



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

Programa Oficial de Postgrau en Biotecnologia

**Mecanismos de regulación de la enzima
ribonucleótido reductasa de *Saccharomyces
cerevisiae* en respuesta a la deficiencia de hierro**

Memoria presentada
por Nerea Sanvisens Delgado
para optar al título de Doctora
por la Universitat de València

Director: Sergi Puig Todolí



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

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

INFORMA:

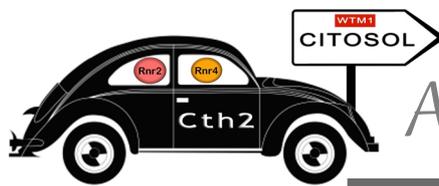
Que Nerea Sanvisens Delgado, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universitat de València ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título “**Mecanismos de regulación de la enzima ribonucleótido reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta a la deficiencia de hierro**”.

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 Valencia.

En Burjassot, Marzo de 2013

Dr. Sergi Puig Todolí

*A mi madre,
por ser mi inspiración...
por quedarse a mi lado.*



Agradecimientos

El trabajo “Mecanismos de regulación de la enzima ribonucleótido reductasa de *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta a la deficiencia de hierro” ha sido financiado con la beca predoctoral BFPI/2008/026 de la Conselleria d’Educació de la Generalitat Valenciana a Nerea Sanvisens. Este trabajo se enmarca dentro de los proyectos “Mecanismos de respuesta a deficiencias en cobre y hierro: aplicaciones agroalimentarias en plantas superiores”, (BIO2005-07120); “Regulación de la expresión génica en deficiencia de cobre y hierro” (BIO2008-02835), y “Caracterización y utilización de mecanismos globales para la obtención y uso alimentario de levaduras industriales enriquecidas en hierro” (AGL2011-29099) del Ministerio de Economía y Competitividad.

Expreso mi mayor gratitud a todos aquellos que han colaborado y contribuido en mi formación como investigadora, así como en la realización de este trabajo:

- Al Dr. Sergi Puig, mi director de tesis, por darme la magnífica oportunidad de iniciarme en la investigación. Por su inmensa dedicación y entrega en este trabajo.

- A la Dra. Lola Peñarrubia por ofrecerme la gran oportunidad de unirme a su grupo. Por su ayuda, críticos consejos e interés mostrado.

- A todos los miembros del laboratorio de Homeostasis del cobre y hierro por facilitarme siempre su ayuda, por su compañerismo.

- A la Dra. Mingxia Huang (*Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Colorado*) por brindarme una de las mejores experiencias de mi vida. Por su supervisión en este trabajo, por orientarme, por todo el tiempo dedicado.

- Al Dr. Juan Carlos Igual y a la Dra. Carmen Bañó, por la colaboración activa en este trabajo, por la multitud de ideas aportadas. A los

Agradecimientos

miembros del laboratorio de Ciclo Celular por toda la ayuda ofrecida, por su compañerismo.

- Al todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València por toda la ayuda recibida y útiles consejos. Al personal administrativo y de servicios por su eficacia.

- A todos los miembros del Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC) por toda la ayuda prestada y el material facilitado.

GRÀCIES a tots aquells que heu format part de la meua felicitat diària durant aquest intens camí, GRÀCIES per fer d'aquest somni una realitat:

A Sergi, per convertir aquesta etapa en una de les millors de la meua vida. Per ser excel·lent com a director: per regalar-me el teu saber (que és infinit), el teu valuós temps, per estar sempre disponible i pendent. Per la constant confiança, suport i múltiples consells. Per la teua paciència, motivació i exigència crítica i rigorosa de la que tant he après. Gràcies per transmetre-me la teua capacitat de treball i completa dedicació. Per contagiarme la teua gran il·lusió per la ciència, ha fet que disfrute plenament d'aquest període. Gràcies enormement per ser més que un director de tesi, per tot el que has fet per mi.

Al lab de Plantes, *el meu lab*. A Toni, per l'ajuda, consells i ànims. Per escriure'm cartes i fer-me "politonos". També a Paco Marco, per fer aquesta etapa tan divertida! A Loreto, por ser todo un ejemplo de altruismo y constancia. Por tus consejos, por escucharme. A Alessandra, por formar parte de los mejores recuerdos. A Nuri, por hacer las cosas más fáciles con esa dulzura que te caracteriza. A Ana, por entenderme mejor que nadie. Gracias a las dos por ser mucho más que compañeras, por ser mis amigas.

A Rosa, *mi dulce locutora de radio*, por tus acertados consejos y ayuda incondicional, por poner paz a mi nerviosismo, por tu confianza y sobre todo, por tu amistad. A Anto, *mi perlita*, por lo mucho que en tan poco tiempo me has ayudado, por tu alegría y cariño, por ser un 10 como compañera! A las dos por hacerme tan feliz. Os dejo en el lab, pero os llevo en mi corazón para siempre.

A lab de Cicle Cel·lular, *la meua segona estada*. A Juan Carlos, per acollir-me i involucrar-se al meu treball. A Carlos, por todos los favores. A Inma, perquè com tu dius, quan ha fet falta i per al que ha fet falta sempre has estat, eres un solet. I a Carme... mesuraria dNTPs per tornar amb vosaltres una estoneta més. Tot un privilegi treballar amb tu. Gràcies per la teua confiança i afecte. Gràcies a tots per fer-me sentir com una més al vostre lab.

A Adri, *mi dj favorita*, por llenar de alegría los días, por "acompañarme" tardes, noches y findes en el 309, por tu complicidad. A Isaac, por haber tenido tiempo, entre risas y vino y más risas, para escucharme. Por hacer inolvidable un congreso! Habéis llegado en el final de esta etapa pero os quedáis conmigo para siempre. Os deseo muchísima suerte, os la merecéis!

Agradecimientos

A dos dels millor regals que esta tesi m'ha donat; el primer a arribar, Elisa, la meua Lisi, per contribuir en aquest treball amb la portada que tanta il·lusió m'ha fet (També a Pere!). Per demostrar que ni el temps ni la distància trenquen una amistad. Y al último, María Soriano, mi Mili, por ser un tesoro como amiga dentro y fuera de la bancada.

A Toni (GFL) per ser un encant. A Ana y Tian, la locura personificada, por ser tan bonicas! A Natalia, per la carrera, el màster, el doctorat, viatges i congressos juntes, per ser una bona companya sempre. A Mercè, per mostrar sempre una sonrisa i a Ernest, per ser tan ideal. A Manolo, perquè sé que en el fons m' aprecies, tant com jo a tu. Gràcies a tots per fer aquesta etapa única. A la resta de membres del Department de Bioquímica, per l'ajuda professional i suport rebut en tot moment. A Merxe Pamblanco, per enamorar-me de la bioquímica amb les teues classes. A Maite Martínez, pels ànims mostrats durant la recta final d'aquest treball. A Maria, Carme, la gent de secretaria, per fer fàcil alló que sembla difícil. A Carmen Alberola, por no equivocarte en tus consejos. Por guiarme y confiar en mi.

A Maria, Ali, Clara, Aurora, Bea, Esther, Meritxel, Fany, Clara, Lupita, Bruno, David Peris, Lidia, Eli...por hacerme sentir como una más desde el primer momento que llegué al IATA. Por vuestro compañerismo, he tenido mucha suerte! Al resto de miembros del Departamento de Biotecnología, por vuestra cordialidad y ayuda siempre que ha sido necesaria. A Andrea, Rachele y Miguel por hacer de su paso por el 309 una de las mejores épocas.

A Marta, la meua Marti, pel suport diari, per ser la millor companya de pis ever, per fer la convivència espectacular! A Javi y Laury, por estar en los mejores momentos y en los peores también. Por todo vuestro apoyo. A Mariam, por valorarme y confiar en mi, por ser tan única, por estar siempre pendiente. Al resto de mis amig@s, por soportar mi estrés, por entender que “estoy siempre ocupada”, por ser un gran apoyo en mi vida.

A los que no nombro y he tenido la suerte de cruzarme durante este camino, gracias también. Por el granito o el montón de arena aportado durante este trabajo, fuera y dentro del laboratorio.

A Sara, la meua indispensable. Per haber plenat aquest camí d'optimisme, de moltes rises i complicitat. Per estar SEMPRE al meu costat. A Cris, la “Esencial” en mi vida. Como

necesitaria un número “infinito” de páginas para agradecerte tanto, lo dejo en un Gracias “Infinito” como el amor que nos une. Gracias por TODO vida. Gracias también a tu familia, por hacerse sentir como la mía.

A mi iaia Luisa, por transmetirme tanta vitalidad. Als meus iaies Manolo i Marina, per ser l'exemple de tirar sempre cap avant. A ma tia Marina, per ser com una mare. A mon tio David, per els teus consells i confiança, per fer-me sentir tan volguda. A Isidoro y Mari Carmen por cuidarme y quererme tanto. Por darme mis dos mayores tesoros, David y María. Al resto de mi familia, por todo el cariño, por alegrarse de mis logros, por hacerme sentir tan afortunada.

To Adam, for giving me so much love. A love full of understanding, of encouragement and support, the most unconditional support of any and so needed to finish this work. A patient kind of love, that even in the distance I have always felt so close to me. Thank you for asking so little in return, for never making any reproach about time spent on my work. From the bottom of my heart, I thank you for respecting my decisions, for following me, and for letting me follow you. “Thank you for sharing this whole new world, a new fantastic point of view, with me”.

Al meu germà, el desig més desitjat de tots, per completar la meua vida. Cada segon invertit en aquest treball és per als meus pares, pel seu amor, per ser admirables. A mon pare, pel teu immens esforç. Per viure per i per a nosaltres. Per ensenyar-me a ser una valenta. Gràcies per fer-me lliure. A mi madre, por no rendirse nunca, por transmetirme su afán de superación, constancia y amor por la ciencia. Por ser una luchadora. Por queremos infinitamente.

Als tres, Gràcies de tot cor per fer-me tan feliç.

ÍNDICE

Listado de abreviaturas.....	1
Introducción.....	3
1. Importancia biológica del hierro	5
2. Mecanismos de respuesta a la deficiencia de hierro en <i>S. cerevisiae</i>	8
2.1. Percepción de la deficiencia de hierro en <i>S. cerevisiae</i>	8
2.2. Adquisición del hierro desde el medio extracelular	11
- Sistema reductivo de alta afinidad	12
- Transportadores de sideróforos	13
- Sistema de baja afinidad	14
2.3. Movilización y reciclaje del hierro	15
2.4. Remodelación metabólica en respuesta a la deficiencia de hierro	16
2.4.1. Regulación post-transcripcional del metabolismo del hierro	17
- Estructura y función de las proteínas Cth1 y Cth2	18
- Mecanismo de acción de la proteína Cth2	20
- Procesos biológicos regulados por Cth1 y Cth2	21
- Regulación de los niveles de Cth1 y Cth2	24
2.4.2. Regulación transcripcional del metabolismo del hierro	24
3. La enzima ribonucleótido reductasa de <i>S. cerevisiae</i>	27
3.1. Estructura y mecanismo catalítico de RNR	28
3.2. Regulación alostérica de RNR	31
3.3. Regulación de RNR en respuesta al estrés genotóxico y durante la fase de síntesis del DNA del ciclo celular	34
3.3.1. Regulación transcripcional de los genes <i>RNR</i>	37

3.3.2. Regulación de la subunidad grande R1 a través de Sml1	42
3.3.3. Localización subcelular de la subunidad pequeña R2	46
Objetivos	51
Materiales y métodos	55
1. Técnica generales de biología molecular	57
1.1. Reacción en cadena la polimerasa	57
1.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	58
1.3. Listado de oligonucleótidos	60
2. Técnica microbiológicas en <i>Escherichia coli</i>	61
2.1. Condiciones de crecimiento	61
3. Técnicas moleculares en <i>Escherichia coli</i>	61
3.1. Construcción y obtención de plásmidos	61
3.2. Listado de plásmidos	63
4. Técnicas microbiológicas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
4.1. Condiciones de crecimiento en medio líquido	64
4.2. Condiciones de crecimiento en medio sólido	65
5. Técnicas moleculares en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
5.1. Transformación de levadura	67
5.2. Obtención de DNA genómico	67
5.3. Construcción de cepas etiquetadas	68
5.4. Listado de cepas de <i>S. cerevisiae</i>	75
5.5. Análisis del contenido de DNA de levadura	76
5.6. Técnicas de microscopía de fluorescencia	76
5.6.1. Inmunofluorescencia indirecta	76

5.6.2. Localización de proteínas etiquetada con GFP	78
5.7. Técnicas de detección de moléculas de RNA	79
5.7.1. Extracción y electroforesis	79
5.7.2. Transferencia de RNA a membrana	81
5.7.3. Obtención y marcaje radiactivo de sondas	82
5.7.4. Hibridación de membranas y cuantificación	82
5.8. Técnica de inmunodetección de proteínas	83
5.8.1. Obtención de extractos proteicos	83
5.8.2. Cuantificación de proteínas	85
5.8.3. Electroforesis y detección de proteínas	85
5.8.4. Listado de anticuerpos	87
5.9. Ensayos de actividad β -galactosidasa en levadura	88
5.10. Ensayo de triple híbrido en levadura	89
5.11. Cuantificación de dATP y dCTP	89

Resultados..... 91

Capítulo 1. Localización subcelular de la subunidad pequeña R2 de la enzima ribonucleótido reductasa en respuesta a la deficiencia de hierro.....	93
1.1 Localización subcelular de Rnr2-GFP y Rnr4-GFP	94
1.2. Estudio cinético de la relocalización núcleo-citoplasma de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP	98
1.3. Funcionalidad de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP	100
1.4. Localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro	101
1.5. Localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa <i>fet3Δfet4Δ</i>	104
1.6. Determinación de los niveles de dATP y dCTP en condiciones de deficiencia de hierro	106

Capítulo 2. Estudio del papel de las quinasas Mec1 y Rad53 en la relocalización subcelular de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro.....	109
2.1. Estado de fosforilación de las quinasas Rad53 y Dun1 en condiciones de deficiencia de hierro	109
2.2. Estudio de la regulación transcripcional de los genes <i>RNR2</i> y <i>RNR4</i> en respuesta a la deficiencia de hierro	113
2.3. Papel de las quinasas Mec1 y Rad53 en la salida al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de déficit de hierro	115

Capítulo 3. Función de las proteínas Cth1 y Cth2 en la regulación de la enzima ribonucleótido reductasa en condiciones de deficiencia de hierro.....	121
3.1. Análisis de los niveles de Wtm1 en condiciones de deficiencia de hierro.	121
3.2. Estudio de la interacción de las proteínas Cth1 y Cth2 con el mRNA <i>WTM1</i> .	124
3.3. Papel de las proteínas Cth1 y Cth2 en la redistribución de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en respuesta deficiencia de hierro	129
3.4. Regulación de la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 a través de las AREs de <i>WTM1</i> en respuesta a la deficiencia de hierro	133
3.5. Regulación de los niveles de dNTPs en respuesta a la deficiencia de hierro a través de las proteínas Cth1 y Cth2	136
3.6. Estudio de los niveles de Rnr2 y Rnr4 durante la deficiencia de hierro.	138

Capítulo 4. Función de la quinasa Dun1 en el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro.....	143
4.1. Localización subcelular en deficiencia de hierro de la subunidad pequeña R2 en mutantes <i>dun1Δ</i>	143
4.2. Importancia del dominio quinasa de Dun1 en la relocalización al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro	144
4.3. Análisis del dominio FHA de la quinasa Dun1 en el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 durante la escasez de hierro	147
4.4. Importancia del residuo T380 de la quinasa Dun1 en la salida de las proteínas Rnr2 y Rnr4 al citoplasma en condiciones de deficiencia de hierro	150
 Capítulo 5. Regulación del inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro.....	 155
5.1. Determinación de los niveles de proteína Sml1 bajo condiciones limitantes de hierro	155
5.2. Función de la quinasa Dun1 en la regulación de los niveles de la proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro	157
5.3. Función del dominio FHA de la quinasa Dun1 en la regulación de los niveles de Sml1	159

5.4. Papel del residuo T380 de Dun1 en la regulación de los niveles de Sml1	160
5.5. Estudio del papel de Mec1 y Rad53 en el control de los niveles de Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro	162
5.6. Papel del proteasoma 26S en la regulación de los niveles de la proteína Sml1 en respuesta a la escasez de hierro	165
5.7. La degradación de la proteína Sml1 en condiciones de escasez hierro depende de sus residuos S56, S58, S60 y S61	168
5.8. Implicación de la ruta proteolítica vacuolar en la degradación de Sml1 en condiciones de baja disponibilidad de hierro	170
Discusión	173
Conclusiones	191
Bibliografía	195

Listado de abreviaturas utilizadas en este trabajo:

ARE	Elemento de secuencia rico en AU, del inglés <i><u>AU Rich Element</u></i>
BPS	Sulfato de bazofenantrolina
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
FAS	Sulfato amónico ferroso
Fe	Hierro
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i><u>Green Fluorescent Protein</u></i>
HU	Hidroxiurea
MMS	Metil metano sulfonato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNR	Ribonucleótido reductasa
TZF	Dominio de dedo de zinc repetido en tándem, del inglés <i><u>Tandem Zinc-Finger domain</u></i> .
UTR	Región no traducible, del inglés <i><u>UnTranslated Region</u></i> .

Introducción

El hierro es un micronutriente esencial para la mayoría de los organismos vivos excepto para algunas bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. La importancia del hierro para la vida viene definida por su participación como cofactor esencial en un gran número de procesos biológicos, entre los que se incluyen la respiración, el transporte de oxígeno, la replicación del DNA y su reparación, la biogénesis de ribosomas y la fotosíntesis. A pesar de que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es baja debido a que se encuentra generalmente presente en forma de hidróxidos y óxidos, los cuales son extremadamente insolubles a pH fisiológico. Este hecho hace que la deficiencia de hierro sea uno de los desórdenes nutricionales más extendidos y comunes a nivel mundial, particularmente en países en desarrollo. Además, se han descrito alteraciones en la homeostasis del hierro en enfermedades humanas como la hemocromatosis hereditaria, la ataxia de Friedrich, la aceruloplasminemia e incluso el cáncer. De esta forma, el conocimiento de los mecanismos que los organismos utilizan para adquirir, utilizar y regular el metabolismo del hierro puede suponer un avance considerable en el desarrollo de nuevas estrategias para tratar de forma más eficiente un elevado número de enfermedades.

1. Importancia biológica del hierro.

El hierro juega un papel central en una amplia variedad de procesos biológicos debido a las propiedades que le confiere la configuración particular de su orbital d. El hierro presenta la capacidad de oscilar fácilmente entre sus dos estados redox; el estado oxidado de hierro o hierro férrico (Fe^{+3}), y el estado reducido de hierro o hierro ferroso (Fe^{+2}). Esta

propiedad permite que el hierro participe en la transferencia de electrones o procesos de oxidación-reducción que tienen lugar durante el transporte de oxígeno en la respiración celular. Además, su capacidad para unirse reversiblemente a una amplia gama de ligandos (átomos de oxígeno, nitrógeno y azufre presentes en pequeñas moléculas orgánicas o en las cadenas laterales de los aminoácidos) convierten al hierro en un cofactor esencial en numerosas actividades enzimáticas celulares (revisado en Sanvisens et al., 2011). El hierro desempeña una función clave en múltiples vías metabólicas incorporándose a las proteínas mediante tres cofactores diferentes. En primer lugar, el hierro es capaz de unirse a la protoporfirina IX formando el grupo prostético hemo de las hemoproteínas. El grupo hemo funciona como grupo prostético en muchas proteínas incluyendo la hemoglobina, donde es esencial para la detección y el transporte de oxígeno molecular en la sangre de organismos vertebrados; en la mioglobina, proteína responsable de almacenar y transportar el oxígeno a los tejidos musculares; y en los citocromos, moléculas capaces de aceptar y donar electrones y generar energía de forma acoplada en cadenas de transporte de electrones fotosintéticas y respiratorias. En segundo lugar, el hierro también puede unirse al azufre y formar los denominados *clusters* hierro-azufre (4Fe-4S, 3Fe-4S, 2Fe-2S). La función más común de los *clusters* Fe-S es su participación como excelentes donadores y aceptores en la transferencia de electrones en una amplia variedad de reacciones biológicas. Los *clusters* Fe-S también ocupan un papel esencial en catálisis enzimática como en la aconitasa o la biotina sintasa. Además, también participan como sensores en la detección de condiciones ambientales o intracelulares para regular la expresión génica. Sin embargo, una de las propiedades que convierte a los

clusters Fe-S en elementos indispensables para la vida y en su defecto al hierro, es su papel en actividades enzimáticas implicadas en funciones como la reparación de daños en el DNA llevado a cabo por la helicasa Rad3 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o en helicasas humanas como XPD y FANCI (revisado en Lill y Mühlhoff, 2008). Estudios recientes han descrito que los *clusters* 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 *clusters* Fe-S (Kispal et al., 2005; Yarunin et al., 2005). Además, en humanos la respuesta a la deficiencia de hierro depende de la presencia de un *cluster* Fe-S en la proteína citosólica reguladora de la homeostasis de hierro IRP1 (revisado en Muckenthaler et al., 2008 y en Rouault, 2006). El hierro también puede formar grupos oxo-dihierro presentes en enzimas que participan en el metabolismo de los esteroides y ácidos grasos, en monooxigenasas bacterianas y en la enzima ribonucleótido reductasa de clase I, esencial para la replicación y reparación del DNA en todos los organismos eucariotas (revisado en Kolberg et al., 2004).

Las mismas propiedades redox que hacen del hierro un micronutriente esencial pueden contribuir a su citotoxicidad dada su alta capacidad de acelerar la producción de especies reactivas de oxígeno. Se ha descrito que, en presencia de oxígeno, el hierro puede participar en reacciones Fenton que dan como resultado la generación de especies de oxígeno altamente reactivas, entre las cuales el radical hidroxilo (OH·) es considerada la más peligrosa. Las células han desarrollado varios sistemas de defensa antioxidantes para combatir el estrés oxidativo, entre los que se incluyen los sistemas enzimáticos de desintoxicación tales como la

superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas, además de sistemas para prevenir daños tales como las tioredoxinas y las glutaredoxinas (revisado en Herrero et al., 2008). Sin embargo, cuando la concentración intracelular de hierro es excesiva, estos mecanismos de defensa pueden ser superados. Si esto ocurre, los radicales libres generados pueden producir daño a diferentes niveles en la célula dada su capacidad para oxidar macromoléculas biológicas tales como determinados aminoácidos, lípidos y el DNA, provocando mutaciones y promoviendo su desestabilización. Además del efecto tóxico que cantidades elevadas de hierro provocan en presencia de oxígeno, dos estudios recientes muestran que niveles elevados de hierro también puede ser tóxicos para las células en condiciones anaeróbicas (Lin et al., 2011; Lee et al., 2012). En concreto, un estudio reciente sugiere que la ruta de síntesis de esfingolípidos está implicada en la toxicidad causada por el exceso de hierro incluso en ausencia de oxígeno (Lee et al., 2012). Lee y colaboradores proponen que los esfingolípidos podrían actuar como moléculas señalizadoras ante un exceso de hierro, ya que la inhibición de la síntesis de esfingolípidos o la sobreexpresión de Orm2, un inhibidor de la síntesis de esfingolípidos, confieren resistencia a cantidades elevadas de hierro. Por todas estas razones, las células han desarrollado mecanismos que permiten a los organismos disponer de suficientes pero no excesivas cantidades de hierro para llevar a cabo sus funciones biológicas.

2. Mecanismos de respuesta a la deficiencia de hierro en *S. cerevisiae*.

2.1. Percepción de la deficiencia de hierro en *S. cerevisiae*.

En la última década, la levadura *S. cerevisiae* ha contribuido de forma considerable al avance en la caracterización de los mecanismos

moleculares que las células eucariotas utilizan para responder a la deficiencia de hierro. Múltiples estudios indican que la eficiencia de síntesis, ensamblaje y exportación de *clusters* Fe-S en la mitocondria actúan como mecanismos reguladores de la activación de la respuesta a niveles tanto insuficientes como excesivos de hierro en organismos eucariotas, independientemente de los niveles de hierro citosólicos (revisado en Lill et al., 2012 y en Sanvisens y Puig 2011). Estudios recientes en *S. cerevisiae* muestran que células mutantes para componentes de la ruta mitocondrial de ensamblaje y exportación de *clusters* Fe-S presentan una remodelación transcripcional característica de células crecidas en condiciones de privación de hierro como es la inducción transcripcional del regulón de hierro (revisado en Hausmann et al., 2008; Miao et al., 2011). El regulón de hierro está formado por un conjunto de unos 25-30 genes que codifican proteínas con funciones implicadas en la adquisición de hierro desde el medio extracelular, en su distribución intracelular a varios compartimentos celulares y su reciclaje, así como en la remodelación de procesos metabólicos dependientes de hierro (revisado en Kaplan y Kaplan, 2009 y en Philpott et al., 2012). La expresión del regulón de hierro está regulada principalmente por el factor de transcripción Aft1 (Casas et al., 1997; Yamaguchi-Iwai, 2002; revisado en Rutherford y Bird, 2004). Bajo condiciones limitantes de hierro, Aft1 induce la transcripción de los genes que forman el regulón de hierro. Para ello, Aft1 entra el núcleo donde reconoce y se une a una secuencia consenso conocida con el nombre de elemento de respuesta a hierro (*FeRE*) presente en la región previa a la secuencia codificante de los genes del regulón de hierro. Se ha propuesto que Aft1 interacciona directamente con el DNA mediante un dominio rico en

residuos básicos situado en su extremo amino terminal y un dominio de activación rico en residuos de glutamina situado en el extremo carboxilo terminal (Ueta et al., 2007). La entrada al núcleo de Aft1 depende de Pse1, una karioferina que reconoce dos secuencias de localización nuclear en Aft1 importándolo al núcleo independientemente de los niveles de hierro (Ueta et al., 2003). A pesar de que Aft1 es uno de los factores transcripcionales mejor estudiados en respuesta al déficit de hierro, el modo en el que Aft1 percibe la deficiencia de hierro sigue acaparando gran interés. Estudios recientes demuestran que en condiciones de suficiencia de hierro una señal de naturaleza desconocida, posiblemente un *cluster* Fe-S, es transportada al citoplasma a través del exportador mitocondrial Atm1. Esta señal promueve la formación de un *cluster* Fe-S que es cargado en las monotiolo glutarredoxinas Grx3/Grx4. Las glutarredoxinas Grx3/Grx4 una vez unidas al *cluster* Fe-S forman un dímero, estructura que es reconocida por Aft1 promoviendo su disociación del DNA, y en consecuencia el silenciamiento transcripcional de los genes del regulón de hierro (Pujol-Carrión et al 2006; Ueta et al., 2012; revisado en Lill et al., 2012). En cambio, en condiciones de deficiencia de hierro o en células que presentan defectos en el ensamblaje y exportación de los *clusters* Fe-S mitocondriales, se ha observado que el regulón está constitutivamente activo (revisado en Lill y Mühlhoff, 2008; Miao et al., 2011). Probablemente, defectos en la ruta mitocondrial de síntesis de *clusters* Fe-S provocan una disminución en el número de moléculas Grx3/Grx4 unidas a *clusters* Fe-S. Como consecuencia, la interacción entre las glutarredoxinas y Aft1 se ve atenuada, hecho que inhibe la separación de Aft1 de sus genes diana promoviendo así su transcripción (Ueta et al., 2012).

El segundo factor transcripcional implicado en la homeostasis del hierro en la levadura *S. cerevisiae* es Aft2, una proteína que guarda un 39% de homología con Aft1. Aft2 es necesario y esencial para regular la respuesta a condiciones de déficit de hierro y a condiciones de estrés oxidativo cuando Aft1 no está presente (Blaiseau, 2001). Estudios anteriores muestran que los factores Aft1 y Aft2 presentan funciones parcialmente solapantes, ya que una cepa doble mutante para estos dos genes es más sensible a condiciones de deficiencia de hierro que una cepa mutante sólo para *AFT1*. Por el contrario, la comparación de genes activados por estos dos factores transcripcionales sugiere que también desarrollan funciones diferentes (Rutherford et al., 2001). Se ha descrito que mientras que Aft1 controla preferentemente la expresión de genes implicados en la absorción de hierro, Aft2 está más implicado en el control de la expresión de genes responsables de la distribución del hierro intracelular como *MRS4* (Courel et al., 2005). En *S. cerevisiae*, Mrs4 participa en el transporte de hierro a la mitocondria, hecho que refuerza la idea de que bajo condiciones de deficiencia de hierro, la mitocondria y en particular la síntesis de *clusters* Fe-S mitocondrial es uno de sus principales destinos (Muhlenhoff, 2003; Froschauer et al., 2009).

2.2. Adquisición del hierro desde el medio extracelular.

La levadura *S. cerevisie* utiliza tres mecanismos principales para incorporar el hierro al interior celular: un sistema reductivo de alta afinidad, un sistema de transportadores de sideróforos y un sistema de baja afinidad.

Sistema reductor de alta afinidad.

En respuesta a la baja disponibilidad de hierro, los factores de transcripción Aft1 y Aft2 activan la expresión de los genes *FRE1*, *FRE2*, *FET3* y *FTR1*. Dada la baja solubilidad que el hierro presenta en estado férrico (Fe^{+3}) a pH no ácido, el sistema reductor de alta afinidad requiere de la previa reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) a su estado ferroso (Fe^{+2}) para poder así ser transportado al interior celular. Este proceso es llevado a cabo por las metaloreductasas Fre1 y Fre2, dos hemoproteínas de membrana que además de reducir hierro, también reducen cobre (Georgatsou y Alexandraki, 1994; revisado en Sanvisens y Puig 2011). Una vez el hierro ha sido reducido, en condiciones aerobias, es transportado al interior celular mediante el sistema de transporte de hierro de alta afinidad Fet3/Ftr1 (Figura I.1). Fet3 es una multicobre ferroxidasa situada en la superficie celular que oxida cuatro moléculas de Fe^{+2} a Fe^{+3} al mismo tiempo que reduce una molécula de oxígeno a agua (De Silva et al., 1995). El Fe^{+3} es transportado al interior celular por Ftr1, permeasa que en condiciones de suficiencia de hierro es ubiquitinada y junto con Fet3 endocitada y degradada por la ruta de proteólisis vacuolar (Severance et al., 2004; revisado en Felice, 2005 y en Sanvisens y Puig 2011).

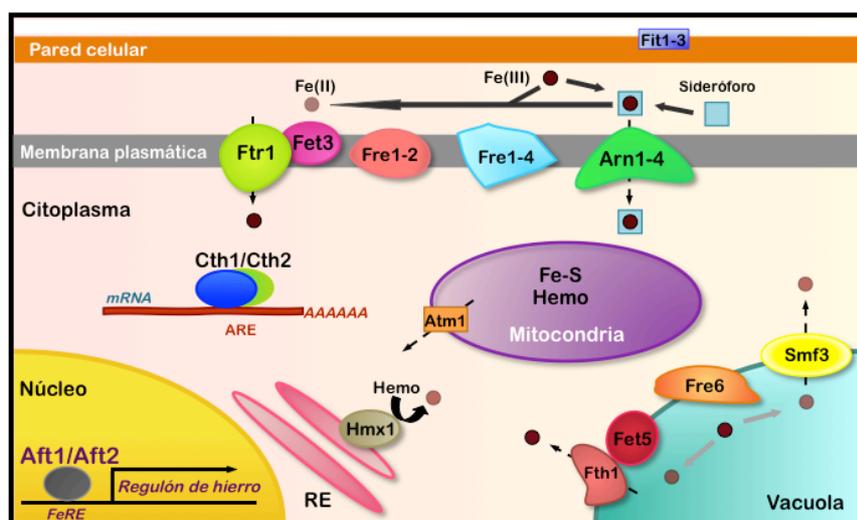


Figura I.1. Activación del regulón de hierro en *S. cerevisiae* como respuesta a la deficiencia de hierro.

Transportadores de sideróforos.

Los sideróforos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan una alta afinidad por el hierro en estado Fe^{+3} (revisado en Kaplan y Kaplan, 2009). Estos compuestos son sintetizados por bacterias, plantas y hongos a excepción de *S. cerevisiae*. A pesar de ello, en condiciones de deficiencia de hierro, *S. cerevisiae* es capaz de utilizar varios complejos Fe^{+3} /sideróforo que otros microorganismos producen. Para ello, los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 activan la expresión de los genes *FIT1-3*, *FRE1-4* y *ARN1-4*. La familia de manoproteínas Fit1-3 facilita el paso del complejo Fe^{+3} /sideróforo a través de la pared celular (Figura I.1) (revisado en Philpott y Protchenko, 2008). El Fe^{+3} unido al sideróforo puede ser reducido por las metaloreductasas Fre1-Fre4 y el Fe^{+2} transportado al interior celular por el complejo Fet3/Ftr1. Alternativamente, el complejo

Fe⁺³/sideróforo puede ser transportado por un sistema no reductivo formado por los transportadores específicos de sideróforos de hierro Arn1-4 (Figura I.1) (revisado en Lesuisse et al., 2001; en Kaplan y Kaplan, 2009 y en Sanvisens y Puig 2011).

Sistema de baja afinidad.

La levadura *S. cerevisiae* bajo condiciones anaerobias transporta el hierro al interior celular mediante un sistema de adquisición de hierro de baja afinidad no dependiente de oxígeno mediado por los transportadores Fet4 y Smf1. Ambos son capaces de transportar otros metales como magnesio, zinc o cobre. La expresión de *FET4* está regulada tanto por los niveles de hierro como por la presencia de oxígeno (revisado en Sanvisens y Puig 2011). Se ha descrito que mientras que en condiciones de déficit de hierro Aft1 activa su expresión, en condiciones aerobias el represor transcripcional Rox1 la reprime, minimizando la toxicidad causada por la entrada de un exceso de metales (Jensen y Culotta, 2002). La dependencia del oxígeno que presentan algunos de los sistemas de adquisición de hierro hacen que sea necesaria la participación adicional de otros factores reguladores como Tup1, Ssn6, Hda1 y Cti6. La síntesis de grupos hemo depende de oxígeno y funciona como sensor de los niveles de oxígeno (revisado en Kwast et al, 1998; Zhang y Hach, 1999). En condiciones de anaerobiosis, los factores Tup1/Ssn6 y Hda1 reprimen la expresión de miembros del regulón como Fet3/Ftr1 cuya función depende de oxígeno. Por otro lado, el factor Cti6 permite la expresión de mecanismos que no dependen del oxígeno o grupos hemo como el sistema de baja afinidad,

desplazando a Tup1/Ssn6 y Hda1 de sus promotores (revisado en Kaplan y Kaplan, 2009).

2.3. Movilización y reciclaje del hierro.

La vacuola es uno de los principales lugares de almacenamiento de hierro en *S. cerevisiae* (Raguzzi et al., 1988). Este almacenamiento depende del transportador de hierro y manganeso vacuolar Ccc1, cuya expresión se activa a través del factor transcripcional Yap5 en respuesta a un aumento en los niveles de hierro que es percibido por un incremento en la síntesis *clusters* Fe-S mitocondrial (revisado en Kaplan y Kaplan, 2009; Li et al., 2012). Por el contrario, en respuesta a la escasez de hierro, los factores transcripcionales Aft1 y Aft2 activan la expresión de *FRE6*, *FET5*, *FTH1* y *SMF3* promoviendo la movilización del hierro desde el interior de la vacuola al citoplasma (Figura I.1). La metaloreductasa Fre6 situada en la membrana vacuolar reduce el hierro Fe^{+3} a Fe^{+2} . El hierro es a continuación transportado al citoplasma a través de un sistema de alta afinidad formando por el complejo Fet5/Fth1, una multicobre oxidasa y una permeasa homólogas a Fet3/Ftr1 respectivamente (Urbanowsk et al., 1999; Singh et al., 2007). El sistema de baja afinidad depende de Smf3, que además de transportar hierro también transporta otros metales de transición (Figura I.1). Al igual que ocurre con Fet4, los niveles de expresión de *SMF3* están regulados tanto por los niveles de hierro como de oxígeno (revisado en Kaplan y Kaplan, 2009 y en Sanvisens y Puig 2011).

Además de la vacuola, el hierro también se encuentra en cantidades importantes en la mitocondria en forma de grupos hemo y *clusters* Fe-S (revisado en Philpott y Protchenko, 2008). De esta forma, proteínas que

contienen *clusters* Fe-S y grupos hemo constituyen un reservorio de hierro que puede ser reutilizado por la célula durante condiciones de déficit del cofactor. En respuesta a deficiencia de hierro, Aft1 induce la expresión de *HMX1*, una hemo-oxigenasa situada en la cara citosólica del retículo endoplasmático que promueve el reciclaje de hierro mediante la degradación de grupos hemo que forman parte de hemoproteínas (Protchenko y Philpott, 2003). Este mecanismo permite que el hierro liberado esté disponible de nuevo para ser reutilizado en procesos metabólicos que dependen del cofactor (Figura I.1).

2.4. Remodelación metabólica en respuesta a la deficiencia de hierro.

Ante niveles insuficientes de hierro, *S. cerevisiae* activa diferentes estrategias que promueven la reorganización del metabolismo celular. Los estudios realizados hasta el momento indican que, en respuesta a la deficiencia de hierro, las células de levadura optimizan la utilización del hierro disponible mediante la represión de procesos metabólicos no esenciales que consumen elevadas cantidades de hierro a beneficio de otros que también requieren del cofactor pero son indispensables para la célula. Este cambio metabólico no se realiza mediante una redistribución del cofactor sino a través de cambios en la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

Uno de los cambios que mejor ilustran esta remodelación metabólica es la síntesis y transporte de biotina. Se ha descrito que la síntesis de biotina depende de hierro en *S. cerevisiae*, puesto que Bio2, enzima que cataliza el último paso de la ruta de biosíntesis, requiere de un *cluster* Fe-S para su actividad (revisado en Marquet et al., 2001). En condiciones baja

disponibilidad de hierro la expresión de *BIO2* disminuye drásticamente evitando así el consumo de hierro. Por otro lado, el factor de transcripción regulado por niveles bajos de biotina Vhr1, así como el factor transcripcional Aft1, inducen la expresión del gen *VTH1*, que codifica un importador de biotina de membrana plasmática, y de *BIO5*, necesario para el transporte de precursores de biotina desde el medio extracelular (Weider, 2006). Por tanto, activando el importe desde el medio exterior e inactivando la ruta biosintética, la célula intenta mantener niveles adecuados de biotina incluso cuando los niveles de hierro son insuficientes para su síntesis.

El metabolismo de aminoácidos también está altamente regulado en condiciones de privación de hierro, dado que son muchos los aminoácidos cuya síntesis depende de enzimas que requieren de hierro como cofactor. La síntesis de glutamato puede llevarse a cabo mediante dos rutas, una ruta controlada por las glutamato deshidrogenasas Gdh1 y Gdh3 e independiente del hierro, y otra ruta controlada por la glutamato sintasa Gln3 y Glt1, dependiente de hierro. En respuesta a deficiencia de hierro, *S. cerevisiae* reprime la transcripción de *GLT1* mientras que activa la de *GDH3* asegurando así la síntesis de glutamato pero a través de una ruta que no implica un consumo de hierro adicional cuando sus niveles son bajos (revisado en Philpott et al., 2012).

2.4.1. Regulación post-transcripcional del metabolismo del hierro.

Una de las proteínas cuyo mecanismo de acción implica cambios relevantes y esenciales en el mantenimiento de la homeostasis del hierro es Cth2 (del inglés *Cysteine-Three Histidine 2*). En respuesta a falta de hierro, Aft1 y Aft2 reconocen y se unen a dos secuencias *FeRE* situadas en el promotor de *CTH2* induciendo fuertemente su expresión (Puig et al., 2005).

Cth2 es una proteína soluble que se mueve entre el citoplasma y núcleo de la célula (Vergara et al., 2011), y remodela diversas actividades biológicas en respuesta a condiciones de deficiencia de hierro a través de la degradación específica de mensajeros de RNA (Figura I.1) (Puig et al., 2005).

Estructura y función de las proteínas Cth1 y Cth2.

El gen *CTH2* codifica una proteína de 285 aminoácidos cuya característica más notoria es la presencia de dos dominios de dedos de zinc repetidos en tándem (TZF, del inglés *Tandem Zinc-Finger*) y situados en su región carboxilo terminal. Los dominios de dedos de zinc de la proteína Cth2 están formados por residuos de cistidina e histidina manteniendo la siguiente forma: $Cx_8Cx_5Cx_3H$ (donde x representa un aminoácido variable) (Figura I.2., panel A) (Thompson et al., 1996). A diferencia del resto de la proteína, el TZF está altamente conservado en organismos eucariotas (revisado en Ciaïis et al., 2012). La proteína tristetraprolina (TTP o Tis11), homóloga a Cth2 en humanos, presenta la capacidad de unirse a mRNAs a través de su dominio TFZ. Después de su unión, TTP acelera la desestabilización de múltiples mRNAs. De forma similar a lo que ocurre con TTP, los dominios TFZ de Cth2 le permiten unirse a elementos ricos en secuencias adenina y uridina conocidos con el nombre de elementos ricos AU o AREs (ARE, del inglés *AU Rich Element*) situados en la región 3' no-traducida (3'-UTR, del inglés *UnTranslated Region*) de sus mensajeros diana. Aunque el dominio TZF reconoce de forma más favorable nonámeros de ARE (5'-UUUUUUUU-3'), se ha descrito que otras secuencias ricas en nucleótidos de uridina que contienen algún motivo AU_nA ($n=2-5$) también pueden ser reconocidas por el dominio TZF aunque la afinidad por ellas sea más

moderada (revisado en Sanvisens y Puig 2011). De esta manera, en respuesta a la deficiencia de hierro, Aft1 y Aft2 inducen la expresión de la proteína Cth2, la cual reconoce y se une a las AREs presentes en mensajeros que codifican proteínas implicadas en procesos celulares dependientes de hierro acelerando su degradación (Puig et al., 2005). Puig y colaboradores han descrito que para que la interacción entre Cth2 y el mRNA diana tenga lugar debe de mantenerse la integridad de ambos. Si los dedos de zinc de Cth2 son mutagenizados en uno de sus residuos cisteína (como por ejemplo la cisteína 190 del primer dominio TZF), o las AREs del mRNA diana son eliminadas o mutadas, la interacción y posterior degradación no tienen lugar (Puig et al., 2005). Varios estudios sugieren que la región amino terminal de Cth2 desempeña un papel importante en el reclutamiento de la maquinaria específica de degradación de mRNAs así como en la elección del lugar de corte y poliadenilación de mRNAs con AREs (Proteau et al., 2008; Ciais et al., 2008).

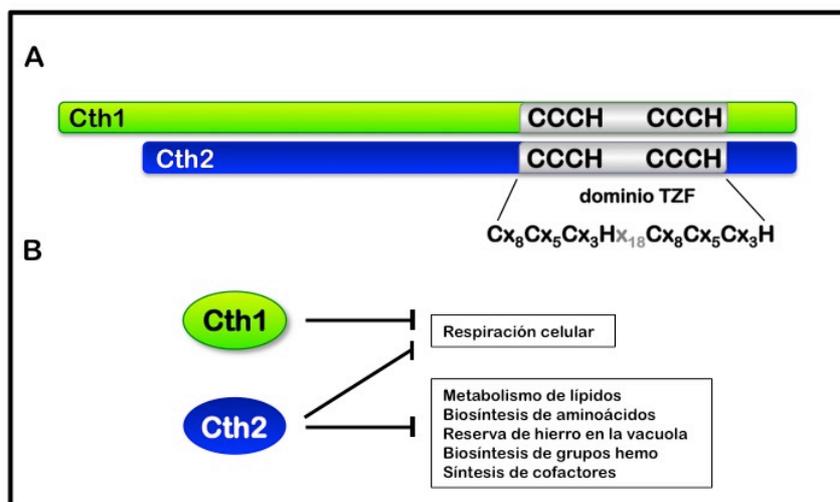


Figura I.2. Las proteínas Cth1 y Cth2 remodelan el metabolismo en respuesta a la deficiencia de hierro a través de un mecanismo post-transcripcional. (A) Representación esquemática de la estructura de Cth1 y Cth2. En el esquema se representan los dos dominios de dedos en zinc (dominio TZF) repetidos en tandem. (B) Procesos reprimidos en condiciones de deficiencia de hierro por las proteínas Cth1 y Cth2.

Mecanismo de acción de la proteína Cth2.

La proteína Cth2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula (Vergara et al., 2011). Se ha observado que Cth2 se acumula en el núcleo de la célula en tres circunstancias: células deficientes en la exportación de mRNAs como los mutantes *mex67-5* o *xpo1-1*, adición de inhibidores de la transcripción como la tiolutina, y mutantes Cth2 incapaces de unirse a sus mRNAs diana (Vergara et al., 2011). Estos resultados indican que la salida de Cth2 del núcleo sólo se produce junto con sus mRNAs diana. Ensayos de doble híbrido muestran que la proteína Cth2 interacciona in vivo con la RNA helicasa Dhh1 (Pedro-Segura et al., 2008). Se ha descrito que Dhh1 forma un complejo con las enzimas de *decapping*

Dcp1 y Dcp2 que favorece el movimiento de mRNAs en traducción activa hacia un estado de represión traduccional o su degradación 5'-3' por la exonucleasa Xrn1 en cuerpos proteicos citoplasmáticos denominados cuerpos de procesamiento o *P-bodies* (Coller et al., 2004). Pedro-Segura y colaboradores han demostrado que Cth2 no promueve la degradación del mRNA *SDH4* en ausencia de *DHH1* (Pedro-Segura et al., 2008). A pesar que la formación de *P-bodies* no se produce en condiciones de limitación de hierro, Cth2 se acumula en estos macrocomplejos en mutantes *xrn1Δ* (Pedro-Segura et al., 2008). Además, mediante la utilización de estructuras secundarias de mRNA que bloquean el avance de las exonucleasas se ha podido demostrar que Cth2 promueve la degradación 5'-3' del mRNA *SDH4*. Todos estos resultados sugieren un modelo en el que la proteína Cth2 entraría al núcleo de la célula donde se produciría la unión a sus mRNAs diana. A continuación, el complejo Cth2-mRNA sería exportado al citoplasma a través de la maquinaria de exportación de mRNAs. La degradación del mRNA por la exonucleasa 5'-3' Xrn1 se produciría en el citoplasma. Una vez degradado el mRNA diana, Cth2 quedaría libre para iniciar un nuevo ciclo de degradación.

