

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**Estudio de la regulación de la homeostasis  
de hierro por la ruta del control general de  
aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae***

Trabajo Final de Grado en Biotecnología

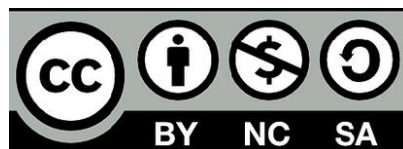
**Autora: Helena Benlloch Ripoll**

**Tutor: Prof. Ramón Serrano Salom**

**Cotutor: Dr. Marcos Caballero Molada**

Curso Académico 2015/2016

Valencia, julio de 2016



**Título:** Estudio de la regulación de la homeostasis de hierro por la ruta del control general de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*

**Autora:** Helena Benlloch Ripoll

**Tutor:** Prof. Ramón Serrano Salom

**Cotutor:** Dr. Marcos Caballero Molada

Valencia, julio 2016

## Resumen

Los aminoácidos son uno de los nutrientes más importantes para las células, lo que ha supuesto que estas hayan desarrollado complejos mecanismos para regular su homeostasis, siendo los más importantes en levadura la ruta TOR y la ruta GAAC. El hierro también es un nutriente esencial, ya que forma parte de multitud de enzimas cuya actividad es dependiente de este metal, entre ellas algunas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos. Por ello parece lógico que la regulación del metabolismo de aminoácidos y la del hierro guarden relación. Trabajos previos en el laboratorio demostraron que la ruta GAAC, cuyo elemento central es la quinasa Gcn2, controla la expresión del regulón de hierro modulando la localización subcelular del factor de transcripción Aft1.

El objetivo de este trabajo es profundizar en el estudio de la relación entre la ruta GAAC y la regulación de la homeostasis del hierro y comprobar si dicha relación está asociada a una modulación de la síntesis de complejos Fe/S. Para ello se estudió la localización subcelular del factor de transcripción Aft1 unido a GFP y se vio que el tratamiento con aminoácidos provoca su localización citoplasmática. Por otro lado, el análisis de la velocidad de toma de hierro en el mutante de pérdida de función de *GCN2* y en el mutante con el alelo de *GCN2* constitutivamente activo indicó que las diferencias a nivel de expresión de los transportadores de hierro, observadas anteriormente en el laboratorio, tienen influencia a nivel de proteína. Con el objetivo de comprobar si la regulación de la ruta GAAC sobre Aft1 se produce a través de una modulación de la síntesis de los complejos Fe/S, se realizó un ensayo de la actividad aconitasa en células tratadas con aminoácidos, el cual mostró un aumento de la actividad de esta enzima, lo que explica que la localización de Aft1 en las células tratadas sea mayoritariamente citosólica y por tanto, que el regulón de hierro esté reprimido. Por otro lado, el descenso de la actividad aconitasa en el mutante  $\Delta gcn2$  no correspondió con lo esperado, lo que cuestiona la hipótesis de que la regulación del regulón de Aft1 por la ruta GAAC se produzca a través de una modulación de la síntesis de los complejos Fe/S. Por último, se llevó a cabo el análisis de la expresión del regulón de hierro en los mutantes  $\Delta aft1$  y *GCN2<sup>c</sup>* bajo tratamiento con aminoácidos. Los resultados obtenidos indican, por un lado, que los aminoácidos regulan esta expresión principalmente a través de Aft1, y en segundo lugar, que probablemente existan otras rutas, además de GAAC, que regulan la homeostasis de hierro en respuesta a aminoácidos.

Estos estudios realizados en levadura sirven como modelo para organismos eucariotas más complejos, donde los mecanismos que regulan la homeostasis de aminoácidos y de hierro están conservados.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, homeostasis de aminoácidos, homeostasis de hierro, Gcn2, Aft1.

**Title:** Study of iron homeostasis regulation by the general amino acid control pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

**Author:** Helena Benlloch Ripoll

**Tutor:** Prof. Ramón Serrano Salom

**Cotutor:** Dr. Marcos Caballero Molada

Valencia, July 2016

## Abstract

As amino acids are one of the most important nutrients for cells, these have evolved complex mechanisms to regulate their homeostasis. In yeast and higher eukaryotes these mechanisms include the TOR and GAAC pathways. Iron is also an essential nutrient, since it is part of several iron-dependent enzymes, some of them involved in amino acid biosynthesis. Therefore it can be expected that the regulation of both, amino acid and iron metabolism, is somehow related. Previous studies in our laboratory demonstrated that the GAAC pathway, whose central element is the kinase Gcn2, controls the expression of the iron regulon modulating the subcellular localization of Aft1 transcription factor.

The objective of this project is to study more in depth the relation between the GAAC pathway and the iron homeostasis regulation and to ascertain if this relation is associated with a modulation of Fe/S cluster synthesis. The subcellular localization of an Aft1-GFP fusion protein revealed that an amino acid treatment triggers its cytoplasmic localization. Secondly, the iron uptake rate analysis in a *GCN2* loss-of-function mutant and in a mutant containing a constitutively active allele of *GCN2* indicated that differences in the expression of iron transporters genes, which were previously determined in our laboratory, correlate with differences at the protein level. With the aim to find out if the GAAC pathway-mediated regulation of Aft1 is due to a modulation of Fe/S cluster synthesis, we performed an aconitase activity assay with amino acid treated cells, which showed an increase in their enzyme activity. This can explain the cytoplasmic localization of Aft1 in amino acid treated cells and the repression of the iron regulon. Unexpectedly, aconitase activity decreased in  $\Delta gcn2$  mutant cells, which argues against Fe/S clusters serving as signal in the GAAC pathway-mediated regulation of Aft1. Finally, we analyzed the effect of an amino acid treatment on iron regulon expression in both  $\Delta aft1$  and *GCN2*<sup>c</sup> mutant cells. The results indicate that amino acids regulate the iron regulon expression mainly through Aft1. Furthermore, these findings suggest that probably other pathways, in addition to GAAC, regulate iron homeostasis in response to amino acids.

These studies in yeast can be used as a model for more complex eukaryotic organisms, where mechanisms that regulate amino acid and iron homeostasis are highly conserved.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, amino acid homeostasis, iron homeostasis, Gcn2, Aft1.

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ramón y Mariche la oportunidad que me han dado de formar parte de su laboratorio y el cariño con el que me han tratado. De su laboratorio me llevo no solo todo lo aprendido a nivel académico, sino también el haber conocido a todos los miembros que forman parte de esta pequeña familia.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a Marcos por todo lo que se ha esforzado en que aprendiese y me valiese por mí misma. Agradecerle que se haya comportado, más que como un tutor, como un amigo. Por ello y por todos los momentos compartidos en estos meses, gracias.

Por último, quisiera agradecer a mis amigos y, sobre todo a mi familia, el haberme apoyado durante todo este tiempo. Gracias por conseguir animarme en los malos momentos y por estar ahí para celebrar y compartir los buenos.

## Tabla de contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Homeostasis de aminoácidos en <i>S. cerevisiae</i>	1
1.1.1. La ruta GAAC ( <i>General Amino Acid Control</i> )	1
1.2. Homeostasis de hierro en <i>S. cerevisiae</i>	5
1.2.1. Transporte de hierro de alta afinidad	8
1.2.2. Movilización del hierro intracelular	9
1.2.3. Respuestas metabólicas a los niveles de hierro	10
1.2.4. Metabolismo de aminoácidos cuando existe deficiencia de hierro	11
1.3. La levadura como sistema modelo	11
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> , plásmidos y medios de cultivo	15
4.2. Estudio de la localización subcelular de Aft1-GFP	16
4.3. Análisis de la velocidad de toma de hierro	16
4.4. Ensayo de la actividad aconitasa	16
4.5. Purificación y manipulación de ácidos nucleicos	17
4.6. Análisis estadísticos	19
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
5.1. Estudio de la localización subcelular de Aft1	20
5.2. Análisis de la velocidad de la toma de hierro	22
5.3. Ensayo de la actividad aconitasa	24
5.4. Estudio de la expresión relativa de los genes del regulón de hierro en los mutantes $\Delta aft1$ y GCN2 <sup>c</sup>	25
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>30</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>31</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>37</b>
Anexo I	37
Anexo II	38
Anexo III	39

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la ruta GAAC en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	2
Figura 2. Representación simplificada de la ruta de iniciación de la traducción en eucariotas ...	3
Figura 3. Dominios funcionales de Gcn2.....	4
Figura 4. El papel de los complejos Fe/S en la regulación de los factores de transcripción de respuesta a hierro en <i>S. cerevisiae</i> .....	7
Figura 5. Respuesta a ayuno de hierro en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
Figura 6. El tratamiento con aminoácidos provoca la localización citoplasmática de Aft1 .....	21
Figura 7. Porcentaje de Aft1-GFP en el núcleo de las células de la cepa silvestre (WT), $\Delta$ gcn2, GCN2c, y la cepa silvestre bajo tratamiento con aminoácidos (WT+AA). .....	22
Figura 8. Análisis de toma de hierro en la cepa silvestre.....	23
Figura 9. Análisis de la toma de hierro en los mutantes de la quinasa Gcn2 y en el tratamiento con aminoácidos .....	23
Figura 10. Análisis de la actividad de la aconitasa en los mutantes de la quinasa Gcn2 y en el tratamiento con aminoácidos.....	25
Figura 11. Expresión relativa de los genes del regulón de hierro en los mutantes $\Delta$ aft1 y GCN2 <sup>c</sup> .....	26
Figura 12. Modelo propuesto para la regulación de la homeostasis del hierro en respuesta a aminoácidos. ....	29
Figura A.1. Los aminoácidos provocan la represión del regulón de Aft1.....	38
Figura A.2. La ruta GAAC regula la expresión de los genes involucrados en la homeostasis de hierro.....	38

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizados en este trabajo. ....	15
Tabla 2. Plásmido utilizado en este trabajo. ....	15
Tabla A.1. Cebadores utilizados para las reacciones de qRT-PCR.....	37
Tabla A.2. Composición aminoacídica de la peptona de caseína ácida (Laboratorios Conda) ..	39

## **Siglas y abreviaturas**

**Abs<sub>660</sub>**: Absorbancia a 660 nm

**Aco1**: *Aconitase 1*

**BPS**: Batofenantrolina Disulfonato

**bZIP**: *Basic Leucine-Zipper*

**CIA**: *Cytosolic Iron-Sulphur protein Assembly machinery*

**CTD**: *C-Terminal Domain*

**C-Terminal**: Carboxi-terminal

**DNA**: *Deoxyribonucleic Acid*

**EDTA**: Ácido Etilendiaminotetraacético

**eIF1**: *eukaryotic Initiation Factor 1*

**eIF2**: *eukaryotic Initiation Factor 2*

**eIF3**: *eukaryotic Initiation Factor 3*

**eIF5**: *eukaryotic Initiation Factor 5*

**FeRe**: *Fe deficiency-Responsive Element*

**GAAC**: *General Amino Acid Control*

**GCN**: *General Control Noninducible or Nonderepressible*

**Gcn2**: *General Control Nonderepressible-2*

**GDP**: *Guanosine Diphosphate*

**GEF**: *Guanine nucleotide Exchange Factor*

**GFP**: *Green Fluorescent Protein*

**Grx**: *Glutarredoxin*

**Grx3/4**: Complejo formado por glutarredoxinas 3 y 4

**GTP**: *Guanosine Triphosphate*

**GTPasa**: *Guanosine Triphosphatase*

**HisRS**: *Histidyl-tRNA Synthetase*

**ISC**: *mitochondrial Iron-Sulphur Cluster*

**MES:** ácido 2-morfolinoetanosulfónico

**mRNA:** *messenger Ribonucleic Acid*

**N-Terminal:** Amino-terminal

**PABP:** *Poly(A)-binding protein*

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*

**PK:** Dominio quinasa de Gcn2

**qRT-PCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**REI:** *Reinitiation*

**rpm:** revoluciones por minuto

**rRNA:** *ribosomal Ribonucleic Acid*

**SD:** *Sythetic Dextrose*

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**TC:** *Ternary Complex*

**TCA:** *Tricarboxylic Acid cycle*

**TOR:** *Target Of Rapamicin*

**tRNA:** *transfer Ribonucleic Acid*

**uORF:** *upstream Open Reading Frame*

**UTR:** *Untranslated Region*

**YNB:** *Yeast Nitrogen Base*

**YPD:** *Yeast extract Peptone Dextrose*



# 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Homeostasis de aminoácidos en *S. cerevisiae*

El crecimiento y la proliferación de las células de organismos eucariotas están determinados por señales externas, como son la disponibilidad de nutrientes y la existencia de condiciones de estrés. Estos organismos han desarrollado elaborados mecanismos que les permiten ajustar su metabolismo en respuesta a las variaciones en la disponibilidad de nutrientes en el medio (Chen *et al.*, 2014). Los microorganismos como *S. cerevisiae* interaccionan directamente con los componentes del medio extracelular, los cuales pueden hacer de señal y nutriente al mismo tiempo. Así, las células estimulan su crecimiento y proliferación cuando existen condiciones favorables, es decir, cuando tienen disponibilidad de nutrientes y hay ausencia de estrés. Por el contrario, cuando las condiciones no son óptimas para que tenga lugar el desarrollo de las células, uno de los mecanismos que adoptan es la inhibición de la síntesis de proteínas, priorizando así su supervivencia frente al crecimiento.

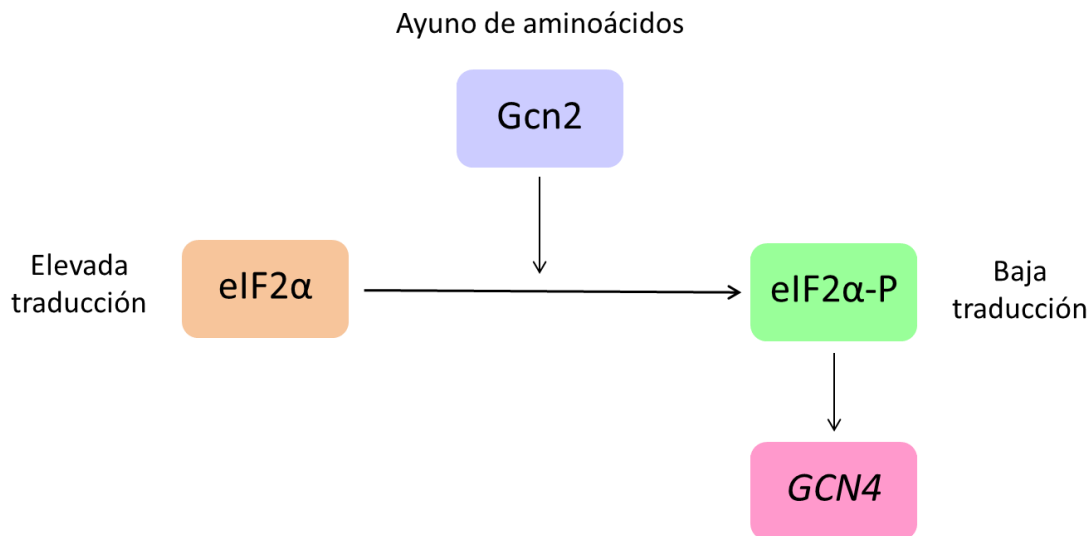
Uno de los nutrientes más importantes de los que depende el crecimiento de las células son los aminoácidos. Estas moléculas orgánicas son de gran importancia biológica, pues son las unidades estructurales de las proteínas y participan como intermediarios en el metabolismo. Estas moléculas se caracterizan por tener un grupo amino ( $-NH_2$ ), un grupo carboxílico ( $-COOH$ ) y una cadena lateral específica. Puesto que la adquisición y conservación de estas moléculas resultan esenciales para un adecuado funcionamiento de las células, los organismos eucariotas han desarrollado complejos mecanismos para regular su homeostasis, siendo los más importantes en levadura la ruta TOR, que controla el crecimiento en respuesta a nutrientes, y la ruta GAAC, que es el objeto de estudio en este trabajo.

