



Universitat de Lleida

# **MODULACIÓ DE L'ESTABILITAT DELS mRNAs EN RESPOSTA A DIVERSOS ESTRESSOS AMBIENTALS EN *Saccharomyces cerevisiae***

**LAIA CASTELLS I ROCA**

---

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

---

UNIVERSITAT DE LLEIDA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES



**MODULACIÓ DE L'ESTABILITAT DELS mRNAs  
EN RESPOSTA A DIVERSOS ESTRESSOS AMBIENTALS  
EN *Saccharomyces cerevisiae***

Memòria per a optar al Grau de Doctor  
per la Universitat de Lleida presentada  
per LAIA CASTELLS I ROCA

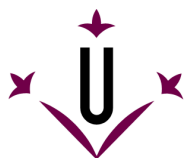
Lleida, juny de 2010

La directora de la Tesi

Dra. Gemma Bellí i Martínez



UNIVERSITAT DE LLEIDA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MÈDIQUES BÀSIQUES



**GEMMA BELLÍ MARTÍNEZ**, Professora Agregada de Microbiologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida,

CERTIFICA:

que **LAIA CASTELLS I ROCA** ha realitzat en el Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultat de Medicina de Lleida, sota la direcció de la Dra. Gemma Bellí Martínez, el treball que presenta per accedir al Grau de Doctor amb el títol: **“Modulació de l’estabilitat dels mRNAs en resposta a diversos estressos ambientals en *Saccharomyces cerevisiae*”**

Per a què així consti, signo el present certificat:

Lleida, 25 de maig de 2010

Dra. Gemma Bellí i Martínez



## AGRAÏMENTS

Moltes mercès a la Gemma i a l'Enric per moltes raons. Vosaltres m'heu acollit, m'heu ensenyat tot el que sé, m'heu ajudat en tot moment, m'heu donat suport i aconsellat, tot el que feu sempre és pel meu bé. Gràcies per no perdre la paciència. Aprecio tots els vostres esforços i aprenc contínuament perquè sou un model per a mi. Enric gràcies per la ciència, els seminaris, els congressos i per deixar-me atansar a aquest món i fer-lo una realitat en la meva vida; gràcies per la teva simpatia, la teva visió racional i la teva capacitat de veure el global ajuntant cada peça, per no perdre el nord, ni l'objectiu de cada experiment. Gemma gràcies per ser-hi, per deixar-me participar de la teva saviesa i animar-me, per escoltar-me i consolar-me, per ser una amiga, en els moments bons i en els dolents, per compartir les teves impressions, per il·lustrar-me, per descobrir-me el laboratori i les seves eines. Gràcies per posar la primera pedra en el meu camí.

Moltes mercès a la Mireia per ser la millor tècnica del món i permetre'm gastar litres i litres i embrutar centenars de matraus i ampolletes; gràcies pel teu suport i la teva alegria. Moltes mercès a la Esther, la Pilar i la Núria que han col·laborat amb mi, colze amb colze i han treballat i suat com jo en la construcció d'espores, experiments de sensibilitats i Northern blots. Moltes mercès a la Celia, la Maria, la Judit, en Carlos, la Sílvia i la Belén per ser els millors companys de laboratori que algú pot imaginar-se, per les converses, les bones estones, el seu bon humor i fer lleuger el que és feixuc.

Moltes mercès a la Núria, a la Mima i a l'Hugo els meus companys i amics al passadís i a fora del laboratori. Vosaltres m'ajudeu, m'animeu i compartiu els meus patiments i les meves alegries, a les verdes i a les madures. Gràcies per la vostra comprensió, en vosaltres em veig reflectida i seieu com costa tot plegat. Vosaltres heu sofert l'evolució d'aquesta tesi i és un goig poder-la gaudir amb els tres.

Moltes mercès al Ramon, perquè aquesta tesi també és teva. Tu més que ningú té paciència, generositat i amor, m'acompanyes, m'esperes i m'animes; aguantes dia rera dia, ets un heroi. Amb tu, anar al laboratori un diumenge és una benedicció. Tu fas les coses més senzilles. Tu et sacrificques constantment per mi. Gràcies per ser-hi.

Moltes mercès a la Rosa Maria, sense ella no ho hauria fet. Tu fas els meus somnis realitat, ets el meu suport logístic i moral, i amb tu tot és fàcil, com un passeig per un jardí, gràcies per escoltar-me, fer-me trobar el camí quan em perdo i guiar el meu esperit més enllà del que es veu. Moltes mercès a la Rossita, que encara aguanta i en part és per a mi, perquè sempre em pregunta i s'interessa, em comprèn i es preocupa. Mercès a en Josep que és un més entre nosaltres i s'esforça i ajuda i treballa perquè tot vagi bé. Gràcies al Jordi, també.



## Al Present

Tal com Déu es dreça davant l'Eternitat  
i la mesura tota amb el seny i amb els braços,  
jo em dreço davant teu, o Present!, despullat  
de somnis massa vells i de records ja lassos.

El passat se'm desfà. M'enlluerna el futur.

Cal un petit espai a la meva poquesa.

¿Un moment que flueix, gota d'un riu obscur,  
podrà ser, solament, la meva eterna presa?

Alguna nit molt íntima, i distès amb esforç,  
m'he dit, en l'interval dels somnis i dels records.

-l'Eternitat és sols un present que s'eixampla.-

Potser l'arrel divina que és soterrada en mi

¿és sols aquest afany, tant difícil de dir,  
de viure en un present una mica més ample?

Màrius Torres





## RESUM

Les cèl·lules reaccionen front els estressos ambientals a través de respostes múltiples que ocorren a nivell transcripcional i posttranscripcional, per tal d'adaptar-se a les noves condicions i contrarestar els possibles danys causats per l'estrès. En aquest treball s'analitzen les respostes a estrès tèrmic i oxidatiu de *Saccharomyces cerevisiae* mitjançant la determinació en paral·lel dels nivells d'mRNA (RA) i de les taxes de transcripció (TR) mitjançant la tècnica de *Genomic Run-On* (GRO) per a cada gen individual a escala genòmica. A més, s'utilitza un algoritme matemàtic adaptat a situacions dinàmiques, com és la resposta a estrès, per a calcular les taxes de degradació teòrica dels mRNAs (TD) a partir de les dades experimentals de TR i RA. Els gens del llevat han estat classificats en diferents grups per homologies de perfils de les cinètiques de TR i RA, resultant distribuïts en 16 i 25 grups en resposta a xoc per calor i a estrès oxidatiu, respectivament. A més, es calcula la mitjana de TD per a cada grup. Aquestes dades prediuen modulacions causades per la contribució de la TD en els patrons d'expressió de la majoria dels transcrits. Els resultats obtinguts mostren dues tendències oposades: una desestabilització general dels mRNA en la resposta a estrès oxidatiu i una estabilització global durant la resposta a l'estrès tèrmic. Malgrat això, en ambdós estressos, un 25% dels gens induïts transcripcionalment no augmenten els seus nivells d'mRNA. Aquesta manca de paral·lelisme prediu canvis importants en l'estabilitat de l'mRNA. Una resposta comuna és la repressió i la forta desestabilització predita en els mRNAs codificants per proteïnes ribosomals i enzims processadors d'rRNA. D'altra banda, la majoria dels mRNAs del proteosoma s'indueixen en els dos estressos i, tot i que aquests s'estabilitzen arran de l'estrès per calor, no ho fan en resposta a l'oxidatiu, fet que suggereix que els canvis en la TD dels mRNAs en resposta a un estrès provoquen diferents modulacions específiques sobre l'RA d'aquest grup de gens. Hem confirmat les prediccions matemàtiques per a alguns gens de diversos grups determinant experimentalment les TDs dels mRNAs emprant el promotor regulable *tetO*. Aquest estudi indica que les respostes a estrès en cèl·lules de llevat estan condicionades no només per la transcripció dels gens, sinó també per la dinàmica de la TD dels mRNAs.

Les nostres anàlisis GRO permeten observar que, arran d'un estrès oxidatiu, els gens del sistema d'alta afinitat d'adquisició de ferro controlat pel transactivador Aft1 s'indueixen transcripcionalment. De forma paral·lela, es demostra que Aft1 s'internalitza transitòriament al nucli. En aquestes condicions, els nivells d'mRNA dels gens de la via no reductiva augmenten, mentre que els transcrits de la via reductiva mediada pel complex Ftr1/Fet3 es mantenen baixos, a causa de la desestabilització del seu mRNA. En conseqüència, els seus nivells de proteïna també són baixos. La degradació d'aquests mRNAs ocorre per la via general 5'-3' i és independent de la proteïna d'unió a RNA Cth2. En concordança, les cèl·lules de llevat són hipersensibles als peròxids quan l'única via funcional d'assimilació de ferro és la via reductiva. Per contra, el peròxid no afecta el creixement quan l'adquisició de ferro es produeix exclusivament a través de la via no reductiva. Això reforça la idea que, en estrès oxidatiu, les cèl·lules d'*S. cerevisiae* redirigeixen l'assimilació de ferro a través de la via no reductiva per minimitzar el dany oxidatiu dels ions ferrosos.



## RESUMEN

Las células reaccionan frente a estreses ambientales a través de respuestas múltiples que ocurren a nivel transcripcional y post-transcripcional para adaptarse a las nuevas condiciones y contrarrestar los posibles daños causados por el estrés. En este trabajo se analizan las respuestas a estrés térmico y oxidativo de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la determinación en paralelo de los niveles de mRNA (RA) y las tasas de transcripción (TR) usando la técnica de *Genomic Run-On* (GRO) para cada gen individual a escala genómica. Además, se utiliza un algoritmo matemático adaptado a situaciones dinámicas, como es la respuesta a estrés, para calcular las tasas de degradación teórica de los mRNAs (TD) a partir de los datos experimentales de TR y RA. Los genes de la levadura han sido clasificados en diferentes grupos según las homologías de los perfiles de las cinéticas de TR y RA. De este modo, los genes se distribuyen en 16 y 25 grupos en respuesta a estrés térmico y oxidativo, respectivamente. Además, se calcula la media de TD para cada grupo. Estos datos predicen modulaciones causadas por la contribución de la TD, en los patrones de expresión de la mayoría de los transcritos. Los resultados obtenidos muestran dos tendencias opuestas: una desestabilización general del mRNA en la respuesta al estrés oxidativo y una estabilización global en la respuesta al choque térmico. Sin embargo, en ambos estreses, alrededor del 25% de los genes inducidos transcripcionalmente no aumentan sus niveles de mRNA. Estas diferencias predicen cambios importantes en la estabilidad del mRNA, así como en la respuesta transcripcional al estrés. Una respuesta común es la represión y la desestabilización predicha en los mRNAs codificantes para proteínas ribosomales y enzimas procesadoras de rRNA. Contrariamente, la mayoría de los mRNAs del proteasoma se inducen en los dos estreses y, aunque estos se estabilizan después del estrés por calor, no lo hacen en respuesta al estrés oxidativo, sugiriendo que cambios en la TD de los mRNAs en respuesta a estrés provocan modulaciones específicas sobre el RA. Hemos confirmado las predicciones matemáticas para algunos genes de diversos grupos determinando experimentalmente las TDs de los mRNAs utilizando el promotor regulable *tetO*. Este estudio indica que las respuestas a estrés en células de levadura están condicionadas no sólo por la transcripción de los genes, sino también por la dinámica de la TD de los mRNAs.

Nuestros análisis GRO permiten observar que en respuesta a estrés oxidativo los genes del sistema de alta afinidad de adquisición de hierro controlado por el transactivador Aft1 se inducen transcripcionalmente. De forma paralela, se demuestra que Aft1 se internaliza transitoriamente en el núcleo. En estas condiciones, los niveles de mRNA de los genes de la vía no reductiva aumentan. Sin embargo, los transcritos de la vía reductiva mediada por el complejo Ftr1/Fet3 se mantienen bajos, debido a la desestabilización de su mRNA. En consecuencia, sus niveles de proteína también son bajos. La degradación de estos mRNAs ocurre por la vía general 5'-3' y es independiente de la proteína de unión a RNA Cth2. En concordancia, las células de levadura son hipersensibles a los peróxidos cuando la única vía funcional de asimilación de hierro es la vía reductiva. Por el contrario, el peróxido no afecta el crecimiento cuando la adquisición de hierro se produce exclusivamente a través de la vía no reductiva. Esto refuerza la idea que,

en respuesta a estrés oxidativo, las células de *S. cerevisiae* redirigen la asimilación de hierro a través de la vía no reductiva para minimizar el daño oxidativo provocado por los iones ferrosos.

## SUMMARY

Cells react against environmental stresses through multiple responses occurring at transcriptional and posttranscriptional levels, in order to adapt themselves to the new conditions and counteract the possible damage caused by stress. In this work the heat and the oxidative stress responses have been analyzed in *Saccharomyces cerevisiae* by parallel determination of mRNA levels (RA) and transcription rates (TR) using the Genomic Run-On (GRO) methodology for each individual gene at a genomic scale. Moreover, a mathematical algorithm has been adapted for dynamic situations, such as the response to stress, to calculate theoretical mRNA decay rates (TD) from the experimental TR and RA data. Yeast genes have been grouped into different clusters, according to homologies of their RA and TR kinetics. In that way, genes are distributed in 16 and 25 clusters upon heat and oxidative stress, respectively. Moreover, the TD average has been calculated for each cluster. These data predict modulations in the RA profiles caused by the TD contribution for most of the transcripts. Two opposite tendencies are observed in response to such stresses: a global trend on mRNA destabilization is shown upon oxidative stress response whereas a general mRNA stabilization occurs during thermal stress response. However, in both stresses, around the 25% of the transcriptionally induced genes do not increase their mRNA levels. This lack of parallelism predicts important changes in mRNA stability as well as in the transcriptional stress response. As a common response, genes for ribosomal proteins and rRNA processing enzymes are abundant among those whose mRNAs are predicted to destabilize. Most of proteasomal genes are upregulated in both stresses. However, these become stabilized among the heat shock, although not in response to oxidative stress, suggesting that changes on the mRNA decay rates in response to one specific stress provoke different responses on the mRNA amount. We have confirmed the mathematical predictions for several genes from different clusters by experimentally determining mRNA decay rates using the regulable *tetO* promoter. This study indicates that stress responses in yeast cells are not only conditioned by gene transcription but also by the mRNA decay dynamics.

Our GRO analyses allow the observation that, upon oxidative stress, genes of the high-affinity system iron acquisition controlled by the Aft1 transactivator are highly transcribed. In parallel, we demonstrate that Aft1 is transiently internalized into the nucleus. In these conditions, the mRNA levels of the non-reductive pathway genes become increased. However, transcripts of the Ftr1/Fet3-mediated reductive pathway remain low due to destabilization of the mRNAs. Consequently, the respective protein levels also remain low. Such mRNA destabilization is mediated by the general 5'-3'-mRNA decay pathway and is independent of the RNA-binding protein Cth2. According with that, yeast cells are hypersensitive to peroxides in growth conditions where only the high-affinity reductive pathway is functional for iron assimilation. On the contrary, peroxide does not affect growth when iron uptake occurs exclusively through the non-reductive pathway. This reinforces the idea that upon oxidative stress *S. cerevisiae* cells redirect iron assimilation through the non-reductive pathway to minimize oxidative damage by the ferrous ions.



## LLISTA D'ABREVIATURES

AR1	Domini transactivador de l'extrem N-terminal del factor de transcripció Hsf1
AR2	Domini transactivador de l'extrem C-terminal del factor de transcripció Hsf1
ARE	Elements ric en AU
AD	Domini activador
BPS	Batofenantrolina àcid disulfònic
c-CRD	Domini C-terminal ric en cisteïnes de <i>YAP1</i>
CER	Resposta comuna ambiental
DA	Domini d'activació
DAPI	4,8-diamino-2-fenilindol
DBD	Domini d'unió a DNA
DDR	Resposta a dany a DNA
DSE	Element de seqüència <i>downstream</i> de l'mRNA
EP	Element de poliadenilació
ESR	Resposta a Estrès Ambiental
FOB	Sideròfor ferrioxamina B
GFP	Proteïna de fluorescència verda ( <i>Green fluorescence protein</i> )
GO	<i>Gene Ontology</i> (consorci que descriu els gens i els seus atributs)
GSH	Glutatió reduït
GSSG	Glutatió oxidat
Grx	Glutaredoxina
HSE	Element de xoc tèrmic
Hsp	Proteïnes de xoc tèrmic
IRES	Llocs d'entrada de ribosomes a l'mRNA
ISC	Centres ferro-sofre
$k_D$	Constant de degradació de l'mRNA
MAPK	MAP quinasa
mtDNA	DNA mitocondrial
NBD	Domini d'unió a nucleòtid
n-CRD	Domini N-terminal ric en cisteïnes de <i>Yap1</i>
NES	Seqüència d'exportació nuclear
NGD	Degradació <i>No-go</i> dels mRNAs
NLS	Seqüència de localització nuclear
NMD	Degradació dels mRNAs sense sentit
NPC	Complex porós nuclear
NSD	Degradació dels mRNAs sense codó de terminació



OD	Densitat òptica
ORF	“ <i>Open reading frame</i> ”
pb	Parells de bases
PCP	Partícula central del proteosoma 20S
PKA	Proteïna-quinasa A
PKC	Proteïna-quinasa C
PP1	Proteïna-fosfatasa 1
PPR	Proteïnes de processament d'rRNAs
PR	Proteïnes ribosomals
PRP	Partícula reguladora del proteosoma 20S
PUFA	Àcids grassos poliinsaturats
RA	Nivells d'mRNA totals
RBP	Proteïnes d'unió a RNA
RE	Reticle endoplasmàtic
RNA Pol I	RNA polimerasa I
RNA Pol II	RNA polimerasa II
rRNA	Àcid ribonuclèic ribosomal
SH	Grup sulfhidril de les proteïnes
sHsp	Proteïna del xoc tèrmic petita
SOD	Superòxid dismutasa
STRE	Element de resposta a estrès
$t_{1/2}$	Temps de vida mitja de l'mRNA
TAFC	Sideròfor triacetilfusarinina C
<i>t</i> -BOOH	Hidroperòxid de <i>tert</i> -butil
TCA	Cicle dels àcids tricarboxílics
TD	Taxa de degradació de l'mRNA
TR	Taxa de transcripció
TR <sub>I</sub>	TR de la RNA Pol I
TR <sub>II</sub>	TR de la RNA Pol II
tRNA	Àcid ribonuclèic de transferència
Trx	Tioredoxina
TZF	Domini en dits de zinc en tàndem
UPR	Resposta de les proteïnes desplegadas
UPS	Sistema d'ubiquitinització i proteosoma
UTR	Regions no traduïbles dels mRNAs
Valor <i>p</i>	Nivell de significació més petit que permet rebutjar la hipòtesi nul·la
YRE	Element de reconeixement de Yap1

# ÍNDEX



I. INTRODUCCIÓ.....	1
1.- L'estrès .....	3
1.1.- L'estrès tèrmic .....	3
1.1.1.- Dany a components cel·lulars per l'efecte de temperatures elevades.....	4
1.1.2.- La resposta cel·lular en front a temperatures elevades .....	5
1.2.- L'estrès oxidatiu .....	5
1.2.1.- Dany a components cel·lulars per l'activitat química de les ROS.....	7
1.2.2.- Els compostos antioxidants .....	9
1.3.- La depleció de ferro.....	10
1.3.1.- La importància de l'homeòstasi del ferro .....	11
2.- El model.....	12
2.1.- L'estrès tèrmic en <i>S. cerevisiae</i> . .....	13
2.1.1.- Fenotips que presenta <i>S. cerevisiae</i> en l'estrès tèrmic.....	13
2.1.2.- Efectes del xoc tèrmic en <i>S. cerevisiae</i> .....	14
2.1.3.- Defensa al dany tèrmic en <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.2.- L'estrès oxidatiu en <i>S. cerevisiae</i> .....	24
2.2.1.- Agents oxidants en <i>S. cerevisiae</i> .....	24
2.2.2.- Efectes generals de l'estrès oxidatiu en <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.2.3.- Protecció antioxidant en <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.3.- La depleció de ferro en <i>S. cerevisiae</i> .....	30
2.3.1.- Estratègies d' <i>S. cerevisiae</i> en front la privació de ferro .....	30
2.3.2.- L'homeòstasi del ferro mitocondrial .....	35
3.- La resposta a estrès en llevat .....	36
3.1.- La resposta general a estrès .....	37
3.1.1.- La resposta transcripcional .....	37
3.2.- La resposta a estrès tèrmic.....	41
3.2.1.- La resposta transcripcional a estrès tèrmic .....	41
3.3.- La resposta a estrès oxidatiu.....	45
3.3.1.- La resposta transcripcional a estrès oxidatiu .....	45
3.4.- La resposta a depleció de ferro .....	47

## Índex

3.4.1.- La resposta transcripcional a depleció de ferro .....	47
3.4.2.- Els mecanismes posttranscripcionals en la depleció de ferro .....	51
4.- La regulació posttranscripcional dels mRNAs en <i>S. cerevisiae</i> .....	53
4.1.- Vies de degradació dels mRNAs .....	55
4.1.1.- Via majoritària de degradació dels mRNAs, dependent de cua poli(A).....	55
4.1.2.- Altres vies de degradació dels mRNAs menys habituals .....	57
4.1.3.- Vies de degradació dels mRNAs defectuosos .....	57
4.1.4.- Vies específiques de degradació dels mRNAs .....	58
4.2.- Regulació de la degradació dels mRNAs .....	59
4.2.1.- Determinats de la degradació dels mRNAs actuant en <i>cis</i> .....	59
4.2.2.- Determinants de la degradació de l'mRNA actuant en <i>trans</i> .....	60
4.3.- L'estabilitat dels mRNAs en estrès .....	63
<b>II. OBJECTIUS .....</b>	<b>65</b>
<b>III. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>69</b>
1.- Soques emprades .....	71
1.1.- Soques de llevat .....	71
1.2.- Soques de bacteri .....	73
2.- Condicions de creixement dels cultius .....	74
2.1.- Medis de cultiu .....	74
2.1.1.- Medis de cultiu pel creixement de llevat .....	74
2.1.2.- Medis de cultiu pel creixement de bacteris.....	75
2.2.- Característiques dels cultius .....	75
2.2.1.- Condicions d'estrès.....	76
2.2.2.- Cinètiques de resposta a estrès .....	76
2.2.3.- Cinètiques de tancament de la transcripció .....	76
2.2.4.- Estudis fenotípics de creixement .....	76
3.- Tècniques de biologia molecular .....	77
3.1.- Extracció de DNA genòmic en <i>S. cerevisiae</i> .....	77
3.2. Tècniques de DNA recombinant.....	78
3.2.1.- Amplificació i clonació dels gens estudiats.....	78

3.2.2.- Mètodes de transformació en <i>E. coli</i> .....	78
3.2.3.- Mètodes de transformació en <i>S. cerevisiae</i> .....	78
3.3. Tècniques de detecció de biomolècules .....	80
3.3.1.- Anàlisi d'expressió gènica en <i>S. cerevisiae</i> per Northern Blot.....	80
3.3.2.- Anàlisi dels nivells de proteïnes en <i>S. cerevisiae</i> per Western Blot .....	84
4.- Tècniques de microscòpia .....	84
5.- Tècniques per a la detecció de ferro .....	84
6.- Tècniques genòmiques .....	85
6.1.- Obtenció de mostres per al <i>Genomic Run On</i> .....	85
6.2.- Protocol de <i>Transcription Run On</i> (TRO).....	85
6.3.- Tractament de les mostres d'RNA.....	86
6.4.- Obtenció de cDNA .....	86
6.5.- Hibridació de les membranes de niló .....	87
6.6.- Quantificació dels senyals d'hibridació de <i>Run-on</i> i cDNA.....	88
6.7.- Normalització de les dades obtingudes mitjançant la tècnica de GRO .....	88
6.7.1.- Normalització de les dades de cDNA.....	88
6.7.2.- Normalitzacions de les dades de TR.....	89
7.- Càlculs de la constant de degradació o $k_D$ .....	89
8.- Anàlisi informàtic de dades .....	90
8.1.- Anàlisi estadística de les dades de TR i RA .....	90
8.2.- Agrupament dels gens per patrons de perfils d'expressió .....	90
8.3.- Cerca de grups funcionals.....	90
8.4.- Cerca de motius en les seqüències 3'UTR i 5'UTR.....	90
8.5.- Cerca d'associacions reguladores entre gens i factors transcripcionals .....	91
<b>IV. RESULTATS.....</b>	<b>93</b>
<b>1a PART Anàlisi de la resposta transcripcional d'<i>S. cerevisiae</i> en resposta a l'estrès tèrmic .....</b>	<b>95</b>
1.1.- Anàlisi de la resposta a estrès tèrmic mitjançant la tècnica de GRO .....	97
1.1.1.- Disseny experimental per a l'estudi de la resposta a l'estrès tèrmic moderat .....	97
1.1.2.- Efecte general de l'estrès tèrmic moderat en els paràmetres de transcripció .....	98

## Índex

1.1.3.- Efecte del xoc tèrmic moderat en els nivells d'mRNA i les taxes de transcripció .....	98
1.1.4.- Efecte del xoc tèrmic en l'estabilitat dels mRNAs .....	101
1.1.5.- Les categories funcionals associades a la classificació en grups arran l'estrès tèrmic.....	103
1.2.- Determinació experimental de les vides mitjanes dels mRNA mitjançant l'ús del promotor <i>tet</i> .....	108
1.2.1.- Disseny experimental per a l'estudi de l'estabilitat dels mRNAs en resposta a l'estrès tèrmic .....	109
1.2.2.- Determinació de les vides mitjanes dels mRNAs en resposta a l'estrès tèrmic.....	109
<b>2a PART Anàlisi de la resposta transcripcional d'<i>S. cerevisiae</i> en resposta a l'estrès oxidatiu .....</b>	<b>119</b>
2.1.- Anàlisi de la resposta a estrès oxidatiu mitjançant la tècnica de GRO.....	121
2.1.1.- Disseny experimental de l'aplicació de l'estrès oxidatiu amb <i>t</i> -BOOH.....	121
2.1.2.- Efecte de les condicions d'estrès oxidatiu en els paràmetres de transcripció.....	122
2.1.3.- Efecte de l'estrès oxidatiu en els nivells d'mRNA i les taxes de transcripció.....	122
2.1.4.- Efecte de l'estrès oxidatiu en l'estabilitat dels mRNAs .....	126
2.1.5.- Les categories funcionals associades a la classificació en grups arran l'estrès oxidatiu .....	129
2.2.- Determinació experimental de les vides mitjanes dels mRNA mitjançant l'ús del promotor <i>tet</i> .....	134
2.2.1.- Disseny experimental per a l'estudi de l'estabilitat dels mRNA en resposta a l'estrès oxidatiu .....	134
2.2.2.- Determinació de les vides mitjanes dels mRNAs en resposta a l'estrès oxidatiu.....	135
<b>3a PART Modulació del reguló Aft1 en resposta a l'estrès oxidatiu .....</b>	<b>141</b>
3.1.- Implicació del factor transcripcional Aft1 en resposta a l'estrès oxidatiu .....	143
3.1.1.- L'estrès oxidatiu indueix la transcripció dels gens involucrats en el sistema d'alta afinitat de captació de ferro.....	143
3.1.2.- Importància dels factors de transcripció Aft1 i Aft2 en resposta a l'estrès oxidatiu .....	145
3.1.3.- L'estrès oxidatiu afecta transitòriament la compartimentació d'Aft1 .....	145
3.2.- El reguló Aft1 no s'activa en estrès oxidatiu en absència de síntesi d'ISC.....	148
3.3.- La via reductiva del sistema d'alta afinitat de captació de ferro durant estrès oxidatiu	150
3.3.1.- L'estrès oxidatiu afecta a la degradació dels mRNAs dels gens responsables de la via reductiva de captació de ferro .....	150
3.3.2.- Els nivells de proteïna de Fet3 i Ftr1 no es veuen significativament afectats arran de l'estrès oxidatiu .....	152
3.3.3.- La funcionalitat de la via reductiva s'afecta negativament amb l'estrès oxidatiu .....	153

3.4.- Cerca de proteïnes candidates a la desestabilització dels mRNAs de la via reductiva en resposta a l'estrès oxidatiu .....	155
3.4.1.- Cth2 no afecta la TD dels mRNAs de <i>FET3</i> i <i>FTR1</i> durant l'estrès oxidatiu .....	155
3.4.2.- Cerca de proteïnes d'unió a RNA i RNases implicades en la supervivència cel·lular en front de l'estrès oxidatiu i depleció de ferro .....	160
3.4.3.- Cerca bibliogràfica d'altres proteïnes d'unió a RNA i RNases candidates a degradar mRNA en condicions d'estrès oxidatiu .....	167
<b>V. DISCUSSIÓ .....</b>	<b>169</b>
1.- La resposta transcripcional d' <i>S. cerevisiae</i> front a l'estrès tèrmic i oxidatiu.....	171
2.- Modulació del reguló Aft1 en resposta a estrès oxidatiu .....	181
<b>VI. CONCLUSIONS .....</b>	<b>189</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>193</b>
<b>VIII. ARTICLES.....</b>	<b>211</b>
HEAT SHOCK RESPONSE IN YEAST INVOLVES BOTH CHANGES IN TRANSCRIPTION RATES AND mRNA STABILITIES .....	213
COMPREHENSIVE TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE OXIDATIVE RESPONSE IN YEAST .....	229
YEAST CELLS MODULATE THE HIGH-AFFINITY IRON UPTAKE SYSTEM UPON OXIDATIVE STRESS .....	241

## ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Paràmetres de classificació de l'estrès tèrmic.....	3
Taula 2. Exemples de ROS, la seva formació i afectació cel·lular. ....	6
Taula 3. Reaccions amb productes ROS .....	7
Taula 4. Compostos antioxidants .....	9
Taula 5. Formulació química dels principals compostos oxidants utilitzats en llevats.....	25
Taula 6. Gens diana dels factors de transcripció Aft1 i Aft2, localització i funció .....	51
Taula 7. Proteïnes implicades en l'estabilitat dels mRNAs en <i>S. cerevisiae</i> .....	62
Taula 8. Les soques de llevat utilitzades.....	73
Taula 9. Els plàsmids utilitzats .....	74
Taula 10. Components del <i>Drop out</i> i la seva quantitat en la barreja. ....	75



## Índex

Taula 11. Gens amb patrons d'expressió de resposta a estrès oxidatiu i tèrmic amb inducció de la TR i valors constants o reprimits d'RA.....	126
Taula 12. Percentatge d'inducció o repressió dels paràmetres transcripcionals obtinguts segons els perfils dels patrons de resposta a estrès tèrmic i oxidatiu, en els experiments GRO.....	133
Taula 13. Soques delecionades pels gens codificants per proteïnes involucrades en la degradació d'mRNA .....	161

## ÍNDEX D'IL·LUSTRACIONS

Il·lustració 1. El conjunt de xaperones en la cèl·lula d' <i>S. cerevisiae</i> segons la seva sublocalització.....	17
Il·lustració 2. Esquema de l'entrada de ferro en <i>S. cerevisiae</i> per les vies de baixa i alta afinitat de ferro ...	31
Il·lustració 3. Gens diana del factor de transcripció Hsf1 classificats segons la seva funció.....	44
Il·lustració 4. Esquema de l'estructura del factor de transcripció Yap1 .....	46
Il·lustració 5. Esquema de l'estructura del factor de transcripció Aft1 .....	48
Il·lustració 6. Esquema de la regulació posttranscripcional del reguló de ferro .....	53
Il·lustració 7. Esquema de l'estructura de l'mRNA eucariota que il·lustra alguns elements de regulació posttranscripcional .....	54
Il·lustració 8. La via de degradació majoritària de l'mRNA.....	56
Il·lustració 9. Disseny experimental de la presa de mostres per l'anàlisi GRO en resposta a l'estrès tèrmic.	97
Il·lustració 10. Valors de diferents paràmetres transcripcionals en resposta a l'estrès tèrmic .....	98
Il·lustració 11. Agrupació dels gens d' <i>S. cerevisiae</i> per homologia en els patrons d'expressió durant l'estrès tèrmic moderat.....	99
Il·lustració 12. Grup 11 desglossat.....	101
Il·lustració 13. Perfils de TD dels 16 grups resultants en resposta a l'estrès tèrmic .....	102
Il·lustració 14. Dades GRO per a les categories funcionals GO "Proteïnes Ribosomals" i de "Proteïnes del Processament de l'rRNA" en resposta a l'estrès tèrmic .....	104
Il·lustració 15. Dades GRO per a les categories funcionals GO de la "Partícula Reguladora del Proteosoma" i del "Complex Central del Proteosoma" en resposta a l'estrès tèrmic .....	106
Il·lustració 16. Dades GRO per a la categoria funcional GO de "Plegament de Proteïnes" en resposta a l'estrès tèrmic .....	107
Il·lustració 17. Valors de TR i RA dels mRNAs codificants per Hsps durant estrès tèrmic.....	108
Il·lustració 18. Disseny experimental per a la determinació de la vida mitjana dels mRNAs en l'estrès tèrmic .....	109
Il·lustració 19. Resum de les dades de TR, RA i TD pel gen <i>HSP42</i> en l'estrès tèrmic.....	110

Il·lustració 20. Efectes de la transcripció del gen <i>ALD4</i> arran de l'estrès tèrmic .....	111
Il·lustració 21. Dades de transcripció de l'mRNA d' <i>HSP104</i> en l'estrès tèrmic moderat .....	112
Il·lustració 22. Resum de les dades de TR, RA i TD pel gen <i>RPS6A</i> en l'estrès tèrmic .....	113
Il·lustració 23. Dades transcripcionals de l' <i>RRP40</i> en l'estrès tèrmic .....	114
Il·lustració 24. Paràmetres transcripcionals d' <i>UTP30</i> després d'un estrès tèrmic moderat .....	115
Il·lustració 25. Dades del trànscrip <i>HSP26</i> en el xoc tèrmic de 25°C a 37°C .....	116
Il·lustració 26. Dades de transcripció durant un xoc tèrmic del gen <i>HSP12</i> .....	118
Il·lustració 27. Disseny experimental de la presa de mostres en l'estrès oxidatiu per a l'anàlisi de GRO. Es parteix d'un cultiu creixent en fase exponencial a 30°C i després de recollir la mostra del temps inicial es procedeix .....	121
Il·lustració 28. Valors dels diferents paràmetres transcripcionals en l'experiment de cinètica en resposta a l'estrès oxidatiu .....	122
Il·lustració 29. Agrupació dels gens d' <i>S. cerevisiae</i> per homologia de patrons d'expressió durant l'estrès oxidatiu .....	123
Il·lustració 30. Nombre de gens amb TR induïda i RA pla o reprimit en resposta als dos estressos .....	124
Il·lustració 31. Perfils de TD dels 25 grups resultants de l'estrès oxidatiu .....	127
Il·lustració 32. Histograma de totes les desviacions de les $k_D$ inicials durant l'estrès oxidatiu .....	128
Il·lustració 33. Dades GRO per a les categories funcionals <i>GO</i> "Proteïnes Ribosomals" i "Proteïnes del Processament de l'rRNA" després d'un estrès oxidatiu .....	130
Il·lustració 34. Dades GRO per a la categoria funcional <i>GO</i> "Activitat Oxidoreductasa" en l'estrès oxidatiu .....	131
Il·lustració 35. Dades GRO per a la categoria funcional <i>GO</i> "Complex Central del Proteosoma" en l'estrès oxidatiu .....	132
Il·lustració 36. Paràmetres transcripcionals dels gens Hsps en els experiments GRO d'estrès oxidatiu .....	132
Il·lustració 37. Disseny experimental per a la determinació de la vida mitjana dels mRNAs en resposta a l'estrès oxidatiu .....	135
Il·lustració 38. Dades de transcripció de l'mRNA d' <i>HSP104</i> en resposta a l'estrès oxidatiu .....	136
Il·lustració 39. Resultats obtinguts per l'mRNA d' <i>HSP42</i> en l'estudi de l'efecte de l'estrès oxidatiu .....	137
Il·lustració 40. Paràmetres de transcripció del gen <i>FIT3</i> durant l'estrès oxidatiu amb <i>t</i> -BOOH .....	138
Il·lustració 41. Dades del trànscrip <i>RRP40</i> en l'estrès oxidatiu .....	139
Il·lustració 42. Paràmetres de la transcripció del gen <i>ALD4</i> en l'estrès oxidatiu .....	140
Il·lustració 43. Dades de la resposta a estrès oxidatiu dels gens diana d'Aft1/Aft2 analitzats per GRO .....	143
Il·lustració 44. Expressió dels gens del reguló d'Aft1 en les soques salvatge, $\Delta aft1$ i $\Delta yap1$ arran de l'estrès oxidatiu .....	144
Il·lustració 45. Assajos de creixement en dilucions seriades en plaques YPD amb 0,15 mM de <i>t</i> -BOOH en $\Delta aft1$ i $\Delta aft2$ .....	145
Il·lustració 46. Localització transitòria d'Aft1 al nucli arran de l'estrès oxidatiu .....	146
Il·lustració 47. Expressió del gen <i>AFT1</i> després d'un estrès oxidatiu .....	147
Il·lustració 48. Patró d'expressió del factor de transcripció Aft2 després de l'estrès oxidatiu .....	148

## Índex

Il·lustració 49. El reguló Aft1 no s'activa arran de l'estrès oxidatiu quan manca un mecanisme funcional per a la síntesi d'ISC .....	149
Il·lustració 50. Resposta transcripcional a dos estressos oxidatius consecutius.....	150
Il·lustració 51. Efectes de desestabilització en els mRNAs codificants pel complex Fet3/Ftr1 de la via reductiva en el sistema de captació de ferro.....	151
Il·lustració 52. Nivells proteics de Fet3, Ftr1 i Fit3 i percentatge de ferro intracel·lular en resposta a l'estrès oxidatiu.....	153
Il·lustració 53. Assajos de sensibilitats de soques mutants per a la via reductiva i no reductiva del sistema d'alta afinitat de captació de ferro.....	154
Il·lustració 54. Dades de transcripció dels gens <i>CTH1</i> i <i>CTH2</i> en estrès oxidatiu.....	155
Il·lustració 55. Valors mitjans per al gen <i>RNT1</i> dels experiments de GRO durant l'estrès oxidatiu .....	156
Il·lustració 56. Comportament del mutant $\Delta ch1\Delta ch2$ en el fons W303.....	157
Il·lustració 57. Expressió de <i>CTH1</i> i <i>CTH2</i> durant l'estrès oxidatiu en les soques $\Delta msn2/4$ i $\Delta yap1$ .....	157
Il·lustració 58. Efecte de Cth2 en l'expressió dels gens del reguló Aft1 arran d'un estrès oxidatiu.....	158
Il·lustració 59. Quantificació dels nivells basals d'expressió de quatre gens del reguló Aft1 en soques que expressen o no <i>CTH2</i> .....	159
Il·lustració 60. Vides mitjanes dels mRNAs de <i>FET3</i> , <i>FTR1</i> i <i>FIT3</i> en les soques que expressen o no <i>CTH2</i> .....	160
Il·lustració 61. Comportament del mutant $\Delta ch1\Delta ch2$ en estrès oxidatiu .....	160
Il·lustració 62. Assaig de sensibilitats en estrès oxidatiu i en privació de ferro de les soques mutants per proteïnes involucrades en la degradació d'mRNA.....	162
Il·lustració 63. Anàlisi de l'expressió de gens del reguló Aft1 en mutants per a proteïnes implicades en la degradació de l'mRNA.....	163
Il·lustració 64. Expressió dels gens del reguló Aft1 en les soques $\Delta xrn1$ i $\Delta ccr4$ arran de l'estrès oxidatiu.....	164
Il·lustració 65. Vides mitjanes dels mRNAs de <i>FET3</i> , <i>FTR1</i> i <i>FIT3</i> en els mutants $\Delta xrn1$ i $\Delta ccr4$ .....	165
Il·lustració 66. Assaig de sensibilitats de les soques mutants que sobreexpressen <i>FET3</i> , <i>FTR1</i> i <i>FIT3</i> combinades amb els mutants $\Delta xrn1$ o $\Delta ccr4$ .....	166
Il·lustració 67. Transcripció dels gens del reguló Aft1 en mutants simples i dobles per a proteïnes de la família PUF i la proteïna Hek2 després de l'addició de <i>t</i> -BOOH.....	167

# **I. INTRODUCCIÓ**



## 1.- L'estrès

Tots els tipus cel·lulars tenen unes condicions òptimes de creixement. Les alteracions en l'ambient extern tenen efectes directes en l'homeòstasi cel·lular, afectant-ne la seva supervivència. La situació d'estrès per a la cèl·lula es crea, precisament, quan hi ha canvis que modifiquen els seus processos normals. Les cèl·lules han desenvolupat mecanismes de resposta i adaptació en front a canvis ambientals de naturalesa química o física (en la temperatura, humitat, pressió, radiació, salinitat, pH, presència d'ions, agents químics tòxics, disponibilitat de nutrients i patògens), els quals inclouen modificacions a tots els nivells: metabolisme, velocitat de creixement, programes de cicle i/o de diferenciació cel·lulars, etc.

Hom pot distingir entre dos tipus d'estrès. Un estrès és moderat quan les cèl·lules que el pateixen continuen el seu creixement i la seva divisió. Un estrès és sever quan hi ha afectacions greus en la fisiologia i el creixement normal de l'organisme.

### 1.1.- L'estrès tèrmic

Un organisme pateix estrès tèrmic quan suporta reaccions físiques i fisiològiques a temperatures fora de la seva zona òptima. L'estrès tèrmic es pot classificar en moderat (un fenomen natural i sovint beneficiós, ja que Park i col·laboradors (2005) postulen que tant en processos on s'incrementa moderadament la temperatura, per exemple la febre, com en presència de ROS, es desencadenen fenòmens fisicoquímics que porten a l'activació de molècules senyalitzadores involucrades en el creixement i la diferenciació cel·lular) i sever (normalment destructiu fisiològicament). Aquesta classificació es fa en base als següents paràmetres d'afectació i resposta cel·lular:

	Estrès tèrmic moderat	Estrès tèrmic sever
Desnaturalització de: polipèptids naixents proteïnes preexistents	sí no	sí sí
Activació del factor de transcripció Hsf1	alta	molt alta
Síntesi de proteïnes del xoc tèrmic (Hsps)	alta	molt alta
Aturada del cicle cel·lular	no	aturada en G1/S i G2/M
Proliferació cel·lular	segons el tipus cel·lular	no
Diferenciació	segons el tipus cel·lular	no
Apoptosi	no	no
Adquisició de termotolerància	sí	sí
Rellevància biològica	adaptació de les condicions de creixement	morbidityat o mort cel·lular

**Taula 1.** Paràmetres de classificació de l'estrès tèrmic. Adaptada de Park *et al*, 2005.

## Introducció

### 1.1.1.- Dany a components cel·lulars per l'efecte de temperatures elevades

Un xoc tèrmic produeix canvis físics directes en les estructures i orgànuls cel·lulars, que condueixen a alteracions en els seus components i aquests poden deixar de realitzar les seves funcions (Sonna *et al*, 2002).

#### 1.1.1.1.- Canvis en la permeabilitat i fluïdesa de la membrana

Els lípids de les membranes ràpidament es desorganitzen molecularment donant lloc a la hiperfluïdesa i formen estructures locals transitòries, perdent la forma típica de bicapa. A més, es perden les interaccions lípid-proteïna de la membrana plasmàtica, desequilibrant la integritat de la membrana. Alguns organismes regulen la fluïdesa de la membrana en front a un estrès tèrmic augmentant la composició d'àcids grassos insaturats.

Les alteracions en els lípids de la membrana porten també a l'increment de fluxos d'ions:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ . L'augment del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular estimula l'activitat de les proteïna-quinases dependents de calmodulina, la producció d'inositol trifosfat i altres cascades senyalitzadores. A més, les alteracions en l'activitat de l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  i la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa fan que el potencial de membrana s'hiperpolaritzi (Park *et al*, 2005).

#### 1.1.1.2.- Alteració de les estructures cel·lulars

En incubar les cèl·lules a altes temperatures, s'esdevenen diverses modificacions morfològiques (Welch i Suhan, 1985):

I. **Del citoesquelet:** Hi ha canvis en l'arquitectura del citoplasma, per exemple s'incrementa l'mRNA dels grànuls d'estrès. Els microfilaments d'actina s'allarguen i consegüentment les cèl·lules adopten forma aplanada. Els filaments intermedis que contenen vimentina es col·lapsen i s'agregen al voltant del nucli.

II. **Del nucli:** El nuclèol sembla descondensar-se i la cromatina es reorganitza. També, apareixen estructures fibroses dins el nucli i estructures electrodenses molt petites, que poden correspondre a grànuls de pericromatina.

III. **D'orgànuls cel·lulars:** Els mitocondris tenen una forma més inflada i es localitzen més a prop del nucli; els complexos de Golgi es desorganitzen.

#### 1.1.1.3.- Inhibició de la progressió del cicle cel·lular

En una exposició aguda a un estrès tèrmic sever es produeix una aturada transitòria del cicle cel·lular, bàsicament en dos punts de control: en les transicions G1/S i G2/M. A més, xocs més severos poden conduir a l'apoptosi (la mort cel·lular programada).

#### **1.1.1.4.- Alteracions en l'estructura i la funció de les proteïnes**

La transició de l'estructura de les proteïnes i el seu desplegament depèn del canvi de capacitat calòrica i aquesta es determina mitjançant la temperatura intrínseca de l'entalpia de solvatació dels grups proteics i de la dependència de la temperatura per a conservar la seva distribució conformacional. Per tant, un canvi en la temperatura pot alterar les estructures i les interaccions d'un gran nombre de proteïnes cel·lulars (Park *et al*, 2005). D'aquesta manera, els canvis ambientals sobtats i la multitud de molècules influencien en els processos de plegament de les cadenes sintetitzades de nou i promouen la pèrdua de la conformació nativa dels polipèptids madurs. Aquesta desnaturalització porta a la manca de funcions proteiques i, també, a la formació de polipèptids agregats. A més, la mala conformació de les proteïnes impossibilita el correcte ensamblatge dels complexos macromoleculars afectant molts processos cel·lulars, com la transcripció, el processament de l'mRNA, la traducció o el transport (Bond, 2006).

#### **1.1.1.5.- Alteracions en el metabolisme cel·lular**

L'augment en la síntesi de les proteïnes de xoc tèrmic (Hsps), com a desencadenats de la resposta, fa incrementar les necessitats energètiques cel·lulars; ja que aquestes consumeixen molt ATP. Per tant, es reorganitza l'expressió i la síntesi dels gens implicats en la glucòlisi i glicòlisi. A més, en el cas del llevat, es produeixen grans quantitats de trehalosa, una molècula protectora d'estructures cel·lulars (com la membrana plasmàtica) que participa en processos cel·lulars, com la síntesi de glicoproteïnes.

#### **1.1.2.- La resposta cel·lular en front a temperatures elevades**

Per tal de protegir-se i adaptar-se a l'estrès tèrmic, les cèl·lules sintetitzen proteïnes, com les Hsps i les ubiquitines. Les Hsps són unes proteïnes altament conservades durant l'evolució i agrupades en famílies segons el seu pes molecular. La importància d'aquestes proteïnes en la resposta al xoc de calor rau en les seves funcions (Morano *et al*, 1998): (i) són xaperones moleculars, capaces de protegir les seves proteïnes substrat contra associacions improductives; (ii) guien les proteïnes naixents cap llurs conformacions actives i localitzacions subcel·lulars, és a dir, la maduració de les proteïnes; (iii) col·laboren en la renaturalització de les proteïnes malmeses; (iv) participen en el marcatge de les proteïnes amb danys irreparables per a la seva degradació i (v) estan involucrades en l'activació de proteïnes de transducció de senyals i factors de transcripció (Hahn *et al*, 2004). Les ubiquitines, en els eucariotes, són un tipus d'Hsps que degraden ràpidament les proteïnes desnaturalitzades i en procariotes, són proteases induïbles per calor (Lindquist i Craig, 1988).

### **1.2.- L'estrès oxidatiu**

L'oxigen es pot presentar de forma tòxica i en excés, en el que s'anomenen les Espècies Reactives d'Oxigen (ROS), essent perillós per a la vida aeròbia. Aquestes es troben de manera normal en l'interior de



## Introducció

les cèl·lules i participen en processos biològics com la transducció de senyals i, també, modifiquen els components cel·lulars. S'han descrit enzims productors de ROS que regulen la proliferació, diferenciació, transducció de senyals extracel·lulars, transport d'ions i la resposta immune (Droge, 2002). Quan el balanç entre espècies prooxidants i antioxidants es veu alterat afavorint les prooxidants s'arriba a una situació potencial de dany anomenada estrès oxidatiu (Moller *et al*, 2007; Sies, 1993).

Les ROS o molècules prooxidants presenten diferents nivells d'oxidació de l'oxigen, com l'anió superòxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i el radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), els quals són subproductes del metabolisme aeròbic, concretament, de la reducció parcial de l' $O_2$  durant la respiració en el desacoblament del transport de la cadena d'electrons en el mitocondri, del metabolisme d'àcids grassos en els peroxisomes i de l'oxidació de NADPH a NADP. A més, nombrosos productes químics ambientals com: xenobiòtics, pesticides, herbicides, fungicides, l'ozó, el fum de les cigarretes i la radiació causen els seus efectes nocius a través de la generació de ROS.

A continuació es mostren les principals espècies reactives d'oxigen, la seva notació química, una explicació de com es formen i de l'afectació que tenen dins la cèl·lula.

Exemples de ROS			
Nom	Notació	Formació	Afectació
Singlet d'oxigen	$^1O_2$	$O_2$ amb el primer estat de singlet excitat	- PUFA (àcids grassos poliinsaturats) - guanidina del DNA - Trp, His, Tyr, Met, Cys
Anió superòxid	$O_2^{\bullet-}$	reducció d'un electró d' $O_2$	- lípids (rarament) - centres Fe-S (ISC)
Peròxid d'hidrogen	$H_2O_2$	dismutació de dues molècules d' $O_2^-$ reducció de dos electrons o l'ió peròxid protonat	- lípids (rarament) - cisteïnes
Radical hidroxil	$OH^{\bullet}$	per fissió homolítica d' $H_2O$ , la reacció de $H_2O_2$ amb $Fe^{2+}$ (Fenton) o la reacció de $H_2O_2$ amb $O_2^{\bullet-}$ (Haber-Weiss)	- lípids - carbohidrats - DNA - residus d'aminoàcids
Radicals alcolil i peroxil	$RO^{\bullet}$ , $ROO^{\bullet}$	pel trencament de molècules orgàniques	reacció en cadena de la peroxidació
Radical d'òxid nítric i derivats	$NO^{\bullet}$ , $NO_2^{\bullet}$ , $ONOO^-$	de l'aminoàcid L-arginina	- lípids - DNA - Proteïnes

**Taula 2.** Exemples de ROS, la seva formació i afectació cel·lular. Adaptada de Scandalios, 2005; Toledano *et al*, 2003; Moller *et al*, 2007.

Les reaccions mitjançant les quals s'obtenen les espècies reactives d'oxigen són les següents:

Reaccions productores de ROS	
Reacció de Haber-Weiss	$\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
Reacció de Fenton	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$
Dismutació (via superòxid dismutasa, SOD)	$2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
Dismutació (via catalasa)	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$

**Taula 3.** Reaccions amb productes ROS. (Toledano *et al*, 2003)

### 1.2.1.- Dany a components cel·lulars per l'activitat química de les ROS

Degut a la naturalesa de “radicals lliures” de les ROS, aquestes tenen tendència a crear reaccions en cadena, ja que una espècie amb un electró desaparellat reaccionarà amb un altre compost per modificar-lo i així generar un electró desaparellat en el segon compost (Sies, 1993).

#### 1.2.1.1.- Dany a DNA

El DNA es pot oxidar de diverses maneres. La meitat de les modificacions ocorren en les bases dels nucleòtids, però també, s'alliberen hidrògens dels àtoms de carboni en les estructures de sucre. L'OH<sup>•</sup> és la ROS més reactiva en aquestes molècules, l'<sup>1</sup>O<sub>2</sub> ataca principalment la guanidina i l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> no reaccionen per si mateixos, sinó que ho fan a través de les reaccions de Haber-Weiss i de Fenton catalitzant la producció d'OH<sup>•</sup> (Imlay i Linn, 1988), ja que el DNA carregat negativament té tendència a unir-se a cations metàl·lics. L'atac d'aquest radical al DNA porta a la mort cel·lular per necrosi, apoptosi, mutacions i transformació maligna. S'han descrit diversos tipus de dany en el DNA (Cadet *et al*, 1997; Girard i Boiteux, 1997): trencament en cadenes simples i dobles de DNA, delecions, mutacions, translocacions, modificacions directes de bases, llocs de formació abàsics i *cross-links* de DNA. També, s'han descrit agrupacions de mutacions en el que s'anomenen *hot spots* (Halliwell i Gutteridge, 2007).

#### 1.2.1.2.- Dany a carbohidrats

L'OH<sup>•</sup> reacciona amb els carbohidrats lliures, com sucres i poliols (Moller *et al*, 2007), fet que produeix intermediaris capaços de reaccionar amb proteïnes (Grimsrud *et al*, 2008).

#### 1.2.1.3.- Dany a lípids

L'OH<sup>•</sup> pot iniciar una reacció en cadena en la peroxidació de lípids, la qual comença amb l'alliberació d'àtoms d'hidrogen, de manera que els lípids poden acceptar una molècula d'O<sub>2</sub> per formar un radical peroxil (LOO<sup>•</sup>), el qual es pot transformar en radical alcoxil (LO<sup>•</sup>). La reacció en cadena de peroxidació és interrompuda quan dos radicals de molècules lipídiques es combinen o per la presència de captadors de radicals com l'alpha-tocoferol (Toledano *et al*, 2003).

## Introducció

L'oxidació dels àcids grassos de la bicapa lipídica o PUFAs dóna lloc a subproductes com el malondialdehid (MDA) i el 4-hidroxinonenal (4-HNE), que puntualment reaccionen amb altres molècules biològiques, de manera que es poden malmetre les membranes cel·lulars i fins i tot provocar la mort cel·lular (Moller *et al*, 2007).

### 1.2.1.4.- Dany a proteïnes

La majoria de modificacions per oxidació en proteïnes són irreversibles i sovint s'associen amb una pèrdua permanent de funció que les condueix a la seva acumulació o eliminació (Ghezzi i Bonetto, 2003). Segons el tipus de ROS, les proteïnes o bé s'agregen, o bé es fragmenten. Generalment, l' $\text{OH}^\bullet$  en provoca l'agregació i la presència d' $\text{O}_2$  condueix a la seva fragmentació. L' $\text{OH}^\bullet$  inicia el dany a proteïnes oxidant-ne el carboni alpha o el seu residu, seguidament, l' $\text{O}_2$  hi reacciona, donant lloc al  $\text{ROO}^\bullet$  i, després, al  $\text{RO}^\bullet$  els quals es poden estabilitzar interaccionant amb l'H d'una altra molècula, provocant, així una reacció en cadena (Toledano *et al*, 2003). D'altra banda, les modificacions que involucren els aminoàcids que contenen centres Fe-S (ISC) són reversibles i tenen una doble funció: la protecció en front a l'oxidació irreversible i la regulació redox (Ghezzi i Bonetto, 2003). Exemples de danys en proteïnes són:

I. **L'oxidació de proteïnes que contenen grups sulfur.** L'oxidació dels sulfhidrils (SH) de les cisteïnes pel  $\text{H}_2\text{O}_2$  du a àcid sulfènic (SOH), el qual pot portar a la formació d'altres ponts disulfur, que a la vegada es poden reduir per l'acció específica de reductases dels sistemes tioredoxina i glutaredoxina (Gilbert, 1995). Aquest és un mecanisme de regulació redox molt important (Moller *et al*, 2007).

II. **La carbonilació de proteïnes.** L'oxidació de certs aminoàcids (arginina, histidina, lisina, prolina, treonina i triptòfan) dóna grups carbonil (Moller *et al*, 2007), reacció que té lloc mitjançant mecanismes diversos (Berlett i Stadtman, 1997; Halliwell i Gutteridge, 2007). Es tracta d'una de les modificacions oxidatives més comunes en proteïnes i no hi ha indicis de què sigui reversible (Shacter, 2000). La mesura del grau de carbonilació de proteïnes és un bon indicador de l'extensió del dany oxidatiu (Ghezzi i Bonetto, 2003).

III. **La nitrosilació.** L'enllaç covalent del missatger  $\text{NO}^\bullet$  a les tiol cisteïnes és una modificació posttraduccional que potencialment regula la funció de les proteïnes. Els tiols de proteïnes i el glutatió (GSH) poden reaccionar amb derivats de  $\text{NO}^\bullet$  per produir grups bisulfit, àcids sulfènics, sulfínics i sulfònics i S-nitrosotiols (Costa *et al*, 2003). El derivat més comú del  $\text{NO}^\bullet$  és el peroxinitrit  $\text{ONOO}^-$ , que es forma amb la reacció  $\text{NO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{ONOO}^-$ . Aquest pot causar depleció dels grups SH i altres modificacions com oxidació de lípids, desaminació de bases del DNA, nitració d'aminoàcids aromàtics (com els residus de tirosines) i creació del grup sulfòxid en metionines (Halliwell i Gutteridge, 2007).

### 1.2.2.- Els compostos antioxidants

Els antioxidants són qualsevol substància que a baixes concentracions és capaç d'endarrerir o inhibir l'oxidació del substrat (Halliwell i Gutteridge, 2007), i per tant, constitueixen la defensa antioxidant en els sistemes biològics. Així doncs, per mantenir un estat redox adequat i fer front a l'exposició de ROS, els organismes detecten i s'adapten a aquestes perturbacions mitjançant la defensa antioxidant, que està compresa d'un sistema no enzimàtic i un sistema enzimàtic (Folch-Mallol *et al*, 2004).

El sistema no enzimàtic intercepta les espècies danyoses, prevenint la seva activitat futura i transfereix la funció del radical lluny de llocs diana més sensibles a compartiments cel·lulars on el dany oxidatiu sigui menys deleteri.