Procesos biológicos regulados por las proteínas Cth1 y Cth2.

Análisis globales de expresión génica en respuesta a niveles bajos de hierro han mostrado que *S. cerevisiae* utiliza la proteína Cth2 para promover la desestabilización de un gran número de mRNAs que codifican proteínas que, o bien utilizan el hierro como cofactor o participan en rutas metabólicas que requieren de hierro en alguna de las etapas o en múltiples pasos (Puig et al., 2005). La mayoría de estos mRNAs poseen AREs consenso en su región

3'UTR. Entre estos mRNAs, se encuentran muchos que codifican proteínas implicadas en la respiración mitocondrial, incluyendo muchos miembros de los distintos complejos respiratorios y del ciclo del ácido cítrico, tales como la succinato deshidrogenasa y la aconitasa. Otros codifican proteínas implicadas en la síntesis de grupos hemo como por ejemplo la ferroquelatasa Hem15 o la hemoproteína Cox10 y en la síntesis de *clusters* Fe-S, como las enzimas Isa1 y Nfu1. También se han observado mRNAs que están implicados en el metabolismo de lípidos, incluyendo la síntesis de esteroides, esfingolípidos y ácidos grasos insaturados, o bien implicados en el metabolismo de aminoácidos, tales como leucina, isoleucina, valina, lisina, glutamato, metionina o cisteína (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008; revisado en Sanvisens y Puig 2011 y en Philpott et al., 2012). Así pues, Cth2 promueve la degradación coordinada de mRNAs que codifican componentes de rutas dependientes de hierro (Puig et al., 2005). La proteína Cth2 también inhibe el almacenaje de hierro en la vacuola mediante la degradación del mRNA de *CCCI*, que codifica el importador vacuolar de hierro (Puig et al., 2005). Esta estrategia permite a las células incrementar la disponibilidad de cofactor en condiciones de deficiencia (Figura I.2., panel B).

En respuesta a la deficiencia de hierro, *S. cerevisiae* induce a través de Aft1 y Aft2 la expresión del gen *CTH1*. La proteína Cth1 presenta dos dominios TZF, y un 46% de identidad con Cth2 (Figura I.2., panel A). Se ha observado que dobles mutantes *cth1Δcth2Δ* presentan mayores defectos de crecimiento bajo condiciones de deficiencia de hierro que mutantes simples *cth1Δ* y *cth2Δ*. Se ha propuesto que la proteína Cth1 reconoce y se une a las AREs presentes en mRNAs que codifican proteínas implicadas en procesos dependientes del hierro (Figura I.2., panel B) (Puig et al., 2008). Además, se

ha observado que la proteína Cth1 también recluta a la RNA helicasa Dhh1 para promover la degradación de mRNAs diana a través de un mecanismo similar al de Cth2 (Puig et al., 2008). Se ha observado que el mRNA *CTH1* se expresa de forma transitoria durante las primeras etapas de la deficiencia de hierro (Puig et al., 2008). En cambio, el mRNA *CTH2* se expresa durante las fases más severas de la deficiencia de hierro y de forma más robusta y estable (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008). Se ha sugerido que las diferencias observadas en los patrones de expresión y en sus dominios TZF contribuyen a la diferente preferencia por sus mRNAs diana (Puig et al., 2008). La actividad coordinada de ambas proteínas puede permitir la adaptación continua a los cambios en la disponibilidad de hierro. Durante las primeras fases de la deficiencia de hierro, pequeñas fluctuaciones en los niveles de proteína Cth1 podrían ser suficientes para adaptarse, remodelando principalmente funciones mitocondriales. En cambio, cuando el déficit de hierro es más severo, la proteína Cth2 es fuertemente inducida provocando cambios en otras rutas metabólicas dependientes de hierro. Se ha observado que en condiciones de deficiencia de hierro, células mutantes para *CTH1* y *CTH2* producen un incremento en mRNAs que codifican proteínas implicadas en la adquisición y almacenamiento de glucosa y un cambio en la migración electroforética de Snf1, regulador central del metabolismo de carbohidratos (Puig et al., 2008). Esta posible conexión entre la homeostasis de hierro y cambios en el metabolismo de carbohidratos podría ser debida una mayor una necesidad de glucosa que compense la pérdida de producción de energía que supone la inhibición del metabolismo respiratorio.

Regulación de los niveles de Cth1 y Cth2.

Recientemente se ha descrito un mecanismo de regulación post-transcripcional que controla los niveles de expresión de *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). Durante la progresión de la deficiencia de hierro, los niveles de proteína Cth2 aumentan y aceleran la degradación del mRNA *CTH1*, restringiendo así la expresión de Cth1 a las etapas iniciales de limitación de hierro, y dejando Cth2 como regulador principal durante la deficiencia de hierro más severa o prolongada. Martínez-Pastor y colaboradores proponen que esta regulación podría establecer la prioridad en la que los procesos dependientes de hierro son regulados durante la progresión de la deficiencia de hierro. En este mismo trabajo se describe que la autorregulación de Cth2 sobre su mRNA limita su propia expresión, evitando una acumulación excesiva que podría ser perjudicial para la supervivencia celular. Se ha observado que cuando las células se transfieren de condiciones de deficiencia a suficiencia de hierro, el mecanismo de autorregulación de Cth2 favorece la desaparición rápida de la proteína. Esta disminución en los niveles Cth2 favorece la activación de procesos dependientes de hierro, como la respiración celular, que permiten una readaptación más eficiente a la suficiencia de hierro.

2.4.2. Regulación transcripcional del metabolismo del hierro.

Cuando los niveles de hierro y oxígeno son bajos, la síntesis de grupos hemo en *S. cerevisiae* disminuye. El factor transcripcional Hap1, el cual requiere de grupos hemo para su actividad transcripcional, es uno de los principales sensores de oxígeno en esta levadura (Zhang y Hach, 1999). En

presencia de oxígeno, y por tanto de grupos hemo, Hap1 induce la transcripción de *CYCI*, gen que codifica una hemoproteína que forma parte del citocromo *c* de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Ante una situación de deficiencia de hierro, los niveles de grupos hemo disminuyen y con ello la actividad de Hap1, provocando una bajada en los niveles del mRNA *CYCI* (Ihrig et al., 2010). Además de esta regulación a nivel transcripcional, las proteínas Cth1 y Cth2 promueven la degradación del mRNA *CYCI* en condiciones de deficiencia de hierro (Ihrig et al., 2010).

En la ruta de biosíntesis de leucina participan dos enzimas que requieren de *clusters* Fe-S para su actividad, Leu1 y Ilv3. El producto de la reacción que cataliza la enzima Ilv3, α -isopropil malato (α -IPM), actúa como co-activador de Leu3, factor de transcripcional responsable de activar la expresión de genes implicados en la biosíntesis de leucina, entre ellos *LEUI* (revisado en Sanvisens y Puig, 2011 y en Philpott et al., 2012). En condiciones de deficiencia de hierro, la disminución en los niveles de *clusters* Fe-S provoca la inactivación Ilv3 y esto se traduce en una bajada de los niveles α -IPM. Este hecho conduce a una disminución de la actividad de Leu3 y por tanto también a una menor expresión del gen *LEUI*. Además de este control a nivel transcripcional, se ha descrito que el mRNA *LEUI* contiene dos AREs en su región 3'UTR que son reconocidas por las proteínas Cth1 y Cth2, las cuales inducen su degradación en condiciones de escasez de hierro (Ihrig et al., 2010).

El metabolismo lipídico también está afectado bajo condiciones de deficiencia de hierro. Ole1, Sur2 y Scs7 son enzimas dependientes hierro que intervienen en la síntesis de ácidos grasos y en el metabolismo de los

esfingolípidos. Se ha observado que bajo condiciones de deficiencia de hierro los niveles de Sur2 y Scs7 disminuyen, situación que provoca la acumulación de esfingolípidos; en cambio, la transcripción de *OLE1* aumenta. De estas tres enzimas, Ole1 es la única esencial. Además de estar regulada a nivel transcripcional, estudios previos sugieren que Ole1 parece mostrar una resistencia específica a desmitalinas que le permiten mantener su actividad (revisado en Dickson, 2008 y en Philpott et al., 2012). La ruta de biosíntesis de ergosterol también está regulada en condiciones de escasez de hierro debido a la dependencia por el cofactor que presentan las enzimas Erg25 y Erg3, dos hemoproteínas, y Erg11 y Erg5, enzimas con un grupo oxo-dihierro. La pérdida de actividad de estas enzimas conduce a una acumulación de intermediarios de la ruta bajo condiciones de baja biodisponibilidad de hierro (Bagnat y Simons, 2002; Shakoury-Elizeh et al., 2010). Tanto la disminución en los niveles celulares de ergosterol, como el cambio en la composición de los esfingolípidos que se produce en respuesta a la deficiencia de hierro afecta a la composición de las membranas celulares y la función de las proteínas integrales de membrana sensibles a su entorno lipídico (Bagnat y Simons, 2002; revisado en Dickson et al., 2008 y en Philpott et al., 2012).

El transporte de hierro a la vacuola es uno de los procesos que se inhibe en respuesta a la deficiencia de hierro para evitar un mayor agotamiento del hierro citosólico. Se ha descrito que en condiciones de deficiencia de hierro, el factor transcripcional Yap5 no activa la transcripción de *CCCI* (Li et al., 2008). Por lo tanto, la regulación coordinada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional de *CCCI* en respuesta a la deficiencia de hierro garantiza plenamente que el hierro no

sea almacenado en estas condiciones, quedando disponible para otras funciones metabólicas.

La modulación de la expresión génica descrita permite a las células adaptar su metabolismo, especialmente en rutas dependientes de hierro, en respuesta a la escasez de este metal. Sin embargo, la resistencia que presentan diferentes enzimas que contienen hierro como aquellas que requieren de *clusters* Fe-S sugiere que *S. cerevisiae* no regula el suministro de hierro a un único cofactor, enzima o vía, ni atenúa la actividad de todos los procesos celulares dependientes de hierro, sino que por el contrario esta levadura parece dar prioridad a la utilización del hierro cuando es escaso mediante la regulación de la transcripción y la estabilidad de mRNAs de genes que codifican proteínas implicadas en procesos dependientes de hierro.

3. La enzima ribonucleótido reductasa de *S. cerevisiae*.

El objetivo principal del ciclo celular es la transmisión fiel del genoma de células madres a hijas, garantizando la integridad genómica. Cada vez son más los estudios que apoyan la existencia de una estrecha relación entre la homeostasis del hierro y la inestabilidad genómica otorgando al hierro una función esencial en la supervivencia celular. Como se ha comentado en líneas anteriores, mientras que el exceso de hierro en condiciones aerobias se asocia principalmente a la producción de especies reactivas de oxígeno causando estrés oxidativo responsable de dañar moléculas de DNA (Bystrom et al., 2012), su escasez afecta a la función de un gran número de proteínas y enzimas implicadas tanto en la progresión del ciclo celular y en la síntesis del DNA, como en la reparación de daños en

este. Se ha observado que en células de mamíferos dada la dependencia por el hierro de algunas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, bajo condiciones de déficit del cofactor, la expresión de estas se ve afectada provocando una parada de las células en la fase G1/S y en la transición G2/M del ciclo celular, e incluso muerte celular por apoptosis (Yu et al., 2007).

Para garantizar la integridad genómica, uno de los procesos esenciales que las células eucariotas controlan es el mantenimiento adecuado de los niveles de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs), asegurando así una alta fidelidad tanto en la replicación durante la proliferación celular como en la reparación de daños en el DNA. En *S. cerevisiae* la actividad de la enzima esencial ribonucleótido reductasa (RNR) está altamente regulada tanto durante el ciclo celular como en respuesta a daños en el DNA, con el objetivo de mantener niveles adecuados de dNTPs (revisado Elledge y Davis, 1990). La regulación de RNR es un proceso crítico y esencial para las células ya que un desequilibrio en los niveles de dNTPs implica un aumento en la tasa de mutación e incluso la muerte celular (Chabes et al., 2003; Nick McElhinny et al., 2010).

3.1. Estructura y mecanismo catalítico de RNR.

RNR es una enzima esencial responsable de catalizar el paso limitante en la biosíntesis de dNTPs en todos los organismos, desde procariotas hasta eucariotas. La RNR cataliza la reducción del grupo 2'OH de un ribonucleósido di o tri-fosfato a un átomo de hidrógeno sintetizando los diferentes dNDPs a partir de los correspondientes ribonucleósidos (NDPs). El mecanismo de acción de RNR implica la formación transitoria de

un radical tiol necesario para iniciar la catálisis enzimática y la regeneración del sitio activo de la enzima (revisado en Sanvisens et al., 2013). Existen tres clases de RNRs, todas ellas están constituidas por dos componentes, un componente generador de un radical y un componente reductor. Se ha descrito que mientras que el componente generador del radical es diferente entre ellas, el componente reductor es bastante similar, generalmente un radical cisteinil ($S\bullet$) (revisado en Eklund et al., 2001 y en Larsson et al., 2004). El componente generador produce y alberga un radical responsable de activar al componente reductor. En función de la naturaleza del radical y de la interacción con el oxígeno, las RNRs se clasifican en clase I, II y III. Sin embargo, a pesar de las grandes diferencias en las secuencias de aminoácidos, las tres clases de RNRs presentan características estructurales muy similares, hecho que sugiere la existencia de un origen evolutivo común (Kolberg et al., 2004).

Las RNRs de clase I están presentes en todos los organismos eucariotas así como en algunos procariotas y algunos virus de DNA como los herpes virus. En eucariotas, las RNRs de clase Ia requieren tanto de oxígeno como de hierro para su función y están formadas por una subunidad R1 (o α) y una subunidad R2 (o β). La subunidad R1 contiene el sitio catalítico y dos sitios de unión a efectores alostéricos que determinan la preferencia por el sustrato y la actividad global. La subunidad R2 alberga un centro dinuclear de hierro (Fe-O-Fe) y un radical tirosil ($Y\bullet$) requerido para la catálisis enzimática. El $Fe^{3+}_2-Y\bullet$ de la subunidad R2 inicia una ruta de transferencia acoplada de protones y electrones que conlleva la formación de un radical tiol reversible y transitorio en el sitio activo de la subunidad R1, responsable de iniciar la reducción del sustrato en cada sitio catalítico. La

regeneración de RNR a su estado activo requiere de la reducción de un par de cisteínas oxidadas conservadas en la subunidad R1. Este último paso es llevado a cabo por tioredoxinas o glutaredoxinas que utilizan el NADPH como fuente de poder reductor (revisado en Nordlund y Reichard, 2006; Cotruvo y Stubbe, 2011). En *S. cerevisiae* la subunidad grande R1 está formada por un homodímero Rnr1 ($\alpha\alpha$), mientras que la subunidad pequeña R2 está formada por un heterodímero compuesto por las proteínas Rnr2 y Rnr4 ($\beta\beta'$). A diferencia del resto de eucariotas, en esta levadura sólo el monómero β (o proteína Rnr2) del heterodímero $\beta\beta'$ de la subunidad pequeña R2 alberga el radical tirosil y el centro dinuclear de hierro ($\text{Fe}^{+3} \text{-Y}\bullet$). El centro dinuclear de hierro es necesario para la generación del radical tirosil y su estabilidad. Por el contrario, la proteína Rnr4, a pesar de presentar alta homología con la proteína Rnr2, carece de varios residuos lisina conservados que son esenciales para la unión del hierro y por tanto no puede formar el radical tiol (Huang y Elledge, 1997; Nguyen et al., 1999). A pesar de esta diferencia, se ha observado que un mutante *RNR4* es letal o condicionalmente letal (en función del fondo genético), característica que subraya su importante papel en la función de RNR (Huang y Elledge, 1997; Wang et al., 1997). En consonancia con esta observación, diversos estudios realizados *in vitro* e *in vivo* sugieren que la proteína Rnr4 contribuye de forma esencial al correcto plegamiento y ensamblaje del cofactor $\text{Fe}_2^{+3}\text{-Y}\bullet$ en la proteína Rnr2 (revisado en Sanvisens et al., 2013). Trabajos recientes demuestran que la adquisición de hierro por parte de la proteína Rnr2 depende de las monotiol glutaredoxinas citosólicas Grx3 y Grx4, responsables del suministro de hierro a múltiples proteínas (Zhang et al., 2011; Mühlhoff et al., 2010). Además, también se ha observado una

disminución tanto de la actividad específica de RNR como en los niveles del radical tirosilo en células que carecen de Dre2, proteína que presenta un *cluster* Fe-S (Zhang et al., 2011).

Como se ha descrito en líneas anteriores, la subunidad grande R1 se compone de un homodímero formado por la proteína Rnr1 esencial para la viabilidad mitótica. Además de Rnr1, se ha descrito que *S. cerevisiae* expresa una segunda proteína que puede formar parte de la subunidad grande y que recibe el nombre de Rnr3 (revisado en Sanvisens et al., 2013). A diferencia de Rnr1, Rnr3 no es esencial para la supervivencia celular y sus niveles de expresión son muy bajos. Se ha observado que su sobreexpresión rescata la letalidad de mutantes *RNR1*. Aunque se desconoce la función fisiológica de Rnr3, diversos estudios han mostrado que a pesar de la baja actividad específica que presenta, la actividad endógena de Rnr3 puede compensar los defectos de crecimiento un mutantes *RNR1* catalíticamente inactivos asociándose a Rnr1 y aumentando la síntesis de dNTPs (Domkin, 2002; Kumar et al., 2010).

3.2. Regulación alostérica de RNR.

Se ha descrito que la cantidad de dNTPs presentes en la fase S del ciclo celular son suficientes para la replicación completa del DNA. Con el objetivo de evitar un exceso de dNTPs durante esta fase, los organismos eucariotas regulan la actividad de la enzima RNR mediante un mecanismo de regulación alostérica. En *S. cerevisiae*, la RNR es la única fuente de producción *de novo* de los cuatro tipos de dNTPs necesarios para la síntesis de DNA y su reparación. Por lo tanto, es fundamental que los niveles de dNTPs se mantengan de forma equilibrada. Se ha descrito que las tasas de

mutación aumentan cuando los niveles de dNTPs no están equilibrados o están presentes en cantidades demasiado elevadas (revisado en Hofer et al., 2012). Como se ha comentado en líneas anteriores, RNR cataliza la reducción de los cuatro tipos de ribonucleósidos mientras mantiene en balance sus productos, desoxirribonucleósidos, mediante un sofisticado mecanismo *feedback* de regulación alostérica a través de la subunidad R1. Cada monómero Rnr1 contiene dos sitios reguladores distintos: el sitio especificidad (o sitio S) y el sitio de actividad (o sitio A). El sitio S, que está situado en la interfase del dímero, actúa como sensor de la concentración individual de cada dNTP y determina qué sustrato se reduce en el sitio catalítico. Cuando el efector alostérico se une al sitio S, se altera la conformación de un bucle flexible que transmite la señal específica al sitio catalítico para que sea más susceptible de discriminar entre los diferentes sustratos, manteniendo así un equilibrio entre los cuatro tipos de dNTPs (revisado en Sanvisens et al., 2013). De esta manera, ATP y dATP promueven la reducción de CDP y UDP; dTTP aumenta la tasa de reducción de GDP y el dGTP promueve la reducción de ADP. Por otro lado, el sitio A actúa como un interruptor principal controlando de forma general la actividad enzimática de RNR, a partir de la proporción dATP (que actúa como inhibidor)/ATP (que actúa como activador). A pesar de que el ATP está presente en cantidades más abundantes en la célula, el dATP tiene una mayor afinidad para el sitio A. Se ha descrito que cuando la concentración de dATP alcanza un cierto nivel, la actividad RNR es inhibida por la propia acción del dATP (revisado en Sanvisens et al., 2013). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en células de mamífero, se ha descrito que en *S. cerevisiae* la actividad RNR no es inhibida por los niveles fisiológicos de

dATP y aunque la afinidad por el dATP es mucho más alta en el sitio de especificidad alostérica, el efecto inhibitorio es solo significativo cuando las concentraciones de dATP son muy altas. De esta forma, este tipo de regulación *feedback* “relajada” asegura que haya un balance para los cuatro tipos diferentes dNTPs (Chabes et al., 2003). Chabes y colaboradores proponen que durante la fase G1, cuando los niveles de expresión de los genes *RNR* son bajos y la actividad de la enzima es mínima, también lo es la concentración de dNTPs. En cambio, durante la fase S (de síntesis del DNA), cuando se induce la transcripción de los genes *RNR*, la actividad del enzima aumenta y con ella también los niveles de dNTPs. Se ha descrito que la proteína Rnr3 no es inhibida por el dATP lo cual podría conferir una ventaja al heterodímero Rnr1-Rnr3 para evitar daños en el DNA. Sin embargo, no se ha observado ninguna disminución de los niveles de dNTPs en células que no expresen *RNR3* en presencia de agentes que dañan el DNA (Domkin, 2002; Chabes et al., 2003).

Estudios realizados en células de mamífero y en *S. cerevisiae* sugieren que sin efectores de nucleótidos la subunidad grande R1 existe como un monómero inactivo α . Tras la unión al sitio S del ATP, dATP, TTP o dGTP, la subunidad grande R1 forma dímeros α , que pueden dar lugar a heterotetrámeros activos $\alpha_2\beta_2$ ($\alpha_2\beta\beta'$ en el caso de *S. cerevisiae*) (Rofougaran et al., 2006). Los datos estructurales y funcionales indican que la unión del dATP al sitio A promueve la asociación de tres dímeros α_2 para formar un hexámero α_6 , que sólo puede interactuar con una sola subunidad pequeña R2 formando un complejo inactivo $\alpha_6\beta_2$ ($\alpha_6\beta\beta'$ en el caso de *S. cerevisiae*) (Fairman et al., 2011; revisado en Sanvisens et al., 2013). Según este modelo, probablemente los cambios conformacionales que acompañan al

dATP interrumpen la interacción estable entre las subunidades de R1 y R2 reprimiendo la cadena de transporte de electrones acoplada a la enzima. Por otro lado, cuando disminuyen los niveles de dATP, la unión del ATP en el sitio A puede promover cambios conformacionales estructuralmente diferentes en el complejo $\alpha_6\beta_2$, que incrementan la actividad catalítica de RNR (revisado en Hofer et al., 2012 y en Sanvisens et al., 2013).

3.3. Regulación de RNR en respuesta al estrés genotóxico y durante la fase de síntesis del DNA del ciclo celular.

Las células han desarrollado mecanismos de regulación de los niveles de dNTPs con el objetivo de mantener un balance equilibrado que permita una adecuada progresión del ciclo celular, reparar el daño y preservar la estabilidad genómica (Lowdon y Vitols 1973). Para ello, *S. cerevisiae* regula la actividad de RNR a través del *checkpoint* de integridad del DNA controlado por la ruta quinasas Mec1-Rad53-Dun1. El *checkpoint* de integridad del DNA es un mecanismo de vigilancia y supervivencia que coordina distintos aspectos del metabolismo cromosómico con la progresión del ciclo celular respondiendo a todo tipo de lesiones en el DNA. Su puesta en marcha conduce a la parada de la progresión del ciclo celular así como a la activación de mecanismos de reparación de daños en el DNA. Fallos en los controles del *checkpoint* comprometen la viabilidad celular debido a que provocan defectos en el bloqueo del ciclo celular que producen un descenso en la resistencia celular a estreses genotóxicos (Glover, 2006; Kolodner et al., 2002). Los componentes centrales del *checkpoint* de integridad de daños en el DNA son quinasas de la familia de la fosfatidilinositol 3 quinasa conocidas en humanos como ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) y ATR

(*Ataxia-Telangiectasia mutated* y *Rad3-related*) y en *S. cerevisiae* como Tel1 y Mec1, respectivamente.

En respuesta al estrés genotóxico, se produce la unión de un complejo sensor a la zona del DNA donde se ha producido el daño. Este complejo sensor recluta a Mec1, principal quinasa sensora y transductora de la señal de daño en el DNA (revisado en Harper y Elledge, 2007). La proteína Mec1 reconoce un motivo de difosfotreoninas (SQ/TQ) en la quinasa transductora de la señal Rad53 que fosforila promoviendo su autofosforilación y completa activación (Sanchez et al., 1996; Sun et al., 1996; Lee et al., 2003; Schwartz et al., 2003; Ma et al., 2006; Berens y Toczyski, 2012). La quinasa Rad53 interacciona a través de sus dominios FHA (*ForkHead-Associated*) con Rad9, mecanismo que favorece su autofosforilación (de la Torre et al., 1998; Sweeney et al., 2005). La hiperfosforilación que la quinasa Rad53 experimenta en presencia de daños en el DNA se puede observar mediante *immunoblot* debido a la presencia de bandas retardadas correspondientes a sus distintos estados de fosforilación, lo que permite monitorizar fácilmente la activación del *checkpoint*. La activación de Rad53 permite retrasar la progresión del ciclo celular, promover procesos de reparación, estabilizar las horquillas de replicación y regular la transcripción (revisado en Branzei y Foiani, 2005). Los mutantes *mec1Δ* y *rad53Δ* son letales debido a los bajos niveles de dNTPs que provocan una gran cantidad de reordenaciones cromosómicas espontáneas en comparación con células de una cepa silvestre (Aparicio et al., 1999; Myung et al., 2001; Cobb et al., 2005).

La quinasa Dun1 es una de las principales dianas de la proteína Rad53. Se ha descrito que la activación de Dun1 requiere la fosforilación por

Rad53 (Chen et al., 2007). La quinasa Dun1 se identificó como mutante nulo en la activación transcripcional de los genes que codifican *RNR* en respuesta al daño en el DNA (revisado en Zhou y Elledge, 1993) y posteriormente se ha demostrado que también se requiere para la inducción de otros genes en respuesta a daños en el DNA (Basrai et al., 1999; Y y W, 2001; revisado en Fu et al., 2008). Datos genómicos han mostrado que la supresión de *DUN1* afecta a la expresión de más de 1000 genes en respuesta a estrés genotóxico. Además, la respuesta del mutante *dun1Δ* es en gran parte la misma que la observada en el mutante *mec1Δ*, lo cual sugiere que la mayor parte de los efectos de la quinasa Mec1 dependen de la expresión de genes mediada por la quinasa Dun1 (Gasch et al., 2001). Se ha descrito que la activación de Dun1 requiere de la interacción directa con la quinasa Rad53. Tras la activación de Rad53, su motivo de disfosfotreoninas hiperfosforilado es reconocido por Dun1 a través de su dominio FHA, esto provoca la fosforilación de Dun1 en varios de sus residuos y en consecuencia su activación (Pike, 2003; Lee et al., 2003; Lee et al., 2008a; Bashkirov et al., 2003; Chen et al., 2007; Hammet et al., 2000). A diferencia de Mec1 y Rad53, la quinasa efectora Dun1 no es esencial (Zhao y Rothstein, 2002). Sin embargo, son muchos los datos en la bibliografía que demuestran de forma consistente el importante papel que la quinasa Dun1 desempeña en el control de la respuesta al daño en el DNA (de la Torre-Ruiz et al., 2000; Zhao y Rothstein, 2002). La quinasa Dun1 participa en el control de la función de RNR principalmente a través de tres vías diferentes: aumentando la transcripción de los genes *RNR*, regulando la correcta localización subcelular de la subunidad pequeña R2 e induciendo la degradación del inhibidor de la subunidad grande R1, Sml1. El control de la expresión de los

genes *RNR* y de su localización así como el estado de activación de la enzima contribuyen a que la síntesis de dNTPs varíe según la fase del ciclo celular o bajo condiciones de estrés genotóxico. Mientras que durante la replicación del DNA en presencia de estrés genotóxico es necesario que los niveles de dNTPs aumenten, durante la fase G1 es crítico y esencial para las células que los dNTPs se mantengan en niveles bajos. Tan delicado ajuste en los niveles de dNTPs probablemente ayuda a minimizar las mutaciones espontáneas dentro de una población celular.

3.3.1. Regulación transcripcional de los genes *RNR1*, *RNR2*, *RNR3* y *RNR4*.

En respuesta a un estrés genotóxico, la tasa de transcripción de los genes *RNR2*, *RNR3* y *RNR4* aumenta rápidamente. Esta inducción está regulada por las quinasas Mec1 y Rad53, y depende parcialmente de la quinasa Dun1 (revisado en Sanvisens et al., 2013). La regulación transcripcional de los genes *RNR2*, *RNR3* y *RNR4* en respuesta a daños en el DNA depende principalmente del complejo represor transcripcional Crt1-Ssn6-Tup1. En ausencia de daños en el DNA, el complejo represor transcripcional Crt1-Ssn6-Tup1 reconoce y se une a elementos X-box (secuencias de DNA de 13 nucleótidos situadas en el extremo 5'UTR) de los genes *RNR2*, *RNR3* y *RNR4*, reprimiendo su transcripción (Huang et al., 1998; Malavé et al., 2006; Klinkenberg et al., 2006; Fu et al., 2006). Huang y colaboradores han observado que el represor transcripcional Crt1 presenta un nivel basal de fosforilación que disminuye en mutantes *mec1Δ*, *rad53Δ* y *dun1Δ* (Huang et al., 1998). Además, en respuesta a un estrés genotóxico, la activación del *checkpoint* de integridad del DNA promueve la hiperfosforilación de Crt1 a través de la quinasa Dun1 provocando la

liberación del complejo Crt1-Ssn6-Tup1 del DNA y permitiendo así la transcripción de los genes *RNR2*, *RNR3* y *RNR4* (Huang y Elledge, 1997). Estudios del promotor de *RNR3* indican que Crt1 antes de liberarse del promotor recluta al factor TFIID, al complejo SWI/SNF remodelador de la cromatina y a desacetilasas de histonas que promueven la activación de la transcripción (Zhang y Reese, 2007 y 2008; Sharma et al., 2003). La presencia de secuencias X-box en el promotor de Crt1 sugiere que existe un mecanismo de autoregulación *feedback* en el gen *CRT1* (Huang et al., 1998). De esta forma, en presencia de estrés genotóxico, los niveles de transcripción del mRNA de *CRT1* aumentan; pero una vez reparado el daño, la señal de activación generada por la ruta de quinasas Mec1-Rad53-Dun1 disminuye y el aumento de los niveles de Crt1 permite a la célula volver rápidamente al estado de represión transcripcional.

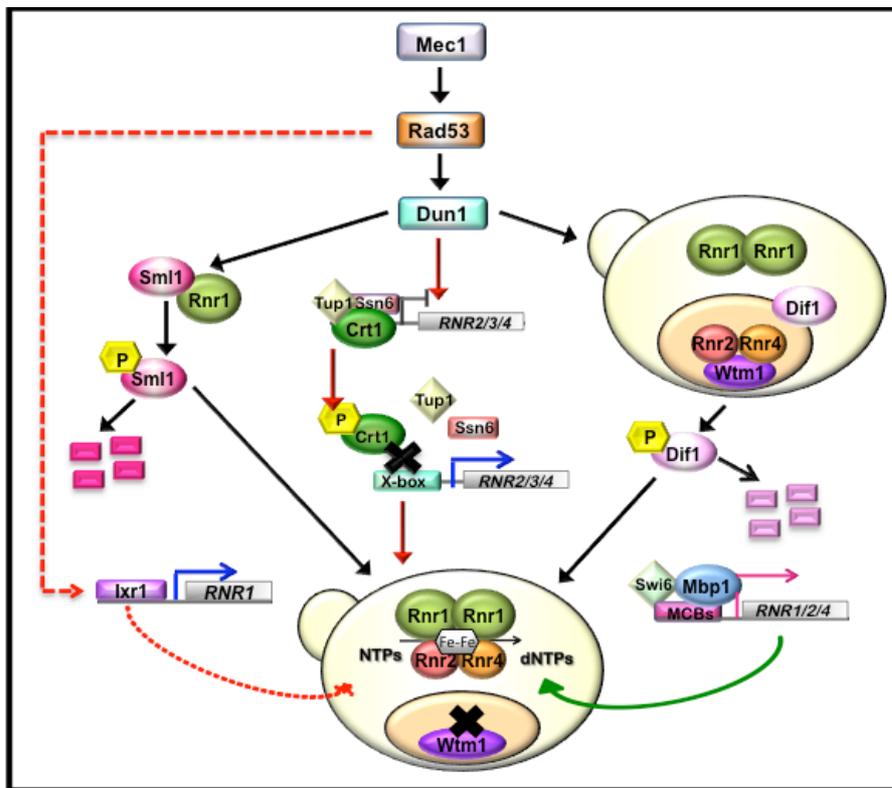
A pesar de que tanto los genes *RNR2*, *RNR3* como *RNR4* se inducen en respuesta a estrés genotóxico, el nivel de inducción es diferente para cada uno de ellos (Elledge y Davis, 1987). Mientras que el gen *RNR2* se induce alrededor de unas 25 veces, el gen *RNR4* lo hace sólo 10 veces en presencia del agente químico hidroximetilurea (HU), compuesto inhibidor de la enzima RNR que causa estrés replicativo, o en presencia del agente alquilante y carcinógeno metil metano sulfonato (MMS), que metila bases nitrogenadas del DNA (en posiciones *N*⁷-*desoxiguanina* y *N*³-*desoxiadenina*) (Wang et al., 1997; Elledge y Davis, 1987; Huang y Elledge, 1997). En el caso del gen *RNR3*, en ausencia de daño sus niveles de expresión son muy bajos, mientras que en presencia de estrés genotóxico se inducen entre 100 y 500 veces (Elledge y Davis, 1987; Huang y Elledge, 1997).

La inducción parcial de los genes *RNR* en presencia de estrés genotóxico en células mutantes *dun1Δ* indica que la regulación de la expresión de los genes *RNR* no es completamente dependiente de esta quinasa, sino que sugiere la existencia de otro mecanismo de inducción independiente (Wang et al., 1997; Zhang et al., 2008). Un estudio reciente ha mostrado que en respuesta a daños en el DNA, la expresión del gen *RNR1* también se induce a través de un mecanismo independiente de la quinasa Dun1 y del represor transcripcional Crt1, pero dependiente de las quinasas Mec1 y Rad53 y del factor transcripcional Irx1 (Tsaponina et al., 2011). El gen *IRX1* codifica un factor de transcripción que se une al DNA a través de sus dominios HMG y promueve su reparación. La transcripción de *RNR1* durante el ciclo celular está controlada por el complejo dimérico de transcripción MBF, formado por las proteínas Mbp1 y Swi6, la cual es fosforilada por la quinasa Rad53 en respuesta a daños en el DNA como se describirá más adelante (revisado en Sanvisens et al., 2013). Aunque no se ha descrito si existe relación entre la regulación ejercida sobre la expresión de *RNR1* entre el complejo MBF y el gen *IRX1*, Tsaponina y colaboradores han demostrado que tanto en condiciones normales como en respuesta a daños en el DNA los niveles de expresión de Rnr1 y el mantenimiento de los niveles de dNTPs dependen del gen *IRX1*. En mutantes *irx1Δ*, los niveles de Rnr1 disminuyen incluso llegando a ser menores en presencia de daños en el DNA, al contrario de lo que ocurre en células de una cepa silvestre. Esta bajada es contrarrestada con el aumento en los niveles de Rnr3 y Rnr4 consecuencia de la activación del *checkpoint* Mec1-Rad53-Dun1 (Tsaponina et al., 2011). Además de los genes *RNR*, la presencia de secuencias X-box el promotor del gen *HUG1* y la elevada inducción transcripcional que

presentan mutantes *Crt1-Ssn6-Tup1* proponen a *Hug1* como un posible represor de RNR después de la respuesta al daño en el DNA, implicado en la recuperación de la activación transcripcional mediada por el *checkpoint* *Mec1-Rad53-Dun1* (Basrai et al., 1999).

La regulación transcripcional de los genes *RNR* también contribuye a cambios en la actividad de RNR durante el ciclo celular (Mazumder et al., 2013). Los niveles del mRNA *RNR1* presentan grandes fluctuaciones durante la progresión ciclo celular alcanzado niveles máximos en los momentos finales de la fase G1 y durante los primeros momentos de la fase S. Sin embargo, están completamente ausentes durante la fase S y G2, hecho que pone de manifiesto una bajada drástica de los niveles mRNA *RNR1* al iniciarse la síntesis de DNA (Elledge y Davis, 1990; Mazumder et al., 2013). La activación transcripcional de *RNR1* durante la transición de la fase G1 a la fase S está regulada por el factor de transcripción MBF, que controla la expresión coordinada de muchos genes requeridos en funciones que tienen lugar durante las primeras fases del ciclo celular, además de regular genes implicados en la replicación y reparación del DNA. El factor MBF es un complejo heterodimérico formado por la proteína reguladora *Swi6* la cual a través *Mbp1*, proteína con afinidad específica por el DNA, se une a elementos MCB situados en el promotor de *RNR1* y de otros genes que se expresan durante la transición G1/S (Horak, 2002; Iyer et al., 2001). El complejo MBF restringe la expresión de sus genes diana a la transición G1/S. Se ha descrito que fuera de esta transición, la proteína *Stb1* interactúa con *Swi6* y reprime la expresión transcripcional mediada por el complejo MBF. Probablemente este mecanismo tiene lugar a través de *Sin3*, previamente a ser fosforilado durante la entrada de las células en la fase G1

(revisado en Sanvisens et al., 2013). Al final de la fase G1, la proteína Stb1 se libera del factor MBF a través de un mecanismo desconocido permitiendo así la transcripción de los genes reprimidos. Al mismo tiempo, la proteína Nrm1 se acumula e interactúa con MBF promoviendo la represión transcripcional de genes durante la fase S (revisado en Sanvisens et al., 2013; de Bruin et al., 2008). Durante la fase S y bajo condiciones de estrés genotóxico, la quinasa Rad53 fosforila directamente al corepresor Nrm1 de forma independiente a la quinasa Dun1 e impide la unión a MBF, permitiendo así la activación transcripcional de forma específica durante la transición G1/S de algunos genes, entre los que se incluye la transcripción de *RNR1* (Travesa et al., 2008; de Oliveira et al., 2012). Además, el complejo SBF compuesto por la proteína reguladora Swi6 y la proteína de unión al DNA Swi4 también ha sido implicado en la activación transcripcional de genes *RNR2* y *RNR3* en respuesta al daño en el DNA (Ho et al., 1999; Liu et al., 2001). Como se ha indicado en líneas anteriores, no se ha descrito ninguna regulación para los niveles de mRNA de *RNR3* durante el ciclo celular mientras que si se detectan cambios en los niveles de *RNR2* y *RNR4*. Aunque las variaciones de los niveles de mRNA para *RNR2* y *RNR4* son menores que las que muestra *RNR1* a lo largo del ciclo, Mazumber y colaboradores han mostrado que al igual que *RNR1*, los niveles son muy bajos durante la fase G1 pero presentan un incremento durante la fase S/G2, sobre todo en el caso de *RNR4*. A pesar de las fluctuaciones en los niveles de mRNA de los genes *RNR* durante el ciclo celular, no se observan cambios en los niveles de proteína. Sin embargo, bajo condiciones de estrés genotóxico, se observa tanto la inducción transcripcional y como el aumento en los niveles proteicos (Mazumber et al., 2013).



13. Representación esquemática de la regulación de la enzima ribonucleótido reductasa durante el ciclo celular (flechas verdes y flechas negras) y en respuesta a daños en el DNA (flechas rojas).

3.3.2. Regulación de la subunidad grande R1 a través del inhibidor Sml1.

Como consecuencia del peculiar mecanismo de inhibición *feedback* que el dATP ejerce en la regulación de la actividad RNR, *S. cerevisiae* presenta un mecanismo adicional de control de la función RNR basado en la inhibición de la subunidad grande R1 a través de la proteína Sml1. Con este mecanismo, *S. cerevisiae* limita la síntesis de dNTPs sólo a aquellos momentos en los que son requeridos evitando un aumento en las tasas de

mutación. En respuesta a daños en el DNA o durante la fase de S del ciclo celular *S. cerevisiae* activa la función de RNR regulando post-traduccionalmente al inhibidor Sml1 (Zhao et al., 1998; Chabes et al., 1999). Trabajos previos *in vivo* han demostrado que cuando cada ciclo catalítico de la RNR se ha completado, la reoxidación y regeneración de los sitios catalíticos de la subunidad grande R1 requiere de la interacción de un par de cisteínas situadas en el dominio carboxilo terminal de uno de sus monómeros con un motivo conservado en el dominio amino terminal de su monómero vecino (Zhang et al., 2007). Fuera de la fase de replicación del DNA o en ausencia de daños en éste, la proteína Sml1 inhibe la síntesis de dNTPs mediante su unión al dominio amino terminal de uno de los monómeros de la subunidad grande R1 con una estequiometría 1:1 (Chabes et al., 1999; Zhao et al., 2000). Esta interacción impide la unión del dominio amino terminal de uno de los monómeros Rnr1 con el dominio carboxilo terminal del monómero vecino, inhibiendo la regeneración del sitio catalítico localizado en la subunidad grande R1 cuando la síntesis de dNTPs no es requerida (Zhao et al., 2000; Zhang et al., 2006). Sml1 no sólo compete con la asociación de un dominio carboxilo terminal al dominio amino terminal de otro monómero, sino que también dificulta su accesibilidad al sitio activo necesario para regeneración de la subunidad grande R1 (Zhao et al., 2000). Algunos resultados sugieren que la interacción entre Sml1 y la subunidad grande R1 además de inhibir la actividad RNR, aumenta la estabilidad de la proteína Sml1 puesto que en cepas que sobreexpresan el gen *RNR1*, las cantidades basales de proteína Sml1 son mayores que en células de una cepa silvestre (Zhao et al., 2000). La recuperación de la viabilidad que presentan cepas mutantes *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ*, el incremento de la resistencia

a estrés genotóxico observado en cepas *dun1Δsml1Δ*, así como el aumento en los niveles del inhibidor Sml1 en condiciones de estrés genotóxico en células mutantes donde la cascada de quinasas no es funcional, refuerzan que el *checkpoint* de integridad del DNA Mec1-Rad53-Dun1 regula la función de la proteína Sml1 (Zhao et al., 1998; Zhao et al., 2001). Diversos trabajos han demostrado que la quinasa Dun1 interacciona y fosforila a la proteína Sml1 en al menos tres de sus residuos serina (Ser56, Ser58, Ser60) situados en una región flexible adyacente a una región hélice α del extremo carboxilo terminal, diferente a la región que interacciona con la subunidad grande R1 (Zhao y Rothstein, 2002; Uchiki, 2004). En cepas mutantes para las quinasas *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* y *MEC3* se observan cantidades elevadas de proteína Sml1 tras inducir daños en el DNA, indicando la participación de estas en el mecanismo de degradación del inhibidor (Zhao et al., 2001). A pesar de que la serina 60 de Sml1 no ha sido identificada como sitio de fosforilación, es necesario que tanto este residuo como las tres serinas mencionadas anteriormente sean mutadas a alanina para suprimir por completo la fosforilación y posterior degradación de la proteína Sml1 (Uchiki, 2004). Una vez la proteína Sml1 está fosforilada, es ubiquitilada y degradada por el proteasoma 26S (Andreson et al., 2010). Un estudio previo ha demostrado que la ubiquitilación de Sml1 en respuesta a daños en el DNA depende de enzima conjugadora de ubiquitina E2 Rad6, de la ubiquitina ligasa E3 Urb2 y de Mub1. La degradación de la proteína Sml1 en respuesta a daños en el DNA es un mecanismo que tiene lugar de forma muy rápida (Zhao et al., 2001). La degradación de la proteína Sml1 promueve un incremento en los niveles de dNTPs de hasta cuatro veces, permitiendo a la célula reparar el daño causado por el estrés genotóxico, asegurando así la progresión del ciclo

celular. Los niveles de expresión de Sml1 también varían a lo largo del ciclo celular. Zhao y colaboradores han demostrado que los niveles de Sml1 disminuyen hasta 6 veces durante la fase S (respecto de la fase G1) y hasta 9 veces respecto a la fase G2/M fase del ciclo celular, en la que además se ha observado que los niveles de proteína Sml1 alcanzan niveles máximos. Este descenso en los niveles de proteína Sml1 durante la fase de síntesis del DNA está también regulado por el *checkpoint* de integridad del DNA Mec1-Rad53-Dun1 del ciclo celular e implica un aumento de 2,5 veces en los niveles de dNTPs (Zhao et al., 2001; Zhao y Rothstein, 2002). Así pues, se ha propuesto que en presencia de estrés genotóxico o en durante la fase S del ciclo celular, la quinasa Dun1 reconoce y fosforila a la proteína Sml1. Sml1 fosforilado es ubiquitilado por el complejo ubiquitin-ligasa Rad6-Ubr2-Mub1 y posteriormente es reconocido y degradado por el proteasoma 26S (Andreson et al., 2010). La observación de que cepas que no expresan la quinasa *DUN1* necesitan más tiempo para completar la replicación del DNA, además de ser defectuosas en la replicación del DNA mitocondrial y más sensibles a agentes que dañan el DNA, indica que la desaparición del inhibidor Sml1 junto con el aumento de los niveles de expresión de *RNR1*, *RNR2* y *RNR4* promueven la formación de un complejo RNR funcional que activa la síntesis de dNTPs hasta niveles óptimos necesarios bien para la reparación de daños como para finalizar la replicación del DNA (Tsaponina et al., 2011).