#### 1.1.1. La ruta GAAC (*General Amino Acid Control*)

La ruta GAAC (*General Amino Acid Control*) es crucial para la percepción y adaptación a la disponibilidad de los nutrientes (Tarumoto *et al.*, 2013) (Figura 1), y se encuentra conservada desde levadura hasta mamíferos (Sood *et al.*, 2000). Esta ruta coordina la tasa de iniciación de la traducción de mRNAs con la disponibilidad de aminoácidos, proporcionando así un mecanismo de respuesta rápido a cambios en las condiciones fisiológicas de las células (Hinnebusch, 2005; Jiang *et al.*, 2006). El elemento central de dicha ruta es Gcn2 (*General Control Nonderepressible-2*), una proteína quinasa que se activa con el ayuno de aminoácidos. Al activarse, Gcn2 fosforila la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción eucariótico eIF2, dando lugar a dos cambios importantes en la célula. Por un lado, provoca una alteración en la pauta de traducción que resulta en la estimulación selectiva de la traducción de determinados mRNAs específicos que, entre otras cosas, favorecen la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos. Por otro lado, la activación de Gcn2 inhibe de manera general la tasa de iniciación de la traducción (Tarumoto *et al.*, 2013). Esta doble respuesta permite a las células que se encuentran en ambientes con escasez de nutrientes limitar el consumo de aminoácidos a la vez que se redirigen los recursos para aumentar su biosíntesis. La única quinasa que se conoce en levadura capaz de fosforilar la subunidad  $\alpha$  de eIF2 es Gcn2.

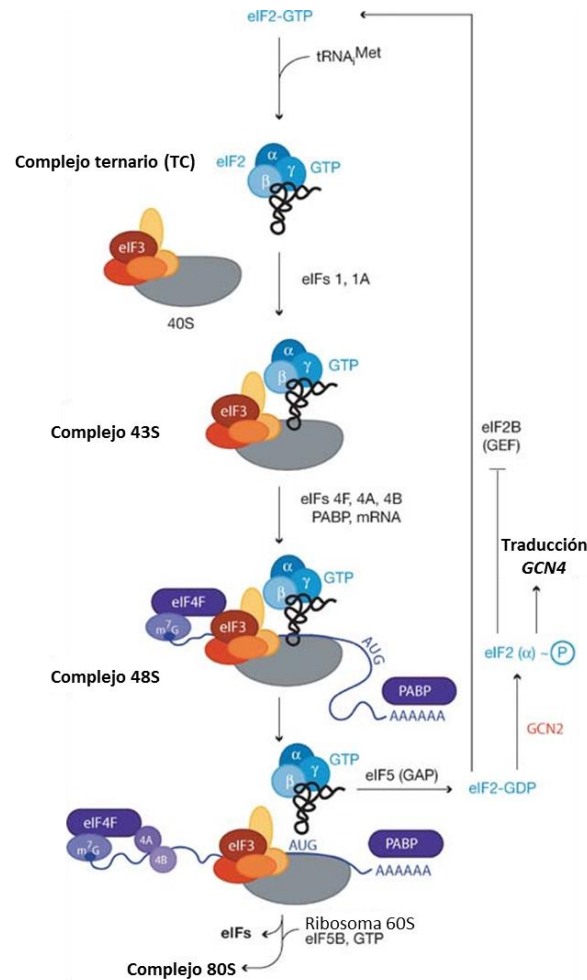
La inhibición de la síntesis general de proteínas ocurre debido a que la fosforilación de eIF2 en su subunidad  $\alpha$  inhibe la formación de los complejos ternarios activos (TC, *Ternary Complex*),

que consisten en eIF2 unido a GTP y metionil-tRNA. Esto supone un descenso de la eficacia del inicio del proceso de la traducción (Hinnebusch, 2005; Holcik y Sonenberg, 2005), dando lugar así a la inhibición de la síntesis proteica.



**Figura 1. Esquema de la ruta GAAC en *Saccharomyces cerevisiae*.** La quinasa Gcn2 se activa por el ayuno de aminoácidos. En su forma desfosforilada, eIF2 mantiene de manera eficiente la traducción general de proteínas. Sin embargo, una vez fosforilado en su subunidad  $\alpha$  debido a la acción de Gcn2 activa, eIF2 $\alpha$ -P causa una inhibición general de la traducción. Paradójicamente, la traducción de *GCN4* aumenta con la fosforilación de eIF2 $\alpha$  e induce genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos.

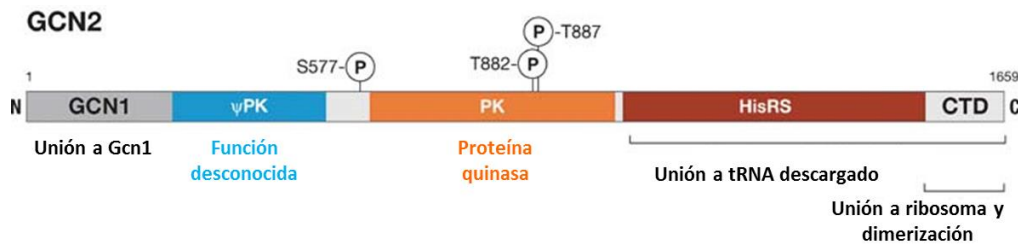
Con el objetivo de comprender el mecanismo por el cual Gcn2 induce la inhibición de la síntesis de proteínas, se describe a continuación el proceso de iniciación de la traducción de mRNAs en células eucariotas (Hinnebusch, 2005) (Figura 2). La reacción comienza con la unión de un complejo ternario a la subunidad 40S del ribosoma para formar el complejo de iniciación 43S. El complejo 43S formado se une al mRNA por la caperuza en el extremo 5', formando así el complejo 48S, que recorre la región 5' no traducida (5' UTR, *Untranslated Region*) del mRNA en busca de un codón AUG. Esta búsqueda se efectúa en función de la complementariedad de bases existente entre el anticodón del Met-tRNA<sup>Met</sup> y el codón AUG. Una vez el complejo encuentra dicho codón, el GTP unido al complejo se hidroliza a GDP, liberándose así eIF2-GDP, y la subunidad ribosomal 60S se une para formar el complejo de iniciación 80S responsable de la síntesis de proteínas. El eIF2-GDP liberado en la reacción debe ser reciclado a eIF2-GTP por el GEF (factor intercambiador de guaninas) eIF2B para que pueda volver a formar el complejo ternario del inicio del proceso de traducción. Esta reacción es inhibida por la quinasa Gcn2 en levadura, que fosforila la Ser-51 de la subunidad  $\alpha$  del eIF2. Puesto que eIF2 $\alpha$ -P es un inhibidor competitivo de eIF2B, la fosforilación de únicamente una fracción de eIF2 puede reducir sustancialmente la síntesis de proteínas. Como se describe posteriormente, el descenso de la formación de complejos ternarios debido a la fosforilación de eIF2 paradójicamente estimula la traducción del mRNA de *GCN4* mientras que disminuye la tasa general de la iniciación de la traducción.



**Figura 2. Representación simplificada de la ruta de iniciación de la traducción en eucariotas.** Los factores eIF1 y eIF1A promueven la unión del complejo ternario (eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup>) y eIF3 para formar el complejo de preiniciación 43S. El mRNA se une a este complejo (gracias a la acción de los factores eIF4 y la proteína de unión poli(A) PABP) formándose así el complejo 48S, el cual escanea el mRNA en busca del codón de inicio AUG. Una vez reconocido el codón AUG, eIF5 se une y estimula la hidrólisis del GTP de eIF2, lo que desencadena en la liberación del factor eIF2-GDP y la unión de la subunidad ribosomal 60S (estimado por una segunda GTPasa eIF5B), lo que resulta en la formación del complejo de iniciación 80S. El reciclado de eIF2-GDP a eIF2-GTP es catalizado por el GEF eIF2B. Esta reacción se inhibe por la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  de eIF2 mediada por Gcn2. Adaptado de Hinnebusch (2005).

La falta de un determinado aminoácido puede provocar la deacilación de tRNAs no cognados (específicos de otros aminoácidos), además de los tRNA cognados; y diferentes tipos de tRNAs descargados pueden activar Gcn2 (Zaborske *et al.*, 2009). Gcn2 se une preferentemente a tRNAs deacilados (descargados) a través de dos de sus dominios: un dominio homólogo a la histidil-tRNA sintetasa (HisRS) y un segmento rico en lisinas del dominio C-terminal (CTD, *C-Terminal Domain*) (Wek *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2000) (Figura 3). Así pues, cuando existen niveles basales de tRNAs, estos dominios interaccionan parcialmente con otro dominio de Gcn2, el dominio quinasa (PK) (Qiu *et al.*, 1998), evitando así que pueda activarse dicha proteína. Sin embargo, bajo ayuno de aminoácidos, los tRNAs descargados se unen al dominio HisRS induciendo un cambio conformacional de Gcn2 (Tarumoto *et al.*, 2013) que supone la eliminación las asociaciones inhibitorias, permitiendo así la activación de Gcn2 (Dong *et al.*,

2000). Asimismo, para completar su activación, Gcn2 precisa de la formación de un dímero y de su autofosforilación (Qiu *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 1998; Narasimhan *et al.*, 2004), para lo que resulta fundamental el dominio CTD (Qiu *et al.*, 2001). Este dominio también es requerido para la asociación de Gcn2 con los ribosomas ya que puede interactuar con segmentos de doble cadena de los rRNA (Ramirez *et al.*, 1991).



**Figura 3. Dominios funcionales de Gcn2.** En esta figura se muestran los dominios funcionales y los sitios de fosforilación a los que pertenecen los 1659 aminoácidos de Gcn2. Desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal se observan: el dominio de unión de Gcn1, el dominio pseudoquinasa ( $\psi$ PK) de función desconocida, el dominio quinasa (PK), el dominio de homología con la histidil tRNA sintetasa (HisRS) y el dominio C-terminal (CTD). Los sitios de fosforilación se indican con la letra P, y estos son la Ser577 y los sitios de autofosforilación en las Thr882 y Thr887. Adaptado de Hinnebusch (2005).

Además de la unión a tRNAs descargados, modificaciones post-traduccionales y otros factores reguladores modulan la actividad de Gcn2 (García-Barrio *et al.*, 2002), (Sattlegger *et al.*, 2004; Sattlegger y Hinnebusch, 2005).

Como ya se ha comentado, la falta de aminoácidos en levadura no sólo reduce de forma general la iniciación de la traducción, sino que además eleva la traducción del factor de transcripción Gcn4 (Hao *et al.*, 2005), lo que induce la expresión de numerosos genes requeridos para la síntesis y toma de los 20 aminoácidos (Wek *et al.*, 1995), mientras que los contenidos celulares no esenciales son reciclados mediante la autofagia (Chen *et al.*, 2014), aumentando así el conjunto interno de aminoácidos. Gcn4 es un activador transcripcional de la familia bZIP (*Basic Leucine-Zipper*) (Ellenberguer *et al.*, 1992) y su influencia sobre la expresión génica puede ser directa o indirecta, ya que Gcn4 también regula la expresión de numerosos factores de transcripción. El mecanismo por el cual la traducción de *GCN4* es regulada recibe el nombre de reiniciación (REI, *Reinitiation*) (Gunisova y Valasek, 2014). Éste se caracteriza por la habilidad que presentan algunas pequeñas pauta de lectura abierta situadas aguas arriba del codón de iniciación del mensajero (uORFs) de retener las subunidades ribosomales 40S en la misma molécula de mRNA incluso después de haber sido traducidas y de que la subunidad 60S haya sido reciclada (Valasek, 2012). Dichas subunidades 40S son entonces capaces de reactivar el escaneado aguas abajo hasta encontrar un nuevo complejo ternario (TC) y reiniciar la traducción. En el caso concreto de *GCN4* se trata de 4 uORFs presentes en la región 5' del mRNA. Según el modelo reciente (Hinnebusch, 2005; Valasek, 2012), el primero de los 4 ORFs se traduce de manera eficiente tanto en condiciones de suficiencia de aminoácidos como en condiciones de ayuno y, después de su traducción, la subunidad 40S del ribosoma permanece unida al mRNA y continua el escaneado. En condiciones normales (sin ayuno de aminoácidos), cuando los niveles de TC son altos, prácticamente todos los ribosomas que permanecen unidos son capaces de volverse a unir a un TC antes de llegar a uno de los siguientes tres ORFs. Como

resultado, los ribosomas que terminen encontrando cualquiera de estos 3 ORFs se someterán a otro paso de reciclado y terminarán disociándose del mRNA, lo que evita que alcancen la ORF principal y puedan traducirla. En condiciones de ayuno de aminoácidos, como ya se ha comentado, Gcn2 fosforila eIF2 $\alpha$ , lo que deriva en una disminución de la formación de complejos ternarios (TC) en el citoplasma. Como consecuencia, las subunidades 40S que continúan recorriendo el mRNA desde la uORF1 necesitan más tiempo para encontrar un nuevo TC y poder reconocer el siguiente codón de inicio AUG. Esto permite que aproximadamente el 50 % de ellos consiga llegar hasta el codón de inicio de *GCN4*. Por lo tanto, a pesar que el proceso de síntesis global de proteínas se ve significativamente inhibido, la expresión de la proteína Gcn4 resulta inducida de forma selectiva (Gunisova y Valasek, 2014).

Además de estimular la transcripción de genes que codifican enzimas de biosíntesis de aminoácidos, al menos la décima parte del genoma de la levadura es inducido por Gcn4 (Rawal *et al.*, 2014), incluyendo genes relacionados con la producción de precursores de aminoácidos, proteínas *carrier* mitocondriales, vitaminas y cofactores, transportadores de aminoácidos, autofagia, o del metabolismo de purinas, glicógeno y la trehalosa (Natarajan *et al.*, 2001). Sin embargo, al mismo tiempo reprime la expresión de los genes relacionados con proteínas ribosomales y factores de traducción. El sentido biológico de este cambio en la expresión génica controlado por Gcn4 tiene que ver con la adaptación a situaciones de escasez de aminoácidos favoreciendo el aumento de su contenido intracelular.

A pesar de que el ayuno de aminoácidos es la causa principal que desencadena en la activación de la ruta GAAC, se han descrito otras situaciones capaces de activar también esta ruta, como pueden ser el ayuno de purinas o glucosa, la alta salinidad (NaCl), tratamientos con agentes alquilantes del DNA y con rapamicina (Murguía y Serrano, 2012). Se ha visto que algunos de estos estreses provocan la acumulación de tRNAs descargados (Zaborske *et al.*, 2009), lo que supone una señal para la célula que le permite activar la ruta GAAC a través de Gcn2. Así, las células reducen su crecimiento y consumo de energía en este tipo de situaciones en las que su viabilidad se ve comprometida.