Els sistemes antioxidants enzimàtics són presents en totes les cèl·lules eucariotes. Els tres sistemes enzimàtics principals són les superòxid dismutases, les catalases i les GSH peroxidases (Sies, 1993).

A continuació es presenta una taula que resumeix els sistemes de defensa antioxidant.

<b>Compostos antioxidants</b>	
<b>Classificació</b>	<b>Funció/localització</b>
<b>Enzimàtics (directes)</b>	
superòxid dismutases GSH peroxidases catalases	Cu/Zn-Sod, Mn-Sod, Fe-Sod GPx, PHGPx proteïna hemo, peroxisomes
<b>Enzimàtics (complementaris)</b>	
enzims de conjugació NADPH-quinona oxidoreductasa reductasa GSSG suplements de NADPH sistemes de transport sistemes reparadors	glutatió-S-transferases UDP-glucuronosil-transferases reducció de dos electrons manteniment dels nivells GSH NADPH per la reductasa GSSG exportació de GSSG i tioèter (conjugat-S) de DNA, de degradació de proteïnes i fosfolípids oxidats
<b>No enzimàtics</b>	
alpha-tocoferol (vitamina E) beta-carotè licopè ubiquinol-10 ascorbat (vitamina C) GSH urat bilirubina flavonoides proteïnes plasmàtiques químics	trencament en cadena dels radicals inhibidor d' <sup>1</sup> O <sub>2</sub> inhibidor d' <sup>1</sup> O <sub>2</sub> carronyaire de radicals funcions antioxidants diverses funcions antioxidants diverses carronyaire de radicals antioxidant plasmàtic antioxidant de plantes unió a metalls additius en menjar, drogues

**Taula 4.** Compostos antioxidants. Adaptada de Sies, 1993.

### 1.3.- La depleció de ferro

El ferro és un element essencial que tots els organismes aerobis necessiten com a cofactor per dur a terme molts processos bioquímics imprescindibles pel seu creixement, la seva diferenciació i el seu benestar. Les cèl·lules contenen proteïnes que requereixen ferro i exerceixen un paper important en nombroses funcions fonamentals:

I. **Les proteïnes amb ferro associat a grups hemo (hemoproteïnes)** uneixen oxigen i són unes proteïnes molt importants per detectar i transportar oxigen. Les proteïnes més abundants en els cossos dels vertebrats són les hemoproteïnes hemoglobina i mioglobina. Aquestes proteïnes porten l'oxigen necessari per a la respiració cel·lular, ja que les pròpies dimensions de l'organisme constitueix una barrera per a la difusió de l'oxigen. Altres hemoproteïnes com els citocroms, les catalases i la citocrom oxidasa intervenen en el metabolisme bàsic de la cèl·lula. Moltes proteïnes que contenen ferro en els eucariotes participen en les reaccions dependents d'oxigen. Són les reaccions que inclouen les que involucren hemoproteïnes (d'unió a oxigen o respiració) i aquelles proteïnes que utilitzen l'oxigen com a substrat (síntesi de porfirina, metabolisme d'esterol, desnaturalització lipídica o transport de ferro) (Kaplan *et al*, 2006).

II. **Les proteïnes amb ISC són participants indispensables de la respiració, la fotosíntesi o la fixació de nitrogen**, són metal·loproteïnes de diverses classes, trobades en molts organismes, des de bacteris fins a humans. Aquestes participen en una àmplia varietat de processos que impliquen transport i catàlisi d'electrons, gràcies a la combinació de la reactivitat química del ferro i el sofre juntament amb variacions de composició del centre, oxidació, estat d'spin i l'ambient local proteic. A més, les proteïnes amb ISC tenen una gran variació de potencials de reducció i són els transportadors d'electrons més importants de la natura, per això moltes proteïnes amb ISC es troben en la cadena mitocondrial de transport d'electrons, en el fotosistema i dels cloroplasts, en la ferredoxina i el complex citocrom. També, la seva habilitat de coordinar lligands els facilita dur a terme diverses funcions enzimàtiques, com per exemple l'aconitasa mitocondrial que és part del cicle de l'àcid cítric, el qual proveeix d'energia lliure per l'alliberació d'ATP. A més són proteïnes amb ISC els enzims amb estabilitat estructural o enzims requerits per al reconeixement i la reparació del dany al DNA. En resum, són proteïnes amb funcions de regulació crucials, ja que s'ha vist, tant en mamífers, com en llevats, que defectes en la síntesi correcta dels ISC condueixen a l'acumulació de ferro i disfunció mitocondrial (Rouault i Tong, 2005).

III. **Les proteïnes amb ferro unit directament**, que utilitzen la química coordinada del ferro de diferents maneres, es tracta d'enzims importants com les lipooxigenases, les aminoàcid hidroxilases i la ribonucleòtid reductasa (l'enzim limitant de la taxa de síntesi de DNA).

IV. **Els enzims dependents de ferro** realitzen accions fonamentals en les cèl·lules, com les demetilases d'histones dependents de ferro, les quals es responsabilitzen de canvis estructurals en la cromatina i els enzims dependents de ferro en el cicle dels àcids tricarboxílics (TCA) o la destoxicació (Anderson i Vulpe, 2009).

La importància biològica del ferro s'atribueix a les seves propietats químiques com a metall de transició. Gràcies a la seva habilitat de guanyar i perdre un electró en les reaccions d'oxidoreducció es presenta en estat oxidat ( $\text{Fe}^{2+}$  o ferrós) i en estat reduït ( $\text{Fe}^{3+}$  o fèrric).

### 1.3.1.- La importància de l'homeòstasi del ferro

La diversitat de les proteïnes que contenen ferro i l'àmplia varietat de reaccions bioquímiques en les quals participa el ferro donen idea de la importància biològica d'aquest element. No obstant, el ferro és tanmateix problemàtic. Per una banda, la mateixa naturalesa química del ferro explica perquè un excés de ferro "lliure" és tòxic, ja que la seva propietat de fàcil guany i pèrdua d'electrons permet la seva participació en les reaccions d'oxidoreducció, catalitzant la formació de radicals d'oxigen. Al citoplasma, el ferro transfereix un electró al  $\text{O}_2$ , generant  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , que és un precursor del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Aquest reacciona amb el  $\text{Fe}^{2+}$  per produir el radical  $\text{OH}^{\bullet}$ , potencialment tòxic, mitjançant la reacció de Fenton (Taula 3). El  $\text{O}_2^{\bullet-}$  és més selectiu que el  $\text{OH}^{\bullet}$ , ja que s'ha vist que actua ràpidament en les proteïnes que contenen ISC, donant com producte final, també,  $\text{OH}^{\bullet}$ . Aquest radical hidroxil reacciona amb proteïnes, lípids i DNA, tal com s'explica anteriorment (De Freitas i Meneghini, 2001).

Per l'altra banda, el ferro és un bioelement escàs. Tot i que, és un element molt abundant no està distribuït homogèniament en l'escorça terrestre i, a més, es troba de forma biològicament inaccessible. En ambients aeròbics, el  $\text{Fe}^{3+}$  reacciona fàcilment amb l'oxigen donant òxids fèrrics insolubles a pH neutre, per tant, predomina la forma insoluble d'hidròxid fèrric (amb una solubilitat de  $10^{-18}$  M). D'aquesta manera, la biodisponibilitat de ferro pot limitar el creixement, i tant organismes unicel·lulars com les plantes han desenvolupat estratègies sofisticades per adquirir ferro de l'ambient, transformant i integrant aquestes formes fèrriques. En humans, el ferro s'absorbeix escassament de la dieta, especialment si la dieta es basa en vegetals i té poc àcid ascòrbic.

Tant per l'alta toxicitat que implica el  $\text{Fe}^{2+}$  com per l'inversió de recursos cel·lulars en captar ferro, l'adquisició, l'emmagatzemament i la distribució intracel·lular de ferro estan altament regulades. A més, l'ús del ferro en les reaccions metabòliques ve determinat per la disponibilitat d'aquest i per la seva participació en el metabolisme de l'oxigen. Organismes eucariotes i procariotes en tots els regnes biològics han desenvolupat mecanismes per remodelar les activitats metabòliques segons el ferro i l'oxigen disponible. També, l'accessibilitat de l'oxigen afecta els enzims i les rutes metabòliques. En el cas de la insuficiència de ferro, els enzims i les rutes metabòliques independents de ferro es potencien, mentre que es minimitzen les rutes dependents de ferro. Una insuficient adquisició de ferro en cèl·lules en cultiu afecta al seu creixement i una privació nutricional o mala absorció de ferro en altres organismes provoca anèmia, malaltia molt estesa la qual afecta aproximadament a dos bilions de persones arreu del món, més

## Introducció

severament a dones embarassades i infants. A més, la deficiència de ferro té efectes adversos en el sistema immune i el desenvolupament físic i cognitiu. Una sobredosi de ferro transfusional o patològica comporta un excés, tant en la capacitat extracel·lular d'unió al ferro de la transferrina, com en la capacitat d'emmagatzematge del ferro intracel·lular de la ferritina, fet que provoca un dany permanent en cèl·lules i teixits (Hentze i Kuhn, 1996; Hentze *et al*, 2004). En aquest sentit, tots els sistemes d'adquisició de ferro estan molt ben regulats per restringir la concentració d'aquest als fluids biològics, des del citosol dels llevats al plasma dels vertebrats. A més, la regulació de l'adquisició de ferro és un pas crític en el manteniment de la seva homeòstasi perquè els vertebrats no tenen mecanismes reguladors de sortida de ferro (Kaplan i Kaplan, 2009).

Per totes les raons anteriorment esmentades i ja que tant l'excés, com el defecte de ferro provoca la mort cel·lular, els nivells de ferro reactiu han de ser curosament controlats i limitats: (i) en tots els processos (adquisició, emmagatzemament, exportació i organització de la distribució del ferro intracel·lular) i (ii) a tots els nivells (transcripcional, posttranscripcional, traduccional i posttraduccional), per tal de mantenir l'homeòstasi del ferro, assegurant-ne unes dosis adequades per suplir les necessitats cel·lulars i, alhora, evitant-ne l'acumulació excessiva (Hentze *et al*, 2004; Kaplan i Kaplan, 2009).

## 2.- El model

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* és un fong ascomicet i un ésser eucariota dels més senzills que existeixen, que el fan un model idoni per a estudis fisiològics i de la biologia cel·lular i molecular; ja que té un creixement cel·lular ràpid en cèl·lules disperses. A més, disposa d'un sistema genètic ben definit i de fàcil anàlisi genètica, tant per a estudis d'*screenings* genòmics, com per anàlisis transcriptòmiques. També, és versàtil per a la transformació de DNA (el qual es pot introduir en forma de plàsmids episomals, centromèrics o integratius, via recombinació homòloga). Aquest microorganisme esdevé un dels organismes més estudiats, sobretot pel que fa a la resposta a estrès, per tres motius principals: (i) l'estreta relació de l'estrès cel·lular amb moltes malalties i l'envelliment, (ii) l'adaptació a estressos mediambientals i les seves aplicacions biotecnològiques en els camps de conreu i (iii) la pròpia tolerància a canvis osmòtics, de temperatura o de concentració d'etanol de les soques del llevat del pa i de la cervesa durant els processos de producció industrials.

*S. cerevisiae* haploide té 16 cromosomes ben caracteritzats i un total de 6.183 "open reading-frames" (ORF) de les quals se'n prediuen 5.800 corresponents a gens codificants a proteïna. Es tracta d'un genoma molt compacte, en el qual els gens representen un 72% de la seqüència total.

Aquest llevat mostra adaptacions metabòliques significatives al metabolisme no respiratori, ja que té una gran capacitat per a realitzar la glicòlisi, tot i que les quantitats d'ATP per mol de glucosa resultants

són inferiors a les comparades amb el metabolisme respiratori. Aquestes modificacions inclouen múltiples transportadors d'hexosa en la superfície cel·lular i molts enzims glicolítics. L'habilitat d'aquest llevat a créixer aeròbiamment i anaeròbia el fan tremendament adaptable, conferint-li un alt grau de plasticitat metabòlica en resposta a canvis ambientals (Kaplan *et al*, 2006). Així doncs, és capaç de créixer en ambients aerobis i anaerobis, sense respiració. Té cinc fases de creixement ben definides al cultivar-se en medi líquid amb glucosa com a font de carboni: fase lag (període d'adaptació a la divisió cel·lular), fase exponencial (mentre la font de carboni estigui disponible, manté un metabolisme fermentatiu en el qual produeix etanol; en aquesta fase assoleix la seva velocitat màxima de duplicació), fase de canvi diàuxic (quan la glucosa és consumida, s'atura la divisió durant un breu període de temps i es prepara per al canvi a metabolisme respiratori), fase postdiàuxica (consumeix l'etanol produït en la fase exponencial i incrementa la seva resistència a estrès) i fase estacionària (quan els nutrients s'han exhaurit i no hi ha divisió cel·lular) (Folch-Mallol *et al*, 2004; Toledano *et al*, 2003).

## 2.1.- L'estrès tèrmic en *S. cerevisiae*.

### 2.1.1.- Fenotips que presenta *S. cerevisiae* en l'estrès tèrmic

La temperatura òptima de creixement del llevat *S. cerevisiae* és de 30°C. Per tal d'avaluar l'impacte citotòxic i segons el tractament de xoc tèrmic al que se sotmeten les cèl·lules de llevat, es poden diferenciar tres fenotips (Trott i Morano, 2003):

I. **Sensibilitat a temperatura.** Les cèl·lules de llevat creixen durant períodes llargs de temps a temperatures suficientment altes com per induir la resposta a xoc tèrmic, però permissives per a la viabilitat de les soques salvatges. Aquestes acostumen a ser entre 35°C i 37°C, tot i que és 37°C la que inactiva una àmplia varietat de soques amb al·lels mutants termosensibles. La temperatura límit per la majoria de soques de laboratori és 41°C.

II. **Termotolerància.** La termotolerància és l'habilitat de les cèl·lules de suportar temperatures letals sobtades. Aquest fenotip sovint es mesura transferint les cèl·lules durant pocs minuts a temperatures d'entre 50°C i 60°C i després tornant-les a la temperatura òptima.

III. **Termotolerància adquirida.** La termotolerància adquirida és l'habilitat de les cèl·lules per organitzar una resposta protectora gràcies a haver adquirit termotolerància després d'un xoc tèrmic moderat. Aquest paràmetre s'acostuma a mesurar fent un pretractament del cultiu cel·lular de 30°C a 37°C i un tractament posterior a 55°C. En aquest cas la supervivència del llevat és dràsticament superior.



## 2.1.2.- Efectes del xoc tèrmic en *S. cerevisiae*

L'estrès tèrmic produeix una gran varietat de dany en les estructures i els processos cel·lulars.

### 2.1.2.1.- Efectes de l'estrès tèrmic en les estructures cel·lulars

Les influències fisiològiques en un xoc tèrmic són diverses (Kim *et al*, 2006): (i) Es redueix la viabilitat cel·lular, i poden arribar inclús a la mort cel·lular. (ii) Es produeixen anormalitats morfològiques cel·lulars generals: gemmació atípica, creixement cel·lular irregular i increment de la mida cel·lular. (iii) S'alenteixen el creixement cel·lular i la divisió, aturant-se en un xoc tèrmic a més de 40°C, ja que les cèl·lules s'aturen en la fase G1 del cicle de manera transitòria, després d'un temps, les cèl·lules es recuperen espontàniament i reemprenen la progressió del cicle cel·lular, tot i estar encara en condicions d'alta temperatura (Rowley *et al*, 1993). (iv) S'altera dràsticament l'estructura del nucli, es disrupcionen el nuclèol i apareixen cossos granulars (Lewis i Pelham, 1985; Sandqvist i Sistonen, 2004; Welch, 1992). (v) S'altera l'estructura de la membrana plasmàtica i, per tant, la seva funció, ja que incrementa la fluïdesa i es redueix la permeabilitat a nutrients essencials, la síntesi d'ergosterol i els nivells d'àcids grassos insaturats. A més, s'estimula l'activació de l'ATPasa i l'activitat RAS-adenilat ciclase i s'acidifica el pH intracel·lular. (vi) Canvia la integritat del citoesquelet, ja que es provoca una disrupció extensiva dels filaments i la xarxa microtubular (Lillie i Brown, 1994). (vii) Hi ha una pèrdua de l'estructura i la funció mitocondrials, perquè es redueix l'activitat respiratòria i s'indueixen els mutants *petite* amb morfologia aberrant i respiració deficient. (viii) S'alteren l'estructura i la funció cromosòmica, puix que hi ha un increment en la freqüència de mutacions durant el creuament mitòtic i la conversió gènica. També, hi ha un augment de la no disjunció del DNA mitòtic cromosomal i una reparació ineficient del DNA malmès per calor.

### 2.1.2.2.- Efectes de l'estrès tèrmic en els processos cel·lulars

En un xoc tèrmic es produeixen una sèrie d'alteracions en els processos cel·lulars:

I. L'expressió de diversos gens s'inhibeix de manera transitòria. Aquesta aturada de la transcripció pot ser deguda a la sensibilitat de la maquinària transcripcional a l'estrès tèrmic o a canvis conformacionals de la cromatina (Mager i Ferreira, 1993).

II. Les cèl·lules de llevat modulen la síntesi proteica, reprimint la producció de moltes proteïnes, mentre que s'indueix específicament la d'altres, com és el cas de certes Hsps i proteïnes mitocondrials. També regulen l'aparició d'intermediaris metabòlics, ja que s'inhibeix tant la respiració com la fermentació. Per sobre la  $T_{m\grave{a}x}$ , s'incrementa immediatament la concentració de trehalosa i la Mn-Sod.

III. S'inhibeix la síntesi d'rRNA, perquè el xoc tèrmic inhibeix la transcripció de la RNA Pol I (transitòriament en un xoc a 37°C i de manera més permanent en un xoc sever) i també la transcripció de la

RNA Pol II, alterant l'estructura i la funció del nuclèol, i conduint consegüentment a una pèrdua de la mida i la forma granular (Lewis i Pelham, 1985; Welch, 1992). El nuclèol té un intens flux macromolecular, ja que rep les PR sintetitzades de nou al citoplasma, les quals s'ensamblen amb els intermediaris del processament d'rRNAs per generar les subunitats ribosomals immadures, que s'exporten al citoplasma. En un xoc a 42,5°C, s'ha observat que moltes proteïnes nucleolars es relocalitzen al citoplasma (fet que no s'observa en un estrès a 37°C), segurament a causa de la manca de la seva reimportació al nucli. A més, sembla que l'exportació no sigui dependent d'ATP, ni s'inhibeixi per xoc tèrmic (Liu *et al*, 1996).

IV. Els grans complexos macromoleculars semblen ésser particularment sensibles a l'estrès tèrmic, sobretot sever, i a altres estressos (Bond, 1988; Bond, 2006). Aquest fet pot afectar a la producció d'mRNA madur, ja que molts complexos macromoleculars necessaris per la síntesi, el processament, l'exportació i la traducció dels mRNAs són sensibles a temperatura. A més, la transcripció, l'addició del cap 5', l'*splicing*, el tall en el 3', la poliadenilació i l'exportació d'mRNA són processos connectats (Maniatis i Reed, 2002; Moore, 2005).

V. En un xoc sever s'inhibeix l'*splicing* d'mRNAs (Yost i Lindquist, 1991). Als 30 minuts del retorn de les cèl·lules a 30°C aquest procés es recupera (Bracken i Bond, 1999; Vogel *et al*, 1995). A més, en un xoc a 41-42,5°C l'mRNA amb cua poli(A) s'acumula al nucli (Liu *et al*, 1996; Saavedra *et al*, 1996). La retenció dels mRNAs en el nucli després d'un estrès tèrmic és una conseqüència de les alteracions en les xaperones associades a l'mRNA en el nucli i a la inhibició del transport citoplasmàtic dels mRNA via el Complex Porós Nuclear (NPC) mediat per receptors i dependent d'energia (Bond, 2006), ja que l'NPC s'altera durant un estrès tèrmic (Vainberg *et al*, 2000). Malgrat això, l'exportació dels mRNAs codificants per Hsps es realitza correctament, possiblement degut a l'existència de mecanismes diferents, dependents de les proteïnes Rip1 i Rat28 (Saavedra *et al*, 1996). Alguns autors han descrit que el complex Nup82 s'estabilitza en presència de Rip1 en condicions d'estrès per permetre l'exportació dels mRNAs codificants per Hsps (Rollenhagen *et al*, 2004).

VI. El xoc tèrmic té un efecte dràstic en el metabolisme dels RNAs degut a una degradació selectiva d'aquests (Yost *et al*, 1990). En un xoc a 42°C els mRNAs citoplasmàtics es degraden ràpidament, mentre que els mRNAs retinguts en el nucli s'estabilitzen i no es degraden (Bond, 2006). S'ha descrit que, en condicions d'estrès alguns mRNAs tenen una taxa de degradació (TD) ràpida i transitòria; és el cas dels mRNAs codificants per PR en un xoc tèrmic (Herruer *et al*, 1988; Tsurugi i Mitsui, 1991). A més, un xoc sever a 46°C induïx la formació de grànuls d'estrès, on s'acumula l'mRNA per ser redirigit a traduir-se, emmagatzemar-se o degradar-se (Grousl *et al*, 2009). Durant la recuperació del xoc tèrmic, els nivells normals d'mRNA cel·lulars es recuperen i els mRNAs codificants per Hsps es degraden selectivament (Yost *et al*, 1990), fet que podria ser degut a la possible inestabilitat intrínseca d'aquestes molècules a temperatures fisiològiques (Mager i Ferreira, 1993).

## Introducció

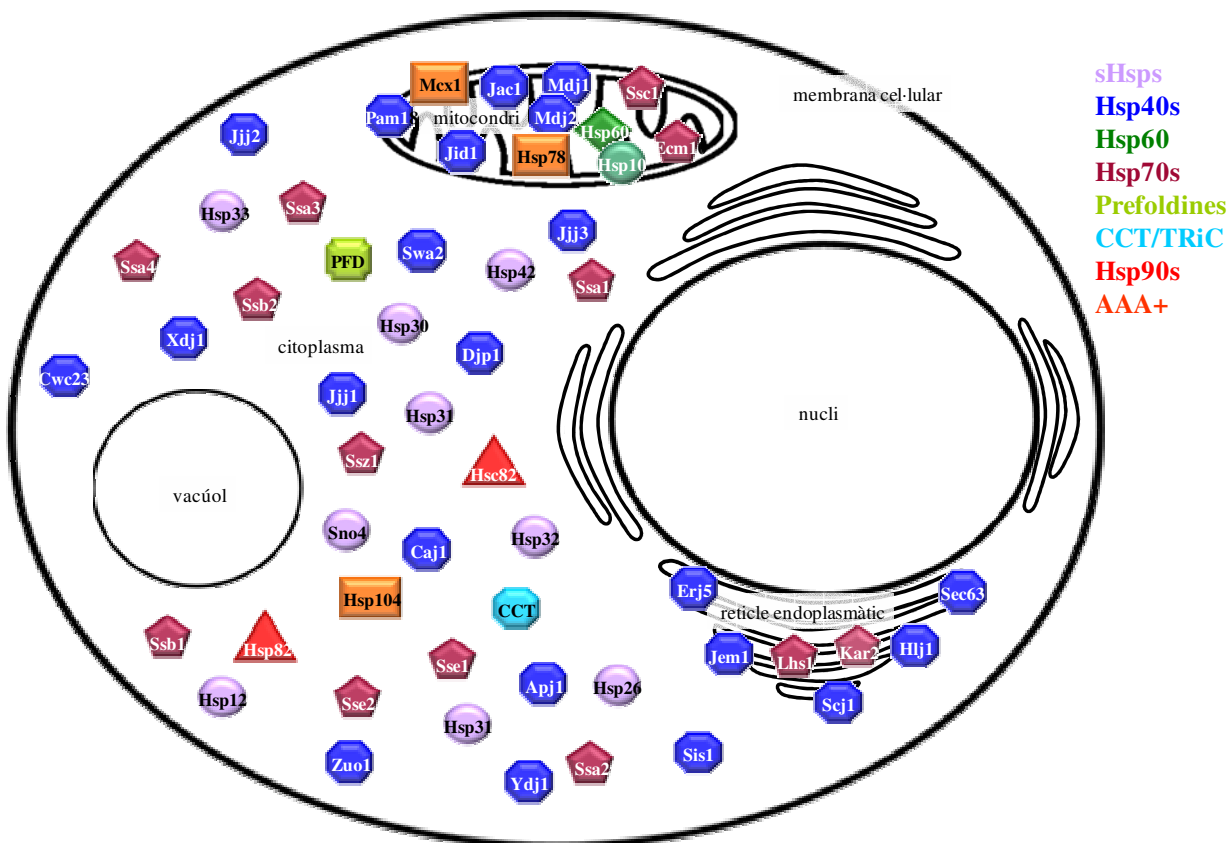
VII. Els nivells d'mRNAs codificants per algunes Hsps (cinc membres de la família de les Hsps 70 i els dos membres de la família de les Hsps 90), entre d'altres, es regulen segons la intensitat de l'estrès mitjançant una via de degradació selectiva activada per la inhibició de l'inici de la traducció (Heikkinen *et al*, 2003). En un estrès a 37°C, aquests mRNAs es degraden per aquesta via, per tal de respondre ràpidament a les necessitats cel·lulars del moment; mentre que en un estrès a 41°C, s'estabilitzen i són accessibles per a la seva traducció un cop superat l'estrès (Bond, 2006).

### **2.1.3.- Defensa al dany tèrmic en *S. cerevisiae***

Les cèl·lules de llevat responen a un estrès tèrmic amb un canvi en la síntesi proteica. En aquest sentit els estudis de Miller i col·laboradors (1982) mostren que un xoc tèrmic moderat (de 23°C a 37°C) provoca canvis en unes 800 proteïnes, de les quals 80 s'indueixen transitòriament (20 són Hsps) i més de 300 es reprimen transitòriament, la majoria d'aquestes són proteïnes de la síntesi i el transport d'RNA (Gorenstein i Warner, 1976; Kim i Warner, 1983; Miller *et al*, 1982). Un increment entre 10°C i 15°C per damunt de la temperatura de creixement induïx la síntesi de les proteïnes Hsps. La majoria d'aquestes són proteases i xaperones moleculars que actuen conjuntament per eliminar selectivament proteïnes amb estructures aberrants, per tal de mantenir l'homeòstasi de proteïnes en la cèl·lula. A més, augmenta la síntesi de diverses proteïnes com l'ubiquitina, enzims glicolítics i proteïnes de la membrana plasmàtica. No obstant, un canvi de 23°C a 30°C no produeix alteracions en el patró de síntesi de proteïnes (Mager i Ferreira, 1993).

#### **2.1.3.1.- Les proteïnes del xoc tèrmic**

Com ja s'ha dit, les Hsps són un conjunt de proteïnes que protegeixen les cèl·lules del dany i faciliten la seva recuperació després d'un estrès tèrmic; estan altament conservades i moltes tenen la funció de xaperones (Hohmann i Mager, 2003); moltes s'expressen constitutivament i s'indueixen en resposta a estressos. La classificació de les Hsps pot fer-se en 8 grups (Gong *et al*, 2009). El següent esquema exposa la classificació de Gong i col·laboradors (2009).



**Il·lustració 1.** El conjunt de xaperones en la cèl·lula d'*S. cerevisiae* segons la seva sublocalització mitocondrial, de RE i citoplasmàtica (les Sno4, Hsp26, Hsp32 i Hsp33 probablement es troben també al nucli i Xdj1 es proposa que també es troba en el mitocondri). Adaptada de Gong *et al*, 2009.

### 2.1.3.1.1.- Proteïnes de xoc tèrmic petites (sHsps)

Aquesta família engloba les Hsps de menor pes molecular i és un grup molt divers (Burnie *et al*, 2006). A continuació se n'expliquen els membres més representatius:

- L'Hsp12 es localitza al citoplasma, a la membrana plasmàtica i a la paret cel·lular, i protegeix les membranes d'assecar-se. Té cinc elements STRE (de reconeixement pels factors de transcripció Msn2/4, vegeu secció 3) al seu promotor i la seva expressió s'indueix amb estrès tèrmic, oxidatiu, osmòtic, entrada a fase estacionària, limitació de glucosa i addició d'etanol i oleat; es regula per les vies HOG i Ras-Pka. Recentment, s'ha descrit que l'Hsp12 intervé en la tolerància a la congelació i la seva absència se supleix amb la inducció de síntesi de trehalosa (Pacheco *et al*, 2009).

- L'Hsp26 és una proteïna citosòlica abundant en eucariotes amb activitat xaperona, que s'organitza en oligòmers de 24 subunitats amb forma d'esfera foradada. La seva activació es produeix mitjançant un canvi conformacional induït per calor, en el qual l'oligòmer passa a dímers capaços d'unir-se a proteïnes desplegadas per evitar-ne l'agregació. Té elements HSE (de reconeixement pel factor de

## Introducció

transcripció Hsf1, vegeu secció 3) evolutivament conservats a la seva regió promotora, tot i que la seva expressió la regulen conjuntament Msn2/4 i Hsf1. No s'expressa en cèl·lules sense estrès i s'indueix fortament en resposta a estrès tèrmic, aturada de fase estacionària, manca de nitrogen i estrès salí.

- L'Hsp30 és una proteïna localitzada a la part hidrofòbica de la membrana citoplasmàtica. S'indueix sota estrès tèrmic i osmòtic, tractament amb etanol i àcid orgànic feble, depleció de glucosa i entrada a fase estacionària. En resposta a estrès tèrmic, aquesta proteïna regula negativament l'activitat ATPasa de la membrana. L'Hsp30 té dos homòlegs, Mrh1 i Yro2.

- L'*HSP42* codifica per l'altra sHsp citosòlica; es transcriu en totes les condicions, tot i que s'indueix en resposta a estrès tèrmic, osmòtic i en limitació de nutrients, tant mitjançant els factors transcripcionals Msn2/4, com Hsf1. La seva proteïna té activitat xaperona i es presenta en oligòmers en forma de barrils que eviten l'agregació de proteïnes desplegadas. A més, participa en la reorganització del citoesquelet després d'estrès tèrmic.

Dins el grup de les sHsps hi ha altres xaperones amb activitat proteasa, Hsp31, Hsp32, Hsp33 i Sno4, membres de la superfamília DJ-1/ThiJ/Pfpl.

### 2.1.3.1.2.- La família de les Hsp40s

La família de les Hsp40s està formada per vint-i-dues proteïnes conegudes en *S. cerevisiae*, trobades gràcies a la seva homologia amb la DnaJ d'*E. coli*. Aquestes xaperones estan involucrades en la regulació de les Hsp70s i Hsp90s. Les Hsp40s canvien la conformació de les Hsp70s cap a una forma de més alta afinitat a diversos substrats després de la hidròlisi d'ATP. Tots els membres d'aquesta família tenen: (i) el domini J, que dirigeix i organitza les interaccions específiques de les Hsp70s i conté el motiu HPD (que regula el cicle hidrolític de les Hsp70s) i (ii) una regió C-terminal conservada d'unió a proteïnes mal plegades. Les Hsp40s s'agrupen en tres classes: (i) classe I, si també tenen un domini en dits de zinc i una regió rica en glicina (Ydj1, Xdj1, Apj1, Mdj1 i Scj1); (ii) classe II, les que només tenen una regió rica en glicines (Sis1, Caj1, Djp1 i Hlj1) i (iii) classe III, les que no tenen cap de les dues regions esmentades (Swa1, Sec63, Pam18, Mdj2, Jac1 i Zuo1). Els membres de la classe I i II tenen una funció semblant. En canvi, els de la classe III no són xaperones, sinó que assisteixen el reclutament de les isoformes d'Hsp70 al seu lloc d'unió (Walsh *et al*, 2004).

### 2.1.3.1.3.- L'Hsp60

L'Hsp60 és una xaperonina mitocondrial essencial, xaperonina del grup I, segons la classificació de Tang i col·laboradors (2007). Forma complexes en tetradecàmer i és requerida pel plegament dependent d'ATP de precursors de polipèptids i per l'ensamblatge de complexes en la matriu mitocondrial. Aquesta proteïna també està implicada en transmissió del DNA mitocondrial (mtDNA) a les cèl·lules filles (Kaufman *et al*, 2003), en dirigir diverses proteïnes a l'espai intermembranal i en protegir les cèl·lules en

front estrès oxidatiu, ja que preserva els ISC de les proteïnes de la inactivació causada pel dany oxidatiu (Cabiscol *et al*, 2002). S'expressa de manera constitutiva i s'indueix en resposta a estrès tèrmic. La seva coxaperona s'anomena Hsp10, la qual inhibeix l'activitat ATPasa de l'Hsp60 i participa en el plegament de proteïnes al mitocondri.

#### 2.1.3.1.4.- La família de les Hsp70s

Les Hsp70s són una família de proteïnes d'estrès altament conservades amb catorze membres. És un grup divers i multifuncional, ja que participen en la translocació de proteïnes, el seu plegament conformacional, ensamblatge i degradació. Dins d'aquesta família hi ha subcategories, en base a l'estructura de seqüència i l'intercanviabilitat funcional. Tot i així, tenen tres dominis funcionals separats: un domini N-terminal d'unió a ATP, un de central d'unió a pèptid substrat i un de variable situat a l'extrem C-terminal.

- Les proteïnes Ssa estan involucrades en la translocació de proteïnes a través de les membranes i en la regulació de la resposta a estrès tèrmic. Ssa1 i Ssa2 s'expressen constitutivament, mentre que Ssa3 i Ssa4 ho fan en condicions d'estrès. Ssa1 també participa en regular l'estabilitat dels elements rics en AU de les regions no traduïbles (UTR) 3' de diversos mRNAs com *MFA2* i *TIF51A* (Duttgupta *et al*, 2003).

- Les proteïnes Ssb s'associen amb els complexos de polisomes que transcriuen activament. Ssb1 i Ssb2, juntament amb Ssz1 (de la mateixa família) i Zuo1 (de la família de les Hsp40), són el grup de xaperones que assisteixen el naixement de les cadenes polipeptídiques dels ribosomes (Gautschi *et al*, 2002).

- Al mitocondri trobem Ssc1, Ssq1 i Emc10. *SSC1* codifica per una xaperona essencial, clau en la translocació de proteïnes precursors a través del complex TIM23; també participa en el replegament de proteïnes. *SSQ1* codifica per una xaperona molecular requerida per a l'ensamblatge d'ISC en proteïnes i participa en la maduració d'Yfh1. La proteïna Emc10 es localitza als nucleòsids mitocondrials i participa en la translocació de proteïnes.

- Al lumen del RE es localitzen Ssd1 (conegut com Kar2) i Lhs1, que són xaperones moleculars involucrades en el plegament i el transport de proteïnes al RE. Mentre que Kar2 participa en el marcatge de proteïnes co- i posttraduccional al RE, Lhs1 només ho fa en la importació posttraduccional. L'activitat d'Lhs1 també afecta el replegament i l'estabilitat de les proteïnes desnaturalitzades. Kar2 regula la Resposta de les Proteïnes Desplegades (UPR) per la seva interacció amb la quinasa/nucleasa Ire1. Els dos gens s'indueixen en l'UPR i les dues proteïnes es regulen recíprocament. A més, independentment a la seva inducció en UPR, *KAR2* s'indueix en un xoc tèrmic mitjançant l'element HSE.

## Introducció

### 2.1.3.1.5.- La família de les Hsp90s

La xaperona molecular HSP90 en *S. cerevisiae* té dues isoformes codificades per *HSC82* i *HSP82*. Són essencials i comparteixen un 97% d'identitat de seqüència. Les seves proteïnes tenen funcions redundants: participen en el plegament de polipèptids naixents de conformació especialment difícil, en el replegament de proteïnes desnaturalitzades, i en l'activació de proteïnes claus de regulació i senyalització cel·lulars, com quinases i factors de transcripció (com Swe1, Gcn2 o Hap1). *HSC82* s'expressa constitutivament i amb nivells basals més elevats que *HSP82*, però s'indueix molt lleugerament en resposta a estrès tèrmic, mentre que *HSP82* s'indueix fortament en condicions d'estrès. Tant la seva transcripció basal com la induïda la regula el factor de transcripció Hsf1. Els dos isòmers són funcionals en forma de dímers i duen a terme el plegament de les proteïnes mitjançant l'activitat ATPasa. A més, s'uneixen a diverses coxaperones que regulen positivament o negativament la seva funció (Sti1, Cdc37, Cns1, Sba1, Cpr6, Cpr7, Sse1, Hch1 i Aha1). Mecanísticament inhibeixen o promouen de manera directa la unió a ATP o alteren la conformació de les proteïnes. Hsp82 participa en la senyalització per feromones, i en la regulació negativa d'Hsf1; amb Tom70 assisteix el lliurament de les preproteïnes mitocondrials, promou la unió de la telomerasa al DNA i l'addició de nucleòtids.

### 2.1.3.1.6.- El complex CCT/TRiC

El complex CCT/TRiC, xaperonina del grup II segons la classificació de Tang *et al*, (2007), amb les subunitats Tc1 i Cct2-8 forma estructura d'anell i participa en el plegament de proteïnes citosòliques naixents (actina, tubulina i proteïnes amb domini WD40) (Etchells *et al*, 2005). Actua en fases posteriors del plegament de l'Hsp70 i ensambla l'expansió de proteïnes amb poliglutamina en oligòmers no tòxics.

### 2.1.3.1.7.- El complex prefoldina/GimC

És una xaperona que s'uneix a proteïnes no natives. La componen sis subunitats diferents formant un heterodímer d'entre 14 i 23 KDa (codificades pels gens *YKE2*, *GIM3*, *GIM4*, *GIM5*, *PAC19* i *PFD1*). Aquest complex transfereix les proteïnes substrat a les xaperones de classe II, esdevenint coxaperona del complex TRiC/CCT (Tang *et al*, 2007).

### 2.1.3.1.8.- La família AAA+

Aquesta família conté membres formadors d'anells AAA+ (associats a ATPases amb diverses activitats cel·lulars). Són proteïnes que controlen l'estat de plegament de les proteïnes i faciliten el seu replegament o la seva degradació cooperant amb sistemes de xaperones o peptidases (Mogk *et al*, 2008).

- L'Hsp104 pertany a la família de les Hsp100s. És una Hsp citosòlica que replega i reactiva proteïnes prèviament desnaturalitzades i agregades, juntament amb Ssa1 i Ydj1. Les seves coxaperones són Sti1, Cpr7 i Cns1. Té nivells baixos d'expressió basal, però s'indueix fortament en condicions d'estrès

tèrmic, oxidatiu, etanol, arsenit sòdic, etc, tant per Msn2/4 com per Hsf1. Hsp104 existeix en formes inactives (monomèrica, dimèrica o trimèrica) o activa, com a hexàmer en estructura d'anell pel qual passen les proteïnes substrat durant el desensamblatge d'agregats. Aquesta proteïna té dos dominis d'unió a nucleòtids: l'NBD2, que regula la formació de l'hexàmer i té una capacitat d'hidrolitzar ATP baixa, i l'NBD1, que proveeix l'energia necessària per promoure la desagregació de proteïnes.

- L'Hsp78 és una xaperona oligomèrica de matriu mitocondrial que preveu la formació d'agregats de proteïnes mal plegades i resolubilitza les proteïnes agregades. A més, coopera amb Ssc1 en l'adquisició de termotolerància mitocondrial després de xoc tèrmic i participa en la proteòlisi indispensable per la degradació eficient de proteïnes en el mitocondri. Aquesta proteïna també forma hexàmers i té dos dominis NBD amb les mateixes funcions que els d'Hsp104.

- La Mcx1 és una xaperona putativa que uneix ATP sense funció proteolítica. Es troba a la matriu mitocondrial.

### 2.1.3.2.- Biosíntesi de metabòlits

Per tal de cobrir la gran demanda energètica durant un estrès tèrmic s'indueixen enzims glicolítics com la fosfogliceraldehid quinasa i l'enolasa i, a més, el factor de transcripció Tye7, que regula els gens de la glicòlisi (Hahn *et al*, 2004).

#### 2.1.3.2.1.- La trehalosa

Com ja s'ha dit, les cèl·lules de llevat responen a estressos mitjançant la síntesi de trehalosa. Aquest sucre té efectes protectors en front la dessecació i promou la supervivència en condicions de calor (Singer i Lindquist, 1998). La trehalosa és un disacàrid no reductiu format per dues molècules de glucosa unides pel seu carboni 1. Aquest metabòlit és gairebé indetectable durant el creixement exponencial del llevat en medi amb glucosa. En canvi, s'acumula en gran manera al citoplasma de les cèl·lules en estat estacionari i en espores, i també, arran d'un estrès tèrmic. Els enzims encarregats de la seva biosíntesi es localitzen al citoplasma, on s'esdevé en dos passos: (i) la glucosa-uridina-difosfat i la glucosa-6-fosfat formen la trehalosa-6-fosfat, una reacció catalitzada per la trehalosa-6-fosfat sintasa i (ii) la trehalosa-6-fosfat allibera el grup fosfat. S'han copurificat tres enzims dels complex que du a terme aquest procés: Tps1, Tps2, Tsl1 i un quart component, identificat per homologia de seqüència amb aquest darrer, Tps3. *TPS1*, *TPS2* i *TPS3* s'expressen constitutivament, tot i que l'expressió dels gens *TPS1* i *TPS2* s'indueix prominentment per calor. L'expressió dels gens requerits per la seva síntesi en resposta a diversos estressos (temperatures elevades, etanol, dessecació i peròxid d'hidrogen) la regulen els factors de transcripció Msn2/4, com s'especifica més endavant. La trehalosa pot ser degradada per diverses trehalases, les quals hidrolitzen el



## Introducció

disacàrid donant lloc a dues molècules de glucosa. L'activitat trehalasa s'ha localitzat tant al citoplasma-nucli, com al vacúol. Paradòxicament, els enzims de síntesi i degradació de la trehalosa s'expressen constitutivament, s'indueixen en condicions d'estrès tèrmic, i les soques disruptonades pels seus gens codificants tenen afectada la supervivència o la termotolerància i la recuperació del xoc tèrmic (Singer i Lindquist, 1998).

En condicions d'estrès, l'activitat de la trehalosa-6-fosfat incrementa, però també ho fa l'activitat de la trehalasa citoplasmàtica. La degradació de la trehalosa és ràpida en situacions de canvi. Així doncs, la seva síntesi és ràpida en condicions d'estrès i també ho és la seva degradació un cop superat aquest, per evitar que la trehalosa interfereixi en el replegament de les proteïnes desnaturalitzades a causa de l'estrès. La trehalosa no es metabolitza més que com a últim recurs, quan les cèl·lules no tenen cap nutrient disponible, molt després d'haver esgotat el glicogen i com a pas previ a la mort cel·lular. Per tant, no es creu que la trehalosa sigui font reservòria d'energia.

La trehalosa és una de les molècules més efectives tant en la preservació de membranes, com en la protecció de l'activitat de les proteïnes, estabilitzant-ne algunes. D'aquesta manera, participa en la integritat estructural de la cèl·lula. En la resposta a un estrès tèrmic, l'acumulació de trehalosa i la síntesi d'Hsps són respostes protectores complementaries (Mager i Ferreira, 1993). La síntesi de trehalosa protegeix les cèl·lules en front un estrès tèrmic moderat i permet la síntesi d'Hsps, ja que la trehalosa actua directament prevenint la desnaturalització proteica i l'agregació de proteïnes mal plegades a altes temperatures.

### 2.1.3.2.- Els esfingolípidis

Els metabòlits d'esfingolípidis s'han descrit com a molècules senyalitzadores potencials, tant en cèl·lules de mamífers, com de llevat. Els esfingolípidis participen en la resposta a estressos en *S. cerevisiae*, perquè s'ha vist que les soques amb mancances en la seva síntesi són incapaces de créixer a altes temperatures, altes pressions osmòtiques i baixos pHs.

Les cèl·lules de llevat, en resposta a un estrès tèrmic, pateixen un augment dels nivells de ceramides i un increment transitori en esfinganina i fitosfingosina. A més, els esfingolípidis podrien estar involucrats en l'acumulació de trehalosa, ja que la dihidroesfingosina activa la transcripció de *TPS2* i del gen reporter *STRE-LacZ*. Per tant, la senyalització mitjançant bases esfingoides podria activar la via de resposta general a estrès (Dickson *et al*, 1997). A més, un mutant defectiu per *LCB1* (*lcb1-100*), gen codificant pel catalitzador del primer pas de la síntesi de bases esfingoides, no presenta aturada del cicle cel·lular ni resistència a estrès tèrmic (Chung *et al*, 2000).

### 2.1.3.3.- Ubiquitinització i proteases

En la resposta a estrès tèrmic, per tal d'impedir que les proteïnes es continuïn agregant, la cèl·lula degrada les proteïnes mal plegades mitjançant les vies proteosòmiques i lisosòmiques de degradació. La via principal de la degradació selectiva de proteïnes no natives al citosol i al nucli és la via de la ubiquitinització i proteosoma. Les proteïnes que no es pleguen o repleguen correctament són dirigides al sistema d'ubiquitinització i proteosoma (UPS) per la seva destrucció. Les proteïnes indesitjades s'uneixen covalentment a ubiquitina, via proteosoma 26S. El sistema de control de l'homeòstasi de proteïnes és molt flexible en ambients canviants, fet que indica que el balanç intracel·lular del replegament i la degradació de proteïnes és un tema crític per les cèl·lules sotmeses a estressos ambientals (Imai *et al*, 2003).

La poliubiquitina és una proteïna codificada pel gen *UBI4* en llevats, que s'indueix fortament en condicions d'estrès. De fet s'ha vist que la seva inducció és fruit d'alts nivells de polipèptids aberrants (Grant *et al*, 1989). *UBI1*, *UBI2* i *UBI3* codifiquen per proteïnes de fusió, probablement involucrades en l'ensamblatge dels ribosomes, les quals no s'indueixen en resposta a estrès tèrmic (Finley *et al*, 1987).

El proteosoma és la maquinària principal de la proteòlisi regulada per a la destrucció selectiva i ràpida de proteïnes importants biològicament i, també, per a la degradació massiva de proteïnes anormals. És un complex gran de moltes subunitats. Consta del centre catalític proteosoma 20S (anomenat PCP, Partícula Central del Proteosoma) i de dos subcomplexes terminals reguladors, units als dos extrems i amb orientació oposada. El proteosoma 20S consta de dues còpies de 14 subunitats diferents (7 del tipus alpha i 7 del tipus beta) disposades en quatre anells heteroheptamèrics. El centre de l'anell alpha està gairebé tancat, impeding l'entrada de les proteïnes cel·lulars a la superfície de l'anell beta, on es localitza l'activitat proteolítica. L'activació del proteosoma 20S la duen a terme tres complexos reguladors: PA28, PA200 i PA700. (i) PA700, també anomenada Partícula Reguladora del Proteosoma (PRP), s'associa a un o als dos extrems del proteosoma 20S de manera dependent d'ATP, produint el proteosoma 26S enzimàticament actiu, el qual és responsable de la degradació d'una àmplia varietat de proteïnes poliubiquitinades i altres independents a ubiquitinització. (ii) P700, que també té funció de xaperona independent al proteosoma 20S, reparació de nucleòtids, estimulació de l'elongació de la transcripció per la RNA Pol II i dissociació del complex Cdc2-ciclinaB. (iii) PA28, o el regulador 11S (REG), és un altre activador del proteosoma 20S, que promou l'activitat peptidasa de manera independent a ATP, però no promou la hidròlisi de grans estructures proteiques desnaturalitzades, ni que estiguin poliubiquitinades.

S'ha vist que la sobreexpressió d'*UBI4* rescata la supervivència en resposta a estrès tèrmic del mutant *lcb1-100*, el qual no indueix de la síntesi d'Hsps, ni de ceramides. La supressió d'aquest efecte mitjançant la via d'ubiquitinització i proteosoma indica que retirar les proteïnes mal plegades o agregades és imprescindible per a la supervivència cel·lular (no pas la pèrdua de les activitats de les proteïnes desnaturalitzades, ni el seu replegament), perquè el que és realment nociu és la toxicitat inherent de les

## Introducció

proteïnes mal plegades o agregades (Friant *et al*, 2003). En condicions d'estrès, l'increment d'expressió de l'ubiquitina molt possiblement augmenta l'activitat de l'UPS per pal·liar els efectes tòxics de les proteïnes desnaturalitzades i agregades. La inducció de les ubiquitines també incrementa l'activitat del proteosoma. A més, l'activació del proteosoma regula el procés d'apoptosi, una de les darreres etapes de la degradació (Riezman, 2004).

### 2.1.3.4.- Biosíntesi d'altres proteïnes

Hi ha altres proteïnes implicades en la resposta a estrès tèrmic: (i) metal·lotioneïnes involucrades en l'homeòstasi de metalls pesats i en destoxicació, com *CUP1*, el qual codifica per una proteïna essencial per prevenir la toxicitat del coure (Mager i Ferreira, 1993), (ii) proteïnes de la paret cel·lular (proteïnes de la família PIR) i (iii) enzims involucrats en la biosíntesi de la paret cel·lular (*GSC2*) (Jung i Levin, 1999).

## 2.2.- L'estrès oxidatiu en *S. cerevisiae*

### 2.2.1.- Agents oxidants en *S. cerevisiae*

Diversos compostos generen estrès oxidatiu en els llevats:

- El peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) es difon molt fàcilment i se suposa que entra passivament en les cèl·lules, de manera que és capaç de penetrar a tots els compartiments cel·lulars i així reaccionar amb qualsevol molècula reactiva. La toxicitat en *S. cerevisiae* és al voltant de 0,5-5 mM, segons el fons genètic. Aquest compost causa una aturada del cicle en G2 (Flattery-O'Brien i Dawes, 1998) i s'han descrit característiques d'apoptosi resultants de la seva aplicació en dosis elevades (Madeo *et al*, 1999).

- Els derivats de peròxids orgànics emprats en llevats són l'hidroperòxid de *tert*-butil (*t*-BOOH), l'hidroperòxid cumè, l'àcid linolènic i l'hidroperòxid linoleic. L'alta hidrofobicitat augmenta la seva probabilitat de reaccionar amb els components de la membrana. La toxicitat en *S. cerevisiae* és al voltant de 0,05 mM pels hidroperòxids lípids.

- Les espècies cíclics redox, com la menadiona (cetona aromàtica policíclica), el paraquat (herbicida) i el plumbagin són drogues generadores de grups  $O_2^{\bullet-}$  en cèl·lules creixent aeròbiamment. Ciclen reduint alternativament l' $O_2$  molecular i oxidant específicament reductases cel·lulars consumint NADPH. La menadiona és tòxica en un rang de 0,1mM en *S. cerevisiae* i causa una aturada del cicle en G1 (Flattery-O'Brien i Dawes, 1998).

- Altres compostos causen estrès oxidatiu indirectament: la diamida és un agent oxidant de grups SH, el GSH (Kosower i Kosower, 1995) i també provoca ponts disulfid intra- i intermoleculars; el dimetilmaleat és un agent alquilant que reacciona amb grups tiol lliures que promouen la depleció de grups GSH reduïts (Plummer *et al*, 1981). Aquests agents són tòxics en el rang milimolar.

Agents oxidants	
Peròxid d'hidrogen	
Hidroperòxid de <i>tert</i> -butil	
Menadiona	
Diamida	
Dietil maleat	

**Taula 5.** Formulació química dels principals compostos oxidants utilitzats en llevats.

### 2.2.2.- Efectes generals de l'estrès oxidatiu en *S. cerevisiae*

L'oxidació de proteïnes depèn del tipus d'estrès i del tipus de proteïna (Cabiscol *et al*, 2000). En el cas de l'estrès per peròxid o menadiona, diversos enzims glicolítics es carbonilen, de manera que possiblement es reprimeix la glicòlisi i el TCA. Durant la respiració, les proteïnes mitocondrials són les dianes principals en l'oxidació, ja que el mitocondri és la font majoritària de ROS (Toledano *et al*, 2003).

L'efecte més deleteri de l' $O_2^{\bullet-}$  és la seva capacitat d'alliberar ferro de les proteïnes amb ISC (com l'aconitasa), que condueix al dany d'aquestes proteïnes i a l'acumulació d' $OH^{\bullet}$ , per la reacció de Haber-Weiss i de Fenton (Taula 3). A més, aquesta toxicitat pot també estar associada a la privació de ferro, degut a la demanda de ferro per reensamblar els centres (De Freitas *et al*, 2000).

### 2.2.3.- Protecció antioxidant en *S. cerevisiae*

La resposta antioxidant en *S. cerevisiae* ocorre primerament a nivell transcripcional (Moye-Rowley, 2002).

#### 2.2.3.1.- Protecció antioxidant enzimàtica

##### 2.2.3.1.1.- Les superòxid dismutases

Les SOD catalitzen la reacció  $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + H_2 \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$ . La seva activitat requereix ions metàl·lics redox actius. En el llevat se n'expressen dues formes: la forma citoplasmàtica Cu/Zn-Sod codificada pel gen *SOD1* elimina  $O_2^{\bullet-}$  del citoplasma i possiblement, també, del peroxisoma; el mutant  $\Delta sod1$  és defectiu en la biosíntesi de lisina (conseqüència del dany en mitocondris) i de metionina (resultat de la inhibició de la via de les pentoses fosfat generada per les condicions oxidatives les quals disminueixen

## Introducció

el NADPH); la forma mitocondrial Mn-Sod codificada per *SOD2* protegeix del  $O_2^{\bullet-}$  generat en la cadena respiratòria mitocondrial i l'exposició a etanol (Folch-Mallol *et al*, 2004), tot i que no sembla intervenir en la defensa contra agents oxidants externs (Herrero *et al*, 2008).

### 2.2.3.1.2.- Les catalases

Les catalases són enzims acomplexats a un grup de ferro homotetramèric i catalitzen la reacció  $H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$ . En *S. cerevisiae* hom troba la catalasa citosòlica Ctt1 (la qual es regula per estrès oxidatiu) i la peroxisomal Cta1 (la qual elimina el  $H_2O_2$  generat per l'acil-CoA oxidasa durant la  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos). La deleció d'un dels gens codificants per aquestes catalases impossibilita dur a terme la resposta adaptativa a  $H_2O_2$  en la fase exponencial del creixement. Les soques defectives en les dues catalases són hipersensibles a  $H_2O_2$  en fase estacionària (Herrero *et al*, 2008; Ruis i Hamiltol, 1992).

### 2.2.3.1.3.- Les peroxidases

Les peroxidases redueixen peròxids orgànics i inorgànics als seus alcohols corresponents, gràcies als grups tiols de les cisteïnes dels llocs actius. Per tant, la seva activitat depèn de grups donadors d'electrons pels tiols.

La glutatió peroxidasa catalitza la reducció d'hidroxi-peròxids, reduint GSH. Hi ha dos tipus de glutatió peroxidases: les clàssiques, i els fosfolípid hidroperòxids. Les primeres són multimèriques i capaces de reduir hidroperòxids orgànics i inorgànics. Les segones acostumen a ser monomèriques i associades a membrana i, a més de reduir els hidroperòxids solubles, redueixen els hidroperòxids lipídics en les membranes, pel que es consideren els enzims principals en la reparació de la peroxidació lipídica en membrana (Halliwell i Gutteridge, 2007). En *S. cerevisiae* hi ha tres enzims d'aquest tipus, Gpx1, Gpx2, Gpx3. Aquesta última isoforma és l'única hipersensible a peròxid; promou l'oxidació del factor de transcripció Yap1 a la seva forma de pont disulfur intramolecular (forma activa), funció associada amb la detecció i la transducció de senyal d'hidroperòxids, mitjançant una via de senyalització basada en una cascada d'oxidació de tiols (Delaunay *et al*, 2002). El seu paper com a transductor de senyal a Yap1 és independent de la seva activitat peroxidasa i de la resistència en front peròxids i metalls pesats. La Gpx2 és l'única glutatió peroxidasa induïda transcripcionalment de manera Yap1 i Skn7 dependent. Aquesta també s'indueix amb elevades concentracions de  $Ca^{2+}$  (Herrero *et al*, 2008). Hi ha altres proteïnes amb activitat GPX contra  $H_2O_2$  o hidroperòxids, com són les glutaredoxines Grx1 i Grx2 i la glutatió transferasa Gtt1.

#### 2.2.3.1.4.- Les peroxiredoxines

Les peroxiredoxines (Prxs) són una superfamília de proteïnes antioxidants, que redueixen peròxids i peroxinitrits catalitzant la reacció  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{R}(\text{OH}) \xrightarrow{\text{Prx}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{R}(\text{O})_2$ . La seva funció no depèn de metalls o grups prostètics, sinó d'un grup tiol. Utilitzen com a donadors d'electrons glutatió o tioredoxines. En *S. cerevisiae*, els termes peroxiredoxina i tioredoxina peroxidasa s'utilitzen indistintament. Les Prxs es divideixen en tres grups: (i) les Prxs 2-Cis típiques homodimèriques amb dues cisteïnes conservades en el centre actiu, (ii) les Prxs 2-Cis atípiques amb només una cisteïna conservada, i (iii) les Prxs 1-Cis monomèriques i amb una cisteïna en el centre actiu. S'han descrit cinc Prxs localitzades en diferents compartiments cel·lulars que realitzen diferents funcions: les citosòliques Tsa1, Tsa2 i Ahp1; la mitocondrial Prx1, i la nuclear Dot5 (Park *et al*, 2000). Totes són del tipus típic Prxs 2-Cis, excepte Prx1 que és del grup 1-Cis. Tsa1 i Tsa2 actuen cooperativament en front l'estrès oxidatiu i nitrosatiu generat metabòlicament. A més, el paper protector de les Prxs s'estén a les ROS generades per metalls pesats (Herrero *et al*, 2008). Una soca delecionada per les cinc Prxs és hipermutable, fet que connecta l'elevada presència de ROS amb la inestabilitat genòmica (Wong *et al*, 2004).

#### 2.2.3.1.5.- La glutatió reductasa (Grr1)

Redueix el glutatió oxidat (GSSG) mantenint, així, el balanç intracel·lular entre GSH i GSSG.