3.3.3. Localización subcelular de la subunidad pequeña R2.

La distribución en distintos compartimentos celulares de las subunidades que forman la RNR es otro de los mecanismos que *S. cerevisiae* utiliza para regular su función, tanto durante el ciclo celular como en respuesta a daños en el DNA. En esta levadura, la subunidad grande R1 se localiza en el citosol de la célula durante la mayor parte del ciclo celular, mientras que la subunidad pequeña R2 se localiza principalmente en el núcleo. En respuesta a estrés genotóxico, la subunidad pequeña R2 se redistribuye del núcleo al citoplasma formando un complejo activo con la subunidad R1 (Yao et al., 2003a). Las proteínas Rnr2 y Rnr4 son cotransportadas del núcleo al citosol en forma de heterodímero (An, 2006). En respuesta a una necesidad de dNTPs, la relocalización del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 está regulada por el *checkpoint* Mec1-Rad53-Dun1 (Yao et al., 2003a). El cambio de localización provocado por la presencia de MMS se suprime cuando la cascada de quinasas no es funcional como en mutantes *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ*, o en células que no expresan la quinasa Dun1. En presencia de HU, las células *dun1Δ* distribuyen el heterodímero Rnr2-Rnr4 entre el núcleo y el citoplasma de la célula por lo que existen mecanismos independientes de Dun1 que promueven esta salida en estas condiciones. Para que se produzca el cambio de localización debido a un estrés genotóxico se requiere del paso a través de la fase G1 del ciclo celular, dado que células paradas en esta fase retienen a la subunidad pequeña R2 en el núcleo incluso después de dos horas bajo condiciones de estrés genotóxico (Yao et al., 2003a).

La localización nuclear de la subunidad pequeña R2 depende de las proteínas Wtm1 y Dif1. En ausencia de daños en el DNA, la proteína nuclear

Wtm1 interacciona con el complejo Rnr2-Rnr4 y lo retiene en el núcleo. Bajo condiciones de estrés genotóxico, la falta de interacción entre la subunidad R2 y Wtm1 permite que Rnr2 y Rnr4 relocalicen del núcleo al citoplasma (Lee y Elledge, 2006; Zhang et al., 2006). Las características de la interacción física entre la proteína Wtm1 y el complejo Rnr2-Rnr4 se desconocen al igual que el mecanismo responsable de eliminar la interacción entre ambos en respuesta a daños en el DNA. En respuesta a estrés genotóxico y tras la activación del *checkpoint* de respuesta a daños en el DNA, la quinasa Dun1 afecta a la interacción entre Wtm1 y la subunidad pequeña R2 facilitando su salida al citoplasma (Lee y Elledge, 2006). La proteína Dif1 también participa en la regulación de la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 (Lee et al., 2008b; Wu y Huang 2006). *DIF1* codifica una proteína con localización parcialmente citoplasmática que se caracteriza por la presencia de dos dominios conservados presentes también en dos de los inhibidores de RNR, Sml1 y Spd1 (proteína de 127 aminoácidos que controla la localización subcelular de la subunidad pequeña de RNR Suc22 en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*) (Liu, 2003). Análisis de secuencias muestran que la región amino terminal de la proteína Dif1 es un 33% idéntica y un 47% similar a la región comprendida entre los aminoácidos 16 y 51 de Spd1, región conocida como dominio Hug. Por otro lado, la región comprendida entre el aminoácido 76 y 114 del extremo carboxilo terminal de Dif1 es un 43% idéntica y un 57% similar a la región central comprendida entre el aminoácido 25 y 66 de la proteína Sml1, región que promueve su fosforilación y degradación en respuesta a daños en el DNA o estrés replicativo y conocida como dominio Sml (Lee et al., 2008b; Wu y Huang, 2008a). La proteína Dif1 interacciona directamente a través de

su dominio Hug con el complejo Rnr2-Rnr4 y es responsable de la importación nuclear de la subunidad pequeña R2 en ausencia de daños en el DNA o en la recuperación tras éste, a través de una ruta independiente a la proteína Wtm1 (Lee y Elledge, 2006). En cambio, en respuesta a estrés genotóxico, la quinasa Dun1 fosforila directamente a la proteína Dif1 en cuatro de sus residuos serina y treonina situados al final de su dominio Sml, fosforilación suficiente para su inactivación y posterior degradación. La inhibición y degradación de Dif1 reduce la importación nuclear del complejo Rnr2-Rnr4 en respuesta a daños en el DNA (Lee y Elledge, 2006; Wu y Huang 2006).

Al igual que ocurre en respuesta al estrés genotóxico, durante la fase S del ciclo celular, la localización nuclear de las proteínas Rnr2 y Rnr4 disminuye, distribuyéndose de forma más ubicua por todo el citosol en un 40% de las células (Yao et al., 2003b). Este cambio en el patrón de distribución de la subunidad pequeña R2 a lo largo del ciclo celular también depende de la proteína nuclear Wtm1 y de Dif1. La proteína Wtm1 es esencial para la localización nuclear de Rnr2 y Rnr4 durante las fases G1 y G2/M del ciclo celular (Zhang et al., 2006). Los niveles de proteína Dif1 se regulan a lo largo del ciclo celular alcanzando un pico máximo al final de fase S cuando la subunidad pequeña R2 vuelve de nuevo al núcleo (Lee et al., 2008b; Wu y Huang, 2008b). Varios autores postulan la existencia de un posible mecanismo responsable de la salida de la subunidad pequeña R2 al citoplasma dependiente de señales de exportación nuclear (NES) mediado por la exportina Crm1 (An, 2006). De esta forma, mediante el mecanismo de control de la localización subcelular del complejo Rnr2-Rnr4, la célula potencia la actividad de la enzima en fase S y proporciona los niveles de

dNTPs necesarios para asegurar la progresión del ciclo celular. Por último, cabe citar que algunos estudios atribuyen a la proteína Hug1 una posible función en la regulación de RNR en respuesta a daños al DNA. La presencia del dominio Hug de unión a Rnr2 y Rnr4 presente también la proteína Dif1, sugieren que la proteína Hug1 puede estar implicada en la regulación de la localización nuclear del complejo Rnr4-Rnr2 en la fase de recuperación tras la exposición a agentes que dañan el DNA (Kim y Siede, 2011).

Objetivos

Puesto que cada vez más datos refuerzan la existencia de una estrecha relación entre la homeostasis del hierro y el mantenimiento de la estabilidad genómica, y dado que la enzima RNR utiliza hierro como cofactor esencial para su función, nos planteamos los siguientes objetivos para el desarrollo de este trabajo:

1. Determinar la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 de la enzima RNR de *S. cerevisiae* en condiciones de deficiencia de hierro, y su efecto sobre la función de la enzima.
2. Estudiar el papel que desempeñan las quinasas Mec1, Rad53 y Dun1 en los mecanismos de regulación de RNR en condiciones de baja disponibilidad de hierro.
3. Estudiar el papel que desempeñan las proteínas de unión a RNA Cth1 y Cth2 en los mecanismos de regulación de la función de RNR en condiciones de deficiencia de hierro.
4. Estudiar los mecanismos de regulación de los niveles de proteína Sml1 bajo condiciones de escasez de hierro.

Materiales y métodos

1. Técnicas generales de biología molecular.

1.1. Reacción en cadena de la polimerasa.

Para amplificar de manera exponencial fragmentos de DNA hicimos uso de la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). El DNA molde es inicialmente desnaturalizado y a continuación polimerizado tal y como se muestra en la Figura M.1., por una DNA polimerasa termoestable a altas temperaturas. Para la amplificación de los fragmentos se utilizan dos secuencias de oligonucleótidos complementarias a la secuencia de DNA molde y que limitan la región de DNA a amplificar, una mezcla de dNTPs, soluciones tamponadoras que proporcionan un ambiente óptimo para la actividad y la estabilidad de la DNA polimerasa, DNA molde y agua *MilliQ*.

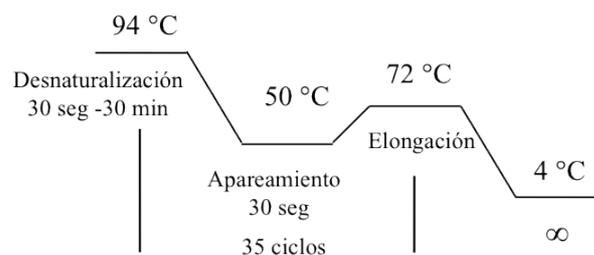


Figura M.1. Representación esquemática de los ciclos de PCR. El tiempo de elongación depende del tamaño del fragmento a amplificar y de la enzima DNA polimerasa utilizada: *Expand High Fidelity* (Roche), 1 min/kb; *Biotaq* (Bioline), 1 min/kb; *Phusion Polymerase* (Finnzymes), 30 segundos/kb. Se utilizaron 3 minutos de desnaturalización cuando el DNA molde era DNA genómico de levadura, y 30 segundos cuando era un plásmido.

Las concentraciones de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR fueron las indicadas por el fabricante en función de la DNA polimerasa utilizada. Para comprobar que el *cassette* se había insertado en el sitio correcto utilizamos la DNA polimerasa *Biotaq* (5 U/ μ L, Bioline), que se

caracteriza por no tener actividad correctora de errores en la pauta de lectura. En cambio, cuando deseábamos amplificar un fragmento del genoma de levadura a clonar en un plásmido, utilizamos la DNA polimerasa *Expand High Fidelity* (3,5 U/ μ L, Roche) o la DNA polimerasa *Phusion Polymerase* (2 U/ μ L, Finnzymes) con actividad exonucleasa en sentido 3'-5'. La cantidad de DNA molde utilizado para la reacción también varió en función de la naturaleza de este. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 50 μ L (como mínimo) utilizando entre 1-50 ng/ μ L de DNA genómico molde y entre 100-200 ng/ μ L cuando se trataba de DNA plasmídico molde.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf) utilizando tubos *PCR-02-C* (PCR® TUBES) de 0,2 mL. Cuando los productos de PCR iban a ser utilizados posteriormente, para eliminar compuestos presentes en la reacción, las reacciones de PCR se purificaron mediante el sistema de purificación *Illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.2. Electroforesis de DNA en geles de agarosa y aislamiento de fragmentos de DNA.

Para la separación de DNA por tamaño y conformación, se utilizaron geles horizontales de agarosa a diferentes concentraciones (0,8 y 2% (p/v)). Tanto los geles como la solución donde tuvo lugar la electroforesis fueron preparados en tampón Tris-Acético-EDTA (TAE) 1X añadiendo además al gel 0,5 μ g/mL de bromuro de etidio (BrEt), agente intercalante entre las bases nitrogenadas del DNA que nos permite visualizarlo bajo luz ultravioleta (UV). El DNA se solubilizó en Tampón de Carga 2X antes de ser cargado en el gel para dar densidad a la muestra y poder visualizar su migración. Para

estimar el tamaño de los fragmentos aislados de DNA, se utilizó el patrón de tamaños *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). El gel se migró en sistemas de electroforesis (Bio-rad) a 70-100 V durante el tiempo necesario. Tras migrar el gel, este se visualizó mediante un transiluminador de luz UV y se fotografió. En el caso de querer recuperar las bandas de DNA hicimos uso de un eje de luz UV de baja energía. Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de la banda cortada en el gel mediante sistema de purificación *Illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tampón TAE 1X	
Tris base pH 8,5	40 mM
Ácido acético glacial	1,14 mL/L
EDTA	20 mM

Tampón de Carga 2X	
Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,05%(p/v)
EDTA	100 mM

1.3. Listado de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores en las reacciones de PCR se detallan en la Tabla M.1.

Tabla M.1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Nombre y secuencia en sentido 5'-3'.

	Oligonucleótido	Secuencia en sentido 5'-3'
1	RNR2-F2	AAGCAAGAAGCCGGTGCTTTCACCTCAA CGAAGACTTTCGGATCCCCGGGTTAATTA
2	RNR2-R1	CAGTGTATATATATATATAAATAAGAGGTGCGAA AGGCCATTTCGAGCTCGTTTAAAC
3	RNR2:1094-F	AGACCAACTTCTTCGAAAAGA
4	RNR2+164-R	CGTATGAAATTCAGCCGAAGT
5	TermTEF:135-F	CGACATCATCTGCCAGAT
6	WTM1-Nt-3Xtag-F	AAATAAATTGTAACACACTATACATTACAACCAAAA ATGCCAAAAAGGGAACAAAAGCTGG
7	WTM1-Nt-3Xtag-R	GGAGATATGTTTCATAAGTGGAAGGCGTAGAT GATTCCAAACCTTCTGTAGGGCGAATTGGG
8	WTM1-200-F	GCAGTCTGTCCCCTTAAT
9	WTM1:190-R	TCCAGTATAAAGGGAGGGAA
10	pMPY-MYC-R	GCGGCCGCTACTATTAAGATCCTC
11	DUN1-R1	CCAGATTCAAACAATGTTTTGAAATAATGCTTCTCA TGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
12	DUN1-F2	CAATAAAATACCCAAAACATACTCAGAATTATCTTG CCTCCGGATCCCCGGGTTAATTA
13	Dun1+267-R	CAAAGGTGCGCTGGTAACTT
14	WTM1-ARE1mt-Sall-F	AGTGTCGACCATATTTCTATCTTTAATGCTTTTAACT
15	WTM1-ARE2mt-R	TAATTAAGATTGAATAAGAAATATACTAACAGTAG
16	WTM1-ARE2mt-F	GTATATTTCTTATCAATCTTTAATTAACAATACT
17	WTM1+392R-BglII	CATAGATCTCCGGATCCAACCCTACCAGA
18	WTM1-AREmt-genomeF	GAATAGTCGCATGCTAAACGCGCGGAACAAGGCC ATATTCTATCTTTAATGCT
19	WTM1+395-R1	CGAGAAATACGCAACCATAAATGAAACGCAAGTTAT GAATTCGAGCTCGTTTAAAC

2. Técnicas microbiológicas en *Escherichia coli*.

2.1. Condiciones de crecimiento.

Células competentes de la cepa de *E. coli* (*F- mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(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. Para su cultivo se utilizó el medio líquido Luria Bertani (LB: extracto de levadura 0,5% (p/v), triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v)). Para preparar medio sólido, se añadió un 1,5% (p/v) de agar bacteriológico. Tanto en medio sólido como en medio líquido, se utilizó ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL (medio LBA) para la selección y mantenimiento de bacterias con plásmidos que contienen el gen Amp^R. Las bacterias se incubaron a 37 °C en agitación (180-200 rpm) durante toda la noche.

3. Técnicas moleculares en *Escherichia coli*.

3.1. Construcción y obtención de plásmidos.

Para llevar a cabo la construcción de plásmidos, se hizo uso de la estrategia de amplificación del DNA a clonar mediante PCR, utilizando oligonucleótidos que poseen sitios de corte reconocidos por enzimas de restricción para su posterior inserción en el vector correspondiente. Tanto el fragmento como el vector fueron digeridos por las enzimas de restricción correspondientes y unidos mediante el sistema de ligación *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Células competentes de *E. coli* fueron transformadas con las correspondientes ligaciones siguiendo las instrucciones del fabricante y los transformantes se seleccionaron en medio sólido LBA. Se aislaron plásmidos de varios

transformantes mediante el kit de extracción de plásmidos *GenElute™HP Plasmid-Miniprep* (Sigma), y se analizaron varios clones mediante PCR y/o digestión con enzimas de restricción según las condiciones del fabricante. Finalmente el fragmento de DNA clonado se secuenció en los servicios centrales de apoyo (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

Para la construcción de los plásmidos P600, P602 y P603 (Tabla M.2), las regiones 3'-UTR de *WTM1*, *RNR2* y *RNR4* se clonaron en el vector pIII/MS2-1 previamente digerido con *SmaI* (Sengupta et al., 1996). Para la construcción de los plásmidos P623, P624 y P625 se utilizó la misma estrategia mutagenizando previamente las AREs mediante la técnica de PCR (Puig et al., 2005).

Para la construcción de los plásmidos pSP684, pSP685 y pSP686 (Tabla M.2) se utilizaron como moldes los plásmidos pSP673, pSP674 y pSP675 para amplificar la secuencia codificante y 240 pares de bases de la región promotora de *DUNI*, *DUNI-R60A* y *DUNI-K100A-R102A* respectivamente. Estos fragmentos se clonaron en el vector P61 previamente digerido con *SacI* y *BamHI* para eliminar el promotor TEF. Una estrategia similar se utilizó para obtener los plásmidos pSP692, pSP693, pSP694 y pSP695 que expresan *DUNI*, *DUNI S10A*, *DUNI-S139A* y *DUNI-T380A* respectivamente, mediante el uso de DNA genómico de las cepas de levadura SPY480, SPY482, SPY483 y SPY484 (Tabla M.3) respectivamente.

3.2. Listado de plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla M.2.

Tabla M.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmidos	Descripción	Procedencia
P6	pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6	Longtine et al 1998
P224	pMPY-3xMYC	Schneider et al 1995
P10	pFA6a-13MYC-KanMX6	Longtine et al 1998
P7	pFA6a-3HA-KanMX6	Longtine et al 1998
pSP642	pFA6a-3'UTR-WTM1-ARE-mt3-KanMX6	Este trabajo
pSP639	<i>RNR4-LacZ</i>	Dr. R.S. Zitomer
pSP640	<i>RNR2-LacZ</i>	Dr. S.J. Elledge
P174	<i>FET3-LacZ</i>	Dr. J. Kaplan
P40	pRS416 <i>URA3</i> , CEN	Puig et al., 2005
pSP476	pRS416- <i>CTH1</i>	Puig et al., 2005
pSP482	pRS416- <i>CTH1-C225R</i>	Puig et al., 2005
P39	pRS415 <i>LEU1</i> , CEN	Puig et al., 2005
pSP419	pRS415- <i>CTH2</i>	Puig et al., 2005
pSP571	pRS415- <i>CTH2-C190R</i>	Puig et al., 2005
P79	pACT2, GAL4-AD, <i>LEU2</i> , 2 μ m	SenGupta et al., 1996
P539	pACT2- <i>CTH2</i>	Puig et al., 2005
P40	pACT2- <i>CTH2-C190R</i>	Puig et al., 2005
P542	pACT2- <i>CTH1</i>	Puig et al., 2005
P543	pACT2- <i>CTH1-C190R</i>	Puig et al., 2005
P162	pIIIA MS2-1, RNA-MS2, <i>URA3</i> , 2 μ m	SenGupta et al., 1996
P545	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>SDH4</i>	Puig et al., 2005
P600	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>WTM1</i>	Este trabajo
P623	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>WTM1-ARE-mt1</i>	Este trabajo
P624	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>WTM1-ARE-mt2</i>	Este trabajo
P625	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>WTM1-ARE-mt3</i>	Este trabajo
P602	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>RNR2</i>	Este trabajo
P603	pIIIA-MS2-1-3'UTR <i>RNR4</i>	Este trabajo
pSP670	CEN <i>LEU2 DUN1</i>	Este trabajo
pSP671	<i>LEU2 DUN1-D328A</i> 2 μ m	Este trabajo
pSP673	pRS414- <i>DUN1</i> -FLAG	Lee et al., 2008
pSP674	pRS414- <i>DUN1-R60A</i> -FLAG	Lee et al., 2008
pSP675	pRS414- <i>DUN1-K100A-R102A</i> -FLAG	Lee et al., 2008
P37	pRS413	Dr. Martin Funk
P61	p413 CEN <i>HIS3 TEFp CYC1t</i>	Mumberg et al., 2005
pSP684	p413- <i>DUN1</i> (EcoRI)	Este trabajo

Tabla M.2. Continuación.

Plásmidos	Descripción	Procedencia
pSP685	p413-DUNI-R60A	Este trabajo
pSP686	p413-DUNI-K100A-R102A	Este trabajo
pSP692	p413-DUNI	Este trabajo
pSP693	p413-DUNI-S10A	Este trabajo
pSP694	p413-DUNI-S139A	Este trabajo
pSP695	p413-DUNI-T380A	Este trabajo

4. Técnicas microbiológicas en *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1. Condiciones de crecimiento en medio líquido.

Las células de levadura utilizadas en este trabajo se cultivaron a 30 °C en agitación (190 rpm) en los siguientes medios de cultivo :

- Medio rico YPD: extracto de levadura al 1% (p/v), peptona bacteriológica al 2% (p/v) y glucosa al 2% (p/v).

- Medio sintético completo (SC): base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico (Difco) 0,17% (p/v), (NH₄)₂SO₄ 0,5% (p/v), mezcla de requerimientos preparada (Formedium) 0,2% (p/v) y glucosa 2% (p/v). Para el mantenimiento de plásmidos durante el crecimiento de cepas de levadura transformadas, se utilizó medio SC sin uno o algunos de los requerimientos.

Los experimentos descritos en este trabajo se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones de crecimiento en medio líquido. Para todas las condiciones, una colonia independiente de células de levadura fue inoculada en tubos de plástico (Eurotubo®, Deltalab) en un volumen entre 3 y 5 mL de medio sintético completo (SC), o bien con ausencia de uno o algunos de los requerimientos cuando era necesario, y crecida durante toda la noche. Al día siguiente, las células fueron reinoculadas en 10 mL de medio de cultivo en

tubos de plástico de 50 mL (*CELLSTAR@TUBES*, Greiner-bio-one) a una DO_{600} alrededor de 0,3-0,4 y crecidas durante 6-9 horas hasta fase exponencial.

Las diferentes condiciones de crecimiento en medio líquido a las que se sometieron las células de *S. cerevisiae* tras ser reinoculadas fueron:

- Crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (Fe): células crecidas durante toda la noche, se reinocularon en medio SC tal y como se detalla en las condiciones descritas en el punto anterior.

- Crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro (-Fe): para inducir condiciones de deficiencia de hierro se utilizaron tres compuestos diferentes: medio SC suplementado con el quelante específico de Fe^{+2} impermeable a la membrana plasmática, sulfato de bazofenantrolina (BPS, Sigma) a una concentración final de 100 μ M; medio SC suplementado con el quelante de hierro permeable a la membrana plasmática 2,2'-dipiridil (DIP, Sigma) a una concentración final de 250 μ M; y medio SC suplementado con 3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenol sulfónico)-1,2,4-triacina (Ferrocina, Sigma) quelante de Fe^{+2} impermeable a la membrana plasmática a una concentración final de 1 mM.

- Crecimiento en condiciones de exceso de hierro (+Fe): medio SC suplementado con 300 μ M de sulfato amónico ferroso [FAS, $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$] (Sigma).

- Crecimiento en condiciones de estrés genotóxico: medio SC suplementado con hidroxurea (HU, Sigma) a una concentración final de 0,2 M o con metil metanosulfonato (MMS, Aldrich) al 0,04% durante la última o dos últimas horas de incubación.

- Crecimiento de mutantes termosensibles: se partió de un cultivo crecido durante toda la noche en medio SC que se encontraba a una DO_{600} entre 0,2-0,3. Las células se incubaron a temperatura restrictiva (37 °C) durante tres horas. Pasado este tiempo, el quelante de hierro BPS se añadió a una concentración final de 100 μ M para inducir condiciones de deficiencia de hierro durante 6 horas manteniendo la temperatura restrictiva durante todo el proceso.

4.2. Condiciones de crecimiento en medio sólido.

Para obtener medio sólido se añadió agar bacteriológico al 1,5% (p/v) a todos los medios preparados tal y como se describe en el punto 4.1 de este apartado. Para la selección de transformantes con marcadores de resistencia a antibióticos, se utilizó medio sólido YPD con sulfato G418 (Geneticina, Gibco) a una concentración final de 200 μ g/mL o con higromicina B (Roche) a una concentración final de 300 μ g/mL. Para la selección de transformantes en función del marcador introducido se utilizó medio SC sin uno o algunos de los requerimientos.

Para los ensayos de crecimiento en medio sólido, los cultivos de levadura se crecieron durante toda la noche y se reinocularon en medio SC al día siguiente hasta llegar a fase exponencial. Se prepararon diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000) después de igualar la DO_{600} a un valor de 0,1. Las gotas se realizaron haciendo uso de un utensilio que permite replicar las gotas (*replicate plater*) placa por placa, a partir del cultivo directo y de cada una de las diluciones. Los ensayos en placa se realizaron tanto en medio rico YPD como en medio sintético SC, o bien suplementados con HU, MMS o BPS a diferentes concentraciones. Las placas se incubaron durante 2-4 días a 30 °C.

5. Técnicas moleculares en *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1. Transformación de levadura.

Las transformaciones de *S. cerevisiae* con plásmidos o con los productos de PCR correspondientes a los *cassettes* se llevaron a cabo siguiendo el método de transformación con acetato de litio descrito en Gietz et al. (2002). En las transformaciones que requieren selección en presencia de sulfato G418 o higromicina B, tras el choque térmico a 42 °C, las células se incubaron en medio YPD líquido durante 2 horas en agitación antes de ser sembradas en placas con el antibiótico para inducir la expresión del gen de resistencia. Las células se sembraron en placas de medio selectivo dejándolas a 30 °C hasta la observación de colonias (2-3 días). Los transformantes obtenidos se purificaron por triple estría dos veces para asegurarnos que partíamos de una colonia procedente de una única célula transformada.

5.2. Obtención de DNA genómico.

Para la obtención de DNA genómico, se creció un cultivo de levaduras en 12 mL de YPD a 30 °C durante toda la noche y se recogieron las células por centrifugación. Las células se resuspendieron en 500 µL de agua y se centrifugaron de nuevo. Eliminado el sobrenadante, se resuspendieron en 200 µL de Tampón de Lisis para DNA y se transfirieron a un nuevo tubo. Se añadieron 200 µL de fenol a pH 8,0 (Fluka) y 1 volumen de perlas de vidrio (Sigma). Tras romper las células mediante agitación vigorosa en 3 periodos de 2 min, se añadieron 200 µL de tampón TE 1X. Las muestras, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo al que se añadió 1 mL de etanol al 96% (v/v) mezclándolo con el resto de la muestra por inversión. Las muestras se mantuvieron a -20 °C

durante un tiempo mínimo de 30 min para favorecer la precipitación del DNA. Tras volverse a centrifugar durante 3 min a 12.000 rpm, se eliminó la fase acuosa y el sedimento se resuspendió en 400 μ L de tampón TE 1X. Se añadieron 30 μ L de RNAsa A (1 mg/mL) y se incubó en agitación durante 15 min a 37 °C. Se añadieron 5,5 μ L de acetato de amonio 4 M y 1 mL de etanol al 96% (v/v) mezclándose por inversión. Para eliminar la fase acuosa, se centrifugó a 12.000 rpm, 3 min y el DNA precipitado se resuspendió en 100 μ L de TE 1X y se guardó a -20 °C hasta ser utilizado.

Tampón de Lisis para DNA	
Triton X-100	2% (v/v)
SDS	1% (v/v)
NaCl	100 mM
Tris-HCl a pH 8	10 mM

Tampón TE 1X	
Tris-HCl a pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

5.3. Construcción de cepas etiquetadas.

5.3.1. Etiquetado de cepas con la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*).

Para obtener la cepa *RNR2-GFP* (Tabla M.3., SPY364), en la que se etiqueta el extremo carboxilo terminal de *RNR2* con GFP, se generó un *cassette* de integración mediante PCR (Figura M.2), usando como molde el plásmido pFA6a-GFP-His3MX6 (Tabla M.2., P6) y dos oligonucleótidos (1 y 2, Tabla M.1) que se caracterizan por tener en su extremo 3' secuencias homólogas a los extremos del *cassette* de integración, mientras que en el extremo 5' poseen secuencias idénticas a zonas específicas del locus *RNR2* que permiten que se integre en el genoma por recombinación homóloga tal y como se muestra la Figura M.2. El plásmido P6 contiene el gen que codifica la proteína *GFP* y el gen *HIS3*, utilizado como marcador de selección. Para

comprobar si el *cassette* se había integrado en el genoma y en el lugar correcto, los transformantes obtenidos se analizaron por PCR haciendo uso dos parejas de oligonucleótidos; el oligonucleótido 3 que se une dentro de la secuencia de *RNR2* y el oligonucleótido 4 que se une fuera de la secuencia de *RNR2*. Por otra parte, el oligonucleótido 3 junto con el oligonucleótido 5 que se une dentro del *cassette* de integración tal y como se muestra en Figura M.2.

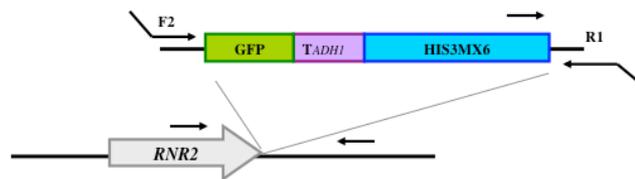


Figura M.2. Construcción de la cepa *RNR2-GFP*. Representación esquemática de la amplificación del fragmento GFP-HIS3MX6 por PCR con los oligonucleótidos 1 y 2 e inserción del *cassette* GFP-HIS3MX6 en la cepa SPY17 (BY4741) para etiquetar *RNR2* con *GFP* en su extremo carboxilo terminal.

5.3.2. Etiquetado de cepas con el epítipo MYC.

5.3.2.1. Construcción de la cepa 3MYC-Wtm1 (Tabla M.3., SPY374).

Con el objetivo de estudiar la regulación de los niveles de proteína Wtm1 en condiciones de deficiencia de hierro, se añadieron tres etiquetas del epítipo MYC en el extremo amino terminal de la copia genómica de *WTM1* sin alterar la secuencia endógena del promotor. Tal y como se describe en Schneider et al. (1995), se utilizó el plásmido pMPY-3xMYC (Tabla M.2., P224) que se caracteriza por la presencia del marcador *URA3* flanqueado por repeticiones del epítipo MYC (MYC-URA3-MYC). Se utilizaron dos oligonucleótidos (6 y 7, Tabla M.1) que amplificaron por PCR un *cassette* de

integración formado por el epítipo MYC-URA3-MYC y dos extremos homólogos a *WTM1* (Figura M.3., panel A). Con este *cassette* se transformó la cepa SPY122 (Tabla M.3) favoreciendo la inserción por recombinación del *cassette* en el extremo amino terminal de *WTM1* (Figura M.3., panel B). Las células de levadura se sembraron en medio selectivo SC-ura, dónde solo aquellas que habían insertado el *cassette* podían crecer (Figura M.3., panel B). Además, por PCR y haciendo uso de los oligonucleótidos 8 y 9 (Tabla M.1) se comprobó que transformantes tenían el inserto en el sitio correcto. Los transformantes con inserto crecieron en medio YPD durante la noche y al día siguiente se sembraron en placas de medio selectivo SC-ura y SC-ura+5-FOA (ácido 5-fluoro-orótico). Transformantes Ura^+ convierten el 5-FOA en fluorouracilo, compuesto tóxico para las células y, por tanto, no pueden crecer. En cambio, aquellos transformantes que pierden el gen *URA3* por recombinación crecen en este medio manteniendo la etiqueta 3MYC en el extremo amino terminal del gen *WTM1* (Figura M.3., panel C). La pérdida del gen *URA3* en algunos de los transformantes que si crecían en el medio con 5-FOA fue también comprobada por PCR haciendo uso de los oligonucleótidos 8 y 10 (Tabla M.1).

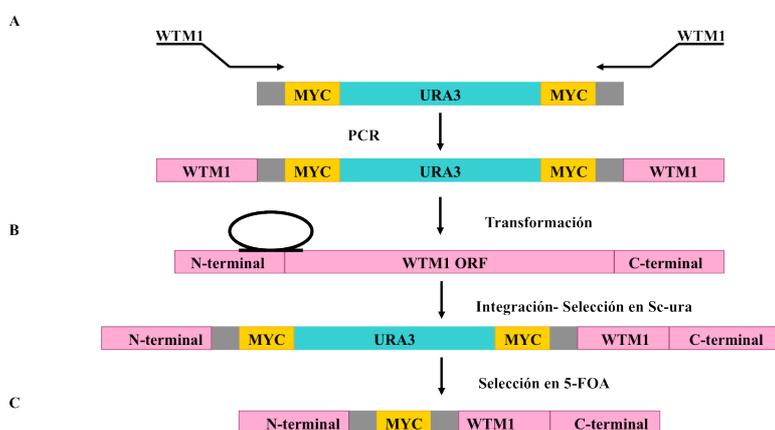


Figura M.3. Estrategia para etiquetar el gen *WTMI* con el epítipo MYC. (A) Amplificación por PCR del *cassette* MYC-URA-MYC. El *cassette* es un fragmento lineal que contiene en sus dos extremos secuencias homólogas a *WTMI*. (B) Transformación e integración del *cassette* en el extremo amino terminal de *WTMI*. Los transformantes son seleccionados en un medio SC-ura. (C) Pérdida del gen *URA3* por recombinación en medio SC-ura+5-FOA.

5.3.2.2. Construcción de la cepa Dun1-MYC13 (Tabla M.3., SPY379).

Con el objetivo de estudiar la fosforilación de la quinasa Dun1 en condiciones de deficiencia de hierro, utilizamos el epítipo 13xMYC como etiqueta en el genoma del extremo carboxilo terminal del gen *DUNI* tal y como se describe en Lee et al. (2003). Para ello, tal y como se muestra en la Figura M.4., se amplificó por PCR el plásmido pFA6a-13MYC-KanMX6 (Tabla M.2., P10.) haciendo uso de los oligonucleótidos 11 y 12 (Tabla M.1) que se caracterizan por la presencia de extremos largos homólogos a la zona de la secuencia del gen donde se desea insertar la etiqueta. Dichos extremos, permiten la recombinación homóloga entre el fragmento amplificado por PCR y con ello, la inserción de la etiqueta en el genoma (Figura M.4). Se comprobó por PCR haciendo uso de los oligonucleótidos 5 y 13 (Tabla M.1) si los transformantes obtenidos presentaban la etiqueta 13xMYC en el extremo carboxilo de *DUNI*.

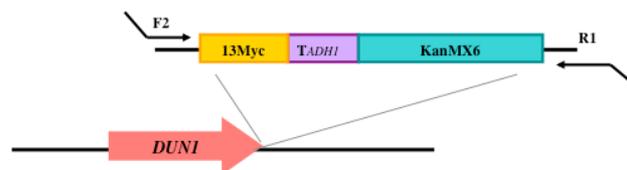


Figura M.4. Construcción de la cepa Dun1-MYC13. Representación esquemática de la amplificación del fragmento 13MYC-KanMX6 por PCR y su inserción en la cepa SPY17 (BY4741) para etiquetar *DUNI* con el epítipo MYC en su extremo carboxilo terminal.

5.3.2.3. Construcción de la cepa *WTM1-mt3* (Tabla M.3., SPY385).

Para estudiar el papel de las AREs del gen *WTM1* en la localización subcelular de las proteínas Rnr4 y Rnr2 en condiciones de deficiencia de hierro, se construyó la cepa de levadura *WTM1-mt3*. La cepa presenta mutaciones puntuales en el genoma en ambas AREs, situadas en la región 3'-UTR del gen *WTM1* (Figura M.5., panel A). Para ello, en primer lugar, se diseñaron cuatro pares de oligonucleótidos (14, 15, 16, 17, Tabla M.1) con los que se construyeron por PCR dos fragmentos de la región 3'-UTR de *WTM1* utilizando como molde DNA genómico:

- El fragmento I (oligonucleótidos 14 y 15, Figura M.5., panel B) contenía por un lado, el lugar de corte para la enzima de restricción *SalI*, la primera ARE de *WTM1* mutada (ARE-mt1) y la segunda ARE de *WTM1* mutada (ARE-mt2).
- El fragmento II (oligonucleótidos 16 y 17, Figura M.5., panel B) contenía el lugar de corte para la enzima de restricción *BglII* y la segunda ARE de *WTM1* mutada (ARE-mt2).

A continuación, se llevó a cabo una tercera reacción de PCR (Figura M.5., panel B) que utilizaba como molde ambos fragmentos (I y II, purificados en gel de agarosa) y los oligonucleótidos 14 y 17 creando así un nuevo fragmento (fragmento III) formado por la secuencia 3'-UTR de *WTM1* con ambas AREs mutadas (ARE-mt3) y flanqueado por los dos sitios de corte para las enzimas de restricción *SalI* y *BglII*.

Puesto que el objetivo era conseguir una cepa que presentara ambas mutaciones (mt1 y mt2) de forma simultánea en el genoma, el siguiente paso fue clonar el fragmento III en el plásmido pFA6a-3HA-KanMX6 (Tabla M.2., P7) que presentaba un sitio de corte, único para *SalI* y otro para *BglII* (Figura M.5., panel C). Tras la digestión, tanto del fragmento III como del plásmido 7

y ligación de ambos (Figura M.5., panel C), se transformaron células competentes de *E. coli* y, a partir del DNA plasmídico de los transformantes obtenidos, se comprobó por PCR, utilizando los oligonucleótidos 14 y 17, que el nuevo plásmido construido (pFA6a-3'-UTR-WTM1-ARE-mt3-KanMX6, Tabla M.2., pSP642) era correcto y por secuenciación, que la región 3'-UTR de *WTM1* presentaba las mutaciones introducidas.

Para introducir las mutaciones en el genoma, se obtuvo un *cassette* de integración WTM1-ARE-mt3-KanMx6 utilizando el plásmido construido (Tabla M.2., pSP642) como molde para la reacción de PCR y los oligonucleótidos 18 y 19 con extremo largos que permiten la recombinación homóloga entre la región 3'-UTR de *WTM1* y el *cassette*, y con ello, su integración en el genoma (Figura M.5., panel D).

Para comprobar que el resultado observado con la cepa *WTM1-mt3* en la localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 era consecuencia de las AREs mutadas en la región 3'-UTR del gen *WTM1* y no efecto del gen Kan^R utilizado como marcador de selección, se construyó siguiendo los mismos pasos descritos para la construcción de cepa SPY385, la cepa SPY459 (Tabla M.3) que mantiene el gen Kan^R situado 395 nucleótidos después del codón de terminación del gen *WTM1* pero no las AREs mutadas.

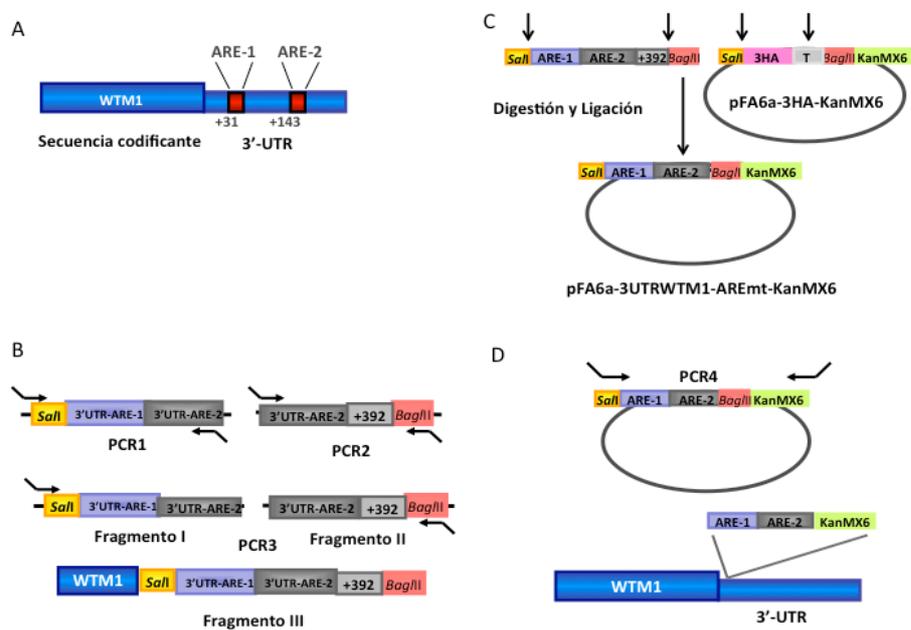


Figura M.5. Construcción de la cepa *WTM1-mt3*. (A) Representación de la cepa *WTM1-mt3*. El gen *WTM1* presenta mutaciones puntuales en ambas AREs putativas, situadas en la posición +31 y +143 de su 3'-UTR. (B) Representación esquemática de la amplificación por PCR y construcción del fragment III. (C) Construcción del plásmido pSP642. Digestión y ligación del fragmento III y del plásmido pFA6a-3HA-KanMX6. (D) Representación esquemática de la inserción del *cassette* 3'-UTR-WTM1-ARE-mt3-KanMX6 extremo en el 3'-UTR de *WTM1*.

5.4. Listado de cepas de *S. cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla M.3.

Tabla M.3. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. Para cada cepa se indica el genotipo detallado y la procedencia.

Cepa	Genotipo	Procedencia
SPY480	BY4741 <i>MATa GFP-SML1::HIS3</i>	Che et al., 2007
SPY482	SPY480 <i>DUNI-TAF-S10A::G418</i>	Che et al., 2007
SPY483	SPY480 <i>DUNI-TAF-S139A::G418</i>	Che et al., 2007
SPY484	SPY480 <i>DUNI-TAF-T380A::G418</i>	Che et al., 2007
SPY120	<i>MATa, ura3-52, leu2-3,112, his3Δ200, trpΔ1, ade2, LYS2::(LexAop)-HIS3, ura::(LexA-op)-LacZ, LexA.-MS2 coat (TRP1)</i>	M. Wickens
SPY17	BY4741 <i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>	Research Genetics
SPY364	SPY17 <i>RNR2-GFP-His3MX6</i>	Este trabajo
SPY322	SPY17 <i>RNR4-GFP-HisMX6</i>	Este trabajo
SPY27	BY4741 <i>fet4::KanMX4</i>	Invitrogen
SPY386	SPY27 <i>fet3::URA3</i>	Este trabajo
SPY379	SPY17 <i>DUNI-MYC13::Kan</i>	Este trabajo
SPY387	W303-1a <i>MATa, ade2-1, trp1-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura3, can1-100, GAL+, psi+</i>	Yao et al., 2003
SPY389	SPY387 <i>mec1::HIS3 sml1::HIS3</i>	Yao et al., 2003
SPY390	SPY387 <i>rad53::HIS3 sml1::HIS3</i>	Yao et al., 2003
SPY391	SPY387 <i>sml1::HIS3</i>	Yao et al., 2003
SPY122	SPY17 <i>cth1::kanMX4 cth2::HisMX6</i>	Puig et al 2005
SPY325	SPY17 <i>cth1::hphB cth2::HisMX6</i>	Este trabajo
SPY374	SPY325 <i>3MYC-WTM1</i>	Este trabajo
SPY385	SPY17 <i>WTM1-mt3-KanMX6</i>	Este trabajo
SPY459	SPY17 <i>WTM1-KanMX6</i>	Este trabajo
SPY350	SPY17 <i>dun1::KanMX4</i>	Research Genetics
SPY473	SPY387 <i>MATa, trp1::promoterTDH3-RNR1-TRP1</i>	Desany et al., 1998
SPY474	SPY387 <i>MATa, trp1::promoterTDH3-RNR1-TRP1, mec1::HIS3</i>	Desany et al., 1998
SPY476	SPY387 <i>MATa, trp1::promoterTDH3-RNR1-TRP1, rad53::HIS3</i>	Desany et al., 1998
SPY478	SPY387 <i>MATa, trp1::promoterTDH3-RNR1-TRP1, dun1::HIS3</i>	Desany et al., 1998
SPY462	<i>MATa ura3 leu2-3,112 his3-11,15 Gal+</i>	Dr. H. Wolf
SPY463	SPY462 <i>pre1-1</i>	Dr. H. Wolf
SPY430	BY4743- <i>MATa/a his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Invitrogen
SPY485	SPY430 <i>rad6::KanMX4</i>	Invitrogen
SPY486	SPY430 <i>mub1::KanMX4</i>	Invitrogen
SPY487	SPY430 <i>urb2::KanMX4</i>	Invitrogen
SPY488	BY4743 <i>urb1::KanMX4</i>	Invitrogen

Tabla M.3. Continuación.

Cepa	Genotipo	Procedencia
SPY465	W303-1a <i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 RAD5+</i>	Andreson et al., 2010
SPY466	SPY465 <i>MATa sml1-S56,58,60,61A</i>	Andreson et al., 2010
SPY496	BY4743 <i>pep4::KanMX4</i>	Invitrogen
SPY349	SPY17 <i>MATa GFP-SML1::HIS3</i>	Invitrogen

5.5. Análisis del contenido de DNA de levadura.

Un mililitro de células de levadura crecidas durante 6 horas bajo diferentes condiciones de crecimiento fueron sonicadas y fijadas en etanol 70% (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, fueron tratadas con 1 mg/mL de RNAsa A en tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 30 °C durante toda la noche en agitación (300 rpm). Tras ser centrifugadas, se resuspendieron en una solución de tinción de núcleos preparada con yoduro de propidio a 50 mg/mL (Sigma) en MgCl₂ 70 mM, Tris-HCl 180 mM pH 7,5 y NaCl 180 mM. El contenido de DNA fue analizado en un citómetro *EPICS XL* (Coulter Inc).