## 1.2. Homeostasis de hierro en *S. cerevisiae*

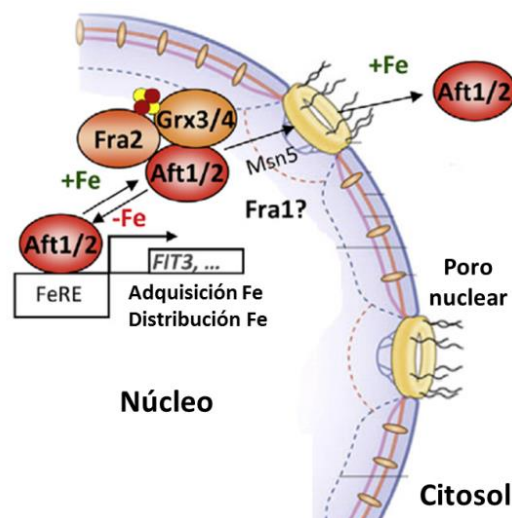
Las células eucariotas contienen cientos de proteínas dependientes de hierro que llevan a cabo funciones críticas en prácticamente todos los procesos celulares (Philpott *et al.*, 2012), lo que convierte al hierro en un nutriente esencial. Los cofactores proteicos basados en este metal activan enzimas y confieren la estructura adecuada a proteínas que participan en prácticamente todos los procesos que tienen lugar dentro de las células. Uno de los principales tipos de cofactores de hierro son los complejos hierro-azufre (Fe/S). Es por esto por lo que la mayoría de los organismos procariontes y todos los eucariotas han desarrollado una gran dependencia a este metal de transición. Las enzimas dependientes de hierro son imprescindibles para la síntesis de la mayoría de los componentes de la célula: lípidos (oxiesteroles, ácidos grasos insaturados, esfingolípidos hidroxilados), proteínas (múltiples amino ácidos) y ácidos nucleicos (deoxirribonucleótidos, purinas en eucariotas superiores). Además, este tipo de enzimas participan en la mayoría de los procesos bioquímicos que tienen lugar en la célula: la fijación de nitrógeno, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la respiración, la

replicación y reparación del DNA, el remodelado de la cromatina, la traducción, el metabolismo de los xenobióticos, el transporte de oxígeno y la síntesis de antibióticos y otras pequeñas moléculas. Por último, las proteínas con hierro sirven como sensores y reguladores para la expresión génica en muchas rutas celulares (Philpott *et al.*, 2012). Sin embargo, el hierro también puede ser potencialmente peligroso para las células, ya que puede participar en la generación de especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido y el radical hidroxilo (Kumanovics *et al.*, 2008).

A pesar de que el hierro es un metal muy abundante en la naturaleza, se encuentra disponible para las células en cantidades limitadas. Normalmente, el hierro suele estar presente en su forma oxidada, la forma férrica, la cual es muy poco soluble en las condiciones ambientales. Por esta razón el hierro puede ser limitante en el crecimiento, lo que ha supuesto que los organismos hayan desarrollado estrategias sofisticadas para su adquisición desde el medio. La respuesta que desarrolla *S. cerevisiae* ante la deficiencia de hierro consiste en: la activación de los sistemas de transporte de hierro de alta afinidad, la movilización intracelular de los reservorios de hierro y una serie de reajustes metabólicos que permiten el mejor aprovechamiento del hierro disponible. Además, la respuesta es proporcional al nivel de escasez de hierro, es decir, cuanto más deficiencia de hierro hay, mayor es la respuesta (Philpott y Protchenko, 2007). Esta respuesta está regulada por el factor de transcripción Aft1 (Dancis *et al.*, 1995), el cual induce la expresión del regulón de hierro en condiciones en las que las células sufren deficiencia de este metal. Existe un segundo factor de transcripción parálogo a Aft1, Aft2. Este tiene una menor relevancia que Aft1 y parece estar involucrado principalmente en la movilización y almacenamiento del hierro intracelular (aunque los efectos transcripcionales de Aft2 solo se perciben en ausencia de Aft1) (Philpott y Protchenko, 2008). Aft1 se expresa de manera constitutiva y su función es regulada a través de su localización subcelular. Este factor de transcripción se mueve entre el núcleo y el citosol en respuesta a los niveles de hierro (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Aft1 es transportado desde el citosol al núcleo por la carioferina Pse1 independientemente del nivel celular de hierro. Sin embargo, en condiciones en las que los niveles de hierro son normales, Aft1 es expulsado de nuevo al citosol (Ueta *et al.*, 2007). Como consecuencia, Aft1 se acumula en el núcleo únicamente en condiciones de deficiencia de hierro (Ueta *et al.*, 2012).

La principal señal que regula la actividad de Aft1 son los complejos hierro-azufre (Fe/S). Estos complejos son cofactores proteicos que forman parte de un número elevado de proteínas en las células eucariotas, las cuales juegan un papel fundamental en diversas reacciones relacionadas con la transferencia de electrones y procesos metabólicos y regulatorios, y se localizan en la mitocondria, en el núcleo y en el citosol (Lill *et al.*, 2006). Los complejos Fe/S están formados por hierro en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y/o férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y sulfuro inorgánico ( $\text{S}^{2-}$ ). Las formas más simples de estos complejos, y a su vez las más comunes, son [2Fe-2S] o [4Fe-4S], aunque existen formas más complejas. La biosíntesis de estos cofactores inorgánicos es bastante compleja y es llevada a cabo por tres maquinarias proteicas diferentes (Lill *et al.*, 2006). El proceso es iniciado por la maquinaria de ensamblaje de complejos Fe/S mitocondriales (ISC, *mitochondrial Iron-Sulphur Cluster*), cuyos componentes se conservan en eucariotas desde la levadura hasta el ser humano. Esta maquinaria es la responsable de la maduración de todas las proteínas mitocondriales asociadas a complejos Fe/S. Además, la

maduración de las proteínas citosólicas y nucleares que contienen complejos Fe/S también requiere la función del sistema de ensamblaje ISC. Aunque todavía no está completamente identificado, se sabe que la maquinaria ISC de la mitocondria se requiere para la formación de un compuesto basado en azufre necesario para la síntesis de estas proteínas Fe/S fuera del orgánulo. Este compuesto es transportado hasta el citosol por el transportador mitocondrial Atm1 (el cual forma parte de la maquinaria exportadora de ISC) y es utilizado por la maquinaria de ensamblaje de proteínas Fe/S citosólicas (CIA, *Cytosolic Iron-Sulphur protein Assembly machinery*). Los componentes de estos dos últimos sistemas también están altamente conservados en todos los organismos eucariotas (Lill *et al.*, 2006). El proceso por el cual los complejos Fe/S actúan como señal reguladora de Aft1 requiere la acción de las glutarredoxinas monotiol extramitocondriales Grx3 y Grx4 (Ueta *et al.*, 2012) y las proteínas Fra1 y Fra2 (Kumanovics *et al.*, 2008). El complejo Grx3/4 participa en el transporte intracelular de los complejos Fe/S y de otros intermediarios que se ensamblan en la mitocondria. Los complejos [2Fe-2S] puente permiten la formación de heterodímeros entre las Grx3-4 y la proteína Fra2, la cual resulta fundamental para la estabilización del complejo (Li *et al.*, 2009). Estos complejos interactúan con Aft1, induciendo su disociación de sus promotores diana. El papel de Fra1 no está claro, aunque se ha visto que podría formar complejos con Fra2 (Kumanovics *et al.*, 2008). Según el estudio llevado a cabo por Ueta y colaboradores (2007), al disociarse de los promotores en presencia de hierro, Aft1 multimeriza y es reconocido por la exportina Msn5, la cual expulsa Aft1 al citosol (Figura 4). Por otro lado, en condiciones de deficiencia de hierro, la síntesis de complejos Fe/S se ve reducida, por lo que hay muy pocos complejos disponibles para unirse al complejo Fra2/Grx3-4. Esto supone que Aft1 no se disocie y permanezca unido a sus genes diana (aproximadamente 40).



**Figura 4. El papel de los complejos Fe/S en la regulación de los factores de transcripción de respuesta a hierro en *S. cerevisiae*.** Los genes involucrados en la adquisición celular y distribución intracelular de hierro están bajo el control de los factores de transcripción Aft1 y Aft2. Aft1 se mueve entre el citosol y el núcleo de una manera dependiente de hierro y funciona como un activador transcripcional bajo limitación de hierro. Las monotiol glutarredoxinas Grx3 y Grx4 interactúan con Aft1-Aft2 y la proteína Fra2, lo que resulta en la disociación de Aft1-Aft2 de sus promotores diana (*FeRE*, *Fe deficiency-Responsive Element*) bajo condiciones de suficiencia de hierro. El complejo Fe/s unido a Grx3-Grx4 es esencial para el proceso. El papel de Fra1 no está claro. Adaptado de Mühlhoff *et al.* (2015).

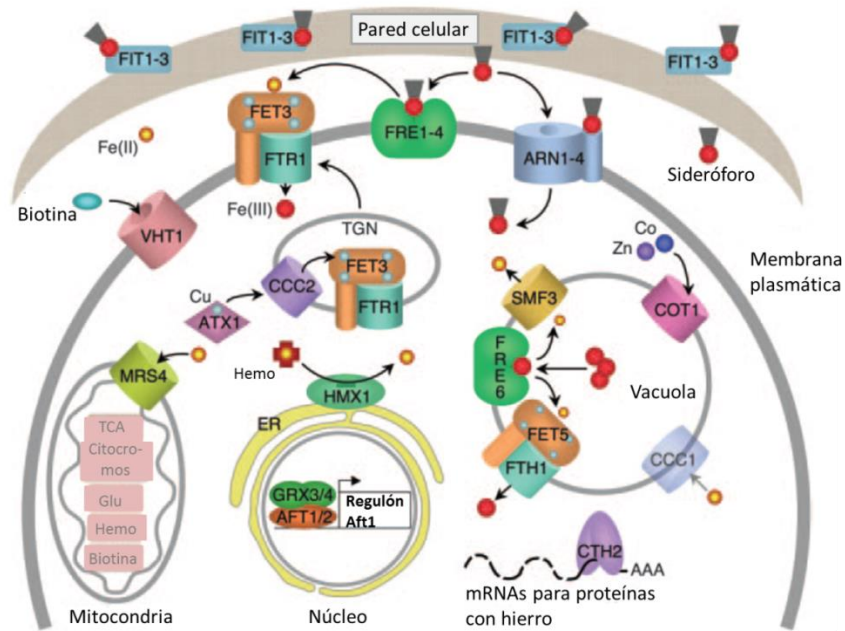


### 1.2.1. Transporte de hierro de alta afinidad

En condiciones normales, el hierro entra en las células a través de transportadores de baja afinidad. Sin embargo, en condiciones en las que *S. cerevisiae* sufre deficiencia de hierro activa la transcripción de una serie de genes a través de Aft1 que permiten, ya sea directa o indirectamente, la toma de hierro en sus diferentes formas (sales, quelatos, sideróforos) desde el exterior a través de la membrana plasmática. En levadura se han descrito dos sistemas de transporte de hierro de alta afinidad (Figura 5).

El primero está formado por transportadores de sideróforos. Los sideróforos son pequeñas moléculas orgánicas que muestran muy alta afinidad y especificidad por el hierro (Van Ho *et al.*, 2002). Estas moléculas son sintetizadas y secretadas por la mayoría de la especies bacterianas y fúngicas y por las plantas herbáceas. Los sideróforos una vez secretados son capaces de unir, y por tanto solubilizar, el hierro férrico (Philpott y Protchenko, 2007). A pesar de que *S. cerevisiae* no es capaz de sintetizar sideróforos, sí que es capaz de capturar y acumular algunos tipos producidos por otros organismos. Los sideróforos son retenidos en la pared celular de la levadura por las manoproteínas Fit1, Fit2 y Fit3 y transportados a través de la membrana plasmática por los transportadores de la familia ARN (Arn1-4) (Philpott y Protchenko, 2007).

El segundo sistema de transporte de hierro de alta afinidad recibe el nombre de sistema reductor. Los sustratos para este sistema son las sales y los quelatos férricos (Philpott y Protchenko, 2007), aunque también el hierro férrico de los sideróforos cuando estos se encuentran en concentraciones altas. Este sistema consta de dos pasos en los que el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es primero reducido hasta el estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y posteriormente transportado hasta el citosol mediante los transportadores de alta afinidad. El paso de la reducción es catalizado por los miembros de la familia de las metalorreductasas FRE. El hierro reducido es transportado al interior de la célula a través de un complejo que consiste en una ferroxidasa multicobre (Fet3) que requiere oxígeno molecular para su funcionamiento y una permeasa transmembrana (Ftr1) (Van Ho *et al.*, 2002; Kosman 2003; Philpott 2006).



**Figura 5. Respuesta a ayuno de hierro en *Saccharomyces cerevisiae*.** Los nombres de los genes bajo el control transcripcional de Aft1 y Aft2 se indican con letra de color negro. En texto gris, CCC1 y proteínas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), los citocromos respiratorios, las rutas de biosíntesis de glutamato (Glt1), grupos hemo y biotina, indicando que se reprimen durante la deficiencia de hierro. Adaptado de Philpott y Protchenko (2008).

### 1.2.2. Movilización del hierro intracelular

Como ya se ha comentado, el factor de transcripción Aft1 regula también genes relacionados con el almacenamiento del hierro y su movilización en la célula (Figura 5).

La vacuola es el principal reservorio de hierro en la célula, aunque éste también puede estar presente en el citosol, mitocondria y otros compartimentos celulares. Cuando hay hierro suficiente para el correcto funcionamiento de la célula, la vacuola lo acumula gracias a la actividad del transportador de hierro y manganeso Ccc1 (Chen, 2000). El secuestro de hierro en la vacuola protege a la célula de sus posible efectos tóxicos y permite su utilización en situaciones en la que este escasea (Li *et al.*, 2001). Cuando esto pasa, la transcripción de CCC1 es inhibida y Aft1 activa la expresión de las proteínas vacuolares que permiten el flujo de hierro desde la vacuola hasta el citosol. En este proceso participa Fre6, miembro de la familia de las metalorreductas FRE que se expresa exclusivamente en la membrana vacuolar, donde cataliza la reducción del hierro y el cobre presente en la vacuola antes de su transporte al citosol (Philpott y Protchenko, 2007).

Además de almacenarse en la vacuola, el hierro también está presente en cantidades sustanciales en la mitocondria, donde se incorpora a los grupos hemo y a ISC. Por lo tanto, al constituir un reservorio de hierro, el contenido celular total de los grupos hemo se ve reducido en condiciones de deficiencia de este metal. Esta función se lleva a cabo gracias a HMX1, que codifica para la hemo oxigenasa de levadura que degrada los grupos hemo. Esta es transcrita activamente en condiciones de escasez de hierro gracias a la acción de Aft1 (Philpott *et al.*, 2012). La degradación de estos grupos permite proveer a la célula de hierro. Además, esta degradación tiene efectos regulatorios, pues los grupos hemo son esenciales para la activación

del factor de transcripción Hap1 (Lee y Zhang, 2009), el cual es el responsable de la activación de genes relacionados con la respiración y el crecimiento aeróbico. Por lo tanto, la deficiencia de hierro provoca un descenso del contenido total de grupos hemo, lo desencadena a su vez en la inactivación de factores de transcripción que controlan la expresión de las rutas relacionadas con la utilización del hierro.