#### 2.2.3.1.6.- Els enzims de la ruta de les pentoses

Aquests enzims, glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (Zwf1), transcetolasa (Tkl1) i ribulosa-5-fosfat epimerasa (Rpe1), són essencials per a la producció de poder reductor cel·lular en forma de NADPH, ja que aquests enzims claus en la resposta antioxidant utilitzen NADPH com a reductor: la glutatió reductasa i la tioredoxina reductasa, per a reduir el GSSG i la tioredoxina, respectivament.

#### 2.2.3.2.- Protecció antioxidant no enzimàtica

El sistema de defensa no enzimàtic està constituït típicament per molècules petites.

##### 2.2.3.2.1.- El glutatió

El glutatió (GSH) és el tripèptid l-L-glutamil-L-cisteinilglicina. Conté un grup SH que reacciona amb els oxidants, produint el grup GSSG. Aquesta modificació s'anomena glutatinationilació o S-tiolació. El GSH té un paper molt important en l'homeòstasi redox cel·lular (ja que és possiblement la molècula atrapadora d'intermediaris reactius d'oxigen més abundant), i en la protecció en front l'oxidació irreversible

## Introducció

de proteïnes. El canvi del tiol-disulfur entre la proteïna S-tionilada i la glutaredoxina reduïda recicla la tiol proteïna reduïda permetent la restauració de l'activitat enzimàtica. En resposta a  $H_2O_2$ , *S. cerevisiae* expressa una proteïna S-tionilada, la Tdh3, que és una de les tres isoformes de la gliceraldehid-3-fosfatasa deshidrogenasa (GAPDH) amb una activitat enzimàtica essencial en aquest estrès. Les altres dues isoformes tenen un paper destacat en la tolerància a exposicions llargues a  $H_2O_2$  (Toledano *et al*, 2003).

### 2.2.3.2.2.- Les glutaredoxines

Les glutaredoxines (Grxs) són un grup de proteïnes petites responsables de la reducció de les proteïnes amb ponts disulfur intra- i intermoleculars amb cisteïnes sensibles al canvi redox al seu centre actiu que participen en la reacció, utilitzant el GSH com a donador d'hidrogen. El **sistema GRX** també inclou la glutatió reductasa i NADPH. Aquest darrer enzim regenera GSH utilitzant els electrons del NADPH a partir de la forma oxidada GSSG, que es produeix durant la reacció de les Grxs. Les Grxs clàssiques contenen el motiu CPY/FC en el centre actiu. En *S. cerevisiae*, hi ha dues Grxs ditiòliques Grx1 i Grx2, les quals es troben en el citosol i una fracció de Grx2 al mitocondri (degut al seu codó d'inici de lectura alternatiu) (Porrás *et al*, 2006). S'ha descrit que Grx1 protegeix la cèl·lula contra  $H_2O_2$  i Grx2 contra  $O_2^{\bullet-}$  (Luikenhuis *et al*, 1998).

Les Grxs monotitiòliques tenen una sola cisteïna al centre actiu inclosa al motiu CGFS, i utilitza com a substrat  $\beta$ -hidroxietil disulfid (HED). En *S. cerevisiae* Grx3 i Grx4 es localitzen al nucli i tenen funcions redundants com a reguladors negatius del factor de transcripció Aft1 (el qual regula l'expressió dels gens de captació de ferro del sistema d'alta afinitat); el doble mutant per les Grxs monotitiòliques nuclears presenta un fenotip hipersensible a agents oxidants. La proteïna mitocondrial Grx5 participa en els darrers passos de la biosíntesi dels ISC, i la seva deleció provoca hipersensibilitat a estrès oxidatiu (Herrero *et al*, 2008). A més, recentment, s'han descrit les Grxs monotitiòliques Grx6, amb el domini CSYS al centre actiu i localitzada en l'aparell de Golgi i al reticle endoplasmàtic (RE), i Grx7, amb el domini CPYS al centre actiu i localitzada al RE. Són proteïnes amb un domini transmembrana, una activitat semblant a les GRXs ditiòliques, i probablement amb funcions associades a la regulació redox de la maquinària secretora en condicions oxidants (Izquierdo *et al*, 2008). La proteïna citosòlica Grx8 és ditiòlica de baixa activitat; la seva expressió està induïda fortament per arsènic i la seva defectiva per aquesta proteïna no presenta sensibilitat a estrès oxidatiu (Eckers *et al*, 2009).

### 2.2.3.2.3.- Les tioredoxines

Les tioredoxines (Trx) són petites tiol oxidoreductases que contenen dos residus de cisteïna conservats al centre actiu i són riques en grups SH. El **sistema TRX** el completa la Trx reductasa, la qual oxida la Trx a la forma tiol activa emprant NADPH. Les Trxs participen en la reducció dels ponts disulfur que es formen en les proteïnes durant el seu cicle catalític, com la ribonucleòtid reductasa (requerida pel manteniment dels nivells de dNTPs), la 3'fosfoadenosina 5'fosfosulfat reductasa (necessària per l'assimilació del sofre) o la Trx peroxidasa. En general, poden participar en la modulació de l'estat redox de les proteïnes SH i conseqüentment en el plegament de proteïnes (Rietsch i Beckwith, 1998). Les Trxs comparteixen amb les Grxs i altres famílies de proteïnes, com les disulfid isomerases, un domini de plegament tioredoxina. Les Trxs i les Grxs poden tenir, a més, funcions redundants com la síntesi de DNA o el metabolisme del sofre (Herrero *et al*, 2008).

En *S. cerevisiae* hi ha dues Trx citosòliques, Trx1 i Trx2, i una mitocondrial, Trx3, i també una Trx reductasa citosòlica, Trx1, i una mitocondrial, Trx2, definint dos sistemes separats i independents (Pedrajas *et al*, 1999). Les soques defectives en les dues Trxs citosòliques tenen la fase S del cicle cel·lular més llarga i són auxotròfiques pels aminoàcids sulfurosos. A més, aquestes estan implicades en la defensa en front a formes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'addició externa, sobretot Trx2 (Muller, 1991). El paper protector del sistema citosòlic de les Trxs en front a condicions reductives ocorre a través de l'activitat xaperona de Tsa1, la qual impedeix l'agregació de les proteïnes ribosomals (PR) mal plegades durant l'estrès reductiu (Herrero *et al*, 2008; Rand i Grant, 2006).

### 2.2.3.2.4.- Les poliamines

Són derivats d'aminoàcids que s'uneixen a diverses ROS, en especial l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. La putrescina, l'espermidina i l'espermina participen en processos nombrosos i variats. Mutants en la síntesi d'espermidina i d'espermina en llevat porta a defectes en el creixement aeròbic, acumulant ROS; a més, en un medi defectiu en poliamines desenvolupen un fenotip apoptòtic i moren (Chattopadhyay *et al*, 2006).

### 2.2.3.2.5.- L'àcid eritroascòrbic

Mostra propietats antioxidants semblants a l'àcid ascòrbic; és un bon agent reductor que reacciona de manera general amb el radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), l'anió superòxid (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el singlet d'oxigen <sup>1</sup>O<sub>2</sub> i els radicals tiil.



## Introducció

### 2.2.3.2.6.- Les metal·lotioneïnes

Són proteïnes petites, riques en cisteïnes, que tenen la capacitat d'unir certs ions metàl·lics per emmagatzemar-los de manera que no puguin reaccionar amb ROS per la reacció de Fenton.

### 2.2.3.2.7.- Les flavohemoglobines

Les flavohemoglobines són metal·loproteïnes que participen en la detecció i protecció en front a òxid nítric. El gen responsable de l'expressió de flavohemoglobines en *S. cerevisiae* és *YHB1* (codificant per l'oxidoreductasa d'òxid nítric). S'indueix en presència d'oxigen i la seva deleció mostra sensibilitat al creixement en presència de diamida i dietilmaleat (Zhao *et al*, 1996).

## 2.3.- La depleció de ferro en *S. cerevisiae*

Els microorganismes unicel·lulars han desenvolupat una sèrie d'estratègies per incrementar la solubilitat del ferro, i així solucionar el problema de la seva biodisponibilitat: acidificant l'ambient, reduint el ferro fèrric ambiental a la forma ferrosa més soluble, i secretant molècules solubilitzadores quelants de ferro (Philpott, 2006). En *S. cerevisiae*, específicament, el ferro resulta importantíssim per diverses raons:

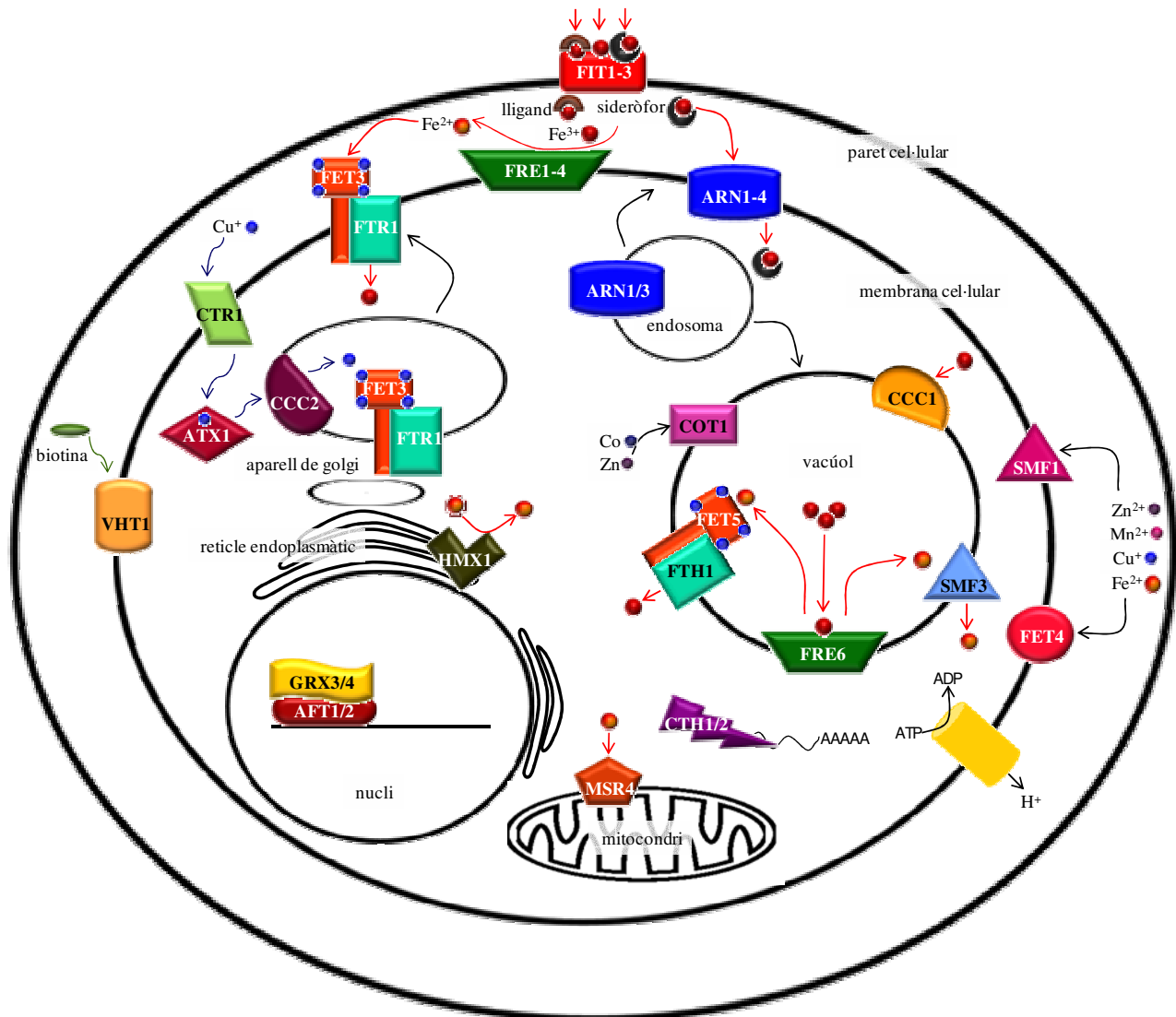
I. Posseeix nombroses vies d'adquisició de ferro genèticament independents. Es tracta de quatre sistemes que permeten transportar ferro a través de la membrana plasmàtica (Kaplan i Kaplan, 2009) en forma de salts fèrriques i ferroses, de quelants de ferro de baixa afinitat (com el citrat fèrric) i de quelants de ferro d'alta afinitat (com els sideròfors) (Philpott i Protchenko, 2008).

II. La solubilització del ferro requereix o bé la síntesi d'aquests sideròfors, o bé la síntesi de proteïnes amb grups hemo capaces de reduir la forma fèrrica del ferro a formes ferroses més solubles. Per tant, aquest fet també comporta una inversió considerable de components cel·lulars.

III. L'habilitat d'aquest llevat a créixer aeròbiamment i anaeròbia li confereix plasticitat metabòlica en resposta a canvis en ferro o oxigen (Kaplan *et al*, 2006), com s'ha dit anteriorment.

### 2.3.1.- Estratègies d'*S. cerevisiae* en front la privació de ferro

En condicions de depleció de ferro, *S. cerevisiae* adopta tres estratègies principals: activa els sistemes d'adquisició de ferro d'alta afinitat, mobilitza el ferro intracel·lular emmagatzemat i realitza canvis metabòlics d'adaptació a la limitació de ferro.



**Il·lustració 2.** Esquema de l'entrada de ferro en *S. cerevisiae* per les vies de baixa i alta afinitat de ferro. Adaptada de Kaplan i Kaplan (2009), Philpott i Protchenko (2008) i Sutak *et al.* (2008).

### 2.3.1.1.- Adquisició de ferro pel sistema d'alta afinitat

En condicions normals, *S. cerevisiae* adquireix ferro a través del sistema de transport de baixa afinitat, el qual el formen els productes dels gens *FET4* i *SMF1*. Aquests gens no són específics de ferro, sinó que permeten l'entrada a la cèl·lula d'altres metalls de transició, com manganès, coure o zinc. Per una banda, el llevat té tres membres de la família NRAMP de transportadors de metalls bivalents: (i) Smf1, que participa en l'influx sobretot de  $Mn^{2+}$  i és un simportador d' $H^+$ /metalls de transició divalents o trivalents, que emprava un gradient de pH per transportar ferro; (ii) Smf2, que s'expressa als microsomes (partícula citoplasmàtica granular rica en enzims que serveixen de suport a l'RNA), i (iii) Smf3, localitzat al vacúol en resposta a depleció de ferro o d'oxigen. Per l'altra banda, Fet4 (típic dels ascomicets) es descriu com una

## Introducció

permeasa de baixa afinitat de  $\text{Fe}^{2+}$ , però també transporta altres metalls com zinc, coure o cadmi. L'expressió de *FET4* augmenta en condicions d'hipòxia i es creu que aquest transportador constitueix el sistema primari d'adquisició de ferro en anaerobiosi, llavors i gràcies a la presència de  $\text{Fe}^{2+}$ , els sistemes de transport de ferro es tornen independents de les reductases (Philpott, 2006). L'adquisició del ferro a través de la membrana plasmàtica en totes les espècies acostuma a involucrar l'acidificació del medi per incrementar la solubilitat del ferro, i ho fa mitjançant un transportador de  $\text{H}^+$  dependent d'ATP (Kaplan i Kaplan, 2009).

En condicions de depleció de ferro, disminueix l'expressió de les proteïnes de superfície cel·lular implicades en l'adquisició de ferro i augmenta l'expressió de l'importador de ferro d'emmagatzematge vacuolar, *CCCI*, el qual protegeix de la toxicitat del ferro (Vergara i Thiele, 2008).

En privació de ferro, hi ha dos sistemes de transport d'alta afinitat situats a la membrana plasmàtica del llevat: el de la via reductiva i el de la via no reductiva. Abans, però, el ferro ha de travessar la paret del llevat. Les mannoproteïnes de la paret de la família FIT (*FIT1*, *FIT2* i *FIT3*) augmenten la seva expressió durant depleció de ferro, contribuint a la retenció de diverses formes del ferro a la paret cel·lular, i promovent l'adquisició de ferro (com el ferro unit a ferricrom i ferrioxamina B) mitjançant mecanismes desconeguts (Philpott i Protchenko, 2008).

### 2.3.1.1.1.- Sistema reductiu de l'adquisició de ferro

La via reductiva d'adquisició de ferro permet l'entrada d'aquest bioelement en forma de sals fèrriques i quelats fèrrics en dues etapes: primer, es redueix la forma fèrrica a ferrosa i després, es transporta la forma ferrosa del ferro mitjançant un complex transportador ferrós específic, d'alta afinitat.

L'etapa de reducció del ferro la du a terme la família FRE de gens metal·loreductases, amb nou membres, que es poden agrupar en tres classes: *FRE1* i *FRE7*, del *FRE2* al *FRE6*, i el *FRE8* i l'*AIM14*. Els gens *FRE1* i *FRE2* codifiquen per flavocitocroms amb activitat fèrric i cúpric reductasa, redueixen el ferro a forma ferrosa i constitueixen la majoria d'aquesta activitat a la membrana cel·lular. Aquests gens són necessaris pel creixement en medis que contenen baixes concentracions de sals fèrriques i poden catalitzar l'alliberament reductiu del ferro de diferents sideròfors. *FRE3* i *FRE4* redueixen la forma fèrrica unida a sideròfors: *FRE3* codifica per una reductasa de la membrana plasmàtica que pot catalitzar l'adquisició reductiva del ferro unit al sideròfor hidroxamat i *FRE4* codifica per un catalitzador de l'adquisició de ferro de l'àcid dihidroxamat rodotorúlic. Tots aquests gens indueixen la seva expressió en depleció de ferro i, a més, *FRE1* i *FRE7*, ho fan en condicions de manca de coure via el factor de transcripció Mac1 (Philpott i Protchenko, 2008). *FRE5* és una reductasa fèrrica putativa semblant a *FRE2*, localitzada al mitocondri. *FRE6* es localitza al vacúol, on participa en l'exportació de ferro i coure cap al citosol. La transcripció de *FRE8* i *AIM14* no s'afecta pel ferro o el coure, però els *Afre8* no poden créixer en privació de ferro i són deficients en la respiració (De Freitas *et al*, 2004).

La internalització del ferro ferrós s'esdevé a través de Fet3, una ferrooxidasa multicoure, i Ftr1, una permeasa; *S. cerevisiae* no es capaç de créixer en medi limitant de ferro sense aquestes dues proteïnes (Askwith *et al*, 1994). Fet3 oxida el  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  en una reacció dependent de Cu i  $\text{O}_2$ . La proteïna oxida tres àtoms de  $\text{Fe}^{2+}$  seqüencialment, emmagatzemant els electrons extrets. Quan un quart àtom és oxidat, Fet3 redueix una molècula d'oxigen a aigua, prevenint la formació de radicals d'oxigen:  $4\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4\text{H}^+ \rightarrow 4\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ . El  $\text{Fe}^{3+}$  passa a través de Ftr1 al citosol (Kaplan i Kaplan, 2009; Philpott, 2006). Fet3 i Ftr1 s'ensamblen en un complex estable abans del seu tràfic cap a la superfície cel·lular i el complex es degrada en presència de ferro mitjançant endocitosis via l'ubiquitinització de Ftr1 (Felice *et al*, 2005).

El coure té un paper prou important en l'adquisició de ferro, ja que dos gens de la família FRE, Fet3 i Ftr1 s'uneixen a coure. L'activitat oxidasa de Fet3 és imprescindible per l'adquisició de ferro i el coure és necessari per la seva activitat. El coure s'hi insereix posttranscripcionalment en un compartiment postgolgi de la via secretora, amb la participació de la xaperona del coure, Atx1, i el transportador de coure, Ccc2. Aquestes dues proteïnes es regulen pel ferro i no pel coure. El coure s'internalitza a la cèl·lula mitjançant la permeasa cúprica, Ctr1. En absència de Ctr1 o Ccc2, la cèl·lula de llevat és defectiva en la via reductiva de transport de ferro d'alta afinitat (Sutak *et al*, 2008).

Un paràleg de Fet3 és Fet5, el qual s'ensambla amb el paràleg de Ftr1, que és Fth1, per formar un complex transportador de ferro ferrós que juntament amb Fre6 es troben al vacúol.

### 2.3.1.1.2.- Sistema no reductiu de l'adquisició de ferro: transport mitjançant sideròfors

Els sideròfors són una classe heterogènia de molècules orgàniques de baix pes molecular, les quals s'uneixen a  $\text{Fe}^{3+}$  amb una excepcionalment alta afinitat i especificitat. Aquests són sintetitzats i secretats deslligats a ferro per la majoria d'espècies de bacteris i fongs, *S. cerevisiae* n'és una excepció, tot i que sintetitza proteïnes d'unió a aquests sideròfors per tal d'adquirir els complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideròfor i competir així amb els altres microorganismes del medi. *S. cerevisiae* acumula grans quantitats d'aquests complexos, fet que indica que aquests actuen com a reservoris de ferro intracel·lulars i, per tant, els sideròfors de l'exterior cel·lular poden unir-se i solubilitzar  $\text{Fe}^{3+}$ , i aquests complexos ésser capturats i internalitzats pels sistemes de transport cel·lulars.

Els sideròfors tenen gran varietat d'estructures, però es poden classificar en dos grups: (i) hidroxamats, fonamentalment secretats per fongs, on s'inclouen els trihidroxamats: ferricrom, triacetilfusarinina C (TAFC) i ferrioxamina B (FOB), i (ii) els catecolats, fonamentalment secretats per bacteris (Philpott *et al*, 2002).

El llevat adquireix sideròfors del medi mitjançant la família de proteïnes ARN, que és un grup de transportadors homòlegs. Cada un d'ells disposa de catorze dominis transmembrana i una altíssima

## Introducció

especificitat per un sideròfor bacterià o fúngic concret. Aquesta és una de les disset famílies gèniques de transportadors de sideròfors úniques del regne dels fongs. En resposta a privació de ferro, *S. cerevisiae* expressa quatre transportadors de sideròfors diferents, tres d'ells reconeixent sideròfors de la classe dels trihidroxamats i un el catecolat enterobactina: (i) Arn1 transporta sideròfors ferricroms de diversos tipus, coprogen i té traces d'activitat cap a TAFC; (ii) Arn2/Taf1 transporta específicament TAFC; (iii) Arn3/Sit1 reconeix ferricroms, coprogen, ferrioxamines bacterianes i, també, té traces d'activitat cap a TAFC; (iv) Arn4/Enb1 només mostra activitat cap a enterobactina (Philpott, 2006). Arn1 i Arn3 trafiquen directament de la xarxa transgolgi al vacúol quan els seus substrats no es troben a l'espai extracel·lular. En canvi, Arn4 es localitza a la membrana cel·lular, tot i l'absència del seu substrat (Philpott i Protchenko, 2008).

### 2.3.1.2.- Mobilització del ferro intracel·lular emmagatzemat

El vacúol és l'òrganul majoritari per l'emmagatzemament de ferro, tot i que el ferro també es troba en altres compartiments. En condicions de repleció de ferro, el vacúol n'acumula gràcies a la mateixa activitat del ferro i al transportador de manganès, Ccc1, per tal d'evitar els efectes tòxics del ferro i per poder disposar-ne en possibles situacions de depleció de ferro. En privació de ferro s'atura l'expressió de Ccc1 i s'indueix l'expressió de diversos gens vacuolars que permeten l'alliberament d'aquest ferro emmagatzemat, duplicant els sistemes de transport de ferro de la membrana plasmàtica. La metal·loredutasa Fre6 és present en la membrana vacuolar, on redueix el ferro i el coure vacuolars abans del seu alliberament al citosol, via el complex Fet5 i Fth1 o l'Smf3 (que proveeix la cèl·lula de ferro per un mecanisme independent d'oxigen, i també s'indueix en condicions de depleció d'oxigen). A més, les cèl·lules en condicions de deficiència de ferro, són més sensibles als efectes tòxics d'altres metalls de transició. En el vacúol, s'indueix l'expressió d'un altre gen, *COT1*, el qual codifica per un transportador d'altres metalls (principalment zinc i cobalt) cap a l'interior del vacúol.

El mitocondri (on hi ha força quantitat de ferro i és el lloc d'incorporació d'aquest als grups hemo o als ISC de les proteïnes) resulta un reservori potencial per a la mobilització de ferro. En aquest òrganul, en condicions de manca de ferro, s'indueix l'expressió del transportador de  $Fe^{2+}$ , Mrs4 (Froschauer *et al*, 2009).

En la membrana del RE s'expressa Hmx1, una oxigenasa hemo que permet l'ús d'aquesta font nutricional de ferro. L'hemo regula l'activació dels factors de transcripció Hap1 i Hap2/3/4/5, els quals controlen la transcripció dels gens involucrats en el creixement aeròbic, molts dels quals són gens dels citocroms, rics en ferro i responsables de la respiració. Per tant, l'expressió d'Hmx1 d'una banda, permet aprofitar el ferro metabòlicament i de l'altra banda, evita que el ferro es destini als complexos respiratoris (Philpott i Protchenko, 2008).

### 2.3.1.3.- Modificacions metabòliques a la privació de ferro

Les cèl·lules, en deficiència de ferro, adapten el seu metabolisme cap a la síntesi de processos que utilitzin proteïnes amb menys contingut de ferro; reduint, per tant, la síntesi d'algunes proteïnes que contenen grups hemo i ISC en privació de ferro. D'aquesta manera s'afecten algunes rutes metabòliques regulades pel ferro (Kaplan i Kaplan, 2009; Shakoury-Elizeh *et al*, 2004):

I. La depleció de ferro condueix a una reducció de la respiració (en la qual abunden enzims que contenen ferro), fet que es compensa amb un augment de la glicòlisi.

II. L'adquisició i la biosíntesi de biotina són processos recíprocament regulats per ferro. En abundància de ferro se n'activa la biosíntesi (mitjançant els enzims codificats per *BIO3*, *BIO4* i *BIO2*) i en depleció de ferro, la transcripció d'aquests gens disminueix i simultàniament augmenta la síntesi de *VTH1*. Aquest codifica per un transportador de biotina de la superfície cel·lular que depèn del factor de transcripció Aft1, ja que cal conservar l'acumulació de biotina per una via independent de ferro (Kaplan *et al*, 2006).

III. La síntesi de glutamina, en condicions limitants de ferro, deixa de catalitzar-se per l'enzim amb ISC, Glt1, per sintetitzar-se via Gdh1/Gdh3 i Gln1, els quals no necessiten ferro.

IV. L'adquisició de fonts de nitrogen alternatives i el metabolisme d'aminoàcids, mentre que en abundància de ferro s'activen gens que participen en la síntesi de purina, probablement degut a un efecte indirecte (Shakoury-Elizeh *et al*, 2004). Altres exemples són la disminució de la síntesi de leucina o àcid lipoic.

### 2.3.2.- L'homeòstasi del ferro mitocondrial

La correcta formació dels ISC és essencial pel manteniment de l'homeòstasi del ferro en el mitocondri. Soques defectives per la cisteïna dessulfurasa involucrada en la biogènesi d'ISC (*Δnfs1*) tenen nivells superiors de ferro mitocondrial comparades amb les salvatges. De manera semblant, soques defectives per proteïnes *scaffold* (*Isu1*, *Isu2*, *Isa1*, *Isa2* i *Nfu1*), xaperona (*Ssq1* i *Jac1*) o ferredoxina (*Yah1*) mostren acumulació de ferro i dany oxidatiu mitocondrial. La deleció de l'homòleg de la frataxina (*Yfh1*) porta a defectes en la respiració, la pèrdua d'activitat enzimàtica ISC, acumulació de ferro mitocondrial, pèrdua de mtDNA i hipersensibilitat a estrès oxidatiu. Les evidències de la seva interacció amb *Nfs1* i *Isu1* indiquen que la frataxina està implicada en l'entrega de ferro per a la biogènesi d'ISC i el seu dèficit compromet la biogènesi dels ISC en l'atàxia de Friedreich.

La interrupció de l'ensamblatge dels ISC condueix a l'acumulació de ferro mitocondrial per dues possibles explicacions. (I) Una proteïna desconeguda amb ISC podria actuar com a detectora mitocondrial de ferro o ajudar a la funció d'aquest sensor. D'aquesta manera, defectes en aquesta proteïna amb ISC marcaria nivells defectius de ferro per a la cèl·lula, augmentant la mobilització del ferro citosòlic cap al mitocondri i l'increment de captació de ferro extracel·lular. (II) El ferro surt del mitocondri en forma d'ISC.

## Introducció

Si aquesta sortida es bloqueja quan s'interromp l'ensamblatge o la funcionalitat de l'exportador d'ISC, els ISC restarien atrapats al mitocondri.

Tant la interrupció de la biogènesi dels ISC com el metabolisme del ferro mitocondrial es relacionen amb canvis en l'expressió dels gens nuclears (regulació mitocondrial retrograda) i amb canvis en altres compartiments subcel·lulars (Rouault i Tong, 2005).

### 3.- La resposta a estrès en llevat

El dany per estrès i la resposta del llevat depenen del tipus i el grau de l'estrès: com més sever, més triga la cèl·lula a respondre. Els llevats han esdevingut excepcionalment competents en la supervivència a canvis sobtats i severs en el medi extern. Els mecanismes d'acció ràpida són crucials per fer front als canvis sobtats en l'ambient, tant per sobreviure, com per mantenir l'elevada taxa de proliferació d'aquest microorganisme. Malgrat això, i com s'ha dit anteriorment, les situacions d'estrès afecten de manera general a les estructures cel·lulars (paret, membrana, citoesquelet) i malmeten l'estructura i per tant la funció de les macromolècules (lípid, proteïnes i àcids nucleics).

La resposta a estrès consta de tres fases generals (Hohmann i Mager, 2003).

En la primera fase s'esdevenen canvis cel·lulars resultants de l'exposició a l'estrès. Es tracta d'una resposta ràpida per minimitzar els danys soferts, com és l'aturada transitòria del cicle cel·lular en G1. Molts dels senyals, sinó tots, són percebuts en la superfície cel·lular pels receptors de la paret i la membrana plasmàtica. L'activació d'aquests receptors per mecanismes com el d'unió a lligand pot portar a alteracions en altres components cel·lulars, i conseqüentment, poden haver-hi canvis en la forma cel·lular, la conductivitat d'ions, l'activitat gènica o la funció cel·lular (Scandalios, 2005).

En la segona es desencadenen els processos de defensa. Hi ha un reajustament del patró d'expressió gènica, ja que el programa d'expressió gènica òptim en un determinat ambient pot no ser-ho en un altre. El genoma detecta la senyalització de l'estrès ambiental i mobilitza la resposta cel·lular. En la resposta transcripcional el genoma pot respondre de manera ràpida i específica, incrementant o reduint l'expressió de gens de manera única per a cada condició d'estrès. Es tracta de canvis transitoris en els nivells de milers de trànscrits, que permet l'adaptació a la nova situació. La velocitat de la resposta i la durada i l'amplitud de les modificacions temporals dels nivells de trànscrits varien segons la magnitud de l'alteració ambiental (Causton *et al*, 2001; Gasch *et al*, 2000).

Finalment, les cèl·lules adaptades reemprenen la proliferació cel·lular.

Aquest treball se centra en els canvis en els patrons d'expressió gènica en resposta a un estrès oxidatiu i tèrmic moderats en el microorganisme *S. cerevisiae*.

### 3.1.- La resposta general a estrès

Els organismes presenten respostes comunes a diverses condicions d'estrès, ja que els seus objectius principals són protegir i reparar les cèl·lules del possible dany sofert. Centenars de gens canvien el seu patró d'expressió gènica de manera estereotipada després d'un estrès ambiental. A més, les cèl·lules de llevat guanyen protecció creuada contra diferents estressos, perquè les cèl·lules exposades a un estrès mitjà es tornen resistents a estressos severos o letals d'altres tipus. Hi ha nombrosos exemples d'aquesta resposta creuada, la depleció de glucosa estimula un ampli rang de respostes cel·lulars i l'estrès hiperosmòtic indueix gens de la resposta oxidativa i incrementa la termotolerància (Hohmann i Mager, 2003); l'estrès tèrmic preadapta les cèl·lules a la tolerància a etanol. També s'ha vist que l'increment de temperatura augmenta la concentració de ROS provocant la inducció de gens antioxidants (Lee i Park, 1998; Sugiyama *et al*, 2000) i que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indueix fortament un gran nombre d'Hsps (Godon *et al*, 1998), fet que suggereix la contribució d'aquests dos tipus de proteïnes a la termotolerància intrínseca de les cèl·lules de llevat (Moraitis i Curran, 2004).

En altres casos però, aquest fenomen no es dona. Així doncs, per exemple l'estrès tèrmic no estimula l'osmotolerància (Mager i Ferreira, 1993). Més recentment, s'ha vist que l'estrès tèrmic i el creixement a fase estacionària indueixen resistència a l'addició d'etanol, peròxid d'hidrogen, NaCl i creixement a fase estacionària o estrès tèrmic (Berry i Gasch, 2008). A més, els canvis ambientals recíprocs no presenten una resposta contrària (Gasch *et al*, 2000). Les evidències esmentades condueixen a parlar del mecanisme general de protecció cel·lular, tot i que es desconeix la seva regulació (Hohmann i Mager, 2003), a banda de les respostes d'expressió gènica específiques per a cada condició ambiental particular.

#### 3.1.1.- La resposta transcripcional

En *S. cerevisiae* s'han estudiat a nivell genòmic els canvis en els patrons d'expressió després de diversos estressos, que indiquen que aproximadament dos terços del genoma està involucrat en la resposta a canvis ambientals: aproximadament 300 gens involucrats en la defensa a l'estrès induïts i uns 600 gens que participen en la síntesi de proteïnes reprimits (Causton *et al*, 2001; Gasch, 2003; Gasch *et al*, 2000). En el treball de Gasch i col·laboradors (2000) es defineix la Resposta a Estrès Ambiental (ESR) analitzant nivells de trànscrips a través del temps en resposta a xocs tèrmics, peròxid d'hidrogen, menadiona, diamida, ditiotreitòl, xocs hiper- i hipoosmòtics, manca d'aminoàcids, depleció de fonts de nitrogen i fase estacionària. Els seus resultats mostren un increment del nivell d'expressió d'aproximadament 300 gens i uns 600 amb expressió disminuïda. En un altre treball, Causton i col·laboradors (2001) defineixen la Resposta Comuna Ambiental (CER) analitzant l'expressió gènica d'*S. cerevisiae* en resposta a diversos canvis ambientals: temperatura, oxidació, nutrients, pH i osmolaritat. En la majoria de respostes, observen modificacions transitòries en els patrons d'expressió gènica d'alguns gens; en altres, però, variacions



## Introducció

mantingudes al llarg de l'estrès. L'estudi d'aquests sis estressos revela 499 transcrits alterats, 216 induïts i 283 reprimits.

### 3.1.1.1.- Característiques de la resposta

#### 3.1.1.1.1.- Gens induïts

Les funcions dels gens induïts durant aquesta resposta són diverses. Les principals inclouen el metabolisme de carbohidrats, l'estrès cel·lular i la generació d'energia.

1. Pel que fa a l'energia: (i) la glucosa es destina a l'emmagatzemament de glicogen, amb enzims que promouen la síntesi (*GLG1*, *GPS2*) i la degradació (*YPR184W*) del glicogen i que es coindueixen i es regulen posttraduccionalment; (ii) la síntesi d'ATP a través de la glicòlisi, per proveir d'energia les xaperones moleculars consumidores d'ATP o l'altra maquinària de resposta a estrès cel·lular; i (iii) es genera NADPH per part de les pentoses fosfat (*ZWF1*, *GND2*).

2. El metabolisme: a banda de glucosa, les cèl·lules de llevat poden consumir altres metabòlits, com els àcids grassos. La  $\beta$ -oxidació dels àcids grassos té lloc en el peroxisoma i en resulten fraccions d'acetil que han de ser transportades al mitocondri on suplementen el TCA pel metabolisme anabòlic i la respiració. En l'ESR, s'indueixen gens involucrats en el metabolisme d'àcids grassos (*FOX2*, *IDH3*) i en el transport de metabòlits, en la importació (*FAAI*, *PXA2*) i l'exportació (*CAT2*) del peroxisoma. A més, se sintetitza trehalosa, que protegeix les membranes i les cèl·lules de la desnaturalització.

3. Inducció de les Hsps clàssiques: moltes codifiquen per xaperones moleculars que faciliten el plegament de les proteïnes i el manteniment de les seves conformacions particulars. Els gens codificants per aquestes proteïnes s'indueixen arran de diversos estressos, no només en resposta a la desnaturalització de proteïnes per calor. Les xaperones que formen part de l'ESR són: les sHsp (*HSP12*, *HSP26*, *HSP42*), els membres de la família d'Hsp70 (*SSA4*, *SSE2*, *HSP78*) i *HSP104*.

4. Proteïnes involucrades en degradació de proteïnes: les proteïnes malmeses o parcialment desnaturalitzades que no poden replegar-se correctament han de ser degradades per ubiquitinització, per tal de prevenir l'acumulació d'agregats proteics. Participen en l'ESR proteïnes involucrades en la lligació i conjugació de l'ubiquitinització (*HULA*, *UBC5*, *UBC8*); *UBI4*, la qual codifica per poliubiquitina i *UBI15*, per una putativa proteasa específica d'ubiquitinització. L'ubiquitinització és important tant per degradar proteïnes mal plegades, com proteïnes actives, d'aquesta manera la cèl·lula elimina ràpidament les proteïnes que no necessita per adaptar-se a l'estrès.

5. Proteïnes de la defensa en front agents oxidants, per prevenir el seu dany potencial. L'ambient reductor del citoplasma de llevat es veu afectat pel balanç dels grups SH de les proteïnes oxidades i reduïdes, el qual és modulats per les Grxs i Trxs mitjançant la reducció de grups disulfur depenent de NADPH. Per aquest motiu s'indueix l'expressió de gens codificants isoenzims de Trx i Grx (*TRX2*, *TTR1*),

l'enzim biosintètic de glutatió gamma-glutamil transferasa (*ECM38*) i antioxidants específics de tiols (*PRX1*, *YDR453C*).

6. Les proteïnes de l'homeòstasi del ferro, o bé que segresten o transporten metalls o bé que regulen Trxs o GSH, per tal de mantenir l'ambient reductor intracel·lular.

7. Proteïnes requerides per a la respiració: com que la despesa energètica en front dels estressos és gran, tot i la presència de glucosa, la respiració proporciona més ATP que la fermentació. Forma part de l'ESR la inducció del pas limitant en el TCA (*CIT1*), una isoforma alternativa del citocrom c (*CYC7*), dos factors que afecten la síntesi i l'ensamblatge de la fosforilació oxidativa dels components de la citocrom c oxidasa (*COX15*) i la ubiquinona (*COQ5*).

8. Les cèl·lules despolaritzen ràpidament el citoesquelet d'actina i el repolaritzen un cop superat l'estrès, modifiquen la paret cel·lular, canvien les funcions vacuolars i mitocondrials, indueixen gens que codifiquen per proteïnes de reparació de dany en DNA i poden autofagocitar-se si és necessari.

### 3.1.1.1.2.- Gens reprimits

Com que l'objectiu més important de l'ESR és conservar l'energia en front diversos estressos, es reprimeixen gens involucrats en síntesi de proteïnes i creixement cel·lular:

1. Hi ha una reducció en la síntesi de ribosomes, per tant, disminueix l'rRNA i els nivells d'mRNA codificants per PR. D'aquesta manera la cèl·lula estalvia massa i energia i destina els esforços a la síntesi i l'ús de xaperones i altres mecanismes de supervivència cel·lular.

2. Es redueixen els nivells de tRNA.

3. Els gens transcrits per les RNA polimerases I i III es reprimeixen en resposta a estrès, com també les subunitats compartides per aquestes. Ni els gens codificants per les subunitats de l'RNA Pol II, ni les subunitats dels seus factors associats i del complex mediador es reprimeixen en l'ESR, ja que aquesta polimerasa transcriu gens imprescindibles per a la supervivència cel·lular en front a estrès ambiental.

4. Minva l'expressió dels gens codificants per factors d'inici, d'elongació i de terminació de la traducció i aminoacil tRNA sintetases citosòliques. Es tracta d'una reducció significativa dels trànscripats codificants per l'aparell de traducció i els seus reguladors, de manera que baixa la síntesi de proteïnes.

D'altra banda i segons la disminució dels nivells d'expressió, els gens reprimits es poden classificar en dos grups: (i) els gens involucrats en processos relacionats amb el creixement, el metabolisme d'RNA, biosíntesi de nucleòtids, secreció i altres processos metabòlics i (ii) trànscripats amb un petit retard en el descens dels seus nivells que corresponen gairebé totalment a gens codificants per PR. S'ha observat la repressió de les PR durant múltiples estressos, regulada coordinadament pel factor de transcripció Rap1 (Li *et al.*, 1999). A més, els seus trànscripats tenen vides mitjanes relativament curtes. La reducció de l'expressió

## Introducció

dels gens d'rDNA i PR els coregula la via de la proteïna quinasa C (PKC) en resposta a defectes de secreció.

### 3.1.1.1.3.- Altres característiques

Hi ha altres característiques remarcables de l'ESR. L'expressió diferencial d'isoenzims n'és una. Diversos enzims involucrats en el metabolisme del carboni, plegament de proteïnes i defensa en front ROS s'indueixen específicament en l'ESR i altres no, potser a causa de les seves propietats òptimes per a l'ESR o per cobrir necessitats més singulars. La inducció de gens els productes dels quals tenen papers metabòlics recíprocs n'és una altra. És a dir, s'esdevé una inducció d'enzims sintètics i catabòlics, els quals tenen una regulació posttraduccional fina que inclina de manera ràpida el balanç metabòlic segons els requeriments energètics concrets del moment. A més, la cèl·lula indueix reguladors positius i negatius de la via proteïna-quinasa A (PKA) per tal de condicionar la resposta en base a la resolució de les modificacions posttraduccional.

### 3.1.1.2.- Els factors de transcripció Msn2 i Msn4

*MSN2* i *MSN4* codifiquen per activadors transcripcionals que s'activen en front diversos estressos, (entre els quals hi ha l'estrès tèrmic, l'osmòtic, l'oxidatiu, el pH àcid, la privació de glucosa, l'àcid sòrbic i l'alta concentració d'etanol) tot i que no són els únics factors transcripcionals activats en diferents estressos, està descrit que regulen l'ESR a estrès en *S. cerevisiae* (Causton *et al*, 2001; Gasch *et al*, 2000; Martinez-Pastor *et al*, 1996). Reconeixen una seqüència consens en *cis* en la regió promotora de molts dels gens induïts durant l'ESR, que s'anomena STRE (Element de Resposta a Estrès). La formen cinc nucleòtids (CCCCT) i és funcional en les dues direccions. S'han predit 186 gens amb aquest element (però no en tots ells és funcional), aquests gens codifiquen per transportadors, proteases i proteïnes que protegeixen a la cèl·lula en front diferents tipus d'estrès.

Les dianes d'Msn2/4 tenen un paper crític en l'adquisició de resistència a l'estrès i, per tant, seran requerits en estressos posteriors (Berry i Gasch, 2008). Segons Berry i col·laboradors (2008), Msn2 i Msn4 no tenen papers reguladors redundants, ja que només el 20% de les seves dianes en cinc estressos diferents mostren un defecte d'inducció additiu en soques  $\Delta msn2/4$ . En general, aquests investigadors han vist que la dependència en aquests dos factors transcripcionals varia segons l'estrès i que Msn2 participa més àmpliament que Msn4 en la regulació de l'expressió gènica. Les dues proteïnes comparteixen un 41% d'identitat i són semblants en mida i composició d'aminoàcids. Les dues contenen un domini de dits de zinc d'unió a l'element STRE localitzat a l'extrem C-terminal, dominis d'activació (DA) de la transcripció i una seqüència d'exportació nuclear a l'N-terminal. Contigu al domini de dits de zinc tenen un senyal de localització nuclear, el qual es inhibeix per la fosforilació de la PKA i activat per la desfosforilació de la proteïna fosfatasa 1 (PP1).

En condicions fisiològiques, Msn2 i Msn4 es localitzen al citoplasma (es regula parcialment via TOR). En situacions d'estrès, Msn2 i Msn4 s'hiperfosforilen i es relocalitzen al nucli, regulades per les vies de transducció de senyals PKA, Hog1, TOR quinasa.

### 3.1.1.3.- La regulació: vies de senyalització

La regulació de l'ESR no la controla un sol sistema, sinó que, segons la condició ambiental, diferents vies de senyalització exerceixen el seu paper. D'aquesta manera es modula l'afectació concreta per a cada condició ambiental. De fet, s'ha descrit que gens induïts en estrès oxidatiu pel factor de transcripció Yap1, també són induïts en estrès tèrmic, però mitjançant els factors de transcripció Msn2/Msn4 (Gasch *et al*, 2000) o també, gens induïts pel factor de transcripció Hsf1 en estrès tèrmic s'indueixen mitjançant Msn2/4 en xoc hiperosmòtic (Gasch, 2003). Les cèl·lules de llevat detecten una combinació d'estressos mitjançant senyals independents i creen un programa d'expressió que integra les respostes individuals a cada senyal. En aquest sentit hi ha una regulació positiva de l'ESR: la via de la PKA en resposta a senyals nutricionals, la via de la PKC en resposta a la inhibició de la secreció, la via HOG en resposta a estrès osmòtic, la via Snf1 en resposta a la manca de fonts de carboni i la via Mec1 en resposta a dany de DNA. També, hi ha una regulació negativa, la via TOR està implicada en la supressió de l'ESR. La complexitat en la regulació de l'ESR comporta avantatges a la cèl·lula: per una banda, precisió i especificitat en la resposta en front el nou ambient, creant un patró d'expressió gènica adaptat segons les necessitats de cada moment; i per l'altra, proveeix de mecanisme de reforç per a l'inici de l'ESR, ja que diverses vies de senyalització intervenen en la seva regulació.

## 3.2.- La resposta a estrès tèrmic

Tal com s'ha esmentat, l'estrès tèrmic causa la desnaturalització i l'agregació parcial de les proteïnes, es desensamblen els complexos proteics i altres estructures i s'incrementa la fluïdesa de les membranes. La formació dels agregats de proteïnes desnaturalitzades porta a la fase d'inducció dels mecanismes termoprotectius. Els programes d'estrès cel·lulars activats en un increment significatiu de temperatura són la resposta a xoc tèrmic i és una resposta amb múltiples facetes: remodelació metabòlica, aturada transitòria del creixement i canvis globals de transcripció, per l'adquisició de termotolerància (Trott i Morano, 2003).

### 3.2.1.- La resposta transcripcional a estrès tèrmic

Un canvi sobtat de temperatura porta a la modulació massiva i ràpida de l'expressió gènica. Tant l'ESR com les respostes especialitzades es donen en qüestió de pocs minuts. Primerament, s'indueixen les xaperones del plegament de proteïnes localitzades al citoplasma, mitocondri i RE i també gens relacionats

## Introducció

amb estrès cel·lular o transport de proteïnes regulats per la UPR; es renaturalitzen les proteïnes, algunes es retenen al RE i es repleguen les glicoproteïnes desnaturalitzades pel xoc. Seguidament, s'indueixen els gens involucrats en respiració i utilització de fonts alternatives de carboni, ja que s'esdevé una davallada en els nivells d'ATP, possiblement degut al seu consum per part de les Hsps (Causton *et al*, 2001).

La resposta transcripcional durant l'estrès tèrmic és transitòria i més curta que en altres estressos. Els primers estudis de la resposta d'*S. cerevisiae* al 1979 després d'un xoc tèrmic (22-37°C) i es postulen canvis temporals en l'eficiència de la traducció i l'estabilitat dels mRNAs degut a efectors activats per senyals nuclears (Miller *et al*, 1979). Els dos factors transcripcionals responsables de la regulació de la resposta protectora en front a estrès tèrmic són Msn2/4 (82 gens descrits dependents d'un o els dos factors transcripcionals en l'estrès tèrmic segons Berry i Gasch, 2008), per la resposta general a estrès i Hsf1, per la resposta a xoc tèrmic. Aquests dos factors de transcripció són necessaris per l'adaptació al xoc tèrmic i sembla que mentre Hsf1 seria essencial per a la recuperació cel·lular d'una exposició curta a temperatures extremes, Msn2/4 es necessitaria per a la supervivència després d'un xoc tèrmic a altes temperatures (Yamamoto *et al*, 2008). La transcripció de les Hsps s'indueix mitjançant els dos factors transcripcionals, ja que els seus promotors tenen combinacions diferents dels elements STRE i HSE. A més, s'han descrit una sèrie de gens induïts tant en estrès tèrmic, com en el tractament amb compostos causants de dany a DNA (McClanahan i McEntee, 1986). Aquesta és la resposta a dany a DNA (DDR) i l'element trobat al promotor d'un gen induït en aquesta resposta (DDR A2) (Kobayashi i McEntee, 1990) té un element homòleg en el promotor d'*UBI4*, el qual també pertany a la família DDR. A més, té elements STRE i HSE al seu promotor (Simon *et al*, 1999). Per tant, altres factors de transcripció regulen també l'expressió de gens en resposta a un estrès tèrmic (Mager i Ferreira, 1993).

### 3.2.1.1- El factor de transcripció Hsf1

Hsf1 és conegut per la seva implicació en la resposta a estrès tèrmic, tot i que també participa en la resposta a altres estressos: pH alcalí, increment en la concentració de salicilat, estrès oxidatiu o depleció de glucosa. En *S. cerevisiae*, el gen *HSF1* és essencial i la seva absència comporta defectes severos en la integritat de la paret cel·lular, la duplicació de l'eix polar, el transport de proteïnes i la progressió del cicle cel·lular. L'Hsf1 s'uneix en forma de trímer (forma activa) i de manera constitutiva (conformació de baixa activitat) i induïble (conformació d'alta activitat) com a complex homotrimèric a l'element de xoc tèrmic (HSE), que és una regió altament conservada en la natura i present als promotors de les seves dianes (Jakobsen i Pelham, 1988). Cada monòmer reconeix la seqüència 5'-NGAAN-3', aquesta regió es pot trobar tres o més vegades repetida contiguament i invertida, dues vegades adjacentment i una separada per 5 parells de bases (pb) o les tres regions separades per 5 pb.

La proteïna Hsf1 té un nucli central molt conservat que és un domini d'unió a DNA del tipus (DBD)  $\alpha$ hèlix-gir- $\alpha$ hèlix, una regió hidrofòbica d'espiral enrotllada imprescindible per a l'estabilització de

la trimerització, una altra regió d'unió a DNA i dos dominis trans-activadors, un a l'extrem N-terminal i l'altre al C-terminal (AR1 i AR2). Els dos dominis participen en l'activació de gens diana específics i en la regulació de la resposta transitòria a estrès tèrmic i el segon, a més, en la mantinguda (Eastmond i Nelson, 2006).

En absència d'estrès tèrmic, l'Hsf1 es localitza al nucli, constitutivament fosforilada i resta unida a l'element HSE en un enllaç triple. En condicions d'estrès, s'hiperfosforila i esdevé actiu, regulant la transcripció de centenars de dianes: gens involucrats en el plegament de proteïnes, destoxicació, generació d'energia, metabolisme de carbohidrats i organització de la paret cel·lular (Hahn *et al*, 2004).

### 3.2.1.2- La regulació d'Hsf1

Hsf1 pot fosforilar-se en diferents residus (majoritàriament serines) i de diferent manera segons el tipus d'estrès, i també, segons l'agent, en cas d'estrès oxidatiu. Per tant, la fosforilació d'aquesta molècula pot tenir un efecte positiu o negatiu en la seva regulació. S'ha vist que diferents estressos causen canvis conformacionals intermoleculars entre les regions AR1, AR2, i la maquinària transcripcional i l'accés de quinases reguladores, tot i que es desconeix la via senyalitzadora d'estrès que hi participa (Trott i Morano, 2003). Així, doncs, Hsf1 sense directament l'escalfor o l'anió superòxid, els quals li provoquen un canvi de conformació per activar-lo. A més, tant l'estrès tèrmic com l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indueixen la trimerització de l'Hsf1 de mamífer regulada de manera redox-reversible (Ahn i Thiele, 2003) i la disminució intracel·lular de ROS decreix l'activitat d'Hsf1 estimulada per l'estrès (Moraitis i Curran, 2004). L'activitat de l'Hsf1 està regulada positivament i negativa mitjançant modificacions posttranscripcionals i interaccions proteïna-proteïna (Holmberg *et al*, 2002; Morimoto, 1998).

L'Hsf1 es regula de manera negativa en absència d'estrès. Durant l'estadi basal d'Hsf1, algunes Hsps "lliures" (Cpr7, Hsc82, Sse1) s'uneixen al seu *loop* regulador per a reprimir la seva activitat transcripcional. En un estrès tèrmic, les Hsps aniran a replegar les proteïnes desnaturalitzades, alliberant les Hsf1s i permeten la seva activació. Les proteïnes Ssa ajuden al seu replegament i les Ssbs participen en l'afinament del procés (Burnie *et al*, 2006). Un increment en la síntesi d'Hsps té com a resultat la reassociació d'aquestes amb Hsf1, donant lloc a una resposta de natura transitòria.

Com que l'Hsf1 resta unit a les regions HSE de manera constitutiva, algunes de les seves dianes s'expressen de manera moderada en condicions fisiològiques. En un estrès tèrmic, els nivells dels mRNA dels gens diana de l'Hsf1 s'incrementen enormement en els primers minuts de l'estrès, arribant als seus nivells màxims entre els 5 i 15 minuts. Després retornen fins a nivells semblants als de les condicions no estressants. D'aquesta manera es pot deduir que aquest factor de transcripció és activat i desactivat durant l'evolució de l'estrès. L'augment d'afinitat del factor de transcripció per unir-se al DNA pot donar-se per l'activació de la unió amb l'estrès o/i una major estabilitat de la unió preexistent. També observen

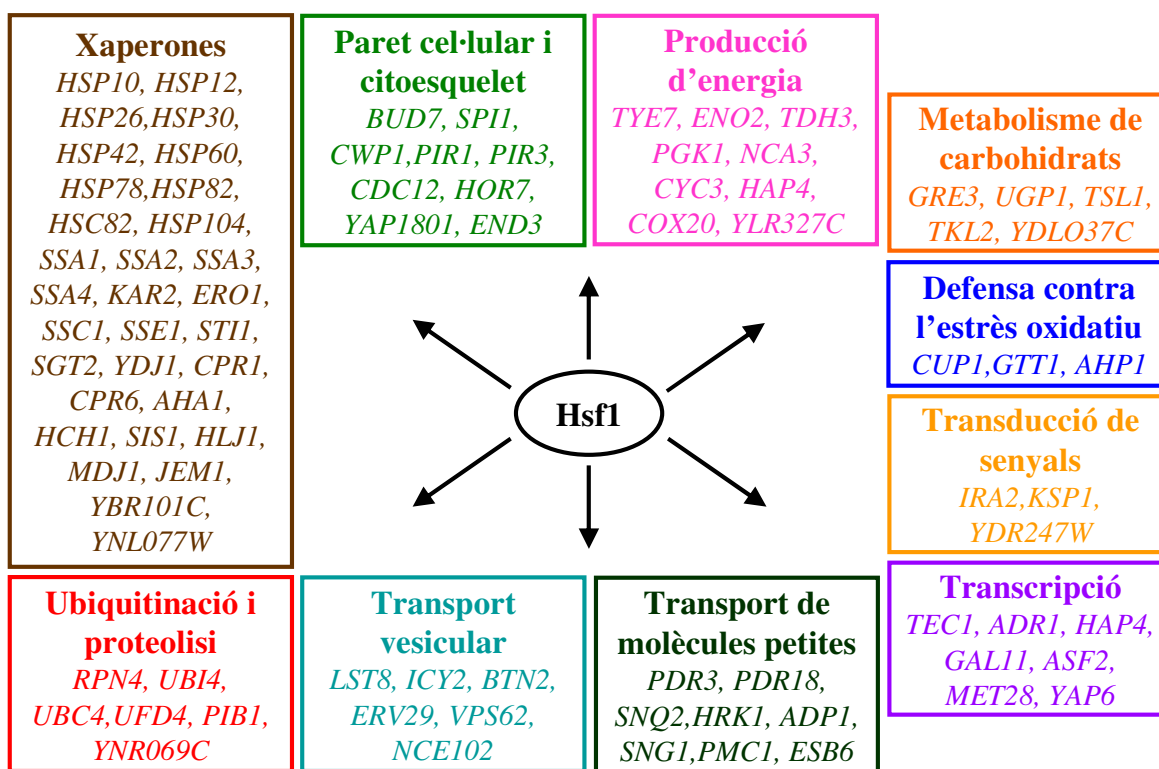
## Introducció

diferències en l'expressió de l'RNA d'aquestes dianes: *SSA1* i *HSP82* tenen una inducció suau i sostinguda en els 60 primers minuts de l'estrès i *SSA3* i *ZPR1* forta i transitòria.

### 3.2.1.3- Les dianes d'Hsf1

Segons Hahn i col·laboradors (2004), els gens diana d'Hsf1 constitueixen en 3% del genoma total d'*S. cerevisiae*, un total de 165 gens. La majoria de les dianes d'Hsf1 pertanyen a gens de l'ESR i s'indueixen en resposta a múltiples estressos, com diàmid, entrada a fase estacionària i privació de nitrogen o font de carboni, com és el cas d'*HSP26* i *HSP104*.

Les dianes d'Hsf1 tenen funcions diverses durant la proliferació cel·lular: la protecció en front estressos, el metabolisme i la reprogramació de les cèl·lules per adaptar-se a la nova situació ambiental. Són gens codificants per proteïnes amb funció de xaperones, ubiquitinització, proteòlisi, transport vesicular i de molècules petites, manteniment del citoesquelet, metabolisme de carbohidrats, producció d'energia, transducció de senyals, mecanismes de defensa contra l'estrès oxidatiu i transcripció.



**Il·lustració 3.** Gens diana del factor de transcripció Hsf1 classificats segons la seva funció. Adaptada de Hahn *et al.*, 2004.