5.6. Técnicas de microscopía de fluorescencia.

5.6.1. Inmunofluorescencia indirecta.

Después 6 horas de incubación bajo diferentes condiciones de crecimiento en medio líquido, 1 mL de células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 900 µL de medio SC con 100 µL de formaldehído al 37% (v/v) y se incubaron durante 15 min a 30 °C (o durante toda la noche a 4 °C) en agitación. Una vez fijadas, se lavaron una vez con Tampón K y dos veces con Tampón P. Para la obtención de esferoplastos, las células se incubaron en 1 mL de Tampón P con 5 µL de β-mercaptoetanol y 5 µL de zimoliasa (MP Biomedicals LLC 100T, 10 mg/mL) durante 10 min a

37 °C en agitación (300 rpm). Las células se centrifugaron a 6.000 rpm durante 1 min para evitar la rotura de los esferoplastos, y se lavaron con 1 mL de Tampón P. Muestras de 10 µL de estos esferoplastos se depositaron durante 30 min en portaobjetos multipocillo *Multitest Slide 15-Well* (MP Biomedicals LLC) en los cuales previamente se había añadido 10 µL de polilisina (Sigma) al 0,1% (p/v) durante 10 min, para mediar la adhesión de los esferoplastos, y se habían lavado 3 veces con agua antes de depositar las muestras. Tras los 30 minutos de incubación, se eliminó el exceso de líquido y los portaobjetos se sumergieron en metanol y acetona fríos durante 6 min y 20 segundos, respectivamente. Para bloquear la unión inespecífica, se utilizó la solución PBS/BSA 1% (p/v) con la que se lavaron los pocillos unas 10 veces, y a continuación las muestras se incubaron con 10 µL de anticuerpo primario diluido en la misma solución PBS/BSA 1% (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, tras lavarse los pocillos (10 veces) con PBS/BSA 1% (p/v), las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, se lavaron de nuevo los pocillos con PBS/BSA 1% (p/v) (10 veces). Tras acabar el último lavado del anticuerpo secundario, las muestras se incubaron (protegidas de la luz) durante 2 min con 2 µL a 0,1 mg/mL de diclorhidrato de 4',6- diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) para teñir los núcleos. A continuación, los pocillos se cubrieron con 3 µL del medio *Vector-shield mounting medium* (Vector Lab. Co) y se selló el cubreobjetos. El análisis cuantitativo de los resultados en función de su localización subcelular se realizó contando un mínimo de 200 células por experimento en al menos 3 experimentos realizados de forma independiente.

Tampón K	
KH ₂ PO ₄	67 mM
K ₂ HPO ₄	33 mM
MgCl ₂	5 mM

PBS 10x	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

Tampón P	
KH ₂ PO ₄	67 mM
K ₂ HPO ₄	33 mM
MgCl ₂	5 mM
Sorbitol	1,2 M

PBS/BSA 1% (p/v)	
BSA	10 mg/mL
PBS	1x
NaN ₃	0,01% (p/v)

Tabla M.4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNADRIO
Anti-Rnr2 policlonal de ratón (Laboratorio de la Dra. J. Stubbe) 1:10.000	Alexa Fluor ® 488, cabra anti-conejo IgG (H+L) Invitrogen 1:1.000
Anti-Rnr4 policlonal de ratón (Laboratorio de la Dra. J. Stubbe) 1:10.000	Alexa Fluor ® 488, cabra anti-conejo IgG (H+L) Invitrogen 1:1.000

5.6.2. Localización de proteínas etiquetadas con *GFP*.

Para la observación de las proteínas Rnr2 y Rnr4 etiquetadas con *GFP*, células crecidas durante toda la noche en medio SC se reinocularon a una DO₆₀₀ de 0,3-0,4 en 10 mL de medio líquido SC (condiciones de suficiencia de hierro) y suplementado con quelantes de hierro (condiciones de deficiencia de hierro), tal y como se describe en el apartado 4.1 de materiales

y métodos, durante 6 horas. Para los ensayos cinéticos de localización subcelular de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP, los cultivos se crecieron bajo las mismas condiciones y las células se observaron al microscopio a diferentes tiempos. Para la tinción y la observación del núcleo, 1 mL de las células fue incubado en DAPI a una concentración de 0,25 mg/L durante 1 hora en agitación a 190 rpm y 30 °C, protegiendo las muestras de la luz. El análisis cuantitativo en función de su localización subcelular se realizó contando un mínimo de 200 células por experimento en al menos 3 experimentos realizados de forma independiente.

Tanto para la inmunofluorescencia como para la localización de proteínas etiquetadas con *GFP*, las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia *Axioskop 2* (Zeiss inc) y las fotografías se realizaron con una cámara *AxioCam MRm* (Zeiss Inc) y el software *AxioVision v4.7* (Zeiss Inc).

5.7. Técnica de detección de moléculas de RNA o *Northern blot*.

5.7.1. Extracción y electroforesis de RNA total de levadura.

Los extractos de RNA total de levadura se obtuvieron a partir de aproximadamente 15 mL de cultivos en fase exponencial (DO_{600} entre 2 y 3) y mediante soluciones libres de RNAsas. Para el aislamiento del RNA total de levadura, se utilizó el método del fenol caliente (Puig et al., 2005). Las células se recogieron y lavaron en 1 mL de Tampón de Lisis para RNA. A continuación, se centrifugaron y se resuspendieron de nuevo en 450 μ L del mismo tampón y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis. Descongeladas las células, se añadió un volumen de fenol ácido (*UltraPure™ Phenol*, Invitrogen) y las muestras se agitaron vigorosamente durante 15 segundos. A continuación, las células incubaron durante 20 min a 65 °C a

máxima velocidad en un agitador *Thermomixer Compac* (Eppendorf) y se mantuvieron 10 min en hielo para precipitar el SDS (Sodio Dodecil Sulfato) que contiene el Tampón de Lisis para RNA. Para recuperar la fase acuosa superior, las muestras se centrifugaron durante 3 min a velocidad máxima. Se separó el sobrenadante del resto pasándose a un nuevo tubo y se añadió un volumen de cloroformo. Tras centrifugarse de nuevo durante 3 min a velocidad máxima, la fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 40 μ L de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol frío al 96% (v/v). Las muestras se mezclaron por inversión y fueron guardadas a -80 °C hasta su utilización. El RNA recogido por centrifugación a 4 °C durante 15 min, se lavó con etanol frío al 70% (v/v) y se centrifugó de nuevo secando posteriormente el precipitado. Las muestras se resuspendieron en 100 μ L de agua *MilliQ* libre de RNAsas y se mantuvieron en agitación durante 10 min a 65 °C. Las muestras de RNA se cuantificaron mediante un *BioPhotometer* (Eppendorf).

Para el análisis por *Northern blot* se utilizaron entre 10 y 15 μ g de RNA total. A las muestras, antes de ser cargadas en el gel se les añadió 5 μ L de Tampón de Carga 5X, se calentaron durante 10 min a 65 °C para romper estructuras secundarias de RNA y se transfirieron a hielo. Para llevar a cabo la electroforesis, las muestras se cargaron en geles de electroforesis para RNA y se sometieron a voltaje constante de 70V durante unas 3 horas en Tampón de electroforesis MOPS 1X. Una vez migrado el gel, visualizamos las muestras por radiación UV para asegurarnos que la carga entre muestras estaba igualada y no había degradación del RNA en ellas.

Tampón MOPS 1X	
MOPS a pH 8.0	40 mM
Acetato sódico	10 mM
EDTA	1 mM

Geles de electroforesis-RNA	
Agarosa	1,5% (p/v)
MOPS	1X
Formaldehido	2,2 M

Tampón de Carga 5X	
Formamida	65% (v/v)
MOPS	1X
Formaldehido	7% (v/v)
Bromuro de etidio	20 µg/mL

Tampón de Lisis para RNA	
Tris a pH 7.4	2 M
EDTA	0,25 mM
SDS	10% (v/v)

5.7.2. Transferencia del RNA a membrana.

El RNA se transfirió a una membrana de nylon *N-Hybrid* (GE Healthcare) utilizando como Solución de Transferencia SSC 10X. El gel, la membrana y dos hojas de papel Whatman 3MM (*Chromatography paper 3MM Chr.* Whatman™) se enjuagaron en SSC 10X. En un recipiente con Solución de Transferencia SSC 10X y la ayuda de un soporte, se dispuso el papel Whatman 3MM en forma de puente de manera que sus extremos quedaran empapados con SSC 10X. Sobre el papel, se depositó el gel y sobre este la membrana de nylon. Por último, se depositó un nuevo papel Whatman 3MM empapado con SSC 10X. Todo se cubrió con papel absorbente y un soporte pesado para favorecer la capilaridad. El gel se rodeó con trozos de papel de plástico para favorecer la capilaridad sólo a través de la zona que cubría el gel. La transferencia se realizó durante toda la noche y el RNA se unió covalentemente a la membrana de nylon mediante irradiación con UV haciendo uso del entrecruzador *GS Gene Linker™ UV Chamber* (Bio-Rad).

Solución de Transferencia SSC 10X	
NaCl	0,9 M
Citrato sódico	0,09 M

5.7.3. Obtención y marcaje radiactivo de las sondas.

Para la obtención de las sondas, se amplificaron los fragmentos de DNA correspondientes a los genes de interés mediante PCR. Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis, y la banda de DNA se aisló a partir del gel purificándose con el sistema *Illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas se guardaron a -20 °C hasta su utilización. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las sondas se describen en la Tabla M.1. Una vez purificados los fragmentos de DNA, se procedió a su marcaje radiactivo mediante el sistema *Random Primers DNA Labeling System* (Invitrogen™) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para marcar las sondas radiactivamente se utilizó [α -³²P]-dCTP o [α -³³P]-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham).

5.7.4. Hibridación de las membranas con la sonda y cuantificación de la señal.

Para evitar hibridaciones inespecíficas, las membranas se incubaron en una solución de pre-hibridación (*ULTRAHyb™*, Ambion®) calentada previamente a 65 °C, durante 30 min a 42 °C. Pasado este tiempo, a la solución con la membrana se añadió la sonda radiactiva desnaturalizada, y se incubó a 42 °C durante toda la noche en un soporte giratorio para asegurarse que la solución cubría toda la membrana. Posteriormente, eliminada la sonda

radiactiva, las membranas se lavaron con dos soluciones, solución I (SSC 2X, 0,1% SDS) durante 20 min a 65 °C y solución II (SSC 0,2X, 0,1% SDS) durante 10 min a 65 °C. Lavadas y secas, se cubrieron con plástico transparente, se pegaron a un *Hypercassette* (GE Healthcare) y se expusieron a una pantalla IP *Phosphorimager* (Fujifilm Imaging Plate, BAS-IP MS 2025) durante el tiempo apropiado (desde horas a días). El análisis de la pantalla IP para la cuantificación de la radiactividad se realizó mediante un sistema de autorradiografía *Phosphorimager* FLA3000 (Fujifilm). El análisis de la imagen se realizó con el programa *Image Gauge* 4.0 (Fujifilm).

5.8. Técnica de inmunodetección de proteínas o *Western blot*.

5.8.1. Obtención de extractos proteicos.

5.8.1.1. Obtención de extractos proteicos mediante NaOH.

Los extractos totales de proteínas para el análisis por *Western* se obtuvieron partir de 5 mL de cultivo crecido hasta fase exponencial (DO_{600} entre 0,8-1,0). Las células se recogieron por centrifugación (3.000 rpm, 5 min) y una vez eliminado el sobrenadante, se lavaron con agua esteril, se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en 200 μ L de NaOH 0,2 M. A continuación, las muestras se agitaron vigorosamente durante 3 segundos dejándose 5 min a temperatura ambiente y recogiendo por centrifugaron a 12.000 rpm durante 1 min. Eliminado el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 μ L de Tampón de Carga 5X-SDS antes de ser calentado 5 min a 95 °C. Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm 10 min y el sobrenadante resultante se congeló a -20 °C hasta ser utilizado.

Tampón de Carga 5X-SDS	
Tris-HCl pH 6.8	60 mM
Glicerol	25% (v/v)
SDS	2% (v/v)
β -mercaptoetanol	14,4 mM
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

5.8.1.2. Obtención de extractos proteicos por precipitación con ácido tricloroacético.

A partir de 5 mL de cultivo, se obtuvieron los extractos totales de proteínas para el análisis por *Western* de células crecidas hasta fase exponencial recogidas por centrifugación (3.000 rpm, 5 min). El sedimento se lavó con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se centrifugó (10.000 rpm, 1 min) y el sedimento resultante se resuspendió en 500 μ L de TCA. Para romper las células, se añadió un volumen de perlas de vidrio y se agitó mediante *Mini Bead-Beater* a velocidad máxima durante 3 min a 4 °C. A continuación, las muestras se centrifugaron (3.000 rpm, 10 min) para separar las perlas del sobrenadante lisado, el cual se transfirió a un nuevo tubo. Las muestras se centrifugaron de nuevo (10.000 rpm, 1 min) para recoger un sedimento sobre el cual se añadieron 50 μ L del Tampón de Carga 2X-SDS y Tampón Tris-HCl 1 M a pH 8 para aumentar el pH hasta conseguir que la solución se volviera de color azulado. En último lugar, las muestras se hirvieron durante 5 min a 95 °C y se centrifugaron a 3.000 rpm 10 min. El sobrenadante se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Tampón de Carga 2X-SDS	
Tris-HCl pH 6.8	125 mM
Glicerol	15% (v/v)
SDS	2% (v/v)
β -mercaptoetanol	0,1 mM
EDTA	5 mM
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

5.8.2. Cuantificación de proteína mediante el método de Bradford.

La determinación de la concentración de proteína total de cada muestra se realizó por comparación de intensidad colorimétrica con una muestra conocida de BSA (seroalbúmina bovina) con la que se realizó la recta de calibrado. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo *Dye Reagent* (Bio-Rad) y mediante cálculos de regresión se determinó la concentración de cada muestra.

5.8.3. Electroforesis y detección de proteínas.

Cantidades equivalentes (entre 10 y 20 μ g) de proteína total se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema de *MiniProtean 3* (Bio-Rad) en Tampón de Electroforesis (SDS-PAGE 1X) y se sometieron a un voltaje constante de 100V. Una vez separadas por electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Protan BA 85 Nitrocellulose*, Whatman) mediante electrotransferencia *Transblot SD semi-dry transfer cell* (Bio-Rad) utilizando Tampón de Transferencia 1X. La transferencia se realizó a voltaje constante de 100V durante 45 min en condiciones de

Materiales y métodos

refrigeración. Una vez acabada la transferencia las membranas se incubaron durante 5 minutos con la tinción rojo de Ponceau (*Ponceau S Staining Solution*, Sigma) como control de proteína total cargada.

Las membranas se incubaron con una solución preparada con el agente bloqueante *ECL Advance™ blocking agent* (GE Healthcare) en TBS-T 1X para bloquear los sitios de unión no específicos durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez bloqueadas, haciendo uso de la misma solución de bloqueo, se añadió el anticuerpo primario y se incubó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en función del anticuerpo. Tras consecutivos 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. Tras diversos lavados en TBS-T 1X, la detección de proteínas se realizó con el sistema de quimioluminiscencia *Amersham™ ECL Advance Western blotting Detection Kit* (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal se detectó mediante dos sistemas: (1) Revelado de películas autorradiográficas *Amersham Hyperfilm™ MP* (GE Healthcare) expuestas a diferentes tiempos en función de la intensidad de la señal. La imagen se adquirió mediante el revelador *Curix 60* (Agfa). (2) Sistema *Image Quant LAS 4000mini biomolecular Imager* (GE Healthcare) con el que se captó las imágenes y se procesaron utilizando el programa *ImageQuant TL 1D gel analysis* para el análisis de las mismas.

TBS-T 1X	
Tris-HCl pH 7,5	0,1 M
NaCl	0,125 M
Tween-20	0,1% (v/v)

Solución de Bloqueo (2-5%)	
ECL Advance™ blocking 2-5 g	
TBS-T 1X	100mL

Tampón de Transferencia SDS-PAGE 10X	
Tris Base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20% (v/v)

Tampón de Electroforesis SDS-PAGE 10X	
Tris Base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (v/v)

5.8.4. Listado de anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por *Western blot* se describen en la tabla M.5.

Tabla M.5. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por *Western blot*.

ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO
Anti-Rnr2 policlonal de ratón (Laboratorio de la Dra. J. Stubbe) 1:100.000	Anti-conejo IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:10.000
Anti-Rnr4 policlonal de ratón (Laboratorio de la Dra. J. Stubbe) 1:100.000	Anti-conejo IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:10.000
Anti-Rad53-YC19 (Santa Cruz Biotechnology) 1:1000	Anti-cabra IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:30.000
Anti-c-myc monoclonal de ratón Roche 1:2000	Anti-conejo IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:50.000
Anti-Sml1 (Laboratorio de la Dra. J. Stubbe) 1:100.000	Anti-conejo IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:10.000
Anti-Dun1 (Laboratorio del Dr. W.D. Heyer) 1:1000	Anti-conejo IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:10.000
Anti-GFP Roche 1:10.000	Anti-ratón IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:50.000
Anti-Fosfoglicerato quinasa-3 (Pdk1) Invitrogen 1:300	Anti-ratón IgG <i>Peroxidase linked</i> GE Healthcare 1:50.000

5.9. Ensayos de actividad β -galactosidasa en levadura.

Para estudiar la regulación de la transcripción de algunos genes bajo diferentes condiciones de crecimiento, los experimentos se realizaron con células crecidas en medio SC (o SC sin alguno/s de los requerimientos) durante toda la noche y reinoculadas al día siguiente en SC bajo diferentes condiciones de crecimiento durante 6 horas. Las células de levadura utilizadas para el ensayo se transformaron con plásmidos (Tabla M.2) que contenían el promotor del gen de interés fusionado al gen *LacZ*, que codifica la enzima β -galactosidasa, la cual hidroliza un compuesto análogo a la lactosa (*ortho*-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido, ONPG) dando lugar a un producto coloreado, orto-nitrofenol, que se puede medir por espectrofotometría a 420 nm. Un volumen de células equivalente a una DO_{600} de 1,0 se recogió por centrifugación y se resuspendió en 1 mL de Tampón Z. A continuación, 700 μ L de esta suspensión se transfirieron a un nuevo tubo donde se añadieron 50 μ L de cloroformo y 50 μ L de SDS 0,1%. Las células se agitaron vigorosamente durante 10 segundos. Para empezar el ensayo, a partir del tiempo inicial, se añadió a cada tubo 200 μ L de ONPG (4 mg/mL), se incubaron a 30 °C en agitación hasta que la solución adquirió un color amarillento (entre 2 y 30 min dependiendo de la muestra). Una vez el color amarillo apareció, la reacción se paró añadiendo 350 μ L de Na_2CO_3 2 M y agitando vigorosamente. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 1 min y se midió la absorbancia a 420 nm del sobrenadante y a 600 nm a partir de diluciones 1:10 de las células. La actividad β -galactosidasa se expresó en Unidades Miller, tipo de unidad arbitraria en que una unidad de β -galactosidasa es la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 nmol de ONPG por minuto a 30 °C a pH 7.

Unidades Miller = $A_{420} * 10 * 1000 / A_{600} * 10 * \text{Vol. células (mL)} * \text{tiempo de ensayo (min)}$

Tampón Z	
Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
β – mercaptoetanol	50 mM

5.10. Ensayo de triple híbrido en levadura.

La interacción RNA-proteína en levadura se estudió mediante la técnica del triple híbrido tal y como se describe en SenGupta et al. (1996). Para ello se reutilizó la cepa de levadura *L40 coat* (Tabla M.3) transformada con los plásmidos correspondientes que se muestran en la Tabla M.2. Las células fueron sembradas en placas de SC-leu-ura (+His) y SC-leu-ura-his (-His) con concentraciones crecientes de aminotriazol (AT) utilizando la estrategia del ensayo de gotas.

5.11. Cuantificación de niveles de trifosfato de desoxiadenosina (dATP) y trifosfato de desoxicitidina (dCTP).

Se recogieron aproximadamente 2×10^8 células por centrifugación (4.000 g, 10 min) y se lavaron con 1,5 mL de agua *MilliQ*. Tras centrifugarse de nuevo (4.000 g, 5 min), el sedimento se resuspendió en metanol al 60% (v/v), añadiendo también un volumen de perlas de vidrio para llevar a cabo la rotura de las células mediante agitación vigorosa. El sedimento se separó por centrifugación a 10.000 rpm durante 1 min a 4 °C y el sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo que se centrifugó a 21.000 rpm durante 1 minuto a 4

Materiales y métodos

°C para separar el extracto de los restos celulares. El sobrenadante resultado de esta centrifugación se mantuvo durante 2 horas a -20 °C. Transcurrido este tiempo, los extractos se hirvieron durante 3 min a 100 °C y se centrifugaron a 12.000 rpm a 4 °C. Sin eliminar el sobrenadante, las muestras se secaron completamente en una *Speed-Vac*. El sedimento resultante se resuspendió en 40 µL de agua y las muestras se guardaron a -20 °C hasta ser utilizadas. Los niveles de dATP y dCTP se determinaron mediante un ensayo enzimático tal y como se describe en Mathews y Wheeler (2009). La incorporación de dATP y dCTP en secuencias específicas de oligonucleótidos caracterizadas por la presencia de extremos poly(AAAT) y poly(AAAG) se realizó con la enzima *DNA Polymerase I Large Fragment* (Klenow, Promega) y se determinó en presencia de exceso de dTTP marcado radiactivamente con [³H]dTTP (30 Ci/mmol, 1 µCi/µl, GE Healthcare).

Resultados

Localización subcelular de la subunidad pequeña R2 de la enzima ribonucleótido reductasa en respuesta a la deficiencia de hierro.

La levadura *S. cerevisiae* regula la actividad RNR mediante diferentes mecanismos, siendo uno de ellos el control de la localización subcelular de la subunidad pequeña R2. En condiciones normales, la subunidad catalítica R1, formada por un homodímero de proteínas Rnr1, se localiza en el citoplasma de la célula, mientras que la subunidad pequeña R2, formada por dos proteínas, Rnr2 y Rnr4, se localiza principalmente en el núcleo (Yao et al., 2003). En cambio, durante la fase S del ciclo celular en la que el DNA es replicado, o como mecanismo de respuesta ante un estrés genotóxico, esta levadura regula la actividad RNR mediante el cambio de localización de la subunidad pequeña R2, que se redistribuye del núcleo al citoplasma formando un complejo activo con la subunidad catalítica R1 (Yao et al., 2003). De esta forma, la célula potencia la actividad de la enzima y proporciona los niveles de dNTPs necesarios para asegurar la progresión del ciclo celular o la reparación de daños en el DNA.

A pesar de que el hierro es esencial en la actividad enzimática de la RNR se sabe muy poco acerca de los mecanismos que controlan esta enzima en condiciones de deficiencia de hierro. Dado que uno de los mecanismos más importantes en la regulación de la RNR consiste en la distribución núcleo-citoplasma de la subunidad pequeña R2 decidimos investigar si cambios en la biodisponibilidad de hierro afectaban a la distribución subcelular de la subunidad pequeña R2 de RNR.

1.1. Localización subcelular de Rnr2-GFP y Rnr4-GFP en condiciones de deficiencia de hierro.

Para determinar la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro, se obtuvieron dos cepas de levadura que se caracterizan por tener etiquetada la proteína Rnr2 o Rnr4 específicamente con GFP en su extremo carboxilo terminal (ver materiales y métodos, Tabla M.3., apartado 5.3., y 5.4). Cultivos de estas células se incubaron en agitación durante 6 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe) y condiciones de deficiencia de hierro inducida por la adición al medio SC del quelante específico de Fe^{+2} impermeable a la membrana plasmática sulfato de bazofenantrolina (BPS) a una concentración final de 100 μM (medio SC+100 μM BPS, -Fe). Para la tinción y la observación del núcleo, se incubó 1 mL de células en DAPI a una concentración de 0,25 mg/L durante 1 hora en agitación a 190 rpm y 30 °C protegiendo las muestras de la luz. Las células se observaron al microscopio de fluorescencia. Como muestra el panel A de la Figura R.1.1., ambas proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP se localizan principalmente en el núcleo de la célula en condiciones de suficiencia de hierro (Fe). En cambio, cuando el crecimiento tiene lugar en condiciones de deficiencia de hierro (-Fe) se produce un cambio de localización tanto de la subunidad Rnr2-GFP como de la subunidad Rnr4-GFP del núcleo al citoplasma de la célula (Figura R.1.1., panel A). Para obtener un análisis cuantitativo de estos resultados se hizo un recuento de las células en función de la localización subcelular de las subunidades Rnr2-GFP y Rnr4-GFP. Para ello, previamente, se estableció un criterio de clasificación tal y como muestra el panel B de la Figura R.1.1. Se definió localización nuclear (N) cuando las células presentaban señal principalmente

nuclear; localización citosólica (C) cuando la señal se localizaba principalmente en el citoplasma de la célula, y localización núcleo-citoplasma (N/C) definida como la presencia de señal de forma difusa tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula. El análisis cuantitativo en función de su localización subcelular se realizó contando un mínimo de 200 células por experimento en al menos 3 experimentos realizados de forma independiente. Siguiendo estos criterios observamos que en condiciones de suficiencia de hierro (Fe) la subunidad Rnr2-GFP se localiza predominantemente en el núcleo de la célula (Figura R.1.1., panel C, Fe: 63% N+N/C). Resultados similares se obtuvieron en la localización subcelular de la proteína Rnr4-GFP (Figura R.1.1., panel D, Fe: 66% N+N/C). En cambio, cuando las células crecen en condiciones de deficiencia de hierro (-Fe), ambas subunidades Rnr2-GFP y Rnr4-GFP se localizan principalmente en el citoplasma de la célula (Figura R.1.1., panel C, -Fe: 91% C y panel D, -Fe : 93% C). Con estos resultados podemos concluir que las células de *S. cerevisiae* utilizan el cambio de localización subcelular de las subunidades Rnr2 y Rnr4 de la enzima RNR como mecanismo de respuesta a la deficiencia de hierro inducida por el quelante BPS.

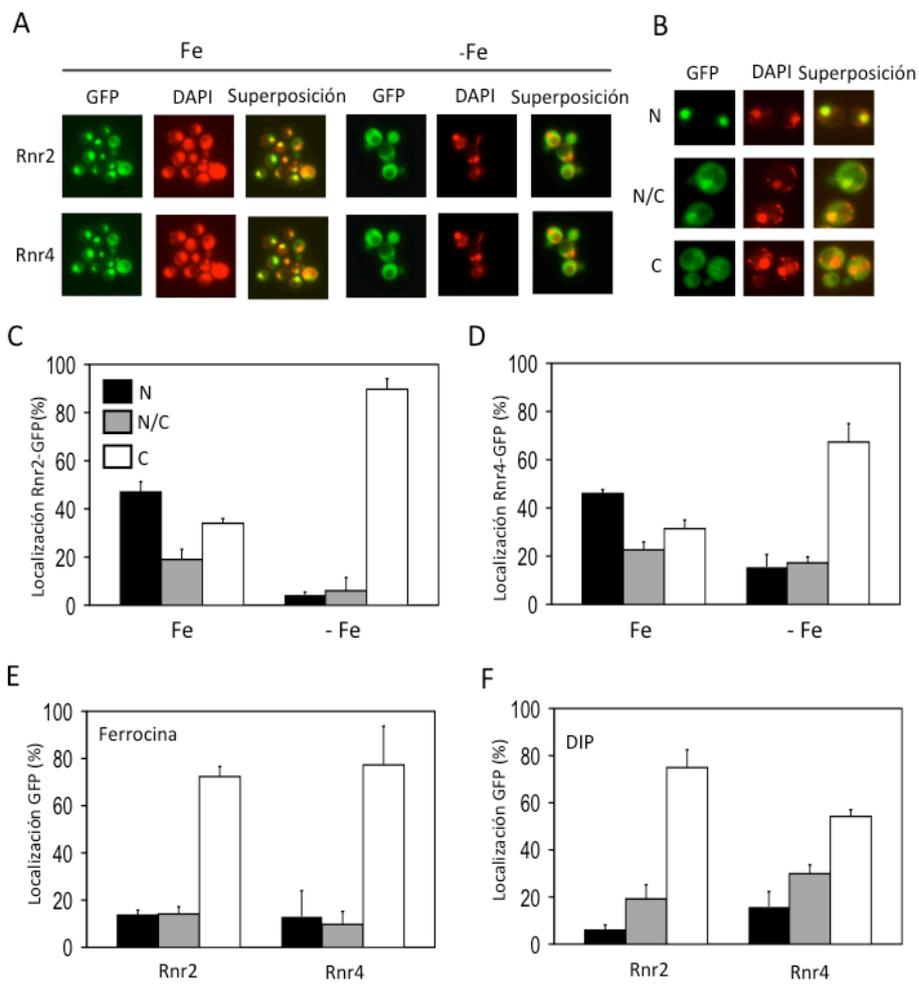


Figura R.1.1. Las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP se redistribuyen del núcleo al citoplasma en condiciones de deficiencia de hierro. (A) Localización de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP en una cepa silvestre (SPY364 y SPY322, respectivamente) crecida durante 6 horas hasta fase exponencial en medio sintético completo bajo condiciones de suficiencia (SC, Fe) o deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M de BPS, -Fe). El DNA fue teñido durante 1 hora con DAPI a una concentración final de 0,25 mg/L. Se muestra también la superposición entre la señal GFP y DAPI (Superposición). (B) Criterios para la clasificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP (C y D). Cuantificación de la localización de Rnr2-GFP (C) y Rnr4-GFP (D) en células de las cepas SPY364 y SPY322 crecidas en las mismas condiciones que se indican en el panel A. Las células se clasificaron en función de la localización de señal GFP para Rnr4 y Rnr2 en el núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). (E y F). Cuantificación de la localización subcelular de Rnr2-GFP y Rnr4-GFP de células de las cepas SPY364 y SPY322 crecidas durante 6 horas hasta fase exponencial en medio sintético completo (SC) adicionado con Ferrocina (E) o DIP (F) a una concentración final de 1 mM y 250 μ M, respectivamente. En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

Para averiguar si el cambio de localización del núcleo al citoplasma de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP cuando el BPS es añadido al medio se debía a una deficiencia de hierro en el medio o, por el contrario, era consecuencia de un efecto provocado por otras propiedades del BPS, decidimos estudiar la localización subcelular de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP haciendo uso de otros dos quelantes de hierro (Fe^{2+}): Ferrocina, quelante impermeable a la membrana plasmática a una concentración final de 1 mM; y DIP, quelante permeable a la membrana plasmática a una concentración final de 250 μ M. Cuando las células de las cepas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP se crecieron durante 6 horas en un medio deficiente en hierro obtenido bien por la adición de Ferrocina o de DIP (Figura R.1.1., panel E y

F), tanto Rnr2-GFP como Rnr4-GFP relocalizaron del núcleo al citoplasma. En el caso de la adición de Ferrocina, tan solo un 30% de las células para Rnr2-GFP y un 20% de las células para Rnr4-GFP presentan señal nuclear (N) o núcleo-citoplasma (N/C), mientras que un 70% y un 80% de las células presentan señal citoplasmática para Rnr2-GFP y Rnr4-GFP, respectivamente (Figura R.1.1., panel E). Haciendo uso del quelante de hierro DIP, en el caso de Rnr2-GFP un 25% de las células presenta localización nuclear o núcleo-citoplasma, mientras que un 75% presenta localización citoplasmática. En cambio, Rnr4-GFP solo relocaliza del núcleo al citoplasma en un 55% de las células manteniéndose en el núcleo (N+N/C) en un 45% de las células (Figura R.1.1., panel F). A partir de estos resultados podemos concluir que la deficiencia de hierro, causada por la adición de quelantes de hierro como el BPS, la Ferrocina o el DIP induce la salida de la subunidad pequeña R2 de RNR del núcleo al citoplasma de la levadura *S. cerevisiae*.

1.2. Estudio cinético de la relocalización núcleo-citoplasma de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP en condiciones de deficiencia de hierro.

Aunque pasadas 6 horas la subunidad pequeña R2 de RNR se localiza predominantemente en el citoplasma, se decidió realizar un estudio cinético para determinar el número mínimo de horas que la célula necesita para inducir la relocalización de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP del núcleo al citoplasma en nuestras condiciones de deficiencia de hierro. Para ello, células de las cepas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP se crecieron en condiciones de suficiencia de hierro (SC, Fe) durante 4 horas hasta fase exponencial (T_0). A continuación, se añadió BPS a una concentración final 100 μM y se tomaron

muestras del cultivo cada 60 min durante 6 horas (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5 y T_6). Los resultados se cuantificaron numéricamente utilizando el mismo criterio de clasificación para la localización subcelular que se muestra en el panel B de la Figura R.1.1. La relocalización de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro se incrementa con el tiempo (del T_0 a T_6 , panel A y B de la Figura R.1.2.), y requiere al menos 6 horas para que el 80% de las células redistribuyan la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma. Pasado este tiempo sólo en el 10% de las células la subunidad pequeña R2 presenta localización nuclear. Tiempos más largos no incrementan la relocalización núcleo-citoplasma de Rnr2-GFP y Rnr4-GFP (datos no mostrados).

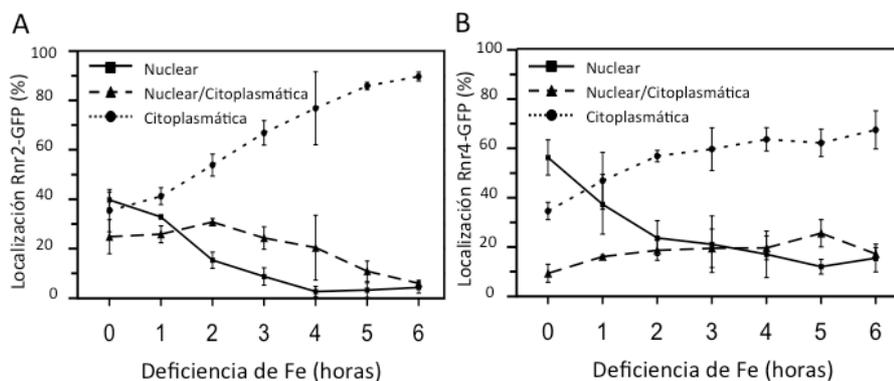


Figura R.1.2. Cinética de la relocalización de Rnr2-GFP y Rnr4-GFP en condiciones de deficiencia de hierro. Cuantificación de la localización de Rnr2-GFP (A) y Rnr4-GFP (B) en las cepas SPY364 y SPY322 respectivamente. Se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes y se clasificaron en función de la localización subcelular de Rnr4-GFP y Rnr2-GFP en el núcleo (N), núcleo-citoplasma (N/C) y citoplasma (C). Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

1.3. Funcionalidad de las proteínas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP.

Los resultados de localización subcelular con las proteínas Rnr2 y Rnr4 etiquetadas con GFP muestran que, bajo condiciones de deficiencia de hierro, la levadura *S. cerevisiae* induce la relocalización de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma tal y como ocurre en respuesta a un estrés genotóxico producido por la adición de HU o del agente alquilante MMS. Las cepas con Rnr2 y Rnr4 etiquetadas con GFP crecen del mismo modo que la cepa silvestre BY4741 en placas de medio rico YPD con concentraciones crecientes de BPS o con MMS al 0,04% (Figura R.1.3., panel A y B). Sin embargo, las cepas con Rnr2 y Rnr4 etiquetadas con GFP presentan problemas de crecimiento en presencia de 10 mM de HU, y no crecen a concentraciones más altas (35 mM de HU), condiciones en las que la cepa silvestre no presenta problemas de crecimiento (Figura R.1.3., panel B). Estos resultados indican que aunque las cepas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP no presentan defectos de crecimiento en placa bajo las condiciones ensayadas de deficiencia de hierro o estrés genotóxico inducido con MMS, la ausencia de crecimiento de estas cepas en presencia de HU sugiere que la etiqueta GFP afecta a la funcionalidad de la enzima.

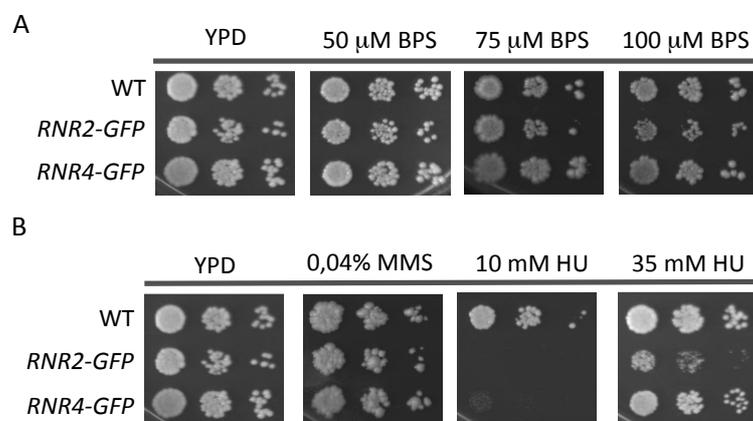


Figura R.1.3. La etiqueta GFP afecta a la funcionalidad de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en presencia de HU. Las cepas Rnr2-GFP (SPY364), Rnr4-GFP (SPY322) y silvestre BY4741 (SPY17, WT) se crecieron hasta fase exponencial en medio líquido YPD y diluciones seriadas de los cultivos se sembraron en medio sólido YPD con o sin BPS (panel A), HU y MMS (panel B) a las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron durante tres días a 30 °C y se fotografiaron.

1.4. Localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro.

Con el objetivo de estudiar si el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 en respuesta a la deficiencia de hierro no era un efecto secundario de la etiqueta GFP, decidimos determinar la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 por inmunofluorescencia indirecta (IMF) en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro. Cultivos de células de la cepa silvestre BY4741 se incubaron en agitación durante 6 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe) y condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe). Se recogió 1 mL de células que se procesaron para visualizar

la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 por IMF. Para ello se utilizaron anticuerpos específicos contra dichas proteínas siguiendo las condiciones que se indican en la Tabla M.4., (ver apartado 5.6.1 de materiales y métodos). Para la tinción y la observación del núcleo las muestras se incubaron, protegidas de la luz, durante 2 min con 2 μ L a 0,1 mg/mL de DAPI. Las células se observaron al microscopio y se fotografiaron. El análisis cuantitativo en función de su localización subcelular se realizó contando un mínimo de 200 células por experimento en al menos 3 experimentos realizados de forma independiente. Tal y como se ha descrito anteriormente, las proteínas Rnr2 y Rnr4 se localizan predominantemente en el núcleo de la célula en condiciones de suficiencia hierro (Figura R.1.4., panel A y B, Fe). En cambio, cuando el crecimiento tiene lugar en condiciones de deficiencia de hierro la subunidad pequeña R2 relocaliza del núcleo al citoplasma (Figura R.1.4., panel A y B, -Fe) al igual que ocurría con las proteínas Rnr2 y Rnr4 etiquetadas con GFP (Figura R.1.1, panel A, -Fe). Para obtener un análisis cuantitativo de estos resultados se utilizó el mismo criterio de clasificación de localización subcelular que se muestra en el panel B de la Figura R.1.1. Siguiendo estos criterios observamos que bajo condiciones de suficiencia de hierro más del 80% de las células presentan señal nuclear tanto para Rnr2 como para Rnr4 (Figura R.1.4., panel C y D, Fe). En cambio, cuando las células crecen en condiciones de deficiencia de hierro la señal es principalmente citoplasmática en un 60-80% de las células, mientras que sólo un 10% presentan señal nuclear (Figura R.1.4., panel C y D, -Fe). Estos resultados demuestran que, al igual que ocurre en respuesta a daños en el DNA, *S. cerevisiae* induce la relocalización del núcleo al citoplasma de la subunidad

pequeña R2 de la enzima RNR cuando se añade el quelante de hierro BPS al medio de crecimiento.

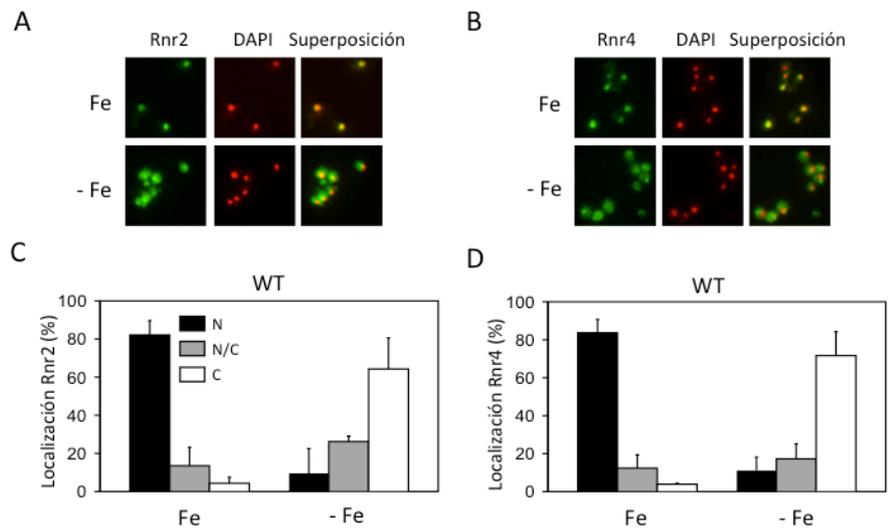


Figura R.1.4. Rnr2 y Rnr4 relocalizan del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro. (A y B) La cepa silvestre BY4741 (SPY17, WT) fue crecida durante 6 horas en medio SC (Fe) o SC con 100 μ M de BPS (-Fe). El DNA fue teñido durante 2 minutos con DAPI a una concentración final de 1 mg/mL y la localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 se determinó por IMF usando anticuerpos anti-Rnr2 (panel A) y anti-Rnr4 (panel B), respectivamente. Se muestra también la superposición entre la señal del DAPI y de la IMF (Superposición). (C y D) Cuantificación de la localización subcelular de Rnr2 (panel C) y Rnr4 (panel D) en células crecidas en las mismas condiciones que se indican en el panel A y B. Las células se clasificaron en función de la localización subcelular de señal de IMF para Rnr4 y Rnr2 en núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados y se representó el % de células totales y la desviación estándar.

1.5. Localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa *fet3Δfet4Δ*.

Para averiguar si la distribución subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 desde el núcleo al citoplasma en respuesta a la adición de quelantes de hierro es una consecuencia específica provocada por el déficit de hierro en el medio, decidimos estudiar la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro inducida de forma genética. En condiciones de escasez de hierro, *S. cerevisiae* induce la transcripción dependiente de Aft1 y Aft2 de varios genes responsables del mecanismo reductor de adquisición de hierro de alta afinidad desde el medio extracelular, entre ellos *FET3* y *FTR1*. El gen *FET3* codifica una metaloreductasa responsable de reoxidar en condiciones aerobias el Fe^{+2} a Fe^{+3} dentro del mecanismo de transporte de hierro de alta afinidad mediado por el complejo Ftr1/Fet3. En cambio, en condiciones anaerobias y de suficiencia de hierro, *S. cerevisiae* expresa el transportador de hierro de baja afinidad Fet4. De esta forma, cepas mutantes para los genes *FET3* y *FET4* presentan problemas en la adquisición de hierro desde el medio extracelular. Con el objetivo de estudiar si defectos en la adquisición de hierro afectan a la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 de la RNR, construimos una cepa *fet3Δfet4Δ* deficiente en los mecanismos de adquisición de hierro de alta y baja afinidad. En condiciones de suficiencia de hierro, la cepa silvestre BY4741 presenta un patrón de localización nuclear para Rnr2 y Rnr4 (Figura R.1.4., panel C y D, Fe), mientras que en estas condiciones de crecimiento la subunidad pequeña R2 ya se encuentra localizada mayoritariamente en el citoplasma en un mutante *fet3Δfet4Δ* (Figura R.1.5., Fe: 80% C). En cambio, cuando se añade un exceso de hierro al medio (+Fe, SC+300 μM de sulfato amónico ferroso, FAS), la cepa

fet3Δfet4Δ presenta localización principalmente nuclear para la subunidad pequeña R2 (Figura R.1.5., +Fe). Este resultado indica que el defecto en la adquisición de hierro de la cepa *fet3Δfet4Δ* provoca la salida de Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma de la célula. Con estos datos podemos concluir que la levadura *S. cerevisiae* induce, en respuesta a la deficiencia de hierro, la relocalización del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 de la RNR. El cambio de localización subcelular se produce tanto en respuesta a una deficiencia de hierro nutricional, creada por el uso de quelantes específicos de hierro que secuestran el metal disminuyendo su disponibilidad, como en respuesta a una deficiencia de hierro genética creada con el uso de mutantes que presentan reducida su capacidad de adquisición de hierro desde el medio extracelular.

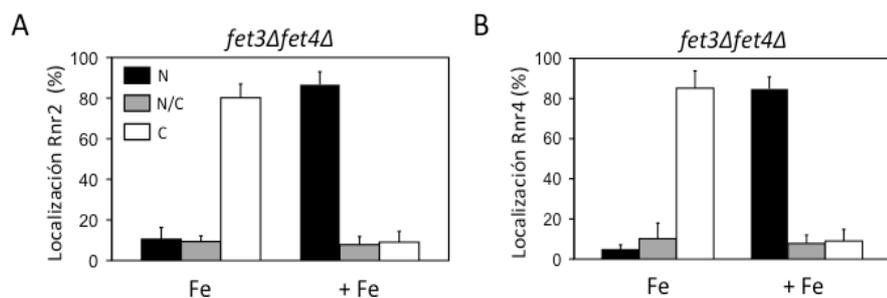


Figura R.1.5. La deficiencia genética provocada por la disrupción de los genes *FET3* y *FET4* causa la relocalización de Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma. (A y B) Cuantificación de la localización subcelular de Rnr2 (panel A) y Rnr4 (panel B) en mutantes *fet3Δfet4Δ* (SPY386) crecidos durante 6 horas en medio SC (Fe) o SC con FAS a una concentración final de 300 μ M (+Fe). Las células son procesadas y los resultados son representados tal y como se indica en la Figura R.1.4. Las células se clasificaron en función de la localización subcelular de señal de IMF para Rnr4 y Rnr2 en núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados y, se representó el % de células totales y la desviación estándar.