### 1.2.3. Respuestas metabólicas a los niveles de hierro

La mayoría de los genes cuya transcripción es activada por Aft1 y Aft2 durante la deficiencia de hierro están relacionados con el transporte de hierro hacia el citosol, tanto desde fuera de la célula como desde los reservorios de la vacuola. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, algunos de los genes diana de Aft1 están relacionados con un reajuste del metabolismo y de la utilización del hierro intracelular. Uno de los métodos que emplea la célula para reducir el consumo de hierro es la inhibición de rutas dependientes de hierro, es decir, rutas en las que participan enzimas con cofactores de hierro, y la activación de rutas en las que participan enzimas cuyo funcionamiento es independiente de este metal, consiguiendo así un uso eficiente del hierro disponible. Un ejemplo de este tipo de regulación es la ruta de biosíntesis del glutamato, que reprime una ruta mediada por una enzima que contiene un complejo Fe/S al mismo tiempo que estimula una ruta alternativa (Philpott *et al.*, 2012). Algunos de los mecanismos por los que se regula el silenciamiento de estos genes consiste en la degradación post-transcripcional de mRNAs que codifican proteínas con hierro a través de Cth1 y Cth2 (Puig *et al.*, 2008); sin embargo la mayoría de los mecanismos de regulación son a nivel transcripcional.

Probablemente, la alteración más significativa en el metabolismo que ocurre frente a la deficiencia de hierro es el cambio hacia el metabolismo fermentativo (Philpott *et al.*, 2012). La levadura metaboliza la glucosa a piruvato a través de la glicólisis. El piruvato es o bien convertido en etanol y CO<sub>2</sub> a través de la fermentación, o bien completamente oxidado dando CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la fosforilación oxidativa. Si la glucosa está disponible, incluso en presencia de oxígeno, la levadura reduce el proceso de mayor producción de energía, es decir, la respiración, metabolizando únicamente el 3 % de la glucosa vía respiración, mientras que el 73 % de la glucosa la metaboliza vía fermentación (Lagunas, 1986). Una vez la levadura ha agotado toda la glucosa disponible, el metabolismo cambia desde fermentativo a respiratorio. Esta transición, conocida como cambio diáuxico, está asociada a grandes cambios en la expresión génica que resultan en una expansión muy notable en el volumen mitocondrial (desde un ~3 % o menos hasta un ~13 % del volumen celular), y a la vez en el nivel de enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y complejos respiratorios en la mitocondria (Stevens, 1977). Este incremento del volumen mitocondrial viene acompañado de un crecimiento de los niveles de hierro mitocondriales, ya que dos de las enzimas del ciclo de TCA, la aconitasa y la succinato deshidrogenasa, contienen complejos Fe/S, y los complejos respiratorios II-IV contienen numerosos centros hemo y Fe/S. La caracterización de los niveles de hierro durante la fase respiratoria y fermentativa de las células indica que la concentración total de hierro dentro de la mitocondria no cambia, pero si la distribución de las especies de hierro (Garber *et al.*, 2010). El hierro presente en las mitocondrias durante la respiración se encuentra principalmente en forma de grupos hemo y complejos Fe/S, mientras que las mitocondrias fermentativas contienen niveles más bajos de

proteínas con grupos hemo y complejos Fe/S y niveles significativamente más altos de hierro no hemínico de alto spin, hierro mononuclear y en forma de nanopartículas. Por lo tanto, el incremento de los niveles de hierro es absolutamente necesario para la respiración. Análisis transcriptómicos de levaduras con deficiencia de hierro han demostrado una regulación negativa en los genes relacionados con la respiración, por lo que en situaciones de deficiencia de hierro las células muestran una dependencia mayor de la fermentación para la producción de energía (Philpott *et al.*, 2012).

#### 1.2.4. Metabolismo de aminoácidos cuando existe deficiencia de hierro

La síntesis de varios aminoácidos en levadura requiere el uso de enzimas que contienen complejos Fe/S: la aconitasa (Aco1), la sulfito reductasa (Met5), la dihidroxiácido deshidratasa (Ilv3), la isopropilmalato isomerasa (Leu1), la homoaconitasa (Lys4) y la glutamato sintetasa (Glt1) (Lill y Mühlenhoff, 2008). A excepción de esta última, la falta de cualquiera de estas enzimas resulta en auxotrofia del correspondiente aminoácido. Por esta razón es probable que el metabolismo de aminoácidos se vea afectado por la deficiencia de hierro. Sin embargo, análisis metabólicos en células levadura crecidas en medio pobre en hierro demostraron que, a pesar de que las células eran deficientes en hierro, presentaban niveles de aminoácidos muy similares o incluso mayores que aquellas levaduras crecidas con niveles normales de hierro (Philpott *et al.*, 2012). Únicamente en el caso del glutamato se observó una ligera reducción con respecto a levaduras en condiciones normales. De hecho, se ha demostrado que durante la deficiencia de hierro la levadura induce numerosos genes de biosíntesis de aminoácidos, pese a que este proceso tiene algún paso dependiente de hierro (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2010). Esto no quiere decir que la deficiencia de hierro no tenga ningún impacto en la biosíntesis de aminoácidos, sino que los mecanismos de homeostasis de aminoácidos en levadura son muy robustos. Así, en situaciones de deficiencia de hierro, la levadura coordina la síntesis de proteínas con los aminoácidos disponibles mediante la disminución en la tasa de traducción, la activación de los sistemas de biosíntesis de aminoácidos y la activación de diversas rutas relacionadas con la autofagia (Chen *et al.*, 2014), estimulando la degradación de proteínas para restaurar los niveles de aminoácidos cuando estos están por debajo de los niveles óptimos.

### 1.3. La levadura como sistema modelo

Los organismos modelo se emplean en el ámbito de la investigación debido a que proporcionan un marco donde desarrollar y optimizar métodos que facilitan y estandarizan diferentes análisis. Dichos organismos deben ser representativos de los seres vivos para los que están siendo utilizados (Karathia *et al.*, 2011).

La levadura es uno de los sistemas más empleados para modelizar organismos eucariotas, pues presenta una larga serie de ventajas. En primer lugar, es un organismo bien definido y bien estudiado genéticamente (Dikicioglu *et al.*, 2013), esto es, su genoma está secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996) y ampliamente caracterizado (Peña-castillo y Hughes, 2007). En segundo lugar, posee un rápido crecimiento y es fácilmente manejable en el laboratorio. Además, es un organismo cuyo genoma es fácilmente manipulable, es decir, es sencillo someterlo a mutaciones y reorganizaciones genéticas mediante técnicas de clonaje e ingeniería genética (Dikicioglu *et al.*, 2013). Por otro lado, existe una amplia conservación de algunos de los

mecanismos moleculares que ocurren en los organismos eucariotas superiores (Schekman y Orci, 1996). Gracias a esto, gran parte de los conocimientos acerca de las interacciones funcionales que ocurren en organismos eucariotas complejos han sido adquiridos a través del estudio de *Saccharomyces cerevisiae* (Kucharczyk y Rytka, 2001), que ha sido utilizada como modelo para estudios relacionados con el envejecimiento (Murakami y Kaeberlein, 2009), la regulación de la expresión génica (Biddick y Young, 2009), el ciclo celular (Nasheuer *et al.*, 2002), la apoptosis (Owsianowski *et al.*, 2008) y otros muchos procesos biológicos.

La respuesta a la presencia de aminoácidos es un proceso que ha sido estudiado de forma intensa en levadura, por lo que es posible extrapolar y comprender su funcionamiento en otros organismos eucariotas más complejos como son las plantas y los mamíferos (Wilson y Roach, 2002). Además, puesto que los mecanismos que regulan la homeostasis del hierro se encuentran altamente conservados (De Freitas *et al.*, 2003), también se considera a *S. cerevisiae* buen organismo modelo para estudiar el metabolismo del hierro en organismos superiores.

## 2. ANTECEDENTES

Los antecedentes a este trabajo son los resultados obtenidos en los experimentos realizados por Marcos Caballero en su Tesis Doctoral.

Experimentos de transcriptómica realizados en levadura indicaron que, tras un tratamiento con aminoácidos, existe una represión del regulón de hierro, que como ya se ha explicado, incluye genes relacionados con la homeostasis y el transporte de este metal. Se descartó la posibilidad de que la represión del regulón de Aft1 se debiese a una mayor concentración intracelular de hierro en las células tratadas con aminoácidos. Experimentos con diferentes mutantes de la ruta GAAC mostraron diferencias significativas en la expresión de los genes regulados por Aft1, sugiriendo que la activación de Gcn2 induce, a través de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  pero no de la derrepresión de Gcn4, la expresión del regulón de Aft1. Un análisis de la localización subcelular de Aft1 unido a GFP en los mutantes de la quinasa Gcn2 mostró una correlación entre la expresión del regulón de Aft1 y su localización subcelular, situándose preferentemente en el citoplasma de las células del mutante de pérdida de función de *GCN2* ( $\Delta gcn2$ ) y en el núcleo de células mutantes con el alelo constitutivamente activo de *GCN2* (*GCN2<sup>c</sup>*). Puesto que los complejos Fe/S son la señal que regula la unión de Aft1 a su regulón (Ueta *et al.*, 2012; Mühlhoff *et al.*, 2015), se planteó la probable conexión entre la ruta GAAC y los procesos de síntesis y/o percepción de dichos complejos. Diferentes ensayos de crecimiento de la levadura realizados en medio con bajo hierro y en medio con galactosa como fuente de carbono apuntaron a que la inhibición de la ruta GAAC podría favorecer la síntesis de complejos Fe/S, ya que el mutante de pérdida de función de la quinasa Gcn2 es tolerante al crecimiento en dichas condiciones mientras que el mutante con el alelo constitutivamente activo de *GCN2* muestra una evidente sensibilidad.

### 3. OBJETIVOS



En base a los antecedentes expuestos anteriormente se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo:

- Determinar la localización subcelular de Aft1 unido a GFP mediante microscopía de fluorescencia en células de levadura tratadas con aminoácidos y compararla con la del mutante de pérdida de función de *GCN2* ( $\Delta gcn2$ ) y con la del mutante con el alelo de *GCN2* constitutivamente activo ( $GCN2^c$ ).
- Determinar el transporte de hierro en células de la cepa silvestre tratadas con aminoácidos y en los mutantes indicados en el punto anterior.
- Analizar la actividad de la enzima aconitasa (la cual es dependiente de los complejos Fe/S) en las condiciones y en los mutantes indicados en el primer punto.
- Analizar la expresión del regulón de hierro en los mutantes  $\Delta aft1$  y  $GCN2^c$  en condiciones normales y bajo tratamiento con aminoácidos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Cepas de *S. cerevisiae*, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas y los plásmidos empleados en este trabajo estaban disponibles en el laboratorio del profesor Ramón Serrano.

En la Tabla 1 se muestran las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

**Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizados en este trabajo.**

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
BY4741 (silvestre)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>Δgcn2</i>	BY4741 <i>Δgcn2::KanMX4</i>	EUROSCARF
GCN2 <sup>c</sup>	BY4741 GCN2 <sup>c</sup> -M719V-E1537G	Menacho-Marquez <i>et al.</i> , 2007
MCM1	BY4741 <i>pRS426 [GFP-AFT1::URA3]</i>	Tesis Marcos Caballero
MCM2	BY4741 <i>Δgcn2::KanMX4 pRS426 [GFP-AFT1::URA3]</i>	Tesis Marcos Caballero
MCM3	BY4741 GCN2 <sup>c</sup> -M719V-E1537G <i>pRS426 [GFP-AFT1::URA3]</i>	Tesis Marcos Caballero

Las características y la procedencia del plásmido con el que las cepas MCM1 MCM2 y MCM3 habían sido transformadas y que se utilizó en este proyecto para estudiar la localización subcelular de Aft1-GFP se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Plásmido utilizado en este trabajo.**

Nombre	Características	Procedencia
pRS426	2μ, AmpR, <i>URA3</i> , <i>GFP-AFT1</i>	Crisp <i>et al.</i> , 2003

En condiciones normales de trabajo, los cultivos de levadura fueron incubados a 28°C en agitación (200 rpm) en los medios descritos posteriormente (Sherman, 2002). Para el almacenamiento a largo plazo, la levadura se mantuvo a -80°C en viales con una solución de glicerol al 15 %. Para su uso rutinario se conservaron en placas de medio sólido (YPD o SD) a 4°C. Para medir la absorbancia de dichos cultivos se empleó un espectrofotómetro Ultrospec 10 (Amersham Biosciences) y una longitud de onda de 660 nm.

#### Medio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*)

Se trata de un medio rico en nutrientes preparado a partir de 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona bacteriológica y 2 % de glucosa.

#### Medio SD (*Synthetic Dextrose*)

Este medio mínimo sintético se preparó disolviendo 0,67 % de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) sin aminoácidos, 2 % de glucosa y 50 mM de MES (ácido 2-morfolinoetanosulfónico) llevado a pH 6,0 con Tris Base. De acuerdo con las necesidades de cada cepa, se suplementó el medio con los aminoácidos y las bases púricas y pirimidínicas requeridas (30 μg/ml histidina, 100 μg/ml leucina, 100 μg/ml metionina, 30 μg/ml uracilo). Para la obtención de medio SD pobre en

hierro se añadió el quelante de hierro extracelular BPS (batofenantrolina disulfonato) en las concentraciones indicadas.

Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2 % de agar.

#### 4.2. Estudio de la localización subcelular de Aft1-GFP

La localización intracelular de Aft1 se determinó mediante microscopía de fluorescencia de la proteína unida a GFP (Crisp *et al.*, 2003; Kumanovics *et al.*, 2008). Los cultivos de levadura fueron crecidos durante toda la noche hasta alcanzar la fase estacionaria en medio SD con bajo hierro (20  $\mu$ M BPS) y se colocaron en un portaobjetos para microscopía. La microscopía de fluorescencia se realizó utilizando un microscopio Leica DM5000 B (Leica Microsystems) con un filtro de GFP. Las imágenes se procesaron usando el *software* NIS elements F (Nikon). Posteriormente se cuantificó el número de células con localización nuclear de Aft1-GFP. Se realizaron cuatro experimentos independientes y, en cada experimento, se examinaron un mínimo de 6 campos por condición, tras lo que se determinó el porcentaje de células con fluorescencia nuclear. Se contaron más de 200 células por condición.

#### 4.3. Análisis de la velocidad de toma de hierro

Se prepararon los preinóculos en 5 ml de medio SD. A partir de estos preinóculos se cultivaron las células en 200 ml de medio SD añadiendo 20  $\mu$ M de BPS. Se recogieron las células crecidas hasta la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4-0,6$ ) y se dejaron 10 min en hielo. Se centrifugaron las células 5 min a 4°C y se llevaron a cabo dos lavados con Solución de Ensayo fría (2 % Glucosa, 10 mM Mes-Tris, pH 6). Después de los lavados se concentró la muestra 10 veces en Solución de Ensayo y se midió la absorbancia de la misma. Se dejó atemperar la muestra 5 min (preincubación) y se tomó una alícuota. Después se añadió 2  $\mu$ M  $FeCl_3$  y se dejó incubar 5 min en agitación. Una vez pasado este tiempo se recogió otra alícuota. Las dos muestras recogidas se lavaron dos veces con 50 mM Tris-HCl, pH 6,5, 10 mM EDTA. Los pellets fueron digeridos con 1 ml de una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico en una proporción 5:2 a 80°C durante 1 h (Li y Kaplan, 1998). Después de la digestión, las muestras se diluyeron hasta un volumen de 4 ml con agua MilliQ, se filtraron y se analizó el hierro en solución con un espectrofotómetro de absorción atómica GBC SensAA (GBC Scientific Equipment Pty Ltd). Las mediciones en el espectrofotómetro de absorción atómica se realizaron con una lámpara de cátodo hueco para hierro (SMI-LabHut Ltd.). Para determinar la concentración precisa de hierro en cada muestra se construyó una recta de calibrado utilizando patrones de  $Fe_2SO_4$  de 0, 0,6, 1, 1,5, 2 y 5  $\mu$ g/ml. Todas las muestras se midieron por triplicado.