### 3.3.- La resposta a estrès oxidatiu

L'estrès oxidatiu causa directament dany oxidatiu a les macromolècules, per tant, moltes funcions proteiques es veuen afectades de manera immediata. La detecció de l'increment de ROS, causat per  $H_2O_2$  o drogues generadores d' $O_2^{\bullet-}$ , porta a la fase de protecció i adaptació.

#### 3.3.1.- La resposta transcripcional a estrès oxidatiu

L'addició de diferents agents oxidatius al medi de cultiu comporta canvis semblants en els patrons d'expressió de les cèl·lules de llevat, provocant la modulació d'aproximadament un terç del transcriptoma (Causton *et al*, 2001). S'indueixen fortament els gens codificants per proteïnes involucrades en la detoxicació de  $H_2O_2$  i anió  $O_2^{\bullet-}$ , com peròxid dismutases, glutatió peroxidases o antioxidants tiol específics i en reaccions oxidatives i reductives, com Trxs, Trxs reductases, Grxs o glutatió reductases (Gasch *et al*, 2000). Els efectes màxims s'esdevenen relativament més tard que en altres estressos.

En *S. cerevisiae*, el sensor redox més important és Yap1, el factor de transcripció que coregula amb Skn7 el reguló de resposta a estrès oxidatiu. Tot i així, l'estrès oxidatiu comporta altres estressos relacionats que impliquen que diversos processos cel·lulars el resisteixin. Per tant, molts dels gens induïts tenen en els seus promotors llocs diana de factors de transcripció variats: pels anteriorment esmentats Yap1 i Skn7, pels factors de l'ESR (Msn2/4) i factors que regulen principalment funcions respiratòries (Hap1, Hap2, Hap3, Hap4 i Hap5) (Temple *et al*, 2005), tot i que no hi ha indicis que Skn7, Msn2/4 i els altres s'activin directament mitjançant oxidants.

##### 3.3.1.1- El factor de transcripció Yap1

Yap1 és un membre de la família de proteïnes activadores en llevats (YAP) dels factors de transcripció de les cremalleres leucina-bàsiques (bZip), les quals intervenen la dimerització adjacent a un domini bàsic d'unió a DNA, per tal d'activar gens antioxidants. Els YAP són una família de vuit gens homòlegs que duen a terme canvis transcripcionals en resposta a estímuls ambientals (Fernandes *et al*, 1997). Molts eucariotes tenen ortòlegs funcionals de Yap1 i tots ells comparteixen un domini ric en cisteïnes conservades (CRD). Aquest domini conservat se situa en la part N-terminal, a diferència dels altres membres de la família. L'element de reconeixement de Yap1 (YRE) és TG/TACTAA. Els gens que regulen Yap1 són gens antioxidants com *TRR1*, *TRX2*, *GSH1* i *GLR1*, tot i que molts d'ells també estan regulats per Skn7.

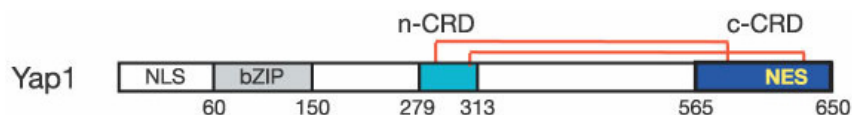
El mutant nul (*Δyap1*) mostra sensibilitat a molts agents oxidants  $H_2O_2$ , *t*-BOOH, diamida, dietil maleat, hidroperòxid de cumè i drogues redox ciclants i compostos que alteren l'estat redox de la cèl·lula. A



## Introducció

més, Yap1 està descrit com un regulador de la via de destoxicació de cadmi, una funció estretament relacionada amb l'estrès oxidatiu i la resistència a drogues.

L'activitat transcripcional de Yap1 està regulada per la seva localització cel·lular. Yap1 és una proteïna citosòlica, que té un domini d'unió a DNA i un domini activador amb dues regions riques en cisteïnes (Wood *et al*, 2004). Conté una Seqüència de Localització Nuclear (NLS) i una Seqüència d'Exportació del Nucli (NES) en la regió N-terminal i C-terminal de la proteïna, respectivament (Kuge *et al*, 1997). En condicions fisiològiques, Yap1 s'exporta des del nucli al citoplasma via l'exportina Crm1. En presència d'oxidants específics es forma un pont disulfur al domini N-terminal ric en cisteïnes (n-CRD) i/o al C-terminal (c-CRD) o via inducció de ponts disulfur amb altres proteïnes, com les peroxiredoxines (Tachibana *et al*, 2009). En el cas del  $H_2O_2$  s'indueix la formació de dos ponts disulfurs entre els dominis n-CRD i c-CRD, catalitzats per Gpx3, que canvien la conformació estructural, emmascarant conseqüentment la NES. Així doncs, Yap1 queda retingut al nucli i actua activant la resposta antioxidant (Kuge *et al*, 2001). El domini c-CRD és necessari per a la tolerància a  $H_2O_2$ , però no per a la resistència a diamida (Gulshan *et al*, 2005). En presència d'aquest agent, sembla que s'acumula igualment al nucli, però sense la formació del pont disulfur (Delaunay *et al*, 2000).



**Il·lustració 4.** Esquema de l'estructura del factor de transcripció Yap1. Wood *et al*, 2004.

Yap1 està regulat negativament pel sistema tioredoxina i per calci. Trx1 i Trx2 redueixen el pont disulfur que internalitza al nucli Yap1. A més, la desfosforilació i degradació de Yap1 sembla estar regulada per calcineurina.

Les dianes de Yap1 són aproximadament 70 gens, entre els quals hi ha *TTR1*, *CTT1*, *TRX2*, *SOD1*, *CCP1* i gens involucrats en el metabolisme de GSH (Gasch *et al*, 2000).

### 3.2.1.2.- Altres factors de transcripció de la família b-Zip

El gen *YAP2* codifica per un factor de transcripció de la família b-Zip involucrat en resposta a estrès, el metabolisme del ferro i resistència a drogues. Quan se sobreexpressa *YAP2*, la soca resultant esdevé resistent a agents estressants com fenantrolina, cadmi, cerulenina i cicloheximida. Per aquest motiu se'l relaciona amb la resposta a compostos tòxics (Rodrigues-Pousada *et al*, 2004). Una soca  $\Delta yap2$ , és hipersensible a diversos agents antioxidants i la resposta adaptativa a  $H_2O_2$  disminueix, tot i que el seu paper de regulació dels gens antioxidants no està gens clar (Folch-Mallol *et al*, 2004). Mitjançant experiments de microxips s'ha vist que Yap2 regula diverses proteïnes implicades en l'estabilització i el

plegament de proteïnes en un ambient oxidant (Cohen *et al*, 2002). La seva seqüència d'unió consens és TTACTAA.

El factor de transcripció Gcn4 (Control General No depressiu) pertany també a aquesta família de proteïnes. Aquest factor de transcripció reconeix l'element TGACTCA, en la regió promotora dels gens implicats en la síntesi d'aminoàcids. S'activa quan hi ha manca d'aquests i pot regular directament o indirecta l'expressió de gens involucrats en biosíntesi de purina, biosíntesi d'òrgànuls, autofàgia, homeòstasi del glicogen i múltiples respostes a estrès (Natarajan *et al*, 2001), tot i que, no sembla estar directament implicat en la resposta gènica a agents oxidants. Malgrat això, podria participar parcialment en la regulació de la resposta en front a radiació UV i la conseqüent producció de ROS intracel·lulars, sobretot  $^1\text{O}_2$  (Folch-Mallol *et al*, 2004).

### 3.2.1.3.- El factor de transcripció Skn7

Skn7 va ser identificat en un estudi de mutants sensibles a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Krems *et al*, 1996). Sembla que Yap1 i Skn7 responen a diferents estressos oxidatius. La proteïna Skn7 conté, principalment, un domini d'unió a DNA i un domini receptor amb un residu aspartat acceptor de grups fosfat (Brown *et al*, 1993) i podria ser regulat per la fosforilació iniciada per Sln1 (Singer i Lindquist, 1998). Les dianes d'aquest factor de transcripció són gens antioxidants com *CTT1*, *SOD1*, *TRX2*, *TRR1*, *TSA1* i *AHP1* (Ikner i Shiozaki, 2005).

## 3.4.- La resposta a depleció de ferro

La resposta a la privació de ferro és gradual, això vol dir que, és major com més severa sigui la limitació del ferro ambiental. La majoria de la resposta la controla la transcripció, tot i que també la regulen mecanismes posttranscripcionals (Philpott i Protchenko, 2008).

### 3.4.1.- La resposta transcripcional a depleció de ferro

En *S. cerevisiae* la resposta primària a la privació de ferro és l'activació transcripcional d'una sèrie de gens sota el control del factor de transcripció dependent de ferro Aft1. Les funcions dels seus productes gènics són, principalment, l'adquisició de ferro, la mobilització del ferro emmagatzemat, el segrest d'altres metalls i l'adquisició de biotina. Diversos estudis (Puig *et al*, 2005; Shakoury-Elizeh *et al*, 2004) mostren variacions en els nivells dels mRNAs en diferents rutes metabòliques. Principalment es reprimeix la respiració metabòlica, el TCA i la cadena de transport d'electrons, i els gens de replicació i reparació del

## Introducció

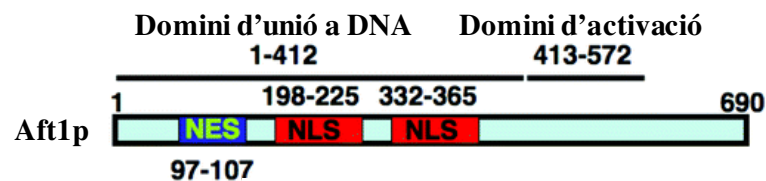
DNA. S'indueixen, òbviamment, els gens del reguló de ferro, la síntesi d'esterol i la d'àcids grassos insaturats.

### 3.4.1.1.- El factor de transcripció Aft1

El factor de transcripció Aft1 reconeix i s'uneix a la seqüència consens PyPuCACCC en les regions promotores dels seus gens diana (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1996).

Aft1 s'expressa de manera constitutiva. Quan el ferro intracel·lular és abundant es localitza al citosol i no activa la transcripció (Yamaguchi-Iwai *et al*, 1995); quan els nivells de ferro intracel·lulars són baixos s'acumula al nucli de la cèl·lula i activa la transcripció dels gens del reguló, en cooperació amb altres factors de transcripció. Aft1 sense els nivells de ferro intracel·lular, però no és coneix si ho fa directament (Philpott i Protchenko, 2008).

Aft1 i el seu homòleg Aft2 tenen el DBD en l'extrem N-terminal (amb una NES i dues NLS) i el centre actiu homòleg CXC (la mutació de qualsevol de les cisteïnes produeix l'activació constitutiva del factor de transcripció), i un DA a l'extrem C-terminal (Kaplan i Kaplan, 2009).



**Il·lustració 5.** Esquema de l'estructura del factor de transcripció Aft1. (Kaplan i Kaplan, 2009).

Aft1 entra i surt del nucli de la cèl·lula de manera contínua. La internalització d'Aft1 al nucli ocorre gràcies a la interacció de Pse1 amb les dues NLS no clàssiques, riques en aminoàcids bàsics (Ueta *et al*, 2003). La NES d'Aft1 és imprescindible per a la seva sortida del nucli, així com l'activitat de l'exportina Msn5, a la qual s'uneix Aft1 per a ser exportat. Tanmateix, la fosforilació dependent de ferro de dues serines és necessària per aquesta exportació al citosol, fet que ha portat a especular que el ferro condueix a la dimerització d'Aft1 per a la seva exportació i terminació de la transcripció (Ueta *et al*, 2007). A més, l'exportació d'aquest factor de transcripció depèn de la maquinària mitocondrial d'ensamblatge dels ISC, les quals inclouen una sèrie de cisteïnes dessulfurases, proteïnes *scaffold*, xaperones del ferro i Trxs. La deleció dels gens codificants per proteïnes implicades en la biogènesi dels ISC, el glutatió i o el transportador Atm1 condueixen tant a la pèrdua de l'ensamblatge dels ISC, com a l'activació de la transcripció del reguló de ferro (Babcock *et al*, 1997). Aquest fet fa pensar que Aft1 sense indirectament els nivells de ferro via el dèficit de síntesi d'ISC, detectant un producte metabòlic mitocondrial del ferro (Chen *et al*, 2004; Rutherford *et al*, 2005). Es postula que el transportador ancorat a la membrana mitocondrial Atm1 exportaria al citosol un compost desconegut requerit per a la maduració dels ISC i per a la inactivació

d'Aft1, però no requerit per la maquinària citosòlica de maduració d'ISC. En condicions de repleció de ferro, aquest substrat desconegut s'acumularia al nucli i conduiria a la dimerització d'Aft1, potser gràcies a la formació d'un pont disulfur, i el complex s'exportaria al citoplasma (Philpott i Protchenko, 2008).

Les Grxs monotioliques Grx3 i Grx4 participen en la inactivació i l'exportació nuclear d'Aft1. S'ha vist que la deleció d'aquestes dues proteïnes porta a una expressió constitutiva dels gens del reguló Aft1 (Ojeda *et al*, 2006; Pujol-Carrion *et al*, 2006). Les dues Grxs estan físicament unides a Aft1 i un residu conservat de cisteïna al centre actiu de les Grxs és necessari per aquesta unió i inactivació d'Aft1, tot i que el ferro no regula aquesta unió. Grx3 i Grx4 citosòliques poden formar complex amb Fra1 i Fra2. La deleció dels seus gens comporten a l'activació del reguló de ferro, però no té efectes sinèrgics amb la pèrdua de la maquinària de síntesi d'ISC. Aquests resultats suggereixen que les FRA pertanyen a la mateixa via de transducció de senyal que la síntesi d'ISC i que el complex Fra-Grx és un intermediari entre la producció dels ISC mitocondrials i la transcripció del reguló de ferro (Kaplan i Kaplan, 2009; Kumanovics *et al*, 2008).

#### **3.4.1.2.- El factor de transcripció Aft2**

Un paràleg d'Aft1 és Aft2, amb un 32% d'identitat, reconeix variacions de la seqüència consens on s'uneix Aft1 i activa la transcripció de gens parcialment solapats (Blaiseau *et al*, 2001; Courel *et al*, 2005; Rutherford *et al*, 2003). El doble mutant  $\Delta aft1/2$  és molt més sensible a privació de ferro que qualsevol dels seus mutants simples. No obstant, els efectes transcripcionals d'Aft2 no són clars, ja que són gairebé imperceptibles si no es delecta Aft1; però regula gens involucrats en el metabolisme intracel·lular de ferro (Kaplan *et al*, 2006). Aft2 també s'activa en privació de ferro i transcriu moltes de les dianes del reguló Aft1 (en un  $\Delta aft1$ , la sobreexpressió d'Aft2 regula la transcripció del reguló de ferro de manera dependent a la depleció de ferro) i, a més, els gens *SMF3* i *MRS4*, els quals participen en el transport de ferro vacuolar i mitocondrial, respectivament (Philpott i Protchenko, 2008).

#### **3.4.1.3.- El factor de transcripció Yap5**

Yap5 és un membre de la família de les YAP dels factors de transcripció bZIP, el qual té un DBD (mitjançant la seqüència consens TTAATA) i un DA amb dues regions riques en cisteïnes, crítiques per a la transcripció dependent de ferro. Un  $\Delta yap5$  és sensible en abundància de ferro.

Yap5 regula la transcripció de *CCCI*, un importador de ferro vacuolar, induït en repleció de ferro (Li *et al*, 2008). En condicions de privació de ferro, el seu mRNA es desestabilitza via Cth1/2 (Puig *et al*, 2005). Yap5 resta unit de manera constitutiva i independentment de ferro al DNA, sembla que en excés de ferro s'alterarien o es reorganitzarien els sulfhidrils lliures de Yap5 (Kaplan i Kaplan, 2009).

### 3.4.1.4.- Les dianes dels factors de transcripció Aft1 i Aft2

Aft1 regula la transcripció dels gens que formen el conjunt del reguló de ferro, els quals s'indueixen en resposta a depleció de ferro, participant en l'adquisició de ferro, alliberant el ferro emmagatzemat o fent-lo accessible, entre altres funcions. Cal esmentar que, tot i que, Aft1 és el principal factor de transcripció de la resposta a depleció de ferro, Aft2 també hi participa induint alguns dels mateixos gens i d'altres independents a Aft1, en respostes transcripcionals solapants. Malgrat tot, és molt complex separar les seves dianes específiques, ja que hom troba en la literatura alguns treballs al respecte que no coincideixen (Courel *et al*, 2005; Rutherford *et al*, 2003). En la Taula 6 es presenta un resum dels gens diana d'Aft1 i Aft2, amb les seves funcions i localitzacions (ja detallades en la secció anterior).

La fina regulació de la transcripció del reguló de ferro s'aconsegueix amb la participació de repressors i activadors de la transcripció. Per exemple, Ssn6 i Tup1 participen en la transcripció de *FRE2* i *ARN2*, però no de *FET3* (Fragiadakis *et al*, 2004). L'oxigen és un altre factor necessari per a l'adquisició de ferro pel sistema de transport d'alta afinitat, ja que les ferrereductases són enzims amb grups hemo. A més, l'oxidació del ferro per part del complex Fet3/Ftr1 implica la reducció d'oxigen a aigua. En absència d'hemo, Tup1 i la histona desacetilasa Hda1 afecten al reguló Aft1. Específicament, Tup1 reprimeix l'expressió de *FET3*, però no la dels gens codificants per transportadors de sideròfors, ja que aquest transport és independent d'oxigen. Aquest és el cas d'*ARN1*, que té una seqüència adjacent a la d'unió amb Aft1 reconeguda per la proteïna Cit6 la qual antagonitza la unió de Tup1 de manera que es perd, conseqüentment, la repressió gènica (Crisp *et al*, 2006).

Gens diana dels factors de transcripció Aft1/Aft2		
Nom del gen	Localització	Funció
<b>Adquisició de ferro a la superfície cel·lular</b>		
<i>FIT1</i>	paret cel·lular	unió/adquisició de sideròfor
<i>FIT2</i>	paret cel·lular	unió/adquisició de sideròfor
<i>FIT3</i>	paret cel·lular	unió/adquisició de sideròfor
<i>FRE1</i>	membrana plasmàtica	metal·loreductasa
<i>FRE2</i>	membrana plasmàtica	metal·loreductasa
<i>FRE3</i>	membrana plasmàtica	sideròfor reductasa
<i>FRE4</i>	membrana plasmàtica	sideròfor reductasa
<i>FET3</i>	membrana plasmàtica	oxidasa multicoure, adquisició Fe <sup>2+</sup>
<i>FTR1</i>	membrana plasmàtica	permeasa, adquisició de Fe <sup>2+</sup>
<i>ATX1</i>	Golgi	metal·loxaperona del Cu, aporta Cu a Ccc2
<i>CCC2</i>	Golgi	transport de Cu a les vesícules
<i>ARN1</i>	endosoma, m. plasmàtica	transport de ferricrom
<i>ARN2/TAF1</i>	desconeguda	transport de TAFC
<i>ARN3/SIT1</i>	endosoma, m. plasmàtica	transport del sideròfor hidroxamat
<i>ARN4/ENB1</i>	membrana plasmàtica	transport d'enterobactina
<b>Sortida de ferro del vacúol al citosol</b>		
<i>FRE6</i>	Vacúol	metal·loreductasa
<i>SMF3<sup>AFT2</sup></i>	Vacúol	transport de Fe <sup>2+</sup>
<i>FET5</i>	Vacúol	oxidasa multicoure, adquisició Fe <sup>2+</sup>
<i>FTH1</i>	Vacúol	permeasa, transport de Fe <sup>2+</sup>
<b>Altres transportadors</b>		
<i>AKR1</i>	membrana plasmàtica	palmitol transferasa, endocitosi
<i>VHT1</i>	membrana plasmàtica	transportador de biotina
<i>COT1</i>	Vacúol	emmagatzemament/destoxicació de Zn <sup>2+</sup> i Co <sup>2+</sup>
<i>MRS4<sup>AFT2</sup></i>	mitocondri	import mitocondrial de ferro
<i>FRE5</i>	mitocondri	reductasa mitocondrial
<b>Adaptació metabòlica a baixes concentracions de ferro</b>		
<i>HMX1</i>	RE	oxigenasa hemo
<i>CTH1</i>	Citosol	degradació d'mRNA
<i>CTH2/TIS11</i>	Citosol	degradació d'mRNA
<b>Altres funcions</b>		
<i>ISU1<sup>AFT2</sup></i>	mitocondri	proteïna d'ensamblatge ISC
<i>BNA2<sup>AFT2</sup></i>	Citosol	triptòfan 2,3-dioxigenasa putativa (biosíntesi de NAD)
<i>GTO2/ECM4<sup>AFT2</sup></i>	Citosol	glutatió transferasa
<i>YAP2<sup>AFT2</sup></i>	citosol/nucli	factor transcripcional de resposta a estrès, metabolisme del ferro i resistència pleiotròpica a drogues

**Taula 6.** Gens diana dels factors de transcripció Aft1 i Aft2, localització i funció. Adaptada de Couret *et al*, 2005; Kaplan i Kaplan, 2009; Philpott i Protchenko, 2008 i Rutherford *et al*, 2003.

### 3.4.2.- Els mecanismes posttranscripcionals en la depleció de ferro

Dos gens homòlegs *CTH1* i *CTH2*, induïts per Aft1/2 en condicions de privació de ferro, codifiquen per proteïnes homòlogues a la família de les tristetraprolines humanes (hTTP), les quals es troben molt conservades des de llevats a plantes i animals. Es caracteritzen per tenir dos dits de zinc en tàndem (TZF)

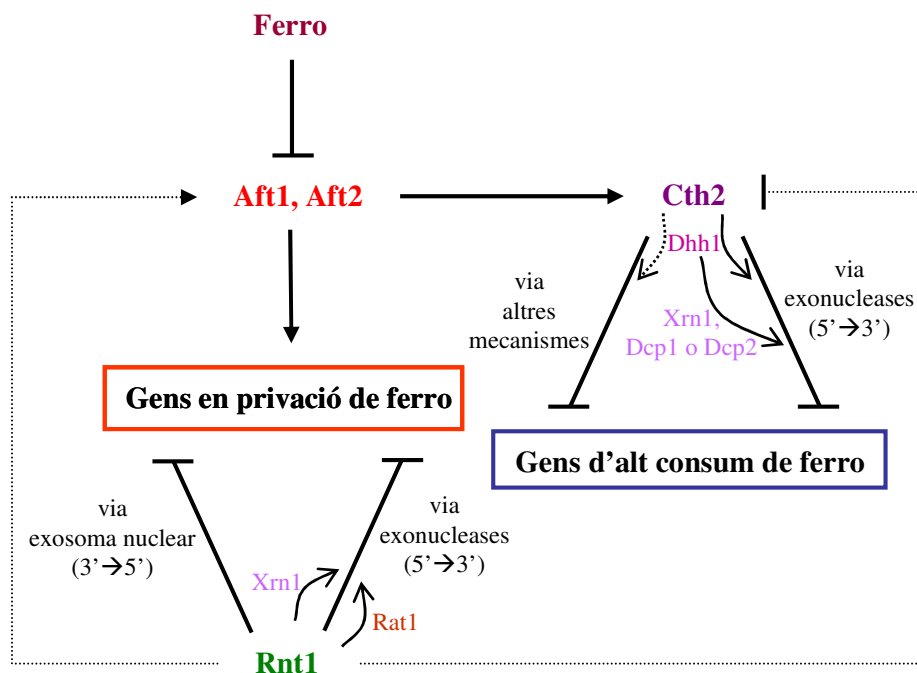
## Introducció

del tipus CCCH, el qual constitueix el domini d'unió a mRNA. Els membres d'aquesta família promouen la ràpida degradació de certes molècules d'mRNA mitjançant el reclutament de la maquinària de degradació d'mRNA a l'element ric en AU (ARE). Així, Cth1 i Cth2 disminueixen la vida mitjana d'mRNAs codificants per proteïnes involucrades en l'emmagatzemament de ferro o en el seu consum. Cth1 s'expressa transitòriament en condicions de depleció de ferro, mentre que Cth2 ho fa de manera sostinguda (Pedro-Segura *et al*, 2008). Cth2 és responsable de desestabilitzar aproximadament 80 mRNAs codificants per proteïnes del metabolisme que requereixen ferro i oxigen, amb funcions cel·lulars que inclouen biosíntesi de grup hemo, biogènesi d'ISC, subunitats del citocrom oxidasa involucrat en la fosforilació oxidativa mitocondrial, enzims del TCA, altres enzims del metabolisme d'intermediaris, proteïnes que participen en l'emmagatzemament de ferro al vacúol i d'altres amb activitats desconegudes (Puig *et al*, 2005). Cth1 desestabilitza preferentment mRNAs de proteïnes mitocondrials involucrades en processos dependents de ferro que participen en respiració o en síntesi d'aminoàcids (Puig *et al*, 2008). Aquests autors hipotitzen que, en deficiència de ferro, s'esdevé una inactivació de funcions mitocondrials dependents de Cth1/2, activant les vies de senyalització dels factors de transcripció Msn2/4, Sko2 (el qual respon als nivells de cAMP) i Rox1 (que és un repressor dependent d'hemo en condicions de repleció de ferro i hipòxia, que reprimeix Fet4, i per tant, el sistema de baixa afinitat), augmentant els nivells d'mRNAs codificants per proteïnes que participen en el metabolisme de la glucosa.

Cth2 s'uneix mitjançant el seu domini TZF a l'ARE dels mRNAs i recluta enzims del *decapping*, deadenilació i amb activitat exonucleolítica. Una diana de Cth2 és l'mRNA de *SDH4*, que sembla degradar-se mitjançant la maquinària de *decapping* i via l'helicasa DExD/H-box Dhh1, la qual activa el *decapping* i ajuda a reclutar els mRNAs cap als *P-bodies* (cossos de processament) citosòlics, on es degraden (Pedro-Segura *et al*, 2008). Aquests investigadors també demostren la interacció directa de Cth1 i Cth2 amb l'extrem C-terminal de Dhh1 mitjançant l'assaig de doble híbrid. Soques delecionades per *XRN1*, *DCP1* o *DCP2* afecten la localització intracel·lular de Cth2, acumulant-lo als *P-bodies*, on normalment es realitza aquesta degradació 5'-3'. A més, un altre mRNA diana, el codificant per *ISA1*, té una degradació parcialment independent a Dhh1, fet que fa pensar que diversos mecanismes són els implicats en la degradació dels mRNAs via Cth2 arran de depleció de ferro.

Un altre sistema de degradació d'mRNAs per a la regulació dels gens del ferro és la via de l'RNasa III Rnt1, una endonucleasa d'RNA de doble cadena que participa en el processament d'alguns RNAs no codificants i en la supervivència d'alguns pre-mRNAs (sense haver patit *splicing*). L'Rnt1 talla *hairpins* del cap d'mRNA per la seqüència de *tetraloop* AGNN. Després, els intermediaris restants es processen o degraden via exonucleases. Les principals de la via 5'-3' són Xrn1 i Rat1, les de la via 3'-5' la realitzen les exonucleases nuclears (Lee *et al*, 2005). Lee *et al*, 2005 mostren que en condicions de repleció de ferro alguns dels gens codificants per proteïnes de l'adquisició i la mobilització de ferro tenen nivells d'expressió majors en absència d'Rnt1, i alguns d'ells tenen les estructures en *stem-loop*. Alguns mRNAs del reguló de

ferro (*FIT3*, *ARN2*, *ARN3*) normals i en forma aberrant s'acumulen en soques defectives per Rnt1, Xrn1 i Rat1. Rnt1 actua al nucli i podria alterar l'exportació d'mRNAs i la traducció. La soca  $\Delta rnt1$  s'endarrereix en la resposta a privació de ferro i és sensible a alts nivells de ferro, probablement per la seva incapacitat de reprimir els transportadors i la maquinària de reducció de ferro. Per tant, Rnt1 actuaria de manera indirecta regulant Aft1. Així, doncs, hi ha una regulació posttranscripcional dels gens d'adquisició de ferro en condicions de repleció de ferro, a través de múltiples vies ribonucleolítiques, possiblement per a prevenir una toxicitat intracel·lular de ferro (Kaplan i Kaplan, 2005).



**Il·lustració 6.** Esquema de la regulació posttranscripcional del reguló de ferro. Adaptada de Kaplan i Kaplan, 2005; Lee *et al*, 2005; Pedro-Segura *et al*, 2008.

En general, diversos mecanismes responen a restriccions de ferro o oxigen, desestabilitzant els missatgers o via activació i repressió transcripcional, per tal de prioritzar la font nutricional limitant. En condicions de privació de ferro, les proteïnes que requereixen ferro deixen de sintetitzar-se i s'afavoreixen les vies metabòliques amb proteïnes que no en requereixen. D'aquesta manera la cèl·lula prioritza l'ús del ferro cap a funcions metabòliques essencials. Les proteïnes imprescindibles que contenen ferro són les proteïnes amb ISC involucrades en reaccions independents a oxigen (Kaplan *et al*, 2006).

#### 4.- La regulació posttranscripcional dels mRNAs en *S. cerevisiae*

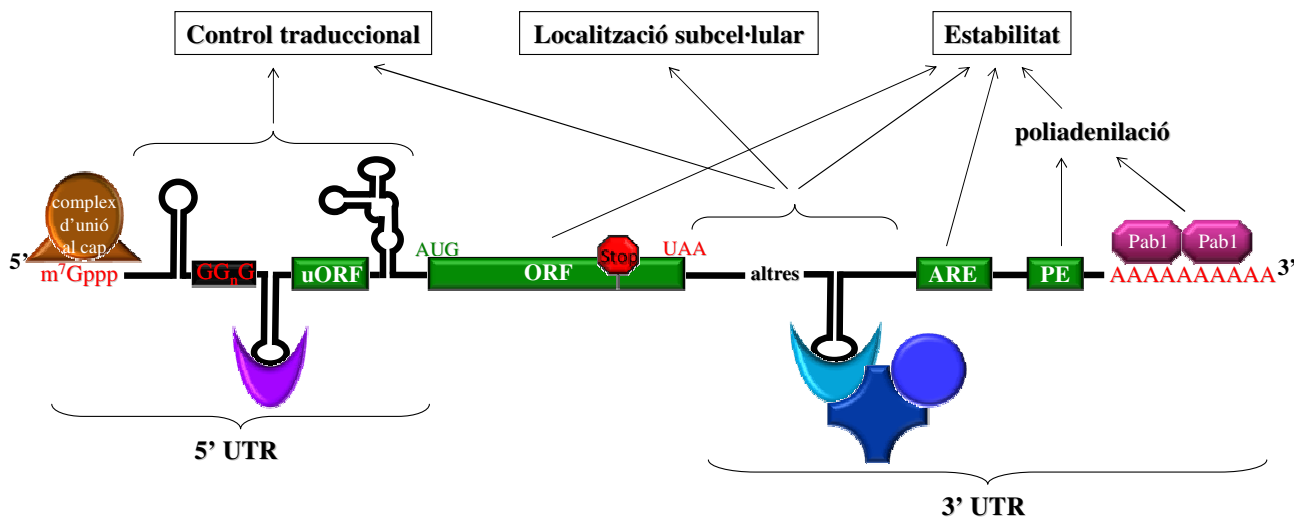
L'abundància de l'mRNA ve determinada pel balanç entre la taxa de transcripció (TR) i la taxa de degradació (TD) (Foat *et al*, 2005; Perez-Ortin, 2007), tot i que l'expressió gènica és el resultat de múltiples



## Introducció

passos en el processament dels mRNAs, des de la transcripció fins a la traducció ocorren diversos processos (i) en el nucli: addició del cap, processament dels introns, poliadenilació, supervivència prèvia a la sortida del nucli i exportació cap al citoplasma i (ii) en el citoplasma: localització subcel·lular citoplasmàtica, eficiència de la traducció i degradació (McKee i Silver, 2007).

La regulació de l'expressió gènica ve regulada pels factors de transcripció, polimerases de l'RNA i diversos elements localitzats en *cis* en el DNA (com ara: promotors, exacerbadors, regions locus de control i silenciadors) per produir l'mRNA madur (Mignone *et al*, 2002). Així, doncs, l'mRNA madura i adopta les seves característiques conformacionals en els passos previs a l'exportació al citoplasma; durant l'exportació i la seva localització citoplasmàtica l'acompanyen proteïnes associades a la seva seqüència i a les estructures secundàries. Tots aquests elements són els elements reguladors posttranscripcionals i en la Il·lustració 7 es mostra l'esquema. L'mRNA eucariota conté tres parts principals: el 5'UTR, la seqüència codificant o ORF i el 3'UTR. Els UTR participen activament en la regulació posttranscripcional de l'expressió gènica i de manera general en la modulació del transport de l'mRNA fora del nucli, l'eficiència de la traducció, la localització subcel·lular i l'estabilitat. La comparació entre diversos genomes seqüenciats revela aspectes conservats entre les estructures dels UTRs.



**Il·lustració 7.** Esquema de l'estructura de l'mRNA eucariota que il·lustra alguns elements de regulació posttranscripcional. La regió 5'UTR normalment consta de: la regió metilada (<sup>7</sup>meGppp) o cap, estructures secundàries en *hairpin*, interaccions RNA-proteïna, *upstream* ORFs (uORFs) o uAUG, seqüències riques en G, llocs d'entrada dels ribosomes (IRES). L'ORF pot allotjar codons stop prematurs i altres seqüències que modulen l'estabilitat. En la regió 3'UTR pot haver-hi: interaccions RNA-proteïna o amb complexos multiproteïcs, elements rics en AU (ARE), elements de poliadenilació (PE), la cua poli(A) de 100 a 250 residus. L'activitat biològica dels dominis de regulació a nivell d'RNA és el resultat de la combinació de les seves estructures primàries i secundàries. Adaptada de Mignoni *et al*, 2002.

No obstant, deixant de banda el processament individual dels mRNAs, l'expressió gènica ve fortament influenciada per la TR i la TD. En la secció anterior ja s'ha parlat de les estratègies cel·lulars per induir i reprimir la síntesi diferencial i específica dels mRNAs en diferents condicions, i per tant, és comprensible que les cèl·lules hagin desenvolupat factors i mecanismes moduladors de la taxa de degradació dels mRNAs. La degradació dels mRNAs és un pas importantíssim en la regulació posttranscripcional, ja que els canvis en l'abundància dels mRNAs alteren la quantitat de la seva proteïna corresponent.

#### 4.1.- Vies de degradació dels mRNAs

Les vies de degradació de l'mRNA en *S. cerevisiae*, com en la resta d'eucariotes, són diverses: n'hi ha dues de majoritàries i dependents de l'eliminació de la cua poli(A), una d'independent a aquesta eliminació, la degradació mitjançant endonucleases, les vies de degradació dels transcrits defectuosos i altres vies específiques (Camier i Seraphin, 2007; Garneau *et al*, 2007; Heikkinen *et al*, 2003). Una de les grans incògnites en l'estudi de la degradació de l'mRNA és com es determinen les taxes específiques de la degradació individual dels mRNAs. Anàlisis experimentals indiquen que la degradació, un cop començada, és ràpidament completada.

L'mRNA eucariota consta de dues estructures estabilitzadores principals: el cap 7-metilguanosina a l'extrem 5'UTR i la cua poli(A) a l'extrem 3'UTR, entre altres (Il·lustració 7). Aquestes s'incorporen cotranscripcionalment. Un cop l'mRNA es troba al citoplasma, el cap interacciona amb el factor d'inici de la traducció (eIF4G) i la cua poli(A) amb la PABP -proteïna d'unió a poli(A)-. Aquestes dues interaccions impedeixen l'accessibilitat dels enzims de degradació a aquest mRNA, de manera que si l'mRNA té aquestes dues proteïnes unides, l'única via possible de degradació és mitjançant l'acció d'alguna endonucleasa (Garneau *et al*, 2007). Concretament, la PABP impossibilita que l'enzim del *decapping* s'uneixi a l'extrem 5'. La PABP s'allibera quan la cua Poli(A) no excedeix de 10-15 nt.

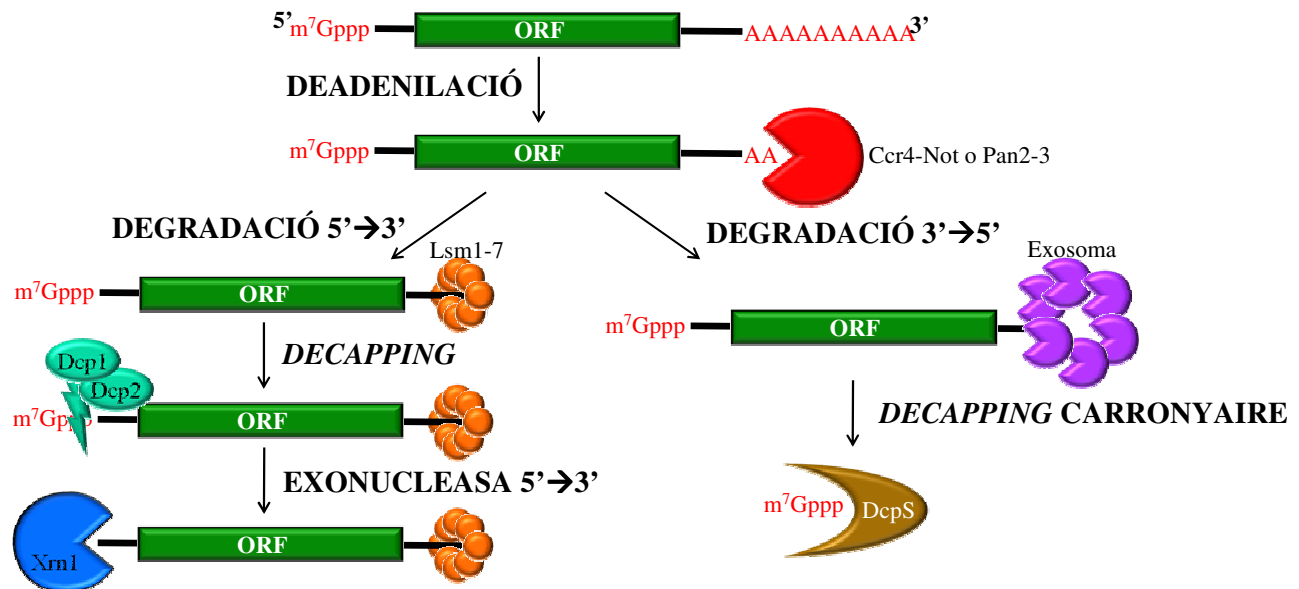
##### 4.1.1.- Via majoritària de degradació dels mRNAs, dependent de cua poli(A)

La via de degradació majoritària dels mRNA la desencadena l'escurçament de la cua poli(A) o **deadenilació** (Garneau *et al*, 2007; Parker i Song, 2004). Aquest procés el duen a terme en *S. cerevisiae*: (i) el complex PAN2-PAN3, el qual és una nucleasa PABP que talla les cues poli(A) dels mRNA naixents a la llargària estàndard de 60-80 nt (Brown *et al*, 1996) i (ii) el complex Ccr4-Not, el qual és la deadenilasa principal en aquest microorganisme i el formen nou proteïnes (de les quals Ccr4 i Caf1 tenen dominis exonucleasa). Aquest és l'únic primer pas reversible en la degradació d'mRNAs, però quan un mRNA té una cua poli(A) que no excedeix dels 10-15 pb i ha de ser destruït pren una de les dues següents rutes:

## Introducció

I. La ruta predominant ve seguida per l'eliminació de l'estructura del cap, mitjançant un procés anomenat *decapping*. L'enzim responsable del *decapping* és el dímer Dcp1 i Dcp2 el qual permet que l'exoribonucleasa Xrn1 degradi l'mRNA en sentit 5'-3'. A més, es requereixen altres factors, com les proteïnes Lsm. El complex heptamèric Lsm1-7 s'associa amb l'extrem 3' deadenilat i promou el *decapping*, també una altra Lsm anomenada Edc3 (exacerbador del *decapping*) i la Pbp1 (la PABP-proteïna d'unió-1). Altres proteïnes accessòries són les Edc1-2, l'helicasa d'RNA Dhh1 de les DExD/H-box i Pat1, les quals a banda de tenir funció *decapping*, intervenen en la repressió de la traducció.

II. La segona ruta més utilitzada és la protagonitzada per l'**exosoma** citoplasmàtic, que és un complex d'exonucleases citoplasmàtiques que degraden en sentit 3'-5'. L'exosoma està format per entre 10 i 12 subunitats en les que trobem 6 proteïnes exoribonucleases 3'-5' fosforolítiques homòlogues, factors amb homologia a les exonucleases hidrolítiques 3'-5', i helicases d'RNA. A més de degradar l'mRNA en el citoplasma, l'exosoma té altres funcions com el processament del 3' dels mRNA no codificants en el nucli. Un cop finalitzada la degradació de l'mRNA per part de l'exosoma, l'enzim carronyaire *decapping*, DcpS, metabolitza l'estructura del cap 5'.



**Il·lustració 8.** La via de degradació majoritària de l'mRNA. (Garneau *et al*, 2007).

Aquestes dues rutes no són mútuament excloents, ni tampoc es coneix la contribució relativa de cada mecanisme. En *S. cerevisiae*, la deleció dels components de les dues rutes té efectes mínims en el transcriptoma, fet que implica la seva redundància (He *et al*, 2003; Houalla *et al*, 2006).

### 4.1.2.- Altres vies de degradació dels mRNAs menys habituals

Hi ha diverses excepcions que s'escapen a la degradació precedida per la deadenilació (Garneau *et al*, 2007).

#### 4.1.2.1- La via del *decapping* independent a deadenilació

S'han descrit un parell de transcrits que s'escapen a la deadenilació per entrar directament en el procés de *decapping*. Aquests es proposa els degraden altres mecanismes específics de degradació, es tracta dels mRNAs codificants per *RPS28B* i *EDC1* (però no es descarta que en pugui haver més), el primer es degrada via Edc3 (Badis *et al*, 2004) i el segon, a banda de la maquinària del *decapping*, requereix algunes subunitats del complex Ccr4-Not (Muhlrad i Parker, 2005), fet que ofereix una connexió interessant entre el complex de deadenilació i el *decapping*.

#### 4.1.2.2- La via de degradació endoribonucleolítica

Possiblement, el tall endonucleolític és la via més eficient per a destruir mRNAs. Amb aquest tall es produeixen dos fragments susceptibles a l'atac per exonucleases. En les cèl·lules, predomina l'RNasa MRP que és un complex amb un centre d'RNA que participa en el processament d'rRNAs i RNAs mitocondrials. Aquesta RNasa està involucrada en la degradació de l'mRNA de *CLB2*, i probablement també en la degradació d'altres mRNAs específics, via el tall del 5'UTR i, consegüentment, l'acció d'Xrn1 (Gill *et al*, 2004).

### 4.1.3.- Vies de degradació dels mRNAs defectuosos

Cada etapa del procés de maduració dels mRNAs ofereix la possibilitat d'introduir errors a les seqüències d'mRNA, per això les cèl·lules han desenvolupat diversos mecanismes que detecten i degraden els transcrits aberrants (Garneau *et al*, 2007).

#### 4.1.3.1- La vigilància nuclear de l'mRNA

Els transcrits que no han sofert *splicing* o poliadenilació es degraden ràpidament via exosoma nuclear (Bousquet-Antonelli *et al*, 2000; Milligan *et al*, 2005). La degradació nuclear 5'-3' requereix el complex Lsm pel *decapping* i una exonucleasa 5'-3' anomenada Rat1 (homòloga a Xrn1). A més, la degradació de l'mRNA nuclear també s'utilitza per regular l'expressió gènica (Kuai *et al*, 2005).

A més, s'ha descrit el complex TRAMP involucrat en la degradació de diversos tipus d'RNA nuclear, el qual conté Trf5 amb activitat poli(A)polimerasa, la qual enlloc d'estabilitzar l'mRNA, recluta i activa l'exosoma (LaCava *et al*, 2005; Vanacova *et al*, 2005).

### 4.1.3.2- La via de la degradació de l'mRNA sense sentit

La via de degradació dels mRNAs sense sentit (NMD), fa anys que s'estudia (Muhlrad i Parker, 1994) i es coneix que (i) protegeix la cèl·lula dels efectes potencialment deleteris de les proteïnes truncades (amb codons de terminació prematurs) i (ii) trànscripcions correctes, però innecessaris i dirigits a una degradació ràpida (Culbertson i Neeno-Eckwall, 2005). L'mRNA associat a proteïnes nuclears s'exporta al citoplasma com a **complex RNP**. Una d'aquestes proteïnes és Hrp1 que s'uneix a l'element de seqüència *downstream* o DSE i salta quan el ribosoma tradueix normalment. Si els ribosomes detecten un codó stop prematur, aturen la traducció; aquesta pausa senyalitza el complex eRF1-eRF3 (factors alliberadors de polipèptids) que s'uneix al lloc A del ribosoma. Seguidament s'activa el **complex de vigilància** (que consisteix en els factors d'alliberament Upfs -Upf1, Upf2, Upf3- i altres proteïnes associades). Aquestes reconeixen el DSE ocupat. La proteïna Hrp1 interacciona especialment amb l'Upf1 i la interacció del complex de vigilància amb el DSE porta a la formació aberrant del complex RNP, substrat del *decapping* ràpid per la Dcp1, i l'mRNA es degrada via Xrn1.

### 4.1.3.3.- La via de degradació dels mRNAs sense codó de terminació (NSD)

Els mRNAs trencats o sense codó stop es degraden per aquesta via i, a més, l'NSD facilita l'alliberament dels ribosomes. Hi ha dues rutes d'NSD, que probablement funcionen coordinadament. (I) El model original, conservat, en el qual el ribosoma s'atura al 3' del trànscrit i Ski7 allibera el ribosoma i recluta a l'exosoma i el complex SKI associat (Ski2, Ski3 i Ski8), per deadenilar-lo i després degradar-lo ràpidament 3'-5' (Frischmeyer *et al*, 2002; van Hoof *et al*, 2002). (II) En absència d'Ski7, una segona via 3'-5', probablement per l'eliminació de la PABP per part del ribosoma, deixa l'mRNA susceptible a *decapping*, reduint l'eficiència traduccional (Inada i Aiba, 2005).

### 4.1.3.4.- La via de degradació *No-go* (NGD)

Aquesta via evita el segrest de factors de traducció als trànscripcions defectuosos, les proteïnes Dom34 i Hbs1 detecten els ribosomes aturats als mRNAs i una altra o més de desconegudes realitzen un tall endonucleolític a prop del lloc d'aturada; d'aquesta manera, s'alliberen el ribosoma i fragments d'mRNA, degradats via exosoma i Xrn1 (Doma i Parker, 2006).

## 4.1.4.- Vies específiques de degradació dels mRNAs

A banda de les vies majoritàries de degradació dels mRNA i de les vies de degradació dels mRNAs defectuosos, se n'ha descrit alguna d'específica:

#### 4.1.4.1.- La via de degradació per repressió de l'inici de la traducció

Aquesta via es dona quan s'alenteix la traducció d'algunes proteïnes, ja que es postula que l'equilibri entre les proteïnes traduïdes i la degradació de l'mRNA es desplaça. S'esdevé quan es muten factors generals de l'inici de la traducció com eIF3, eIF4 i eIF2B i hi intervenen les proteïnes Upf1 i Upf2 (Barnes, 1998). La degradació dels mRNAs per aquesta via és 5'-3', mitjançant Dcp1 i Xrn1 (Heikkinen *et al*, 2003). Heikkinen i col·laboradors (2003) descriuen que es degraden per aquesta via cinc membres de la família de les Hsp70 i els dos membres de l'Hsp90, i suggereixen que pot ser una via de degradació específica per aquest estrès.

## 4.2.- Regulació de la degradació dels mRNAs

Existeixen diversos condicionants de l'estabilitat que actuen en diferents nivells en l'mRNA. En molts casos la seva influència depèn del posicionament.

### 4.2.1.- Determinats de la degradació dels mRNAs actuant en *cis*

La pròpia estructura de l'mRNA porta els elements que fixen la seva vida mitjana. Diversos estudis massius identifiquen dominis reguladors actuant en *cis* (Jacobs Anderson i Parker, 2000; Kellis *et al*, 2003).

#### 4.2.1.1.- Determinants de l'estabilitat es troben en l'ORF i en el 3'UTR

La majoria dels determinants de l'estabilitat es troben en aquestes dues regions (McCarthy, 1998).

I. La **cua poli(A)** és una característica dels mRNAs de l'RNA Pol II i es creu que juga un paper general en el control del començament de la degradació de molts mRNAs.

II. L'existència de **segments en la regió codificant o en el 3'UTR** que els capacita per a una inducció ràpida de la degradació. Els ARE són els més comuns i la seva presència modula l'estabilitat dels mRNAs (Vasudevan i Peltz, 2001). Aquests també poden controlar l'eficiència de la traducció i per tant faciliten el control flexible de l'expressió gènica en múltiples nivells (Wilusz i Wilusz, 2004). Els ARE se situen a la regió 3'UTR de molts mRNAs i es classifiquen en tres tipus segons el nombre i el context del pentàmer AUUUA (Garneau *et al*, 2007; Mignone *et al*, 2002). Malgrat tot sembla que no hi ha dues ARE iguals, encara que siguin de la mateixa classe, ja que les seqüències flanquejants influeixen en l'estabilitat dels missatgers. S'han caracteritzat: (i) diverses seqüències consens (tant per a la localització, com per a l'estabilitat o desestabilitat dels mRNAs) (Shalgi *et al*, 2005), (ii) proteïnes que reconeixen ARE -com la família PUF (Foat *et al*, 2005; Gerber *et al*, 2004)-, (iii) algunes de les seves dianes (Ulbricht i Olivas,

## Introducció

2008) (o les proteïnes Cth1/2 (Puig *et al*, 2005; Puig *et al*, 2008)) i (iv) alguns mecanismes d'acció, com és el cas de Cth2 (Pedro-Segura *et al*, 2008) i Rnt1 (Lee *et al*, 2005), entre altres.

III. Els **codons stop prematurs**, si són pròxims al 5'UTR són uns elements molt forts de desestabilització i si se situen distalment al 5'UTR són elements febles de la desestabilització. L'efecte desestabilitzant de codons sense sentit interns a l'mRNA provoca l'acceleració de l'NSD. Sembla que la maquinària cel·lular té un gradient de sensibilitat no lineal a l'efecte dels codons stop, en *PGK1* els que se situen a la quarta part final del marc de lectura no tenen efecte, mentre que els que estan entre el 55% dels primers codons tenen la capacitat d'accelerar la degradació unes 12 vegades (McCarthy, 1998).

### 4.2.1.2.- Modulació de la degradació mitjançant la regió 5'UTR

La regió 5'UTR pot allotjar un gran nombre d'elements estructurals que influeixen l'estabilitat dels mRNAs; els seus efectes depenen de la natura de l'mRNA *downstream* de la seva localització en la seqüència (McCarthy, 1998):

I. L'estructura més destacada és la **regió metilada del cap**, que té una funció protectora en front l'activitat exonucleasa 5'-3'.

II. **Upstream Open Reading Frame** (uORF) desestabilitza l'mRNA, poden conduir a la degradació accelerada dels mRNAs. S'ha vist que en alguns mRNAs hi ha codons d'inici molt a prop o solapant el codó d'inici veritable, fet que dona lloc a mRNAs molt inestables.

III. **Altres elements** que afecten positivament a l'estabilitat de certs mRNAs són: regions estructurals en *loop*, una extensió de poli(G) o la formació d'una diana d'unió a complex de proteïna.

Aquests elements estructurals de la regió 5'UTR es creu que exerceixen el seu efecte positiu en l'estabilitat dels mRNAs de dues maneres: (i) **inhibint la traducció**: poden canviar l'activitat dels elements estabilitzadors (com Pub1) de la seqüència d'mRNA, destorbant la formació dels polisomes de la traducció, o (ii) **inhibint directament el progrés de l'activitat exonucleasa**: les extensions poli(G) i, menys extensament, els *loops* dels *hairpins* estabilitzen suficientment per causar una forta inhibició traduccional, actuant per impedir la degradació exonucleotídica 5'-3'.

### 4.2.2.- Determinants de la degradació de l'mRNA actuant en *trans*

Hi ha un gran nombre de proteïnes associades al reconeixement i a la pròpia degradació de les molècules d'mRNA, algunes de les quals ja s'han determinat i caracteritzat. A continuació es mostra una taula que en resumeix algunes de les més comuns en *S. cerevisiae*.

Factor de degradació	Components	Funcions i característiques	Localització	Altres funcions
<b>Proteïnes estabilitzadores d'mRNA</b>				
<b>PABP</b>	Pab1, interacciona amb Pbp1	proteïna d'unió a poli(A) i part del complex processador d'RNA de l'extrem 3'	nucli, citoplasma, <i>P-bodies</i>	interaccions amb el cap 5' i interacciona amb l'eIF4G de la traducció
<b>Pub1</b>		proteïna d'unió a poli(A), requerida per l'estabilitat d'alguns mRNAs, que reconeix dominis del 5' i 3'UTR (Duttgupta <i>et al</i> , 2005)	nucli, citoplasma, <i>P-bodies</i> , grànuls d'estrès	component dels grànuls d'estrès en privació de glucosa, involucrada en l'ensamblatge dels grànuls
<b>Deadenilació</b>				
<b>CCR4-NOT</b>	Ccr4, Caf1, Caf40, Caf130, Not1-5	deadenilasa majoritària, inhibida per PABP	nucli, citoplasma, <i>P-bodies</i>	transcripció, degradació de proteïnes
<b>PAN2-PAN3</b>	Pan2, Pan3	participa en la primera fase de l'escurçament del poli(A)	nucli, citoplasma	desconegudes
<b>Degradació 5'-3'</b>				
<b>Enzim del decapping</b>	Dcp1, Dcp2	produeix <sup>7me</sup> GDP	citoplasma, <i>P-bodies</i>	localització d'mRNA
<b>Dhh1</b>	hèlices d'RNA DExD/H-box	necessària pel <i>decapping</i>	citoplasma, <i>P-bodies</i>	repressió de la traducció
<b>Proteïnes Edc</b>	Edc1, Edc2	exacerba el <i>decapping</i>	<i>P-bodies</i>	traducció en estrès tèrmic
<b>Complex Lsm</b>	Lsm1-7	necessària pel <i>decapping</i>	citoplasma, <i>P-bodies</i>	Lsm2-8 nuclears participen en l' <i>splicing</i>
<b>Pat1</b>	Pat1	topoisomerasa II associada al <i>decapping</i> dependent de deadenilació (funcionalment lligat a Pab1)	citoplasma, <i>P-bodies</i>	transmissió de cromosomes, manteniment de l'estabilitat del locus rDNA
<b>Xrn1</b>		degrada l'RNA 5' monofosfat sense cap	citoplasma, <i>P-bodies</i>	polimerització del microtúbul
<b>Rat1</b>		degrada l'RNA 5' monofosfat sense cap	nucli	processament d'rRNA
<b>Degradació 3'-5'</b>				
<b>Exosoma citoplasmàtic</b>	Csl4, Rrp4, Rrp40, Ski6, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3, Dis3	exonucleasa 3'-5' i activitats endoribonucleolítiques	citoplasma	processos catabòlics d'RNA, processament d'RNAs petits
	Ski7 i associats (Ski2, 3 i 8)	proteïna adaptadora i complex mediador de l'exosoma	citoplasma	participa en l'NSD
<b>Exosoma nuclear</b>	amb la subunitat Rrp6 I Lrp1 i Mpp6	Vigilància nuclear de l'mRNA	nucli	exonucleasa 3'-5' i activitats endoribonucleolítiques
	complex TRAMP (Trf5, Pap2, Air1, Air2, Mtr4)	Vigilància nuclear de l'mRNA	nucli	marcatge d'RNAs per a la degradació
<b>Enzim carronyaire del decapping</b>	DcpS	<sup>7me</sup> GpppP → <sup>7me</sup> GMP	nucli	facilita la degradació 5'-3'



Factor de degradació	Components	Funcions i característiques	Localització	Altres funcions
<b>Degradació endoribonucleolítica</b>				
<b>MRP</b>	Rmp1 i les altres subunitats (Rpp1, Pop1, Pop3, Pop4, Pop5, Pop6, Pop7, Pop8 i Snm1) i la subunitat d'RNA <i>NME1</i>	Enzim RNasa MRP	nucli, citoplasma, <i>P-bodies</i>	processament del pre-rRNA, progressió del cycle cel·lular
<b>Control de qualitat dels mRNAs i vies específiques de degradació</b>				
<b>complex de vigilància</b>	Upf1 interacciona amb Upf2, Upf3, eRF1 i eRF3	RNA helicasa dependent d'ATP, marcatge de substrats NMD als <i>P-bodies</i>	citoplasma, polisomes	acabament eficient de la traducció als codons sense sentit
	Upf2 interacciona amb Upf1, Upf3 i eRF3	participa en el NMD	citoplasma, polisomes	involucrada en el manteniment dels telòmers
	Upf3 interacciona amb Upf1, Upf2 i eRF3	participa en el NMD	Nuclear, citoplasma, polisomes	involucrada en el manteniment dels telòmers, influencia en el transport nuclear
<b>Hrp1</b>	subunitat del factor de tall I (CFI)	proteïna d'unió al DSE i requerida per l'NMD	nucli, citoplasma, <i>P-bodies</i>	necessària pel tall i la poliadenilació dels 3' dels pre-mRNAs
<b>Dom34</b>	associada a Hbs1 (proteïna d'unió a GTP)	endoribonucleasa en l'NGD	citoplasma	traducció per promoure la progressió en G1 i la diferenciació, requerida per la divisió meiótica
<b>Família PUF</b>	Puf1, Puf2, Puf3, Puf4, Puf5 i Puf6	proteïnes d'unió a mRNA, al domini UGUR del 3'UTR, típicament desestabilitzadores (Gerber <i>et al</i> , 2004)	nucli, citoplasma o mitocondri	manteniment de la integritat de la paret, modificació cromàtica o expressió de proteïnes mitocondrials
<b>Vts1</b>		regulador posttranscripcional, proteïna d'unió a mRNA, en el <i>pentaloop</i> CNGGN, amb efecte desestabilitzador (Oberstrass <i>et al</i> , 2006; Rendl <i>et al</i> , 2008)	nucli, citoplasma, <i>P-bodies</i>	supressor de Vti1-2 (en el tràfic en la membrana cisgolgi), activador de Dna2 (endonucleasa en la replicació)

**Taula 7.** Proteïnes implicades en l'estabilitat dels mRNAs en *S. cerevisiae*. Adaptada de Garneau *et al*, 2007 i Wilusz *et al*, 2001.