1.6. Determinación de los niveles de desoxirribonucleótidos en condiciones de deficiencia de hierro.

En *S. cerevisiae*, múltiples vías metabólicas que dependen de hierro como cofactor esencial, tales como la respiración, la síntesis de algunos aminoácidos y lípidos o la síntesis de grupos hemo, ven disminuída su actividad en condiciones de limitación de hierro (Ihrig et al., 2010; Puig et al., 2008; Puig et al., 2005; Shakoury-Elizeh et al., 2004). Dado que la enzima RNR requiere de un cofactor di-Fe para la catálisis enzimática, se estudió si, además de la distribución celular de la subunidad pequeña R2, la función RNR también está regulada bajo diferentes condiciones de biodisponibilidad de hierro. Para este propósito, células de la cepa silvestre BY4741 se crecieron durante 7 horas hasta fase exponencial de crecimiento bajo condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe) y de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe). A continuación, se obtuvo un extracto de dNTPs de aproximadamente 2×10^8 células (tal y como se describe en el punto 5.11 del apartado materiales y métodos) y, mediante un ensayo enzimático, se determinaron las concentraciones intracelulares de trifosfato de desoxiadenosina (dATP) y trifosfato de desoxicitidina (dCTP) (Mathews y Wheeler 2009). Sorprendentemente, observamos que después de 7 horas de crecimiento en condiciones de deficiencia de hierro (Figura R.1.6., WT, -Fe) los niveles intracelulares de dATP y dCTP no solo no disminuyen sino que muestran un aumento de 2 veces respecto de los niveles de dATP y dCTP en células crecidas en condiciones de suficiencia de hierro (Figura R.1.6., WT, Fe).

Con el fin de asegurarnos de si el aumento observado en los niveles de dATP y dCTP es debido a la deficiencia de hierro en el medio y no, a un efecto secundario del quelante BPS, se utilizó la cepa mutante *fet3 Δ fet4 Δ*

con el fin de disminuir la adquisición de hierro y promover su limitación intracelular. De esta forma, se creció la cepa mutante *fet3Δfet4Δ* bajo condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe) en las cuales, como se ha mostrado anteriormente, la subunidad pequeña R2 se localiza en el citoplasma de la célula (Figura R.1.5., Fe) y, una vez obtenidos los extractos de dNTPs, se midieron los niveles mediante el mismo ensayo enzimático utilizado con la cepa silvestre (Figura R.1.6., WT, Mathews y Wheeler 2009). Como se muestra en la Figura R.1.6., en condiciones de suficiencia de hierro la cepa *fet3Δfet4Δ* muestra un aumento de los niveles de dATP y dCTP en comparación con la cepa silvestre bajo estas mismas condiciones de crecimiento. Con estos resultados podemos concluir que en nuestras condiciones de deficiencia de hierro (tanto nutricional como genética), a pesar de la menor disponibilidad de hierro para la célula, los niveles de dATP y dCTP aumentan 2 veces.

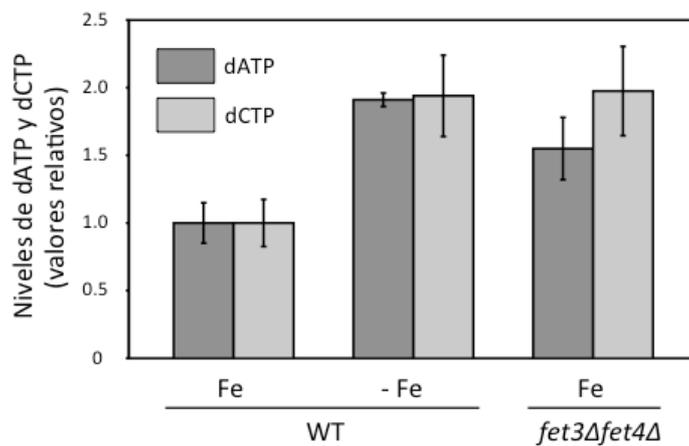


Figura R.1.6. En la levadura *S. cerevisiae* los niveles de dATP y de dCTP aumentan en respuesta a deficiencia nutricional y genética de hierro. Cultivos de células de la cepa silvestre BY4741 (SPY17, WT) y de la cepa mutante *fet3Δfet4Δ* (SPY386) se crecieron durante 7 horas en medio SC (Fe) y SC con 100 μ M de BPS (-Fe). Los niveles de dATP (barras representadas en gris oscuro) y dCTP (barras representadas en gris claro) fueron determinados mediante un ensayo enzimático (Mathews y Wheeler et al 2009). Los valores relativos de dATP y dCTP se representan respecto a los de la cepa silvestre crecida bajo condiciones de suficiencia de hierro. El promedio y la desviación estándar representan los valores obtenidos de al menos 3 experimentos realizados de forma independiente.

Estudio del papel de las quinasas Mec1 y Rad53 en la relocalización subcelular de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro.

Como se ha descrito en el capítulo anterior, en respuesta a la deficiencia de hierro, la subunidad pequeña R2 de RNR cambia su localización subcelular del núcleo al citoplasma. Dado que el *checkpoint* de integridad del DNA Mec1-Rad53-Dun1 es responsable de activar el mecanismo de respuesta de salida de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en respuesta al estrés genotóxico (Yao et al., 2003), decidimos estudiar si el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 en condiciones de déficit de hierro dependía de la ruta de quinasas Mec1-Rad53-Dun1.

2.1. Estado de fosforilación de las quinasas Rad53 y Dun1 en condiciones de deficiencia de hierro.

Como se ha descrito anteriormente, condiciones que requieren un incremento en los niveles de dNTPs inducen la actividad RNR. En *S. cerevisiae* en respuesta a un estrés genotóxico que requiere un aumento en los niveles de dNTPs como el inducido por la HU o el MMS, se produce la activación del *checkpoint* de respuesta a daños en el DNA formado por la ruta de quinasas Mec1, Rad53 y Dun1 (Harper y Elledge, 2007). Para averiguar si la ruta de quinasas Mec1-Rad53-Dun1 se activa en respuesta a la deficiencia de hierro, se estudió el estado de fosforilación de las quinasas Rad53 y Dun1 en estas condiciones. Para ello, células de la cepa silvestre BY4741 y de la cepa Dun1-MYC13 se incubaron en agitación durante 6 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de

hierro (medio SC, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe) y condiciones de estrés genotóxico inducido por HU (medio SC+0,2 M de HU) y MMS (medio SC+0,04% de MMS). Ambos agentes genotóxicos, HU y MMS, se añadieron a los medios de cultivo pasadas cuatro horas de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro y se incubaron en agitación durante dos horas. Además, se crecieron células *fet3 Δ fet4 Δ* en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe). A continuación, se obtuvieron los extractos totales de proteínas a partir de 5 mL de estos cultivos. Cantidades equivalentes de proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida para ser analizadas por *Western blot* (ver materiales y métodos apartado 5.8.). La inmunodetección de proteínas se llevó a cabo mediante anticuerpos específicos siguiendo las condiciones que se indican en la Tabla M.5. Como se ha descrito previamente, la activación del *checkpoint* de integridad del DNA controlado por la ruta de quinasas Mec1-Rad53-Dun1 en respuesta al estrés genotóxico, causado por HU o MMS, provoca la fosforilación de las quinasas Rad53 y Dun1 que se evidencia por un retraso en la movilidad electroforética de ambas proteínas (Figura R.2.1., Sanchez et al., 1996; Chen et al., 2007). En cambio, este retraso en la migración electroforética no se observa bajo condiciones de deficiencia de hierro tanto nutricional, (Figura R.2.1., cepa silvestre BY4741 y cepa *Dun1-MYC13* en medio SC+100 μ M BPS, -Fe) como genética (Figura R.2.1., cepa *fet3 Δ fet4 Δ* crecida en medio SC). Destacar que estas condiciones de deficiencia de hierro promueven el cambio de localización subcelular del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 de RNR. Con estos resultados, podemos concluir que las quinasas Rad53 y Dun1 no se activan por

fosforilación en respuesta a la deficiencia de hierro, como ocurre en respuesta a un estrés genotóxico.

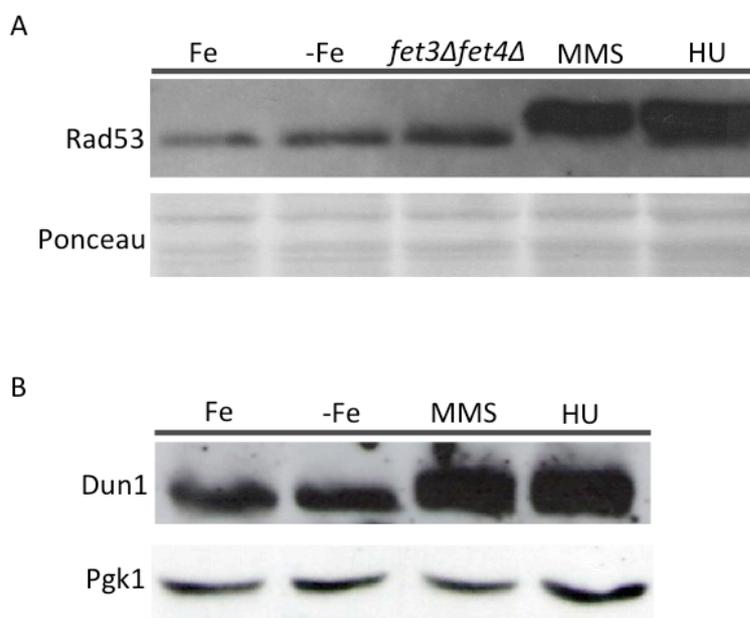


Figura R.2.1. Las quinasas Rad53 y Dun1 no se fosforilan en condiciones de deficiencia de hierro. Determinación del estado de fosforilación de la quinasa Rad53 (panel A) y Dun1 (panel B). La cepa silvestre BY4741 (panel A, SPY17) y la cepa Dun1-MYC13 (panel B, SPY379) se crecieron en medio SC (Fe), SC con 100 μ M de BPS (-Fe) durante 6 horas; medio SC con 0,04% de MMS (MMS) y medio SC con 0,2 M de HU (HU) añadidos al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. La cepa *fet3Δfet4Δ* se creció durante 6 horas en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe). Los extractos totales de proteínas obtenidos mediante extracción alcalina, se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Rad53 (panel A) y anti-c-Myc (panel B). La tinción con Ponceau S (panel A) y los niveles de proteína Pgk1 (panel B) se utilizaron como control de carga.

Como se describe en el apartado 1.3 del capítulo anterior, ensayos de crecimiento en placa muestran que la etiqueta GFP afecta a la funcionalidad de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en presencia de HU. Sin embargo, bajo las condiciones de deficiencia de hierro ensayadas, las cepas Rnr2-GFP y Rnr4-GFP no presentan defectos de crecimiento. Tal y como muestra la Figura R.2.2., en condiciones de estrés genotóxico la quinasa Rad53 presenta un retraso en su movilidad electroforética que no se observa bajo condiciones de deficiencia de hierro para la cepa silvestres BY4741 y Rnr4-GFP. Sin embargo, condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe) provocan un retraso en la movilidad electroforética de la quinasa Rad53 en la cepa Rnr2-GFP al igual que ocurre en respuesta a un estrés genotóxico (Figura R.2.2., Rnr2-GFP, -Fe). La ausencia de crecimiento de las cepas etiquetadas con GFP en presencia de HU (Figura R.1.3., panel B) y el retraso en la movilidad electroforética de la quinasa Rad53 en la cepa Rnr2-GFP en condiciones de deficiencia de hierro (Figura R.2.2.) indican que la etiqueta GFP afecta negativamente a la funcionalidad de la subunidad pequeña R2 de RNR induciendo, posiblemente, la activación del *checkpoint* controlado por las quinasas Mec1 y Rad53.

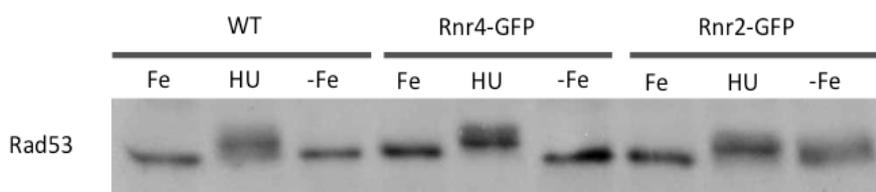


Figura R.2.2. Estado de fosforilación de la quinasa Rad53 en condiciones de deficiencia de hierro en la cepa Rnr2-GFP. Determinación del estado de fosforilación de la quinasa Rad53. La cepa silvestre BY4741 (SPY17, WT), la cepa SPY363 (Rnr4-GFP) y la cepa SPY322 (Rnr2-GFP) se crecieron en medio SC (Fe), SC con 100 μ M de BPS (-Fe) durante 6 horas; y medio SC con 0,2 M de HU (HU) añadidos al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. Los extractos totales de proteínas se obtuvieron por precipitación con TCA y cantidades equivalentes de proteínas se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Rad53 tal y como se describe para la Figura R.2.1.

2.2. Estudio de la regulación transcripcional de los genes *RNR2* y *RNR4* en respuesta a la deficiencia de hierro.

En *S. cerevisiae*, el *checkpoint* de integridad del DNA Mec1-Rad53-Dun1 es necesario para la activación transcripcional de la mayoría genes implicados en la respuesta al estrés genotóxico. La activación de la ruta de quinasas Mec1-Rad53-Dun1 promueve, en respuesta a un estrés genotóxico, la desrepresión de los genes *RNR2* y *RNR4* que codifican las proteínas que forman la subunidad pequeña R2 de RNR (Huang et al., 1998). En concreto, bajo estas condiciones, la quinasa Dun1 induce la fosforilación del represor transcripcional Crt1 impidiendo su unión al DNA y favoreciendo así la expresión de los genes *RNR2* y *RNR4*. Dado que la regulación transcripcional de los genes *RNR2* y *RNR4* es otro de los mecanismos de respuesta que *S. cerevisiae* activa en respuesta a daños en el DNA, decimos estudiar si el déficit de hierro en el medio afectaba a la activación transcripcional de los genes *RNR2* y *RNR4*. Para ello, la cepa silvestre

BY4741 se transformó con los plásmidos *RNR2-LacZ*, *RNR4-LacZ* y *FET3-LacZ*, que se caracterizan por expresar el gen *LacZ* que codifica β -galactosidasa bajo el control de la región promotora de los genes *RNR2*, *RNR4* y *FET3* respectivamente. El promotor del gen *FET3* se utilizó como control de inducción de la expresión génica en condiciones de deficiencia de hierro. Cultivos de estas células se crecieron hasta fase exponencial durante 6 horas en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC suplementado con 100 μ M de FAS, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe) y condiciones de estrés genotóxico inducido por el agente alquilante MMS al 0,04% (medio SC+100 μ M de FAS+MMS al 0,04%) añadido al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. Se recogieron 5 mL de células a una DO_{600} de 1,0 y se realizaron ensayos de β -galactosidasa. Las células se procesaron tal y como se describe el apartado 5.9 de materiales y métodos. Como muestra la Figura R.2.3., en presencia de MMS (barras grises), se induce la expresión de los genes *RNR2-LacZ* y *RNR4-LacZ* como mecanismo de respuesta a daños en el DNA, mientras que la expresión del gen *FET3-lacZ* apenas se ve afectada. En cambio, la inducción de los genes *RNR2* y *RNR4* no se observa bajo condiciones de deficiencia de hierro (barras negras) que activan la expresión del gen *FET3*. La ausencia de inducción de la transcripción de los genes *RNR2* y *RNR4* en condiciones de deficiencia de hierro sugiere que *S. cerevisiae* no regula a nivel transcripcional la expresión de los genes *RNR2* y *RNR4* en respuesta a la falta de hierro como sí ocurre en respuesta al estrés genotóxico.

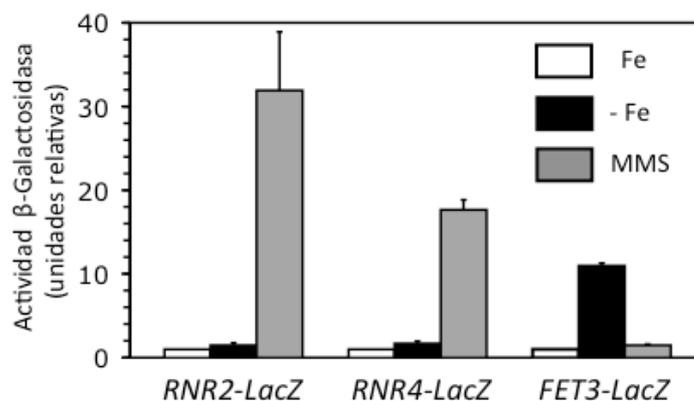


Figura R.2.3. La transcripción de los genes *RNR2* y *RNR4* no se activa en respuesta a la deficiencia de hierro. Cultivos de células de la cepa silvestre BY4741 (SPY17) transformadas con los plásmidos *RNR2-LacZ* (pSP640) *RNR4-LacZ* (pSP639) y *FET3-LacZ* (P174) se crecieron hasta fase exponencial durante 6 horas en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC+100 μ M de FAS, Fe, barras blancas), condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe, barras negras); y condiciones de estrés genotóxico (medio SC+100 μ M de FAS+MMS al 0,04%, barras grises) donde el MMS se añade durante las dos últimas horas de crecimiento. La actividad β -galactosidasa se calculó para cada transformante en al menos tres experimentos realizados independientemente y el resultado se expresó en actividades relativas a las condiciones de suficiencia de hierro (SC+100 μ M de FAS, Fe), dando a estas un valor de 1.

2.3. Papel de las quinasas Mec1 y Rad53 en la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de déficit de hierro.

El mecanismo de respuesta al cambio de localización subcelular del núcleo al citoplasma de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en respuesta al estrés genotóxico depende del *checkpoint* de integridad del DNA Mec1-Rad53-Dun1. En mutantes deficientes en las quinasas Mec1 y Rad53 la salida del núcleo al citoplasma no ocurre en presencia de HU o MMS (Yao et al.,

2003). Dado que en condiciones de deficiencia de hierro la subunidad pequeña R2 de RNR se relocaliza del núcleo al citoplasma, decidimos averiguar si este cambio de localización dependía de las quinasas Mec1 y Rad53. Para ello, decidimos estudiar por IMF indirecta la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 bajo condiciones de deficiencia de hierro en mutantes deficientes en las quinasas Mec1 y Rad53. Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron cultivos de la cepa silvestre W303-1a y de las cepas mutantes *mec1Δsml1Δ*, *rad53Δsml1Δ* y *sml1Δ*. Se utilizaron dobles mutantes *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ* porque los mutantes simples para las quinasas Mec1 y Rad53 son letales debido a una replicación cromosómica incompleta. En cambio, la delección del gen *SML1*, una de las dianas de la quinasa Dun1 y responsable de inhibir a la subunidad grande R1 de RNR en condiciones donde no es necesaria la síntesis de dNTPs, permite la viabilidad de las células *mec1Δ* y *rad53Δ* proporcionando niveles de dNTPs adecuados que rescatan la letalidad de estos mutantes (Zhao et al., 1998). Cultivos de estas cepas se incubaron en agitación durante 6 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μM BPS, -Fe) y condiciones de estrés genotóxico inducido por el agente químico HU a una concentración final de 0,2 M (medio SC+0,2 M de HU) y el agente alquilante MMS al 0,04% (medio SC+ 0,04% de MMS), los cuales fueron añadidos al medio durante las dos últimas horas de crecimiento.. Al igual que ocurre con la cepa silvestre BY4741, en la cepa silvestre W303-1a la subunidad pequeña R2 relocaliza del núcleo al citoplasma de la célula en respuesta al estrés genotóxico (Figura R.2.4., WT). En cambio, en mutantes *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ* la subunidad R2 de RNR queda retenida principalmente en el núcleo de las células en presencia de HU y MMS

(Figura R.2.4., panel C, D, E y F; Yao et al., 2003). Por el contrario, en mutantes *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ*, entre un 60-80% de las células localizan la subunidad pequeña R2 en el citoplasma de la célula en condiciones de deficiencia de hierro, al igual que ocurre en la cepa silvestre W303-1a (Figura R.2.4.). Estos resultados nos permiten concluir que en *S. cerevisiae* el cambio de localización subcelular de la subunidad pequeña R2 de RNR en respuesta a la deficiencia de hierro no depende de las quinasas Mec1 y Rad53.

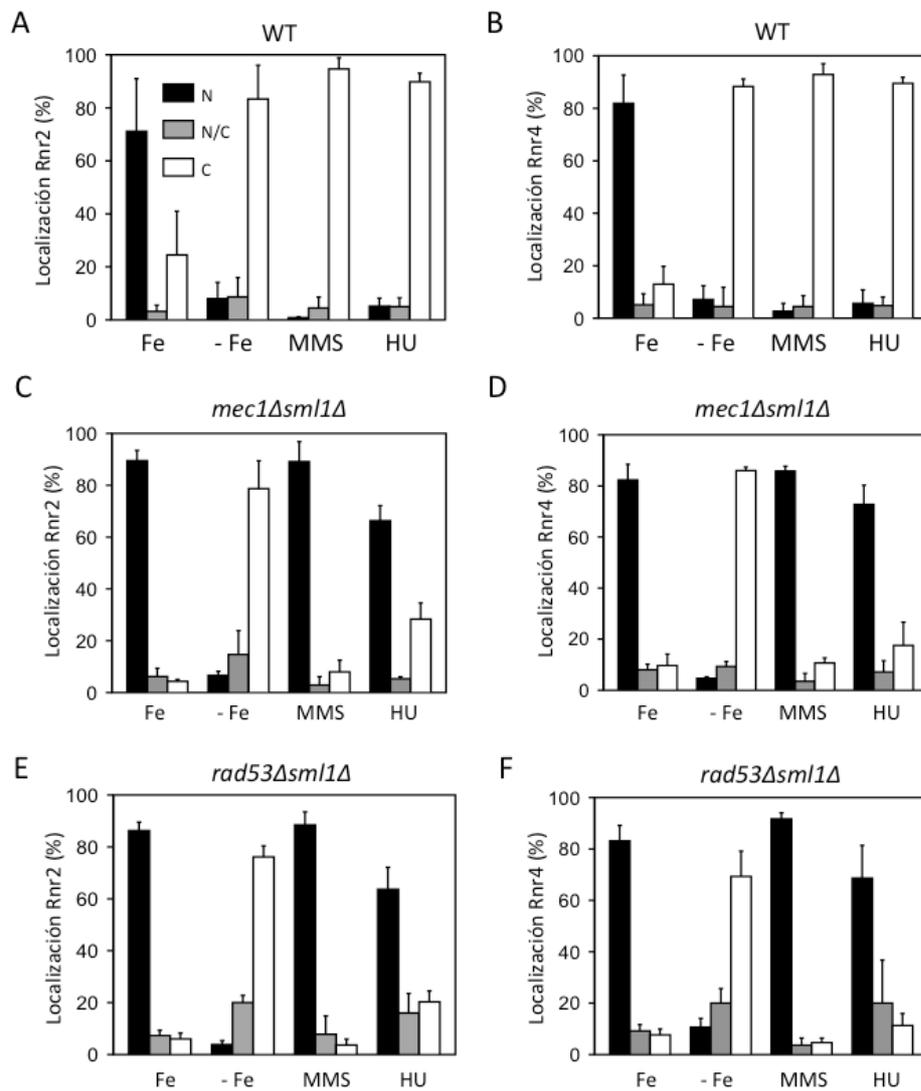


Figura R.2.4. Las quinasas Mec1 y Rad53 no participan en el cambio de localización subcelular del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa silvestre W303-1a (panel A y B , SPY387) y en las cepas mutantes *mec1Δsml1Δ* (panel C y D , SPY389) y *rad53Δsml1Δ* (panel E y F , SPY390) crecidas durante 6 horas en medio SC (Fe), SC con 100 μM de BPS (-Fe), SC con 0,2 M de HU o MMS al 0,04%. Las células son procesadas y los resultados representados tal y como se indica en la Figura R.1.4. Las células se clasificaron en función de la localización subcelular de señal de IMF para Rnr4 y Rnr2 en núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

La proteína Sml1, inhibidor de la subunidad grande R1 y diana de la ruta de quinasas Mec1-Rad53-Dun1, se degrada durante la fase S del ciclo celular y en respuesta a daños en el DNA para mantener un balance óptimo en los niveles de dNTPs. A pesar de ello, en mutantes *sml1Δ* la subunidad pequeña R2 relocaliza al citoplasma en presencia de agentes genotóxicos que inducen la activación del *checkpoint* de respuesta a daños al DNA (Yao et al., 2003). Para averiguar si la proteína Sml1 participa en el cambio de localización subcelular de la subunidad pequeña R2 de RNR en condiciones de deficiencia de hierro, estudiamos por IMF indirecta la localización subcelular de las proteínas Rnr4 y Rnr2 en mutantes *sml1Δ*. Como muestra la Figura R.2.5., en condiciones de deficiencia de hierro, tanto la proteína Rnr2 como Rnr4 relocalizan del núcleo al citoplasma en mutantes *sml1Δ*. Estos resultados indican que la proteína Sml1 no afecta la distribución del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 de RNR en condiciones de deficiencia de hierro.

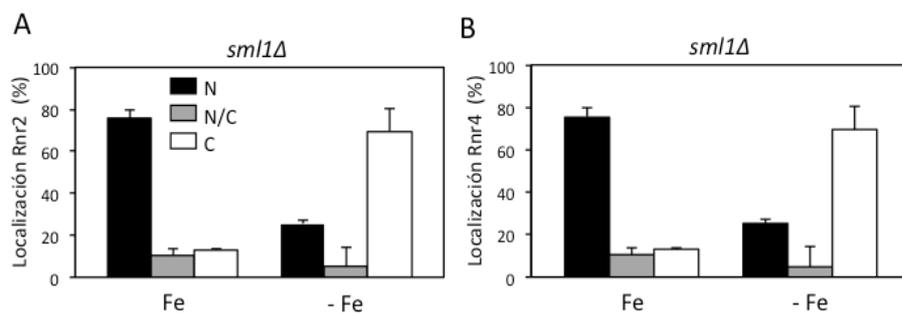


Figura R.2.5. El cambio de localización de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro no depende de la proteína Sml1. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 (panel A) y Rnr4 (panel B) en la cepa mutante *sml1Δ* (SPY391) crecida durante 6 horas en medio SC (Fe), o SC con 100 μ M de BPS (-Fe). Las células son procesadas y los resultados representados tal y como se indica en la Figura R.2.4. Las células se clasificaron en función de la localización subcelular de señal de IMF para Rnr4 y Rnr2 en núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

Función de las proteínas Cth1 y Cth2 en la regulación de la enzima ribonucleótido reductasa en condiciones de deficiencia de hierro.

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, en respuesta a daños en el DNA, la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 se produce como consecuencia de la falta de interacción entre dicha subunidad y Wtm1 (Yao et al., 2003; Lee et al., 2006). Dado que estudios previos a este trabajo muestran que los niveles de mensajero de *WTM1* aumentan en condiciones de deficiencia de hierro cuando la proteína Cth2 no se expresa (cepa *cth2Δ*) (Puig et al., 2005), decidimos estudiar si el cambio de localización del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en respuesta a la deficiencia de este metal está regulado por las proteínas Cth1 y Cth2 a través del mensajero *WTM1*.

3.1. Análisis de los niveles de Wtm1 en condiciones de deficiencia de hierro.

Estudios globales realizados en *S. cerevisiae* muestran que, en condiciones de deficiencia de hierro, los niveles de un gran número de mRNAs relacionados con procesos celulares dependientes de hierro, entre los que se encuentra *WTM1*, aumentan cuando las proteínas Cth1 y Cth2 no se expresan (mutante *cth1Δcth2Δ*) o lo hacen en una forma no funcional (*CTH1-C225R* y *CTH2-C190R*) (Puig et al., 2005; Puig et al., 2008). Para averiguar si las proteínas Cth1 y Cth2 regulan los niveles de Wtm1 en condiciones de escasez de hierro, se analizaron los niveles de mRNA *WTM1*. Para ello, células de la cepa mutante *cth1Δcth2Δ* se transformaron sólo con vector, con *CTH1* y *CTH2* o con los alelos no funcionales de Cth1 y Cth2 (*CTH1-C225R* y *CTH2-C190R*), los cuales presentan mutados los dominios

de dedos de zinc (TZFs) necesarios y esenciales para unirse a sus mRNAs diana y promover su desestabilización en respuesta a la deficiencia de hierro. Las células se incubaron en agitación durante 8 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC-leu-ura, Fe) o deficiencia de hierro (medio SC-leu-ura +100 μ M BPS, -Fe). Las células se procesaron y los niveles de mRNA *WTM1* se determinaron por *Northerh blot* (ver materiales y métodos apartado 5.7.). Tal y como muestra la Figura R.3.1., en una cepa silvestre para *Cth1* y *Cth2* (*cth1 Δ cth2 Δ +CTH1/CTH2*) los niveles del mensajero *WTM1* disminuyen en condiciones de deficiencia de hierro. Esta disminución es dependiente de *Cth1* y *Cth2* ya que no ocurre en los mutantes *cth1 Δ cth2 Δ* y *CTH1-C225R/CTH2-C190R* (Figura R.3.1.). Con estos resultados podemos concluir que en condiciones de deficiencia de hierro, los niveles del mensajero *WTM1* disminuyen de una forma dependiente de *Cth1* y *Cth2*.

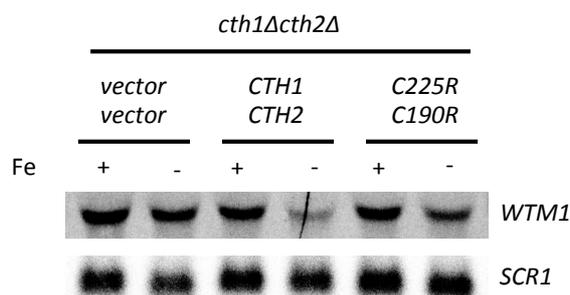


Figura R.3.1. Las proteínas *Cth1* y *Cth2* regulan los niveles de mRNA *WTM1* en respuesta a la deficiencia de hierro. Células de la cepa *cth1 Δ cth2 Δ* (SPY122) co-transformada con P40 y P39 (*vector/vector*), pSP476 y pSP419 (*CTH1/CTH2*), o pSP482 y pSP571 (*CTH1-C225R/CTH2-C190R*) se crecieron durante 8 horas en SC-leu-ura (+Fe) o SC-leu-ura con 100 μ M de BPS (-Fe). Los extractos totales de mRNA extraídos se analizaron por *Norther blot* con una sonda específica para *WTM1*. Los niveles de mRNA *SCR1* se utilizaron como control de carga.

Para estudiar la bajada en los niveles de mRNA *WTM1* se traduce en una disminución de los niveles de proteína *Wtm1*, se etiquetó la copia genómica de *WTM1* en su extremo amino-terminal con un epítipo 3MYC sin alterar su promotor endógeno ni su región 3'-UTR en células *cth1Δcth2Δ*. Estas células se transformaron con vector, *CTH1* y *CTH2*, o los alelos no funcionales de *Cth1* y *Cth2*, *CTH1-C225R* y *CTH2-C190R*. Las células se incubaron en agitación durante 8 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC-leu-ura, Fe) y condiciones de deficiencia de hierro (medio SC-leu-ura +100 μM BPS, -Fe). A continuación, se obtuvieron los extractos totales de proteínas a partir de 5 mL de estos cultivos. Cantidades equivalentes de proteínas y se analizaron por *Western Blot* (ver materiales y métodos apartado 5.8.). Como muestra la Figura R.3.2., células que expresan tanto *CTH1* como *CTH2* exhiben una disminución en los niveles de proteína 3MYC-*Wtm1* en respuesta a la deficiencia de hierro. Por el contrario, los niveles de proteína 3MYC-*Wtm1* no cambian significativamente bajo condiciones de limitación de hierro en células que carecen de *CTH1* y *CTH2*, o que expresan los alelos mutantes de éstas (Figura R.3.2.). En conjunto, estos resultados sugieren que las proteínas *Cth1* y *Cth2* promueven la disminución de los niveles de proteína *Wtm1* en respuesta a la deficiencia de hierro.

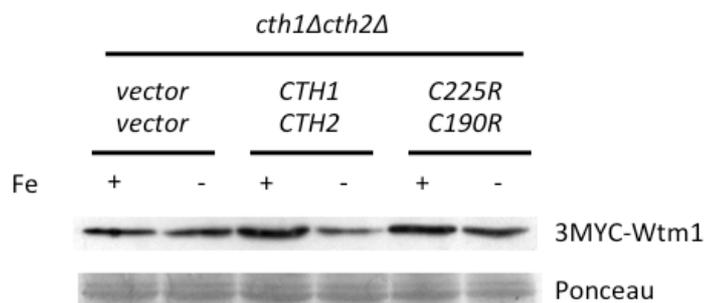


Figura R.3.2. Las proteínas Cth1 y Cth2 regulan los niveles de proteína Wtm1 en condiciones de deficiencia de hierro. Células de la cepa *cth1Δcth2Δ*-3MYC-Wtm1 (SPY374) co-transformada con P40 y P39 (*vector/vector*), pSP476 y pSP419 (*CTH1/CTH2*), o pSP482 y pSP571 (*CTH1-C225R/CTH2-C190R*) se crecieron durante 8 horas en SC-leu-ura (+Fe) o SC-leu-ura con 100 μ M de BPS (-Fe). Los extractos totales de proteínas obtenidos mediante extracción alcalina, se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-c-Myc. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga.

3.2. Estudio de la interacción de las proteínas Cth1 y Cth2 con el mRNA *WTM1*.

Aproximadamente el 80% de los mRNAs que se sobreexpresan en células *cth1Δcth2Δ* crecidas en condiciones deficiencia de hierro, contienen una o más posibles AREs situadas en sus 3'-UTR (Puig et al., 2005). En el caso de *WTM1*, su región 3'-UTR se caracteriza por la presencia de dos posibles AREs situadas 31 y 143 nucleótidos después del codón de parada (Figura R.3.3., panel B, *WTM1*, nucleótidos subrayados). Se ha descrito que Cth1 y Cth2 promueven la degradación de mRNAs a través de la unión de sus TZFs a AREs presentes en sus mensajeros diana (Puig et al., 2005). Para determinar si la disminución en los niveles del mRNA *WTM1* es consecuencia de la unión de las proteínas Cth1 y Cth2 sobre el mRNA

WTM1 o por el contrario un efecto indirecto de la remodelación de la expresión génica mediada por Cth1 y Cth2, se analizó si había interacción de las proteínas Cth1 y Cth2 con el mRNA *WTM1* utilizando el ensayo de triple híbrido en levadura (ver materiales y métodos apartado 5.10). Para ello, 141 pares de bases de la región 3'-UTR del mensajero de *WTM1* que contiene ambas AREs, se fusionaron al mRNA del bacteriófago MS2 (Figura R.3.3., panel A). Esta construcción se introdujo en células de levadura de la cepa L40-coat que contenían los plásmidos pACT2-*CTH1*, pACT2-*CTH2*, pACT2-*CTH1-C225R* o pACT2-*CTH2-C190R*, los cuales expresan proteínas Cth1 y Cth2 fusionadas al dominio de activación del factor transcripcional Gal4 (GAD, *Gal4 Activation Domain*). Para determinar la interacción de Cth1 y Cth2 con el mRNA *WTM1*, se utilizaron los genes reportero *HIS3* y *LacZ* presentes en la cepa L40-coat. La interacción se manifiesta mediante el crecimiento en un medio sin histidina (-His), o bien por la presencia de actividad β -galactosidasa del gen reportero *LacZ*. Con el fin de rebajar los niveles de crecimiento en medio sin histidina y poder observar diferentes grados de interacción, se emplearon varias concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT). Como control positivo del ensayo de triple híbrido se empleó la región 3'-UTR del mRNA *SDH4* de *S. cerevisiae*, del cual se sabe de antemano que interacciona con la proteína Cth2 a través de sus AREs (Pedro-Segura et al., 2008; Puig et al, 2005). Como control negativo del ensayo se emplearon los transformantes con vectores pACT2 y pIII-MS2-1. En medio con histidina, todas las células transformadas presentan crecimiento por igual. Las células que expresan la proteína GAD-Cth1 o GAD-Cth2 junto con la región 3'-UTR del mRNA *SDH4* o crecen en medio sin histidina, indicando la existencia de interacción de Cth1 y Cth2 con la región 3'-UTR de ambos mRNAs (Figura R.3.3., paneles C y D). La

interacción entre las proteínas Cth1 o Cth2 y la región 3'-UTR de *WTM1* se suprime en los mutantes Cth2-C190R y Cth1-C225R (Figura R.3.3., panel C y D, columnas Cth1-C225R y Cth2-C190R, fila *WTM1*, -His) sugiriendo que la integridad de los dominios de dedos de zinc tanto de Cth1 como de Cth2 es requerida para la interacción con la región 3'-UTR de *WTM1*.

A continuación, para evaluar la especificidad de la interacción de las proteínas Cth1 y Cth2 con el mRNA *WTM1*, se mutagenizó la primera ARE (*WTM1-mt1*), la segunda ARE (*WTM1-mt2*) o ambas (*WTM1-mt3*) mediante la sustitución de residuos por citosina (Figura R.3.3., panel B). Cuando se mutan las dos AREs de *WTM1* no se observa crecimiento en medio sin histidina. En cambio, cuando se muta una sola ARE los transformantes son capaces de crecer aunque con menor eficiencia que la cepa que expresa el alelo silvestre de *WTM1* (Figura R.3.3., panel C y D). Las proteínas Cth1 y Cth2 no muestran el mismo grado de interacción con las dos AREs de *WTM1*, ya que cuando mutagenizamos la primera de éstas no observamos crecimiento en medio sin histidina con adición del inhibidor 3-AT, mientras que las células aún son capaces de crecer en un medio sin histidina cuando la mutagénesis tiene lugar en la segunda ARE (Figura R.3.3., panel C y D).

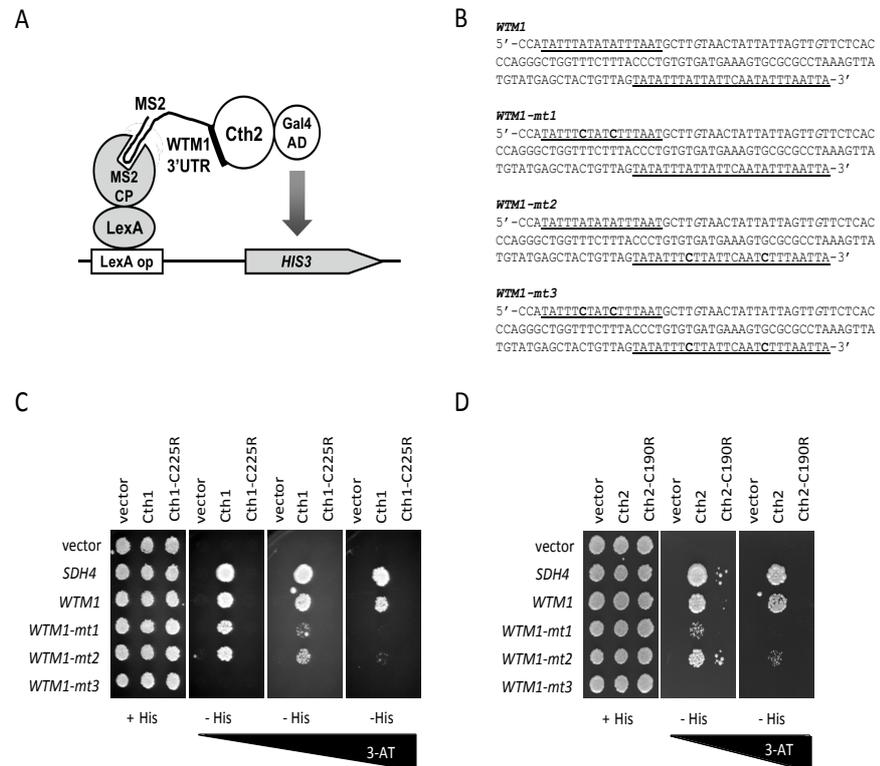


Figura R.3.3. Las proteínas Cth1 y Cth2 interactúan específicamente con el mRNA *WTM1*. (A) Representación esquemática del ensayo de triple híbrido (Y3H) utilizado para determinar la existencia de interacción *in vivo* entre las proteínas Cth1 (panel C) o Cth2 (panel D) y la región 3'-UTR del mRNA *WTM1*. (B) Secuencias de la región 3'-UTR de *WTM1* utilizadas en el ensayo Y3H. Las AREs putativas de *WTM1* se muestran subrayadas. Residuos de adenina de la región 3'-UTR de *WTM1* mutagenizados a citosina en la primera ARE (*WTM1-mt1*), en la segunda (*WTM1-mt2*), o en ambas (*WTM1-mt3*) se muestran en negrita. Las Gs en cursiva son sustituidas por Us para evitar la terminación prematura de la transcripción por la RNA polimerasa III. (C) Células de la cepa SPY120 (L40-coat) fueron co-transformadas con (1) pIII/MS2-1 que contiene la región 3'-UTR de *WTM1* (P600), *WTM1-mt1* (P623), *WTM1-mt2* (P624) *WTM1-mt3* (P625) *SDH4* (como control positivo), y solo vector (P162) (como control negativo), y (2) vector pACT2 solo (P79) o fusionado a *CTH1* (P542), *CTH1-C225R* (P543), *CTH2* (P539) O *CTH2-C190R* (P540). Las células se crecieron en placas SC-leu-ura (+His), y SC-leu-ura-his (-His) que contienen concentraciones entre 250 y 750 mM del inhibidor 3-AT durante 2-6 días a 30 °C.

Estos mismos resultados son corroborados mediante un ensayo β -galactosidasa obtenidos a partir de células de la cepa L40-coat co-transformadas con el vector pIII/MS2-1 que contiene la región 3'-UTR de *WTM1* y el vector pACT2 sólo o fusionado a *CTH2* o *CTH2-C190R*. Los resultados obtenidos indican que las células que expresan Cth2-C190R poseen una disminución del 94% en su actividad β -galactosidasa respecto de la cepa que expresa la forma silvestre de Cth2 (Figura R.3.4.). Además, la interacción entre Cth2 y *WTM1* se reduce casi en un 90% cuando se muta la primera ARE, en un 80% cuando se muta la segunda ARE, y en un 98% cuando se mutan ambas AREs (Figura R.3.4.). Con estos resultados podemos confirmar que la interacción *in vivo* de las proteínas Cth1 y Cth2 con el mRNA *WTM1* depende tanto de la integridad de los dedos de zinc las proteínas Cth1 y Cth2 como de las AREs presentes en el región 3'-UTR del mensajero *WTM1*.

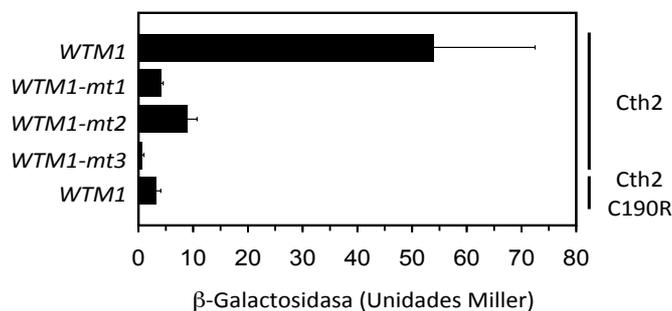


Figura R.3.4. Las proteínas Cth1 y Cth2 interactúan a través de sus dominios de dedos de zinc con las AREs del mRNA *WTM1*. Células de la cepa SPY120 (L40-coat) se co-transformaron con (1) pIII/MS2-1 que contiene la región 3'-UTR de *WTM1* (P600), *WTM1-mt1* (P623), *WTM1-mt2* (P624), *WTM1-mt3* (P625) y (2) vector pACT2 solo (P79) o fusionado a *CTH2* (P539) o *CTH2 C190R* (P540). Las células se crecieron en medio SC-leu-ura y se midió actividad β -galactosidasa. Los datos se representaron en unidades Miller y las barras de error representan la desviación estándar de al menos 3 ensayos realizados independientemente.

3.3. Papel de las proteínas Cth1 y Cth2 en la redistribución de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que defectos en la degradación de *WTM1* en condiciones de deficiencia de hierro podrían dar lugar a efectos en la relocalización de las subunidades Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma. Para testar esta hipótesis, se determinó la localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 en cultivos de células de la cepa *cth1 Δ acth2 Δ* crecidos en agitación durante 6 horas hasta fase exponencial de crecimiento en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe) y condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe). Se empleó una cepa silvestre BY4741 como control del experimento. Como muestran los datos la Figura R.3.5., en condiciones de suficiencia de hierro, Rnr2 y Rnr4 se localizan principalmente en el núcleo de la célula tanto en una cepa mutante *cth1 Δ acth2 Δ* como en una cepa silvestre. En cambio, en condiciones de deficiencia de hierro, mientras que en la cepa silvestre la subunidad pequeña R2 se localiza principalmente en el citoplasma, las células *cth1 Δ acth2 Δ* exhiben un defecto importante en la redistribución de las proteínas Rnr2 y Rnr4 al citoplasma (Figura R.3.5.). Además, se observa que bajo condiciones de deficiencia de hierro menos del 20% de las células de la cepa silvestre

retienen a la subunidad pequeña R2 en el núcleo, mientras que entre el 50-70% de células mutantes *cth1Δcth2Δ* siguen mostrando un patrón predominantemente nuclear para Rnr2 y Rnr4.