#### 4.4. Ensayo de la actividad aconitasa

El ensayo de actividad aconitasa se llevó a cabo con el *Aconitase Activity Assay Kit* (Sigma-Aldrich).

Se crecieron 5 ml de células hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento en medio SD y se midió la absorbancia. Se dejaron las células 10 min en hielo y se realizaron 2 lavados en frío con agua. Se resuspendió el pellet con 250  $\mu$ L de *Assay Buffer* frío. Una vez resuspendido se

llevó a cabo la rotura de las células con bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y la agitación se realizó en cinco ciclos de 45 s en el vórtex, dejando durante los intervalos las muestras en hielo. Después se recuperó toda la muestra posible y se pasó a otro microtubo. Se centrifugaron las muestras en frío a baja velocidad (3.000 rpm) durante 5 min. Este paso se repitió las veces necesarias hasta que se eliminó el debris de las muestras. Se recogió el sobrenadante y, con el objetivo de romper las mitocondrias, se sonicaron las muestras durante 4 ciclos de 5 s dejando las muestras en hielo durante los intervalos. A continuación se empleó la técnica Bradford para determinar la cantidad de proteína de las muestras y se llevó a cabo el ensayo de la actividad de la aconitasa en una placa de 96 pocillos. Se prepararon todos los reactivos y las mezclas de la reacción según indica el protocolo Sigma-Aldrich. Se activaron las muestras (100  $\mu$ l) añadiendo 10  $\mu$ l de Solución de Activación y se dejaron en hielo 1 h. Una vez incubadas, se añadió la misma cantidad de proteína total para cada muestra y se ajustó el volumen hasta 50  $\mu$ l con *Assay Buffer*. Después se añadieron 50  $\mu$ l del mezcla de la reacción (46  $\mu$ l de *Assay Buffer*, 2  $\mu$ l de enzima y 2  $\mu$ l de sustrato) a las muestras y a los patrones (0, 4, 8, 16 y 20 nm de isocitrato) y 50  $\mu$ l de mezcla control (48  $\mu$ l *Assay Buffer* y 2  $\mu$ l de enzima) a las muestras control. Se mezclaron las muestras brevemente empleando un agitador horizontal y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente protegiendo la placa de la luz. A continuación se añadieron a cada pocillo 10  $\mu$ l del Revelador, se mezcló, y se dejó incubando a temperatura ambiente 10 min. Por último se midió la absorbancia de las muestras a 450 nm con un lector de microplacas iMark Microplate Reader (Bio-Rad). Para calcular la actividad de la aconitasa se restó la absorbancia del control a la absorbancia de las muestras y se obtuvieron los nanomoles de isocitrato generados por la aconitasa a partir de la curva patrón.

#### 4.5. Purificación y manipulación de ácidos nucleicos

- Aislamiento de RNA de *S. cerevisiae*

Se aisló RNA de células de levadura crecidas en 10 ml de medio SD hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Abs_{660} \approx 0,4$ ) empleando un método basado en el descrito por Li y colaboradores (2009). Las células del cultivo se concentraron por centrifugación en frío (4°C) durante 5 min a 2500 rpm y se resuspendieron en 1 ml de agua estéril. Se volvió a centrifugar a 4°C durante 2 min a 12800 rpm. Las células se resuspendieron en 400  $\mu$ l de *RNA Isolation Buffer* (5 % SDS, 10 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 6), tras lo cual se incubaron durante 5 min a 65°C. Seguidamente, los microtubos se colocaron en hielo y se añadió 200  $\mu$ l de KCl 0,3 M (pH 6). Después se centrifugaron a 4°C durante 5 min y a 12800 rpm. El sobrenadante se pasó a un nuevo microtubo y se añadió un volumen de PCI ácido. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm, se recogió la fase superior y se añadió 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. A continuación, se dejaron las muestras 20 min a -20°C y después se centrifugaron durante 10 min a 12800 rpm. Finalmente, se lavó el RNA precipitado con 1 ml de etanol 70 % y, tras volver a centrifugar 5 min a 12800 rpm, se resuspendió el RNA en 100  $\mu$ l de agua estéril. Posteriormente, el RNA se purificó mediante un kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) que permite su unión a una membrana porosa de silica gel, un tratamiento con DNAsa y su posterior elución. La integridad del RNA se comprobó mediante geles no desnaturizantes y para conocer su concentración se utilizó un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

- Electroforesis de RNA bajo condiciones no desnaturalizantes

Para comprobar la integridad del RNA extraído se emplearon geles de agarosa al 1 % fundida en tampón de electroforesis TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA) con 0,001 % de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon con el tampón de carga 1,25X (55 % formamida, 20 % formaldehído, 12,5 % MAE 10X, 8 % glicerol, 0,05 % azul de bromofenol y 0,001 % de bromuro de etidio) y se calentaron a 56°C durante 10 min antes de cargarlas en el gel. El marcador *0,5 -10 kb RNA Ladder* (Invitrogen) se trató como una muestra más. Los geles se corrieron 1-2 h a 50 V y la visualización del RNA se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda.

- Síntesis de cDNA

Se partió de 1 µg de RNA total purificado previamente y cuya integridad se había verificado mediante electroforesis de la muestra. Se añadieron 4 µl de *5X Reaction Mix* y 2 µl de *Maxima Enzyme Mix* (Thermo Scientific) en un volumen total de 20 µl (en el mix está incluido el oligodT). La incubación tuvo dos etapas: una primera de 10 min a 25°C y otra de 30 min a 50°C. Finalmente, la reacción se inactivó calentando la muestra a 85°C durante 5 min.

- PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

A partir del cDNA obtenido como se ha explicado anteriormente, el experimento de qRT-PCR se llevó a cabo en una placa multipocillo (Applied Biosystems) añadiendo:

- 1 µl de cDNA
- 0,5 µl de cebador sentido 10 µM
- 0,5 µl de cebador antisentido 10 µM
- 2 µl de Polimerasa *5X PyroTaq Evagreen qPCR Mix Plus (ROX)* (Cultek Molecular Biotek)
- Volumen final de 10 µl con agua MilliQ estéril

En la Tabla A.1. del Anexo I se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de qRT-PCR. Las reacciones se realizaron en un termociclador *7500 Fast Real-Time* (Applied Biosystems) con el siguiente programa:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min
- 40 ciclos:
  - 15 s de desnaturalización a 95°C
  - 30 s de hibridación de los cebadores a 55°C
  - 30 s de extensión a 72°C
- Ciclo final de desnaturalización-renaturalización

La especificidad de la amplificación por PCR se comprobó mediante una curva de disociación (de 60°C a 95°C). Además se calculó la eficiencia de la PCR y se utilizó *UBC6* como el gen de referencia (Teste *et al.*, 2009). La abundancia relativa de mRNA fue calculada usando el método *comparative threshold cycle* (Pfaffl, 2001).

#### **4.6. Análisis estadísticos**

A menos que se especifique lo contrario, los resultados obtenidos en este trabajo corresponden a un mínimo de tres repeticiones biológicas. Las barras de error en las figuras representan el error estándar, y los datos que resultan estadísticamente significativos se representan con un asterisco. Para determinar las diferencias significativas se utilizó la prueba estadística *t* de *Student* para datos independientes.

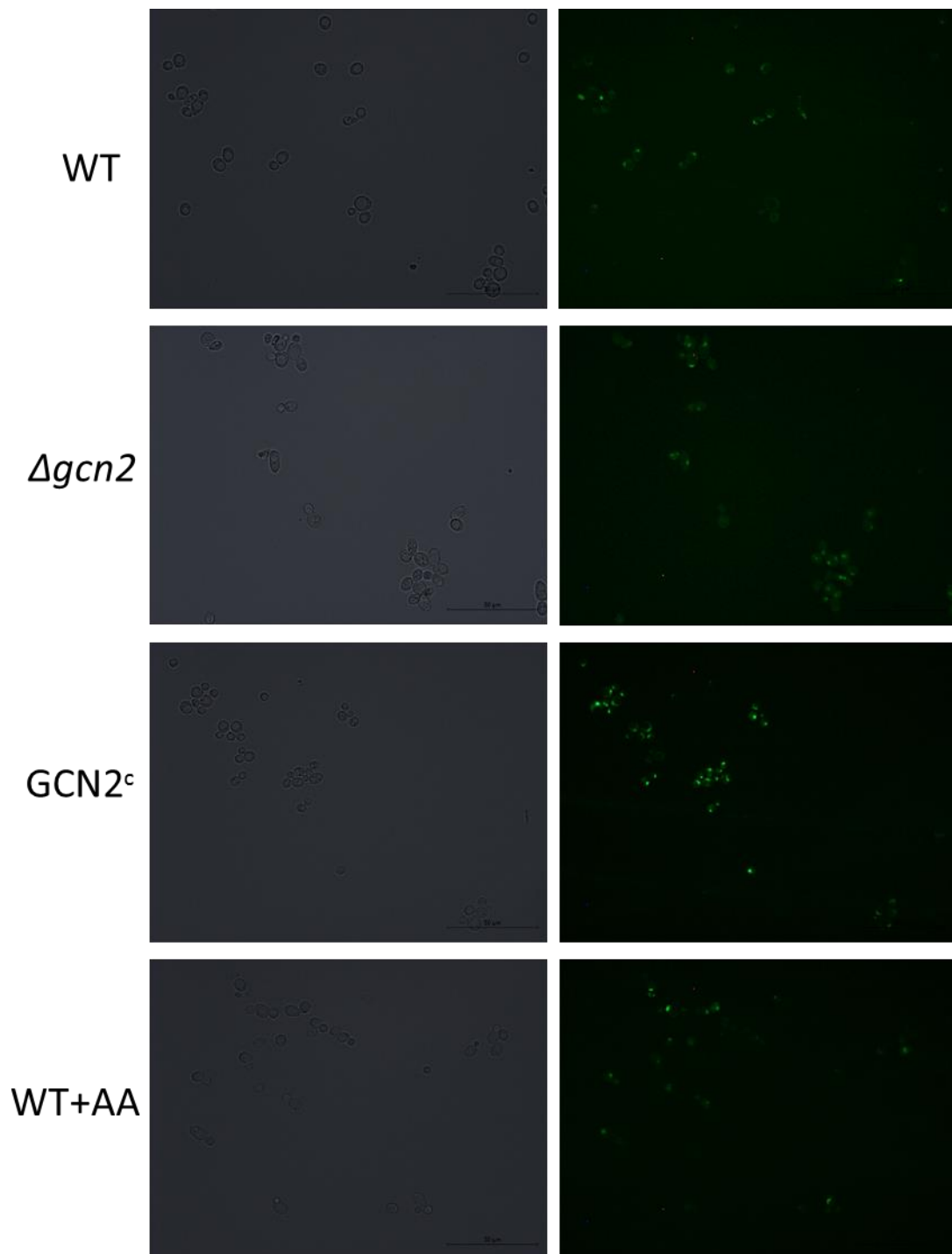
## 5. RESULTADOS



### 5.1. Estudio de la localización subcelular de Aft1

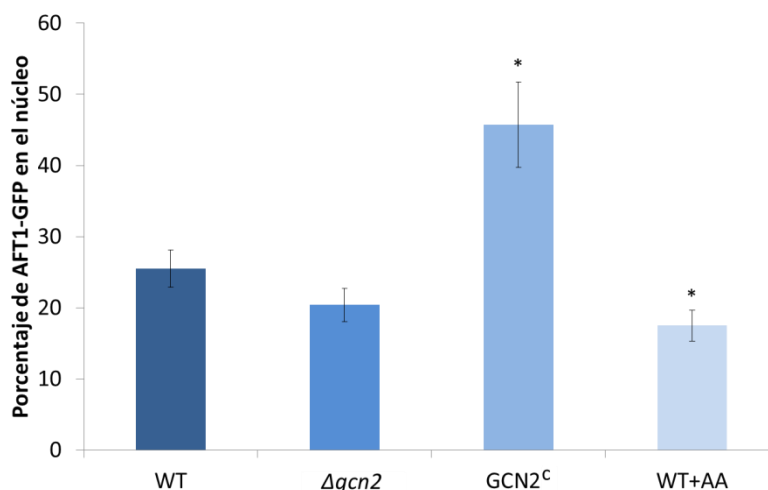
La activación transcripcional mediada por Aft1 es posible gracias a su translocación desde el citosol al núcleo y a su permanencia en él. Por esta razón se espera que en células en las que Aft1 está activo, y por tanto su regulón inducido, este factor de transcripción se encuentre mayoritariamente en el núcleo, mientras que en células en las que el regulón está reprimido, su localización sea principalmente citoplasmática.

El tratamiento de las células con aminoácidos inhibe la acción de la quinasa Gcn2, reprimiéndose así la ruta GAAC y la expresión del regulón de Aft1. Por esta razón, en estas células se esperaría ver una concentración de Aft1 en el núcleo menor que en la cepa silvestre. Del mismo modo, cabría esperar un resultado similar en el mutante de pérdida de función de *GCN2* ( $\Delta gcn2$ ) y el resultado contrario en el mutante con su alelo constitutivamente activo *GCN2<sup>c</sup>*. Con el objetivo de poder ver posibles diferencias en la localización de Aft1 en condiciones de ayuno y suficiencia de aminoácidos y comparar dicha localización con la que se observa en los diferentes mutantes de la quinasa Gcn2 ( $\Delta gcn2$  y *GCN2<sup>c</sup>*), se emplearon cepas transformadas con un plásmido que expresa Aft1 marcado con GFP bajo el control de su promotor endógeno. El tratamiento con aminoácidos se basa en la adición de 1 g/l de un hidrolizado de caseína ácida de composición conocida, la cual se especifica en el Anexo III. Las células se crecieron en medio pobre en hierro hasta la fase estacionaria (Figura 6).



**Figura 6. El tratamiento con aminoácidos provoca la localización citoplasmática de Aft1.** En las imágenes se observan células de la cepa silvestre (WT),  $\Delta gcn2$ , GCN2<sup>c</sup> y la cepa silvestre bajo tratamiento con aminoácidos (WT+AA) transformadas con un plásmido que expresa Aft1 marcado con GFP bajo su promotor endógeno. Las células fueron crecidas hasta la fase estacionaria en medio SD pobre en hierro (SD + 20 $\mu$ M BPS). La localización subcelular de Aft1-GFP se determinó mediante microscopía de fluorescencia.

Como se observa en la Figura 7, tanto el mutante  $\Delta gcn2$  como la cepa silvestre tratada con aminoácidos mostraron una localización de Aft1-GFP principalmente citosólica, con el 20,41 % y 17,49 % de células presentando una localización de Aft1-GFP nuclear, respectivamente. En el mutante GCN2<sup>c</sup> Aft1-GFP se detectó en el núcleo de aproximadamente el 46 % de las células. Las células de la cepa silvestre mostraron un comportamiento intermedio, con Aft1-GFP situado en el núcleo del 25,50 % de las células.