Cal destacar que en aquesta taula apareixen algunes proteïnes d'unió a RNA (RBPs). Aquestes proteïnes tenen diverses funcions en l'expressió gènica, ja que regulen mecanismes posttranscripcionals. Un 70% del transcriptoma té associacions significatives com a mínim amb una d'aquestes RBPs, i de mitjana cada mRNA interacciona amb tres RBPs. No obstant, es coneix el paper regulador de poques RBPs. *S. cerevisiae* conté unes 600 RBPs anotades i altres d'unió a RNA sense anotar, per tant, hi ha una àmplia variabilitat: algunes regulen mRNAs que comparteixen característiques de funció (biogènesi de ribosomes, processos metabòlics, traducció, arquitectura de la cromatina, etc) o localització (paret cel·lular, membrana citoplasmàtica, RE, mitocondri, nucli, citoplasma, gemma, etc) (Hogan *et al*, 2008). Hogan i col·laboradors

(2008) identifiquen elements específics en *cis* enriquits en els mRNAs diana per algunes RBPs, aquestes tenen diferent seqüència, estructura i localització: molts en el 3'UTR, altres en el 5'UTR i alguns en l'ORF, i altres en dues regions o més d'aquestes. També, relacionen algunes RBPs amb mRNAs que tenen introns, uORF o IRES. Algunes RBPs involucrades en la regulació posttranscripcional citoplasmàtica també participen en una àmplia varietat de processos reguladors (com l'*splicing* alternatiu o el processament de l'extrem 3') dins el nucli: són les ribonucleoproteïnes heterogènies nuclears (hnRNPs) (Mignone *et al*, 2002).

### 4.3.- L'estabilitat dels mRNAs en estrès

S'esperaria que l'estabilitat de l'mRNA eucariòtic hauria d'estar relacionada amb els llocs potencials de tall en cada molècula d'mRNA, per tant, els llocs potencials accessibles i els períodes relatius d'exposició a RBPs o RNases estarien influenciats per la densitat de ribosomes. Tot i així, les correlacions entre l'estabilitat de l'mRNA, les característiques que puguin afectar al nombre i a la proporció dels llocs ocupats per ribosomes en l'mRNA (incloent la longitud del transcrit, l'ús de codó i la cinètica de l'inici i l'elongació de la traducció) són molt difícils d'identificar (McCarthy, 1998). A més, el control de la traducció també influencia l'estabilitat dels mRNAs, ja que la inhibició de la síntesi de proteïnes podria permetre la degradació dels mRNA i les proteïnes existents, i, per tant, facilitar el canvi del programa genètic requerit en un estrès particular. També, la inhibició global de l'inici de la traducció pot portar a la traducció d'mRNAs específics i aquesta activació afavorir l'adaptació a l'estrès (Holmes *et al*, 2004).

Degut a la gran inversió de la cèl·lula en aquests mecanismes posttranscripcionals (centenars d'RBPs i diferents vies de degradació), l'estabilitat dels mRNAs ha de ser altament selectiva i ha de dependre de les condicions cel·lulars i els seus determinants de seqüència. Per tant, la degradació de l'mRNA juga un paper clau en el control de l'expressió gènica. A més a més, l'augment o la disminució de l'estabilitat és important en la rapidesa dels canvis en els perfils d'expressió, essent un mecanisme regulador utilitzat per adaptar veloçment les cèl·lules a un ambient alterat (Foat *et al*, 2005). Dóna suport a aquesta idea el treball de Berry i Gasch (2008), on proposen que la remodelació del programa d'expressió gènica arran d'un estrès no es requereix per a la supervivència al mateix estrès, sinó per sobreviure a un estrès posterior.

Molts estudis d'expressió gènica analitzen de manera global el transcriptoma. Malgrat això, en l'última dècada han aparegut treballs interessants que fan palesa la influència de l'estabilitat dels mRNAs en diferents condicions. Amb l'objectiu de determinar la TD individual del conjunt d'mRNAs d'*S. cerevisiae*, uns autors han utilitzat un mutant termosensible per una proteïna del complex de la RNA Pol II, la qual s'inactiva mitjançant un canvi de temperatura a 37°C (Wang *et al*, 2002). Altres grups, han analitzat

## Introducció

l'estabilitat dels mRNAs amb la presència de diverses drogues inhibidores de la transcripció com la fenantrolina o la tiolutina en resposta a xoc tèrmic i depleció de nutrients (Grigull *et al*, 2004). Aquests investigadors també determinen les vides mitjanes individuals dels mRNAs i descriuen que els gens codificants per proteïnes ribosomals i la seva biogènesi estan especialment regulats per la TD. Les condicions experimentals emprades en els dos casos poden introduir una situació d'estrès que pot ser artefactual per determinar les vides mitjanes dels mRNAs (Parker *et al*, 1991), sobretot quan es vol estudiar la resposta enfront un estrès ambiental (Adams i Gross, 1991). A pesar d'aquestes limitacions, aquests treballs han demostrat que les vides mitjanes estimades dels missatgers d'*S. cerevisiae* varien entre menys d'un minut i una hora.

A més a més, s'afegeix el problema del càlcul de les vides mitjanes de l'mRNA de les mostres recollides en un interval de temps, ja que això implica moltes vegades fluctuacions en l'estabilitat, arran del dinamisme de les respostes a estrès (Perez-Ortin, 2007). Tenint en compte les limitacions de les estratègies emprades fins ara en la determinació de les TD individuals dels mRNAs d'*S. cerevisiae*, s'ha aplicat la tècnica de GRO (*Genomic Run-On*) per inferir les TD dels transcrits a escala genòmica (Alberola *et al*, 2004); mitjançant aquest procediment es poden percebre tant els nivells d'mRNA (RA), com l'evolució de la TR, i subseqüentment, inferir la seva TD, durant el canvi de font de carboni (Garcia-Martinez *et al*, 2004). En un altre estudi, s'ha fet ús d'aquesta metodologia per veure els efectes transcripcionals i posttranscripcionals durant un estrès hiperosmòtic (Romero-Santacreu *et al*, 2009).

## **II. OBJECTIUS**



Aquest treball se centra en analitzar els canvis en els patrons d'expressió gènica i en l'estabilitat dels mRNAs del llevat *Saccharomyces cerevisiae* en resposta a diversos estressos. En primer lloc arran d'un xoc tèrmic moderat (mitjançant el canvi de temperatura de 25°C a 37°C). I en segon, després d'un estrès oxidatiu amb *t*-BOOH, a una concentració final que no afecta la viabilitat d'aquest microorganisme. L'esmentat estudi s'ha centrat en quatre aspectes:

I. Estudiar la resposta a aquests dos estressos a nivell del transcriptoma global mitjançant la tècnica de GRO, per determinar tant la TR com els nivells d'mRNA all llarg del temps.

II. Inferir la TD teòrica de cada gen, així com el seu efecte global en resposta a l'estrès.

III. Validar els resultats de  $k_D$  teòrics mitjançant l'estudi experimental d'alguns mRNAs específics per la tècnica de Northern blot i emprant un sistema de transcripció regulada, el qual permet determinar la vida mitjana dels trànscrips arran de cada estrès.

IV. Analitzar el comportament de diversos grups funcionals de gens, així com el dels trànscrips regulats per un mateix factor de transcripció.

Arran de les dades de GRO obtingudes en l'estrès oxidatiu s'observa que en aquestes condicions s'indueix el sistema d'assimilació de ferro d'alta afinitat, que depèn del factor transcripcional Aft1. Per això, part d'aquest estudi se centra en els següents objectius:

I. Analitzar experimentalment la resposta transcripcional dels membres del reguló Aft1 després de l'estrès oxidatiu. Estudiar la dependència d'Aft1/Aft2, així com la possible intervenció d'altres factors transcripcionals.

II. Caracteritzar l'activació d'Aft1 en resposta a estrès oxidatiu i analitzar la seva dependència respecte la funcionalitat dels ISC.

III. Comparar les diferències entre els nivells de TR i RA dels gens del sistema d'alta afinitat arran de l'estrès oxidatiu i cercar possibles relacions funcionals entre aquests.

IV. Demostrar la desestabilització dels mRNAs codificants per proteïnes de la via reductiva en condicions d'estrès oxidatiu i estudiar la seva transcendència fisiològica.

V. Cercar proteïnes responsables de la desestabilització específica d'aquests mRNAs en resposta a estrès oxidatiu.



### **III. MATERIALS I MÈTODES**





## 1.- Soques emprades

Els experiments que es descriuen en aquest apartat es duen a terme amb les soques de llevat i bacteri que es descriuen continuació.

### 1.1.- Soques de llevat

Totes les soques de llevat utilitzades en aquesta tesi es mostren en la Taula 8.

Soca	Genotip	Font
W303-1A	<i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15</i>	soca parental L. Johston
W303-1B	<i>MATalpha ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15</i>	soca parental L. Johston
W303yap1	W303-1A <i>yap1::kanMX4</i>	F. Estruch
Wmsn2msn4	W303-1A <i>msn2::HIS3 msn4::TRP1</i>	F. Estruch
BY4741	<i>MATa his3d1 leu2d0 met15d0 ura3d0</i>	Euroscarf
MML100	W303-1A <i>grx5::kanMX4</i>	Rodríguez-Manzanaque <i>et al.</i> (2002)
MML298	W303-1A <i>yfh1::kanMX4</i>	Rodríguez-Manzanaque <i>et al.</i> (2002)
MML348	W303-1A <i>aft1::URA</i>	Rodríguez-Manzanaque <i>et al.</i> (2002)
MML800	W303-1A <i>rps6A::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML830	W303-1A <i>[pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
W303-1A-pMM721	W303-1A <i>hsp104::kanMX4 [pCM188 (tetO<sub>2</sub>-HSP104 + 3'UTR d'ADH1)]::URA [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
W303-1A-pMM725	W303-1A <i>hsp12::kanMX4 [pCM188 (tetO<sub>2</sub>-HSP12 + 3'UTR d'ADH1)]::URA [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
W303-1A-pMM752	W303-1A <i>hsp12::kanMX4 [pCM188 (tetO<sub>2</sub>-HSP12 + 3'UTR endogen)]::URA [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML863	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>- HSP104::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML882	W303-1B <i>rps6B1::natMX4</i>	Aquest treball
MML896	W303-1A <i>rps6A::kanMX4 rps6B1::natMX4 tetO<sub>2</sub>-RPS6A::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML957	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>- RRP40::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML980	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>- HSP42::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML987	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>- HSP12::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML990	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>- FIT3::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball
MML1035	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>- HSP26::kanMX4 [pCM244 (tetR'-SSN6)]::LEU2</i>	Aquest treball

Soca	Genotip	Font
MML1042	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>-ALD4::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball
MML1049	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1054	W303-1B <i>cth2::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1062	W303-1A <i>cth1::natMX cth2::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1081	W303-1A <i>cth1::natMX cth2::kanMX4</i> [YIplac128]::LEU2	Aquest treball
MML1082	W303-1A <i>cth1::natMX cth2::kanMX4</i> [pMM928( <i>CTH2</i> )]::LEU2	Aquest treball
MML1084	W303-1A [YIplac128]::LEU2	Aquest treball
MML1086	W303-1A <i>aft2::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1088	W303-1A <i>aft1-Δ5 aft2::kanMX4</i>	Aquest treball, deriva de MML348
MML348- pMM412	W303-1A [pUG35 (Met25-AFT1-yEGFP)]	Aquest treball
MML1093	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>-FTR1::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML830
MML1099	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>-FET3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML830
MML1101	W303-1A <i>arn4::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1107	W303-1A <i>fet3::natMX4</i>	Aquest treball
MML1109	W303-1B <i>fet3::natMX4</i>	Aquest treball
MML1112	W303-1A <i>fet3::natMX4 arn4::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1114	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i> [YIplac211]::URA3 <i>tetO<sub>2</sub>-FTR1::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1093
MML1116	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i> [pMM942( <i>CTH2</i> )]::URA3 <i>tetO<sub>2</sub>-FTR1::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1093
MML1119	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i> [pMM942( <i>CTH2</i> )]::URA3 <i>tetO<sub>2</sub>-FIT3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML990
MML1120	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i> [YIplac211]::URA3 <i>tetO<sub>2</sub>-FIT3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML990
MML1122	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i> [YIplac211]::URA3 <i>tetO<sub>2</sub>-FET3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1099
MML1123	W303-1A <i>cth1::natMX4 cth2::kanMX4</i> [pMM942( <i>CTH2</i> )]::URA3 <i>tetO<sub>2</sub>-FET3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1099
MML1159	W303-1A [pMM955 ( <i>FTR1-3HA</i> )]::URA3	Aquest treball
MML1172	W303-1A [pMM953 ( <i>FET3-3HA</i> )]::URA3	Aquest treball
MML1174	W303-1A [pMM950 ( <i>FIT3-3HA</i> )]::URA3	Aquest treball

Soca	Genotip	Font
MML1186	W303-1A <i>tetO<sub>2</sub>-UTP30::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML830
MML1192	W303-1A <i>ccr4::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1194	W303-1A <i>puf6::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1196	W303-1A <i>xrn1::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1222	W303-1A <i>xrn1::kanMX4</i> <i>tetO<sub>2</sub>-FET3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1099
MML1224	W303-1A <i>xrn1::kanMX4</i> <i>tetO<sub>2</sub>-FTR1::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1093
MML1238	W303-1A <i>ccr4::kanMX4</i> <i>tetO<sub>2</sub>-FET3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1099
MML1239	W303-1A <i>ccr4::kanMX4</i> <i>tetO<sub>2</sub>-FTR1::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML1093
MML1241	W303-1A <i>xrn1::kanMX4</i> <i>tetO<sub>2</sub>-FIT3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML990
MML1243	W303-1A <i>ccr4::kanMX4</i> <i>tetO<sub>2</sub>-FIT3::kanMX4</i> [pCM244 ( <i>tetR'</i> -SSN6)]::LEU2	Aquest treball, deriva de MML990
MML1247	W303-1A <i>puf1::natMX4</i>	Aquest treball
MML1249	W303-1A <i>puf2::kanMX4</i>	Aquest treball
MML1253	W303-1B <i>puf1::natMX4</i>	Aquest treball
MML1254	W303-1A <i>puf1::natMX4</i> <i>puf2::kanMX4</i>	Aquest treball

**Taula 8.** Les soques de llevat utilitzades en aquesta tesi.

## 1.2.- Soques de bacteri

Per tal de replicar i conservar els plàsmids construïts en aquest treball s'utilitza la soca d'*E. coli* DH5 $\alpha$ [F *SupE44 DlacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1*] (Hanahan, 1983). Seguidament es mostra una taula que resumeix els clonatges que s'han dut a terme en aquest treball.

Plàsmid	Origen	Característiques
pUG35	J. Hegemann	Centromèric, promotor <i>MET25</i> + MCS + <i>YGFP3</i> en C-terminal
pCM188	(Gari <i>et al</i> , 1997)	Episomal, promotor <i>tetO<sub>2</sub></i> + MSC + <i>URA</i>
pCM224	(Gari <i>et al</i> , 1997)	Integratiu, promotor <i>tetO<sub>2</sub></i> - <i>kanMX4</i> + MSC + <i>URA</i>
pCM244	(Belli <i>et al</i> , 1998b)	<i>tetR'</i> -SSN6::LEU
pMM412	(Pujol-Carrion <i>et al</i> , 2006)	<i>AFTI-GFP</i> clonat en pUG35

Plàsmid	Origen	Característiques
pMM721	pCM188	<i>tetO<sub>2</sub>-HSP104</i> + 3'UTR de <i>ADH1</i>
pMM725	pCM188	<i>tetO<sub>2</sub>-HSP12</i> + 3'UTR de <i>ADH1</i>
pMM727	pCM188	<i>tetO<sub>2</sub>-RPS6A</i> + 3'UTR endogen (fragment de 339 pb)
pMM752	pCM188	<i>tetO<sub>2</sub>-HSP12</i> + 3'UTR endogen (fragment de 442 pb)
pYIplac128	(Gietz i Sugino, 1988)	Integratiu, <i>LEU</i>
pYIplac211	(Gietz i Sugino, 1988)	Integratiu, <i>URA</i>
pMM928	pYIplac128	Regió 5'UTR, ORF i 3'UTR de <i>CTH2</i> (fragments de 740, 858 i 304 pb, respectivament)
pMM942	pYIplac211	Regió 5'UTR, ORF i 3'UTR de <i>CTH2</i> (fragments de 740, 858 i 304 pb, respectivament)
pMM50	pYIplac211	Fragment de 400 pb <i>PstI/HindIII</i> (fragment que conté 3 epítops HA)
pMM944	pMM50	Regió 3'UTR de <i>FET3</i> (fragment de 381 pb <i>HindIII/AscI</i> )
pMM946	pMM50	Regió 3'UTR de <i>FIT3</i> (fragment de 512 pb <i>HindIII/AscI</i> )
pMM948	pMM50	Regió 3'UTR de <i>FRT1</i> (fragment de 488 pb <i>HindIII/AscI</i> )
pMM950	pMM944	Regió 5'UTR i ORF de <i>FET3</i> (fragment de 2702 pb <i>EcoRI/PstI</i> )
pMM953	pMM946	Regió 5'UTR i ORF de <i>FIT3</i> (fragment de 1363 pb <i>EcoRI/PstI</i> )
pMM955	pMM948	Regió 5'UTR i ORF de <i>FRT1</i> (fragment de 2008 pb <i>EcoRI/XbaI</i> )

Taula 9. Els plàsmids utilitzats en aquesta tesi.

## 2.- Condicions de creixement dels cultius

### 2.1.- Medis de cultiu

#### 2.1.1.- Medis de cultiu pel creixement de llevat

Els medis de cultiu pel creixement d'*S. cerevisiae* en els assajos realitzats són els següents:

I. **YPD:** glucosa 2%, peptona 2%, extracte de llevat 1%. Segons les condicions requerides, s'afegeixen els antibiòtics geneticina o nourseotricina a una concentració final 200 mg/l.

II. **SC (Sherman, 2002):** base nitrogenada per a llevats sense aminoàcids (Difco™) 0,67%, glucosa 2%, *Drop out* 0,2%. El *Drop out* és la combinació en sec de bases nitrogenades, aminoàcids i vitamines, excepte el suplement adequat al requeriment de les auxotrofies de cada soca. La seva composició es detalla en la Taula 10.

Aminoàcid	Grams	Aminoàcid	Grams	Aminoàcid	Grams
adenina	0,5	glicina	2,0	fenilalanina	2,0
alanina	2,0	histidina	2,0	prolina	2,0
arginina	2,0	inositol	2,0	serina	2,0
asparagina	2,0	isoleucina	2,0	treonina	2,0
àcid aspàrtic	2,0	leucina	4,0	triptòfan	2,0
cisteïna	2,0	lisina	4,0	tirosina	2,0
glutamina	2,0	metionina	4,0	uracil	2,0
àcid glutàmic	2,0	àcid <i>para</i> -aminobenzòic	0,2	valina	2,0

**Taula 10.** Components del *Drop out* i la seva quantitat en la barreja. (Sherman, 2002).

III. **SD (Sherman, 2002):** base nitrogenada per a llevats sense aminoàcids (Difco™) 0,67%, glucosa 2%.

IV. **MEDI D'ESPORULACIÓ:** Acetat potàssic 1%, extracte de llevat 0,1%, glucosa 0,05%.

Quan és necessari s'afegeix agar al 2% per obtenir medi de cultiu sòlid i agar noble (Difco™) per solidificar el medi en condicions de privació de ferro.

### 2.1.2.- Medis de cultiu pel creixement de bacteris

Pel cultiu d'*E. coli* s'ha emprat medi **LB (Luria-Bertani)**: triptona 1%, NaCl 1%, extracte de llevat 0,5% a un pH de 7,5, ajustat amb NaOH 1M. Per a la selecció de transformants, se suplementa amb ampicil·lina a una concentració final de 50 mg/l. Per a la preparació de medi sòlid, se suplementa el medi líquid amb l'1,5% d'agar.

### 2.2.- Característiques dels cultius

La incubació dels cultius de llevat i bacteri es fan a 30°C i 37°C, respectivament i en una agitació d'aproximadament 175 rpm. La mesura del creixement dels cultius es fa amb la lectura de la densitat òptica (OD) del cultiu a 600 nm. Tant per l'aplicació dels diversos tractaments, com per la recollida de mostres pels diferents processaments que es detallen en aquest apartat, es duen a terme en cultius creixent exponencialment en medi líquid amb  $1,5 \cdot 10^7$  cèl·lules/ml, normalment en YPD, però si ho requereix, també en SC.

### 2.2.1.- Condicions d'estrès

I. **Experiments de xoc tèrmic:** En els tractaments de xoc tèrmic la temperatura de creixement dels cultius és de 25°C i l'estrès es realitza a 37°C.

II. **Experiments d'estrès oxidatiu:** S'agrega hidroperòxid de *tert*-butil (*t*-BOOH) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) als cultius a diferents concentracions. Es dilueixen amb aigua estèril per a tenir una concentració *stock* d'1 M i 100 mM, respectivament, i una concentració final segons la soca i la intensitat que es vol obtenir en la resposta. Normalment, 0,1 mM de concentració final de *t*-BOOH per la soca W303-1A i a 0,8 mM per la BY4741.

III. **Experiments de depleció de ferro:** S'addiciona als cultius líquids o al medi sòlid un agent quelant de ferro: (i) ferrocina (Sigma), que quela el ferro intracel·lular i extracel·lular o (ii) batofenantrolina àcid disulfònic (BPS) (Fluka), que és un quelant de ferro extracel·lular. Es pesa la quantitat necessària i s'afegeix aigua estèril per a obtenir a una concentració *stock* inicial de 100 mM i 6 mM, respectivament i diferents concentracions finals, segons la intensitat que es vol obtenir en la resposta. Normalment, el BPS és l'agent més utilitzat a una concentració final de 0,1 mM pels estudis de sensibilitats en medi sòlid i de 0,15 mM pels estudis de resposta transcripcional en medi líquid.

IV. **Experiments de repleció de ferro:** S'afegeix sulfat amònic ferrós (Sigma) a una concentració final de 2 mM.

### 2.2.2.- Cinètiques de resposta a estrès

La presa de mostres al llarg del temps consisteix en agafar un volum de cultiu creixent exponencialment (entre 0,2 i 0,8 d'OD). Un primer punt just abans de l'estrès (temps 0) i la resta en diferents intervals durant l'estrès i segons la conveniència de cada cas, ja que en el xoc tèrmic la cinètica acostuma a durar fins al minut 45, l'estrès oxidatiu fins als 90 minuts i la depleció de ferro fins les cinc hores.

### 2.2.3.- Cinètiques de tancament de la transcripció

El tancament de l'expressió dels gens clonats sota el promotor *tetO*<sub>2</sub> es realitza addicionant doxiciclina a 10 µg/ml, a un cultiu exponencial i de manera immediata en agafar la primera mostra. Aquesta cinètica consisteix en prendre alíquotes d'un cultiu tractat amb l'estrès objectiu d'estudi i d'un cultiu control no tractat.

### 2.2.4.- Estudis fenotípics de creixement

Per observar els comportaments fenotípics de les soques mutants, es realitzen diversos assajos de sensibilitat. Les cèl·lules es deixen créixer exponencialment en medi YPD líquid (al voltant de 2x10<sup>7</sup> cèl·lules/ml). Seguidament, es plaquegen mitjançant dilucions seriades (1:5) sobre medi YPD o SD sòlid i

en presència dels agents oxidants i quelants de ferro anteriorment esmentats. Les plaques s'incuben durant 48 o 72 hores, a 30°C.

### 3.- Tècniques de biologia molecular

#### 3.1.- Extracció de DNA genòmic en *S. cerevisiae*

El procediment utilitzat és el següent:

I. S'inoculen 10 ml de medi YPD amb una colònia fresca de llevat i es deixa créixer durant 16 hores.

II. El cultiu se centrifuga a 4.000 rpm durant 2 minuts i es passen les cèl·lules a un tub eppendorf per rentar-les amb 1 ml d'aigua estèril.

III. Les cèl·lules es resuspenen amb 200 µl de TNST i seguidament s'agreguen 200 µl de FC i 200 µl de perles de vidre (450-600 µm, Sigma).

IV. La barreja s'agita amb vòrtex a velocitat màxima durant 4 minuts.

V. Posteriorment s'agregen 200µl de TE barrejat per inversió. La barreja se centrifuga a 12.000 rpm, 5 minuts.

VI. El sobrenedant es fica en un tub nou, on s'afegeix 1 ml d'etanol 100%. Després de barrejar per inversió, se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 minuts.

VII. Al precipitat s'agreguen 400 µl de TE i 3 µl d'RNasa (10 mg/ml) i s'incuba a 37°C, 5 minuts.

VIII. Després s'afegeixen 50 µl de NaOAc i 500 µl de FC. Aquesta barreja s'agita al vòrtex a velocitat màxima durant 1 minut.

IX. Llavors se centrifuga a 12.000 rpm, 5 minuts i s'elimina el sobrenedant.

X. El precipitat es renta amb 1 ml d'etanol al 70% i se centrifuga novament a 12.000 rpm, 1 minuts.

XI. Es retira completament el sobrenedant i se centrifuga una altra vegada a la mateixa velocitat. El sobrenedant restant s'elimina completament i el precipitat s'asseca amb ajut d'un *Speed vacuum*, 2 minuts.

XII. El precipitat es resuspèn en 50 µl d'aigua milliQ i es valora de manera aproximada mitjançant electroforesi de DNA en gel d'agarosa (Serva) al 0,8%, comparant la intensitat de la banda amb la intensitat de les bandes patró de quantitat coneguda.

Solucions necessàries:

- **TNST:** Tritó X-100 2%, SDS 1%, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.
- **FC:** Fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 amb 0,1% 8-hidroxiquinolina i saturat amb TE.
- **TE:** 0,5 ml de solució Tris-HCl 2 M pH 8; 0,2 ml d'EDTA 0,5 mM pH 8; enrasat fins a un volum d'1 litre d'aigua miliQ.
- **NaOAc:** Acetat de sodi 3 M pH 8.



## 3.2. Tècniques de DNA recombinant

### 3.2.1.- Amplificació i clonació dels gens estudiats

Per a la clonació de gens d'*S. cerevisiae*, s'amplifiquen els gens mitjançant PCR a partir del DNA genòmic de la soca salvatge W303-1A.

I. **Reacció en cadena de la polimerasa (PCR):** Les condicions habituals de PCR són: 5 minuts a 95°C; 30 cicles d'1 minut a 95°C, 45 segons a 52°C i 3 o 4 minuts a 65°C i, finalment, 10 minuts a 65°C. Cada reacció de 50 µl totals conté 20-100 ng de DNA, tampó de Roche 1x, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleòtids a una concentració 4 µM i 1 unitat de DNA polimerasa (Roche).

A continuació es digereix l'insert i el vector amb els enzims corresponents segons els llocs de restricció seleccionats per la seva inserció.

II. **Digestions:** Els enzims de restricció utilitzats (Roche o Takara) i les condicions de digestió es realitzen seguint les indicacions del fabricant, entre 2 i 4 hores a 37°C, amb els tampons aconsellats.

III. **Purificació dels fragments de DNA:** Els fragments obtinguts després de les digestions es purifiquen emprant el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) i es valoren mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 0,8%. Per determinar la mida aproximada dels fragments de DNA s'utilitza com estàndard *1Kb DNA Ladder* (Invitrogen™).

IV. **Lligació dels vectors amb els fragments de DNA:** En les lligacions insert-vector s'utilitza l'enzim T4 DNA lligasa (Takara), seguint les instruccions del fabricant.

### 3.2.2.- Mètodes de transformació en *E. coli*

L'obtenció de cèl·lules competents i el procediment de transformació de cultius d'*E. coli* mitjançant el mètode de clorur de calci es realitzen d'acord amb el protocol estàndard del laboratori, en el qual les cèl·lules competents es xoquen 2 minuts a 42°C i s'incuben 1 hora a 37°C (Ausubel, 1994-1998).

**Purificació de plàsmids a partir de cultius d'*E. coli*:** Per a obtenir plàsmids replicats en *E. coli* es cultiven les cèl·lules en medi LB amb ampicil·lina a 37°C durant 16 hores i s'empra el sistema *NucleoSpin® Plasmid QuickPure* (Macherey-Nagel) segons les indicacions del fabricant.

### 3.2.3.- Mètodes de transformació en *S. cerevisiae*

- **En la transformació d'*S. cerevisiae* amb plàsmids d'expressió o fragments lineals de DNA** se segueix el mètode ràpid amb acetat de liti (AcLi) (Gietz *et al*, 1992), plaquejant les cèl·lules en medi selectiu (segons l'auxotròfia o el marcador de selecció corresponent) i s'incuben les plaques a 30°C durant 48 hores.

Per dur a terme la transformació és necessari que el cultiu de llevat estigui en fase exponencial de creixement. Es realitza una primera centrifugació de 4 minuts a 4.000 rpm a temperatura ambient. A

continuació es renta amb aigua estèril i se centrifuga de nou en les mateixes condicions. El sediment es resuspèn en 900 µl de la solució d'AcLi/TE, i se centrifuga durant 5 segons. A continuació es resuspèn el sediment amb 100 µl de la mateixa solució i es transfereixen 50 µl d'aquesta suspensió en tubs eppendorfs nous, al quals s'afegeixen 5 µl de DNA d'esperma de salmó (ssDNA) i 300 µl de solució de polietilenglicol (PEG) a cada mostra i a una d'elles s'afegeixen 800 ng del DNA per transformar. S'homogeneïtzen completament i s'incuben amb agitació a 30°C, 30 minuts. A continuació es realitza un tractament de 15 minuts a 42°C. Se centrifuguen durant pocs segons, per eliminar les restes de les solucions i es resuspenen les cèl·lules per (i) plaquejar, en el cas de selecció per auxotròfia o (ii) incubar en 4 ml de YPD a 30°C durant 4 hores, quan la selecció dels transformants és per resistència a antibiòtic. Les plaques s'incuben 48 hores a 30°C i després es reaïllen les colònies resistents. La incorporació de la resistència en el lloc apropiat del genoma es comprova per PCR, segons l'estratègia descrita en Wach *et al.* (1994).

- **La construcció de clonats.** El plàsmid pMM928 deriva del YIplac128, un plàsmid integratiu per *LEU2* (Gietz i Sugino, 1988), i conté l'ORF de *CTH2*, més 820 i 306 pb de les regions *upstream* i *downstream* respectivament, clonada entre els llocs *EcoRI* i *BamHI* del vector. També el mateix gen *CTH2*, més les seves seqüències adjacents es clona en el plàsmid integratiu YIplac211 per *URA3* (Gietz i Sugino, 1988) per a generar pMM942.

- **La construcció dels mutants nuls per un únic gen** s'obtenen seguint el mètode de substitució per homologia de seqüències flanquejants curtes (*short-flanking homology approach*). El primer pas és el disseny dels oligonucleòtids específics amb suficient regió homòloga per poder-se substituir del gen d'interès amb el mòdul *kanMX4* (resistència a geneticina) (Wach *et al.*, 1994), *natMX4* (resistència a nourseotricina) (Goldstein i McCusker, 1999), o *CaURA3MX* (restauració de l'auxotròfia d'uracil) (Goldstein *et al.*, 1999).

- **La substitució de promotors endògens pel promotor *tetO<sub>2</sub>*** es realitza mitjançant l'amplificació amb oligonucleòtids específics de la regió *upstream* del codó d'inici de cada gen de la regió de 3.813 nt del marcador *kanMX4*, l'activador *tTA* i el promotor *tetO<sub>2</sub>* del plàsmid integratiu pCM224 (Belli *et al.*, 1998b). El producte de PCR es transforma en la soca MML830, la qual porta el plàsmid integratiu pCM244 linearitzat amb *EcoRV*, que restaura l'auxotròfia per leucina. Aquest conté la proteïna repressora del promotor *tetO<sub>2</sub> tetR'-Ssn6*, després de l'actuació de la doxiciclina.

- **El marcatge de les ORFs de Fet3, Ftr1 i Fit3 amb HA.** S'utilitza el plàsmid pMM50 que conté una seqüència de tres hemaglutinines (l'epítip HA) (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Aquestes construccions s'efectuen mitjançant dues clonacions, per poder respectar les regions 5'UTR i 3'UTR dels mRNAs i per tant les seves seqüències estabilitzadores i desestabilitzadores. (i) S'amplifica la regió 3'UTR dels tres gens, es digereixen *AscI* i *HindIII* i es clonen al vector pMM50, darrera de 3xHA, 6xHis i el codó TAG. (ii) S'amplifica la regió 5'UTR i ORF dels tres gens: es digereixen *EcoRI/PstI* per *FIT3* i *FET3* i *EcoRI* i *XbaI* per *FTR1* i es clonen en els plàsmids obtinguts en el pas anterior. Així, s'obtenen els plàsmids

## Materials i mètodes

pMM950, pMM953 i pMM955, el primer conté l'ORF del gen *FET3* i la regió -791 i de +381 pb més de la mateixa ORF; el segon, el marc de lectura de *FIT3* i -750 i +512 pb de *FIT3* i el tercer plàsmid inclou l'ORF de *FTR1* amb la regió -796 i +488 pb d'aquesta ORF. Tots els marcs de lectura estan fusionats amb l'etiqueta de 3xHA. Aquests tres plàsmids s'integren cromosòmicament després de la seva linealització amb la digestió *EcoRV* o *NcoI*.

- **La construcció de proteïnes fusionades amb GFP** es realitza a partir del vector pUG35 (obtingut pel Dr. J. Hegemann, *Institute für Mikrobiologie*, Düsseldorf, Alemanya) que és un plàsmid centromèric amb el promotor de *MET25* i el gen de la yEGFP. A partir d'aquest, s'obté el plàsmid pMM412, amb el marc de lectura d'*AFT1* clonat entre els llocs *EcoRI* i *ClaI* del vector, de manera que codifica una proteïna de fusió GFP-Aft1.

- **Els mutants múltiples** s'obtenen creuant les soques parentals, induint l' esporulació de la seva soca diploide i analitzant els fenotips de les tètades resultants, per a seleccionar la combinació de mutacions d'interès (Sherman, 2002).

### 3.3. Tècniques de detecció de biomolècules

#### 3.3.1.- Anàlisi d'expressió gènica en *S. cerevisiae* per Northern Blot

Aquest procediment es du a terme tal i com es descriu en Bellí i col·laboradors (1998b).

##### 3.3.1.1.- Obtenció de mostres

Les soques d'interès es cultiven tota la nit en medi líquid i s'incuben en agitació a 30°C. L'experiment comença quan el cultiu ha arribat a fase exponencial de creixement, quan es pren la mostra de temps 0 ( $t_0$ ) i de manera immediata s'afegeix l'agent estressant o l'antibiòtic desitjat, i es continuen agafant mostres al llarg del temps segons el cas. Les diferents alíquotes de cultiu es transfereixen a un tub de centrifuga amb més del doble del volum que s'agafa d'aigua milliQ a 4°C i se centrifuguen a 4.000 rpm durant 4 minuts, mantenint-les en fred.

##### 3.3.1.2.- Extracció d'RNA total

- I. Les cèl·lules es resuspenen en 25 µl de TE i, a continuació s'afegeixen 25 µl de fenol àcid.
- II. Després de barrejar bé, s'incuben els eppendorfs a 65°C 2 minuts i posteriorment s'afegeix un volum igual de perles de vidre (450-600 µm, Sigma).
- III. Durant 8 minuts s'agita la barreja al vòrtex a velocitat màxima, per a trencar les cèl·lules.
- IV. S'afegeixen 600 µl de TES i 600 µl de fenol àcid i s'homogeneïtza bé amb vòrtex durant uns segons.
- V. Seguidament s'incuben els tubs a 65°C durant 15 minuts, s'agiten i es refreden en gel, 5 minuts.

VI. Se centrifuguen les mostres a 12.000 rpm durant 5 minuts i es transfereixen els sobrenedants a tubs eppendorfs nous amb 500 µl de FC.

VII. S'agiten al vòrtex a màxima velocitat i a continuació se centrifuguen a 12.000 rpm, 5 minuts.

VIII. Es transfereixen els sobrenedants a tubs nous i s'afegeixen 40 µl de NaOAC i 1 ml d'etanol 100%, els quals es barregen per immersió.

IX. Per precipitar l'RNA, s'incuba durant 1-2 hores a -20°C. Després se centrifuguen els eppendorfs a 12.000 rpm durant 10 minuts.

X. Els precipitats es renten amb etanol 70%. Se centrifuguen i s'eliminen els sobrenedants a l'*Speed vacuum*.

XI. La resuspensió de l'RNA es fa amb 50 µl de d'aigua milliQ lliure d'RNases.

XII. L'RNA es quantifica utilitzant un espectrofotòmetre que mesura l'OD a 260 i 280 nm.

XIII. L'RNA total extret es pot conservar a -20°C.

### **3.3.1.3.- Electroforesi en gel de formaldehid-agarosa**

I. Es barregen 0,8 g d'agarosa en 80 ml d'1xNBC. La barreja s'escalfa al microones fins que l'agarosa es dissol completament.

II. L'agarosa es deixa a 65°C i s'afegeixen 2 ml de formaldehid al 37%, barrejant bé.

III. La solució d'agarosa es col·loca a la cubeta d'electroforesi amb els pintes i es deixa solidificar. El tampó d'electroforesi és l'1xNBC.

IV. Se separen 10-15 µg d'RNA de cada mostra i s'afegeixen 2 µl de 10xNBC, 3 µl de formaldehid al 37% i 10 µl de formamida, en un tubet nou.

V. Aquestes barreges s'incuben a 65°C durant 15 minuts i, a continuació s'agreguen 2 µl de tampó de càrrega 10x juntament amb 0,5 µl de solució de bromur d'etidi.

VI. Les mostres es carreguen al gel i es corre l'electroforesi a 100V durant 90 minuts.

### **3.3.1.4.- Transferència a la membrana de niló i fixació amb rajos UV**

I. La membrana de niló se submergeix en aigua durant 5 minuts, abans de la transferència.

II. Es col·loca la membrana i després el gel amb la carrera d'RNA sobre l'equip de buit *VacuBlot* d'acord amb les instruccions del fabricant.

III. S'acobla la bomba de buit i es fixa a una pressió de 50 mBars.

IV. El gel es cobreix amb aigua durant 15 minuts.

V. S'enretira l'aigua i es cobreix el gel amb NaOH 0,1 M durant 15 minuts. Aquest pas es realitza dos cops.

VI. S'enretira aquesta solució i es cobreix el gel amb Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 durant 15 minuts.

## Materials i mètodes

VII. S'enretira la solució anterior i es cobreix completament la cambra del *VacuBlot* amb aigua milliQ. Es deixa transferir 90 minuts.

VIII. Seguidament, s'elimina l'aigua i se separen el gel i la membrana, la qual es col·loca sobre una safata amb paper de filtre humit.

IX. La membrana es posa a l'equip *Stratalinker* 1.800 (Stratagen) i s'aplica llum ultraviolada ( $12.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) per fixar-ne covalentment l'RNA transferit.

X. Usant un transil·luminador UV es verifica la transferència i la posició dels rRNA.

XI. Per retirar el formaldehid i el tampó de carrega, es renta la membrana dos cops amb 100 ml de WB a 65°C durant 15 minuts.

### 3.3.1.5.- Hibridació i rentats

I. Es preescalfa la solució MagicHyb a 65°C, per redissoldre-la.

II. Després del dos rentats amb WB, la membrana es passa a tub d'hibridació juntament amb 5 ml de MagicHyb i s'incuba durant 1 hora a 65°C en rotació.

III. Per desnaturalitzar la sonda (2,5 ng/ml) es dissol en 200  $\mu\text{l}$  d'aigua i s'escalfa a 100°C durant 4 minuts. A continuació es posa en gel durant 5 minuts.

IV. La sonda desnaturalitzada s'afegeix al tub d'hibridació amb la membrana, i s'incuba a 65°C durant 16 hores.

V. Per a retirar l'excés de sonda es renta la membrana a 65°C amb 100 ml de WB, preescalfat a la mateixa temperatura, durant 20 minuts. Aquest pas es repeteix dues vegades més.

### 3.3.1.6.- Detecció per quimioluminescència

I. La membrana es renta dues vegades amb 50 ml de B1 durant 5 minuts, en agitació forta.

II. Per bloquejar la membrana s'utilitzen 50 ml de B2, i s'incuba en agitació suau durant 1 hora.

III. Seguidament es dilueix l'anticòs Anti-DIG en proporció 1:15.000 en B2, i s'incuba a la mateixa velocitat, 30 minuts.

IV. Per evitar l'excés d'anticòs, la membrana es renta quatre cops amb 50 ml de B1, 10 minuts.

V. Posteriorment la membrana s'incuba amb 50 ml de B3 durant 5 minuts i després amb 1 ml de B3 amb CDP-star diluït 1:100 5 minuts.

VI. Per captar la quimioluminescència s'utilitza l'equip *Lumi-Imager*<sup>TM</sup> (Roche).

### 3.3.1.7.- Solucions

- **Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, conjugats amb fosfatasa alcalina (Roche).**

- **B1:** 25 ml d'una solució Tris-HCl 2 M pH 8 i 25 ml de NaCl 2,5 M, aigua fins a 500ml. Esterilitzat a l'autoclau.

- **B2:** 0,5g de *Blocking Reagent* (Roche), 100 ml de B1. També esterilitzat a l'autoclau.
- **B3:** 0,5 ml de dietanolamina, 40 µl de HCl 37%, aigua milliQ fins a 50 ml.
- **CDP-Star<sup>TM</sup>** (Roche): Substrat de la fosfatasa alcalina, la seva defosforilació dóna lloc a la formació d'un compost quimioluminescent.
- **FC:** fenol/cloroform/alcohol isoamílic 25:24:1 amb 0,1% 8-hidroxiquinolina i saturat amb TE.
- **Fenol Àcid:** Fenol:aigua 3,75:1
- **MagicHyb:** 25 ml d'una solució Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M pH 7,2, 1 ml d'una solució EDTA 0,5 mM pH 8, 20 g SDS, 0,5 g de *Blocking Reagent*, aigua fins a 100 ml. Conservat a 4°C.
- **Membrana de niló** carregada positivament (Roche)
- **NaOAC:** Acetat de sodi 3M pH 5,2. Esterilitzat a l'autoclau.
- **NaOH 0,1 M i Tris HCl 0,1 M:** per a transferir l'RNA a la membrana de niló.
- **10x NBC:** Àcid bòric 0,5 M, citrat de sodi 10 mM, NaOH 50 mM, aigua fins a 1 litre, pH 7,5. Després de preparar aquesta solució s'agrega dietil pirocarbonat 1%, es barreja per immersió i s'autoclava.
- **Tampó de càrrega 10x:** Ficoll 15%, EDTA disòdic 0,1 M pH 8 i blau de bromofenol 0,25%.
- **TE:** 0,5 ml de solució Tris-HCl 2 M pH 8, 0,2 ml de solució d'EDTA 0,5 mM pH 8 i aigua fins a un volum d'1 litre. S'autoclava.
- **TES:** 0,5 ml d'una solució de Tris-HCl 2 M pH 8, 0,2 ml d'una solució de EDTA 0,5 mM pH 8, 0,5 ml d'una solució d'SDS 10% i aigua fins a 100 ml. S'esterilitza a l'autoclau.
- **WB:** 10 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M pH 7,2, 1 ml d'EDTA 0,5 M pH 8, 5 g d'SDS i aigua fins a 500 ml.

### 3.3.1.8.- Síntesi de sondes de DNA marcades amb Dioxigenin-dUDP (DIG-dUDP)

La síntesi de sondes per a la detecció d'mRNA es fa utilitzant el producte *DIG DNA Labeling Mix, 10x concentration* (Roche), seguint les indicacions del fabricant. El fragment de DNA del gen d'interès, amplifica prèviament mitjançant PCR a partir de DNA genòmic. La qualitat de la sonda es verifica mitjançant Dot-blot.

### 3.3.1.9.- Càlcul de vides mitjanes d'mRNAs

En els experiments del càlcul de vides mitjanes es fa provocant una aturada de la transcripció del gen d'interès, gràcies al sistema dual d'expressió regulada per l'addició de doxiciclina al cultiu cel·lular. Així, doncs, es cultiva la soca que conté el aquest gen d'interès sota l'expressió del promotor *tetO<sub>2</sub>*, s'afegeix l'antibiòtic en condicions de creixement exponencial, i es realitza una cinètica d'extracció de mostres a intervals de pocs minuts.

S'extreu l'RNA i es valora el tancament de l'expressió del gen per Northern blot. Seguidament, es quantifica la intensitat de les bandes obtingudes i es relativitzen pel control de càrrega utilitzat (la sonda d'U1). Com que la TD de l'mRNA segueix una cinètica de primer ordre, es representen gràficament els

logaritmes en base 2 dels valors resultants respecte el temps i se'n determina la recta resultant  $y = -ax + b$  i les vides mitjanes s'obtenen amb el càlcul de la inversa del pendent  $t_{1/2} = -\frac{1}{a}$  (Hargrove *et al*, 1991).

### 3.3.2.- Anàlisi dels nivells de proteïnes en *S. cerevisiae* per Western Blot

Les mostres s'obtenen a partir de cultius de les soques amb els gens d'interès marcats amb HA creixent exponencialment en medi líquid YPD. Es recullen les cèl·lules per centrifugació en fred i es passen a eppendorfs que es congelen immediatament. S'extreu la proteïna amb urea i la concentració de proteïna es calcula amb l'assaig de proteïna Micro DC (Bio-Rad). La mateixa quantitat de proteïna de cada mostra es processa en gels d' SDS-poliacrilamida i es transfereix a una membrana de PVDF. La immunodetecció es fa incubant la membrana amb anticòs monoclonal anti-HA (Roche) (Belli *et al*, 1998a) en una dilució 1:2.500 en una solució de tampó TBST (10 ml 2 M Tris-HCl pH 8, 50 ml 2,5 M NaCl, 1ml Tween 20) en presència de 0,25% de llet en pols desnatada i, posteriorment, s'empra anticòs *anti-mouse* (Amersham-Bioscience) en una dilució final d'1:10.000 en la mateixa solució. Per a la detecció quimioluminescent s'utilitza el *kit SuperSignal West Dura Extended duration Substrate* (Pierce) i l'equip *Lumi-Imager<sup>TM</sup>* (Roche).

## 4.- Tècniques de microscòpia

La proteïna Aft1 marcada amb GFP s'expressa en cèl·lules d'*S. cerevisiae*. Aquesta soca es cultiva en medi YPD líquid i es prenen alíquotes en creixement exponencial que s'incuben directament amb DAPI (5 g/ml) durant 40 minuts en la foscor, per tal de tenyir el nucli d'aquestes cèl·lules *in vivo*, s'observen les mostres al microscopi de fluorescència *Olympus BX51* segons les tècniques estàndards (Tatchell i Robinson, 2002), amb els filtres U-MNUA2 i U-MNUA3, per a DAPI i GFP, respectivament.

## 5.- Tècniques per a la detecció de ferro

Per a detectar el ferro intracel·lular es realitza el següent protocol (Tamarit *et al*, 2006).

I. Es cultiven les cèl·lules exponencialment, es recullen per centrifugació i es renten amb aigua freda.

II. Seguidament, es digereixen les cèl·lules amb una barreja de 285 µl d'aigua milliQ i 214 µl d'àcid nítric al 7%, que es vorteja i s'incuba entre 95 i 100°C, durant un mínim de 16 hores.

III. A continuació, se centrifuguen els tubs a 10.000 rpm i s'agafa 400 µl de la barreja en un altre tub amb 300 µl d'aigua milliQ, 160 µl d'ascorbat de sodi (38 mg/ml) o un quelant de ferro com el BPS o la ferrocina, 126 µl solució d'acetat d'amoni (acetat d'amoni saturat, diluït al 3%).

IV. Després de 5 minuts, l'absorbància específica del complex ferro-quelant es llegeix a 535 nm, pel BPS o 565 nm, per la ferrocina, en un espectrofotòmetre *Shimadzu UV-2401 PC*.

V. El volum cel·lular es calcula en un *Coulter* comptador i mesurador de partícules Z2 (volum cel·lular = nombre de cèl·lules x volum mitjà).

## 6.- Tècniques genòmiques

### 6.1.- Obtenció de mostres per al *Genomic Run On*

L'experiment del *Genomic Run On* (GRO) es realitza segons el protocol descrit en García-Martínez i col·laboradors (2004). Les cèl·lules de llevat es cultiven en YPD fins a arribar a una OD de 0,6 (a 25°C) o 0,4 (a 30°C), en l'experiment d'estrès tèrmic i d'estrès oxidatiu, respectivament. Es recullen mostres de cultiu als temps 0, 4, 11, 16, 26 i 40 minuts, després d'aplicar un estrès tèrmic (afegint la meitat més de medi a 49°C i canviant el cultiu a un incubador a 37°C) i 0, 7, 16, 26, 41 i 71 minuts, després d'aplicar un xoc oxidatiu amb *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM (vegeu els dissenys experimentals dels estressos en els Resultats Il·lustració 9 i Il·lustració 27).

De cada temps es prenen 70 ml de cultiu als quals s'afegeixen 300 ml d'aigua freda i 20 ml de N-Lauril sarcosina sulfat sòdic (10%). Les cèl·lules diluïdes en aigua se separen en dues alíquotes, (i) una de 100 ml es processa per a l'obtenció de l'RNA total i (ii) l'altra de 250 ml per a l'obtenció de les TRs. Les primeres es renten amb aigua freda i es congelen en nitrogen líquid, conservant-les a -20°C fins al seu processament.

### 6.2.- Protocol de *Transcription Run On* (TRO)

I. Les cèl·lules per a l'obtenció de les TRs es renten amb N-Lauril sarcosina sulfat sòdic (0,5 %) per permeabilitzar-les i aturar les RNA polimerases elongants.

II. Després d'aquest rentat, es recullen per centrifugació, es resuspenen en 900 µl d'aigua freda i es passen a un tub de rosca, al qual s'afegeixen 50 µl d'N-Lauril sarcosina sulfat sòdic (10%), incubant-se 20 minuts en gel.

III. Transcorregut aquest temps, en què les cèl·lules es permeabilitzen, se centrifuguen i se n'elimina el sobrenedant.

IV. A continuació es realitza la transcripció *in vivo* (*run-on*), incubant les mostres a 30°C durant 5 minuts en presència d'un nucleòtid uracil radioactiu. Per fer-ho es resuspenen les cèl·lules en la següent barreja de reacció:

- 120 µl de tampó de transcripció (50 mM Tris-HCl pH 7,7, 500 mM KCl, 80 mM MgCl<sub>2</sub>),
- 16 µl d'rNTPs (barreja d'ACG 10 mM: CTP 10 mM, ATP 10 mM i GTP 10 mM),
- 6 µl de DTT 0,1 M
- i 13 µl de [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP 10 µCi/ml.



## Materials i mètodes

V. La reacció s'atura afegint 1 ml d'aigua freda i se centrifuguen les cèl·lules per eliminar els nucleòtids radioactius no incorporats.

VI. A continuació s'extreu l'RNA total i es quantifica. També es quantifica la radioactivitat específica de 5 µl de la dilució 2 µl d'RNA en 198 µl d'aigua mitjançant un comptador de centelleig (WALLAC 1409).

VII. Tot l'RNA marcat amb la transcripció *in vivo* s'empra per a la hibridació dels macroxips.

### 6.3.- Tractament de les mostres d'RNA

Les cèl·lules per a l'obtenció d'RNA total de cada mostra es descongela en gel, s'extreu l'RNA i es quantifica. Un cop obtingut i quantificat l'RNA se segueix el següent tractament:

I. S'aplica un tractament amb DNasa per a eliminar possibles restes de DNA. Per a això es prenen 50 µg d'RNA i s'afegeixen 2 µl de 5x *First Strand Buffer* (Invitrogen), 1 µl d'RNasa OUT (Invitrogen) i 0,4 µl de DNasa 1 (*RNasa free*) (Roche) i aigua tractada per a RNA fins a un volum final de 20,4 µl. La reacció s'incuba a 37°C durant 30 minuts. Després s'afegeixen 0,4 µl de DNasa 1 i es tornen a incubar a 37°C uns altres 30 minuts. Seguidament s'elimina la DNasa 1 amb un volum de fenol àcid:cloroform:alcohol isoamílic (125:24:1).

II. A continuació, se centrifuguen 5 minuts a 12.000 rpm i se'n recull la fase aquosa.

III. S'addiciona un volum de cloroform:alcohol:isoamílic (24:1) i es torna a centrifugar 5 minuts a 12.000 rpm.

IV. Es recull la fase aquosa i es precipita l'RNA amb l'addició de 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M i 2,5 volums d'etanol 96% mantenint-ho a -20°C durant tota la nit.

V. L'RNA precipitat se centrifuga 15 minuts a 12.000 rpm i es renta amb etanol 70%.

VI. Després es resuspèn en 11,3 µl d'aigua per a RNA.

### 6.4.- Obtenció de cDNA

L'RNA que en resulta s'utilitza com a motlle per a l'obtenció de cDNA mitjançant retrotranscripció. Per a això es procedeix de la següent manera:

I. Als 11,3 µl d'RNA s'afegeix 1,2 µl d'hexàmers aleatoris (3 µg/µl) (Invitrogen) i 1 µl d'RNasa OUT (Invitrogen). La barreja s'incuba a 70°C durant 10 minuts per a la desnaturalització de l'RNA.

II. Després es passa a 25°C, 10 minuts, per a permetre la hibridació dels oligonucleòtids amb l'RNA.

III. Es prepara una barreja amb 6 µl de 5x *First Strand Buffer* (Invitrogen), 3 µl de DTT 0,1 M, 1,5 µl de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP 16 mM i dCTP 100 µM), 5 pl de [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] CTP 10 µCi/ml i 1 µl de

transcriptasa reversa, *SuperScript™ II RT* (200 Us/μl, Invitrogen). La reacció s'incuba durant 1 hora a 43°C i s'atura afegint 1 μl d'EDTA 0,5 M.

IV. Per a separar els nucleòtids no incorporats del cDNA marcat s'utilitzen columnes *ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant.

## 6.5.- Hibridació de les membranes de niló

Els macroxips de DNA van ser fabricats per la secció de Xips de DNA-S.C.S.I.I de la Universitat de València. Els filtres utilitzats són membranes de niló carregades positivament (Amersham Hybond™ N+) sobre les quals es dipositen sondes de DNA bicatenàries utilitzant el robot de fabricació de xips BioGrid™ (BioRobotics). El macroxip és una versió modificada de la descrita en Alberola *et al.*, 2004, (la informació de les versions actuals es troba en el web <http://scsie.uv.es/chipsdna/>). El nombre de posicions que contenen aquests macroxips és de 6.144; contenen sondes de 6.020 ORFs del genoma d'*S. cerevisiae* (productes de PCR de la ORF completa), 12 controls positius (DNA genòmic d'*S. cerevisiae*), 8 rèpliques d'una regió de rDNA 18S i 8 del rDNA 25S, 4 sondes de tRNAY, 4 sondes de *SCR1*, 15 sondes de clons de *Bacillus subtilis* i 73 posicions buides.

En aquest treball s'han utilitzat 12 macroxips de llevat, 6 per a l'experiment de GRO d'estrès tèrmic i 6 per al d'estrès oxidatiu, realitzant-se tres rèpliques de cada experiment. Cada macroxip s'ha utilitzat sis vegades, tres per a mostres de *Run-on* i tres per a mostres de cDNA, per a les mostres agafades en tres temps diferents de la cinètica. Les mostres de *Run-on* i de cDNA per a un temps determinat s'han hibridat al mateix macroxip, realitzant-se entre ambdues hibridacions un rentat per a l'eliminació de la radioactivitat. D'aquesta manera, les dades de TR i quantitat d'mRNA (RA) són comparables per a un mateix gen, en un temps concret.

La hibridació de les mostres de GRO es realitza de la manera següent:

I. Els macroxips es prehibriden durant 1 hora amb SSC 5x, *Denhart's* 5x (0,5% BSA, 0,5% Ficoll, 0,5% PVP), SDS 0,5%, ssDNA 100 μg/ml.

II. Després s'hibriden amb 5 ml de la solució anterior juntament amb l'RNA marcat amb el protocol *Run-On* o el cDNA obtingut a partir de l'RNA total, entre 40 i 48 hores, a 65°C.

III. Transcorregut el temps d'hibridació, els filtres es renten, per a eliminar la sonda no unida, una vegada en 2x SSC, 0,1% SDS, durant 20 minuts i dues vegades en 0,2x SSC, 0,1% SDS, durant 30 minuts.

IV. Finalment, es segellen les membranes amb plàstic fi i s'exposen en una pantalla *Imaging Plate* (BAS-MP, Fujifilm).

V. Les pantalles es llegeixen amb un escàner *Fujifilm FLA3000T Phosphorimager*.

VI. Després de cada hibridació, les membranes es renten amb una solució que conté fosfat sòdic 5 mM pH 7,5 i SDS 0,1% per a eliminar la radioactivitat dels filtres. Aquests rentats es fan en tres passos

consecutius en els quals s'afegeix la solució bullint sobre les membranes i es manté durant 10 minuts en agitació.

## 6.6.- Quantificació dels senyals d'hibridació de *Run-on* i cDNA

Per a quantificar les intensitats de cada punt del macroxip s'utilitza el programa d'anàlisi d'imatge *Array Vision*<sup>TM</sup>. Amb aquest programa s'obté (i) les dades crues *ARM Density* (Artifact-removed density) calculades com la mitjana dels píxels de cada punt en funció de l'àrea, i (ii) les dades corregides *ARM Density* (background-corrected ARM density).