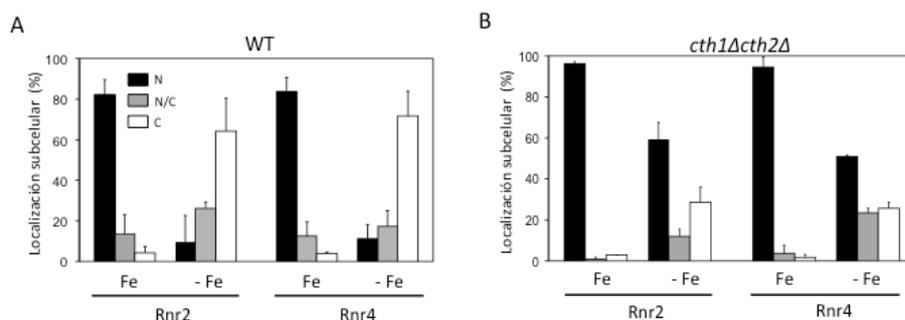


Figura R.3.5. La distribución del núcleo al citoplasma de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro depende parcialmente de Cth1 y Cth2. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa silvestre (SPY17, WT) y en la cepa mutante *cth1Δcth2Δ* (SPY122) crecidas durante 6 horas en medio SC (Fe) y SC con 100 μ M de BPS (-Fe). Las células son procesadas y los resultados representados tal y como se indica en la Figura R.1.4. Las células se clasificaron en función de la localización subcelular de señal de IMF para Rnr4 y Rnr2 en núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

A continuación se estudió si Cth1 y Cth2 regulan la redistribución de la subunidad R2 a través de su TZF, responsable de la unión a mRNAs. Para ello, la cepa *cth1Δcth2Δ* se transformó con plásmidos que expresan *CTH1* y *CTH2*, *CTH1-C225R* y *CTH2-190R*, o vectores vacíos, y se determinó la localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro. En condiciones de deficiencia de hierro las células *cth1Δcth2Δ* que expresan *CTH1* y *CTH2* en plásmidos exportan la subunidad

pequeña R2 al citoplasma al igual que la cepa silvestre (Figura R.3.5.). Sin embargo, células *cth1Δcth2Δ* que expresan los alelos mutantes *CTH1-C225R* y *CTH2-C190R* muestran un defecto considerable en la redistribución de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma (Figura R.3.6.). Estos resultados indican que las proteínas Cth1 y Cth2 promueven la redistribución de las proteínas de Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro a través de la acción de sus dedos de zinc.

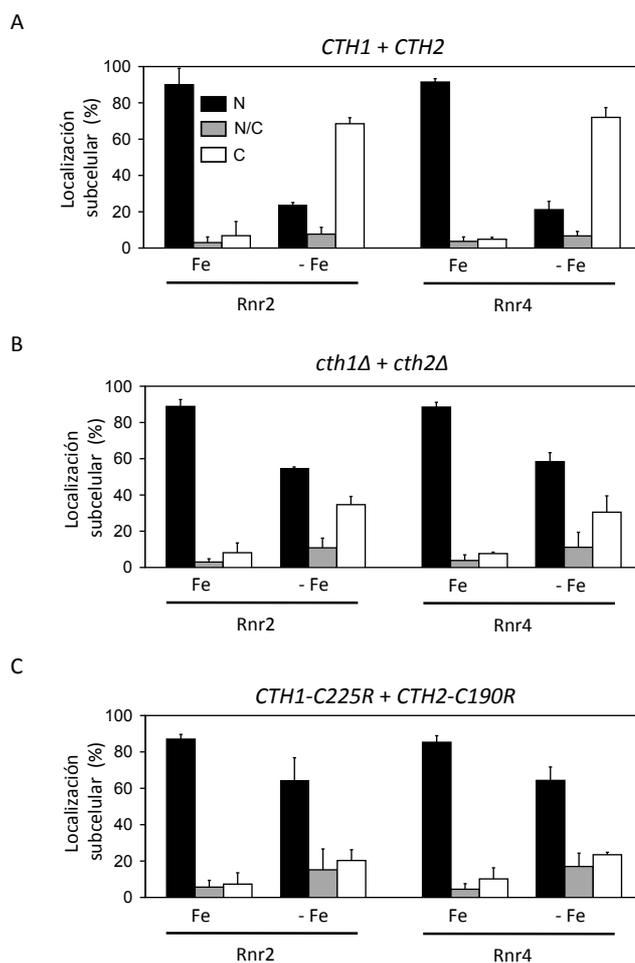


Figura R3.6. Las proteínas Cth1 y Cth2 promueven la salida del núcleo al citoplasma de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en respuesta a la escasez de hierro. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa mutante *cth1Δcth2Δ* (SPY122) co-transformada con pSP476 y pSP419 (panel A, *CTH1/CTH2*), con P40 y P39 (panel B, *vector/vector*) o pSP482 y pSP571 (panel C, *CTH1-C225R/CTH2-C190R*) y crecidas durante 6 horas en medio SC (Fe) y SC con 100 μ M de BPS (-Fe). Las células son procesadas y los resultados representados tal y como se indica en la Figura R.1.4. Las células se clasificaron y cuantificaron tal y como se detalla en la Figura R.3.5. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

3.4. Regulación de la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 a través de las AREs de *WTM1* en respuesta a la deficiencia de hierro.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que las proteínas Cth1 y Cth2 promueven tanto la disminución de los niveles de proteína Wtm1 y como la redistribución de Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro. Sin embargo, estos resultados no excluyen la posibilidad de que Cth1 y Cth2 regulen la localización de subunidad pequeña R2 través de mecanismos independientes a Wtm1. Para determinar si la disminución de los niveles de mensajero y proteína Wtm1 promovida por Cth1 y Cth2 es la razón por la cual Rnr2 y Rnr4 son liberados del núcleo al citoplasma bajo condiciones limitantes de hierro, se determinó el patrón de distribución de la subunidad pequeña R2 en células en las que las AREs del mensajero *WTM1* han sido mutadas (*WTM1-mt3*). Como se muestra la Figura R.3.7., células que expresan el alelo *WTM1-MT3* presentan un defecto importante en la redistribución de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma cuando crecen bajo condiciones de deficiencia de hierro. Este patrón de distribución predominantemente nuclear mostrado para Rnr2 y Rnr4 en respuesta a la deficiencia de hierro es similar al que muestran células de la cepa *cth1Δcth2Δ* y de la cepa que expresa los alelos mutantes *CTH1-C225R* y *CTH2-C190R* (Figura R.3.6.). Estos datos sugieren que la unión de las proteínas Cth1 y Cth2 a las AREs situadas dentro del mRNA *WTM1* promueven una disminución en los niveles de proteína Wtm1 que conduce a la redistribución de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro.

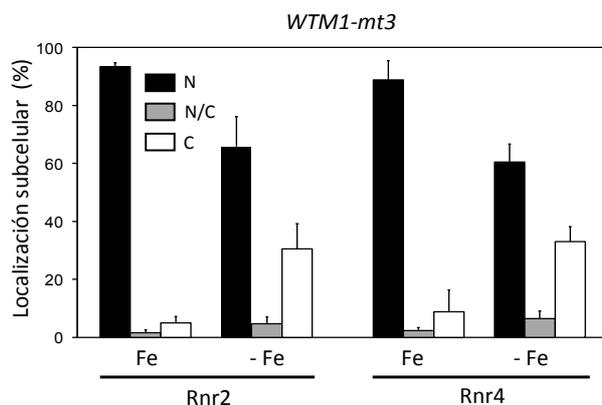


Figura R.3.7. Las proteínas Cth1 y Cth2 promueven la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 a través de la degradación del mensajero *WTM1*. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa mutante SPY385 (*WTM1-mt3*) crecidas durante 6 horas en medio SC (Fe) y SC con 100 μ M de BPS (-Fe). Las células son procesadas y los resultados representados tal y como se indica en la Figura R.1.4. Las células se clasificaron y cuantificaron tal y como se detalla en la Figura R.3.5. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

Tanto en los mutantes *cth1 Δ cth2 Δ* y como en la cepa *WTM1-mt3* existe una redistribución residual del núcleo al citoplasma de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en respuesta a la escasez de hierro (Figuras R.3.6., y R.3.7.). Con el objetivo de estudiar si que esta distribución residual es consecuencia de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA, se estudió el estado de fosforilación de la quinasa Rad53 en células *cth1 Δ cth2 Δ* y *WTM1-mt3*. Para ello, ambas cepas se incubaron junto con una cepa silvestre en condiciones de suficiencia de hierro, deficiencia de hierro y estrés genotóxico. Al igual que ocurre en la cepa silvestre, no se observa ningún retraso en la migración electroforética de la quinasa Rad53 bajo condiciones de deficiencia de hierro en las cepas mutantes *cth1 Δ cth2 Δ* y *WTM1-mt3*

(Figura R.3.8.), mientras que el tratamiento con MMS provoca un retraso en la migración, probablemente debido a la fosforilación de la quinasa Rad53.

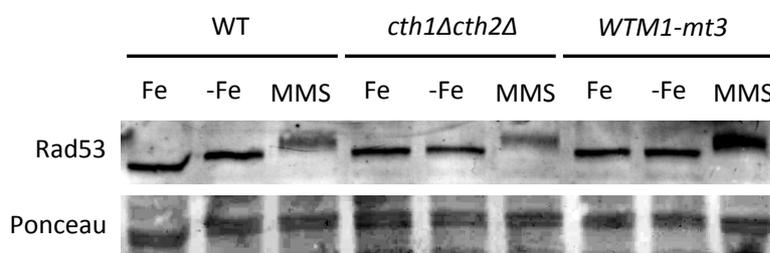


Figura R.3.8. La quinasa Rad53 no se fosforila en las cepas *cth1Δcth2Δ* y *WTM1-mt3* en respuesta al déficit de hierro. Determinación del estado de fosforilación de la quinasa Rad53. Células de la cepa silvestre (SPY17, WT) *cth1Δcth2Δ* (SPY122) y la cepa SPY385 (*WTM1-mt3*) se crecieron en medio SC (Fe), SC con 100 μ M de BPS (-Fe) durante 6 horas y medio SC con 0,04% de MMS (MMS) añadido al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. Los extractos totales de proteínas obtenidos mediante extracción alcalina se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Rad53. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga.

Además, la falta de activación transcripcional de los genes *RNR2* y *RNR4* que muestra el ensayo β -galactosidasa realizado en células de la cepa mutante *cth1Δcth2Δ* que expresan *RNR2-lacZ* y *RNR4-lacZ* (Figura R.3.9.) apoya que la redistribución residual de la subunidad pequeña R2 que presentan las cepas mutantes *cth1Δcth2Δ* y *WTM1-mt3* crecidas en condiciones de deficiencia de hierro no es consecuencia de la activación del *checkpoint* de respuesta a daños en el DNA en estas cepas.

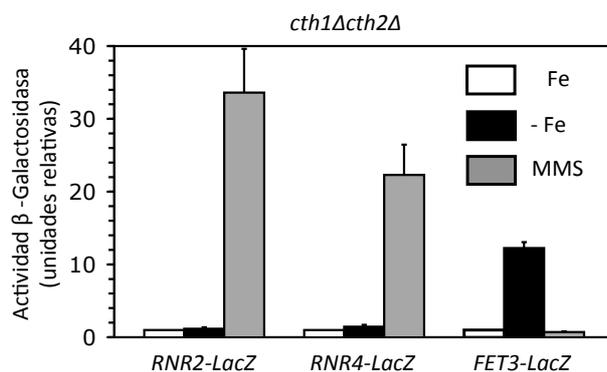


Figura R.3.9. La transcripción de los genes *RNR2* y *RNR4* en células mutantes de la cepa *cth1Δcth2Δ*. Cultivos de células de la cepa SPY122 (*cth1Δcth2Δ*) transformadas con los plásmidos pSP640 (*RNR2-LacZ*) pSP639 (*RNR4-LacZ*) y P174 (*FET3-LacZ*) se crecieron hasta fase exponencial durante 6 horas en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC+100 μ M de FAS, Fe, barras blancas), condiciones de deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe, barras negras); y condiciones de estrés genotóxico (medio SC+ 100 μ M de FAS+MMS al 0,04%, barras grises) donde el MMS se añade durante las dos últimas horas de crecimiento. El plásmido *FET3-LacZ* se utilizó como control positivo de inducción de deficiencia de hierro en el medio. La actividad β -galactosidasa se calculó para cada transformante en al menos tres experimentos realizados independientemente, y el resultado se expresó en actividades relativas a las condiciones de suficiencia de hierro (SC+100 μ M de FAS, Fe) dando a estas un valor de 1.

3.5. Regulación de los niveles de dNTPs en respuesta a la deficiencia de hierro a través de las proteínas Cth1 y Cth2.

Dado que en respuesta a la deficiencia de hierro las proteínas Cth1 y Cth2 regulan la redistribución de la subunidad pequeña R2 al citoplasma a través de la degradación del mRNA *WTM1*, se decidió estudiar si este mecanismo de regulación afecta a la función de la RNR. Para ello, se determinaron niveles de dATP y dCTP en células de la cepa silvestre BY4741 y de la cepa mutante *WTM1-mt3*. Células de ambas cepas se

crecieron durante 7 horas bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro y se determinaron las concentraciones intracelulares de dATP y dCTP (Mathews y Wheeler 2009). Tal y como muestra la Figura R.3.10., bajo condiciones de suficiencia de hierro, células mutantes de la cepa *WTM1-mt3* exhiben niveles de dATP y dCTP similares a los observados en células de la cepa silvestre. Sin embargo, mientras que células silvestres muestran un aumento de 2 veces en los niveles de dATP y de dCTP bajo estas condiciones de deficiencia hierro, en células de la cepa mutante *WTM1-mt3* las concentraciones de dATP y dCTP permanecen constantes (Figura R.3.10.). Estos resultados sugieren que la disminución de los niveles de mRNA *WTM1* contribuyen a la optimización de la función RNR bajo condiciones deficientes en hierro.

A continuación, se determinó la contribución de Cth1 y Cth2 a la función de RNR. Como muestra la Figura R.3.10., bajo condiciones de suficiencia de hierro, la cepa *cth1Δcth2Δ* presenta niveles de dCTP similares a la cepa silvestre, y una ligera disminución en los niveles de dATP. Destacar que los niveles de dATP y dCTP en la cepa *cth1Δcth2Δ* disminuyen 2,5 veces en respuesta a la deficiencia de hierro, mientras que aumentan 2 veces en células silvestres (Figura R.3.10.). Estos resultados indican que las proteínas Cth1 y Cth2 mantienen la actividad RNR cuando disminuyen los niveles de hierro.

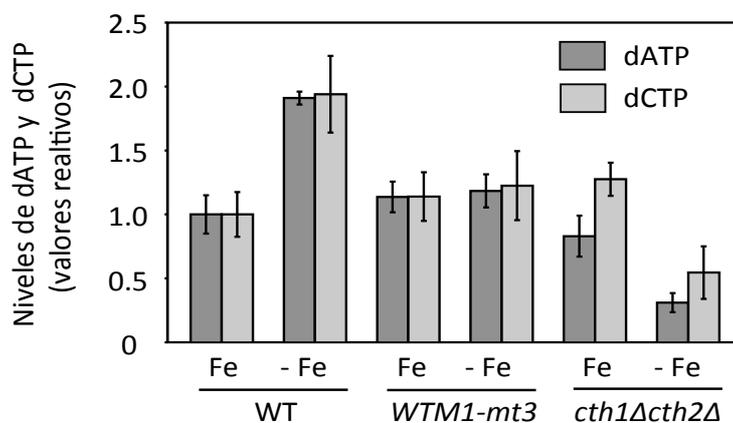


Figura R.3.10. Las proteínas Cth1 y Cth2 promueven la actividad RNR en respuesta a la deficiencia de hierro. Cultivos de células de la cepa silvestre BY4741 (SPY17) y de las cepas mutantes SPY385 (*WTM1-mt3*) y SPY122 (*cth1Δcth2Δ*) fueron crecidos durante 7 horas en medio SC (Fe) y SC con 100 μ M de BPS (-Fe). Los niveles de dATP (barras representadas en gris oscuro) y dCTP (barras representadas en gris claro) se determinaron mediante un ensayo enzimático (Mathews y Wheeler 2009). Los valores relativos de dATP y dCTP se representan respecto a los de la cepa silvestre crecida bajo condiciones de suficiencia de hierro. El promedio y la desviación estándar representan los valores obtenidos de al menos 3 experimentos realizados de forma independiente.

3.6. Estudio de los niveles de Rnr2 y Rnr4 durante la deficiencia de hierro.

Múltiples son los factores que podrían estar contribuyendo a la baja actividad RNR en condiciones de deficiencia de hierro, incluyendo los niveles de proteína Rnr2 y Rnr4. Estudios globales de expresión génica realizados en cepas *cth1Δcth2Δ* crecidas en condiciones limitantes de hierro, muestran un incremento de 1.4 y 1.8 veces en los niveles de mensajero de *RNR2* y *RNR4* respectivamente, en comparación con las células que expresan *CTH1* y *CTH2* (Puig et al, 2005; Puig et al, 2008). Estos datos

sugieren que las proteínas Cth1 y Cth2 podrían regular también los niveles de *RNR2* y *RNR4*. Con el objetivo de investigar esta hipótesis, determinamos los niveles de mRNA y de proteína Rnr2 y Rnr4. Para ello, se utilizó una cepa *cth1Δcth2Δ* transformada con plásmidos que expresan *CTH1* y *CTH2*, *CTH1-C225R* y *CTH2-C190R*, o bien sólo vector. Como muestra la Figura R.3.11., las células que expresan *CTH1* y *CTH2* promueven la disminución de los niveles de mRNA y proteína R2 alrededor de un 30% y 65%, respectivamente. En cambio, células que no expresan *CTH1* y *CTH2* o que expresan los alelos mutantes de los TZFs presentan un defecto importante en la disminución tanto en los niveles de mRNA como de proteína de Rnr2 y Rnr4 en estas mismas condiciones de crecimiento (Figura R.3.11.). Estos resultados indican de Cth1 y Cth2 regulan los niveles de expresión de Rnr2 y Rnr4 en respuesta a la falta de hierro.

Los mRNAs *RNR2* y *RNR4* presentan en su región 3'-UTR una y dos posibles AREs situadas 68 (en el caso de *RNR2*) o 39 y 125 (en el caso de *RNR4*) nucleótidos después del codón de parada (Figura R.3.11., panel C). Así pues, utilizamos el ensayo de triple híbrido para estudiar una posible interacción de las proteínas Cth1 y Cth2 con los mRNAs *RNR2* y *RNR4*. Parte de la región 3'-UTR de *RNR2* y *RNR4* que contiene dichas AREs se fusionó al RNA MS2. Estos RNAs se expresaron en una cepa L40-coat que contenía los plásmidos pACT2-*CTH1*, pACT2-*CTH1-C225R*, pACT2-*CTH2* o pACT2-*CTH2-C190R*, y se utilizó *HIS3* como gen reportero. La presencia de crecimiento en el medio sin histidina en células que expresan los alelos silvestres indica que ambas proteínas Cth1 y Cth2 interactúan *in vivo* con la región 3'-UTR de los mRNAs *RNR2* y *RNR4* (Figura R.3.11.). Por otro lado, la ausencia de crecimiento en el medio sin histidina en células con *CTH1-C225R* y *CTH2-C190R* indica que la integridad del TZF de Cth1 y Cth2 es

esencial para la interacción con la región 3'-UTR de *RNR2* y *RNR4* (Figura R.3.11.). De acuerdo con estos resultados podemos concluir que, en respuesta a la deficiencia de hierro, las proteínas Cth1 y Cth2 se unen y promueven la degradación de los mRNAs *RNR2* y *RNR4*, dando lugar a una disminución en los niveles de ambas proteínas.

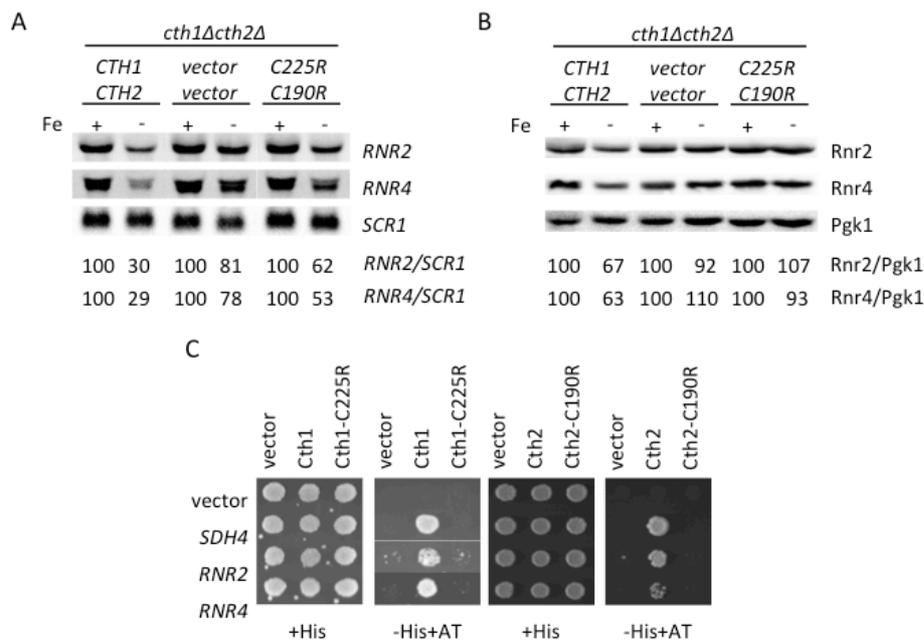


Figura R.3.11. Las proteínas Cth1 y Cth2 controlan de los niveles de Rnr2 y Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro. Los niveles de mRNA (panel A) y de proteínas (panel B) de Rnr2 y Rnr4 fueron determinados en células de la cepa SPY122 (*cth1Δcth2Δ*) co-transformadas, crecidas y procesadas tal y como se detalla en la Figura R.3.1. Los niveles de RNA y proteína se cuantificaron y se normalizaron con *SCR1* (utilizado como control de la carga de RNA) y Pgk1 (utilizado como control de carga de proteína), respectivamente. (C) Secuencias de la región 3'-UTR de *RNR2* y *RNR4* utilizadas en el ensayo Y3H. Las AREs putativas de *RNR2/4* se muestran subrayadas. (D) El ensayo de triple híbrido se utilizó para testar interacciones in vivo entre Cth1 y Cth2 y el fragmento que contiene la región 3'UTR del mRNA *RNR2* y *RNR4*. Células de la cepa SPY120 (L40-coat) de células se co-transformaron con (1) pIII/MS2-1 que contiene la región 3'-UTR del mRNA *RNR2* (P602) *RNR4* (P603) *SDH4* (P545) y el vector solo (P162), y (2) pACT2 vector solo (P79) o fusionado a *CTH1* (P542), *CTH1-C225R* (P543), *CTH2* (P539), o *CTH2 C190R* (P540). Las células se crecieron tal y como se describe en la Figura R.3.3.

Función de la quinasa Dun1 en el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 de la RNR en condiciones de deficiencia de hierro.

En respuesta a daños en el DNA la quinasa Dun1 activa la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 (Zhou y Elledge, 1993; Chen et al., 2007; Yao et al., 2003). Dada la función que la quinasa Dun1 desempeña en la regulación de la enzima RNR en presencia de daños en el DNA, decidimos estudiar si también participa en la relocalización al citosol de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en respuesta a baja biodisponibilidad de hierro.

4.1. Localización subcelular en deficiencia de hierro de la subunidad pequeña R2 en mutantes *dun1Δ*.

Así pues, decidimos determinar por IMF indirecta la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 bajo condiciones de deficiencia de hierro en la cepa mutante *dun1Δ*. Para ello, la cepa silvestre BY4741 y *dun1Δ* se incubaron en condiciones de suficiencia y deficiencia de hierro (medio SC+100 μM BPS, -Fe). Como se observa en la Figura R.4.1., un 60% de las células *dun1Δ* retienen a Rnr2 y Rnr4 en el núcleo en respuesta a deficiencia de hierro frente al aproximadamente un 10% en la cepa silvestre. Estos resultados indican que la quinasa Dun1 regula la salida al citoplasma de Rnr2 y Rnr4 en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro.

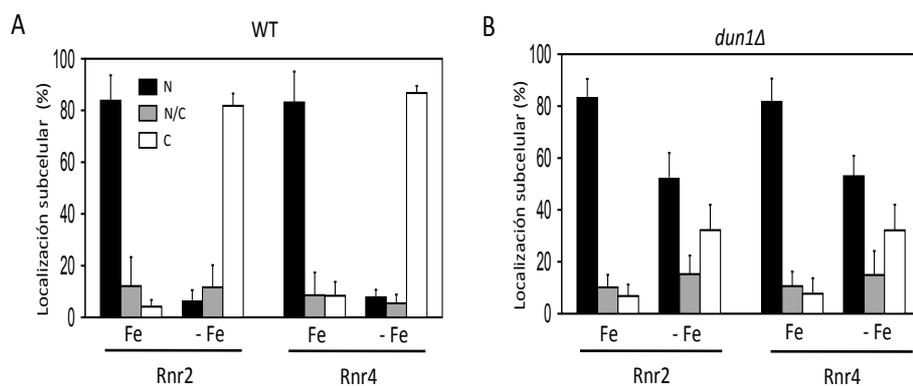


Figura R.4.1. La quinasa Dun1 participa en el cambio de localización subcelular de la subunidad R2 en respuesta a la deficiencia de hierro. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en la cepa silvestre BY4741 (panel A, WT, SPY17) y en la cepa mutante *dun1Δ* (panel B, *dun1Δ*, SPY350) crecidas durante 6 horas en medio SC (Fe) y SC con 100 μ M de BPS (-Fe). La localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 se determinó por IMF usando anticuerpos anti-Rnr2 y anti-Rnr4. Las células se clasificaron en función de la localización subcelular de señal de IMF para Rnr4 y Rnr2 en núcleo (N, barras negras), núcleo-citoplasma (N/C, barras grises) y citoplasma (C, barras blancas). En todos los casos se contaron entre 200 y 500 células en cada uno de los tres experimentos independientes realizados. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

4.2. Importancia del dominio quinasa de Dun1 en la relocalización al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro.

El dominio quinasa de Dun1 se sitúa entre los residuos 200 y 480 (Figura R.4.2). La mutación D328A suprime completamente la actividad quinasa de Dun1 y con ello todos sus mecanismos de regulación en respuesta a daños en el DNA (Zhou et al., 1993; Zhao et al., 2002).

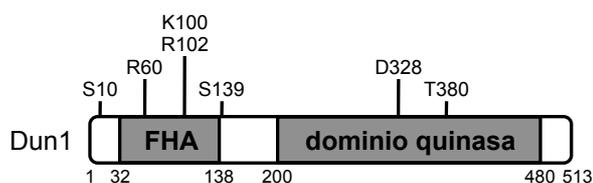


Figura R.4.2. Esquema representativo de los dominios y residuos de aminoácidos más relevantes de la quinasa Dun1. Los números indican la posición del aminoácido.

Con el objetivo de estudiar si el dominio quinasa de Dun1 juega un papel en el cambio de localización de Rnr2 y Rnr4 en respuesta a la deficiencia de hierro, la cepa *dun1Δ* se transformó con vector vacío, el mismo plásmido que expresa la copia silvestre de *DUNI* bajo el control de su propio promotor y con el vector que expresa el alelo mutante sin actividad quinasa de Dun1 (*DUNI-D328A*). Al igual que ocurre en la cepa silvestre, el 80% de las células *dun1Δ* que expresan el alelo silvestre *DUNI* presentan la subunidad pequeña R2 localizada en el citoplasma de la célula tanto en condiciones de deficiencia de hierro como bajo condiciones de estrés genotóxico (Figura R.4.3.). En cambio, células *dun1Δ* con vector o el alelo *DUNI-D328A* presentan un defecto en la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad R2 tanto en condiciones de deficiencia de hierro como en respuesta a daños en el DNA inducido por MMS (Figura R.4.3.). El defecto en el cambio de localización que presenta el mutante *DUNI-D328A* crecido bajo condiciones de deficiencia de hierro no se debe a un cambio en los niveles de proteína Dun1-D328A ya que estos no varían respecto de los niveles de proteína silvestre (Figura R.4.4.). Todos estos resultados sugieren que la integridad del dominio quinasa de Dun1 es necesaria para promover el cambio de localización de las proteínas Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma en condiciones de escasez de hierro.

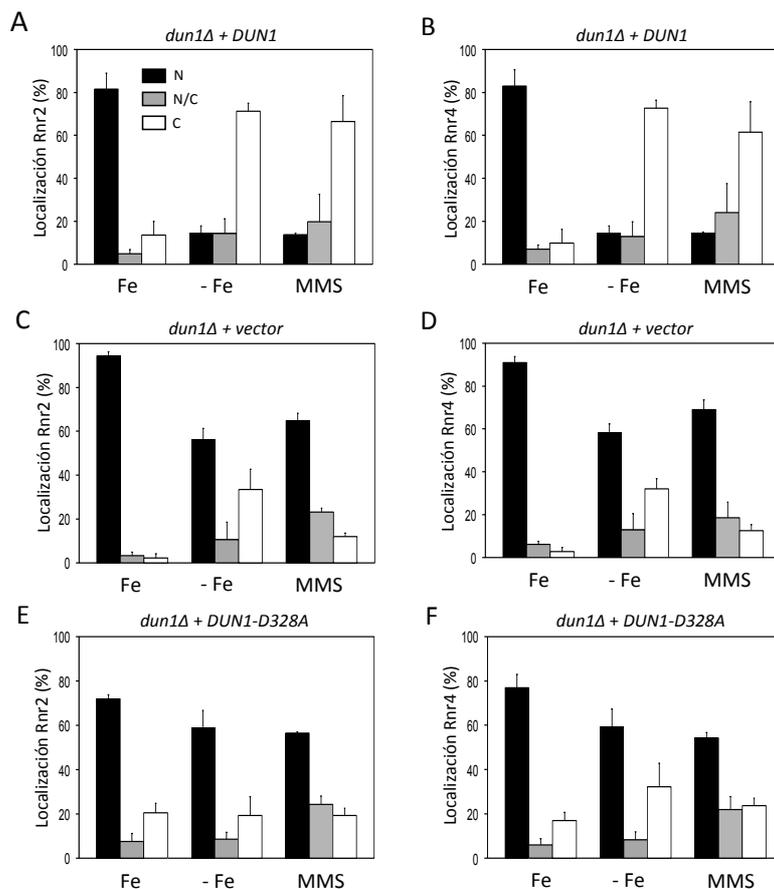


Figura R.4.3. El dominio quinasa de Dun1 es necesario para la salida al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 (panel A, C, E) y Rnr4 (panel B, D, F) de la cepa *dun1Δ* transformada con pSP670 (*DUN1*, panel A y B), p40 (vector, panel C y D) o pSP671(*DUN1-D328A*, panel E y F) y crecidas en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (SC con 100 μ M de BPS, -Fe) durante 6 horas y condiciones de suficiencia de hierro con 0,04% de MMS (MMS) añadido al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. La localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 se determinó por IMF usando anticuerpos anti-Rnr2 y anti-Rnr4. Las células se clasificaron y cuantificaron tal y como se ha descrito en la Figura R.4.1. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

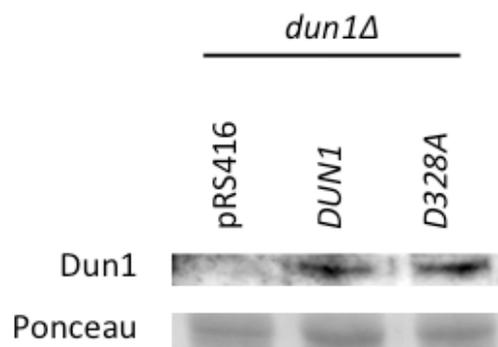


Figura R.4.4. Los niveles de la quinasa Dun1 no cambian en condiciones de deficiencia de hierro en mutantes *DUN1-D328A*. Células de *dun1Δ* (SPY350) transformadas el vector p40 (pRS416), con pSP670 (*DUN1*), o pSP671 (*DUN1-D328A*) se crecieron en condiciones de deficiencia de hierro (SC con 100 μ M de BPS, -Fe) durante 6 horas. Los extractos totales de proteínas obtenidos mediante extracción alcalina se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Dun1. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes.

4.3. Análisis del dominio FHA de la quinasa Dun1 en el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 durante la escasez de hierro.

La activación de la quinasa Dun1 en respuesta a daños en el DNA depende de la interacción específica de su dominio FHA (*Forkhead-Associated*) situado entre los residuos 32 y 138 (Figura R.4.2.) y un motivo di-fosfotreonina presente en la quinasa transductora de la señal Rad53 (Lee et al., 2008; Bashkirov et al., 2003). Residuos del dominio FHA de la quinasa Dun1, como la arginina situada en la posición 60 (R60) y la lisina y arginina de las posiciones 100 y 102 respectivamente (K100/R102) (Figura R.4.2.), son necesarios para la interacción proteína-proteína entre el dominio FHA de Dun1 y dos residuos fosfotreonina situados en el primer cluster SQ/TQ de la quinasa Rad53. De esta forma, mutaciones a alanina de los residuos R60 y K100/R102 suprimen

completamente la activación de Dun1 y las respuestas dependientes de esta en presencia de daños en el DNA (Lee et al., 2008; Bashkirov et al., 2003). Con el objetivo de determinar si la integridad del dominio FHA de Dun1 es necesario para la salida al citoplasma de la subunidad R2 en respuesta a la deficiencia de hierro, células *dun1Δ* se transformaron con vectores que expresan los alelos mutantes del FHA (R60, K100A/R102A) de Dun1. Como muestran los datos de IMF de la Figura R.4.5., células *dun1Δ* que expresan los alelos *DUNI-R60A* o *DUNI-K100A/R102A* presentan un defecto importante en el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 en presencia de MMS al igual que células de la cepa mutante *dun1Δ* con vector. En cambio, células que expresan tanto *DUNI-R60A* como *DUNI-K100A/R102A* crecidas en condiciones de deficiencia de hierro no muestran defectos en el cambio de localización de las proteínas Rnr2 y Rnr4 (Figura R.4.5.). El cambio de localización en los mutantes *DUNI-R60A* y *DUNI-K100/R102* crecidos bajo condiciones de deficiencia de hierro no se debe a alteraciones en los niveles de proteína *DUNI-R60A* y *DUNI-K100/R102* (Figura R.4.6.). Estos resultados indican que la integridad del dominio FHA de Dun1 no se requiere para el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en respuesta a la falta de hierro.

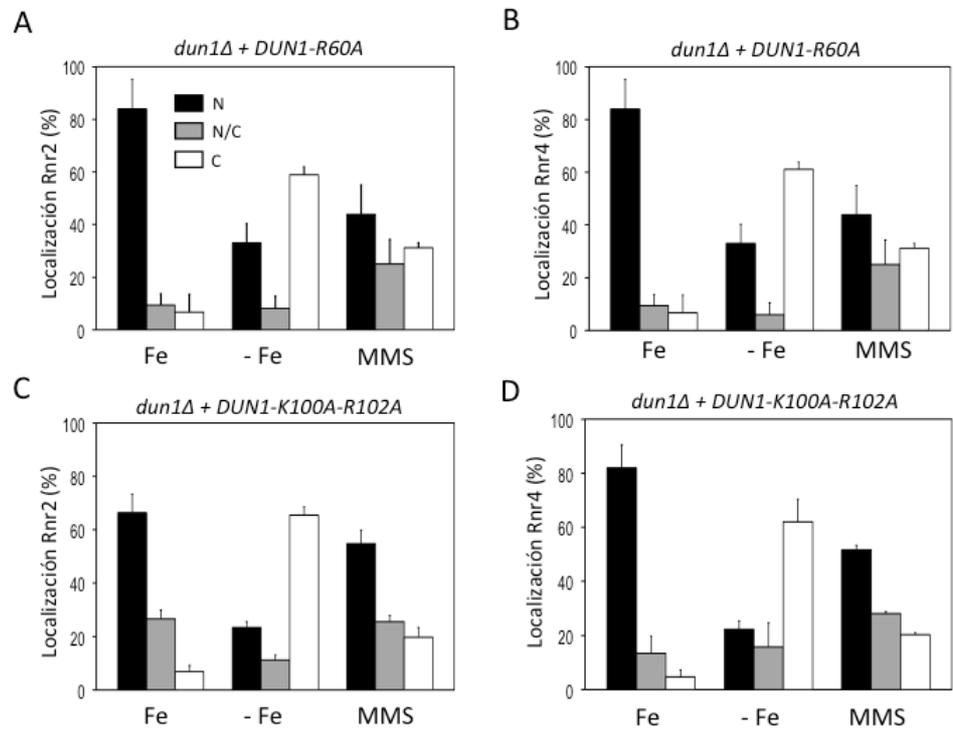


Figura R.4.5. El dominio FHA de la quinasa Dun1 no es necesario para la salida al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 (panel A y C) y Rnr4 (panel B y D) en células de la cepa *dun1Δ* (SPY350) transformada con los plásmidos pSP685 (*DUN1-R60A*, panel A y B), o pSP686 (*DUN1-K100A-R102A*, panel C y D) y crecidas tal y como se describe en la Figura R.4.3. La localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 se determinó por IMF usando anticuerpos anti-Rnr2 y anti-Rnr4. Las células se clasificaron y cuantificaron tal y como se ha descrito en la Figura R.4.1. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

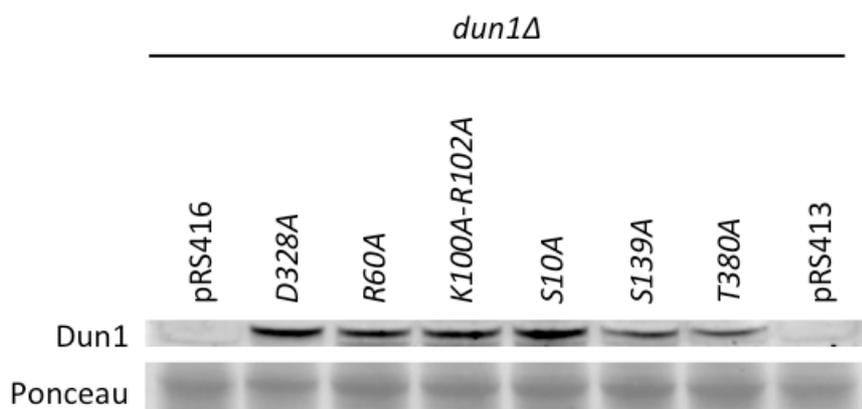


Figura R.4.6. Niveles de quinasa Dun1 en respuesta a la deficiencia de hierro en mutantes *DUN1-R60A*, *DUN1-K100A-R102A*, *DUN1-S10A*, *DUN1-S139A* y *DUN1-T380A*. Células de la cepa *dun1Δ* (SPY350) transformadas con los plásmidos P40 (pRS416), pSP671 (*DUN1-D328A*), pSP685 (*DUN1-R60A*), pSP686 (*DUN1-K100A-R102A*), P37 (pRS413), pSP693 (*DUN1-S10A*), pSP694 (*DUN1-S139A*) o pSP695 (*DUN1-T380A*) se crecieron tal y como se describe en la Figura R.4.4. Los extractos totales de proteínas obtenidos se analizaron tal y como se describe en la Figura R.4.4. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes.

4.4. Importancia del residuo T380 de la quinasa Dun1 en la salida de las proteínas Rnr2 y Rnr4 al citoplasma en condiciones de escasez de hierro.

Para activar la función catalítica de la quinasa Dun1 en respuesta a daños en el DNA es necesario que el residuo treonina situado en la posición 380 (T380) dentro del dominio catalítico de Dun1 (Figura R.4.2.) sea fosforilado por la quinasa Rad53 (Chen et al., 2007). De esta forma, células que presentan mutada la treonina 380 de Dun1 a alanina (*DUN1-T380A*) muestran defectos de crecimiento en placa en presencia de agentes genotóxicos como la HU y la radiación UV (Chen et al., 2007). Aunque resultados previos mostrados en este trabajo (capítulo 2) muestran que la quinasa Rad53 no participa en la regulación

del cambio de localización de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro, decidimos analizar si la treonina 380 de Dun1 es necesaria para promover el cambio de localización de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en condiciones limitantes de hierro. Con este propósito, células de *dun1Δ* transformadas con el alelo *DUN1-T380A* se crecieron bajo las mismas condiciones que se detallan en la Figura R.4.3., y se determinó mediante IMF el patrón de localización subcelular de Rnr2 y Rnr4. Aunque hasta ahora defectos sobre la relocalización de la subunidad R2 no han sido caracterizados bajo condiciones de estrés genotóxico en células que expresan el alelo mutante *DUN1-T380A*, nuestros resultados muestran que mutaciones en la treonina 380 inhiben la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad R2 en presencia de MMS (Figura R.4.7). Células que expresan el alelo *DUN1-T380A* presentan un ligero defecto en la salida al citoplasma de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en respuesta a la escasez de hierro. La ligera disminución en los niveles de proteína Dun1-T380A en condiciones de deficiencia de hierro podría contribuir al defecto en la salida de la subunidad pequeña R2 (Figura R.4.6). Estos resultados sugieren la proteína Dun1-T380A presenta defectos en la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 de la RNR en condiciones de escasez de hierro.

Análisis mediante espectrometría de masas han permitido la identificación de otros residuos de Dun1 que se fosforilan en la respuesta a daños en el DNA (Chen et al., 2007). Las serinas situadas en posición 10 y 139 de Dun1 han sido caracterizadas como residuos de autofosforilación. Células que presentan mutadas la serina 10 o 139 a alanina presentan defectos de crecimiento en presencia de HU o radiación UV (Chen et al., 2007). Con el objetivo de estudiar si dichos residuos participan en el cambio de localización de la subunidad pequeña R2 bajo condiciones de deficiencia de hierro, células de la

cepa mutante *dun1Δ* transformadas con los vectores que expresan el alelo mutante *DUNI-S10A* y *DUNI-S139A* se crecieron bajo las mismas condiciones que se detallan en la Figura R4.3., y se determinó el patrón de localización subcelular para las proteínas Rnr2 y Rnr4. A pesar de los defectos de crecimiento que ambos mutantes (*DUNI-S10A* y *DUNI-S139A*) presentan bajo condiciones de estrés genotóxico inducidas por HU o UV (Chen et al., 2007), los resultados de la Figura R.4.7., muestran que en condiciones de estrés genotóxico inducido por MMS la subunidad pequeña R2 relocaliza al citoplasma en aproximadamente el 60% de células que expresan el alelo mutante *DUNI-S10A* y el 40% que en mutantes *DUNI-S139A*. Por el contrario, no se observan defectos en la relocalización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 en células que expresan los alelos mutantes *S10A* y *S139A* crecidas bajo condiciones de deficiencia de hierro (Figura R.4.7.). Con estos resultados podemos concluir que ni el residuo S10 y ni el residuo S139 son importantes para la activación del cambio de localización de la subunidad pequeña R2 en condiciones de escasez de hierro.

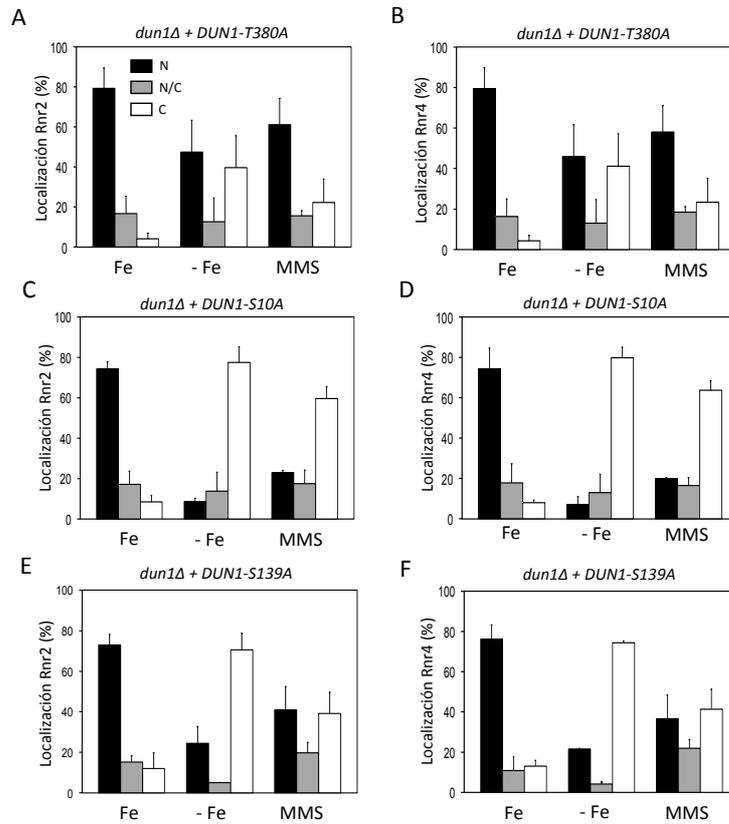


Figura R.4.7. El cambio de localización de la subunidad R2 en condiciones de deficiencia de hierro depende de la integridad del residuo T380 pero no de los residuos S10 y S139 de la quinasa Dun1. Cuantificación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 (panel A, C y D) y Rnr4 (panel B, D y E) en células de la cepa *dun1Δ* transformada con los plásmidos pSP695 (*DUN1-T380A*, panel A y B), pSP693 (*DUN1-S10A*, panel C y D) o pSP694 (*DUN1-S139A*, panel E y F) y crecidas tal y como se describe en la Figura R.4.3. La localización subcelular de Rnr2 y Rnr4 se determinó por IMF usando anticuerpos anti-Rnr2 y anti-Rnr4. Las células se clasificaron y cuantificaron tal y como se ha descrito en la Figura R.4.1. Se representó el % de células totales y la desviación estándar.