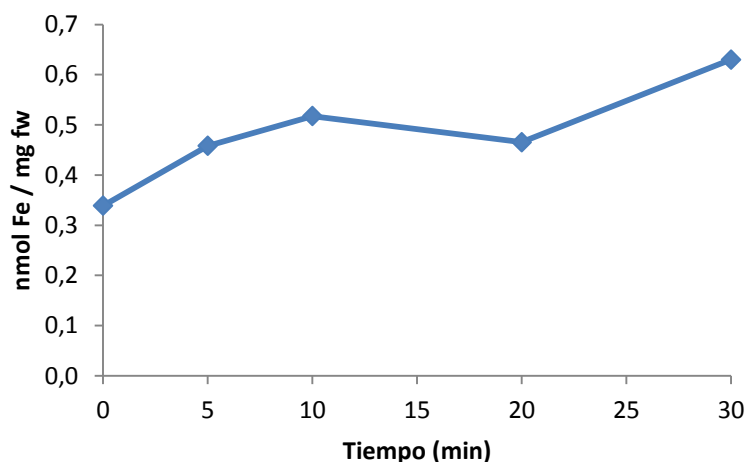
**Figura 7. Porcentaje de Aft1-GFP en el núcleo de las células de la cepa silvestre (WT),  $\Delta gcn2$ , GCN2c y la cepa silvestre bajo tratamiento con aminoácidos (WT+AA).** El porcentaje de células mostrando Aft1-GFP en el núcleo fue cuantificado. \*Diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (WT) ( $P < 0,05$ ).

Estos datos contribuyen a demostrar que los aminoácidos, posiblemente a través de la inhibición de Gcn2, controlan la expresión del regulón de hierro de una manera dependiente de Aft1.

## 5.2. Análisis de la velocidad de la toma de hierro

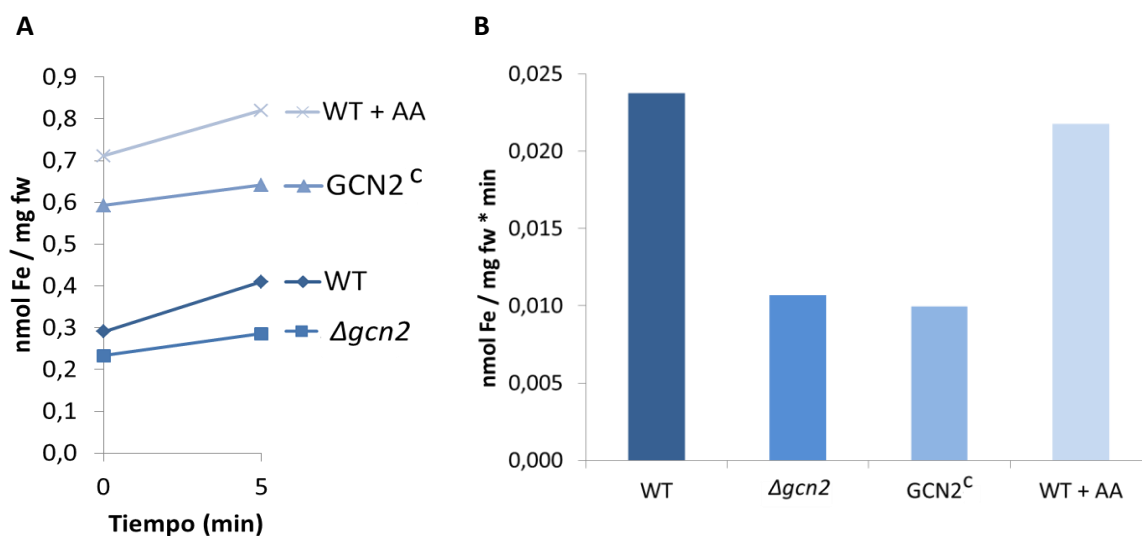
Como ya se ha comentado, los resultados obtenidos en los experimentos de transcriptómica realizados por Marcos Caballero indicaron que existe una represión en la expresión de los transportadores celulares de hierro tras el tratamiento con aminoácidos. Con el objetivo de comprobar si las diferencias de expresión de estos genes tienen influencia a nivel de proteína se realizó un análisis de la velocidad de transporte de hierro.

En primer lugar, con el objetivo de poner a punto el protocolo para este experimento, realizamos un ensayo únicamente con la cepa silvestre. Crecimos las células en medio pobre en hierro hasta la fase exponencial y calculamos la cantidad de hierro total en la muestra antes y después de la adición de  $2\mu\text{M FeCl}_3$  para poder estudiar la velocidad de entrada de este metal. Las medidas se realizaron a diferentes tiempos con el objetivo de determinar el intervalo de tiempo en el cual la velocidad de transporte es máxima. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 8.



**Figura 8. Análisis de toma de hierro en la cepa silvestre.** Se muestran las concentraciones de hierro totales a tiempo 0 y tras 5, 10, 20 y 30 minutos de incubación con  $2\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  en la cepa silvestre. Las células fueron crecidas en medio pobre en hierro (SD +  $20\mu\text{M}$  BPS) hasta la fase exponencial de crecimiento.

Las células presentaron la máxima velocidad de toma de hierro en los primeros cinco minutos tras la adición del hierro. Esta va disminuyendo en las siguientes medidas, hasta que finalmente parece que la entrada de hierro se reduce considerablemente (la curva comienza a saturarse en los últimos tiempos medidos). A partir de estos datos concluimos que a la hora de hacer este experimento con los mutantes ( $\Delta gcn2$  y  $\text{GCN2}^c$ ) y en las diferentes condiciones (la cepa silvestre en condiciones de ayuno y suficiencia de aminoácidos) tomaremos únicamente dos alícuotas: la primera a tiempo cero (antes de añadir el  $2\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ) y la segunda una vez transcurridos 5 minutos tras la adición del hierro. Los resultados de este último experimento se recogen en la Figura 9.



**Figura 9. Análisis de la toma de hierro en los mutantes de la quinasa Gcn2 y en el tratamiento con aminoácidos.** **A)** Se muestran las concentraciones de hierro totales a tiempo 0 y tras 5 minutos de incubación con  $2\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  en las cepas silvestre (WT),  $\Delta gcn2$ ,  $\text{GCN2}^c$  y la cepa silvestre bajo tratamiento con aminoácidos (WT+AA). Las células fueron crecidas en medio pobre en hierro (SD +  $20\mu\text{M}$  BPS) hasta la fase exponencial de crecimiento. **B)** Se ha calculado la velocidad de entrada de hierro en las cepas silvestre (WT),  $\Delta gcn2$ ,  $\text{GCN2}^c$  y la cepa silvestre bajo tratamiento con aminoácidos (WT+AA). Los valores corresponden a la media de dos experimentos.

Con respecto a las diferencias del contenido total en hierro a tiempo 0, tanto el mutante GCN2<sup>c</sup> como la cepa silvestre tratada con aminoácidos presentan niveles mayores que la cepa silvestre sin tratamiento. Por el contrario, el mutante  $\Delta gcn2$  presenta unos niveles iniciales de contenido en hierro menores.

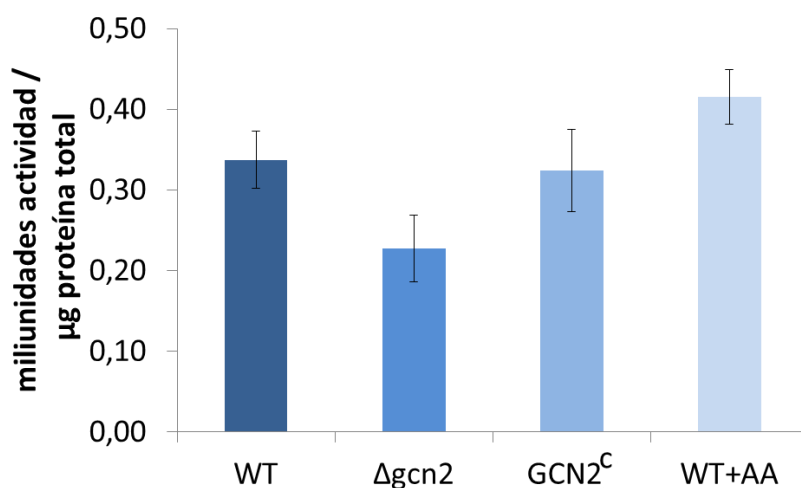
En cuanto a la velocidad de entrada de hierro en las células, los dos mutantes de la quinasa Gcn2 muestran una velocidad menor que la cepa silvestre, mientras que el tratamiento con aminoácidos únicamente produce un ligero descenso en la velocidad de transporte.

### 5.3. Ensayo de la actividad aconitasa

Se sabe que la localización subcelular y, por tanto, la actividad de Aft1 se regulan a través de los complejos Fe/S. Además, diferentes experimentos realizados por Marcos Caballero en su tesis doctoral mostraron diferencias en el crecimiento de los diferentes mutantes en medio sin hierro y medio con galactosa. A partir de los resultados de estos experimentos se dedujo que el mutante  $\Delta gcn2$  podría presentar una mayor eficiencia en la síntesis de los complejos Fe/S y, por el contrario, el mutante GCN2<sup>c</sup> una menor eficiencia en la síntesis de estos complejos. Con el objetivo de comprobar si las células de *S. cerevisiae* controlan la síntesis de los complejos Fe/S a través de la ruta GAAC se diseñó este experimento.

Las aconitasas son una familia de enzimas que contienen complejos Fe/S y que catalizan la isomerización de citrato a isocitrato. En levadura y en el resto de eucariotas existen dos aconitasas, Aco1 (citósólica) y Aco2 (mitocondrial, participa en la ruta de los ácidos tricarbónicos). Por lo tanto, la actividad de estas enzimas puede proporcionar una medida de la capacidad de biosíntesis de los complejos Fe/S. En este caso se decidió estudiar la actividad de ambas aconitasas, sin discriminar entre la citósólica y la mitocondrial.

Para llevar a cabo este ensayo se crecieron las células de las cepas silvestre,  $\Delta gcn2$ , GCN2<sup>c</sup> y la cepa silvestre bajo tratamiento con aminoácidos hasta la fase estacionaria, pues es en esta fase en la que la enzima aconitasa está más activa, ya que las células se encuentran en la fase respiratoria de crecimiento (Figura 10).

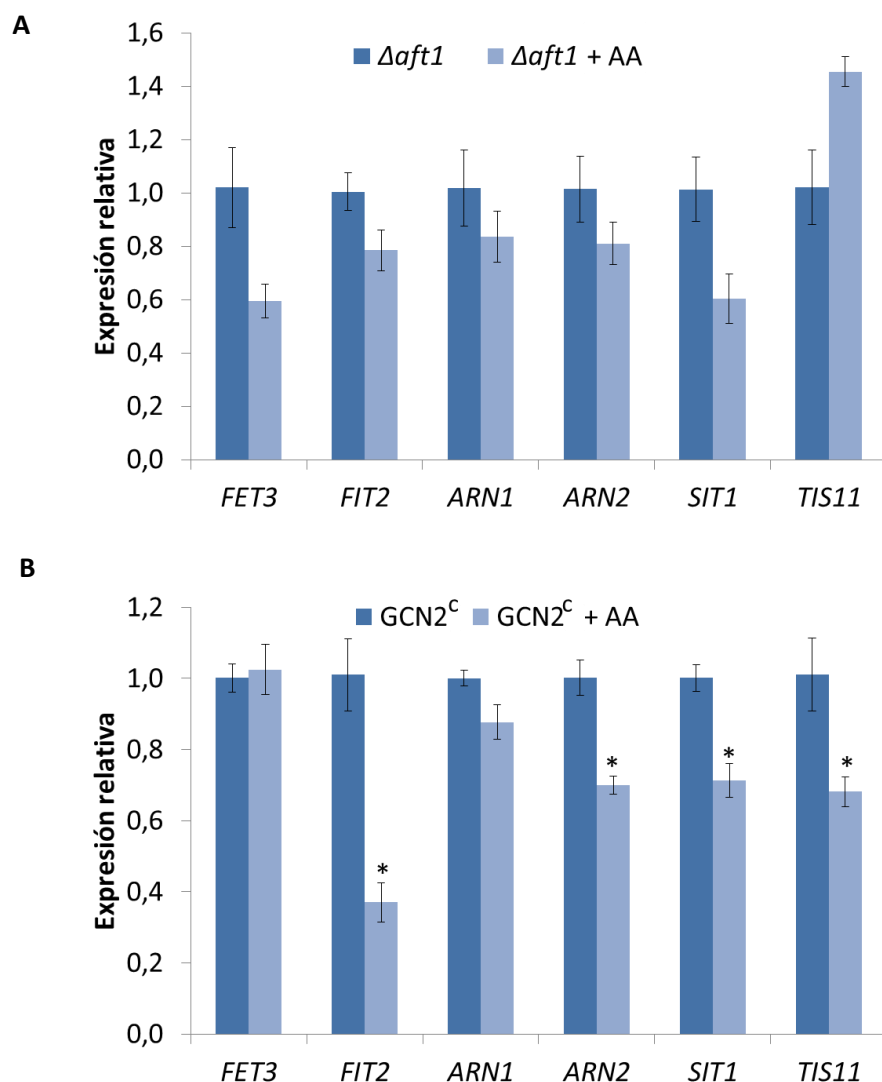


**Figura 10. Análisis de la actividad de la aconitasa en los mutantes de la quinasa Gcn2 y en el tratamiento con aminoácidos.** Se muestra la actividad de la aconitasa en las cepas silvestre (WT),  $\Delta gcn2$ , GCN2<sup>c</sup> y la cepa silvestre bajo tratamiento de aminoácidos (WT+AA). Las células fueron crecidas en medio SD hasta la fase estacionaria de crecimiento.

El mutante  $\Delta gcn2$  muestra una tendencia a tener una menor actividad aconitasa que la cepa silvestre y el mutante GCN2<sup>c</sup> apenas muestra diferencias de actividad con la cepa silvestre. El tratamiento con aminoácidos tiende a presentar un aumento de la actividad de esta enzima.

#### 5.4. Estudio de la expresión relativa de los genes del regulón de hierro en los mutantes $\Delta aft1$ y GCN2<sup>c</sup>.

Como ya se ha mencionado, estudios previos en el laboratorio indican que la ruta GAAC modula la actividad de Aft1 y por tanto la expresión del regulón de hierro. Con el objetivo de comprobar que efectivamente los aminoácidos regulan la expresión de los genes de hierro a través de Aft1 y para ver si existen rutas alternativas a GAAC que también intervengan en la regulación de este factor de transcripción por aminoácidos se diseñó este experimento. Se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real en la que evaluamos la expresión de los mutantes  $\Delta aft1$  y GCN2<sup>c</sup> en condiciones normales y bajo tratamiento con aminoácidos. Si la regulación de Aft1 en presencia de aminoácidos tiene lugar únicamente a través de la ruta GAAC, lo esperable sería que la expresión de los transportadores de hierro en estos mutantes no se viese alterada con el tratamiento con aminoácidos. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 11.



**Figura 11. Expresión relativa de los genes del regulón de hierro en los mutantes  $\Delta aft1$  y GCN2<sup>c</sup>.** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión relativa de 6 genes del regulón de Aft1 en células del mutante  $\Delta aft1$  (A) y del mutante GCN2<sup>c</sup> (B) crecidas hasta la fase exponencial de crecimiento en medio SD normal. \*Diferencias significativas respecto a la cepa que no ha recibido el tratamiento con aminoácidos ( $P < 0,05$ ).