Les dades obtingudes per l'experiment de GRO d'estrès oxidatiu estan dipositades en la base de dades GEO (Barrett *et al*, 2007) a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/> amb el número d'accés per tot l'experiment GSE9645 (per les dades d'RA) i GSE9663 (per les dades de TR).

## 6.7.- Normalització de les dades obtingudes mitjançant la tècnica de GRO

Per tal d'eliminar les diferències en intensitats en els senyals de TR i RA obtinguts de les hibridacions dels macroxips, que són degudes a diferents quantitats de sondes de DNA dipositades en el filtre durant la seva fabricació, es fa una primera normalització de les dades utilitzant les relacions d'intensitats de la hibridació dels macroxips amb el DNA genòmic.

Per fer-ho es marca radioactivament DNA genòmic (a partir d'1 µg d'aquest dissolt en un volum total de 46 µl) es desnaturalitza amb una incubació de 5 minuts a 95°C i després es manté en gel. El seu marcatge es realitza amb  $\alpha^{33}\text{P}[\text{dCTP}]$  emprant el kit *Ready-to-Go* (Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant. Per a separar el DNA marcat dels nucleòtids no incorporats s'utilitzen les columnes *ProbeQuant*<sup>TM</sup> *G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences) tal i com proposa el fabricant.

### 6.7.1.- Normalització de les dades de cDNA

La normalització de la hibridació de cDNA es realitza per cada rèplica de l'experiment mitjançant el procediment de mitjana global. El factor de correcció per normalitzar les dades entre experiments es calcula a partir dels valors mitjans globals de les mostres de  $t_0$ . La reproductibilitat de les rèpliques es prova amb el programari *ArrayStat* (Imaging Research, Inc), considerant independents les dades i permetent que el programa consideri un nombre mínim de dues repeticions vàlides per a calcular els valors promig per a cada gen (només a una de les tres repeticions se li permet ser un valor atípic extraïble). Els valors promig de cDNA per a cada gen, finalment, són corregits pel percentatge de residus de guanina en cada sonda, ja que el marcatge es realitza amb dCTP i es marca la cadena complementària.

La normalització entre els punts de mostreig es fa emprant la quantitat d'mRNA per cèl·lula per obtenir el nombre de còpies d'mRNA per cèl·lula per a cada gen en cada punt del temps. Aquests valors s'utilitzen per a l'anàlisi d'agrupament i comparacions.

### 6.7.2.- Normalitzacions de les dades de TR

Per a la normalització de les hibridacions del GRO se segueix una estratègia diferent. En primer lloc, es mesura la transcripció total per cèl·lula mesurant les dpm totals de l'RNA marcat radioactivament després de la seva extracció *in vivo*. La quantificació de l'RNA extret permet estimar la transcripció total per cèl·lula. Per a cada temps, s'estima (i) la  $TR_I$  (TR, de la RNA Pol I) considerant els 16 senyals de les sondes específiques (vuit per a les regions 18 S i vuit per a les 25 S), i (ii)  $TR_{II}$  (TR, de la Pol II) tenint en compte el conjunt dels senyals (5.950 sondes per al transcrits de l'RNA Pol II) en cada hibridació.

Per a l'experiment d'estrès oxidatiu, es considera que, com ja és sabut, en el  $t_0$  (del creixement exponencial en YPD) la relació entre la  $TR_I$  i la  $TR_{II}$  és de 2 aproximadament (Warner, 1999) i la transcripció total estimada és la suma de la contribució d'aquestes dues polimerases; és possible determinar el factor de correcció que compleix amb aquestes condicions. Aquest factor s'aplica a les TRs crues per a cada punt de mostreig. Això permet normalitzar els senyals bruts d'hibridació obtinguts per les sondes dels transcrits de l'RNA Pol II. La validació estadística de les rèpliques es realitza com en els valors de cDNA. Després d'això, els valors mitjans de TR per a cada gen, finalment, són corregits pel percentatge de residus d'uracil present en cada sonda. Una vegada més, els valors promig corregits s'utilitzen per a l'anàlisi d'agrupament i comparacions.

## 7.- Càlculs de la constant de degradació o $k_D$

Per al càlcul de la  $k_D$ , els nivells d'RA s'assumeix que estan en un estat d'equilibri constant, en l'aparició de l'estrès. Per tant, la  $k_D$  inicial (d'estat d'equilibri) es calcula com la proporció dels valors de TR a RA determinats en el  $t_0$ . Després de l'estrès, quan es perden (suposadament) les condicions d'estat d'equilibri, les TDs s'infereixen dels valors experimentals de TR i RA facilitades per la tècnica GRO en la cinètica d'estrès al llarg del temps. Suposant una variació lineal de TR entre els valors determinats experimentalment, s'ha demostrat la següent relació entre TR, RA, i  $k_D$  (Perez-Ortin *et al*, 2007)

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

$RA_1$  i  $RA_2$  són valors determinats experimentalment en els punts de temps successius  $t_1$  i  $t_2$ . En resoldre numèricament la  $k_D$  (utilitzant un algoritme de bisecció escrit com a Aplicació per a Visual Basic (VBA) en un full de càlcul de Microsoft Excel) en l'equació anterior, s'obté un valor mitjà de  $k_D$  per a l'interval de temps entre  $t_1$  i  $t_2$ . D'aquesta manera es calculen tots els valors absoluts de les desviacions de les  $k_D$  respecte al valor inicial ( $t_0$ ).

## 8.- Anàlisi informàtic de dades

### 8.1.- Anàlisi estadística de les dades de TR i RA

Una vegada es duen a terme totes les normalitzacions, es realitza una anàlisi estadística de les dades utilitzant el programari *ArrayStat<sup>TM</sup>*. Aquest programa d'anàlisi avalua la reproductibilitat de les rèpliques, eliminant les dades disperses en funció del valor estadístic MAD (*Median Absolute Deviation*) i proporciona per a aquells gens en els quals hi ha 2 o 3 valors suficientment repetitius un valor estadístic promig.

### 8.2.- Agrupament dels gens per patrons de perfils d'expressió

Per tal d'agrupar els gens segons el seu perfil d'expressió s'utilitza el servidor WEB: *Gene Expression Pattern Analysis Suite v3.0 (GEPAS)* (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) (Montaner *et al*, 2006). Les dades de TR, RA i  $k_D$  es transfereixen al servidor de *SOTA tree* (Herrero *et al*, 2001) emprant el coeficient de correlació lineal com a distància entre gens per a establir els grups segons les similituds dels perfils.

### 8.3.- Cerca de grups funcionals

L'assignació de categories funcionals es realitza mitjançant les eines de cerca d'enriquiment de categories funcionals *FuncAssociate* (<http://flama.med.harvard.edu/Software.html>) (Berriz *et al*, 2003) i *Funspec* (<http://funspec.med.utoronto.ca/>) (Robinson *et al*, 2002): aquestes eines proporcionen, a partir d'una llista de gens, les categories funcionals que estan enriquides en la llista i calculen la probabilitat que l'enriquiment sigui per l'atzar utilitzant el test exacte de Fisher d'una cua. Aquest servidor utilitza un enfocament de simulació de Monte Carlo i només accepta categories importants d'acord amb el seu valor  $p$  ajustat (calculat a partir de la fracció de 1.000 simulacions sota la hipòtesi nul·la amb un valor  $p$  igual o inferior i després de la correcció de múltiples test simultanis). Només es consideren significatives les categories funcionals segons *Gene Ontology (GO)* amb un valor  $p$  ajustat per sota de 0,05.

### 8.4.- Cerca de motius en les seqüències 3'UTR i 5'UTR

Aquesta cerca es realitza mitjançant el conjunt de programes RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tools*) accessibles en <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> de la següent manera: (i) s'utilitza l'eina *Retrieve sequence* per a obtenir la seqüència dels gens d'interès i (ii) l'eina *Pattern matching: DNA-pattern* per cercar motius específics.

## **8.5.- Cerca d'associacions reguladores entre gens i factors transcripcionals**

Les cerques es fan emprant la base de dades YEASTRACT (*Yeast Search for Transcriptional Regulators i Consensus Tracking*) (van Helden, 2003) en [www.yeasttract.com](http://www.yeasttract.com). Aquest web permet distingir entre possibles llocs diana de factors de transcripció i, també, posseeix dades d'associacions reguladores en gens de llevat de més de 1.000 referències bibliogràfiques (les evidències documentades de regulació són, o bé mitjançant l'associació del factor transcripcional al promotor del gen diana, o bé mitjançant canvis en l'expressió del gen diana a causa de la deleció del gen que codifica per al factor transcripcional). Per tant, es poden fer cerques potencials i documentades.



## **IV. RESULTATS**





## **1a PART**

**Anàlisi de la resposta transcripcional d'*S. cerevisiae* en resposta a l'estrès tèrmic**

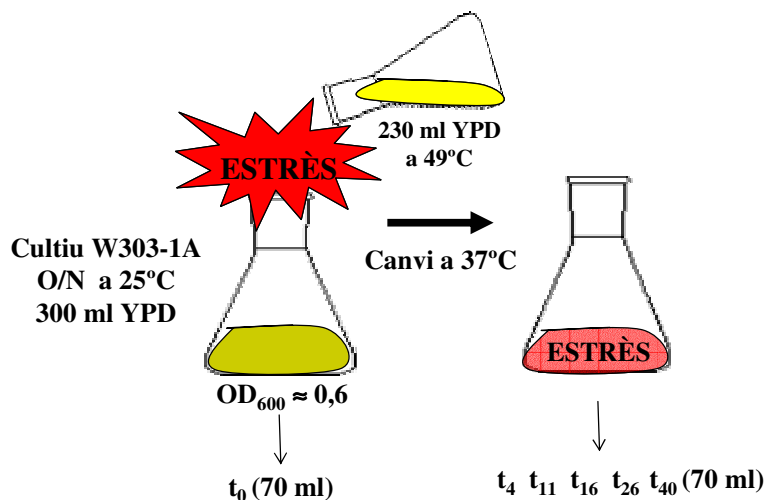


Els experiments d'estrès tèrmic que hem aplicat en els nostres estudis consisteixen en canviar bruscament la temperatura d'un cultiu de cèl·lules d'*S. cerevisiae* en creixement exponencial, de 25°C a 37°C. S'escull un estrès moderat per a minimitzar l'afectació indesitjable d'aturada del cicle cel·lular (Rowley *et al*, 1993), que podria pertorbar els efectes directes del xoc de calor en la transcripció general i l'estabilitat de l'mRNA. Així, doncs, s'empren condicions d'estrès lleu que afecten mínimament al creixement però que indueixen l'expressió dels gens que participen en la resposta a xoc tèrmic.

## 1.1.- Anàlisi de la resposta a estrès tèrmic mitjançant la tècnica de GRO

### 1.1.1.- Disseny experimental per a l'estudi de la resposta a l'estrès tèrmic moderat

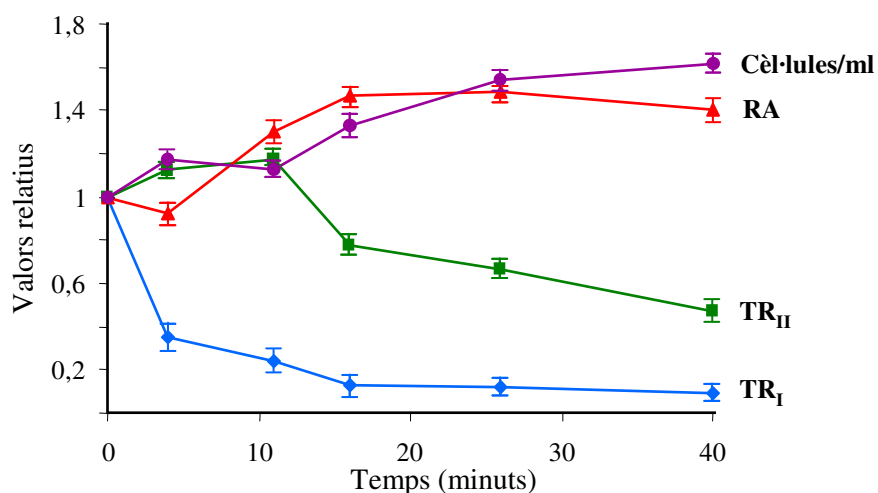
Per a dur a terme l'experiment de GRO que ens permet saber en paral·lel la taxa de transcripció (TR) i els nivells d'mRNAs totals (RA) en resposta a l'estrès tèrmic, s'agafen dues alíquotes de cada mostra del cultiu en diferents temps al llarg de l'estrès. D'aquesta manera, una d'elles serveix per determinar la TR i l'altra per quantificar l'RA. Es parteix d'un cultiu exponencial creixent a 25°C (a una OD d'aproximadament 0,6), s'agafa la primera mostra (temps 0) i immediatament s'afegeix el mateix volum de medi calent (a 49°C) per passar el cultiu a 37°C al més ràpid possible, canviant aquest a un incubador a aquesta temperatura. Seguidament es realitza la cinètica d'estrès tèrmic, que consisteix en agafar alíquotes de cultiu als temps que es mostren en la figura que hi ha a continuació.



**Il·lustració 9.** Disseny experimental de la presa de mostres per l'anàlisi GRO en resposta a l'estrès tèrmic. Es parteix d'un cultiu exponencial a 25°C i després de recollir la mostra del temps inicial es procedeix al canvi de temperatura, addicionant el mateix volum de cultiu a 49°C. S'agafen alíquotes de cultiu als 4, 11, 16, 26 i 40 minuts després de l'estrès.

### 1.1.2.- Efecte general de l'estrès tèrmic moderat en els paràmetres de transcripció

Les dades obtingudes en resposta a l'estrès tèrmic moderat descrit mostren un increment sobtat de l'mRNA poli(A) des dels 5 als 20 primers minuts de l'estrès. Es tracta d'una pujada lleugerament més ràpida que la de la taxa de proliferació cel·lular, i que manté el nivell assolit al llarg de l'experiment (Il·lustració 10). La transcripció de l'RNA Pol II augmenta suaument en els moments inicials, un efecte també observat després del canvi de font de carboni (Garcia-Martinez *et al*, 2004), per disminuir gradualment en els últims minuts i arribar a nivells fins i tot inferiors als de  $t_0$ . D'altra banda, la  $TR_I$  disminueix bruscament amb l'estrès. La comparació de la cinètica dels nivells d'mRNA i de la transcripció dependent de l'RNA Pol II en resposta al xoc tèrmic suggereix que hi ha una estabilització generalitzada dels mRNAs, després d'una ràpida desestabilització inicial.

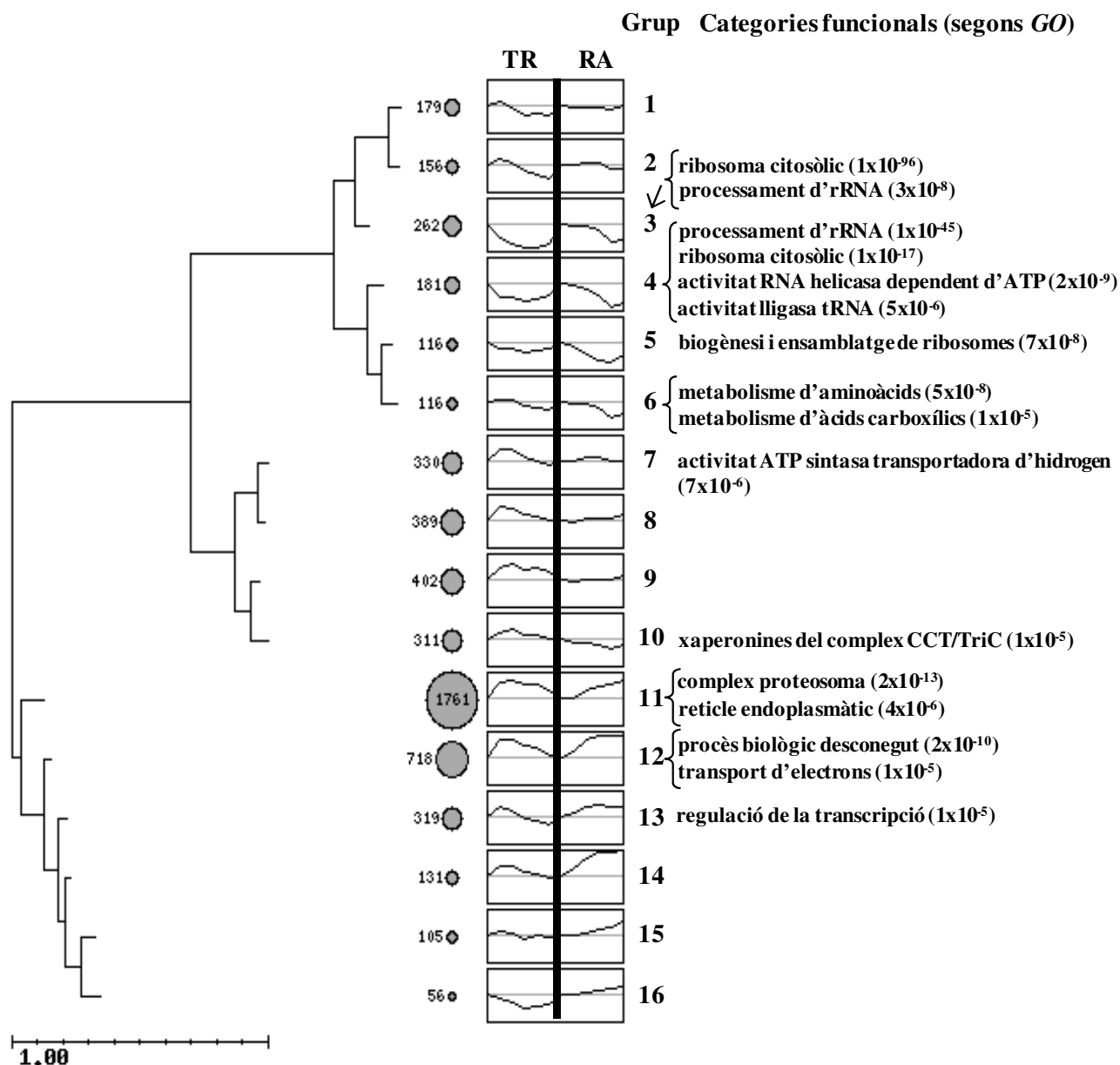


**Il·lustració 10.** Valors de diferents paràmetres transcripcionals en resposta a l'estrès tèrmic. Variació del nombre de cèl·lules, quantitat d'mRNA (RA),  $TR_I$  i  $TR_{II}$ , respecte al temps 0 al llarg de l'estrès tèrmic. Les barres representen la desviació estàndard per  $n=3$ .

### 1.1.3.- Efecte del xoc tèrmic moderat en els nivells d'mRNA i les taxes de transcripció

Amb aquesta aplicació experimental (realitzada per triplicat) es determinen els valors de TR i RA per a cada gen d'*S. cerevisiae* durant l'estrès. Els senyals obtinguts per a tots dos paràmetres es normalitzen amb una hibridació de DNA genòmic, per permetre una comparació completa dels valors obtinguts per als gens individuals. Per a fer l'anàlisi d'agrupació s'utilitzen les dues dades (TR i RA). Primerament, es fan les mitjanes dels valors d'intensitat dels tres experiments independents. Després, es relativitzen respecte el  $t_0$  per a evitar diferències d'escala en els dos conjunts de dades. Per tant, en el  $t_0$  TR i RA tenen un valor 0 en l'escala logarítmica. Es prossegueix representant gràficament els valors resultants. Els perfils d'un total de 12 punts reflecteixen la variació de la TR (els primers 6 punts) i la modulació d'RA (en els últims 6 punts) al llarg de l'estrès. Finalment, les cinètiques de TR i RA resultants per a cada gen s'agrupen tenint en compte els criteris de similitud establerts en el programa bioinformàtic utilitzat. La informació tractada *in*

*silico* es representa en forma d'arbre amb 16 perfils mitjana que resumeixen el comportament del transcriptoma d'*S. cerevisiae* en resposta a l'estrès tèrmic moderat, tal i com es pot observar en la següent il·lustració.



**Il·lustració 11.** Agrupació dels gens d'*S. cerevisiae* per homologia en els patrons d'expressió durant l'estrès tèrmic moderat. A l'esquerra, es mostra el desglossament dels grups en dues grans branques, la primera dividida en dues subbranques. Seguidament, el nombre de gens que configura cadascun dels 16 grups. A continuació el patró de TR i RA amb que es comporten de mitjana cada grup de gens arran de l'estrès tèrmic; entre l'últim punt de la TR i el  $t_0$  de l'RA hi ha un valor irreal que es representa amb una barra negra vertical. Les ordenades són en escala logarítmica i la línia horitzontal de cada una marca el nivell zero. A la dreta, les categories funcionals més

## Resultats

significatives (amb un valor  $p \leq 5 \times 10^{-5}$ ) segons *Gene Ontology (GO)* amb les quals s'enriqueixen alguns grups. La barra d'escala a baix a l'esquerra marca la distància entre els perfils dels grups.

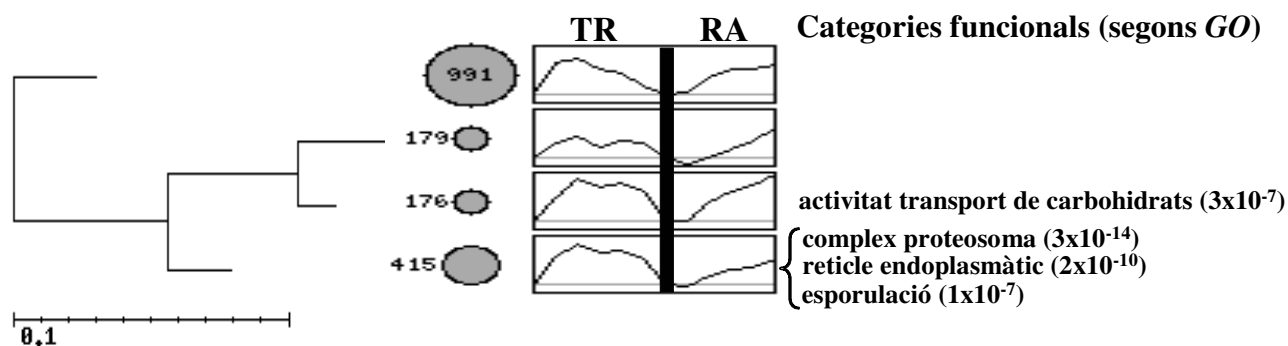
L'arbre que agrupa els perfils per homologies mostra una branca principal (conté els grups de l'1 al 10) que inclou 2.442 gens (un 45% del total), i que està subdividida en dues subbranques.

(i) La primera (grups 1-6), inclou els gens que mostren una disminució en els nivells de TR al llarg del temps, seguit en la majoria dels casos per una disminució en l'RA. Per tant, corresponen a les categories de gens reprimits durant un estrès tèrmic. Els gens en aquesta subbranca (un 19% del total) es troben homogèniament distribuïts entre els 6 grups. El comportament més diferent s'aprecia en els grups 1 i 2, on un augment inicial lleuger de la TR és seguit per una disminució sostinguda d'aquest paràmetre, mentre que l'RA no canvia significativament al llarg de l'experiment. Això apunta a l'estabilització d'aquests mRNA en els darrers minuts de l'estrès. Els grups 3 i 4 contenen un major nombre de gens i les seves TR es reprimeixen fortament al llarg de tot l'estrès. Els seus RA ho fan també intensament, però no de manera tant immediata com la TR. Així, doncs, sembla que la TD contribuiria a la repressió dels nivells d'mRNA sobretot a temps tardans. En els grups 5 i 6 la TR disminueix molt poc i l'RA ho fa en major grau i de manera continuada (sobretot en el cas del grup 5) començant a recuperar-se en els darrers minuts de l'estrès, fet que apunta a la desestabilització dels mRNAs, sobretot en el grup 5.

(ii) La segona subbranca de la part superior de l'arbre (engloba els grups 7-10) consta del 26% dels gens totals) i té un comportament diferent. La TR augmenta temporalment i moderada, mentre que l'RA gairebé no canvia en la majoria dels casos (grups del 7 al 9) o fins i tot disminueix (grup 10). Per tant, hi ha una inducció transitòria de l'expressió d'aquests gens en els primers minuts de l'estrès, fet que no es tradueix en incrementar el nivell d'mRNA. Això suggereix uns efectes forts de desestabilització.

La part inferior de l'arbre (grups de l'11 al 16) està clarament dividida en branques separades. En tots els casos, hi ha un augment en l'RA, que en la majoria dels casos s'acompanya d'una inducció més o menys sostinguda de la TR. (i) L'excepció són els grups 15 i 16, una minoria del genoma (161 gens) on la TR roman constant (grup 15) o disminueix (grup 16), mentre que puja l'RA, suggerint efectes de forta estabilització dels seus mRNAs. En la resta, els grups de l'11 al 14 destaquen per tenir una inducció clara de la TR. (ii) Aquest pic d'inducció és més discret i transitori en els grups 13 i 14. En el cas del grup 13 la pujada de l'RA també té les mateixes característiques, però pel que fa al grup 14, l'RA incrementa en major proporció i de manera sostinguda en el temps. (iii) Notablement, els grups 11 i 12 (que agrupen el 45% del total dels gens analitzats en aquest estudi) tenen un comportament bastant paral·lel entre la TR i l'RA. Malgrat això, tot i la forta inducció de la TR arran de l'estrès, l'RA del grup 11 augmenta de manera sostinguda, però amb retard (hi ha una desestabilització, seguida d'una estabilització) i, en el cas del grup 12, hi ha un increment més fort i immediat (una estabilització). Aquestes diferències apunten a certes divergències en l'estabilitat de l'mRNA causades pel xoc tèrmic. Una anàlisi d'agrupament posterior, restringit als 1.761 gens del grup 11 el divideix en quatre subgrups, on es pot veure que el pic de TR es

limita als 40 minuts de l'estrès en els quatre casos. L'RA augmenta lentament i encara no està recuperat al final de la cinètica. S'observa que la inducció d'RA en el segon grup (179 gens) és més moderada i en el tercer grup s'endarrereix lleugerament, tot i que arriba a assolir nivells molt més alts.



**Il·lustració 12.** Grup 11 desglossat. Vegeu la Il·lustració 11.

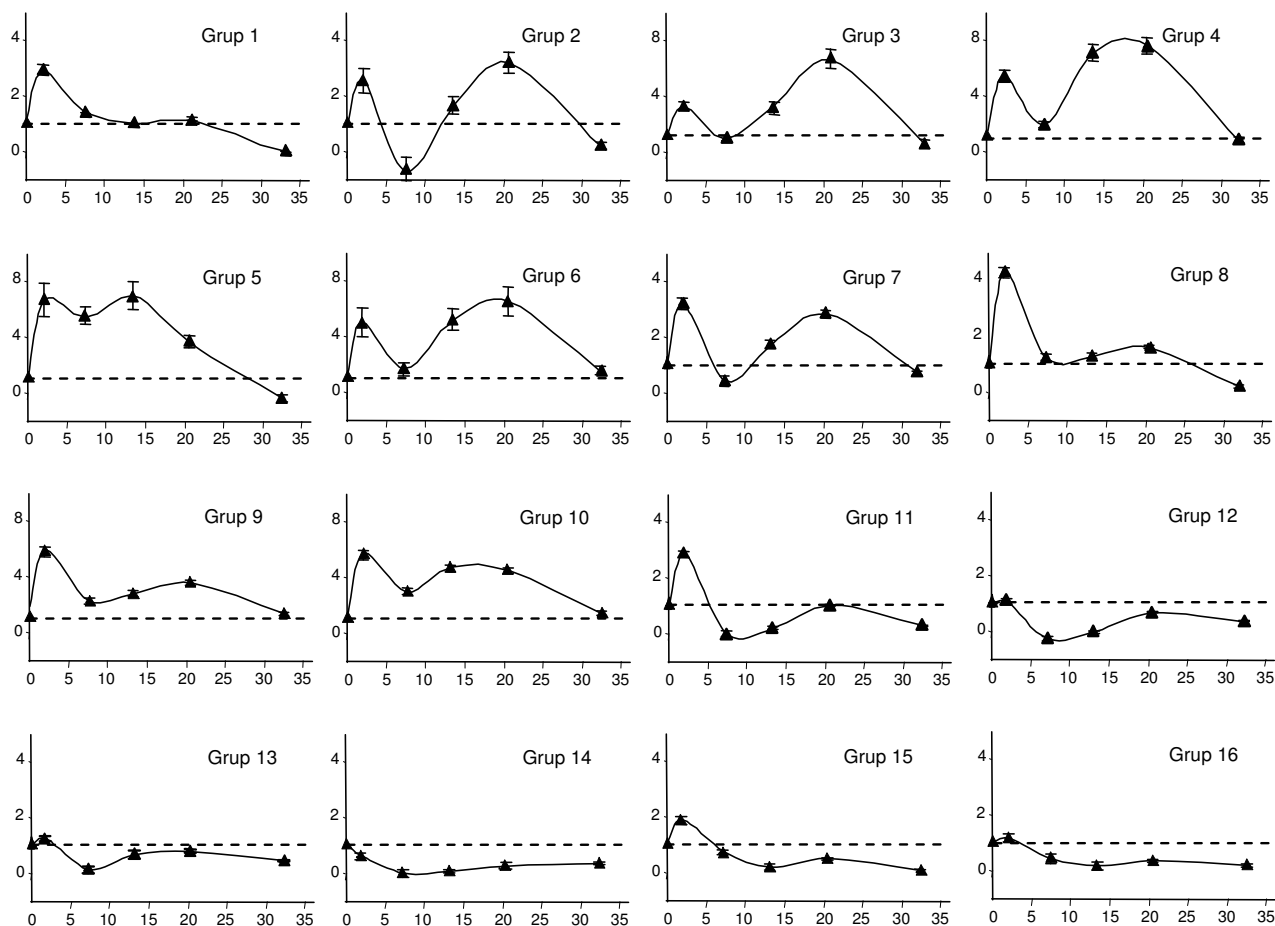
#### 1.1.4.- Efecte del xoc tèrmic en l'estabilitat dels mRNAs

Un cop obtingudes les cinètiques d'evolució de TR i RA de cada gen pels procediments de GRO, es pot inferir la taxa de degradació (TD) comparant la TR i els nivells d'mRNA al llarg del temps. Per estimar la constant de degradació de primer ordre de l'mRNA ( $k_D$ ), que indica una mesura de la inestabilitat de l'mRNA, s'apliquen els valors absoluts de TR i RA a una aproximació matemàtica dissenyada per a situacions dinàmiques, ja que es considera que aquests dos paràmetres no estan en estat d'equilibri després de l'estrès (Perez-Ortin *et al.*, 2007). Per tant, l'aproximació matemàtica es basa en integrar les equacions cinètiques entre dos punts consecutius en el temps de resposta a l'estrès assumint un comportament lineal de la TR durant l'interval.

La  $k_D$  es calcula a partir dels valors absoluts de TR i RA, els quals han de ser determinats per comparació de conjunts de dades externes, de manera que l'error associat pot ésser amplificat amb la manipulació matemàtica. Els valors obtinguts de  $k_D$  individuals de cada gen tenen probablement massa soroll per poder investigar-los més profundament. No obstant, la nostra anàlisi demostra que els gens relacionats funcionalment segueixen comportaments similars en les TR, els RA i també en els perfils d'estabilitat de l'mRNA. En conseqüència, s'utilitzen els perfils mitjans de l'agrupació de gens per descriure l'evolució de l'estabilitat de l'mRNA. Les dades mitjanes de cadascun dels 16 grups es mostren en la Il·lustració 13. Cal destacar que els valors de  $k_D$  representats són relatius al valor inicial (el qual s'assumeix en estat d'equilibri). Així, els valors de  $k_D$  majors d'1 indiquen que l'mRNA corresponent es desestabilitza i els valors menors d'1 són indicatius d'efectes d'estabilització en l'mRNA.



## Resultats



**Il·lustració 13.** Perfils de TD dels 16 grups resultants en resposta a l'estrès tèrmic. En els eixos d'ordenades s'hi representen els valors relatius de  $k_D$  respecte el valor de  $t_0$  i en els eixos d'abscisses el temps en minuts al llarg de l'estrès tèrmic. Les gràfiques representen la mitjana de les  $k_D$  de tots els gens d'un grup determinat. Les barres representen l'error estàndard de cada punt.

Tots els grups mostren una  $k_D$  alterada arran de l'estrès, però en general i malgrat les diferències, tendeixen a tornar a valors similars als inicials o inclús inferiors. La característica més remarcable és l'augment immediat de  $k_D$  que pateixen tots els grups en els primers minuts del xoc tèrmic (a excepció del grup 14). Així doncs, sembla que l'estrès per calor pot causar una desestabilització inicial sobtada i general dels mRNAs. Aquest fet s'evidencia en la disminució dels nivells d'mRNA totals durant els 4 primers minuts de l'experiment (Il·lustració 10) en grups de la part superior de l'arbre de la Il·lustració 11 (grups 1 a 10) i en l'anàlisi feta del grup 11 (Il·lustració 12). Malgrat aquesta homogeneïtat en la resposta en front un estrès tèrmic, hi ha diferències notables entre els grups quan es considera el perfil complet de la resposta.

Globalment, les cinètiques de  $k_D$  dels grups de l'1 al 10 mostren valors majors a la unitat. Per tant, els mRNAs dels gens inclosos en aquests grups pateixen una desestabilització arran d'un xoc tèrmic. Pel que fa al grup 1 el valor de  $k_D$  disminueix ràpidament, després de l'augment transitori inicial, arribant a valors inferiors a 1. De manera que es confirma la predicció d'estabilització d'aquests mRNAs en la

Il·lustració 11. En canvi, en els grups del 2 al 10 el valor de  $k_D$  continua essent superior a 1 en la majoria dels punts del seu perfil. Aquest increment és especialment sostingut en el grup 5, durant els primers 20 minuts del xoc tèrmic. Aquesta predicció en la desestabilització de l'mRNA prediu que (i) l'RA minva més intensament del que es podria esperar basant-se tan sols en la disminució de la TR (pels grups 2-6) o que (ii) la cinètica d'RA no augmenta de manera paral·lela a l'augment transitori de TR (pels grups 7-10).

No obstant, els patrons de  $k_D$  en els grups de l'11 al 16 (un 66% dels gens) mostren un comportament oposat. La disminució més o menys sostinguda d'aquest valor assenyalava efectes d'estabilització de l'mRNA. Aquesta estabilització pot contribuir a l'increment d'RA en aquests grups arran de l'estrès. Pel que fa als grups 15 i 16 l'efecte d'estabilització de l'mRNA seria l'únic responsable de l'augment de l'RA, mentre que en el grup 14 se sumaria a l'increment modest de TR, resultant en la inducció significativa d'RA observada. En el cas del grup 11, la pujada inicial de  $k_D$  reflecteix el retard inicial en l'augment de l'RA comparat amb el perfil d'RA del grup 12 (Il·lustració 11).

Tenint en compte que la majoria dels gens analitzats en aquest estudi s'inclouen dins dels grups de l'11 al 16, la predicció de l'estabilitat de l'mRNA que resulta dels perfils de  $k_D$  concorden amb la estabilització general, posterior a la desestabilització inicial que es mostra en la Il·lustració 10, on tot i la disminució de la TR, l'RA augmenta al llarg de l'estrès.

### **1.1.5.- Les categories funcionals associades a la classificació en grups arran l'estrès tèrmic.**

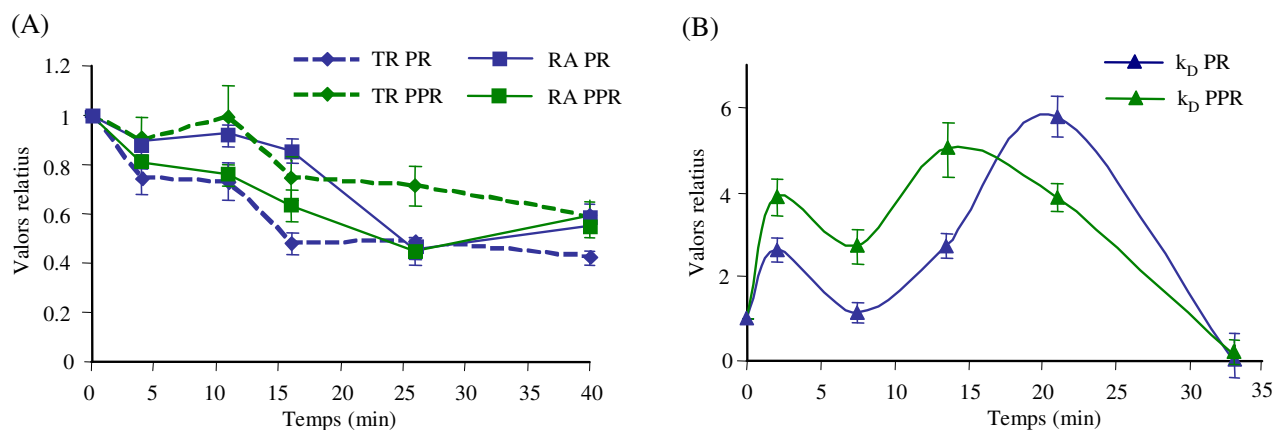
En general, l'mRNA dels gens relacionats funcionalment tendeixen a tenir un comportament semblant quan se sotmeten a canvis ambientals (Gasch, 2003; Wu *et al*, 2002). En la Il·lustració 11 apareixen les categories funcionals més significatives d'alguns dels grups. Com s'ha comentat anteriorment, en la primera sub branca la repressió de l'RA està precedida per una disminució general de la TR i s'inclouen els grups 1-6. Aquests inclouen majoritàriament gens relacionats amb la biosíntesi i ensamblatge de ribosomes i el processament d'rRNA, amb les categories funcionals segons GO de "Ribosoma citosòlic" i "processament d'rRNA" (grup 3 i 4), i "Biogènesi i Ensamblatge de Ribosomes" (grup 5); també s'inclou el metabolisme de biomolècules, amb les categories "Metabolisme d'Aminoàcids" i "Metabolisme d'Àcids Carboxílics" (grups 6) i altres activitats "Activitat RNA helicasa dependent d'ATP" i "Activitat Lligasa tRNA" (grup 4). En la segona sub branca, la repressió de l'RA ve precedida per un augment transitori de TR i es prediu una desestabilització dels mRNAs d'aquests grups. Destaquen significativament les categories segons GO "Activitat ATP Sintasa Transportadora d'Hidrogen" i "Xaperonines del Complex CCT/TRiC".

## Resultats

La segona part de l'arbre no té una branca pròpiament definida perquè la distància entre els braços és molt curta. Tot i així, en aquesta part s'agrupen els gens amb RA induïda i estan enriquits amb categories funcionals *GO* que estan relacionades amb catabolisme, resposta a estímuls i transport d'electrons: “Complex Proteosoma” i “Reticle Endoplasmàtic” (grup 11), “Transport d'Electrons” (grup 12) i “Regulació de la Transcripció” (grup 13).

S'analitzen 119 gens codificants per PR -la majoria d'ells en el grup 3 (70%) i 4 (24%) de la Il·lustració 11-, d'un mínim de dos experiments de GRO. En la il·lustració es mostra la mitjana dels valors obtinguts pels diferents paràmetres. S'observa que els nivells d'mRNA de les PRs cau a partir dels 10 minuts del canvi de temperatura, mostrant el valor més baix (al voltant del 50% respecte a les cèl·lules a 25°C) després dels 25 minuts de l'estrès. Els nivells de TR, però, mostren una disminució brusca abans dels 5 minuts a 37°C, per assolir valors al voltant del 45% respecte a les cèl·lules sense estrès. Aquests dos paràmetres no semblen recuperar-se en el transcurs de l'experiment. La determinació matemàtica de la  $k_D$  prediu la desestabilització d'aquests mRNAs als 10 minuts de l'estrès, amb un pic en el minut 20, fet que explicaria la forta disminució de l'mRNA en els últims minuts del canvi de temperatura.

De la mateixa manera s'estudien 108 gens codificants per a PPR distribuïts en els grups 3, 4 i 10 (Il·lustració 11). En aquesta categoria els valors d'RA disminueixen progressivament després del xoc tèrmic fins als 25 minuts de l'estrès. No obstant, les dades de TR baixen sobtadament i de manera immediata a l'estrès, però menys intensament que en el cas dels mRNAs de PR. Amb el càlcul de la TD es prediu que els mRNAs d'aquesta categoria funcional es desestabilitzen ràpidament després del xoc durant 20 minuts. Clarament, l'estrès tèrmic reprimeix els mRNAs d'aquestes dues categories *GO* involucrades en la biogènesi dels ribosomes. Tot i així, hi ha diferències en la modulació dels diversos processos del metabolisme de l'mRNA. En general, no només el descens de la TR, sinó també la desestabilització de l'mRNA contribueix en aquesta repressió.

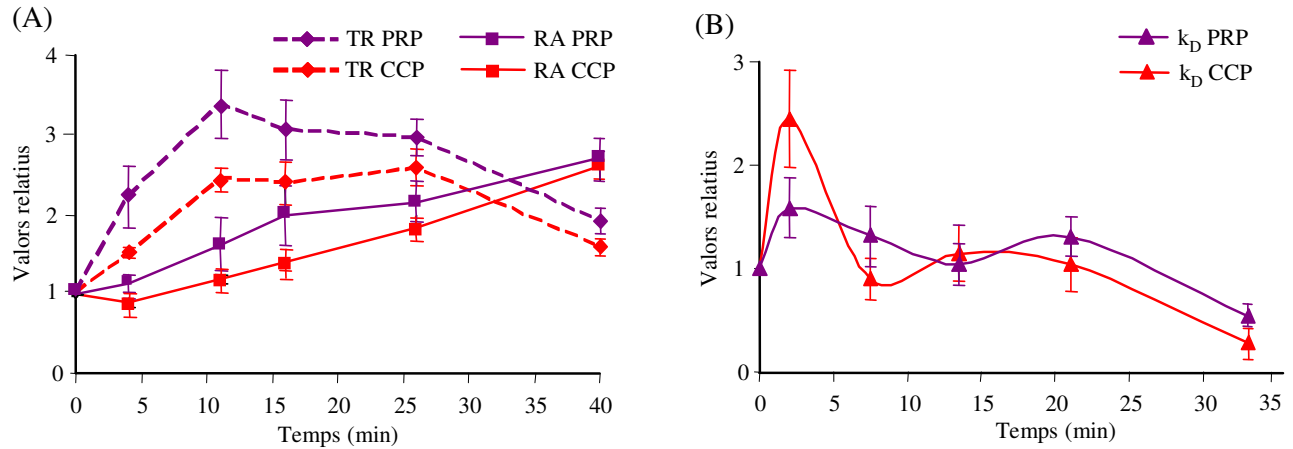


**Il·lustració 14.** Dades GRO per a les categories funcionals *GO* “Proteïnes Ribosomals” i de “Proteïnes del Processament de l'rRNA” en resposta a l'estrès tèrmic. (A) Representació dels valors mitjans de TR i RA i (B) TD de PR en blau i de PPR en verd.

La segona sub branca de la part superior de l'arbre de la II-lustració 11 engloba els grups del 7 al 10. Els gens corresponents a aquests grups es caracteritzen per la predicció d'una desestabilització en els seus transcrits, ja que aquests incrementen la seva TR, però no l'mRNA. Tenen poques categories funcional sobrerrepresentades. En el grup 7 s'hi troba "l'Activitat ATP Sintasa Transportadora d'Hidrogen" i en el 10 les "Xaperonines del Complex CCT/TRiC". En estendre la cerca, es troben associades al grup 8 la categoria de "Matriu Mitocondrial" (amb un valor  $p = 8,5 \times 10^{-5}$ ) i de la "Biosíntesi de Glicoproteïnes" (valor  $p = 2,4 \times 10^{-5}$ ) i "Via Secretora" (valor  $p = 2,7 \times 10^{-5}$ ) al grup 9. Aquestes categories tenen també membres repartits en altres grups sobretot en el grup 11. Així, doncs, en general, l'expressió d'aquests gens s'indueix a nivell de TR i alguns d'ells també a nivell d'RA, però d'altres no. Per tant, la desestabilització posttraduccional de l'mRNA d'aquests gens regula l'especificitat de la resposta a estrès tèrmic.

Un canvi a temperatures relativament altes pot danyar les estructures proteïques i conduir a l'acumulació de proteïnes mal plegades. A la vegada, les cèl·lules sotmeses a un xoc tèrmic expressen com a resposta adaptativa xaperones (Hartl i Hayer-Hartl, 2002), ubiquitina i enzims ubiquitinadors (Jentsch i Schlenker, 1995), que ajuden a prevenir l'agregació de proteïnes mal plegades (Goldberg, 2003; Medicherla i Goldberg, 2008). Els gens codificants pel complex del proteosoma són al grup 11, en la regió de gens induïts de l'arbre (II-lustració 11) durant un estrès tèrmic. En relació als gens d'aquesta categoria s'analitzen detalladament dues categories GO: el "Complex Central del Proteosoma" (CCP) (15 gens amb dades GRO) i la "Partícula Reguladora dels Proteosoma" (PRP) (amb 18 gens), tal i com es mostra en la II-lustració 15. Gairebé tots els gens es distribueixen entre els grups 11 i 12, la qual cosa indica un comportament regular en la transcripció dels components del proteosoma. Els valors mitjans de TR de les dues categories augmenten transitòriament després del xoc de calor i precedeixen l'increment dels RAs, els quals pugen lentament i constant al llarg de l'evolució de l'estrès. La TD matemàtica prediu una desestabilització inicial i una estabilització tardana dels mRNAs. D'aquesta manera, la TD modula la intensitat de la inducció dels gens de CCP i PRP, ja que l'augment dels nivells d'mRNA són el resultat de l'increment de la TR en els primers temps i una estabilització dels mRNAs a posteriori.

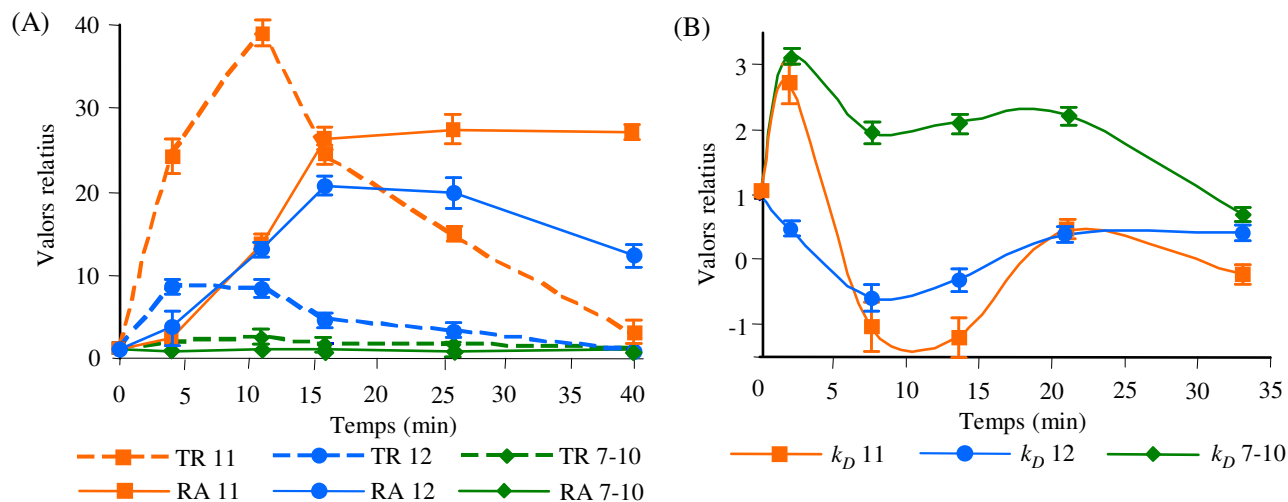
## Resultats



**Il·lustració 15.** Dades GRO per a les categories funcionals *GO* de la “Partícula Reguladora del Proteosoma” i del “Complex Central del Proteosoma” en resposta a l’estrès tèrmic. (A) Representació dels valors mitjans de TR i RA (B) TD de PRP en roig i de CCP en lila.

En la resposta en front a un xoc tèrmic també pren protagonisme la inducció de la via del replegament de proteïnes per la que es renaturalitzen les proteïnes mal plegades. En aquest procés algunes Hsps tenen un paper important (Riezman, 2004). Per tant, s’estudien 67 gens de la categoria *GO*: “Plegament de Proteïnes”. La majoria d’aquests gens tenen una TR i/o RA induïts arran de l’estrès per calor i s’inclouen en els grups 11 (23 gens), 12 (16 gens), entre els grups 7-10 (18 gens) i una minoria en la resta de grups, tal i com s’aprecia en la Il·lustració 16. Aquesta distribució implica una resposta força regular. Tot i així, es poden definir dos patrons molt diferents per a la inducció d’aquests gens. En els gens de les agrupacions 11 i 12, tant la TR, com l’RA augmenten en un xoc tèrmic, i l’increment de la TR precedeix al d’RA. A més, la regulació de la TR en el grup 11 és més intensa que en el grup 12. Això és acompanyat per una regulació positiva més sostinguda d’RA en el grup 11. No obstant això, en ambdós casos l’evolució dels valors de  $k_D$  després del xoc tèrmic prediu un efecte d’estabilització de l’*mRNA* al llarg de la major part del temps de l’experiment, que contribueix juntament amb l’augment de la TR en l’increment d’RA dels gens codificants per al plegament de proteïnes. En canvi, s’observa un patró diferent en la resposta en front a xoc tèrmic en els gens d’aquesta categoria funcional pertanyents als grups 7-10. Aquests gens mostren un augment molt modest de TR, que no és paral·lel a l’RA (el qual es manté constant al llarg de tot l’experiment), fet que assenyala una desestabilització sostinguda de l’*mRNA*. De fet, els valors predits de  $k_D$  continuen sent elevats i només tendeixen a recuperar els nivells basals a temps tardans. Per tant, es pot distingir entre dos grups principals de gens implicats en el plegament de les proteïnes en funció de la intensitat de la seva inducció, i de la contribució dels efectes d’estabilitat dels *mRNAs* en les divergències d’aquesta resposta. Com era d’esperar, la majoria dels gens codificants per Hsps implicats en el plegament de les proteïnes són al grup de gens induïts 11 i 12. De manera contrària, entre els gens codificants per proteïnes implicades en el plegament de polipèptids no induïts hi ha set membres del Complex TRiC,

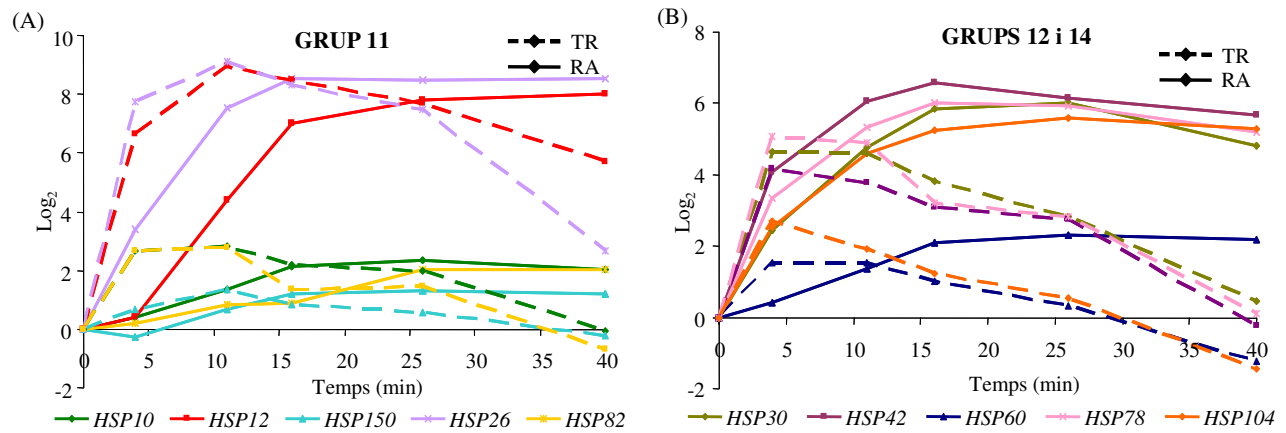
relacionat funcionalment amb la maquinària enzimàtica de síntesi de proteïnes (Etchells *et al*, 2005), i també *PIH1* (l'ORF YHR034c), que participa en el preprocessament d'rRNA (Gonzales *et al*, 2005).



**Il·lustració 16.** Dades GRO per a la categoria funcional *GO* de “Plegament de Proteïnes” en resposta a l’estrès tèrmic. Representació dels valors mitjans de TR i RA (part A) i TD (part B): mitjana dels gens en el grup 11 en taronja, mitjana dels gens del grup 12 en blau i mitjana dels gens inclosos en els grups 7-10 en verd.

Els gens codificants per les Hsps en resposta a aquest estrès induïxen els seus perfils de TR i també els d’RA, i es concentren en tres grups: l’11, el 12 i el 14. Tot i l’augment d’RA, aquests gens es classifiquen en dues agrupacions, pel que fa a criteris d’estabilitat: els gens pertanyents al grup 11, amb una desestabilització inicial i els gens del grup 12, juntament amb *HSP104* del grup 14. Seguidament es mostra la Il·lustració 17, amb els valors logarítmics dels paràmetres GRO, per poder igualar els valors dels paràmetres a comparar. En l’apartat (A) es representen la TR i l’RA dels gens Hsps inclosos en el grup 11. S’observen dues tendències al llarg del temps de resposta a estrès. En els primers moments de l’estrès, la inducció de TR és major i més ràpida que l’augment de l’RA (més lent i endarrerit). Per tant, aquests mRNAs es desestabilitzen immediatament després de l’estrès. A temps finals, però, tot i que la TR baixa, l’RA es manté alt. En l’apartat (B) es representen els paràmetres transcripcionals dels gens Hsps inclosos als grups 12 i 14. En aquest cas, les TRs s’indueixen de manera transitòria, però el seu creixement inicial ve acompanyat de manera paral·lela per l’augment d’RA. A més, passats els deu primers minuts de l’estrès, la TR cau més ràpidament que les TRs del grup 11 i l’RA segueix induïda. D’altra banda, els perfils de  $k_D$  de la Il·lustració 13 mostren com els mRNAs del grup 11 pateixen una desestabilització inicial important i els del grup 12 s’estabilitzen. En conclusió, la TD dels mRNAs codificants per Hsps modula els nivells d’mRNA, per una banda, endarrerint-ne la seva expressió i, per l’altra, prolongant-la al llarg de la resposta.

## Resultats



**Il·lustració 17.** Valors de TR i RA dels mRNAs codificants per Hsps durant estrès tèrmic. (A) Perfils de transcripció dels gens Hsps pertanyents al grup 11. (B) Patrons de transcripció dels gens Hsps inclosos en els grups 12 i 14.

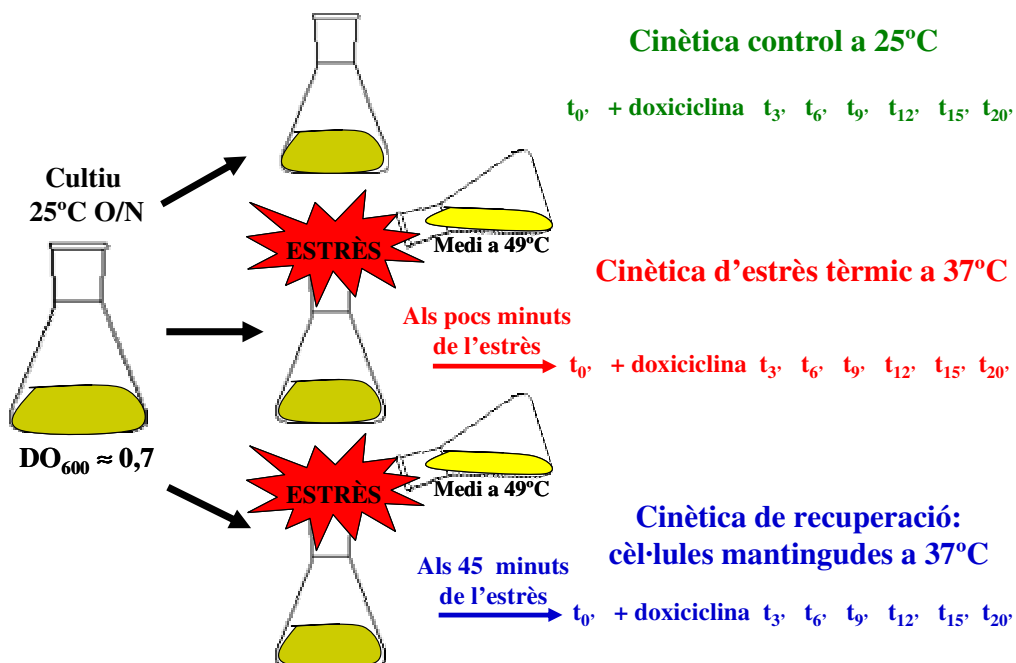
Una altra categoria funcional *GO* sobrerrepresentada en la segona subbranca principal (Il·lustració 11) que és interessant per a la resposta a estrès i que comparteix aquestes característiques (inducció de la TR i l'RA) és "Regulació de la Transcripció" (grup 13). La resposta a aquest estrès es caracteritza per una inducció de l'expressió dels gens (superats els primers minuts d'aturada) (Il·lustració 10), tot i que el comportament transcripcional dels membres d'aquesta categoria no presenta diferències quantitatives entre l'expressió de reguladors funcionalment negatius o positius.

### 1.2.- Determinació experimental de les vides mitjanes dels mRNA mitjançant l'ús del promotor *tet*

Amb l'objectiu de validar les prediccions matemàtiques de les TDs dels mRNAs, s'escullen alguns gens per a determinar experimentalment la cinètica d'estabilitat dels seus mRNAs. Amb aquesta finalitat, es substitueixen els promotors endògens dels gens pel promotor regulable per doxiciclina *tetO<sub>2</sub>* i s'analitzen les TDs en les soques resultants, mesurant els nivells de senyal dels mRNAs mitjançant la tècnica de Northern blot de les mostres recollides en una cinètica després de l'addició de doxiciclina. Les soques amb el promotor substituït també porten integrat el sistema dual activador (*tTA*)-repressor (*tetR-Ssn6*), gràcies al qual el tancament de l'expressió del gen a estudiar s'optimitza (Belli *et al*, 1998b).