Regulación del inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro.

Para restringir la síntesis de dNTPs sólo a aquellos momentos donde son necesarios, la levadura *S. cerevisiae* regula la actividad RNR mediante diversos mecanismos. Uno de ellos consiste en la inhibición de la función de la subunidad grande R1 a través de la proteína Sml1 (Zhao et al., 1998). Dado que en respuesta al estrés genotóxico o durante la fase S del ciclo celular los niveles de proteína Sml1 disminuyen dejando libre a la subunidad grande R1 (Zhao et al., 1998; Chabes et al., 1999; Zhao et al., 2000; Zhao et al., 2001), decidimos estudiar si los niveles de Sml1 estaban regulados en respuesta a la deficiencia de hierro.

5.1. Determinación de los niveles de la proteína Sml1 bajo condiciones limitantes de hierro.

Para determinar los niveles de proteína Sml1 en condiciones de escasez de hierro, se creció la cepa silvestre BY4741 durante 6 horas hasta fase exponencial bajo condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe), deficiencia de hierro (medio SC+100 μ M BPS, -Fe) y condiciones de estrés genotóxico inducido por MMS añadido durante las dos últimas horas (medio SC+0,04% de MMS). A continuación, se obtuvieron extractos totales de proteínas y se determinaron los niveles de proteína Sml1 por *Western blot* (ver materiales y métodos apartado 5.8.). En respuesta a daños en el DNA inducidos por MMS, los niveles de proteína Sml1 disminuyen de forma importante (Figura R.5.1.). Destacar que en condiciones de deficiencia de hierro también se produce una disminución significativa en los niveles de proteína Sml1 (Figura R.5.1.). Con el fin de asegurarnos que la disminución

observada en los niveles de proteína Sml1 es debida a la deficiencia de hierro en el medio y no a un efecto secundario del quelante BPS, se utilizó la cepa mutante *fet3Δfet4* que presenta reducida su capacidad de adquisición de hierro desde el medio extracelular. En células *fet3Δfet4* crecidas en en suficiencia de hierro (medio SC, Fe) los niveles de Sml1 disminuyen de forma similar a los de la cepa silvestre bajo condiciones de deficiencia de hierro (Figura R.5.1.). Sin embargo, los niveles de Sml1 no disminuyen cuando al cepa *fet3Δfet4* se crece con un exceso de hierro en el medio (Figura R.5.1.). Con estos resultados podemos concluir que los niveles de proteína Sml1 disminuyen en respuesta a condiciones de deficiencia de hierro tanto nutricional como genética.

Para determinar si Cth1 y Cth2 contribuyen a la disminución de los niveles de proteína Sml1 en respuesta a la escasez de hierro, se determinaron los niveles de Sml1 en células *cth1Δcth2Δ*. Como muestra la Figura R.5.1., la escasez de hierro promueve la disminución en los niveles de proteína Sml1 en células *cth1Δcth2Δ* tal y como ocurre en células de la cepa silvestre. Este resultado sugiere que la disminución en los niveles de Sml1 bajo condiciones limitantes de hierro no depende de las proteínas Cth1 y Cth2.

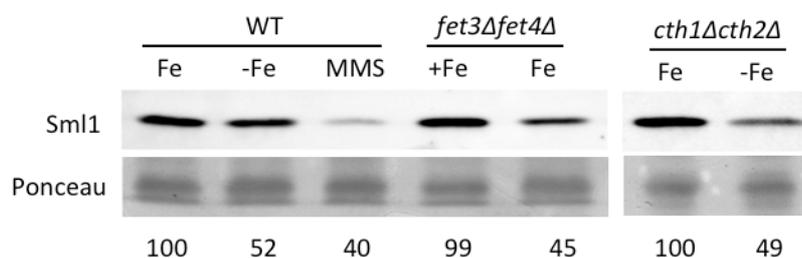


Figura R5.1. Los niveles de proteína Sml1 disminuyen en respuesta a la deficiencia de hierro independientemente de las proteínas Cth1 y Cth2. Células de la cepa silvestre (WT, SPY17), de la cepa *fet3Δfet4Δ* (SPY386) y de la cepa *cth1Δcth2Δ* (SPY122) se crecieron en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (SC con 100 μ M de BPS, -Fe), condiciones de exceso de hierro (medio SC+100 μ M de FAS, +Fe) durante 6 horas y condiciones de suficiencia de hierro con 0,04% de MMS (MMS) añadido al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. Los extractos totales de proteínas obtenidos mediante extracción alcalina se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-Sml1. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes. Los niveles de proteína Sml1 se cuantificaron y la cuantificación se indica (en porcentaje) respecto de la cepa silvestre (WT y cepa *fet3Δfet4Δ*) o respecto de la cepa *cth1Δcth2Δ* (cepa *cth1Δcth2Δ*).

5.2. Función de la quinasa Dun1 en la regulación de los niveles de la proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro.

En respuesta al estrés genotóxico la quinasa Dun1 fosforila a Sml1 y promueve su degradación (Zhao et al., 2002; Uchiki 2004). Para estudiar si Dun1 participa en la regulación de los transformada con vector vacío o con la copia silvestre de *DUNI* bajo el control de su propio promotor. Como muestra la Figura R.5.2., células que expresan *DUNI* presentan una reducción en los niveles de proteína Sml1 tanto en respuesta a MMS como a la deficiencia de hierro de la misma forma que lo hacen células de la cepa

silvestre. En cambio, no se observa ningún descenso en los niveles de Sml1 en células *dun1Δ* crecidas en condiciones de estrés genotóxico o deficiencia de hierro. Estos resultados indican que la quinasa Dun1 regula los niveles de la proteína Sml1 en respuesta a deficiencia de hierro.

A continuación decidimos estudiar si la actividad quinasa de Dun1 es importante en la regulación de los niveles de proteína Sml1 durante la escasez de hierro. Para ello, se utilizó la cepa *dun1Δ* transformada con el alelo *DUNI-D328A*. Como muestra la Figura R.5.2., células que expresan el alelo *DUNI-D328A* no presentan una reducción en los niveles de proteína Sml1 en respuesta a condiciones de deficiencia de hierro o MMS. Este defecto no se debe a alteraciones en los niveles de expresión del alelo *DUNI-D328A* bajo condiciones de deficiencia de hierro (Figura R.4.4.). En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad quinasa de Dun1 es necesaria para la disminución de los niveles de proteína Sml1 en respuesta a la escasez de hierro.

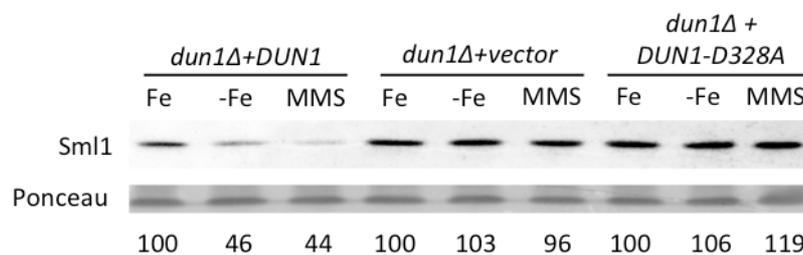


Figura R.5.2. La quinasa Dun1 promueve la disminución de los niveles de proteína Sml1 en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro. Células de la cepa *dun1Δ* (SPY350) se transformaron con pSP670 (*DUN1*), P40 (vector) o pSP671 (*DUN1-D328A*) y se crecieron en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (SC con 100 μ M de BPS, -Fe) durante 6 horas y condiciones de suficiencia de hierro con 0,04% de MMS (MMS) añadido al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. Los extractos totales de proteínas obtenidos se analizaron tal y como se describe en la Figura R.5.1. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes. La cuantificación de los niveles de proteína de Sml1 en condiciones de deficiencia de hierro (-Fe) y MMS se hace en referencia a los niveles obtenidos en condiciones de suficiencia de hierro (Fe).

5.3. Función del dominio FHA de la quinasa Dun1 en la regulación de los niveles de proteína Sml1.

Con el objetivo de determinar si el dominio FHA de Dun1 está implicado en la regulación de los niveles de proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro, se utilizó una cepa *dun1Δ* transformada con vectores que expresan los alelos mutantes del FHA *R60A* y *K100A/R102A* de *DUN1*. Como se observa en la Figura R.5.3., la disminución de los niveles de la proteína Sml1 no se produce en los mutantes *DUN1-R60A* y *DUN1-K100A/R102A* en condiciones de estrés genotóxico o deficiencia de hierro. Como muestra la Figura R.4.6., este defecto no se debe a cambios en los niveles de proteína Dun1-R60A o Dun1-K100A/R102A en condiciones de deficiencia de hierro. Estos resultados indican que la integridad del dominio

FHA de Dun1 es absolutamente indispensable en la regulación de los niveles de proteína Sml1 bajo condiciones de escasez de hierro.

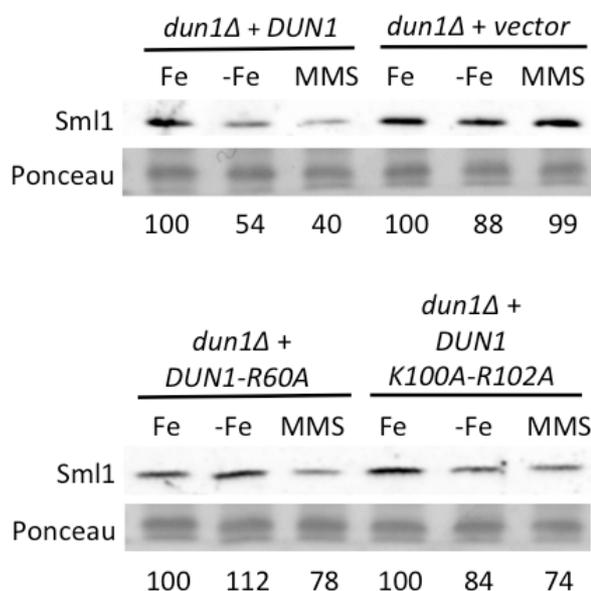


Figura R.5.3. La integridad del dominio FHA de la quinasa Dun1 es necesaria para la regulación de los niveles de proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro. Células de la cepa *dun1Δ* (SPY350) transformadas con los plásmidos pSP684 (*DUN1*), P37 (vector), pSP685 (*DUN1-R60A*), o pSP686 (*DUN1-K100A-R102A*) y se crecieron tal y como se describe en la Figura R.5.2. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes.

5.4. Papel del residuo T380 de Dun1 en la regulación de los niveles de Sml1.

Trabajos previos han descrito que células que presentan mutada la treonina 380 de Dun1 a alanina (*DUN1-T380A*) son incapaces de inducir la degradación del inhibidor de la subunidad grande R1 Sml1 en respuesta a

estrés genotóxico debido a que no puede ser fosforilado por la quinasa Rad53 (Chen et al., 2007). Decidimos estudiar si, en condiciones de escasez de hierro, la regulación en los niveles de Sml1 depende del residuo T380 de Dun1. Para ello, la cepa *dun1Δ* se transformó con un plásmido que expresa el alelo *DUNI-T380A* bajo el control del promotor endógeno. Las células que expresan el alelo *DUNI-T380A* fueron incapaces de promover la degradación de la proteína Sml1 en presencia de MMS (Figura R.5.4.). En cambio, se observa una disminución significativa en los niveles de proteína Sml1 en células que expresan el alelo mutante *DUNI-T380A* en respuesta a la escasez de hierro al igual que ocurre en células que expresan el alelo silvestre *DUNI* (Figura R.5.4.) Este resultado indica que bajo condiciones de deficiencia de hierro, la disminución en los niveles de proteína Sml1 es independiente de la fosforilación del residuo T380 de Dun1.

Al igual que en el capítulo 4, se estudió el papel de las serinas 10 y 139 de Dun1. Los resultados de la Figura R.5.4. muestran que *DUNI-S10A* y *DUNI-S139A* no presenta defectos significativos en la degradación de la proteína Sml1 en respuesta al tratamiento con MMS. Tampoco presenta ningún defecto en los niveles de Sml1 el alelo *DUNI-S10A* en condiciones de escasez de hierro (Figura R.5.4.). Sin embargo, se observa un ligero defecto en la disminución de los niveles de proteína Sml1 en condiciones de deficiencia de hierro para el alelo *DUNI-S139A* (Figura R.5.4.). Este resultado podría deberse a los menores niveles de proteína Dun1-S139A en condiciones de baja disponibilidad de hierro (Figura R.4.6.). Estos resultados sugieren que los residuos T380, S10 y S139 de la quinasa Dun1 no juegan un papel importante en la regulación de los niveles de proteína Sml1 en condiciones de escasez de hierro.

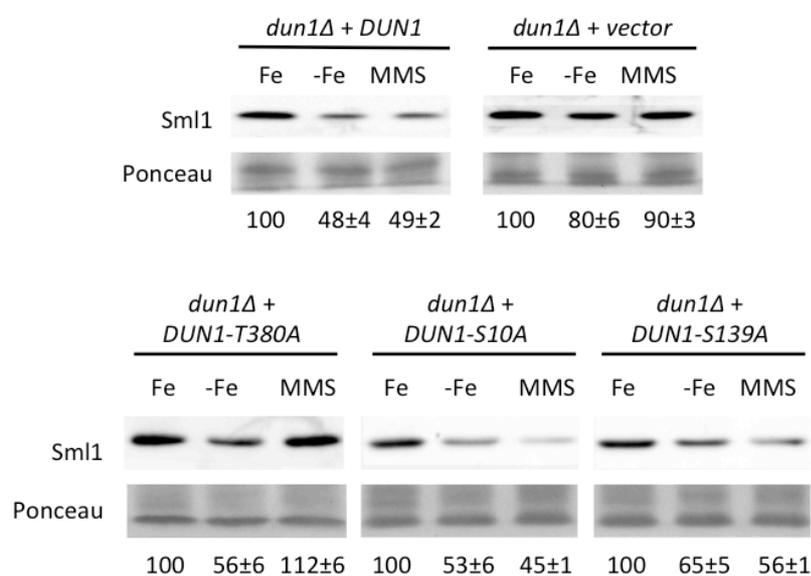


Figura R.5.4. Niveles de proteína Sml1 en mutantes de la quinasa Dun1 que carecen de sitios específicos de fosforilación. Células de la cepa *dun1Δ* (SPY350) transformadas con los plásmidos pSP692 (*DUN1*), P37 (vector), pSP693 (*DUN1-S10A*), pSP694 (*DUN1-S139A*), o pSP695 (*DUN1-T380A*) se crecieron tal y como se describe en la Figura R.5.2. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes.

5.5. Estudio del papel de Mec1 y Rad53 en el control de los niveles de proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro.

Las quinasa Mec1 y Rad53 activan Dun1 en respuesta a daños en el DNA provocando la degradación de Sml1 (Allen et al., 1994; Sun et al., 1996; Zhao et al., 2001). Así pues, decidimos estudiar si las quinasa Mec1 y Rad53 participan en la regulación de la proteína Sml1 en condiciones limitantes de hierro. Como se ha descrito previamente, los mutantes simples

mec1Δ y *rad53Δ* son letales debido a los bajos niveles de dNTPs que presentan. Existen diferentes estrategias para recuperar la viabilidad de estos como son la delección de la proteína Sml1 (ver capítulo 2, apartado 2.3) o la sobreexpresión de la subunidad grande R1 de RNR bajo el control de un promotor de expresión constitutiva (Desany et al., 1998; Zhao et al., 1998). Puesto que nuestro objetivo es determinar los niveles de proteína Sml1, para este experimento se utilizó la cepa silvestre W303-1a y las cepas mutantes *mec1Δ*, *rad53Δ*, y *dun1Δ* que sobreexpresan *RNR1*. Como muestra la Figura R.5.5., tanto en condiciones de deficiencia de hierro como en condiciones de estrés genotóxico la cepa silvestre, pero no *dun1Δ*, promueve la disminución de los niveles de proteína Sml1. En cambio, los niveles de Sml1 disminuyen en células *mec1Δ* y *rad53Δ* crecidas en condiciones limitantes de hierro, mientras que se mantienen en células incubadas con MMS (Figura R.5.5.). En conclusión, los resultados obtenidos indican que a diferencia de lo que ocurre en la respuesta a daños en el DNA, la disminución en los niveles de la proteína Sml1 en condiciones de deficiencia de hierro es independiente de las quinasas Mec1 y Rad53.

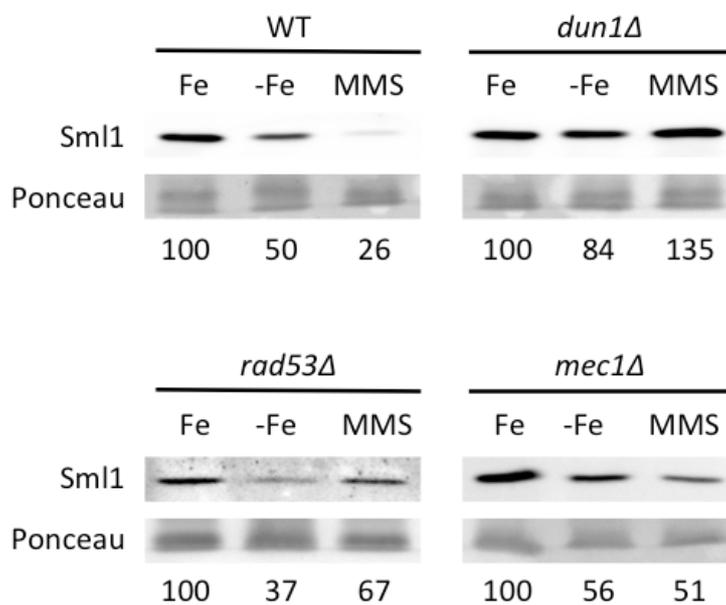


Figura R.5.5. Las quinasas Mec1 y Rad53 no regulan los niveles de proteína Sml1 en condiciones de escasez de hierro. Células de la cepa silvestre W303-1a (SPY473) *dun1Δ* (SPY478), *rad53Δ* (SPY476) y *mec1Δ* (SPY474) se crecieron en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC, Fe), condiciones de deficiencia de hierro (SC con 100 μ M de BPS, -Fe) durante 6 horas y condiciones de suficiencia de hierro con 0,04% de MMS (MMS) añadido al medio durante la última hora de crecimiento. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos tres repeticiones biológicas independientes.

5.6. Papel del proteasoma 26S en la regulación de los niveles de proteína Sml1 en respuesta a la escasez de hierro.

En respuesta a daños en el DNA, la fosforilación y posterior ubiquitilación de la proteína Sml1 promueven su degradación a través del proteasoma 26S (Andreson et al., 2010). Con el fin de estudiar si esta observación se hace extensible a condiciones de deficiencia de hierro, se determinaron niveles de proteína Sml1 en células que presentan inactivado el gen *PRE1* implicado en el ensamblaje de subunidad 20S del proteasoma 26S (Heinemeyer et al., 1991; Birgit Richter-Ruoff, 1992). Puesto que *PRE1* es esencial, se utilizó el mutante termosensible *pre1-1* incubado a temperatura restrictiva (37 °C). Para ello, las cepa silvestre BY4743 y mutante *pre1-1* se crecieron 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, manteniendo la temperatura restrictiva durante todo el proceso (ver materiales y métodos apartado 4.1.). A continuación, los niveles de proteína Sml1 se determinaron del mismo modo que se indica en los apartados anteriores. Como se observa en la Figura R.5.6., los niveles de proteína Sml1 no varían en células *pre1-1* crecidas en condiciones de deficiencia de hierro mientras que en la cepa silvestre los niveles de Sml1 disminuyen de forma significativa. Estos resultados sugieren que, al igual que ocurre en respuesta a daños en el DNA, el proteasoma 26S participa en la degradación la proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro.

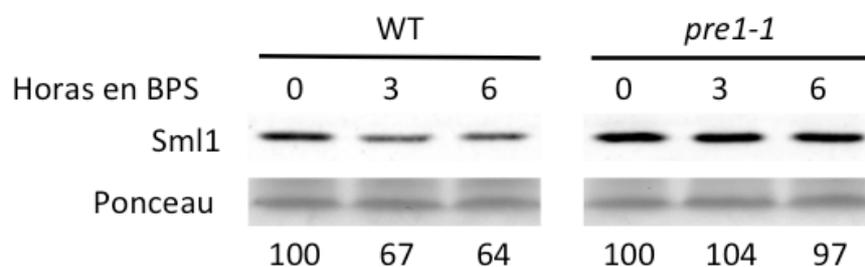


Figura R.5.6. La degradación de la proteína Sml1 en condiciones de deficiencia de hierro depende del proteasoma 26S. Células de la cepa silvestre BY4743 (SPY462) y de la cepa mutante *pre1-1* (SPY463) se crecieron en condiciones de suficiencia de hierro (medio SC) durante 3 horas a 37 °C. A continuación se añadió al medio el quelante de hierro BPS (SC+100µM de BPS, -Fe) y las células se crecieron durante 6 horas más a 37 °C. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos dos repeticiones biológicas independientes es mostrado.

La fosforilación de la proteína Sml1 durante la fase S del ciclo celular o en respuesta a daños en el DNA es necesaria para que ésta sea posteriormente ubiquitilada y degradada por el proteasoma 26S (Andreson et al., 2010). La ubiquitilación de Sml1 en respuesta a daños en el DNA depende de enzima conjugadora de ubiquitina E2 Rad6, la ubiquitina ligasa E3 Urb2 y de Mub1. Para estudiar si el complejo ubiquitín-ligasa Rad6-Ubr2-Mub1 regula la degradación de la proteína Sml1 durante condiciones de deficiencia de hierro, se determinaron los niveles de proteína Sml1 en mutantes *rad6Δ*, *ubr2Δ* y *mub1Δ*. La ubiquitina ligasa Ubr1 interactúa con la enzima Rad6 y con Mub1 formando un complejo que ubiquitina a Rpn4, un factor de transcripción implicado en la biosíntesis de los componentes del proteasoma (Wang et al., 1997; Wang, 2004; Ju et al., 2008), por lo que se incluyó la cepa *ubr1Δ* en el ensayo. Así pues, la cepa silvestre BY4743 y las

cepas *rad6Δ*, *ubr2Δ*, *mub1Δ* y *ubr1Δ* se crecieron en condiciones de suficiencia, deficiencia de hierro y estrés genotóxico como se ha detallado en apartados anteriores. Como muestra la Figura R.5.7., células mutantes de las cepas *rad6Δ*, *ubr2Δ* y *mub1Δ* presentan defectos en la degradación de la proteína Sml1 en condiciones de deficiencia de hierro y en MMS. Por otro lado, los niveles de Sml1 disminuyen de forma importante en condiciones de deficiencia de hierro y estrés genotóxico en la cepa silvestre y la cepa mutante *ubr1Δ* (Figura R.5.7). Estos resultados indican que el complejo ubiquín-ligasa Rad6-Ubr2-Mub1 participa en la degradación de la proteína Sml1 bajo condiciones baja biodisponibilidad de hierro, como se ha demostrado que también ocurre en respuesta a daños en el DNA.

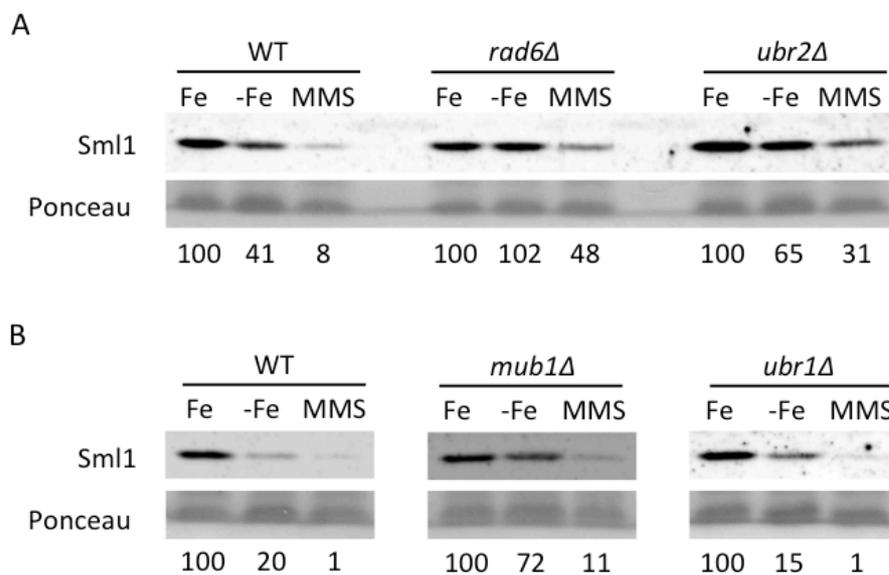


Figura R.5.7. El complejo ubiquitín-ligasa Rad6-Ubr2-Mub1 participa en la degradación de Sml1 en condiciones de escasez de hierro. Células de la cepa silvestre BY4743 (WT, panel A, SPY430) y de las cepas mutantes *rad6Δ* (SPY485), *ubr2Δ* (SPY487) (panel A) se crecieron bajo las mismas condiciones que se indican en la Figura R.4.4. Células de la cepa silvestre (WT, panel B, SPY430) y de las cepas mutantes *mub1Δ* (SPY486) y *ubr1Δ* (SPY488) (panel B) se crecieron en condiciones de suficiencia (medio SC, Fe), deficiencia de hierro (SC con 100 μ M de BPS, -Fe) durante 8 horas y condiciones de suficiencia de hierro con 0,04% de MMS (MMS) añadido al medio durante las dos últimas horas. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos dos repeticiones biológicas independientes.

5.7. La degradación de la proteína Sml1 en condiciones de escasez de hierro depende de sus residuos S56, S58, S60 y S61.

Un estudio previo muestra que las serinas S56, S58, S60 y S61 de la proteína Sml1 son fosforiladas por la quinasa Dun1 en respuesta a daños en el DNA (Uchiki, 2004; Andreson et al., 2010). La mutación de estos cuatro

residuos de serina a alanina (mutante *sml1-4SA*) suprime completamente la degradación de Sml1 en respuesta a daños en el DNA (Zhao et al., 2000; Zhang et al., 2007; Uchiki, 2004; Andreson et al., 2010). Dado que en condiciones de deficiencia de hierro, la disminución en los niveles de proteína Sml1 depende de actividad quinasa Dun1, decidimos estudiar si los residuos S56, S58, S60 y S61 de Sml1 se requieren para la degradación de la proteína en condiciones de escasez de hierro. Para llevar a cabo este objetivo, células de la cepa silvestre W303-1a y la cepa mutante *sml1-4SA* se crecieron bajo las mismas condiciones que se detallan en ensayos anteriores y los niveles de proteína Sml1 se determinaron como se ha indicado previamente. Tal y como se muestra en la Figura R.5.8., la proteína Sml1 silvestre se degrada más rápido que la proteína Sml1-4SA en respuesta al estrés genotóxico y a la deficiencia de hierro. Estos datos sugieren que las serinas S56, S58, S60 y S61 de Sml1 son importantes para la degradación de Sml1 en condiciones de baja disponibilidad de hierro.

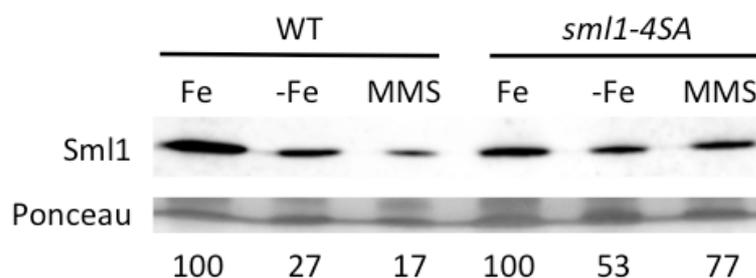


Figura R.5.8. Los residuos S56, S58, S60 y S61 de Sml1 regulan la estabilidad de la proteína en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro. Células de la cepa silvestre W303-1a (WT, SPY465) y *sml1-4SA* (SPY466) se crecieron tal y como se describe en la Figura R.5.2. La tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos dos de tres repeticiones biológicas independientes.

5.8. Implicación de la ruta proteolítica vacuolar en la degradación de Sml1 en condiciones de baja disponibilidad de hierro.

Análisis de los niveles proteicos de Sml1 en células que expresan la proteína de fusión Sml1-GFP muestran que bajo condiciones de deficiencia de hierro la proteína Sml1-GFP se degrada (Figura R.5.9., panel A) al igual que ocurre en una cepa silvestre (Figura R.5.1.). Sin embargo, la degradación de Sml1-GFP no se observa en respuesta a tratamientos que inducen estrés genotóxico como HU o MMS (Figura R.5.9., panel A). En cambio, se observa un retraso en la movilidad electroforética de Sml1-GFP debido probablemente a la fosforilación que la quinasa Dun1 ejerce sobre Sml1. Este resultado sugiere que la etiqueta GFP interfiere en la degradación de la proteína Sml1 en respuesta a tratamientos con HU o MMS pero no es respuesta a la falta de hierro. Estas observaciones sugieren que en condiciones de deficiencia de hierro existen otros mecanismos de degradación para Sml1 que no se ven afectados por la presencia de la proteína GFP fusionada a Sml1.

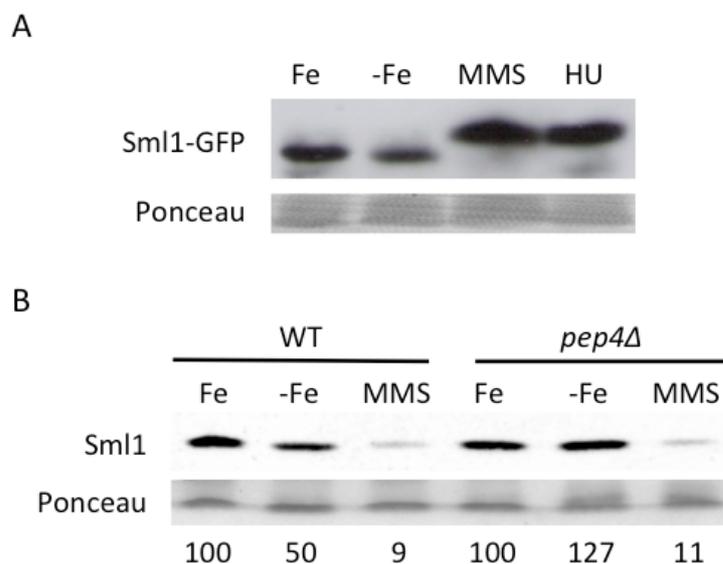


Figura R.5.9. La ruta proteolítica vacuolar dependiente de la proteinasa vacuolar Pep4 contribuye a la degradación de proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro, pero no en respuesta a daños en el DNA. (A) Células de la cepa que expresan la proteína de fusión Sml1-GFP (SPY349) se crecieron en medio SC (Fe), SC con 100 μ M de BPS (-Fe) durante 6 horas; medio SC con 0,04% de MMS (MMS) y medio SC con 0,2 M de HU (HU) añadidos al medio durante las dos últimas horas de crecimiento. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron mediante el anticuerpo anti-GFP. (B) Células de la cepa silvestre BY4743 (WT, SPY430) y de la cepa mutante *pep4Δ* (SPY496) crecieron tal y como se describe en la Figura R.5.4. Los niveles de proteína Sml1 se determinaron y cuantificaron como se ha descrito previamente. Se muestra un experimento representativo de al menos dos repeticiones biológicas independientes. Para ambos casos (panel A y B) la tinción con Ponceau S se utilizó como control de carga.

Además de la ruta de degradación de proteínas citoplasmáticas mediada por el sistema ubiquitín-proteasoma, existe otra vía de degradación proteolítica llevada a cabo por la vacuola. En *S. cerevisiae*, la ruta proteolítica vacuolar requiere de la actividad aspartil proteasa vacuolar (proteínasa A) Pep4. Pep4 está implicada en la maduración post-traduccional

de precursores de proteinasas vacuolares además de participar en la proteólisis de proteínas en respuesta al estrés nutricional, durante la esporulación y bajo condiciones de crecimiento vegetativo (Wolff et al., 1996; Ammerer et al., 1986; Parr et al., 2007). Decidimos estudiar si la ruta proteolítica vacuolar está implicada en la degradación la proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro. Para ello, se determinaron los niveles de Sml1 en una cepa silvestre BY4743 y en la cepa mutante *pep4Δ*. De acuerdo con los resultados obtenidos previamente mediante tratamientos con HU (Baek et al., 2012), la degradación de la proteína Sml1 en respuesta al estrés genotóxico, en este caso inducido por MMS, es independiente de la proteasa vacuolar Pep4 (Figura R.5.9., panel B; Baek et al., 2012). En cambio, en un mutante *pep4Δ* no se observa disminución en los niveles de proteína Sml1 (Figura R.5.9., panel B). Con todos estos resultados podemos concluir que la deficiencia de hierro promueve la degradación de la proteína Sml1 tanto a través del proteasoma 26S como de la ruta proteolítica vacuolar. En respuesta a daños en el DNA el proceso ocurre de forma dependiente del proteasoma 26S pero independientemente de la ruta proteolítica vacuolar.

Discusión

La capacidad de dividirse depende, entre otros factores, de la eficacia de las células para replicar su material hereditario. En los organismos eucariotas el hierro desempeña un papel imprescindible en la síntesis de DNA dada su participación como cofactor en las DNA polimerasas y en la enzima ribonucleótido reductasa. A pesar de que hace más de cuarenta años que se ha descrito que la RNR presenta un centro dinuclear de hierro esencial para su función (Brown, 1968), ningún estudio ha descrito hasta el momento los mecanismos que regulan la actividad RNR ante situaciones de escasez de hierro. En este trabajo hemos descrito mediante ensayos de inmunolocalización que la levadura *S. cerevisiae* induce la relocalización de la subunidad pequeña R2 de RNR del núcleo al citoplasma de la célula bajo condiciones de deficiencia de hierro. Este cambio de localización subcelular ocurre cuando los niveles de hierro son bajos, tanto si la deficiencia es provocada por la presencia de un quelante de hierro como cuando las células presentan reducida su capacidad de adquisición del metal desde el medio extracelular (mutantes *fet3Δfet4Δ*). La relocalización de las proteínas Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma tanto durante la fase S del ciclo celular como en respuesta a daños en el DNA tiene lugar a través de un mecanismo dependiente de las quinasas del *checkpoint* de integridad del DNA Mec1 y Rad53 (Yao et al., 2003). Sin embargo, bajo nuestras condiciones de ensayo, la quinasa Rad53 no muestra cambios significativos en su movilidad electroforética posiblemente debido a que no está fosforilada en respuesta a niveles bajos de hierro. Este resultado sugiere que las condiciones de deficiencia de hierro ensayadas en este trabajo no activan el *checkpoint* de integridad del DNA. No obstante, la ausencia de hiperfosforilación en la quinasa Rad53 no es sinónimo inequívoco de inactivación del *checkpoint*. Así pues, tan sólo con este

resultado, no se puede descartar de forma definitiva la posibilidad de que la quinasa Rad53 esté participando en el mecanismo de regulación de la RNR en condiciones de deficiencia de hierro. Tsaponina y colaboradores han mostrado que en mutantes *ixr1Δ*, factor de transcripción que controla la expresión de *RNR1* además de la respuesta a hipoxia, la expresión de los genes *RNR3* y *RNR4* aumenta a pesar de que la quinasa Rad53 no muestra cambios en su movilidad electroforética. Esta inducción desaparece cuando la quinasa Rad53 no está presente (Tsaponina et al., 2010). Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos pensar que la ausencia de hiperfosforilación de la quinasa Rad53 no impide que esté involucrada en el control de la relocalización de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro. Sin embargo, la presencia de una distribución principalmente citoplasmática de la subunidad pequeña R2 en mutantes *mec1Δsml1Δ* y *rad53Δsml1Δ*, en condiciones de deficiencia de hierro, sugiere que Mec1 y Rad53 no participan en este cambio de localización.

Aunque este último resultado excluye la participación de las quinasas Mec1 y Rad53 en la activación del cambio de localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4, no se puede descartar que el cambio de localización sea debido a defectos en la progresión del ciclo celular causados por la deficiencia del cofactor. Es factible pensar que bajo las condiciones de deficiencia de hierro ensayadas, las células podrían tender a acumularse en la fase de síntesis del DNA puesto que, como trabajos previos han descrito, es en esta fase donde casi más de la mitad de las células presentan un patrón difuso de localización citoplasmática para la subunidad pequeña R2 (Yao et al., 2003). Sin embargo, análisis de citometría de flujo (resultados no mostrados) indican que células crecidas en las condiciones de deficiencia de hierro utilizadas en este trabajo no presentan diferencias

significativas en la distribución del ciclo celular respecto a células crecidas en condiciones de suficiencia de hierro. Además, ensayos de inmunolocalización en células crecidas en presencia de BPS y paradas en la fase G1 del ciclo celular muestran un patrón de localización principalmente citoplasmático, tanto para la proteína Rnr2 como para Rnr4 (resultados no mostrados). Estos resultados indican que la relocalización de la subunidad pequeña R2 en respuesta a las condiciones de baja biodisponibilidad de hierro ensayadas no es una consecuencia indirecta de defectos en la progresión del ciclo, ni tampoco requiere del paso a través de ninguna fase concreta del ciclo celular. La distribución de la subunidad pequeña R2 al citoplasma tampoco es debida a un aumento de la expresión de *RNR2* y *RNR4*, como indica la ausencia de inducción transcripcional en condiciones de deficiencia de hierro mostrada mediante ensayos β -galactosidasa. De acuerdo con esta observación, Yao y colaboradores han mostrado que bajo condiciones de estrés genotóxico la falta de activación transcripcional de *RNR2* y *RNR4* no impide que la subunidad pequeña R2 realice del núcleo al citoplasma de la célula (Yao et al., 2003).

Ante déficit de hierro, la levadura *S. cerevisiae* activa una respuesta a nivel transcripcional y post-transcripcional que facilita adquirir, movilizar, reciclar e incluso atenuar la actividad de algunas rutas metabólicas en provecho de otras. Puig y colaboradores han descrito que gran parte de la remodelación post-transcripcional que tiene lugar en respuesta a la deficiencia de hierro está dirigida por las proteínas Cth1 y Cth2. Los resultados de sus trabajos apoyan la idea de que la función llevada a cabo por ambas proteínas tiene como finalidad reprimir el consumo de hierro por parte de procesos no esenciales a favor de procesos celulares indispensables que también requieren de este cofactor para su actividad (Puig et al., 2005 y

2008). En este trabajo se muestra que las proteínas Cth1 y Cth2 regulan la localización subcelular de la subunidad pequeña R2 en respuesta a la deficiencia de hierro. Cuando los niveles de hierro son limitantes, las proteínas Cth1 y Cth2 reconocen y se unen a través de sus dedos de zinc a las AREs situadas en la región 3'UTR del mRNA *WTM1* induciendo su degradación. La unión de Cth1 y Cth2 a la región 3'UTR de *WTM1* es un proceso específico que requiere tanto de la integridad de los dedos de zinc de Cth1 y Cth2, como de la integridad de las AREs de la región 3'UTR de *WTM1*, tal y como los resultados de los ensayos de triple híbrido realizados en este trabajo sugieren. Además, hemos observado mediante *Western blot* que la disminución en los niveles de mRNA *WTM1* promueve una bajada en los niveles de proteína. La disminución de los niveles de proteína Wtm1 favorece la salida de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma aproximadamente en el 60-70% de las células. Así pues, nuestros resultados sugieren que cuando los niveles de hierro son bajos las proteínas Cth1 y Cth2 presentan una función directa en el control de la regulación de la localización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 a través de la estabilidad del mRNA *WTM1* (Figura D.1).

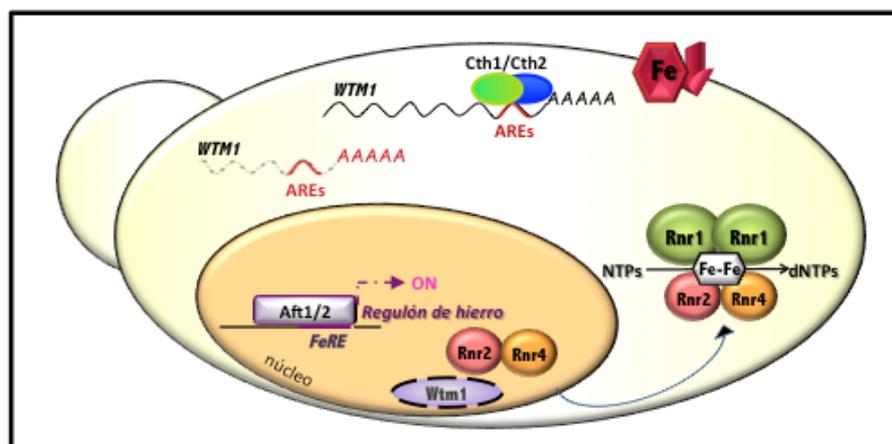


Figura D.1. Modelo de regulación de la enzima ribonucleótido reductasa de *S. cerevisiae* en condiciones de deficiencia de hierro a través de las proteínas Cth1 y Cth2.

Nuestros ensayos de inmunolocalización para las proteínas Rnr2 y Rnr4 muestran que en condiciones de deficiencia de hierro más de un 20% de las células que no expresan *CTH1* y *CTH2*, que expresan sus alelos no funcionales o el alelo *WTM1-ARE-mt3* presentan a la subunidad pequeña R2 en el citoplasma de la célula. Estos resultados sugieren que en condiciones de limitación de hierro existen mecanismos independientes a la degradación del mensajero *WTM1* que también intervienen en la regulación de la localización subcelular de la subunidad pequeña R2. Un posible mecanismo podría ser la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Sin embargo, ensayos de *immunoblot* realizados en mutantes *cth1Δcth2Δ* y *WTM1-ARE-mt3* para estudiar el estado de fosforilación de la quinasa Rad53, no muestran ningún retraso en la movilidad electroforética de esta quinasa en las condiciones de deficiencia de hierro utilizadas en este trabajo. Por tanto, hemos descartado que el patrón parcialmente citoplasmático que presentan

Discusión

los mutantes *cth1Δcth2Δ* y *WTM1-ARE-mt3* sea consecuencia de la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Puesto que la ausencia de fosforilación de Rad53 no siempre implica falta de activación del *checkpoint*, hemos estudiado si células mutantes *cth1Δcth2Δ* presentan activación de la transcripción de los genes *RNR*. Los resultados obtenidos (no mostrados) a partir de ensayos β-galactosidasa realizados en la cepa mutante *cth1Δcth2Δ* no muestran cambios en la transcripción de los genes *RNR2* y *RNR4*, descartando así la activación del *checkpoint* de integridad del DNA. Así pues, todos estos resultados refuerzan la idea de que mecanismos independientes al *checkpoint* de integridad del DNA y a las proteínas Cth1 y Cth2 contribuyen a la salida de Rnr2 y Rnr4 del núcleo al citoplasma en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro. No podemos descartar que la salida parcial al citoplasma de la subunidad pequeña R2 que presentan estos mutantes cuando los niveles de hierro disminuyen sea consecuencia de defectos en la progresión del ciclo celular. De esta forma, sería interesante estudiar si dichos mutantes presentan alteraciones en la progresión de las fases del ciclo bajo las condiciones de limitación del hierro ensayadas. Tampoco podemos descartar que existan mecanismos que regulen la estabilidad de la interacción entre la proteína Wtm1 y Rnr2-Rnr4 en condiciones de deficiencia de hierro tal y como ocurre en respuesta al estrés genotóxico.