Con respecto al mutante  $\Delta aft1$ , a pesar de que no se observan cambios de expresión significativos entre la condición normal y el tratamiento con aminoácidos, 5 de los 6 genes analizados sí que parecen mostrar una tendencia a disminuir la expresión de estos genes cuando las células son sometidas al tratamiento. En el mutante GCN2<sup>c</sup>, 4 de los 6 genes analizados muestran una reducción significativa de su expresión.

## 6. DISCUSIÓN



Estudios realizados anteriormente en el laboratorio mostraron que un tratamiento con aminoácidos en células de levadura provoca la inhibición de la expresión del regulón de Aft1 (Figura A.1. del Anexo II). El análisis de la localización subcelular de Aft1 mostró una correlación entre esta inhibición y su localización citoplasmática (Figuras 6 y 7). Además, en el análisis de la expresión relativa de los genes del regulón de hierro en el mutante  $\Delta aft1$  no se vieron diferencias significativas entre la expresión de los genes en condiciones normales y el tratamiento con aminoácidos (Figura 11A), lo que demuestra que la regulación de estos genes en respuesta a aminoácidos está mediada principalmente por Aft1. Sin embargo, sí que se observa que la expresión de estos genes tiende a reducirse cuando las células reciben dicho tratamiento, lo que puede deberse a la acción del factor de transcripción Aft2 sobre sus genes diana.

Por otro lado, en el estudio de la localización subcelular de Aft1 se vio que en las células del mutante  $\Delta gcn2$  este factor de transcripción presentaba una localización principalmente citoplasmática en consonancia con el tratamiento con aminoácidos (que inhibe Gcn2), mientras que las células del mutante GCN2<sup>c</sup> mostraban en su mayoría una localización de Aft1 nuclear. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos anteriormente en el laboratorio, en los que se observaba una represión del regulón de hierro en las células del mutante  $\Delta gcn2$  y en las tratadas con aminoácidos, mientras que en el mutante GCN2<sup>c</sup> este regulón aparecía inducido (Figuras A.1 y A.2.A del Anexo II). Los resultados sugieren que los aminoácidos, a través de la inhibición de Gcn2, controlan la expresión del regulón de hierro de una manera dependiente de Aft1.

Sin embargo, en el estudio de la expresión del regulón de hierro en el mutante GCN2<sup>c</sup> se observó que, tras un tratamiento con aminoácidos, se inhibe la expresión de algunos de estos genes (Figura 11B), aunque esta represión del regulón de Aft1 es menor que la observada en la cepa silvestre después de haber sido tratada con aminoácidos (Figura A.1. del Anexo II). Por lo tanto, es probable que otras rutas, además de GAAC, controlen la expresión del regulón de hierro a través de Aft1 en presencia de aminoácidos.

Las diferencias observadas en el contenido total de hierro inicial en el ensayo de toma de este metal (Figura 9A) en las células de los mutantes de la quinasa Gcn2 se podrían explicar debido a las diferencias de expresión de los transportadores de hierro detectadas previamente. Por un lado, el mutante  $\Delta gcn2$  presentó niveles de hierro menores que la cepa silvestre, lo que puede explicarse por el hecho de que en este mutante los transportadores de hierro están inhibidos. Por el contrario, que el mutante GCN2<sup>c</sup> presentase niveles superiores de hierro respecto a la cepa silvestre podría deberse a que tiene los transportadores de hierro inducidos. Estos datos indican que las diferencias de expresión del regulón de hierro en los mutantes de Gcn2 tienen un efecto perceptible a nivel de proteína. La cepa silvestre tratada con aminoácidos presentó unos niveles de hierro superiores a la cepa control. Este hecho aparentemente contradictorio podría explicarse por la capacidad que tienen los aminoácidos de unir hierro si estos compitiesen con el BPS por este metal y facilitasen así su entrada en las células.

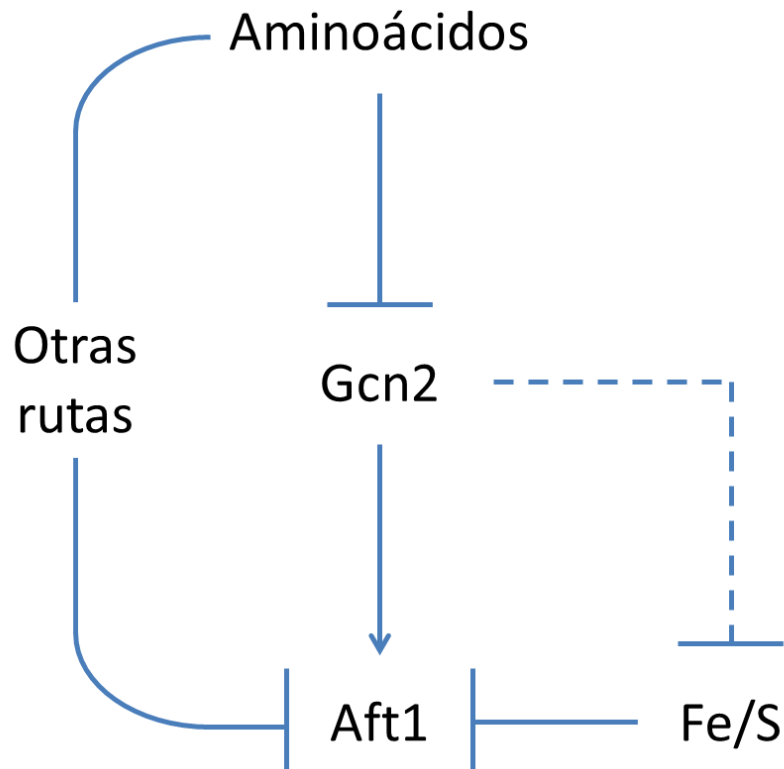
La velocidad de transporte de hierro desde el medio hasta el interior celular que mostró el mutante  $\Delta gcn2$  fue menor que la de la cepa silvestre (Figura 9B), lo que de nuevo podría explicarse por la represión de los transportadores de hierro. Además, el mutante GCN2<sup>c</sup>

también presentó una velocidad de transporte inferior a la de la cepa silvestre. Esto puede ser debido a que inicialmente este mutante ya presentaba unos niveles de hierro intracelulares relativamente altos que podrían estar cerca de los niveles de homeostasis de hierro en condiciones normales, por lo que la tendencia a captar hierro del medio sería menor.

Los resultados obtenidos con los mutantes de Gcn2 en el ensayo de la actividad de la aconitasa no coinciden con lo esperado pues, como se ve en la Figura 10, el mutante  $\Delta gcn2$  mostró menor actividad aconitasa que la cepa silvestre, mientras que el mutante GCN2<sup>c</sup> apenas mostró diferencias. En cambio, el tratamiento con aminoácidos concuerda con lo esperado, ya que sí que se observó un aumento significativo de la actividad aconitasa, lo que explicaría la localización citoplasmática de Aft1 y una menor expresión de los transportadores de hierro. En cualquier caso, con los datos de los que disponemos, no podemos descartar que la ruta GAAC regule la biosíntesis de los complejos Fe/S. Es posible que estos resultados se deban a que Gcn2 es una quinasa de gran relevancia en la célula que probablemente, además de en la regulación de la traducción, intervenga también en otros procesos que regulen enzimas relacionadas con el metabolismo como la aconitasa. De hecho, hay indicios de que Gcn2 podría estimular la traducción selectiva de otros mRNAs además del de *GCN4* (Molin *et al.*, 2011). Cabe destacar la existencia de diversos trabajos que apuntan a que Gcn2 tiene otras funciones más allá de la regulación de la traducción a través de su principal sustrato eIF2 $\alpha$ . Por ejemplo, al producirse daños en el DNA por la exposición a radiación ultravioleta (Tvegard *et al.*, 2007), Gcn2 parece inhibir la síntesis de proteínas y retrasar el ciclo celular en la transición G1/S a través de mecanismos todavía no dilucidados pero independientes de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ . Ello sugiere que Gcn2, al ser activado por daños en el DNA, tendría otros sustratos (componentes de las rutas de reparación y de control del DNA, por ejemplo) mediante los que modularía la respuesta al estrés (Murguía y Serrano, 2012). Por lo tanto, una regulación específica de la ruta GAAC sobre la aconitasa podría enmascarar posibles diferencias en la biosíntesis de complejos Fe/S que explicasen la regulación de Aft1 en los mutantes de *GCN2*.

Con el objetivo de profundizar en el estudio de la regulación de Aft1 por la ruta GAAC podría analizarse la actividad aconitasa en un mutante cuya subunidad  $\alpha$  del factor eIF2 no puede ser fosforilada por Gcn2, ya que estudios anteriores realizados por Marcos Caballero mostraron una considerable represión en la expresión de los transportadores de hierro en este mutante (Figura A.2.B del Anexo II), mientras que la represión que mostraba el mutante  $\Delta gcn2$  fue más sutil (Figura A.2.A del Anexo II). Además, para comprobar si los resultados obtenidos con la enzima aconitasa se deben a diferencias en la cantidad de esta proteína en los diferentes mutantes sería conveniente analizar la aconitasa total en las muestras mediante un *Western Blot*.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos, proponemos el modelo expuesto en la Figura 12 para la regulación de la homeostasis del hierro en presencia de aminoácidos.



**Figura 12. Modelo propuesto para la regulación de la homeostasis del hierro en respuesta a aminoácidos.** La presencia de aminoácidos inhibe, por un lado, la proteína quinasa Gcn2, la cual es el elemento central de la ruta GAAC. En las células con ayuno de aminoácidos, Gcn2 se activa, lo que induce a su vez la activación del factor de transcripción Aft1. Es posible que esta activación se produzca a través de la inhibición de la síntesis de los complejos Fe/S. Por otro lado, los aminoácidos regulan negativamente la acción de Aft1 a través de otras rutas, las cuales por el momento desconocemos. Las líneas continuas indican funciones con el respaldo de evidencias experimentales (descritas anteriormente y en este trabajo), mientras que las líneas discontinuas representan funciones hipotéticas con menor evidencia experimental.

## 7. CONCLUSIONES

- El tratamiento con aminoácidos provoca la localización citoplasmática de Aft1, lo que explica los resultados obtenidos previamente en el laboratorio en los que se observó que dicho tratamiento reprime el regulón de hierro.
- La velocidad de entrada de hierro en el mutante de pérdida de función de *GCN2* y en el mutante con el alelo de *GCN2* constitutivamente activo es menor que en la cepa silvestre. El mutante  $\Delta gcn2$  presenta unos niveles de hierro total en medio con bajo hierro ligeramente inferiores que la cepa silvestre, mientras que en el mutante *GCN2<sup>c</sup>* estos niveles son considerablemente mayores. Esto puede deberse a las diferencias en la expresión de los transportadores de hierro observadas con anterioridad en el laboratorio.
- La actividad aconitasa en las células tratadas con aminoácidos es superior a la que presenta el control. Esto explica que la localización de Aft1 sea mayoritariamente citosólica y que el regulón de hierro se encuentre reprimido.
- El mutante *GCN2<sup>c</sup>* apenas presenta diferencias en la actividad de la enzima aconitasa con respecto a la cepa silvestre, mientras que el mutante  $\Delta gcn2$  tiene una menor actividad. Estos resultados no corresponden con lo esperado, lo que cuestiona la hipótesis de que la regulación del regulón de Aft1 por la ruta GAAC se produzca a través de una modulación de la síntesis de los complejos Fe/S.
- El análisis de la expresión del regulón de hierro en el mutante  $\Delta aft1$  demuestra que los aminoácidos regulan dicha expresión principalmente a través de Aft1. Por otro lado, la expresión de estos genes en el mutante *GCN2<sup>c</sup>* bajo el tratamiento con aminoácidos indica que probablemente existen otras rutas, además de GAAC, que regulan la homeostasis de hierro en respuesta a aminoácidos.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

BIDDICK, R. y YOUNG, E. (2009). The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast*, 26(4), 205-220.

CABALLERO, M. (2016). Estudio de los efectos protectores y mecanismos de acción frente a estrés abiótico de bioestimulantes de fertilizantes en *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Politécnica de Valencia. Tesis Doctoral.

CHEN, O. (2000). CCC1 Suppresses Mitochondrial Damage in the Yeast Model of Friedreich's Ataxia by Limiting Mitochondrial Iron Accumulation. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(11), 7626-7632.

CHEN, R.; ZOU, Y.; MAO, D.; SUN, D.; GAO, G.; SHI, J.; LIU, X.; ZHU, C.; YANG, M.; YE, W.; HAO, Q; LI, R. y YU, L. (2014). The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *The Journal of Cell Biology*, 206(2), 173-182.

CRISP, R.; POLLINGTON, A.; GALEA, C.; JARON, S.; YAMAGUCHI-IWAI, Y. y KAPLAN, J. (2003). Inhibition of Heme Biosynthesis Prevents Transcription of Iron Uptake Genes in Yeast. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(46), 45499-45506.

DANCIS, A.; KLAUSNER, R. D. y YAMAGUCHI-IWAI, Y. (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 14(6), 1231-1239.

DE FREITAS, J.; WINTZ, H.; KIM, JH.; POYNTON, H.; FOX, T. y VULPE, C. (2003). Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *Biometals*, 16(1), 185-97.

DIKICIOGLU, D.; PIR, P. y OLIVER, S. (2013). Predicting complex phenotype-genotype interactions to enable yeast engineering: *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism and a cell factory. *Biotechnology Journal*, 8(9), 1017-1034.

DONG, J.; QIU, H.; GARCIA-BARRIO, M.; ANDERSON, J. y HINNEBUSCH, A. (2000). Uncharged tRNA Activates GCN2 by Displacing the Protein Kinase Moiety from a Bipartite tRNA-Binding Domain. *Molecular Cell*, 6(2), 269-279.

ELLENBERGER, T.; BRANDL, C.; STRUHL, K. y HARRISON, S. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted  $\alpha$  Helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71(7), 1223-1237.

GARBER MORALES, J.; HOLMES-HAMPTON, G.; MIAO, R.; GUO, Y.; MÜNCK, E. y LINDAHL, P. (2010). Biophysical Characterization of Iron in Mitochondria Isolated from Respiring and Fermenting Yeast. *Biochemistry*, 49(26), 5436-5444.

GARCIA-BARRIO, M.; DONG, J.; CHERKASOVA, V. A.; ZHANG, X.; ZHANG, F.; UFANO S.; LAI, R.; QIN, J. y HINNEBUSCH, AG. (2002) Serine 577 is phosphorylated and negatively affects the tRNA binding and eIF2 $\alpha$  kinase activities of GCN2. *Journal of Biological Chemistry*. 277, 30675–30683

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, HW.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H. y OLIVER, S.G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546-567.

GUNISOVA, S. y VALASEK, L. (2014). Fail-safe mechanism of GCN4 translational control--uORF2 promotes reinitiation by analogous mechanism to uORF1 and thus secures its key role in GCN4 expression. *Nucleic Acids Research*, 42(9), 5880-5893.

HAO, S.; SHARP, J.W.; ROSS-INTA, C.M.; MCDANIEL, B.J.; ANTHONY, T.G.; WEK, R.C.; CAVANER, D.R.; MCGRATH, B.C.; RUDELL, J.B.; KOEHNLE, T.J. y GIETZEN, D.W. (2005). Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex. *Science*, 307(5716), 1776-1778.

HINNEBUSCH, A. (2005). Translational regulation of *gcn4* and the general amino acid control of yeast. *Annual Review Of Microbiology*, 59(1), 407-450.

HOLCIK, M. y SONENBERG, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(4), 318-327.

JIANG, H.; WEK, R. y ANTHONY, T. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, 34(1), 7.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A. y ALVES, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *Plos ONE*, 6(2), e16015.