## 1.2.1.- Disseny experimental per a l'estudi de l'estabilitat dels mRNAs en resposta a l'estrès tèrmic

Per a cada gen es determina la TD del seu mRNA just abans del xoc tèrmic i en dos moments diferents de l'estrès, segons els valors de  $k_D$  predits per l'algorisme matemàtic arran dels experiments GRO. El disseny experimental de la cinètica triple es mostra a continuació.



**Il·lustració 18.** Disseny experimental per a la determinació de la vida mitjana dels mRNAs en l'estrès tèrmic. Un total de tres cinètiques amb l'addició de doxiciclina a 10 µg/ml de concentració final a 25°C, als pocs minuts després de l'estrès tèrmic i als 45 minuts del canvi de temperatura (explicat en la Il·lustració 9).

## 1.2.2.- Determinació de les vides mitjanes dels mRNAs en resposta a l'estrès tèrmic

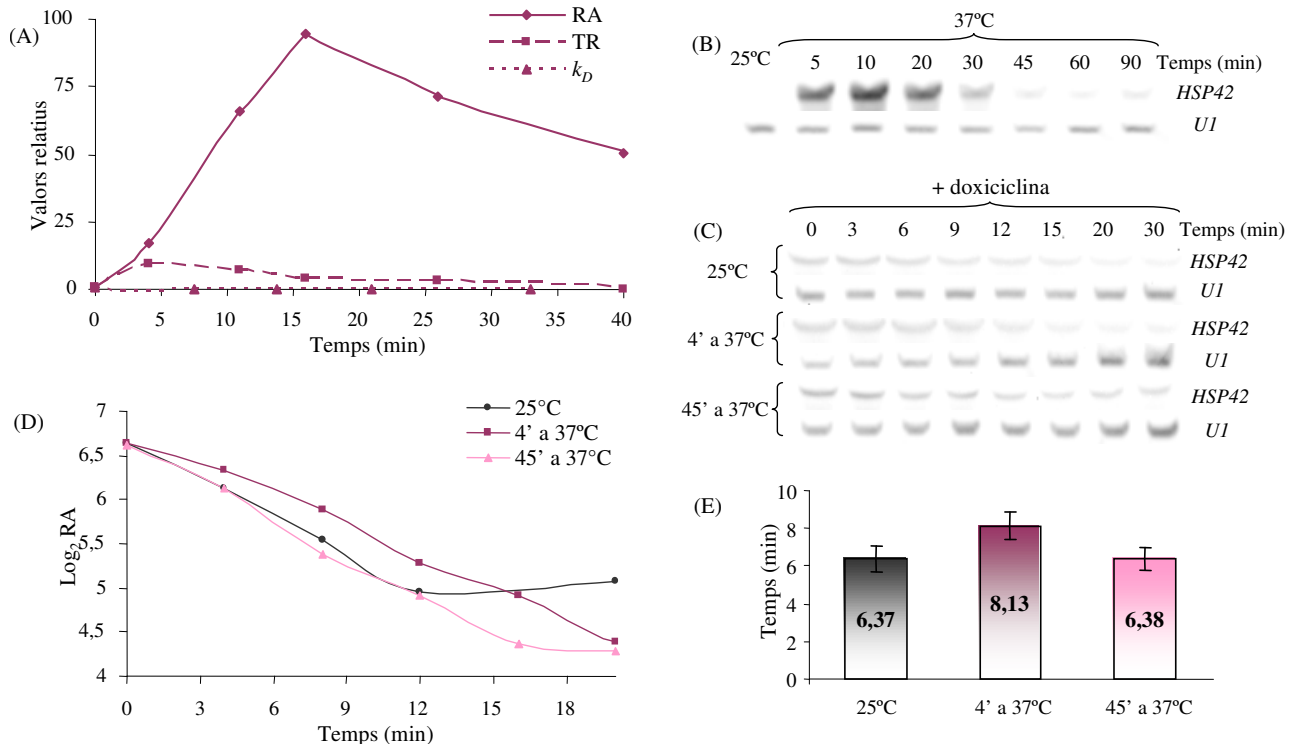
### 1.2.2.1.- Exemples d'mRNAs que s'estabilitzen arran de l'estrès tèrmic

Després d'analitzar els patrons dels paràmetres transcripcionals dels gens de les Hsps es decideix comprovar l'efecte de l'estrès tèrmic en les vides mitjanes d'aquests mRNAs, ja que tot i la inducció de la seva expressió, hi ha diferències d'estabilitat. El gen codificant per la xaperona Hsp42 és un dels gens escollits que s'indueixen en resposta a estrès tèrmic. Aquest gen s'inclou en el grup 12 (la Il·lustració 11). Les dades de GRO dels experiments successius es mostren en la Il·lustració 19 (apartat A). S'observa que els valors mitjans de GRO de TR i RA d'aquests gens augmenten durant l'estrès. No obstant, no ho fan amb la mateixa intensitat. Mentre que els nivells de TR recuperen els valors originals al 15 minuts del xoc, l'RA es manté constantment elevada, fins a temps molt posteriors, quan tendeix a acostar-se als nivells inicials. També, l'augment de TR precedeix al de l'mRNA i matemàticament es prediu que de manera immediata a



## Resultats

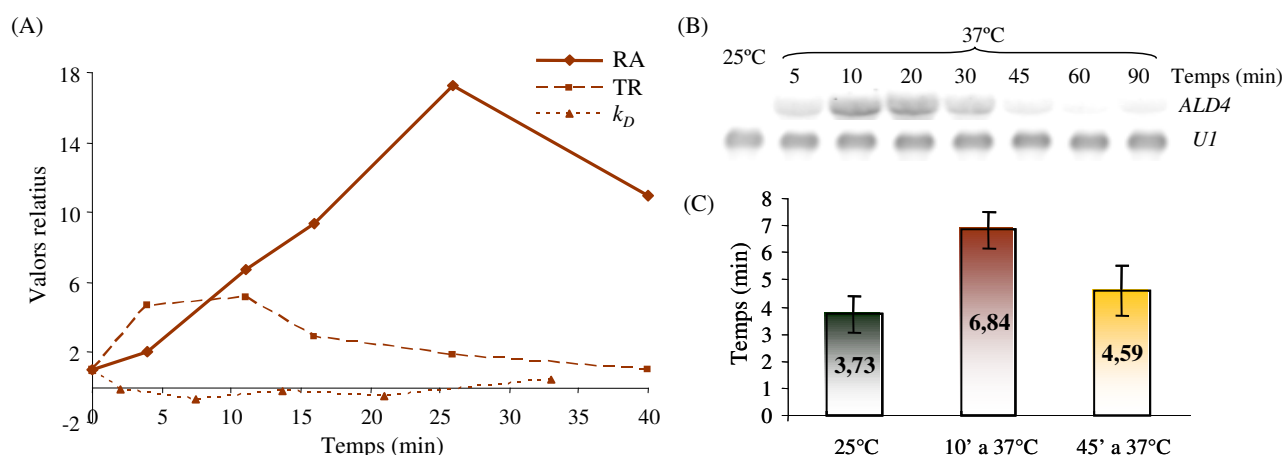
l'estrès hi ha un pic d'estabilització de l'mRNA (amb el màxim als 2,5 minuts). A més, la  $k_D$  inferida té valors inferiors a la unitat en tota la cinètica. Per tant, la inducció transitòria de TR combinada amb l'estabilització de l'mRNA portaria a l'increment en els nivells d'mRNA. Per Northern blot, es confirma que el màxim d'inducció per calor d'*HSP42* és al voltant dels 10 minuts de l'estrès i que disminueix en els últims temps (apartat B). Amb la construcció *tetO<sub>2</sub>-HSP42* es realitzen les cinètiques (per triplicat) de tancament d'expressió en diferents condicions: a 25°C, als 4 minuts de l'estrès i als 45 minuts (apartat C), com mostra el disseny experimental de la Il·lustració 18, i es determina la vida mitjana de l'mRNA. Com s'espera, les TDs inicials segueixen una cinètica d'ordre zero i les vides mitjanes es calculen amb la inversa negativa del pendent del logaritme en base 2 de la desaparició de l'mRNA, la qual es representa en l'apartat (D). S'obté un valor de vida mitjana de l'mRNA de 6,4 minuts en cèl·lules creixent exponencialment a 25°C; aquesta xifra augmenta a 8,1 minuts als 4 minuts del canvi de temperatura a 37°C, per disminuir de nou a 6,4 minuts als 45 minuts de l'estrès (apartat E). Aquesta recuperació de l'estabilitat als 45 minuts de l'estrès és similar als valors de vida mitjana en un cultiu creixent exponencialment a 37°C (6,37 minuts). Tot i que l'augment de la vida mitjana de l'mRNA immediatament després de l'estrès és moderat, les diferències són reproduïbles entre els experiments. Per tant, l'mRNA d'*HSP42* s'estabilitza transitòriament en comparació amb les cèl·lules no estressades, fet que confirma les prediccions matemàtiques.



**Il·lustració 19.** Resum de les dades de TR, RA i TD pel gen *HSP42* en l'estrès tèrmic. (A) Valors mitjans d'RA, TR i  $k_D$  dels experiments GRO. (B) Cinètica d'estrès tèrmic analitzada per Northern blot amb la sonda d'*HSP42* i *U1* com a control. (C) Cinètiques de tancament de l'expressió del gen amb la soca *tetO<sub>2</sub>-HSP42/tetR'* (MML980): abans de l'estrès i als 4 i 45 minuts després d'aquest. (D) Representació gràfica del logaritme en

base 2 de la quantificació de la desaparició de les bandes d'mRNA en les tres cinètiques, respecte al temps. (E) Representació en diagrama de barres de la vida mitjana de l'mRNA d'*HSP42* en els tres casos exposats. Les barres corresponen a l'error estàndard de les quantificacions del pendent de la degradació d'aquest mRNA.

De manera semblant, s'analitza la transcripció en estrès tèrmic pel gen *ALD4*, també del grup 12. Aquest gen codifica per una aldehyd deshidrogenasa mitocondrial, que trenca els aldehyds tòxics acumulats en condicions d'estrès (Aranda i del Olmo MI, 2003). En l'apartat (A) de la II-lustració 20 els paràmetres transcripcionals resultants dels experiments de GRO mostren la inducció de l'expressió d'aquest gen; de nou es produeix un increment transitori de TR i un augment més sostingut de l'RA que al final tendeix a recuperar-se. La  $k_D$  assenyala una estabilització prolongada en els primers 30 minuts del xoc tèrmic. Inicialment, es corrobora experimentalment per Northern blot la inducció d'aquest mRNA arran de l'estrès (apartat B, II-lustració 20) i seguidament se'n determina l'estabilitat en cultius creixent exponencialment a 25°C i 37°C. En el primer cas la vida mitjana és de 3,73 minuts i en el segon de 7,76 minuts. Es determina la vida mitjana d'aquest mRNA a pocs minuts de l'estrès i una vegada el cultiu ja s'ha recuperat (apartat C, II-lustració 20), i es confirma la seva estabilització als 10 minuts, ja que l'mRNA passa a una vida mitjana de 6,84 minuts immediatament després de l'estrès. Als 45 minuts de l'estrès la vida mitjana de l'mRNA disminueix a 4,59 minuts. Aquesta estabilització temporal concorda amb l'estimació matemàtica de la  $k_D$ , la qual mostra un pic d'estabilització al voltant dels 10 minuts i una posterior recuperació.



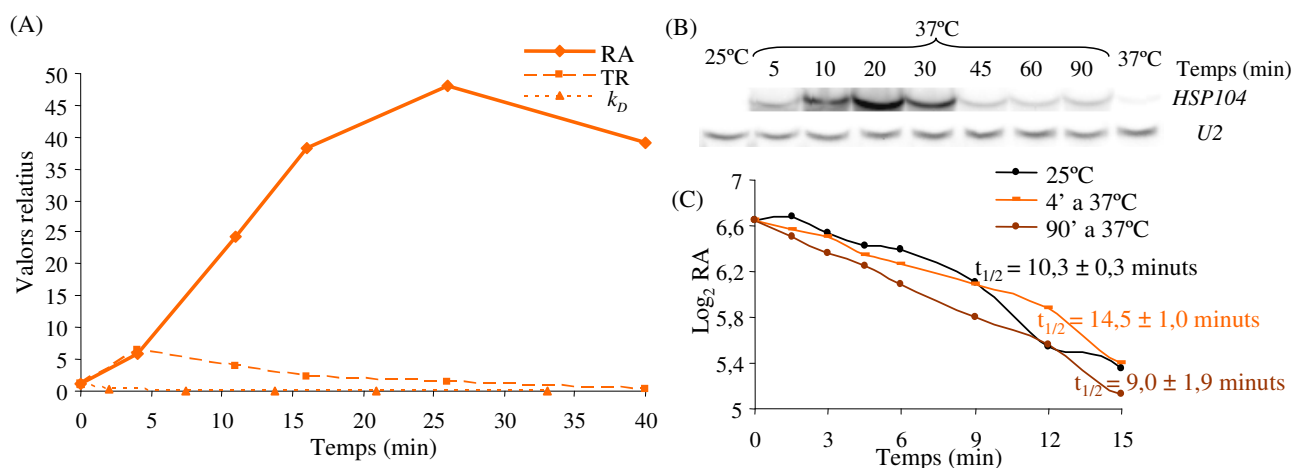
**II-lustració 20.** Efectes de la transcripció del gen *ALD4* arran de l'estrès tèrmic. (A) Dades d'RA, TR i  $k_D$ . La representació gràfica es fa amb les mitjanes dels experiments GRO relativitzant els valors a la unitat i respecte el  $t_0$ . (B) Northern blot de la cinètica d'estrès tèrmic en cèl·lules salvatges amb les sondes d'*ALD4* i del control de càrrega *UI*. (C) Histograma de les vides mitjanes de l'mRNA d'*ALD4* de la soca *tetO<sub>2</sub>-ALD4/tetR'* (MML1042) a 25°C i als 10 i 45 minuts de l'estrès tèrmic a 37°C. Les barres corresponen a l'error estàndard entre els 3 experiments independents realitzats.

La inducció de l'mRNA del gen *HSP104* és molt intensa en l'estrès tèrmic. Aquesta xaperona forma part del grup 14 (II-lustració 11), grup que es caracteritza per tenir una TR induïda transitòriament als primers minuts de l'estrès mentre l'RA augmenta en major grau i de manera permanent al llarg del temps de

## Resultats

la presa de mostres. La  $k_D$  predita té valors per sota de la unitat que tendeixen a la recuperació en els darrers minuts del xoc per calor. Aquestes dades de GRO es mostren en l'apartat (A) de la II-lustració 21. Mitjançant Northern blot es comprova la inducció de l'mRNA d'*HSP104* amb l'estrès tèrmic i es corrobora la pujada dràstica dels nivells d'mRNA obtinguda amb les dades dels experiments GRO, amb un màxim entre els 20 i els 30 minuts de l'estrès (apartat B, II-lustració 21).

Per validar les dades de GRO se substitueix el promotor endogen d'*HSP104* pel promotor *tetO<sub>2</sub>* de regulació condicional. Amb aquesta construcció es realitzen cinètiques triples de tancament de l'expressió del gen i es conclou que als 4 minuts del canvi de temperatura l'mRNA d'*HSP104* s'estabilitza força (passa de 10,32 minuts a 25°C a 14,46 minuts). Un cop superat l'estrès, als 90 minuts, la vida mitjana d'aquest mRNA torna a ser de 9,05 minuts (apartat C, II-lustració 21). Els resultats concorden clarament amb l'estabilització predita amb la TD inferida matemàticament i amb les vides mitjanes obtingudes amb els cultius creixent en fase exponencial a 25°C, que és de 10,40 minuts i a 37°C, que és de 10,48 minuts.

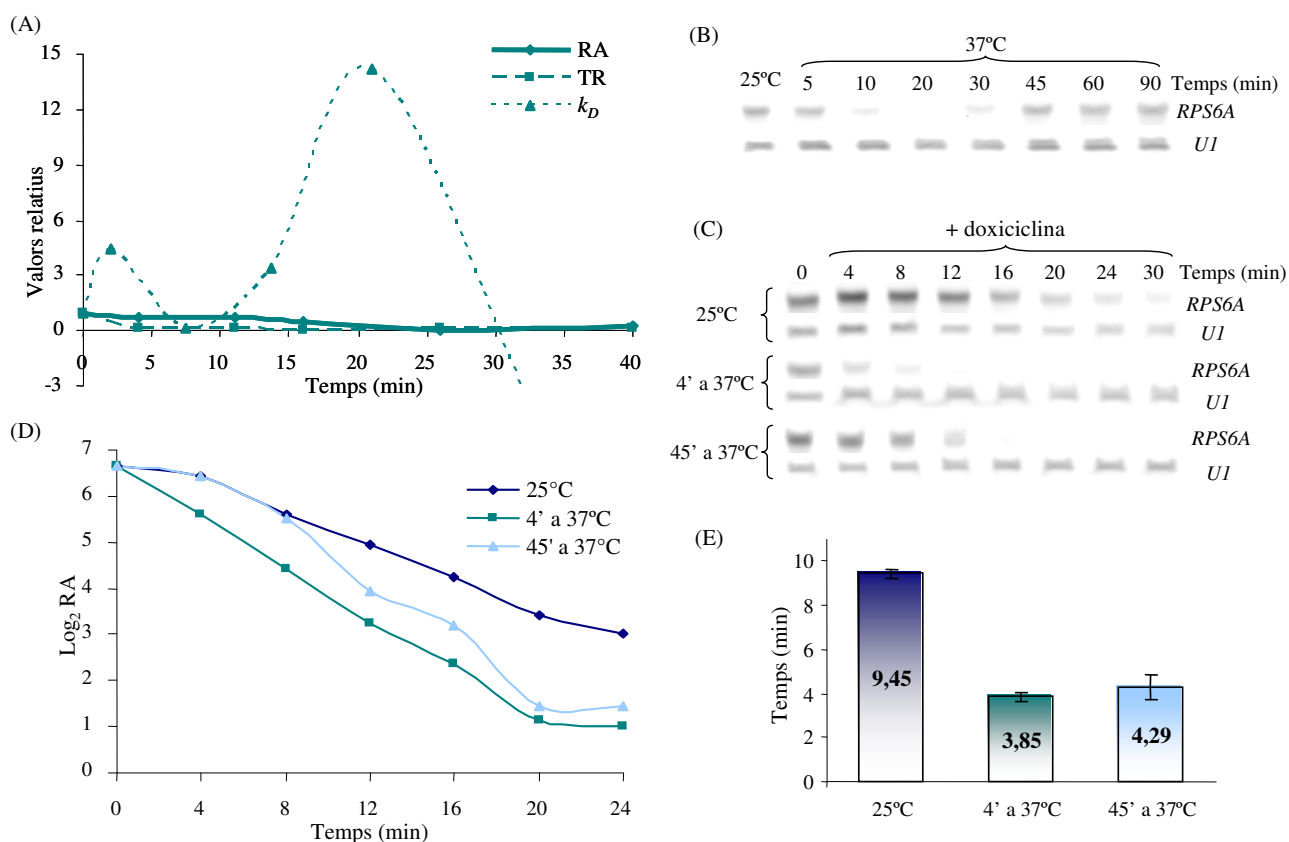


**II-lustració 21.** Dades de transcripció de l'mRNA d'*HSP104* en l'estrès tèrmic moderat. (A) Valors mitjans d'RA, TR i  $k_D$  resultants dels experiments de GRO. (B) Cinètica de l'estrès tèrmic (de 25°C a 37°C) analitzada mitjançant Northern blot amb la sonda d'*HSP104* i *U1* com a control de càrrega. En l'últim carril hi ha una mostra control creixent exponencialment a 37°C. (C) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació del tancament de l'expressió d'*HSP104*, en les cèl·lules *tetO<sub>2</sub>-HSP104/tetR'* (MML863) respecte al  $t_0$ , a 25°C, als 4 minuts del canvi a 37°C i als 90 minuts de l'estrès. S'hi inclou la vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) d'aquest mRNA en els tres casos, amb l'error estàndard de les quantificacions realitzades. La  $t_{1/2}$  es calcula amb la regressió lineal dels valors experimentals obtinguts.

D'altra banda es construeix també un plàsmid amb el promotor *tetO<sub>2</sub>*, l'ORF d'*HSP104* i la regió 3'UTR d'*ADHI*. Amb aquesta construcció es porten a terme cinètiques d'apagada de l'expressió d'*HSP104* amb l'addició de doxiciclina a 25°C i 37°C. Els resultats són bastant diferents als realitzats anteriorment, ja que s'obté una vida mitjana al voltant d'un minut a 25°C i de dos minuts aproximadament a 37°C. Per tant, la regió 3'UTR endògena del gen *HSP104* influeix fortament en l'estabilitat de l'mRNA d'*HSP104*.

### 1.2.2.1.- Exemples d'mRNAs que es desestabilitzen arran de l'estrès tèrmic

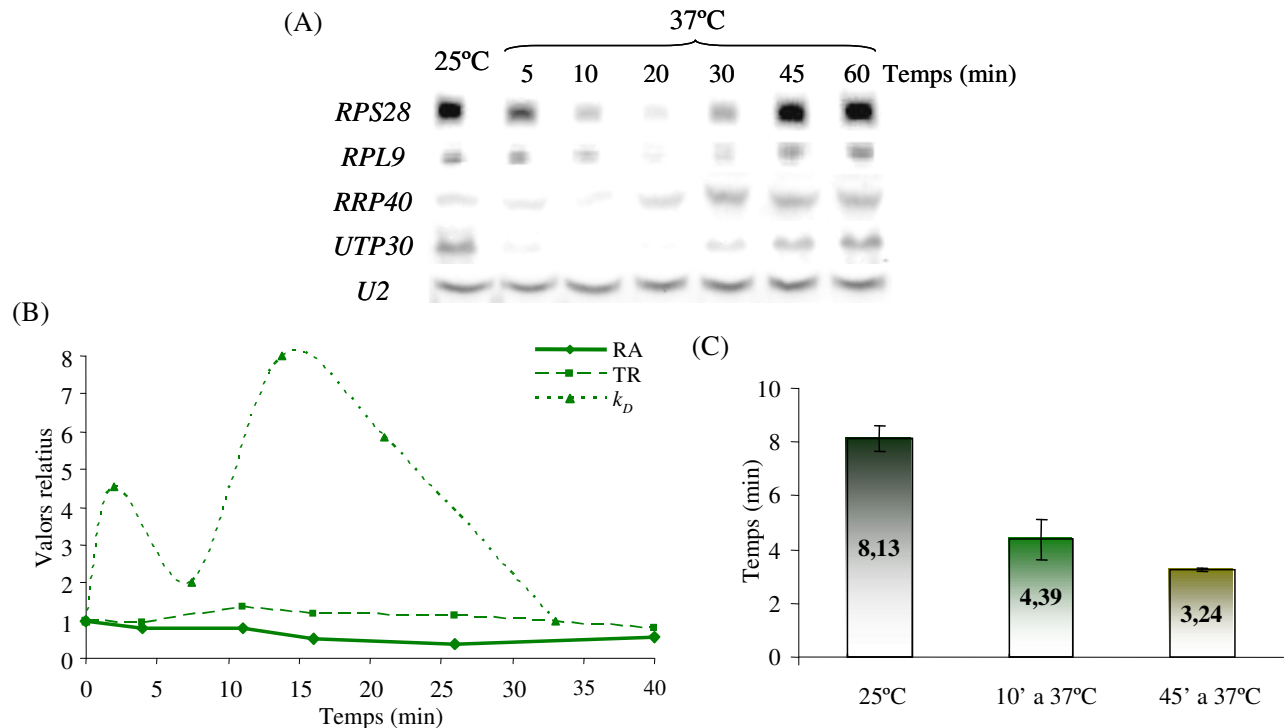
Molts gens codificants per PR o PPR s'agrupen en els grups 3 i 4 de la Il·lustració 11, que es caracteritzen per tenir la TR i l'RA reprimits. L'anàlisi per Northern blot confirma la repressió dels nivells d'mRNA en el xoc tèrmic per al gen *RPS6A*, representatiu del grup 4. La inferència matemàtica dels valors de  $k_D$  prediu la desestabilització dels gens en els grups 3 i 4 (Il·lustració 13). La determinació experimental de la cinètica de degradació demostra que l'mRNA d'*RPS6A* es desestabilitza dràsticament arran de l'estrès, des d'un valor de vida mitjana inicial de 9,4 minuts en cèl·lules no estressades, a 3,8 i 4,3 minuts després de 4 i 45 minuts del canvi de temperatura, respectivament. L'anàlisi de l'estat d'equilibri amb cèl·lules creixent de manera exponencial a 25°C i 37°C concorden amb les dades obtingudes en l'estudi de l'estrès, ja que es determina una vida mitjana de 9,0 minuts a 25°C i 4,2 minuts a 37°C per l'mRNA d'aquest gen.



**Il·lustració 22.** Resum de les dades de TR, RA i TD pel gen *RPS6A* en l'estrès tèrmic. (A) Valors mitjans d'RA, TR i  $k_D$  en els experiments GRO. (B) Cinètica d'estrès tèrmic analitzada per Northern blot amb la sonda d'*RPS6A* i *U1* com a control. (C) Cinètiques de tancament de l'expressió del gen en la soca *tetO<sub>2</sub>-RPS61/tetR'* (MML896): abans de l'estrès i als 4 i 45 minuts d'aquest. (D) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació de la desaparició de les bandes d'mRNA en les tres cinètiques, respecte al temps. (E) Representació en diagrama de barres de la vida mitjana de l'mRNA d'*RPS6A* en els tres casos exposats; les barres representen l'error estàndard.

## Resultats

Aquesta desestabilització causada per l'estrès tèrmic també s'identifica en l'mRNA del gen *RRP40* codificant per una proteïna de la categoria *GO* PPR (aquest gen es troba inclòs en el grup 10 de la Il·lustració 11). Les seves dades GRO i el comportament dels seus nivells d'mRNA arran del canvi de temperatura de 25°C a 37°C es mostren en la Il·lustració 23. En aquesta es pot observar com l'estudi d'estabilitats mostra la desestabilització de l'mRNA després de l'estrès tèrmic i que aquest no es recupera en 45 minuts després del xoc. Els valors de vides mitjanes són de 8,1; 4,4 i 3,2 minuts, a 25°C i als 10 i 45 minuts després del xoc. En l'apartat (A) d'aquesta il·lustració també es pot veure la repressió d'altres mRNAs de les categories PR i PPR.

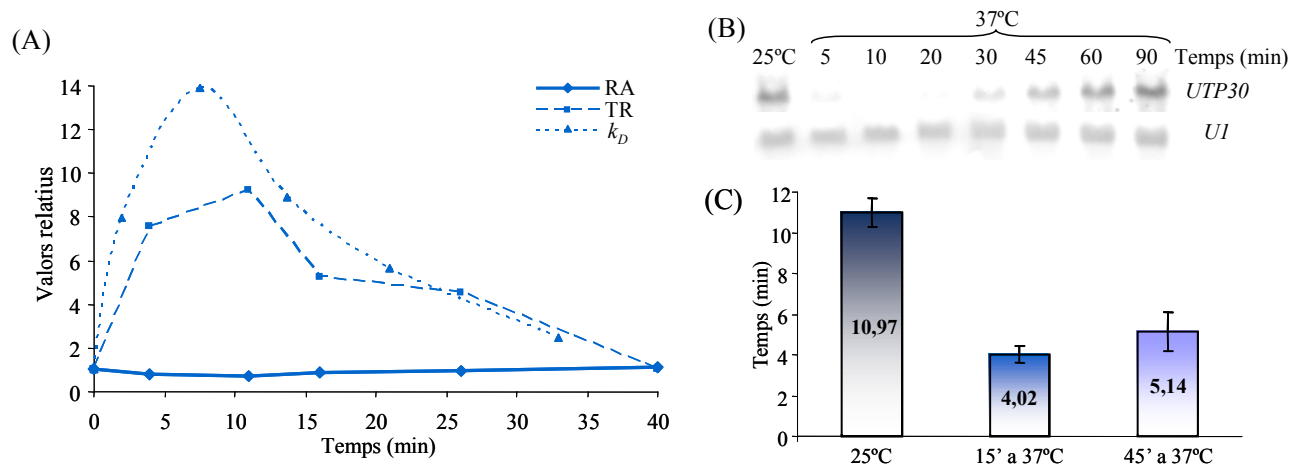


**Il·lustració 23.** Dades transcripcionals de l'*RRP40* en l'estrès tèrmic. (A) Northern blot de la cinètica d'estrès tèrmic per als gens *RPS28* i *RPL9* (de la categoria funcional PR), *RRP40* (de la categoria PPR) i el control de càrrega *U2*. (B) Dades d'RA, TR i  $k_D$  pel gen *RRP40*. La representació gràfica es fa amb les mitjanes dels experiments GRO relativitzant els valors a la unitat i respecte el  $t_0$ . (C) Histograma de les vides mitjanes de l'mRNA d'*RRP40* de la soca *tetO<sub>2</sub>-RRP40/tetR'* (MML957) a 25°C, als 10 minuts del canvi de temperatura a 37°C i als 45 minuts d'aquest estrès. Les barres corresponen a l'error estàndard de les quantificacions del pendent de la degradació d'aquest mRNA.

En conclusió, considerant els resultats assolits es pot afirmar que la repressió general de la TR i l'RA en la majoria dels gens de la categoria funcional *GO* PR i PPR i la desestabilització de l'mRNA (pels dos casos estudiats *RSP6A* i *RRP40*) és deguda a una regulació negativa transcripcional i posttranscripcional en resposta al xoc tèrmic.

No obstant, hi ha algun exemple que no s'ajusta a la majoria de patrons d'expressió per la categoria *GO* PPR. El gen *UTP30* codifica per una proteïna involucrada en la producció de l'rRNA 18S i

l'ensamblatge de la subunitat petita dels ribosomes (Grandi *et al*, 2002). L'*UTP30* pertany al novè grup (Il·lustració 11), un dels quatre grups caracteritzats per tenir una TR induïda i un RA que disminueix lleugerament durant la cinètica de l'experiment. En l'apartat (A) de la Il·lustració 24 es representen els paràmetres transcripcionals obtinguts amb la tècnica GRO d'aquest gen i s'observa que, com en els gens de la resta del grup 9, la TR augmenta considerablement ens els primers minuts de l'estrès tèrmic, per després disminuir lentament. L'mRNA, però, sembla reprimir-se moderadament. Això resulta en una predicció de  $k_D$  de forta desestabilització de l'mRNA, la qual als temps finals de la cinètica encara no assoleix el nivell de vida mitjana inicial. Els nivells d'mRNA copsats en la cinètica de canvi de temperatura i analitzats mitjançant Northern blot mostren una repressió considerable de l'mRNA d'*UTP30* (apartat B, Il·lustració 24). L'estudi de l'estabilitat d'aquest mRNA es realitza amb les tres cinètiques després de l'addició de doxiciclina a partir del cultiu creixent a 25°C i als 15 i 45 minuts del canvi de temperatura a 37°C. El processament de les mostres per Northern blot permet el càlcul de l'estabilitat i és així com es veu que en l'estrès tèrmic la vida mitjana d'aquest mRNA baixa aproximadament a la meitat, als 15 minuts de l'estrès i que als 45 minuts encara no s'ha recuperat. A 25°C la vida mitjana de l'mRNA d'*UTP30* és 10,9 minuts, mentre que als 15 minuts de passar a 37°C és de 4 minuts i als 45 minuts és de 5,1 minuts, fet que concorda amb la predicció de TD. Amb aquests experiments es descobreix com un gen de la categoria funcional PPR, es reprimeix a costa de la seva inestabilització, tot i que la seva TR s'indueix fortament a causa de l'estrès tèrmic.



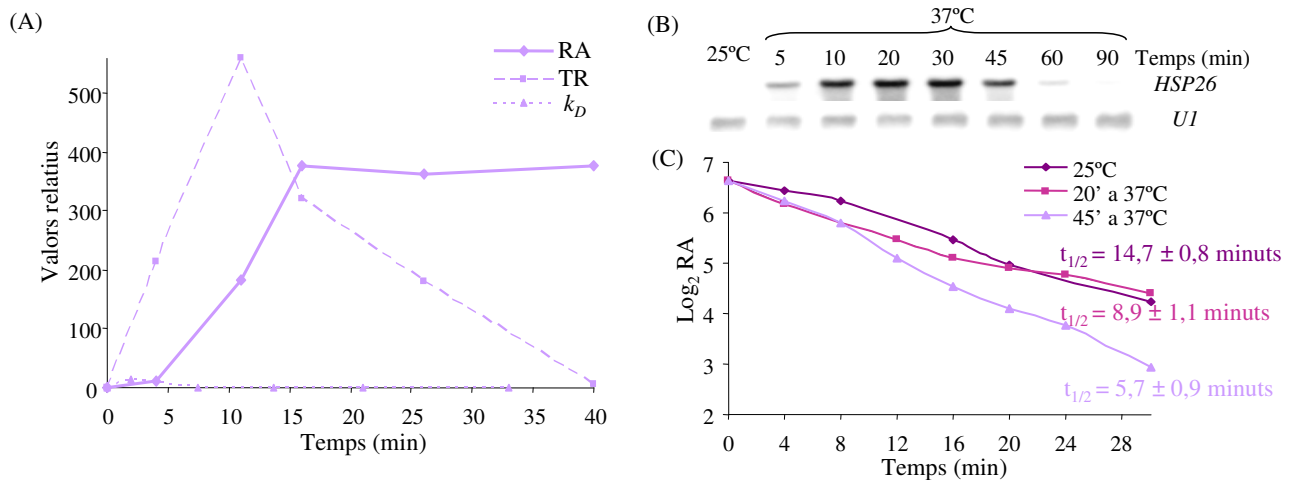
**Il·lustració 24.** Paràmetres transcripcionals d'*UTP30* després d'un estrès tèrmic moderat. (A) Valors de TR i RA mitjans per l'mRNA del gen *UTP30* en els experiments de GRO.  $k_D$  matemàtica inferida a partir de les dues variables anteriors. (B) Cinètica d'estrès tèrmic en una cèl·lula salvatge analitzada per Northern blot, amb les sondes d'*UTP30* i *UI*. (C) Histograma indicatiu de les vides mitjanes de l'mRNA d'aquest gen en la soca *tetO2-UTP30/tetR'* (MML1186) abans i als 15 i 45 minuts del canvi de temperatura. Les barres representen l'error estàndard dels experiments.

Les proteïnes de xoc tèrmic codificades pels gens *HSP12* i *HSP26* (del grup 11) tenen un comportament transcripcional, arran del xoc per calor, diferent al dels gens *HSP42* i *HSP104*. De manera

## Resultats

semblant als paràmetres de transcripció dels gens del grup 12 (al qual pertany *HSP42*), la TR i l'RA dels gens del grup 11 augmenten com a conseqüència del xoc tèrmic (Il·lustració 11), però mentre que hi ha un pic màxim de TR als 10 minuts de l'estrès i els nivells decreixen lentament fins als valors originals, l'RA incrementa amb un retard significatiu, apuntant, doncs, a una desestabilització important de l'mRNA en temps inicials. De fet, la predicció matemàtica indica en mitjana pel grup 11 que les molècules d'mRNA es desestabilitzen transitòriament poc després del xoc tèrmic moderat (Il·lustració 13).

L'mRNA d'*HSP26* s'indueix sostingudament després d'un xoc tèrmic, tal com es pot veure en els apartats (A) i (B) de la Il·lustració 25, on es mostren els paràmetres d'RA de GRO i l'anàlisi de Northern blot per la cinètica de canvi de temperatura, on el màxim d'inducció dels nivells d'mRNA es troba entre els 20 i els 30 minuts. A més, s'observa que l'RA augmenta més tardanament en el temps que la TR, la qual s'indueix ràpidament i transitòria en els primers minuts del xoc. La  $k_D$  estimada prediu una desestabilització primerenca forta. Les cinètiques per a la quantificació de la vida mitjana de l'mRNA corroboren la desestabilització d'aquest mRNA arran de l'estrès tèrmic, ja que a 25°C la seva vida mitjana és de 14,7 minuts, als 20 minuts del canvi a 37°C és de 8,9 minuts i als 45 minuts del canvi de temperatura és de 5,7 minuts. Les dades obtingudes mitjançant el processament de Northern blot de cinètiques en estat equilibri de cultius creixent exponencialment a 25°C i 37°C són 15,8 i 5,2 minuts, respectivament. Per tant, coincideixen plenament amb la cinètica anterior a l'estrès i la de les cèl·lules ja recuperades, indicant que l'mRNA d'aquest gen a 37°C és més inestable que a 25°C.



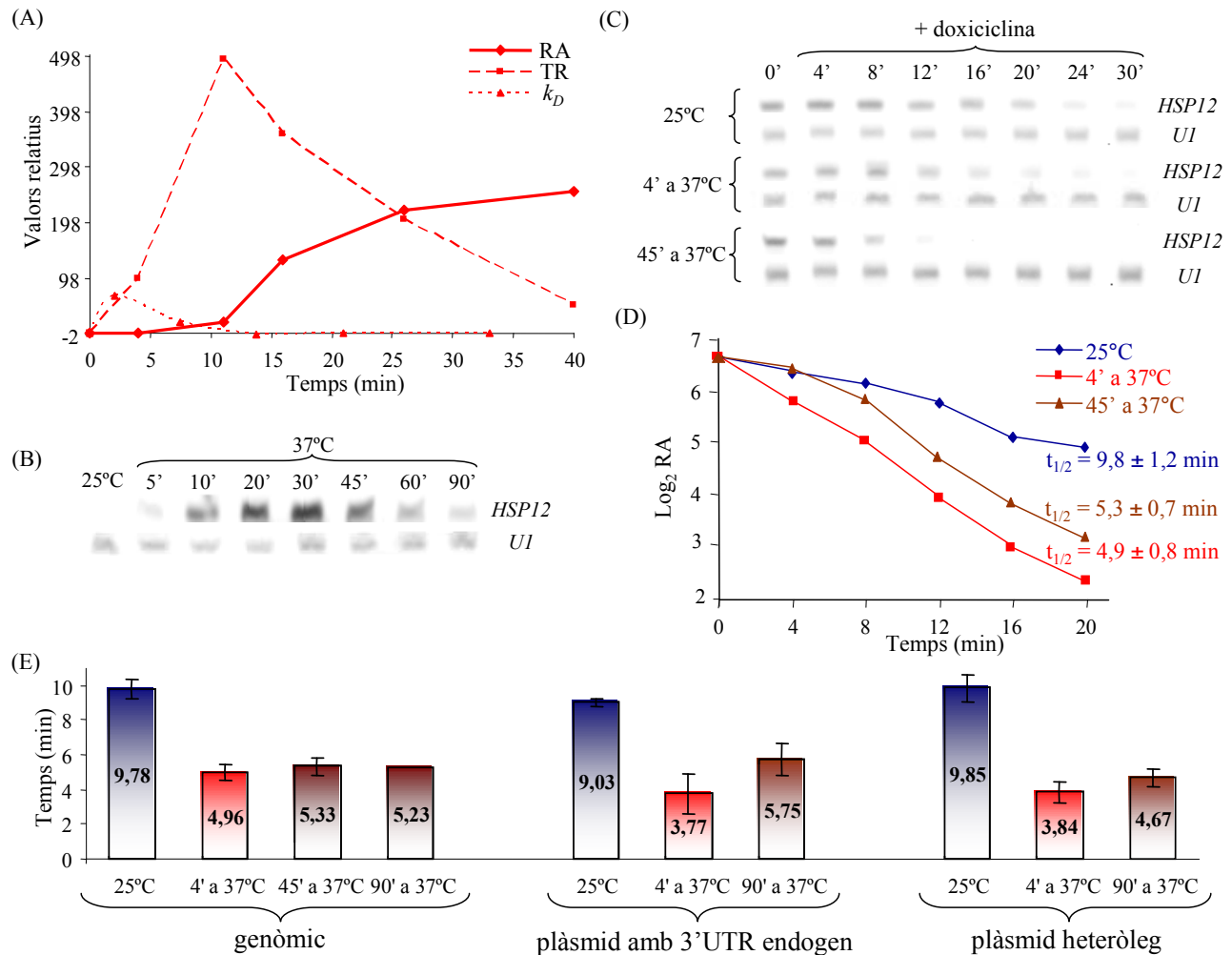
**Il·lustració 25.** Dades del transcrit *HSP26* en el xoc tèrmic de 25°C a 37°C. (A) Dades dels experiments de GRO: valors mitjans d'RA i TR i  $k_D$  matemàtica. (B) Cinètica d'estrès tèrmic processada per Northern blot amb la sonda d'*HSP26* i *UI* com a control de càrrega. (C) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació del tancament de l'expressió d'*HSP26*, en les cèl·lules *tetO<sub>2</sub>-HSP26/tetR'* (MML1035), respecte al  $t_0$ , a 25°C, als 20 minuts del canvi a 37°C i als 45 minuts de l'estrès. En la il·lustració apareixen els valors mitjans de vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) d'aquest mRNA en els tres casos, amb l'error estàndard de les quantificacions realitzades.

S'obtenen unes dades semblants pel gen codificant per la xaperona Hsp12. Els paràmetres per a la transcripció d'aquest gen amb l'aplicació de l'estrès tèrmic es mostren en l'apartat (A) de la Il·lustració 26. En el gràfic hi ha un augment transitori de la TR, amb un màxim cap als 10 minuts de l'estrès mentre que l'RA puja més tard en el temps, fet que concorda amb la corba de  $k_D$  predita teòricament i representada en la mateixa gràfica. L'estudi per Northern blot confirma que l'mRNA d'*HSP12* s'indueix després del canvi amb l'increment moderat de temperatura i té uns nivells màxims entre els 20 i els 30 minuts després del xoc (apartat B de la Il·lustració 26). La  $k_D$  particular d'aquest mRNA prediu que els valors de TD assenyalen que l'estabilitat de l'mRNA d'*HSP12* segueix la tendència general del grup 11 (Il·lustració 13). Les dades experimentals per a l'estudi de l'estabilitat indiquen una vida mitjana de 9,5 minuts en les cèl·lules creixent en condicions no estressants, que disminueix a 4,9 als 4 minuts a 37°C, a 5,3 als 45 i a 5,2 minuts als 90 minuts a 37°C (apartat D i E, Il·lustració 26). En cultius creixent exponencialment en condicions d'estat d'equilibri a 25°C la vida mitjana és de 9,3 minuts i a 37°C és de 6,2 minuts. Aquests resultats confirmen, per tant, les prediccions de l'anàlisi GRO sobre el comportament diferencial de l'estabilitat de l'mRNA del gen *HSP12* en el xoc per calor, encara que la desestabilització de l'mRNA d'*HSP12* es manté en l'estrès durant més temps que el predit matemàticament.

A més de la substitució del promotor del gen pel promotor *tetO<sub>2</sub>* en el propi genoma (per tant, es conserva el 3'UTR propi), es realitzen dues construccions plasmídiques més que contenen totes dues el promotor *tetO<sub>2</sub>* seguit de l'ORF del gen *HSP12*, però: (i) una conserva també la regió endògena 3'UTR i (ii) l'altra té la regió 3'UTR del gen *ADHI*. Amb la primera construcció els resultats obtinguts són pràcticament iguals als del canvi de promotor genòmic, ja que es tracta de diferències en la vida mitjana de segons, que no són gaire significatives. Així, doncs, el plàsmid que conserva el 3'UTR a 25°C i als 4 minuts de l'estrès tèrmic dóna valors quelcom més baixos que en la construcció genòmica, i als 90 minuts de l'estrès inclús una mica més elevats. Amb el segon plàsmid també es copsen unes dades molt semblants de vides mitjanes, als 4 minuts del xoc per calor la vida mitjana de l'mRNA d'*HSP12* disminueix lleugerament més, però de manera poc significativa, i un cop superat l'estrès torna a augmentar, gairebé tant com en el primer cas (fins a 4,6 minuts) assolint els valors de l'estat d'equilibri d'aquest mRNA (en un cultiu creixent en fase exponencial a 37°C la seva vida mitjana és de 4,4 minuts). En conclusió, en l'estudi d'estabilitats de l'mRNA d'*HSP12*, les dades resultants amb la construcció genòmica i amb el clonatge en vector varien al voltant d'un minut, el qual entra dins de les limitacions de la tècnica. A més, el canvi de la regió 3'UTR endògena d'*HSP12* per la regió 3'UTR d'*ADHI* no aporta canvis significatius en la vida mitjana d'aquest gen i tampoc en l'anàlisi de cultius creixent exponencialment a 25°C i 37°C, ni en l'estrès tèrmic.



## Resultats



**Il·lustració 26.** Dades de transcripció durant un xoc tèrmic del gen *HSP12*. (A) Valors mitjans d'RA, TR i  $k_D$  en els experiments GRO i inferits matemàticament. (B) Cinètica d'estrès tèrmic analitzada per Northern blot amb la sonda d'*HSP12* i *U1* com a control de càrrega. (C) Cinètiques de tancament de l'expressió del gen a 25°C, als 4 i 45 minuts de l'estrès, en les cèl·lules *tetO<sub>2</sub>-HSP12/tetR'* (MML987). (D) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació de la desaparició de les bandes d'mRNA en les tres cinètiques descrites, respecte al temps. En la il·lustració apareixen els valors mitjans de vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) més l'error estàndard del total dels experiments realitzats. (E) Representació en diagrama de barres de la vida mitjana de l'mRNA d'*HSP12* sense estrès i als 4, 45 i 90 minuts del canvi de temperatura a 37°C. S'exposen les dades per a les tres construccions gèniques realitzades: substitució genòmica del promotor [soca *tetO<sub>2</sub>-HSP12/tetR'* (MML987)], clonació de l'ORF a un plàsmid amb el 3'UTR propi del gen [soca *tetO<sub>2</sub>-HSP12/tetR'* (MML803)] i clonació de l'ORF a un plàsmid amb el 3'UTR d'un altre gen [soca *tetO<sub>2</sub>-HSP12+3'UTR d'ADHI/tetR'* (MML802)]. Les barres corresponen a l'error estàndard de les quantificacions del pendent de la degradació d'aquest mRNA.

## **2a PART**

**Anàlisi de la resposta transcripcional d'*S. cerevisiae* en resposta a l'estrès oxidatiu**

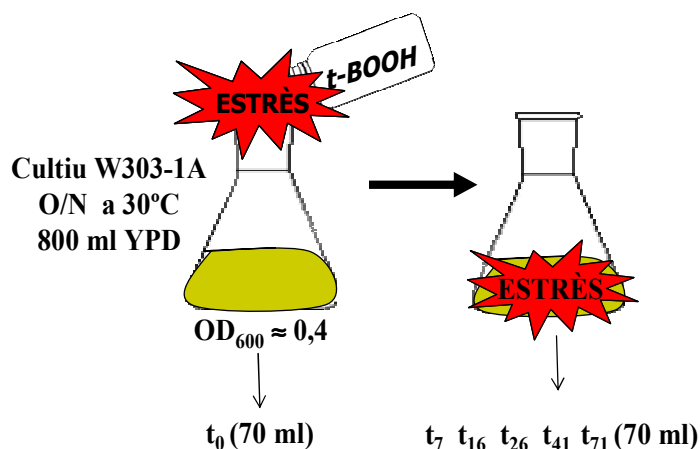


S'ha descrit que alguns estressos oxidatius en concentracions no letals d'hidroperòxids i altres oxidants causen una aturada transitòria del creixement en fase G1 del cicle cel·lular d'*S. cerevisiae* (Lee *et al*, 1996; Wanke *et al*, 1999). Per tal d'evitar aquesta aturada del creixement, que podria emascarar els efectes directes de l'estrès oxidatiu sobre la transcripció general i l'estabilitat de l'mRNA, s'assagen, primerament, una sèrie de concentracions de *t*-BOOH. Se cerquen les condicions estressants que no afectin al creixement exponencial (en comparació amb un cultiu control no tractat) i que indueixin l'expressió de tres gens reporters (*TRR1*, *TRX2*, *HSP12*), els quals s'indueixen en condicions d'estrès oxidatiu (Garrido i Grant, 2002; Gasch *et al*, 2000). Hem observat que 0,1 mM de *t*-BOOH és la concentració d'aquest agent oxidant en què aquests requeriments s'acompleixin. Per tant, tots els experiments successius es realitzen a aquesta concentració; d'aquesta manera es pot definir aquest estrès oxidatiu com moderat, ja que no afecta al cicle cel·lular, però provoca resposta cel·lular a nivell transcripcional.

## 2.1.- Anàlisi de la resposta a estrès oxidatiu mitjançant la tècnica de GRO

### 2.1.1.- Disseny experimental de l'aplicació de l'estrès oxidatiu amb *t*-BOOH

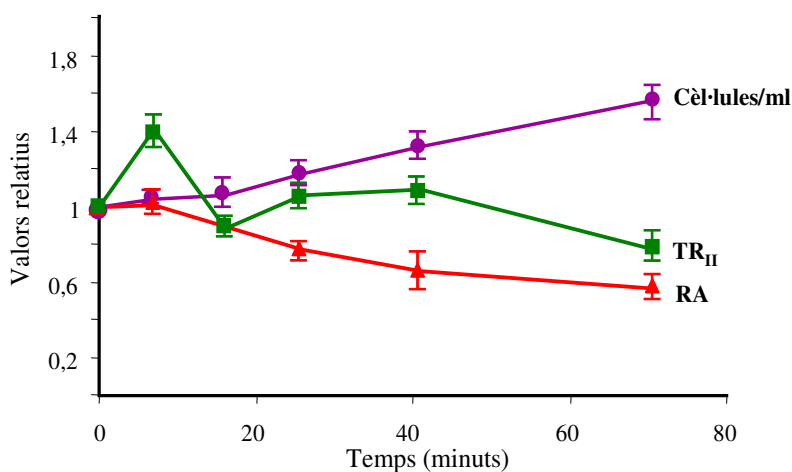
El disseny experimental per recollir les mostres que posteriorment s'analitzen mitjançant GRO parteix d'un cultiu creixent exponencialment a 30°C (en aquest cas a una OD d'aproximadament 0,4). S'agafa la primera mostra de  $t_0$  (abans de l'estrès) i immediatament s'afegeix *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM. Seguidament es recullen alíquotes del cultiu tractat a cinc temps diferents, com es mostra en la figura següent, per duplicat, com en el cas de l'estrès tèrmic, i així poder processar posteriorment les cèl·lules per obtenir dades de TR i RA.



**Il·lustració 27.** Disseny experimental de la presa de mostres en l'estrès oxidatiu per a l'anàlisi de GRO. Es parteix d'un cultiu creixent en fase exponencial a 30°C i després de recollir la mostra del temps inicial es procedeix a l'addició de l'agent oxidant a una concentració final de 0,1 mM. S'agafen alíquotes del cultiu als 7, 16, 26, 41 i 71 minuts després de l'estrès.

### 2.1.2.- Efecte de les condicions d'estrès oxidatiu en els paràmetres de transcripció

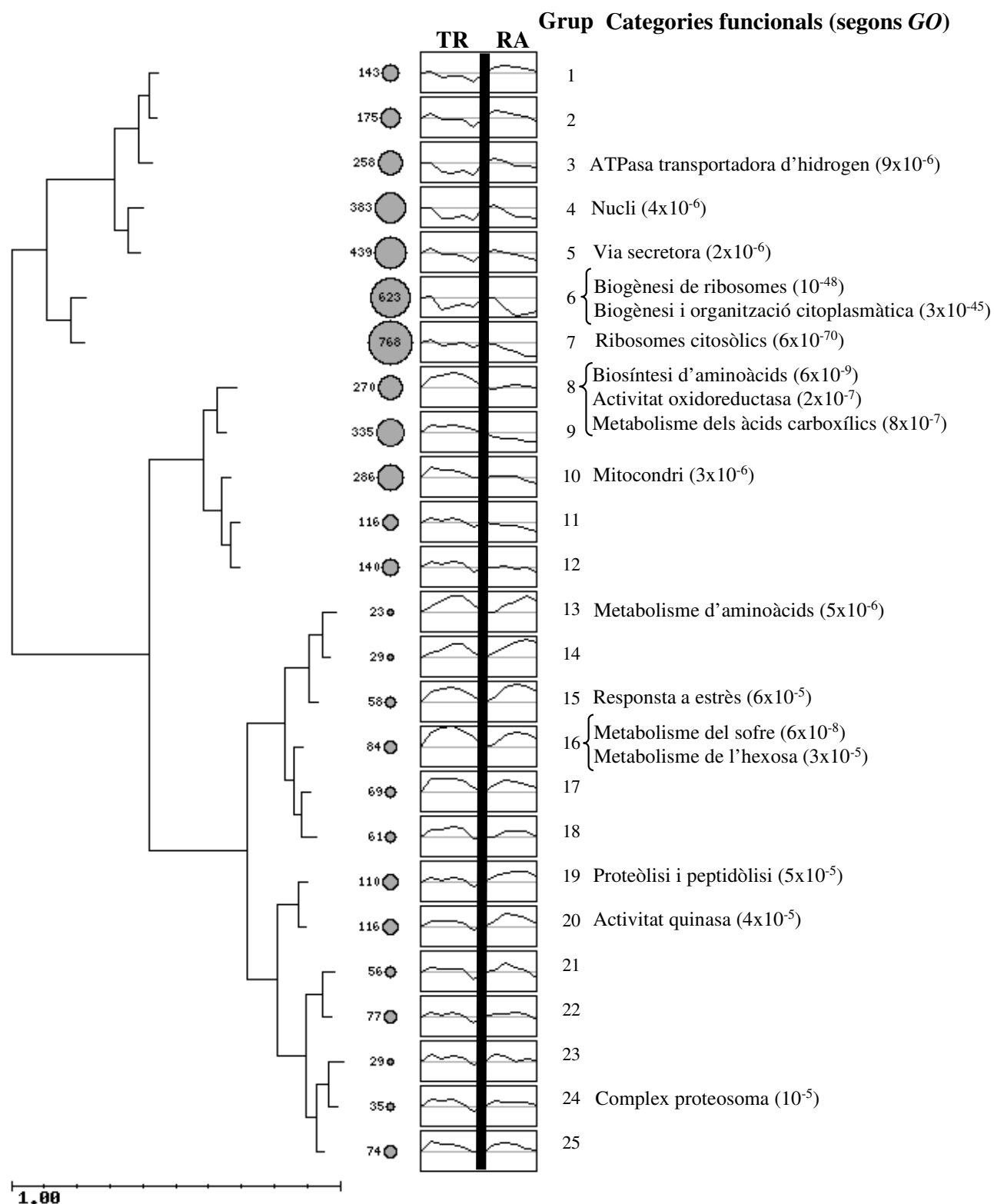
El processament de les mostres de GRO es realitza de la mateixa manera que en el cas de l'estrès tèrmic. Les dades experimentals obtingudes en el cas de l'estrès oxidatiu mostren que l'mRNA total amb cua poli(A) (RA) per cèl·lula decreix suaument en el transcurs de l'experiment, mentre que, com s'espera, continua la proliferació cel·lular. La  $TR_{II}$  augmenta inicialment, un efecte també observat després del canvi de font de carboni (Garcia-Martinez *et al*, 2004) i en resposta a l'estrès tèrmic, per disminuir en els últims temps a nivells similars als del  $t_0$ . Com que els nivells relatius de TR no minven tan com els nivells relatius d'RA, se suggereix que hi ha una desestabilització general de l'mRNA conseqüent a l'estrès oxidatiu moderat.



**Il·lustració 28.** Valors dels diferents paràmetres transcripcionals en l'experiment de cinètica en resposta a l'estrès oxidatiu. Variació de la concentració cel·lular, quantitat d'mRNA per cèl·lula (RA) i  $TR_{II}$ , respecte el  $t_0$  al llarg de l'estrès oxidatiu. Les barres són la desviació estàndard per  $n=3$ .

### 2.1.3.- Efecte de l'estrès oxidatiu en els nivells d'mRNA i les taxes de transcripció

El tractament dels valors resultants (normalització amb DNA genòmic, quantificació, relativització respecte al  $t_0$ ) es realitza de la mateixa manera que en els experiments d'estrès tèrmic. Igualment, també s'obtenen dades de TR i RA per a cada gen d'*S. cerevisiae* al llarg del temps després de l'addició de *t*-BOOH. Amb els dotze punts de les cinètiques de cada gen s'obté la variació de la TR (primers sis punts: 0-5) i la seva conseqüència en l'RA (últims sis punts: 0-5) en la Il·lustració 29. Aquests perfils s'utilitzen per classificar els gens per homologia de patrons de resposta TR i RA. Els gens d'*S. cerevisiae* es divideixen en 25 grups segons la seva resposta transcripcional a l'estrès oxidatiu, sota els criteris definits en el programa informàtic.



**Il·lustració 29.** Agrupació dels gens d'*S. cerevisiae* per homologia de patrons d'expressió durant l'estrès oxidatiu. A l'esquerra, es mostra el desglossament dels grups en dues grans branques, la primera dividida en dues; seguidament, el nombre de gens que configura cadascun dels 25 grups; a continuació el patró de TR i RA

## Resultats

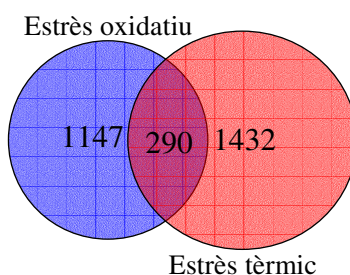
amb què es comporten de mitjana arran l'estrès oxidatiu i a la dreta, les categories funcionals segons *GO* amb les quals s'enriqueixen alguns grups significativament, amb un valor  $p \leq 5 \times 10^{-5}$ .

L'arbre que resulta de la classificació dels gens en funció de la resposta transcripcional a l'estrès oxidatiu té dues branques majoritàries: la primera engloba aquells gens que tenen una repressió de la TR durant aquest estrès i la segona agrupa els gens que tenen la TR induïda.