Mediante un ensayo enzimático hemos determinado que las concentraciones intracelulares de dATP y dCTP aumentan dos veces tras 7 horas de crecimiento bajo condiciones de déficit de hierro. Estos resultados sugieren que la escasez de hierro no conduce a una inhibición drástica de

actividad RNR, sino que su función se mantiene al menos durante las primeras horas. En mutantes *WTM1-ARE-mt3* crecidos en condiciones de deficiencia de hierro las cantidades de dNTPs no aumentan, sino que se mantienen en niveles similares a los determinados en condiciones de suficiencia de hierro. Así pues, concluimos que la degradación del mRNA *WTM1* en condiciones de deficiencia de hierro promueve la activación de la función biológica de la enzima RNR (Figura D.1). En mutantes *cth1Δcth2Δ*, los niveles de dNTPs no sólo no se mantienen, sino que disminuyen más de seis veces respecto de células de la cepa silvestre crecidas 7 horas en condiciones de deficiencia de hierro. Este resultado no se debe a un aumento en los niveles del mRNA *WTM1* ya que mutantes *WTM1-ARE-mt3* y *cth1Δcth2Δ* presentan el mismo defecto en la degradación del mRNA *WTM1*. Este resultado tampoco se explica por un mayor defecto en la salida al citoplasma de la subunidad pequeña R2 ya que los mutantes *cth1Δcth2Δ* y *WTM1-ARE-mt3* exhiben el mismo defecto en la relocalización subcelular de las proteínas Rnr2 y Rnr4 bajo condiciones de escasez de hierro. La diferencia en los niveles intracelulares de dNTPs se podría deber a defectos en la distribución del cofactor en mutantes *cth1Δcth2Δ*. En respuesta a la deficiencia de hierro tanto en células de una cepa silvestre como en mutantes *WTM1-ARE-mt3* se están reprimiendo, a través del mecanismo de acción de las proteínas Cth1 y Cth2, procesos no esenciales que requieren del hierro para su actividad. Por tanto, es posible que cuando estos procesos están siendo reprimidos, la célula disponga de mayor cantidad de cofactor libre que podía ser destinado a la actividad de la enzima RNR. En cambio, la represión de estos procesos desaparece en mutantes *cth1Δcth2Δ* provocando posiblemente una disminución en la cantidad de cofactor libre y disponible para la RNR, hecho que afectaría negativamente a su actividad enzimática,

traduciéndose en una disminución en los niveles de dNTPs. Por tanto, la síntesis de dNTPs no está simplemente limitada por la salida de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma sino por otras causas como puede ser la disponibilidad de hierro. No podemos obviar que la disminución en los niveles de dNTPs también puede ser debida a efectos secundarios de los mutantes *cth1Δcth2Δ*. Hemos observado que las proteínas Cth1 y Cth2 además de regular el cambio de localización también regulan otros aspectos de la función de la RNR como son los niveles de Rnr2 y Rnr4. Por tanto, no podemos descartar que defectos en la regulación de los niveles de la subunidad pequeña R2 o en otros factores que afectan su actividad provocando una disminución en los niveles de dNTPs en condiciones de deficiencia de hierro. Es interesante indicar que mientras que mutantes *WTM1-ARE-mt3* no presentan defectos de crecimiento en presencia del quelante de hierro BPS, mutantes *cth1Δcth2Δ* crecen de forma más lenta (resultados no mostrados). Además, en este trabajo no se ha estudiado si mutantes *cth1Δcth2Δ* presentan defectos en la liberación del cofactor a actividades enzimáticas celulares que requieren del hierro para su función como por ejemplo algunas de las enzimas que están implicadas en el mantenimiento de la estabilidad genómica, factor que podría alterar la síntesis de dNTPs. Tampoco podemos descartar que el descenso observado en los niveles de dNTPs que presentan estos mutantes bajo condiciones de deficiencia de hierro pueda ser consecuencia de alteraciones en la progresión de alguna de las fases del ciclo celular, como podría ocasionar un retraso en la entrada en la fase de replicación del DNA o la parada en alguna fase donde sea esencial para las células mantener niveles bajos de dNTPs. Por último, es importante resaltar que el descenso en los niveles de dNTPs que presentan mutantes *cth1Δcth2Δ* sólo ha sido determinado al cabo de 7 horas

de crecimiento bajo condiciones de déficit de hierro. No sabemos si este defecto en el mantenimiento de los niveles de dNTPs tiene lugar de forma transitoria o si la bajada es reproducible a tiempos más largos de deficiencia. Sería interesante investigar con más detalle que ocurre con los niveles de dNTPs tanto en tiempos más cortos como pasadas más de siete horas en condiciones de limitación del cofactor. En este sentido, se ha descrito que en algunas líneas celulares de mamífero se produce un aumento transitorio en los niveles de dNTPs durante las primeras etapas de la deficiencia de hierro a pesar de que a tiempos más largos de deficiencia más severa los niveles de estos disminuyen y el ciclo celular acaba parándose debido al papel esencial que el hierro juega en la división celular (Furukawa et al., 1992). La falta de activación del *checkpoint* y la ausencia de defectos en la progresión del ciclo celular tras seis horas en deficiencia de hierro, parecen indicar que esta deficiencia de hierro no es lo suficientemente severa como para provocar consecuencias indirectas de la falta de dNTPs.

La relocalización citosólica de la subunidad pequeña R2 bajo condiciones de deficiencia de hierro tiene lugar entre aproximadamente el 60-70% de las células de una cepa silvestre. En cambio, la síntesis de dNTPs sólo se traduce en un aumento de dos veces en los niveles de dATP y dCTP. Este resultado sugiere la existencia de otros factores que limitan la síntesis de dNTPs bajo estas condiciones. Como ya hemos comentado anteriormente, bajo condiciones de baja biodisponibilidad de hierro la transcripción de *RNR2* y *RNR4* no aumenta significativamente en comparación con el tratamiento de MMS, resultado consistente con la falta de activación de las quinasa Mec1 y Rad53. Hemos observado que tanto los mRNAs *RNR2* y *RNR4* como sus niveles de proteína disminuyen en respuesta a la deficiencia de hierro. Estos resultados sugieren que una ligera disminución en los

niveles de proteína de la subunidad R2 podría limitar la actividad de RNR durante condiciones de menor disponibilidad de hierro. Además, es importante considerar que la función de la RNR puede estar limitada por la disponibilidad del cofactor así como por la entrega de este a la enzima. Estudios recientes han demostrado que las glutarredoxinas Grx3/Grx4 son importantes para la entrega del cofactor a la RNR (Muhlenhoff et al., 2010). Sería muy interesante ampliar este trabajo con estudios más detallados que permitan determinar cómo la entrega del hierro a la RNR se ve afectada durante la deficiencia y si esto influye en la regulación de la RNR. En este trabajo hemos observado que a pesar de que los niveles del inhibidor Sml1 de la subunidad grande R1 disminuyen, aproximadamente un 50% de la proteína Sml1 permanece estable tras 6 horas bajo condiciones de deficiencia de hierro. Por tanto, no podemos descartar que cantidades de Sml1 estén impidiendo un aumento mayor en los niveles de dNTPs. Es posible que las células controlen de varias formas los niveles de dNTPs en condiciones de deficiencia de hierro. Un ligero descenso en los niveles de dNTPs quizás sea suficiente para priorizar actividades relacionadas con el metabolismo del DNA sin causar daños a la célula como consecuencia de un incremento en la tasa de mutación o a la propia toxicidad que causan cantidades elevadas de dNTPs.

La presencia de mecanismos independientes a las proteínas Cth1 y Cth2 que también regulan la actividad RNR, nos ha permitido asignar una nueva función a la quinasa Dun1 en la homeostasis del hierro. El papel más estudiado y mejor caracterizado de la quinasa Dun1 es su función en la regulación de la síntesis de dNTPs a través del control de la actividad RNR en respuesta al estrés genotóxico. En este trabajo hemos demostrado que la quinasa Dun1 también regula varios aspectos de la RNR en condiciones de

deficiencia de hierro como son la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 y los niveles del inhibidor Sml1 de la subunidad grande R1. Varios resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la quinasa Dun1 participa en la respuesta a la deficiencia de hierro a través de un mecanismo diferente al que tiene lugar bajo condiciones de estrés genotóxico. Por un lado, resultados obtenidos a partir de ensayos de inmulo-localización en mutantes *mec1Δ* y *rad53Δ* descartan una función de ambas quinasas en la relocalización de la subunidad pequeña R2 del núcleo al citoplasma en condiciones de deficiencia de hierro. Por otro lado, defectos en la disminución de los niveles de proteína Sml1 observados en mutantes *dun1Δ* pero ausentes en mutantes *mec1Δ* y *rad53Δ* en condiciones de deficiencia de hierro, excluyen tanto a Mec1 como a Rad53 de la regulación de los niveles del inhibidor Sml1. Es importante destacar que el papel de Dun1 a través de un mecanismo independiente a la quinasa Rad53 no resulta novedoso. De hecho, varios estudios sugieren que rutas independientes a la quinasa Rad53 también pueden activar a la quinasa Dun1 (Bashkirov et al., 2003). Por ejemplo, la activación transcripcional de *SNM1*, gen necesario para la reparación de enlaces de cadena cruzada en el DNA en respuesta al daño, parece ser dependiente de Dun1 pero independiente de Rad53 (Ralf y Siede, 1996). Por otra parte, tanto Mec1 como Dun1 parecen estar implicadas en la supresión de reordenamientos cromosómicos y en el silenciamiento de genes teloméricos a través de un mecanismo independiente de Rad53 (Craven y Petes, 2000; Myung et al., 2001). Además, la ausencia de retraso en la migración electroforética de Dun1 en condiciones de déficit de hierro así como la falta de inducción transcripcional de los genes *RNR2* y *RNR4* bajo las mismas condiciones apoyan la idea de que Dun1 regula la función de la RNR a través de un mecanismo diferente al que tiene lugar en

respuesta a daños en el DNA. Así pues, sería de gran interés estudiar cómo Dun1 percibe la deficiencia de hierro, así como la naturaleza de esta señal. Mientras que la activación de las proteínas Cth1 y Cth2 depende de la inducción transcripcional gobernada por los factores Aft1 y Aft2, no podemos descartar la existencia de mecanismos independientes a éstos responsables de promover la actividad de Dun1 en condiciones de limitación del cofactor.

En este trabajo hemos estudiado los residuos de Dun1 implicados en la localización de la subunidad pequeña R2 y en la regulación de los niveles de proteína Sm11. Hemos centrado nuestros estudios en aquellos residuos que han sido previamente descritos como importantes en la función de Dun1 en la regulación de RNR en respuesta a daños en el DNA (Zhao et al., 2002; Lee et al., 2008). Hemos observado que mutantes *DUNI-D328A* sin actividad quinasa, y por tanto incapaces de fosforilar a sus dianas, son incapaces tanto de promover la relocalización de la subunidad pequeña R2 como de inducir la degradación de la proteína Sm11. Estos resultados indican que la integridad de la actividad quinasa de Dun1 es necesaria para la regulación de la RNR en respuesta a la deficiencia de hierro tal y como ocurre en respuesta a daños en el DNA. En cambio, las serinas de las posiciones 10 y 139 descritas como posibles sitios de autofosforilación importantes para la activación de Dun1 en respuesta a daños en el DNA, parecen no tener un papel importante ni en el cambio de localización del núcleo al citoplasma de las proteínas Rnr2 y Rnr4, ni en la disminución de los niveles de proteína Sm11 bajo condiciones de limitación de hierro. Estos resultados refuerzan la idea de que la quinasa Dun1 participa en la regulación de la RNR en condiciones de deficiencia de hierro a través de un mecanismo diferente al que promueve su actividad en respuesta a daños en

el DNA. Sin embargo, no disponemos de datos suficientes que permitan descifrar a través de que mecanismos tiene lugar esta regulación. Entre muchos otros factores, sería de gran interés estudiar si la quinasa Dun1 afecta a la interacción entre el complejo Rnr2-Rnr4 y la proteína Wtm1. Cabe destacar que datos preliminares no parecen indicar que la función de la quinasa Dun1 regule los niveles de Wtm1 (datos no mostrados).

En respuesta al estrés genotóxico inducido por MMS, el dominio FHA de Dun1 y el residuo T380 de Dun1 participan en la degradación de Sml1 y en el cambio de localización. En cambio, nuestros resultados sugieren que en condiciones de deficiencia de hierro el dominio FHA de Dun1 no se requiere para la relocalización del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 pero sí para la regulación de los niveles del inhibidor Sml1. Dadas las evidencias que indican que Rad53 no participa en ninguno de ambos procesos, estos resultados nos llevan a plantearnos si los defectos en regulación de los niveles de Sml1 que estos mutantes presentan podrían ser atribuidos a una posible función del dominio FHA como mediador de la interacción entre Sml1 y Dun1. Si fuera así, este resultado otorgaría una nueva función al dominio FHA de la quinasa Dun1 en la regulación de los niveles de Sml1 en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro. En consonancia con esta idea encontramos en la bibliografía un trabajo donde se describe que el dominio FHA de la quinasa Dun1 además de estar implicado en el reconocimiento de motivos di-fosfotreonina de Rad53, interacciona con Pan3, subunidad del complejo nucleasa-poly(A) regulando los niveles del mRNA *RAD5* en respuesta al estrés replicativo (Hammet et al., 2000). No obstante, no podemos descartar que Dun1 reconozca a través de su dominio FHA una proteína con un motivo di-fosfotreonina necesaria para inducir la

degradación de Sml1 bajo condiciones de limitación del cofactor, pero no requerida para el cambio de localización de la subunidad pequeña R2.

La controversia observada entre el cambio de localización subcelular de la subunidad pequeña R2 y los niveles de proteína Sml1 que exhiben mutantes *DUNI* que presentan el residuo de treonina de la posición 380 mutado (T380A), requiere ser estudiada con mayor detalle. Nuestros resultados indican que mutaciones en la treonina 380 no inhiben la disminución de los niveles de Sml1 en condiciones de baja biodisponibilidad de hierro; en cambio si parecen provocar defectos en el salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2. La falta de más datos en este sentido hace difícil explicar este resultado. No obstante, es importante destacar que los datos de cuantificación obtenidos a partir de ensayos de inmunolocalización realizados con estos mutantes en condiciones de deficiencia de hierro muestran desviaciones estándar elevadas.

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, daños en el DNA inducen la degradación de la proteína Sml1 a través del proteasoma 26S, tras ser fosforilada y ubiquitilada. Nuestros resultados de *inmonublot* utilizando mutantes *sml1-4SA*, así como múltiples mutantes de ubiquitilación y mutantes termosensibles del proteasoma 26S, sugieren que cuando los niveles del cofactor son bajos, la proteína Sml1 es ubiquitilada y degradada a través del proteasoma 26S como ocurre en respuesta a daños en el DNA. Sin embargo, nuestros resultados no descartan que las condiciones de escasez de hierro ensayadas impliquen la participación de otros mecanismos adicionales en la degradación del inhibidor Sml1. En este sentido hemos detectado diferencias en la movilidad electroforética en cepas que presentan la fusión Sml1-GFP tratadas con el quelante de hierro BPS respecto de células tratadas con HU y MMS. Después de tratamientos con agentes que dañan

DNA, la proteína de fusión Sml1-GFP parece estar atrapada como una forma intermedia y fosforilada que no puede ser degradada. Sin embargo, en respuesta a la deficiencia de hierro, no sólo no se observa la forma intermedia sino que además los niveles de proteína de fusión Sml1-GFP disminuyen respecto a condiciones de suficiencia de hierro. Teniendo en cuenta que la ruta proteolítica vacuolar dependiente de la proteínasa vacuolar Pep4 es una forma alternativa para la degradación de algunas proteínas, se ha observado que mutantes *pep4Δ* presentan defectos en la degradación de la proteína Sml1 cuando los niveles de hierro disminuyen. Así pues, concluimos que tanto el proteasoma 26S y como la vía proteolítica vacuolar contribuyen a la degradación de la proteína Sml1 en respuesta a la deficiencia de hierro. En cambio, la ruta proteolítica vacuolar no participa en la degradación de Sml1 tras tratamiento con HU (Baek et al., 2012), o MMS (como se ha mostrado en este trabajo).

Nuestros estudios en la levadura *S. cerevisiae* podrían en un futuro servir como precedente para estudiar si existen mecanismos similares en humanos que regulen la función de la RNR en respuesta a la falta de hierro. Se ha descrito que en respuesta a estreses genotóxicos líneas celulares humanas de fibroblastos producen cambios en los niveles de expresión y cambios localización subcelular de las subunidades de la RNR R1, R2 y p53R2 (Tanaka et al., 2000; Xue et al., 2003). Además, un trabajo recientemente publicado ha descrito que la proteína homóloga a Cth2 en humanos, TTP, regulada a través de la ruta mTOR, promueve la degradación del receptor de transferrina en condiciones de baja disponibilidad de hierro (Bayeva et al., 2012). Bayeva y colaboradores sugieren que esta regulación podría ser específica de tejido en función del requerimiento por el hierro que estos presentan. Este trabajo atribuye por primera vez un papel a la proteína

Discusión

TTP en la homeostasis de hierro en humanos y despierta el interés en conocer si su mecanismo de acción también implica cambios en la regulación de la enzima ribonucleótido reductasa.

Conclusiones

1. La deficiencia de hierro provoca la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 de la enzima ribonucleótido reductasa de la levadura *S. cerevisiae*.

2. Las condiciones de deficiencia de hierro utilizadas en este trabajo no provocan la activación de las quinasas del *checkpoint* de integridad del DNA Mec1 y Rad53.

3. La subunidad pequeña R2 de la enzima ribonucleótido reductasa relocaliza del núcleo al citoplasma en respuesta a la deficiencia de hierro independientemente de las quinasas del *checkpoint* de integridad del DNA Mec1 y Rad53.

4. La regulación de la enzima ribonucleótido reductasa en condiciones de deficiencia de hierro depende de las proteínas Cth1 y Cth2 y de la quinasa Dun1.

5. En condiciones de baja biodisponibilidad de hierro, las proteínas Cth1 y Cth2 reconocen e interaccionan a través de su TZF con AREs situadas en la región 3'UTR del mRNA *WTM1* promoviendo su degradación. La disminución de los niveles de mensajero *WTM1* se traduce en una bajada en los niveles de proteína, mecanismo que facilita la salida del núcleo al citoplasma de la subunidad pequeña R2 en condiciones de deficiencia de hierro.

6. Las proteínas Cth1 y Cth2 incrementan los niveles de dATP y dCTP en respuesta a la deficiencia de hierro a través de la degradación del mRNA *WTM1*.

7. En condiciones de baja biodisponibilidad de hierro, las proteínas Cth1 y Cth2 interaccionan a través de su TZF con AREs situadas en la región 3'UTR de los mRNAs *RNR2* y *RNR4* promoviendo

su degradación. La disminución de los niveles de mensajero *RNR2* y *RNR4* se traduce en una ligera bajada en los niveles de proteína.

8. Los niveles de proteína Sml1, inhibidor de la subunidad grande R1, disminuyen en condiciones de deficiencia de hierro de forma independiente de las proteínas Cth1 y Cth2.

9. La quinasa Dun1 promueve la salida de la subunidad pequeña R2 de la enzima ribonucleotido reductasa del núcleo al citoplasma y disminuye los niveles de Sml1 de forma independiente a Mec1 y Rad53.

10. El cambio de localización de la subunidad pequeña R2 y el descenso en los niveles de la proteína Sml1 en condiciones de deficiencia de hierro dependen de la integridad del dominio quinasa de Dun1 mientras que las serinas de las posiciones 10 y 139 son dispensables.

11. En condiciones de baja biodisponibilidad de hierro, el dominio FHA de Dun1 no parece estar implicado en la relocalización de la subunidad pequeña R2 al citoplasma, pero sí en la degradación del inhibidor Sml1.

12. En condiciones de escasez de hierro, la degradación de la proteína Sml1 depende tanto del complejo de ubiquín-ligasas Rad6-Urb2-Mub1 y del proteasoma 26S como de la ruta vacuolar proteolítica.

Bibliografía

- Ammerer, G., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., Valls, L.A., and Stevens, T.H. (1986).** PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Molecular and Cellular Biology* 6, 2490–2499.
- An, X. (2006).** Cotransport of the Heterodimeric Small Subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* Ribonucleotide Reductase Between the Nucleus and the Cytoplasm. *Genetics* 173, 63–73.
- Andreson, B.L., Gupta, A., Georgieva, B.P., and Rothstein, R. (2010).** The ribonucleotide reductase inhibitor, Sml1, is sequentially phosphorylated, ubiquitylated and degraded in response to DNA damage. *Nucleic Acids Research* 38, 6490–6501.
- Aparicio, O.M.O., Stout, A.M.A., and Bell, S.P.S. (1999).** Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9130–9135.
- Bagnat, M., and Simons, K. (2002).** Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Chem.* 383, 1475–1480.
- Baek, I.J., Kang, H.J., Chang, M., Choi, I.D., Kang, C.M., and Yun, C.W. (2012).** Cadmium inhibits the protein degradation of Sml1 by inhibiting the phosphorylation of Sml1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 424, 385–390.
- Bashkirov, V.I., Bashkirova, E.V., and Edwin Haghazari, A.W. (2003).** Direct Kinase-to-Kinase Signaling Mediated by the FHA Phosphoprotein Recognition Domain of the Dun1 DNA Damage Checkpoint Kinase. *Mol Cell Biol.* 23, 1441-1452.
- Basrai, M.A., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., And Hieter, A.P. (1999).** NORF5/HUG1 Is a Component of the MEC1-Mediated Checkpoint Response to DNA Damage and Replication Arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*. 19, 7041-7049
- Bayeva, M., Khechaduri, A., Puig, S., Chang, H.-C., Patial, S., Blackshear, P.J., and Ardehali, H. (2012).** mTOR Regulates Cellular Iron Homeostasis through Tristetraprolin. *Cell Metabolism* 16, 645–657.
- Berens, T.J., and Toczyski, D.P. (2012).** Colocalization of Mec1 and Mrc1 is sufficient for Rad53 phosphorylation in vivo. *Mol. Biol. Cell* 23, 1058–1067.

- Birgit Richter-Ruoff, W.D.H.W. (1992).** The proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase. *FEBS*. 2, 192-195
- Blaiseau, P.L. (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, 34221–34226.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2005).** The DNA damage response during DNA replication. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 568–575.
- Brown, N.C. (1968).** Non-Heme Iron as a cofactor in Ribonucleotide reductase From E.coli. *Biochemical and Biophysical research communications*. 30.
- Bystrom, L.M., Guzman, M., and Rivella, S. (2012).** Iron and ROS: Friends or Foes of Cancer? *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Casas, C., Aldea, M., Espinet, C., Gallego, C., Gil, R., and Herrero, E. (1997).** The AFT1 transcriptional factor is differentially required for expression of high-affinity iron uptake genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 13, 621-37.
- Chabes, A., Domkin, V., and Thelander, L. (1999).** Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* 274, 36679–36683.
- Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R., and Thelander, L. (2003).** Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* 112, 391–401.
- Chen, S.-H., Smolka, M.B., and Zhou, H. (2007).** Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 986–995.
- Chen, S.-H., Smolka, M.B., and Zhou, H. (2007).** Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 986–995.
- Ciais, D., Bohnsack, M.T., and Tollervey, D. (2008).** The mRNA encoding the yeast ARE-binding protein Cth2 is generated by a novel 3' processing pathway. *Nucleic Acids Research* 36, 3075–3084.
- Ciais, D., Cherradi, N., and Feige, J.J. (2012).** Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.*

- Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J.A., and Gasser, S.M. (2005).** Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes & Development* *19*, 3055–3069.
- Coller, J., and Parker, R. (2004).** Eukaryotic mRNA decapping. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 861–890.
- Cotruvo, J.A., Jr., and Stubbe, J. (2011).** Class I Ribonucleotide Reductases: Metallocofactor Assembly and Repair In Vitro and In Vivo. *Annu. Rev. Biochem.* *80*, 733–767.
- Courel, M., Lallet, S., Camadro, J.M., and Blaiseau, P.L. (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*, 6760–6771.
- Craven, R.J., and Petes, T.D. (2000).** Involvement of the Checkpoint Protein Mec1p in Silencing of Gene Expression at Telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 2378–2384.
- De Bruin, R.A.M., Kalashnikova, T.I., and Wittenberg, C. (2008).** Stb1 Collaborates with Other Regulators To Modulate the G1-Specific Transcriptional Circuit. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 6919–6928.
- De Oliveira, F.M.B., Harris, M.R., Brazauskas, P., de Bruin, R.A.M., and Smolka, M.B. (2012).** Linking DNA replication checkpoint to MBF cell-cycle transcription reveals a distinct class of G1/S genes. *Embo J.* *31*, 1798–1810.
- De Silva, M.D., Askwith, C.C., Eide, D., and Kaplan, J. (1995).** The FET3 Gene Product Required for High Affinity Iron Transport in yeast Is a Cell Surface Ferroxidase. *J Biol Chem.* *270*, 1098–1101.
- Dickson, R.C. (2008).** Thematic Review Series: Sphingolipids. New insights into sphingolipid metabolism and function in budding yeast. *The Journal of Lipid Research* *49*, 909–921.
- Dohmen, R.J., Madura, K., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1991).** The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *88*, 7351–7355.

- Domkin, V. (2002).** Yeast DNA Damage-inducible Rnr3 Has a Very Low Catalytic Activity Strongly Stimulated after the Formation of a Cross-talking Rnr1/Rnr3 Complex. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18574–18578.
- Dubacq, C.C., Chevalier, A.A., and Mann, C.C. (2004).** The protein kinase Snf1 is required for tolerance to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2560–2572.
- Eklund, H., Uhlin, U., Färnegårdh, M., Logan, D.T., and Nordlund, P. (2001).** Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77, 177–268.
- Elledge, S.J., and 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, 2783–2793.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1990).** Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes & Development* 4, 740–751.
- Fairman, J.W., Wijerathna, S.R., Ahmad, M.F., Xu, H., Nakano, R., Jha, S., Prendergast, J., Welin, R.M., Flodin, S., Roos, A., et al. (2011).** Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nat Struct Mol Biol* 18, 316–322.
- Felice, M.R. (2005).** Post-transcriptional Regulation of the Yeast High Affinity Iron Transport System. *Journal of Biological Chemistry* 280, 22181–22190.
- Froschauer, E.M., Schweyen, R.J., and Wiesenberger, G. (2009).** The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *BBA - Biomembranes* 1788, 1044–1050.
- Fu, Y. (2006).** Identification and characterization of CRT10 as a novel regulator of *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase genes. *Nucleic Acids Research* 34, 1876–1883.
- Fu, Y., Pastushok, L., and Xiao, W. (2008).** DNA damage-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 908–926.

- Furukawa, T., Naitoh, Y., Kohno, H., Tokunaga, R., and Taketani, S. (1992).** Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. *Life Sciences* 50, 2059–2065.
- Gasch, A.P.A., Huang, M.M., Metzner, S.S., Botstein, D.D., Elledge, S.J.S., and Brown, P.O.P. (2001).** Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. *Mol. Biol. Cell* 12, 2987–3003.
- Georgatsou, E., and Alexandraki, D. (1994).** Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 14, 3065–3073.
- Gietz, R.D. and R.A. Woods. (2002).** Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method. *Methods in Enzymology* 350, 87-96.
- Glover, T.W. (2006).** Common fragile sites. *Cancer Letters* 232, 4–12.
- Hammet, A., Pike, B.L., Mitchelhill, K.I., Teh, T., Kobe, B., House, C.M., Kemp, B.E., and Heierhorst, J. (2000).** FHA domain boundaries of the dun1p and rad53p cell cycle checkpoint kinases. *FEBS Letters* 471, 141–146.
- Harper., J.W and Elledge, S. (2007).** The DNA Damage Response: Ten Years After *Molecular Cell*. 28, 739-745.
- Hausmann, A., Samans, B., Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008).** Cellular and mitochondrial re- modeling upon defects in iron–sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 8318–8330.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Sadowsky, J., Escher, C., and Wolf, D.H. (1991).** Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. 1–8.
- Herrero, E., Ros, J., Belli, G., and Cabisco, E. (2008).** Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780, 1217–1235.
- Ho, Y., Costanzo, M., Moore, L., Kobayashi, R., and Andrews, B.J. (1999).** Regulation of transcription at the *Saccharomyces cerevisiae* start transition by Stb1, a Swi6-binding protein. *Molecular and Cellular Biology* 19, 5267–5278.

- Hochstrasser, M. (1997).** Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genetic.* *30*, 405-439.
- Hofer, A., Crona, M., Logan, D.T., and Sjöberg, B.M. (2012).** DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* *47*, 50–63.
- Horak, C.E. (2002).** Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development* *16*, 3017–3033.
- Huang, M., and Elledge, S.J. (1997).** Identification of RNR4, Encoding a Second Essential Small Subunit of Ribonucleotide Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*. *17*, 6105-6113.
- Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1998).** The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* *94*, 595–605.
- Ihrig, J., Hausmann, A., Hain, A., Richter, N., Hamza, I., Lill, R., and Muhlenhoff, U. (2010).** Iron Regulation through the Back Door: Iron-Dependent Metabolite Levels Contribute to Transcriptional Adaptation to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* *9*, 460–471.
- Iyer, V.R., Horak, C.E., Scafek, C.S., Botsteink, D., and Brown, M.S.P.O. (2001).** Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Letters to Nature*, 409.
- Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2002).** Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by Oxygen and Iron. *Journal of Molecular Biology* *318*, 251–260.
- Ju, D., Wang, X., Xu, H., and Xie, Y. (2008).** Genome-Wide Analysis Identifies MYND-Domain Protein Mub1 as an Essential Factor for Rpn4 Ubiquitylation. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 1404–1412
- Kaplan, C.D., and Kaplan, J. (2009).** Iron Acquisition and Transcriptional Regulation. *Chem. Rev.* *109*, 4536–4552.
- Kim, E., and Siede, W. (2011).** Phenotypes associated with *Saccharomyces cerevisiae* Hug1 protein, a putative negative regulator of dNTP Levels, reveal similarities and differences with sequence-related dif1. *J Microbiol.* *49*, 78–85.

- Kispal, G., Sipos, K., Lange, H., Fekete, Z., Bedekovics, T., Janáky, T., Bassler, J., Aguilar Netz, D.J., Balk, J., Rotte, C., et al. (2005).** Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. *Embo J.* 24, 589–598.
- Klinkenberg, L.G., Webb, T., and Zitomer, R.S. (2006).** Synergy among Differentially Regulated Repressors of the Ribonucleotide Diphosphate Reductase Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 5, 1007–1017.
- Kolberg, M., Strand, K.R., Graff, P., and Kristoffer Andersson, K. (2004).** Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1699, 1–34.
- Kolodner, R.D., Putnam, C.D., and Myung, K. (2002).** Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297, 552–557.
- Kumar, D., Viberg, J., Nilsson, A.K., and Chabes, A. (2010).** Highly mutagenic and severely imbalanced dNTP pools can escape detection by the S-phase checkpoint. *Nucleic Acids Research* 38, 3975–3983.
- Kwast, K.E., Burke, P. V., And Poyton R.O. (1998).** Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygenresponsive genes in yeast. *The Journal of Experimental Biology* 201, 1177–1195.
- La Torre-Ruiz, de, M.A., Green, C.M., and Lowndes, N.F. (1998).** RAD9 and RAD24 define two additive, interacting branches of the DNA damage checkpoint pathway in budding yeast normally required for Rad53 modification and activation. *Embo J.* 17, 2687–2698.
- La Torre-Ruiz, de M.A., and Lowndes, N.F (2000).** Dun1 defines one branch downstream of Rad53 for transcription and DNA damage repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 485, 205–206.
- Larsson, K.-M., Jordan, A., Eliasson, R., Reichard, P., Logan, D.T., and Nordlund, P. (2004).** Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1142–1149.
- Lee, H., Yuan, C., Hammet, A., Mahajan, A., Chen, E.S.W., Wu, M.R., Su, M.I., Heierhorst, J., and Tsai, M.D. (2008a).** Diphosphothreonine-Specific Interaction between an SQ/TQ Cluster and an FHA Domain in the Rad53-Dun1 Kinase Cascade. *Mol. Cell* 30, 767–778.

- Lee, S.-J., Schwartz, M.F., Duong, J.K., and Stern, D.F. (2003).** Rad53 phosphorylation site clusters are important for Rad53 regulation and signaling. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 6300–6314.
- Lee, Y.-J., Huang, X., Kropat, J., Henras, A., Merchant, S.S., Dickson, R.C., and Chanfreau, G.F. (2012).** Sphingolipid Signaling Mediates Iron Toxicity. *Cell Metabolism* *16*, 90–96.
- Lee, Y.D., and Elledge, S.J. (2006).** Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes & Development* *20*, 334–344.
- Lee, Y.D., Wang, J., Stubbe, J., and Elledge, S.J. (2008b).** Dif1 Is a DNA-Damage-Regulated Facilitator of Nuclear Import for Ribonucleotide Reductase. *Mol. Cell* *32*, 70–80.
- Lesuisse, E., Blaiseau, P.L., Dancis, A., and Camadro, J.M. (2001).** Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. *147*, 289-298.
- Li, B. (2001).** Ssn6-Tup1 Regulates RNR3 by Positioning Nucleosomes and Affecting the Chromatin Structure at the Upstream Repression Sequence. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 33788–33797.
- Li, L., Bagley, D., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2008).** Yap5 Is an Iron-Responsive Transcriptional Activator That Regulates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 1326–1337.
- Li, L., Miao, R., Bertram, S., Jia, X., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2012).** A Role for Iron-Sulfur Clusters in the Regulation of Transcription Factor Yap5-dependent High Iron Transcriptional Responses in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* *287*, 35709–35721.
- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2008).** Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* *77*, 669–700.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C., and Mühlenhoff, U. (2012).** The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *BBA - Molecular Cell Research* *1823*, 1491–1508.

- Lin, H., Li, L., Jia, X., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2011).** Genetic and Biochemical Analysis of High Iron Toxicity in Yeast: Iron toxicity is due to the accumulation of cytosolic iron and occurs under both aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Biological Chemistry* 286, 3851–3862.
- Liu, C. (2003).** Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes & Development* 17, 1130–1140.
- Lowdon and Vitols (1973).** Ribonucleotide Reductase Activity During the Cell Cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 158, 177-184
- Ma, J.L.J., Lee, S.J.S., Duong, J.K.J., and Stern, D.F.D. (2006).** Activation of the checkpoint kinase Rad53 by the phosphatidylinositol kinase-like kinase Mec1. *J. Biol. Chem.* 281, 3954–3963.
- Malavé, T.M., Dent, S.Y. (2006).** Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochem Cell Biol* 84, 437-43.
- Marquet, A., Bui, B.T., and Florentin, D (2001).** Biosynthesis of biotin and lipoic acid. *Vitam Horm* 61, 51-101.
- Martinez-Pastor, M., Vergara, S.V., Thiele, D.J., and Puig, S. (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* (in press).
- Mathews, C.K., and Wheeler, L.J., (2009).** Measuring DNA Precursor Pools in Mitochondria. *Methods Mol Biol.* 554, 371-81.
- Mazumder, A., Tummler, K., Bathe, M., and Samson, L.D. (2013).** Single-Cell Analysis of Ribonucleotide Reductase Transcriptional and Translational Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 33, 635–642.
- Miao, R., Holmes-Hampton, G.P., and Lindahl, P.A. (2011).** Biophysical investigation of the iron in Aft1-1(up) and Gal-YAH1 *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 50, 2660–2671.
- Muckenthaler, M.U., Galy, B., and Hentze, M.W (2008).** Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr.* 28, 197-213.

- Muhlenhoff, U. (2003).** A Specific Role of the Yeast Mitochondrial Carriers Mrs3/4p in Mitochondrial Iron Acquisition under Iron-limiting Conditions. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 40612–40620.
- Mühlenhoff, U., Molik, S., Godoy, J.R., Uzarska, M.A., Richter, N., Seubert, A., Zhang, Y., Stubbe, J., Pierrel, F., Herrero, E., et al. (2010).** Cytosolic Monothiol Glutaredoxins Function in Intracellular Iron Sensing and Trafficking via Their Bound Iron-Sulfur Cluster. *Cell Metabolism* *12*, 373–385.
- Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R.D. (2001).** Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *104*, 397–408.
- Nguyen, H.-H.T., Ge, J., Perlstein, D.L., and Stubbe, J. (1999).** Purification of ribonucleotide reductase subunits Y1, Y2, Y3, and Y4 from yeast: Y4 plays a key role in iron cluster assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *96*, 12339–12344.
- Nick McElhinny, S.A., Watts, B.E., Kumar, D., Watt, D.L., Lundstrom, E.B., Burgers, P.M.J., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2010).** Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 4949–4954.
- Nordlund, P., and Reichard, P. (2006).** Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 681–706.
- Parr, C.L., Keates, R.A.B., Bryksa, B.C., Ogawa, M., and Yada, R.Y. (2007).** The structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* *24*, 467–480.
- Pedro-Segura, E., Vergara, S.V., Rodriguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D.J., and Puig, S. (2008).** The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase SDH4 mRNA in response to iron deficiency. *J. Biol. Chem.* *283*, 28527–28535.
- Philpott, C.C., and Protchenko, O. (2008).** Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* *7*, 20–27.
- Philpott, C.C., Leidgens, S., and Frey, A.G. (2012).** Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *BBA. Biochem. Biophys Acta*.

- Pike, B.L. (2003).** Diverse but Overlapping Functions of the Two Forkhead-associated (FHA) Domains in Rad53 Checkpoint Kinase Activation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 30421–30424.
- Protchenko, O and Philpott, CC. (2003).** Regulation of intracellular heme levels by *HMX1*, a homologue of heme oxygenase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* . 278, 36582-36587.
- Prouteau, M., Daugeron, M.-C., and Séraphin, B. (2008).** Regulation of ARE transcript 3' end processing by the yeast Cth2 mRNA decay factor. *Embo J.* 27, 2966–2976.
- Puig, S., Askeland, E., and Thiele, D.J. (2005).** Coordinated Remodeling of Cellular Metabolism during Iron Deficiency through Targeted mRNA Degradation. *Cell* 120, 99–110.
- Puig, S., Vergara, S.V., and Thiele, D.J. (2008).** Cooperation of Two mRNA-Binding Proteins Drives Metabolic Adaptation to Iron Deficiency. *Cell Metabolism* 7, 555–564.
- Pujol-Carrion, N., Belli, G., Herrero, E., Nogues, A., and de la Torre-Ruiz MA. (2006).** Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 119, 4554-64.
- Raguzzi, F., Lesuisse. E., and Crichton, R.R (1988).** Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 231, 253-258.
- Ralf, W., Siede, W., and Brendel, M (1996).** Regulation of SNM1, an inducible *Saccharomyces cerevisiae* gene required for repair of DNA cross-links. *Mol Genetics.* 256, 162-168.
- Rofougaran, R., Vodnala, M., and Hofer, A. (2006).** Enzymatically active mammalian ribonucleotide reductase exists primarily as an alpha6beta2 octamer. *J. Biol. Chem.* 281, 27705–27711.
- Rouault,T.A. (2006).** The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat Chem Biol.* 2, 406-414.
- Rutherford, J.C., and Bird, A.J. (2004).** Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic Cell* 3, 1–13.

- Rutherford, J.C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P.O., and Winge, D.R. (2001).** A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14322–14327.
- Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones Wj., Liu, Q., Wang, B., and Elledge Sj. (1996).** Regulation of Rad53 by the Atm-Like Kinases Mec1 and Tel1 in Yeast Cell Cycle Checkpoint Pathways. *Science* 19, 357-360.
- Sanvisens, N., de Llanos, R., and Puig, S. (2013).** Function and regulation of yeast ribonucleotide reductase: cell cycle, genotoxic stress and iron availability. *Biomedical Journal*, in press.
- Sanvisens, N., and Puig, S. (2011).** Causes and consequences of nutritional iron deficiency in living organisms. In *Biology of starvation in humans and other organisms*. Edited by Merkin TC: Nova Science Publishers, 245-276. ISBN: 978-1-61122-546-4.
- Schneider, B.L., Seufert, W., Steiner, B., Yang, Q.H., and Futcher, A.B. (1995).** Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1265-74.
- Schwartz, M.F., Lee, S.J., Duong, J.K., Eminaga, S., and Stern, D.F. (2003).** FHA domain-mediated DNA checkpoint regulation of Rad53. *Cc* 2, 384–396.
- SenGupta, DJ., Zhang, B., Kraemerm, B., Pochart, P., Fields, S., i Wickens, M. (1996).** A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 93, 8496-8501.
- Severance, S., Chakraborty, S., and Kosman, D.J. (2004).** The Ftr1p iron permease in the yeast plasma membrane: orientation, topology and structure-function relationships. *Biochem. J.* 380, 487–496.
- Shakoury-Elizeh, M., Protchenko, O., Berger, A., Cox, J., Gable, K., Dunn, T.M., Prinz, W.A., Bard, M., and Philpott, C.C. (2010).** Metabolic response to iron deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 14823–14833.
- Shakoury-Elizeh, M., Tiedeman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P.O., Botstein, D., and Philpott, C.C. (2004).** Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell* 15, 1233–1243.

- Sharma, V.M., Li, B., and Reese, J.C. (2003).** SWI/SNF-dependent chromatin remodeling of RNR3 requires TAF(II)s and the general transcription machinery. *Genes & Development* *17*, 502–515.
- Singh, A., Kaur, N., and Kosman, D.J (2007).** The metalloredutase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J Biol Chem.* *282*, 28619-28626.
- Sun, Z., Fay, D.S., Marini, F., Foiani, M., and Stern, D.F. (1996).** Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes & Development* *10*, 395–406.
- Sweeney, F.D., Yang, F., Chi, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Durocher, D. (2005).** *Saccharomyces cerevisiae* Rad9 Acts as a Mec1 Adaptor to Allow Rad53 Activation. *Current Biology* *15*, 1364–1375.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000).** A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* *404*, 42–49.
- Thompson, M.J., Lai, W.S., Taylor, G.A., and Blackshear, P.J. (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*, 225–233.
- Travesa, A., Duch, A., and Quintana, D.G. (2008).** Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53. *J. Biol. Chem.* *283*, 17123–17130.
- Tsaponina, O., Barsoum, E., Åström, S.U., and Chabes, A. (2011).** Ixr1 Is Required for the Expression of the Ribonucleotide Reductase Rnr1 and Maintenance of dNTP Pools. *PLoS Genet* *7*
- Uchiki, T. (2004).** Identification of Phosphorylation Sites on the Yeast Ribonucleotide Reductase Inhibitor Sml1. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 11293–11303.
- Ueta, R. (2003).** Pse1p Mediates the Nuclear Import of the Iron-responsive Transcription Factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 50120–50127.

- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., and Yamaguchi-Iwai, Y. (2007).** Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 2980–2990.
- Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., and Yamaguchi-Iwai, Y. (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*, 4998–5008.
- Urbanowski, J.L., Piper, R.C (1999).** The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem* *274*, 38061–38070.
- Vergara, S.V., Puig, S., and Thiele, D.J. (2011).** Early Recruitment of AU-Rich Element-Containing mRNAs Determines Their Cytosolic Fate during Iron Deficiency. *Molecular and Cellular Biology* *31*, 417–429.
- Wang, L. (2004).** Rpn4 Is a Physiological Substrate of the Ubr2 Ubiquitin Ligase. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 55218–55223.
- Wang, P.J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X.C., Thelander, L., and Huffaker, T.C. (1997).** Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Molecular and Cellular Biology* *17*, 6114–6121.
- Weider, M. (2006).** Vhr1p, a New Transcription Factor from Budding Yeast, Regulates Biotin-dependent Expression of VHT1 and BIO5. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 13513–13524.
- Wolff, A.M., Din, N., and Petersen, J.G. (1996).** Vacuolar and extracellular maturation of *Saccharomyces cerevisiae* proteinase A. *Yeast* *12*, 823–832.
- Wu, X., and Huang, M. (2008a).** Dif1 Controls Subcellular Localization of Ribonucleotide Reductase by Mediating Nuclear Import of the R2 Subunit. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 7156–7167.
- Xue, L., Zhou, B., Liu, X., Qiu, W., Jin, Z., and Yen, Y. (2003).** Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein-protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits. *Cancer Res.* *63*, 980–986.
- Y, Z., and W, X. (2001).** Two alternative cell cycle checkpoint pathways differentially control DNA damage-dependent induction of MAG1 and DD11 expression in yeast. *Mol Genet Genomics* *266*, 436–444.

- Yamaguchi-Iwai, Y. (2002).** Subcellular Localization of Aft1 Transcription Factor Responds to Iron Status in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 18914–18918.
- Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D.L., Stubbe, J., and Huang, M. (2003a).** Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 100, 6628–6633.
- Yarunin, A., Panse, V.G., Petfalski, E., Dez, C., Tollervey, D., and Hurt, E. (2005).** Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron–sulfur proteins. *Embo J.* 24, 580–588.
- Yu, Y., Kovacevic, Z., and Richardson, D.R. (2007).** Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cc* 6, 1982–1994.
- Zhang, L., and Hach, A. (1999).** Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 415–426.
- Zhang, H., and Reese, J.C. (2007).** Exposing the core promoter is sufficient to activate transcription and alter coactivator requirement at RNR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 104, 8833–8838.
- Zhang, H., Kruk, J.A., and Reese, J.C. (2008).** Dissection of coactivator requirement at RNR3 reveals unexpected contributions from TFIID and SAGA. *J. Biol. Chem.* 283, 27360–27368.
- Zhang, Y.Y., Liu, L.L., Wu, X.X., An, X.X., Stubbe, J.J., and Huang, M.M. (2011).** Investigation of in vivo diferric tyrosyl radical formation in *Saccharomyces cerevisiae* Rnr2 protein: requirement of Rnr4 and contribution of Grx3/4 AND Dre2 proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 41499–41509.
- Zhang, Z., An, X., Yang, K., Perlstein, D.L., Hicks, L., Kelleher, N., Stubbe, J., and Huang, M. (2006).** Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 103, 1422–1427.
- Zhang, Z., and Reese, J.C. (2005).** Molecular Genetic Analysis of the Yeast Repressor Rfx1/Crt1 Reveals a Novel Two-Step Regulatory Mechanism. *Molecular and Cellular Biology* 25, 7399–7411.

- Zhang, Z., Yang, K., Chen, C.-C., Feser, J., and Huang, M. (2007).** Role of the C terminus of the ribonucleotide reductase large subunit in enzyme regeneration and its inhibition by Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *104*, 2217–2222.
- Zhao, X., and Rothstein, R. (2002).** The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *99*, 3746–3751.
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R. (2001).** The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *Embo J.* *20*, 3544–3553.
- Zhao, X., Georgieva, B., Chabes, A., Domkin, V., Ippel, J.H., Schleucher, J., Wijmenga, S., Thelander, L., and Rothstein, R. (2000).** Mutational and structural analyses of the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 define its Rnr1 interaction domain whose inactivation allows suppression of mec1 and rad53 lethality. *Molecular and Cellular Biology* *20*, 9076–9083.
- Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998).** A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell* *2*, 329–340.
- Zhou, Z.Z., and Elledge, S.J.S. (1993).** DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell* *75*, 1119–1127.