KOSMAN, D. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Molecular Microbiology*, 47(5), 1185-1197.

KUCHARCZYK, R. y RYTKA, J. (2001). *Saccharomyces cerevisiae*--a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4):1025-42.

KUMANOVICS, A.; CHEN, O.; LI, L.; BAGLEY, D.; ADKINS, E.; LIN, H.; DINGRA, N.N.; OUTTEN, C.E.; KELLER, G.; WINGE, D.; WARD, D.M. y KAPLAN, J. (2008). Identification of FRA1 and FRA2 as Genes Involved in Regulating the Yeast Iron Regulon in Response to Decreased Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Synthesis. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(16), 10276-10286.

LAGUNAS, R. (1986). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2(4), 221-228.

LEE, H. y ZHANG, L. (2009). A Unique Mechanism of Chaperone Action: Heme Regulation of Hap1 Activity Involves Separate Control of Repression and Activation. *Protein & Peptide Letters*, 16(6), 642-649.

LI, H.; MAPOLELO, D.; DINGRA, N.; NAIK, S.; LEES, N.; HOFFMAN, B.; RIGGS-GELASCO, P.J.; HUYNH, B.H.; JOHNSON, M.K. y OUTTEN, C.E. (2009). The Yeast Iron Regulatory Proteins Grx3/4 and Fra2 Form Heterodimeric Complexes Containing a [2Fe-2S] Cluster with Cysteinylyl and Histidyl Ligation. *Biochemistry*, 48(40), 9569-9581.



- LI, J.; LIU, J.; WANG, X.; ZHAO, L.; CHEN, Q. y ZHAO, W. (2009). A waterbath method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Biochemistry*, 384(1), 189-190.
- LI, L. y KAPLAN, J. (1998). Defects in the Yeast High Affinity Iron Transport System Result in Increased Metal Sensitivity because of the Increased Expression of Transporters with a Broad Transition Metal Specificity. *Journal Of Biological Chemistry*, 273(35), 22181-22187.
- LI, L.; CHEN, O.; WARD, D. y KAPLAN, J. (2001). CCC1 Is a Transporter That Mediates Vacuolar Iron Storage in Yeast. *Journal Of Biological Chemistry*, 276(31), 29515-29519.
- LILL, R. y MÜHLENHOFF, U. (2008). Maturation of Iron-Sulfur Proteins in Eukaryotes: Mechanisms, Connected Processes, and Diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 669-700.
- LILL, R.; DUTKIEWICZ, R.; ELSÄSSER, H.; HAUSMANN, A.; NETZ, D.; PIERIK, A.; STEHLING, O.; URZICA, E. y MÜHLENHOFF, U. (2006). Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 652-667.
- MENACHO-MÁRQUEZ, M., PEREZ-VALLE, J., ARINO, J., GADEA, J., y MURGUÍA, J. (2007). Gcn2p Regulates a G1/S Cell Cycle Checkpoint in Response to DNA Damage. *Cell Cycle*, 6(18), 2302-2305.
- MOLIN, M.; YANG, J.; HANZÉN, S.; TOLEDANO, M.; LABARRE, J. y NYSTRÖM, T. (2011). Life Span Extension and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Resistance Elicited by Caloric Restriction Require the Peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 43(5), 823-833.
- MURAKAMI, C. Y KAEBERLEIN, M. (2009). Quantifying Yeast Chronological Life Span by Outgrowth of Aged Cells. *Journal Of Visualized Experiments*, (27).
- MURGUÍA, J. Y SERRANO, R. (2012). New functions of protein kinase Gcn2 in yeast and mammals. *IUBMB Life*, 64(12), 971-974.
- NARASIMHAN, J.; STASCHKE, K. y WEK, R. (2004). Dimerization Is Required for Activation of eIF2 Kinase Gcn2 in Response to Diverse Environmental Stress Conditions. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(22), 22820-22832.
- NASHEUER, HP.; SMITH, R.; BAUERSCHMIDT, C.; GROSSE, F. y WEISSHART, K. (2002). Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 72, 41-94.
- NATARAJAN, K.; MEYER, M.; JACKSON, B.; SLADE, D.; ROBERTS, C.; HINNEBUSCH, A. y MARTON, M. (2001). Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular And Cellular Biology*, 21(13), 4347-4368.
- OWSIANOWSKI, E.; WALTER, D. y FAHRENKROG, B. (2008). Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(7), 1303-1310.

- PEÑA-CASTILLO, L. y HUGHES, T. (2007). Why Are There Still Over 1000 Uncharacterized Yeast Genes? *Genetics*, 176(1), 7-14.
- PFAFFL, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e-45.
- PHILPOTT, C. (2006). Iron uptake in fungi: A system for every source. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(7), 636-645.
- PHILPOTT, C. y PROTCHENKO, O. (2007). Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 20-27.
- PHILPOTT, C.; LEIDGENS, S. y FREY, A. (2012). Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1509-1520.
- PUIG, S.; VERGARA, S. y THIELE, D. (2008). Cooperation of Two mRNA-Binding Proteins Drives Metabolic Adaptation to Iron Deficiency. *Cell Metabolism*, 7(6), 555-564.
- QIU, H.; DONG, J.; HU, C.; FRANCKLYN, C. y HINNEBUSCH, A. (2001). The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J*, 20(6), 1425-1438.
- QIU, H.; GARCIA-BARRIO, M. y HINNEBUSCH, A. (1998). Dimerization by Translation Initiation Factor 2 Kinase GCN2 Is Mediated by Interactions in the C-Terminal Ribosome-Binding Region and the Protein Kinase Domain. *Molecular And Cellular Biology*, 18(5), 2697-2711.
- RAMIREZ, M.; WEK, R. y HINNEBUSCH, A. (1991). Ribosome association of GCN2 protein kinase, a translational activator of the GCN4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology*, 11(6), 3027-3036.
- RAWAL, Y.; QIU, H. y HINNEBUSCH, A. (2014). Accumulation of a Threonine Biosynthetic Intermediate Attenuates General Amino Acid Control by Accelerating Degradation of Gcn4 via Pho85 and Cdk8. *Plos Genetics*, 10(7), e1004534.
- ROMANO, P.; GARCIA-BARRIO, M.; ZHANG, X.; WANG, Q.; TAYLOR, D.; ZHANG, F.; HERRING, C.; MATHEWS, M.B.; QIN, J. y HINNEBUSCH, A.G. (1998). Autophosphorylation in the Activation Loop Is Required for Full Kinase Activity In Vivo of Human and Yeast Eukaryotic Initiation Factor 2 $\alpha$  Kinases PKR and GCN2. *Molecular And Cellular Biology*, 18(4), 2282-2297.
- SATTLEGGGER, E. y HINNEBUSCH, A. (2005). Polyribosome Binding by GCN1 Is Required for Full Activation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Kinase GCN2 during Amino Acid Starvation. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(16), 16514-16521.
- SATTLEGGGER, E.; SWANSON, M.; ASHCRAFT, E.; JENNINGS, J.; FEKETE, R.; LINK, A. y HINNEBUSCH, A. (2004). YIH1 Is an Actin-binding Protein That Inhibits Protein Kinase GCN2 and Impairs General Amino Acid Control When Overexpressed. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(29), 29952-29962.

- SCHEKMAN, R. y ORCI, L. (1996). Coat Proteins and Vesicle Budding. *Science*, 271(5255), 1526-1533.
- SHAKOURY-ELIZEH, M.; PROTCHEENKO, O.; BERGER, A.; COX, J.; GABLE, K.; DUNN, T.; PRINZ, W.A.; BARD, M. y PHILPOTT, C.C. (2010). Metabolic Response to Iron Deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Of Biological Chemistry*, 285(19), 14823-14833.
- SHERMAN, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods in Enzymology*, 350, 3-41.
- SOOD, R.; PORTER, A.C.; OLSEN, D.A.; CAVENER, D.R. y WEK, R.C. (2000). A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$ . *Genetics*, 154(2), 787–801.
- STEVENS, B. (1977). Variation in Number and Volume of Mitochondria in Yeast According to Growth-Conditions: Study Based on Serial Sectioning and Computer Graphics Reconstitution. *Biology of the Cell*, 28, 37–56.
- TARUMOTO, Y.; KANO, H. y ISHIKAWA, F. (2013). Receptor for Activated C-Kinase (RACK1) Homolog Cpc2 Facilitates the General Amino Acid Control Response through Gcn2 Kinase in Fission Yeast. *Journal Of Biological Chemistry*, 288(26), 19260-19268.
- TESTE, M.; DUQUENNE, M.; FRANÇOIS, J. y PARROU, J. (2009). Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 99.
- TVEGARD, T.; SOLTANI, H.; SKJOLBERG, H.; KROHN, M.; NILSSEN, E.; KEARSEY, S.; GRALLERT, B. y BOYE, E. (2007). A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes & Development*, 21(6), 649-654.
- UETA, R.; FUJIWARA, N.; IWAI, K. y YAMAGUCHI-IWAI, Y. (2007). Mechanism Underlying the Iron-dependent Nuclear Export of the Iron-responsive Transcription Factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology Of The Cell*, 18(8), 2980-2990.
- UETA, R.; FUJIWARA, N.; IWAI, K. y 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(24), 4998-5008.
- VAN HO, A.; WARD, D. y KAPLAN, J. (2002). Transition Metal Transport in Yeast. *Annual Review Of Microbiology*, 56(1), 237-261.
- VALASEK, L. (2012). 'Ribozomin' – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). *Current Protein & Peptide Science*, 13(4), 305-330.
- WEK, S.; ZHU, S. y WEK, R. (1995). The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Molecular And Cellular Biology*, 15(8), 4497-4506.

WILSON, W. y ROACH, P. (2002). Nutrient-Regulated Protein Kinases in Budding Yeast. *Cell*, 111(2), 155-158.

YAMAGUCHI-IWAI, Y.; UETA, R.; FUKUNAKA, A. y SASAKI R. (2002). Subcellular Localization of Aft1 Transcription Factor Responds to Iron Status in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(21), 18914-18918.

ZABORSKE, J.; NARASIMHAN, J.; JIANG, L.; WEK, S.; DITTMAR, K.; Y FREIMOSER, F.; PAN, T. y WEK, R.C. (2009). Genome-wide Analysis of tRNA Charging and Activation of the eIF2 Kinase Gcn2p. *Journal Of Biological Chemistry*, 284(37), 25254-25267.

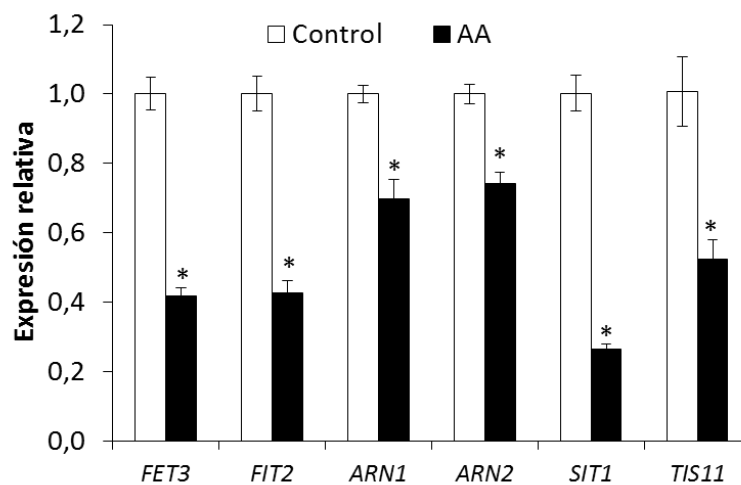
## 9. ANEXOS

## Anexo I

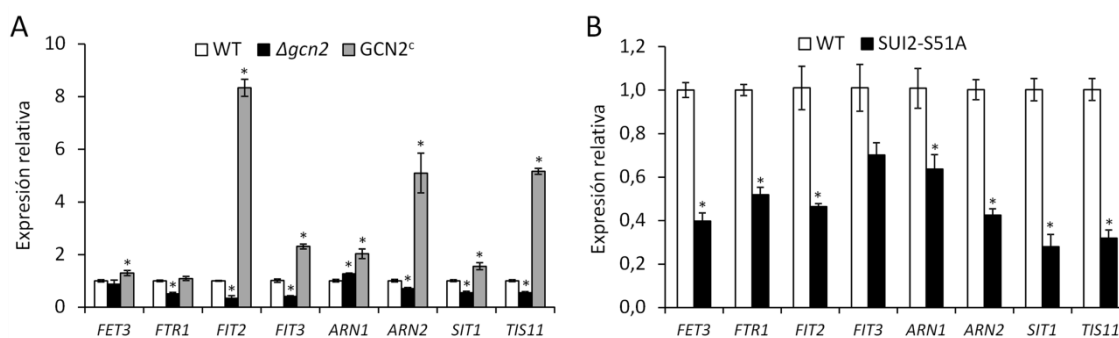
Tabla A.1. Cebadores utilizados para las reacciones de qRT-PCR.

Cebador	Secuencia 5' -> 3'
FET3for	TTCAGCATGCCTTCATTCTAC
FET3rev	TTCGGTCGCATCTCCATATC
FIT2for	CACCGCTGACCCTATCATTAG
FIT2rev	CAGAGGTGGTATCTGGTCCTC
SIT1for	CGGTATCATTGGCTCTTTGTG
SIT1rev	GAGGTTACTACGCCATTCTTG
ARN1for	GATGGTGGCTATGGGTTTATTG
ARN1rev	CAGAGACGGTAACTGGGTAAGTG
ARN2for	CATATGGACGCAGTCATTGTACC
ARN2rev	CTCAACCATCGCAGACCTAAC
TIS11for	ACGGACTCGGCGAATTAAG
TIS11rev	CTGCCATAAGGACAATAACCTAGT
UBC6for	CGGCAAATACAGGTGATGAAAC
UBC6rev	TTCAGCGCGTATTCTGTCTTC

## Anexo II



**Figura A.1. Los aminoácidos provocan la represión del regulón de Aft1.** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión relativa de 11 genes del regulón de Aft1 en células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Ab_{660} \approx 0,4$ ) en medio SD normal en presencia de casaminoácidos (AA) \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ). Figura adaptada de la Tesis Doctoral de Marcos Caballero Molada.



**Figura A.2. La ruta GAAC regula la expresión de los genes involucrados en la homeostasis de hierro.** Mediante qRT-PCR se determinó la expresión relativa de genes del sistema de transporte de hierro de alta afinidad en células de las cepas mutantes  $\Delta gcn2$  y GCN2<sup>c</sup> (A) y SUI2-S51A (B) respecto a sus respectivas cepas silvestres (WT). En el momento de la extracción de las muestras de RNA, las células habían sido crecidas en medio SD hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento ( $Ab_{660} \approx 0,4$ ). \*Diferencias significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ). Figura obtenida de la Tesis Doctoral de Marcos Caballero Molada

## Anexo III

Tabla A.2. Composición aminoacídica de la peptona de caseína ácida (Laboratorios Conda).

<b>Aminoácido</b>	<b>g/100g</b>
Ácido aspártico	5,30
Ácido glutámico	13,70
Alanina	1,70
Arginina	2,00
Cistina	0,20
Fenilalanina	2,00
Glicina	1,00
Histidina	1,40
Isoleucina	2,90
Leucina	5,00
Lisina	4,60
Metionina	1,50
Prolina	5,80
Serina	2,80
Tirosina	1,70
Treonina	2,00
Triptófano	< 1,00
Valina	3,60