La branca principal de la part superior de l'arbre (amb els grups 1-7) inclou 2.789 gens (59% del genoma estudiat) i correspon als gens que mostren una disminució en la seva TR en el curs de l'experiment. En la majoria dels casos, aquest desens de la TR precedeix també una disminució de l'RA.

La branca principal de la part baixa de l'arbre (amb els grups 8-25) mostra un augment transitori de la TR que es reflecteix en alguns casos, en un augment transitori en l'RA (grups 13-25, 821 gens, 17%) però no en altres (grups 8-12, 1.147 gens, 24%). Els grups del 13 al 25 inclouen gens que durant un estrès oxidatiu incrementen els nivells d'mRNA, però presenten diferències en els temps de la cinètica d'inducció. En molts casos, el pic de TR precedeix al d'RA (grups 13-19 i 22-25), però en els grups 20 i 21 el pic d'inducció de l'RA ocorre abans que el de TR.

Sorpren que les agrupacions 8-12, tot i l'augment en la TR no tinguin majors nivells d'mRNA. Això suggereix que una significativa desestabilització de l'mRNA compensa les dues cinètiques (grup 8), o fins i tot sobrepassa l'augment de la transcripció (grups 9-12). En comparar els gens inclosos en aquests grups amb els gens inclosos als grups del 7 al 10 corresponents a l'arbre de l'estrès tèrmic (II-lustració 11) es troben 290 gens comuns amb paràmetres de TR induïda transitòriament i RA reprimint (II-lustració 30), és a dir, la desestabilització d'aquests mRNAs després de l'estrès és la màxima responsable dels nivells d'expressió d'aquests gens en l'estrès. La resta queden repartits en els altres grups, sense importància estadística.



**II-lustració 30.** Nombre de gens amb TR induïda i RA pla o reprimint en resposta als dos estressos. L'estrès oxidatiu es representa en blau i el tèrmic en roig.

Els 290 gens que tenen aquest perfil dels patrons d'expressió en els dos estressos es troben en la Taula 11. Hi ha un enriquiment en gens de la categoria funcional segons *GO* de "Procés Metabòlic d'Amina", amb un valor  $p \leq 5,5 \times 10^{-5}$ .

<b>Categoria funcional GO</b>	<b>Valor p</b>	<b>ORF</b>
Procés biosintètic	7,39e-07	<i>ALG1 ARO3 ADE8 TRP2 PCT1 YHI9 ERG9 URA2 TRP3 AAT2 FOL3</i>
Procés biosintètic d'aminoàcids	1,22e-05	<i>ARO3 TRP4 HOM3 HIS1 TRP2 HIS2 TRP5 ADE3 CPA2 ECM17 BAT2 TRP3 ECM40 LEU4 ORT1 ASN1</i>
Procés metabòlic de compostos aromàtics	2,34e-05	<i>IDP1 ADE8 DLD3 HIS2 FOL2 CPA2 ECM17 ECM40 NRK1 URE2 ORT1</i>
Rescat de compostos metabòlics	4,09e-04	<i>ADE1 ARO3 TCP1 CIA1 TRP2 TMN3 FTR1 FRA2 IKI1 URA2 MDE1 ERG13 ELP6 ADH6 MVD1 MCA1</i>
Procés metabòlic d'àcid orgànic	5,64e-04	<i>DLD3 YJR111C ECM17 AAT2 ORT1</i>
Procés metabòlic	6,2e-04	<i>IDP1 ARO3 YDR051C TRP4 YDR541C HPA3 HOM3 TRP5 POX1 TDH3 ADE3 BGL2 PUT2 YIR042C URA2 CPA2 ECM17 BAT2 DCW1 FBA1 TRP3 TAL1 ERG13 SRT1 TMA29 ADH6 LEU4 YNL108C ADH1 ASN1 AOS1</i>
Regulació de la traducció	6,36e-04	<i>ADE1 SWD3 ISW1 BPL1 CCT6 TCP1 TRR1 TRP4 VPS74 ERD1 TRP2 TRP5 SEC27 RNR4 TDH3 URA2 ATG27 FBA1 TRP3 SAC1 MDL1 NMT1 TUB3 ERG13 ADH6 OCA1 YNL108C ADH1 SMP3 MCA1 NHP6A ASN1</i>
Reducció de l'oxidació	1,45e-03	<i>ATP1 IDP1 TRR1 YDR541C AFG1 DLD3 LPD1 POX1 ERV1 RNR4 TDH3 ADE3 PUT2 ERG9 DOT5 ECM17 FET3 TMA29 ADH6 FRE4 ADH1 PEX11 MET12</i>
Germinació d'espores	1,83e-03	<i>UBC1 IRR1</i>
Assimilació de ferro per reducció i transport	1,83e-03	<i>FTR1 FET3</i>
Procés biosintètic de la família d'aminoàcids aromàtics	2,01e-03	<i>ARO3 TRP4 TRP2 TRP5 TRP3</i>
Procés biosintètic de triptòfan	3,99e-03	<i>TRP4 TRP2 TRP5 TRP3</i>
Procés metabòlic de triptòfan	5,33e-03	<i>TRP5 TRP3</i>
Transducció de senyal mediat per GTPasa petita	6,89e-03	<i>GEM1 RDI1 SEC4 RGD2 YPT52 RAX2 CDC42 YPT7 RHO1</i>
Creixement filamentós	7,11e-03	<i>UGO1 DLD3 DOT6 CDC42 GAS1</i>
Procés metabòlic de proteïna cel·lular	7,46e-03	<i>TCM62 CCT6 TCP1</i>
Biogènesi i organització del citoesquelet	8,4e-03	<i>CCT6 TCP1 BUB1 CDC42 TUB3 PFY1</i>
Vesícula de fusió	9,48e-03	<i>EXO84 SEC1 SEC20 SEC4 EXO70</i>
<b>ORF de la resta de categories funcionals no sobrerepresentades</b>		
<i>ADO1 AIP1 ALG1 ALG5 APD1 APN1 AQY2 ARE1 ATF2 ATP3 BET3 BET5 BUD16 CET1 CHL1 CIS3 COD5 COF1 CTM1 CUS1 CWC2 DAD2 DAL3 DCC1 DID2 DID4 DNMI DUO1 EAF3 ECM15 ECM31 EPS1 EPT1 ERP3 ERP5 FRE4 FUM1 GAT3 GPI16 GRX5 IDS2 KEX1 KIN28 LEA1 LRO1 LSB5 MBA1 MEP1 MET22 MMM1 MNT4 MOG1 MON1 MRP7 MRPL20 MRPL35 MRPL38 MRPL6 MRPL8 MRPS17 MRPS18 MRPS9 MSC6 MSN4 NAS6 NCA2 NGL1 PET56 PEX12 PEX28 PFS2 PGD1 POB3 POP7 PSH1 PSP1 PSR1 RAD5 RAM2 REM50 RFA3 RIB5 RNA14 RUB1 SBA1 SCO1 SEC31 SFT2 SIP3 SIT1 SLA2 SMC2 SMD2 SNF4 SPC1 SPL2 TFA2 TFB4 TFG1 TPD3 TUB4 UBP13 VMA10 VMA7 VPS70 VPS9 XDJ1 YAL044W-A YAL047W-A YBR089W YBR206W YBR210W YBR219C YCK3 YDL096C YDL157C YDL176W YDL203C YDL237W YDR010C YDR031W YDR051C YDR090C YDR094W YDR117C YDR154C YDR199W YDR279W YDR521W YEL030C-A YEL045C YER074W-A YFR006W YFR024C YGL132W YGL152C YGR017W YGR073C YGR190C YGR206W YIL137C YIL157C YJL065C YJL072C YJL206C-A YJL218W YJR012C YKL056C YKL063C YKL169C YKR040C YKR065C YKR074W YLL047W YLL049W YLL053C YLR031W YLR036C YLR324W YLR326W YLR385C YMR237W YMR252C YMR265C YMR269W YNL203C YNL310C YOL007C</i>		



---

*YOL027C YOL107W YOL134C YOR352W YPL137C YPL150W YPL158C YPL264C YPL267W YPR091C  
YPR098C YPR115W YPR147C YRA2*

---

**Taula 11.** Gens amb patrons d'expressió de resposta a estrès oxidatiu i tèrmic amb inducció de la TR i valors constants o reprimits d'RA.

No es troben seqüències consens repetides en les regions 3'UTR d'aquests mRNAs, ni tampoc una sobrerepresentació significativa dels motius descrits (Hogan *et al*, 2008) reconeguts per RBPs.

### 2.1.4.- Efecte de l'estrès oxidatiu en l'estabilitat dels mRNAs

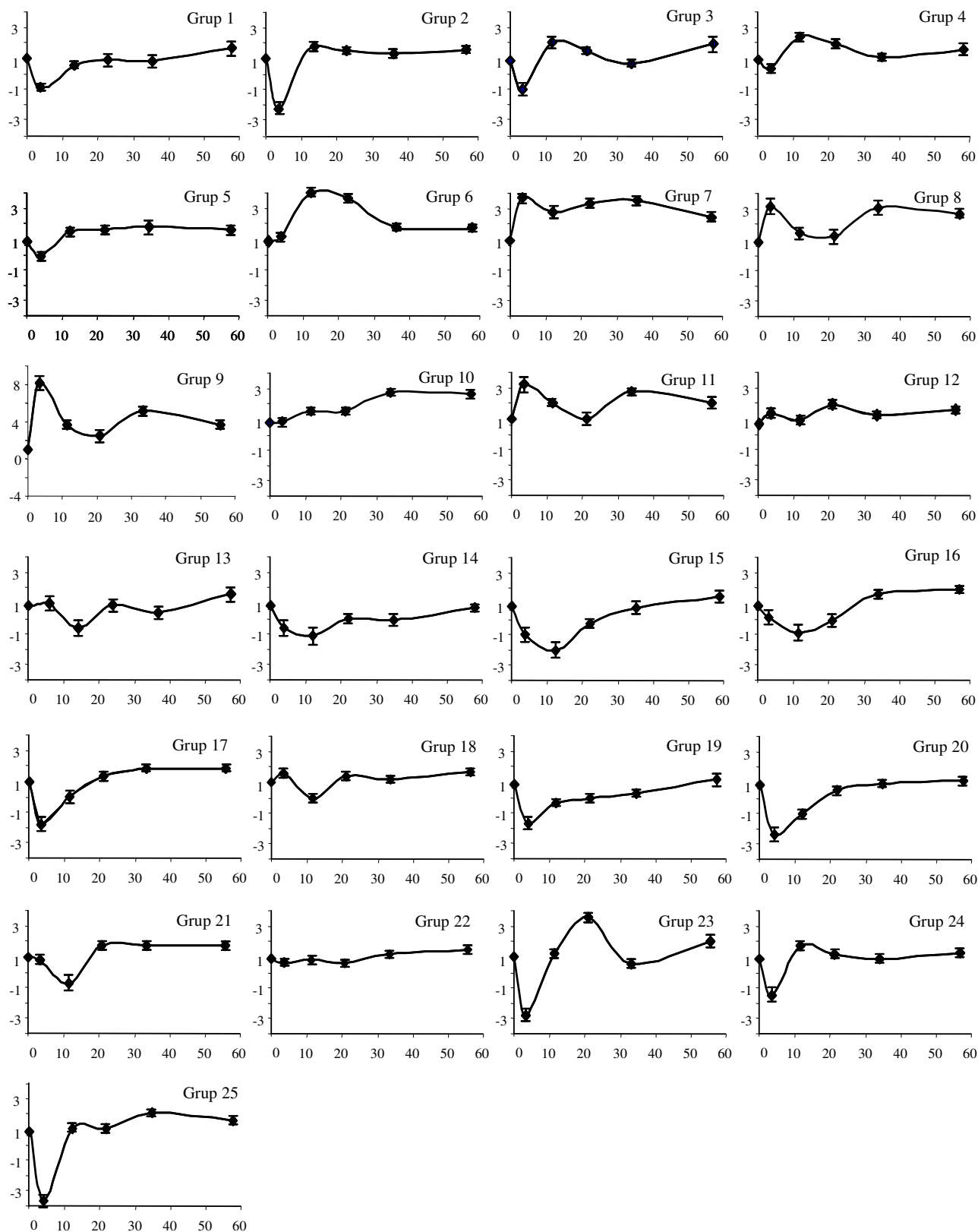
La TD en la cinètica d'estrès oxidatiu es calcula matemàticament, com en el cas d'estrès tèrmic, a partir dels valors absoluts de TR i RA normalitzats de les dades de GRO i gràcies a la formulació matemàtica que permet integrar les equacions (Perez-Ortin *et al*, 2007) per a cada interval de temps en què s'han recollit les alíquotes al llarg de l'estrès. Les dades mitjanes de cada un dels 25 grups es representa en la Il·lustració 31. La majoria dels grups mostren una alteració inicial de la seva  $k_D$ , però tendeixen a tornar als seus valors originals. Els grups 1-12, malgrat les seves diferències, tenen una  $k_D$  final superior a la inicial. Els grups 13-25 tornen a un valor gairebé idèntic al seu de  $k_D$  inicial, amb una lleugera tendència a la desestabilització.

Els grups 1-5, 14-17, 19, 20 i 23-25 es caracteritzen per tenir un pic de desestabilització en els primers minuts, seguit d'una recuperació o estabilització, en diferents graus d'intensitat. Des del sisè fins al dotzè grup, s'observa una tendència desestabilitzadora al llarg de l'estrès. Curiosament, alguns grups amb diferències gairebé imperceptibles entre els perfils de TR i RA exhibeixen perfils clarament diferents de  $k_D$  (per exemple, el 9 enfront del 10 o el 23 enfront del 24), i altres grups amb patrons d'expressió de TR i RA molt diferents (per exemple, el 7 enfront del 8) tenen perfils de  $k_D$  molt similars, la qual cosa indica que els canvis en l'estabilitat de l'mRNA no es dedueix fàcilment dels perfils de TR i RA en una situació dinàmica.

En els gens dels grups 1-5, 14-17, 19, 20 i 23-25 sembla que l'estrès causi una sobtada estabilització de l'mRNA tant si s'activa transcripcionalment o no. La conseqüència d'aquesta estabilització és que l'augment d'RA és major en els casos d'inducció de la TR i en els gens que es reprimeixen hi ha una menor disminució d'RA. En els grups 6-12, el perfil de  $k_D$  mostra un comportament oposat, una desestabilització de l'mRNA sobtada (grups 6-9, 11, 12) o tardana (grup 10).

És especialment important la contribució de la TD en els grups del 8 al 12, ja que tot i l'augment de la TR (grups 8-11), hi ha una hiperdesestabilització que compensa o fins i tot regula negativament l'RA d'aquests gens durant un estrès oxidatiu.

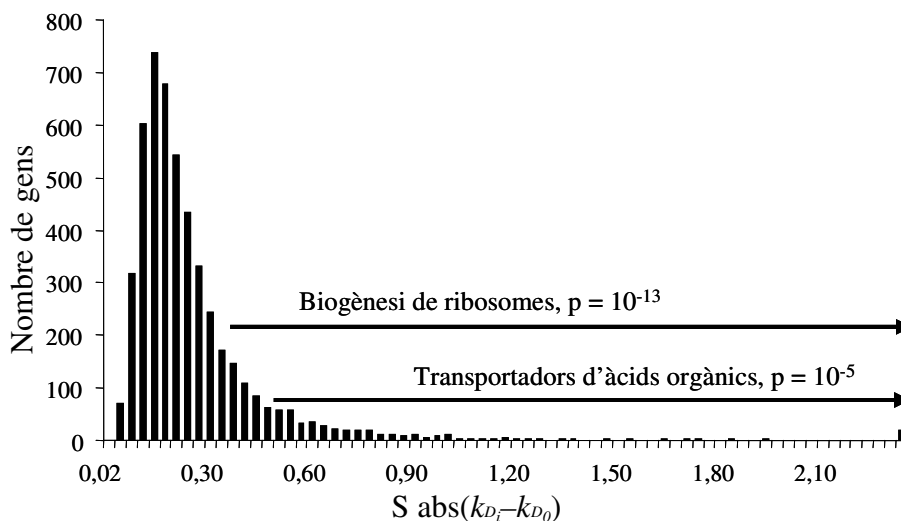
Finalment, només una petita part dels gens del llevat (211) tenen perfils  $k_D$  més o menys plans (grups 12 i 22), la qual cosa indica que la regulació de l'estabilitat de l'mRNA és una característica general (> 95%) de la resposta transcripcional a l'estrès oxidatiu.



**Il·lustració 31.** Perfils de TD dels 25 grups resultants de l'estrès oxidatiu. En els eixos d'ordenades s'hi representen els valors relatius de  $k_D$  i en els eixos d'abscisses el temps en minuts al llarg de l'estrès oxidatiu.

## Resultats

La importància de la  $k_D$  com a mecanisme de regulació s'aprecia millor quan els gens del llevat es classifiquen d'acord amb la magnitud de la desviació del valor de  $k_D$  de l'estat estacionari. Il·lustració 32. Aquesta és la primera vegada que una anàlisi detallada de l'estabilitat de l'mRNA s'ha fet en una situació dinàmica en qualsevol organisme.



**Il·lustració 32.** Histograma de totes les desviacions de les  $k_D$  inicials durant l'estrès oxidatiu. Es calcula la suma de les diferències en valors absoluts entre la  $k_D$  calculada i la  $k_D$  de l'estat d'equilibri inicial per tots els punts de tots els gens individuals. Es representen la suma dels valors distribuïts en rangs, i el nombre de gens de cada interval de rang. Quan es consideren els gens amb  $\Sigma > 0,3$  apareixen diverses categories funcionals GO relacionades amb la "Biogènesi dels Ribosomes" com estadísticament significatives (es mostra el valor  $p$ ). A més, la categoria de GO "Transports d'Àcids Orgànics" apareix com a significativa quan es considera  $\Sigma > 0,48$ .

Diversos grups mostren valors negatius de  $k_D$  estadísticament significatius en certs moments (en particular durant les primeres fases de l'experiment). Els valors negatius de  $k_D$  (els quals no tenen sentit biològic) són indicatius d'un excés d'RA final que es podria esperar d'una evolució lineal de la TR entre els valors determinats experimentalment al començament i a la fi de l'interval de temps. No tenim coneixement de cap artefacte (com un biaix metodològic o l'alliberament dels mRNAs no detectats anteriorment) que podria causar un possible augment de l'RA i afectar únicament determinats grups només en punts de temps definits. Per tant, creiem que una possible explicació dels valors negatius de  $k_D$  és que la TR no evoluciona linealment en els intervals inicials de temps durant l'estrès oxidatiu, sinó que segueix una trajectòria marcadament convexa amb un pic entre els valors determinats experimentalment. De fet, s'ha argumentat que un pic de TR transitori és una estratègia per ajustar la transcripció en una transició ràpida a un nou nivell d'mRNA després d'un canvi en el medi ambient (Perez-Ortin *et al*, 2007). En conseqüència, l'anàlisi dels perfils de  $k_D$  suggereix un pic de TR transitori (no detectat experimentalment) entre els 0 i 7 minuts i / o entre els 7 i 16 minuts.

### 2.1.5.- Les categories funcionals associades a la classificació en grups arran l'estrès oxidatiu

Com ja s'ha dit, l'mRNA dels gens relacionats funcionalment tendeixen a tenir un comportament semblant quan se sotmeten a canvis ambientals (Gasch, 2003; Wu *et al*, 2002). En la II·lustració 29 apareixen les categories funcionals segons *GO* més significatives d'alguns dels grups, amb un valor  $p \leq 5 \times 10^{-5}$ .

En la primera branca, on les TR es reprimeixen, es troben els grups 1-7, que inclouen majoritàriament gens relacionats amb la biosíntesi de macromolècules (traducció, biogènesi dels ribosomes, transcripció) i destaquen les categories funcionals segons *GO*: “ATPasa Transportadora d'Hidrogen” (grup 3), “Nucli” (grup 4), “Via Secretora” (grup 5), “Biogènesi de Ribosomes” i “Biogènesi i Organització Citoplasmàtica” (grup 6) i “Ribosomes Citosòlics” (grup 7).

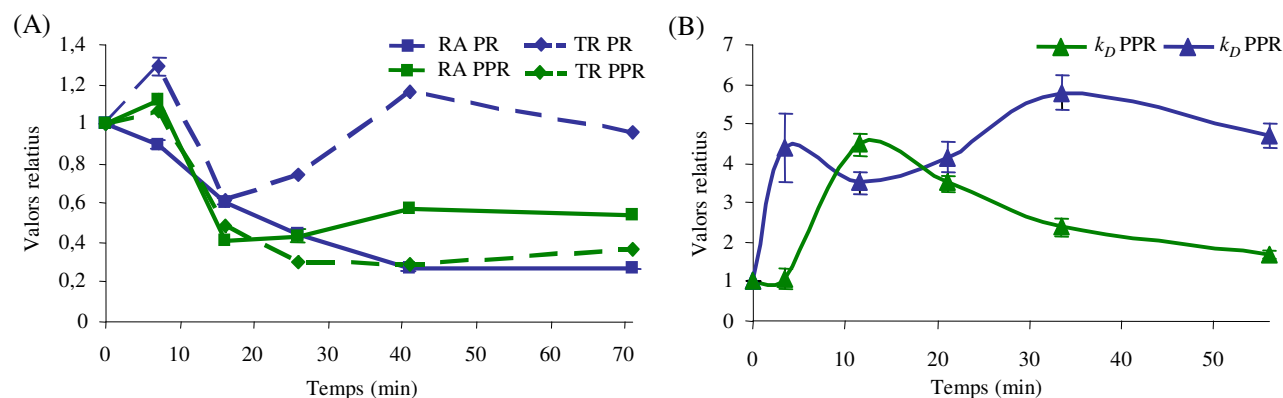
La segona branca està dividida en dues subbranques. En la primera subbranca hi ha els gens amb TR induïda i RA reprimida (corresponen als grups 8-12), per tant, té molta importància la regulació negativa posttranscripcional en els mRNAs d'aquests grups. Aquestes agrupacions estan enriquides amb categories *GO* per “Processos de Biosíntesi d'Aminoàcids”, “Activitat Oxidoreductasa” i “Metabolisme dels Àcids Carboxílics” (al grup 8) i “Mitocondri” (grup 10). En la segona subbranca hi ha els gens amb TR i RA induïts durant un estrès oxidatiu (agrupats del 13 al 25). Tenen assignades, en general, categories funcionals *GO* relacionades amb resposta a estímuls, transport d'ions i catabolisme. En concret, aquesta subbranca està enriquida amb categories funcionals de “Resposta a Estrès” (grup 15), “Metabolisme del Sofre” i “Metabolisme d'Hexosa” (grup 16), “Proteòlisi i Peptidòlisi” (grup 19), “Activitat Quinasa” (grup 20) i “Complex del Proteosoma” (grup 24).

Pel que fa doncs a les categories relacionades amb gens ribosomals i el seu processament, es coneix que els nivells d'mRNA per les PR i les PPR decreixen en un estrès oxidatiu (Gasch *et al*, 2000). S'amplien aquests estudis previs amb els paràmetres de transcripció obtinguts experimentalment amb el GRO i a la  $k_D$  matemàtica en la resposta a estrès oxidatiu (II·lustració 31). S'estudien 122 gens codificants per PR (la majoria d'ells en el grup 7 de la II·lustració 29 pels quals existien dades d'un mínim de dos experiments de cinètica d'estrès oxidatiu independents. En la II·lustració 33 es representen els valors mitjans per a tot el grup de gens.

Uns patrons semblants s'obtenen pels 135 gens codificants per la categoria funcional PPR (principalment en el grup 6 de la II·lustració 29). No obstant, la TR d'aquests gens no es recupera al llarg de l'experiment. Es prediu que l'mRNA d'aquesta categoria *GO* es desestabilitza durant l'estrès, a uns nivells superiors a la TD dels gens codificants per PR. Curiosament, una modesta regulació positiva inicial de la TR s'observa després de l'addició de l'oxidant, tant pels gens de PR, com pels de PPR.

## Resultats

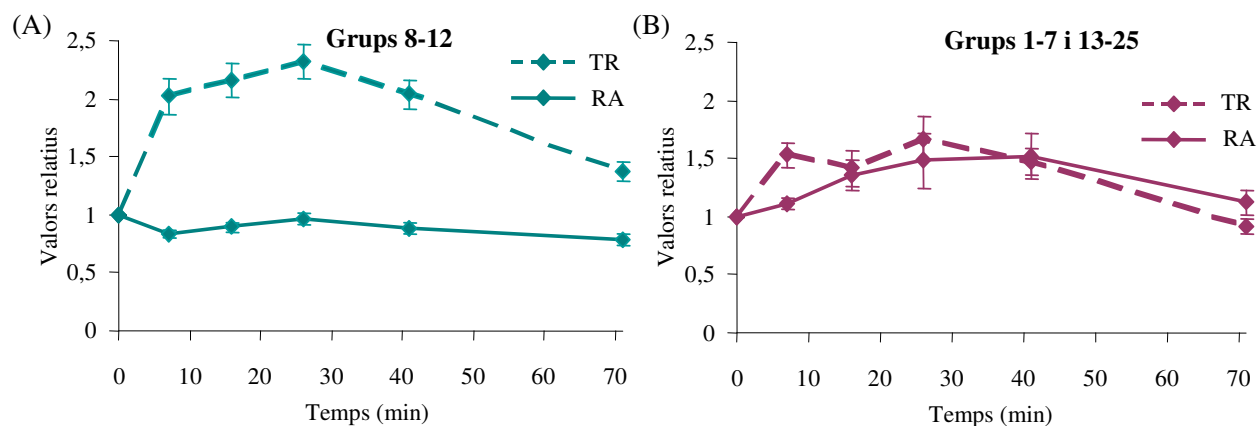
En la part (A) de la Il·lustració 33, els nivells d'mRNA descendeixen de forma constant durant els primers 40 minuts de l'estrès; després mantenen un valor constant a menys del 30% respecte a les condicions no estressants, mentre que la TR disminueix transitòriament entre els 20 i 30 primers minuts per després recuperar-se i acabar assolint el nivell inicial. Això correlaciona amb la predicció de desestabilització dels mRNAs de la part (B).



**Il·lustració 33.** Dades GRO per a les categories funcionals GO “Proteïnes Ribosomals” i “Proteïnes del Processament de l'rRNA” després d'un estrès oxidatiu. (A) Representació dels valors mitjans de TR i RA (mitjanes de les dades experimentals dels experiments de GRO) i (B) TD inferida de la cinètica d'estrès oxidatiu de la categoria PR en blau i PPR en verd.

En els grups del 8 al 12 destaca el grup 8 on es concentren les tres categories funcionals GO anteriorment esmentades. Entre aquestes es veu significativament sobrerrepresentada la categoria “Activitat Oxidoreductasa”; a més, altres membres d'aquesta categoria es troben en els grups 9-12. Com s'ha indicat abans, aquests grups mostren un augment de la TR, però no un increment d'RA. Per aprofundir en això, es divideixen els gens d'aquesta categoria en dos subgrups: (i) els pertanyents als grups 8-12 (84 gens) i (ii) aquells que s'inclouen a la resta de grups (143 gens). En la Il·lustració 34 es representen els valors mitjans de TR i RA per separat per a ambdós grups i s'observen dos comportaments diferents: els gens que mostren un paral·lelisme entre TR i RA, amb un increment modest de la TR anterior al de l'RA (grups 1-7 i 13-25) i els que mostren un increment major de la TR, mentre que mantenen força constant l'RA, fet que prediu una desestabilització dels mRNAs (grups 8-12) molt important per a la regulació negativa de l'mRNA d'aquests gens durant la resposta.

Una anàlisi *in silico* dels promotors i el 3'UTR d'aquests gens no evidencia estadísticament un enriquiment significatiu de seqüències específiques en qualsevol dels dos grups de gens. No obstant, cal destacar que fins a un terç dels gens d'aquesta categoria “Activitat Oxidoreductasa” en els grups 8-12 (que no s'han detectat en els estudis genòmics basats estrictament en l'anàlisi d'RA) contenen seqüències reconegudes pel factor de transcripció Yap1 en els seus promotors i el 40% contenen seqüències STRE reconegudes per Msn2/Msn4. La presència d'aquestes seqüències explica l'augment de TR després de l'aplicació de l'estrès.



**Il·lustració 34.** Dades GRO per a la categoria funcional *GO* “Activitat Oxidoreductasa” en l’estrès oxidatiu. Paràmetres TR i RA dels grups 8–12 (A) o dels grups 1-7 i 13-25 (B), en la cinètica d’estrès oxidatiu. Les dades de la gràfica són relatives al valor de la unitat en el  $t_0$  i les barres representen l’error estàndard per a cada temps.

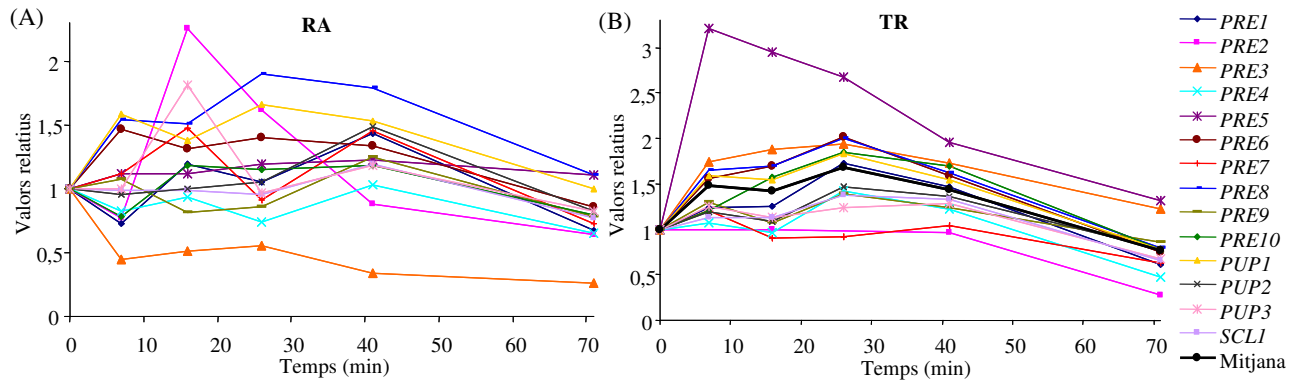
Uns perfils semblants s’obtenen pels gens codificants per la categoria funcional *GO* “Biosíntesi d’Aminoàcids” (principalment en el grup 8 de la Il·lustració 29). S’analitzen 33 gens pertanyents als grups 8-12 i 57 gens dels grups 1-7 i 13-25. Les mitjanes de la TR mostren una inducció d’aquesta al llarg de l’estrès (major en el cas dels gens dels grups 8-12), acompanyada d’un augment paral·lel de l’*mRNA* dels gens dels grups 1-7 i 13-25 (però menor a la seva TR) i d’un perfil d’RA pràcticament igual a la unitat al llarg de la cinètica d’estrès oxidatiu dels gens dels grups 8-12, el qual indica una desestabilització molt forta arran de l’estrès pels gens d’aquesta categoria en aquests 5 grups. Les categories funcionals *GO* “Metabolisme d’Àcids carboxílics” i “Mitocondri”, enriquides en els grups 8 i 10 respectivament, segueixen uns patrons de transcripció semblants.

La resposta a l’estrès ambiental causa una inducció dels *mRNAs* codificants per les subunitats del proteosoma (Gasch, 2003; Gasch *et al.*, 2000). En el cas particular de la resposta a l’estrès oxidatiu, també s’ha demostrat que moltes subunitats del proteosoma s’indueixen (Godon *et al.*, 1998). S’analitzen els perfils de 14 gens inclosos en la categoria *GO* CCP, que estan distribuïts en vuit grups diferents de la Il·lustració 29 (els grups 12 i 24 contenen tres gens d’aquesta categoria funcional cada un). En general, aquests gens tenen una TR que s’indueix ràpidament i transitòria per decreixer a temps més tardans per sota del nivell inicial, com es mostra en la Il·lustració 29. Aquest augment precedeix l’increment dels nivells d’*mRNA*.

La TR per a la majoria dels *mRNAs* que codifiquen pel CCP està coordinadament induïda immediatament després de l’estrès oxidatiu, i això és seguit per una repressió tardana. Aquest fet per si sol podria explicar el retard en els canvis paral·lels en l’RA. El comportament coordinat de TR en el CCP es pot relacionar amb el paper del factor de transcripció Rpn4 com a regulador de l’expressió de la majoria dels gens codificants pel proteosoma del llevat (Mannhaupt *et al.*, 1999). Tot i això, els perfils de l’RA són molt més variables, fet que indica que els mecanismes posttranscripcionals actuen de manera diferent en cada

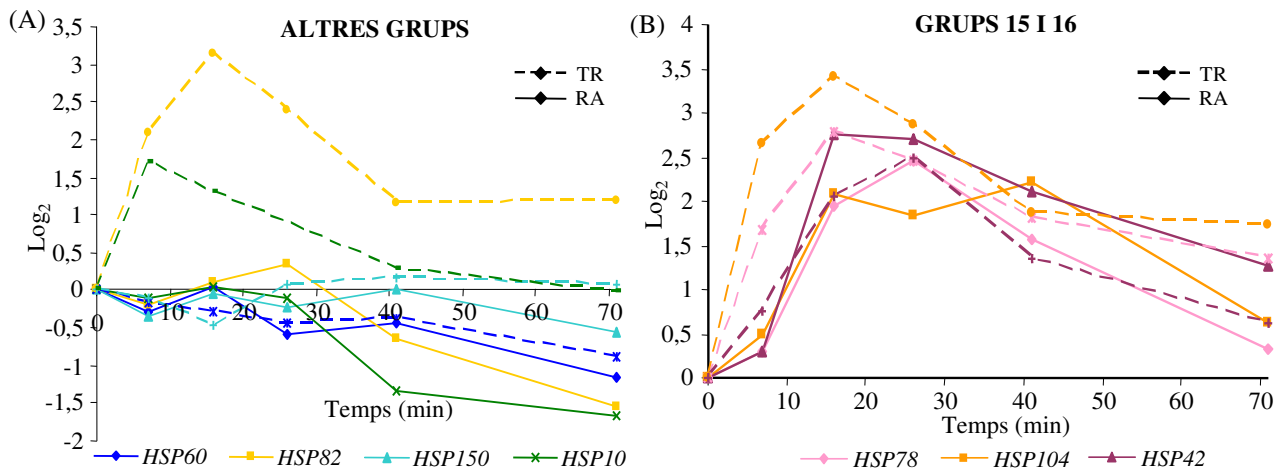
## Resultats

mRNA d'aquesta categoria funcional. L'anàlisi dels gens en la categoria funcional *GO* PRP té uns patrons molt semblants als del CCP.



**Il·lustració 35.** Dades GRO per a la categoria funcional *GO* “Complex Central del Proteosoma” en l’estrès oxidatiu. Representació dels valors relatius al  $t_0$ , (A) dels nivells d’mRNA de 14 gens corresponents a la categoria CCP i (B) la seva TR, amb els valors mitjans representats en negre en la cinètica d’estrès oxidatiu.

La resposta transcripcional a estrès oxidatiu de la categoria funcional que engloba els gens implicats en “Plegament de Proteïnes” encara és més heterogènia. Mentre que en front a l’estrès tèrmic la majoria dels mRNAs d’aquesta categoria s’indueixen, en l’estrès oxidatiu: 10 es reprimeixen (tant en TR, com en RA), 20 augmenten la seva TR, però no el seu RA (grups 8-12) i 12 s’indueixen (en quant a TR i RA). Un exemple d’aquesta diversitat és el comportament dels mRNAs de les Hsps (Il·lustració 36), ja que hi ha RAs reprimits (apartat A) i induïts (apartat B), mentre que en l’estrès tèrmic tots s’indueixen. En aquest cas: tres mRNAs s’indueixen (a nivell de TR i RA), dos s’indueixen a nivell de TR però no en RA i els altres dos tenen els dos paràmetres reprimits. La resposta transcripcional de les Hsps a l’estrès tèrmic i a l’estrès oxidatiu és un exemple del comportament divergent de l’mRNA codificant per proteïnes típiques de resposta a estrès.



**Il·lustració 36.** Paràmetres transcripcionals dels gens Hsps en els experiments GRO d’estrès oxidatiu. La TR es representa en línia discontinua i l’RA en continua. (A) Es representa en blau *HSP60* (grup 5), groc *HSP82* (grup

8), blau cel *HSP150* (grup 9) i verd *HSP10* (grup 10). (B) Es representa en rosa *HSP78* (grup 16), en taronja *HSP104* i en grana *HSP42* (grup 15).

Altres categories funcionals segons *GO* d'interès en resposta a estressos són: “Respiració Cel·lular” i “Procés Catabòlic de Glucosa”. Els gens corresponents a aquestes categories s'indueixen probablement degut a la demanda energètica en les situacions d'estrès (Causton *et al.*, 2001). També és interessant la categoria “Traducció”, ja que en resposta a estrès la síntesi de proteïnes es reprimeix transitòriament (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Proud, 2005) i s'atura la síntesi de noves proteïnes (Hinnebusch, 2005; Shenton *et al.*, 2006). Altres són “*P-bodies*” i “Grànuls d'Estrès”, els quals s'indueixen en estressos severos (Bond, 2006; Hilgers *et al.*, 2006). Seguidament es presenta una taula resum amb les dades qualitatives segons el perfil de les cinètiques d'inducció o repressió dels paràmetres transcripcionals per aquestes categories en els dos estressos analitzats.

	ESTRÈS TÈRMIC		ESTRÈS OXIDATIU	
	TR	RA	TR	RA
Respiració cel·lular	94% ↑	67% ↑	57% ↑	21% ↑
Procés catabòlic de glucosa	89% ↑	53% ↑	40% ↑	12% ↑
Traducció	40% ↓	67% ↓	90% ↓	71% ↓
Inici de la traducció	41% ↓	67% ↓	87% ↓	97% ↓
<i>P-bodies</i>	10% ↓	65% ↓	68% ↓	79% ↓
Grànuls d'estrès	40% ↓	67% ↓	80% ↓	100% ↓

**Taula 12.** Percentatge d'inducció o repressió dels paràmetres transcripcionals obtinguts segons els perfils dels patrons de resposta a estrès tèrmic i oxidatiu, en els experiments GRO. Es mostren les categories funcionals segons *GO* “Respiració Cel·lular”, “Procés Catabòlic de Glucosa”, “Traducció”, “Inici de la Traducció”, “*P-bodies*” i “Grànuls d'Estrès”.

En la Taula 12 s'observen les diferències en els paràmetres transcripcionals TR i RA en els perfils de la resposta a estrès tèrmic i oxidatiu. Respecte a l'obtenció d'energia, les dades mostren un augment transcripcional important en condicions d'estrès tèrmic, doncs el 97% dels gens presenten un increment en TR, tot i que el 67% presenta uns increments significatius en els nivells d'mRNA; en canvi, en resposta a l'estrès oxidatiu, l'augment transcripcional en general és menor i l'RA incrementa discretament (21%). Sembla ser, doncs, que els requeriments energètics serien majors en resposta a estrès tèrmics. No obstant, en tots ells existeix una clara regulació posttranscripcional, fet que reflexa el pes de l'estabilitat en el nivell d'mRNA induït. Les TRs dels mRNAs implicats en “Traducció” es reprimeixen moderadament en un estrès tèrmic, encara que les molècules transcrites d'aquesta categoria disminueixen considerablement. Per tant, en



## Resultats

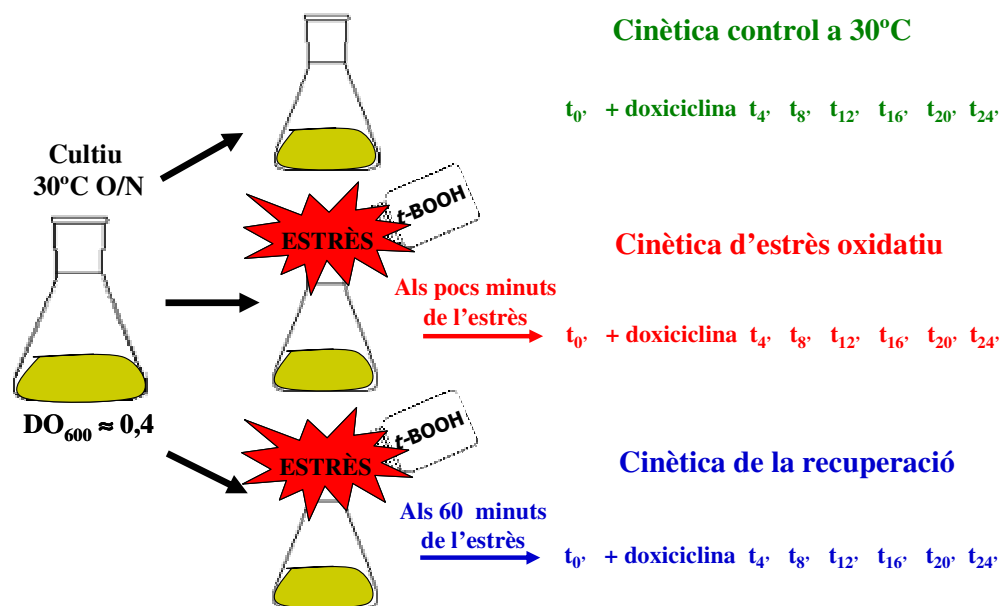
aquest cas fenòmens de desestabilització de l'mRNA regulen negativament els trànscrips inclosos en aquestes categories. En l'estrès oxidatiu, en canvi, la repressió transcripcional és molt gran i aquesta és modulada per la TD, ja que els nivells d'RA respecte als de TR no són paral·lels, doncs disminueixen més moderadament. "L'Inici de la Traducció" en aquest estrès estaria reprimit transcripcionalment gairebé en la seva totalitat i en l'estrès tèrmic es reprimeix en menor grau. En l'expressió dels gens d'aquesta categoria també es prediu que la TD influeix els seus nivells d'mRNA, ja que en cap dels dos estressos és paral·lela a la TR. Així, sembla que aquests mRNAs es desestabilitzen globalment. Les categories de "P-bodies" i "Grànuls d'Estrès" es reprimeixen en els dos estressos, tot i que en l'estrès oxidatiu ho fan en major grau. S'observa, a més, que els trànscrips d'aquestes dues categories també es desestabilitzen, per a augmentar així la repressió transcripcional, que és bastant moderada en el cas de l'estrès tèrmic.

## **2.2.- Determinació experimental de les vides mitjanes dels mRNA mitjançant l'ús del promotor *tet***

S'utilitza el promotor regulable per doxiciclina *tetO<sub>2</sub>* per substituir del promotor endogen d'alguns gens i aproximar experimentalment la vida mitjana dels mRNAs, comparant els resultats amb la TD inferida matemàticament, de la mateixa manera que s'ha fet en el cas de l'estrès tèrmic. S'elegeixen alguns gens i es construeixen les soques amb el promotor *tetO<sub>2</sub>* i l'activador (*tTA*)-repressor (*tetR-SsnB*), per poder tancar l'expressió del gen amb l'antibiòtic doxiciclina (Belli *et al*, 1998b). Es recullen alíquotes de cultiu durant una cinètica a temps curts i es processen per Northern blot. Seguidament es quantifiquen els nivells de senyal dels mRNAs i amb la representació logarítmica dels valors s'obté una recta, amb el pendent de la qual es calcula la vida mitjana de l'mRNA en qüestió.

### **2.2.1.- Disseny experimental per a l'estudi de l'estabilitat dels mRNA en resposta a l'estrès oxidatiu**

Per a cada gen, es determina la TD del seu mRNA just abans de l'estrès oxidatiu i en dos moments diferents de l'estrès, segons els valors de  $k_D$  predits per l'algorisme matemàtic arran dels experiments GRO. La cinètica triple per a la determinació experimental de les vides mitjanes dels mRNAs abans i a dos temps diferents després de l'estrès oxidatiu es mostra tot seguit.



**Il·lustració 37.** Disseny experimental per a la determinació de la vida mitjana dels mRNAs en resposta a l'estrès oxidatiu. Un total de tres cinètiques amb l'addició de doxiciclina a 10  $\mu\text{g/ml}$  de concentració final sense agent oxidant, als pocs minuts d'afegir *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM i als 60 minuts després de l'estrès oxidatiu (explicat en la Il·lustració 27).

## 2.2.2.- Determinació de les vides mitjanes dels mRNAs en resposta a l'estrès oxidatiu

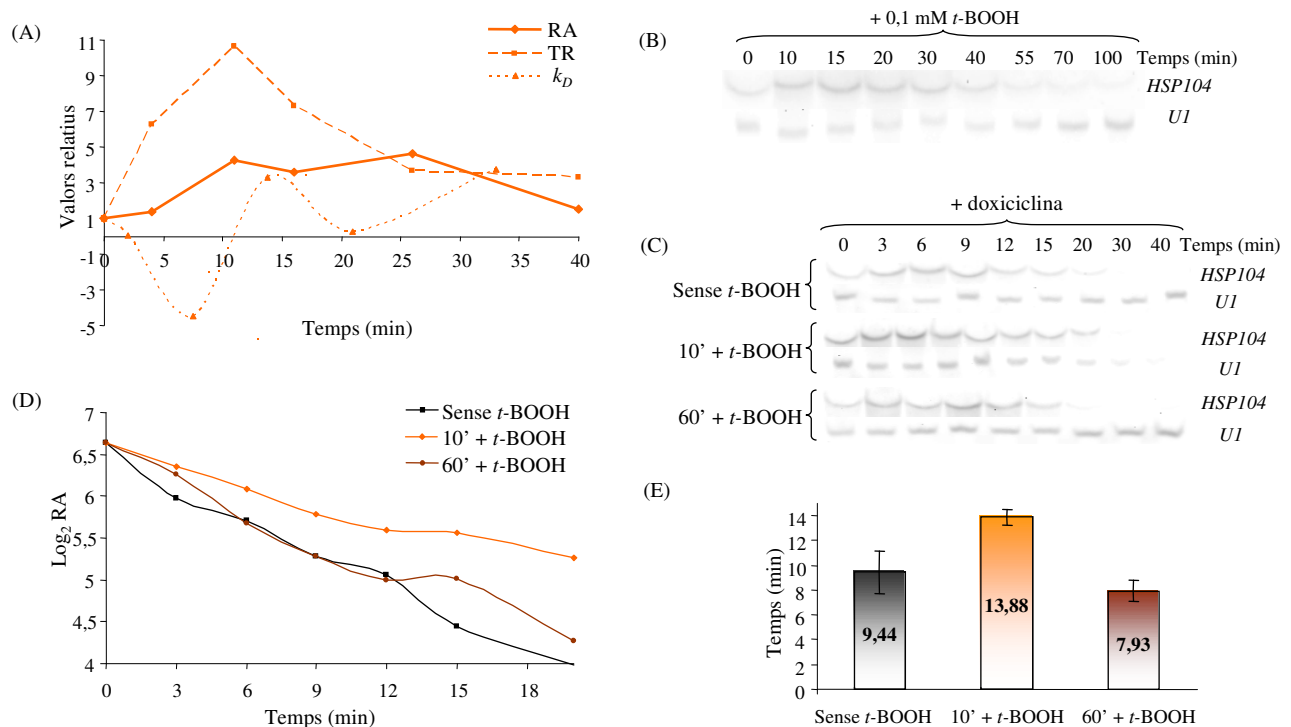
### 2.2.2.1.- Exemples d'mRNAs que s'estabilitzen arran de l'estrès oxidatiu

S'escullen diversos gens amb una TD que prediu que el seu mRNA s'estabilitza arran d'un estrès oxidatiu. Les xaperones de xoc tèrmic codificades per *HSP42* i *HSP104* estan localitzades en els grups 15 i 16, respectivament (Il·lustració 29). En ambdós casos, l'RA i la TR, determinats en l'experiment de GRO, augmenten transitòriament després de l'addició de l'agent oxidant i minven a prop dels valors originals en els últims temps de la cinètica (Il·lustració 39 i Il·lustració 38, respectivament). L'increment de la TR precedeix al de l'RA i matemàticament es prediu per als grups 15 i 16 que les molècules d'mRNA s'estabilitzen transitòriament en els temps inicials a l'aparició de l'estrès. Les diferències entre els gens en les agrupacions 15 i 16 depenen bàsicament del fet que la TR té una inducció més intensa en el grup 16 (Il·lustració 29).

La TR de l'mRNA de la xaperona Hsp104 s'indueix en un estrès oxidatiu i també el seu RA, que ho fa de manera sostinguda des dels 10 fins gairebé els 40 minuts de l'estrès. Aquesta inducció es veu en els experiments de GRO i també en l'anàlisi per Northern blot (apartat A i B de la Il·lustració 38). En canvi les dades de  $k_D$  inferides pels gens del grup 16 marquen un màxim d'estabilització cap als 10 minuts de l'addició de l'oxidant (Il·lustració 31) i en el cas dels valors de TD per aquest mRNA individual oscil·len al

## Resultats

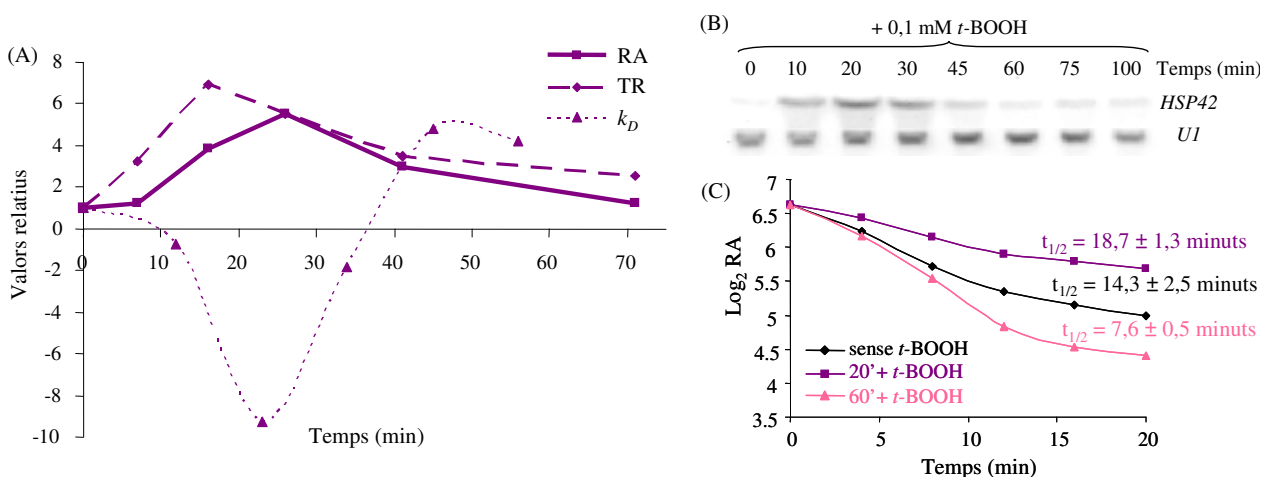
llarg de la cinètica en resposta a estrès, conservant, tot i això, conserven aquest màxim (apartat A de la Il·lustració 38). Per estimar la vida mitjana d'aquest mRNA es construeix una soca on el promotor endogen d'aquest gen és substituït pel promotor *tetO<sub>2</sub>* per poder fer experiments de cinètiques triples de l'apagada regulada de l'expressió del gen. Com és d'esperar, les TD inicials segueixen una cinètica de primer ordre (Hargrove *et al*, 1991), i la vida mitjana es calcula a partir dels pendents de les corbes logarítmiques. Els resultats mostren un augment transitori de la mitja vida de l'mRNA durant l'estrès oxidatiu, ja que sense estrès és de 9,44 minuts, als 10 minuts de l'estrès puja a 13,88 i als 60 minuts es recupera (té una vida mitjana de 7,93 minuts aproximadament). A més, aquest fet concorda amb què la  $k_D$  teòrica als 60 minuts es manté més elevada que al  $t_0$ , mostrant una suau desestabilització.



**Il·lustració 38.** Dades de transcripció de l'mRNA d'*HSP104* en resposta a l'estrès oxidatiu. (A) Valors mitjans d'RA, TR i  $k_D$  obtinguts en els experiments GRO. (B) Cinètica d'addició de *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM analitzada mitjançant Northern blot amb la sonda d'*HSP104* i *UI* com a control de càrrega. (C) Cinètiques de tancament de l'expressió del gen *HSP104*, en les cèl·lules *tetO<sub>2</sub>-HSP104/tetR'* (MML863): abans de l'estrès i als 10 i 60 minuts de l'estrès, realitzat de la mateixa manera que en l'apartat (B). (D) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació de la desaparició de les bandes d'mRNA en les tres cinètiques, respecte al temps. (E) Representació en diagrama de barres de la vida mitjana de l'mRNA d'*HSP104* en els tres casos exposats. Les barretes corresponen a l'error estàndard de les quantificacions del pendent de la degradació d'aquest mRNA.

Mitjançant Northern blot es confirma que el nivell màxim d'inducció de l'mRNA que codifica per Hsp42 és al voltant dels 20 minuts després de l'estrès oxidatiu (part B de la Il·lustració 39), seguint una

cinètica similar a la de l'experiment de GRO (apartat A). La vida mitjana de l'mRNA d'*HSP42* es determina abans de l'estrès i als 20 i 60 minuts després de l'addició de l'agent oxidant. Amb un valor de vida mitjana de 14,3 minuts en els cultius en fase de creixement exponencial, aquesta xifra augmenta a 18,6 minuts després dels 20 minuts de l'aplicació de l'estrès, per disminuir a 7,6 minuts als 60 minuts de les condicions d'estrès (part C de la II·lustració 39). És a dir, l'mRNA d'*HSP42* inicialment s'estabilitza i en temps més tardans es desestabilitza. Tant l'estabilització primerenca, com la desestabilització final confirmen les prediccions matemàtiques del gen (apartat A, II·lustració 39) i del conjunt del grup 15 (II·lustració 31).

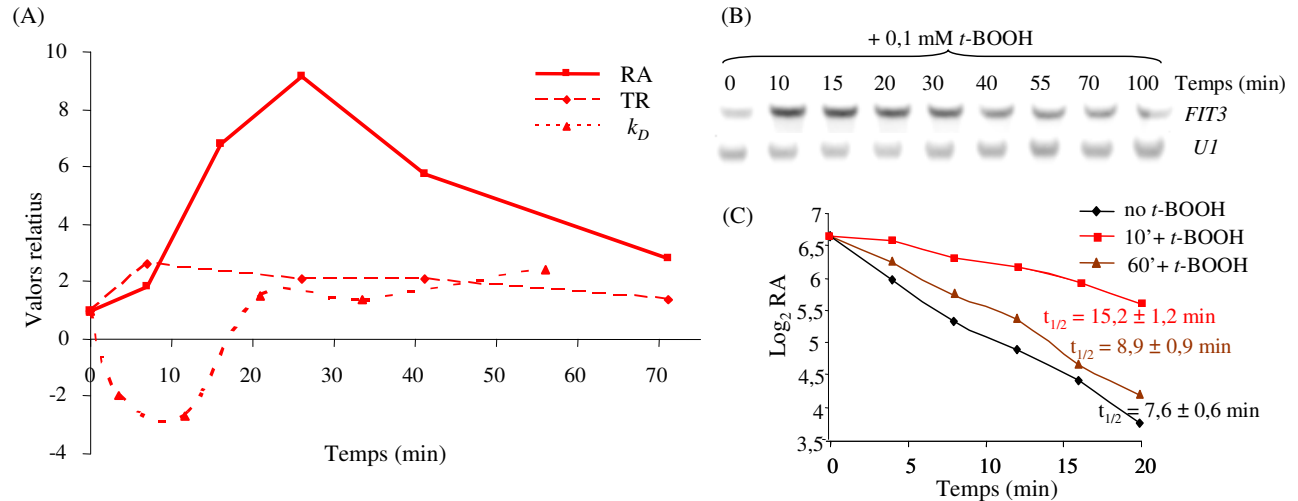


**II·lustració 39.** Resultats obtinguts per l'mRNA d'*HSP42* en l'estudi de l'efecte de l'estrès oxidatiu. (A) Dades d'RA, TR i  $k_D$ . La representació gràfica es fa amb les mitjanes dels experiments GRO relativitzant els valors a la unitat i respecte el  $t_0$ . (B) Northern blot de la cinètica de l'addició de l'agent oxidant amb les sondes d'*HSP42* i del control de càrrega *UI*. (C) Representació del logaritme en base 2 de la quantificació de les cinètiques de tancament de l'expressió d'*HSP42* en les tres condicions, abans de l'estrès i als 20 i 60 minuts després de l'estrès oxidatiu en la soca *tetO<sub>2</sub>-HSP42/tetR'* (MML980). També apareixen els valors mitjans de vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) d'aquest mRNA en els tres casos i l'error estàndard calculat en les quantificacions realitzades.

Els membres dels grups 19 i 20 experimenten un augment molt més alt i ràpid de la TR i l'RA en un estrès oxidatiu (II·lustració 29). En conseqüència amb aquests patrons d'expressió es preveu una estabilització temporal dels mRNAs en aquests dos grups (II·lustració 31). Dins el grup 20 es troba el gen *FIT3*, que mostra una intensa inducció transitòria dels nivells d'mRNA en resposta a *t*-BOOH (apartat A i B de la II·lustració 40). El producte de *FIT3* és una mannoproteïna de la paret cel·lular que uneix sideròfors quelants de ferro, i per tant, facilita l'absorció de ferro (Protchenko *et al*, 2001). Utilitzant la construcció *tetO<sub>2</sub>-FIT3* es determina que la vida mitjana de l'mRNA de *FIT3* als 10 minuts de l'estrès oxidatiu gairebé es duplica respecte a les condicions no estressants (ja que passa de 7,64 minuts sense estrès, a 15,15

## Resultats

minuts), mentre que 60 minuts després de l'addició de l'agent oxidant la vida mitjana d'aquest mRNA torna a un nivell semblant al de les cèl·lules sense tractar (apartat C, Il·lustració 40). Això confirma que l'estabilització inicial predita per l'mRNA de *FIT3* contribueix a augmentar el grau d'inducció transitòria dels seus nivells d'mRNA.

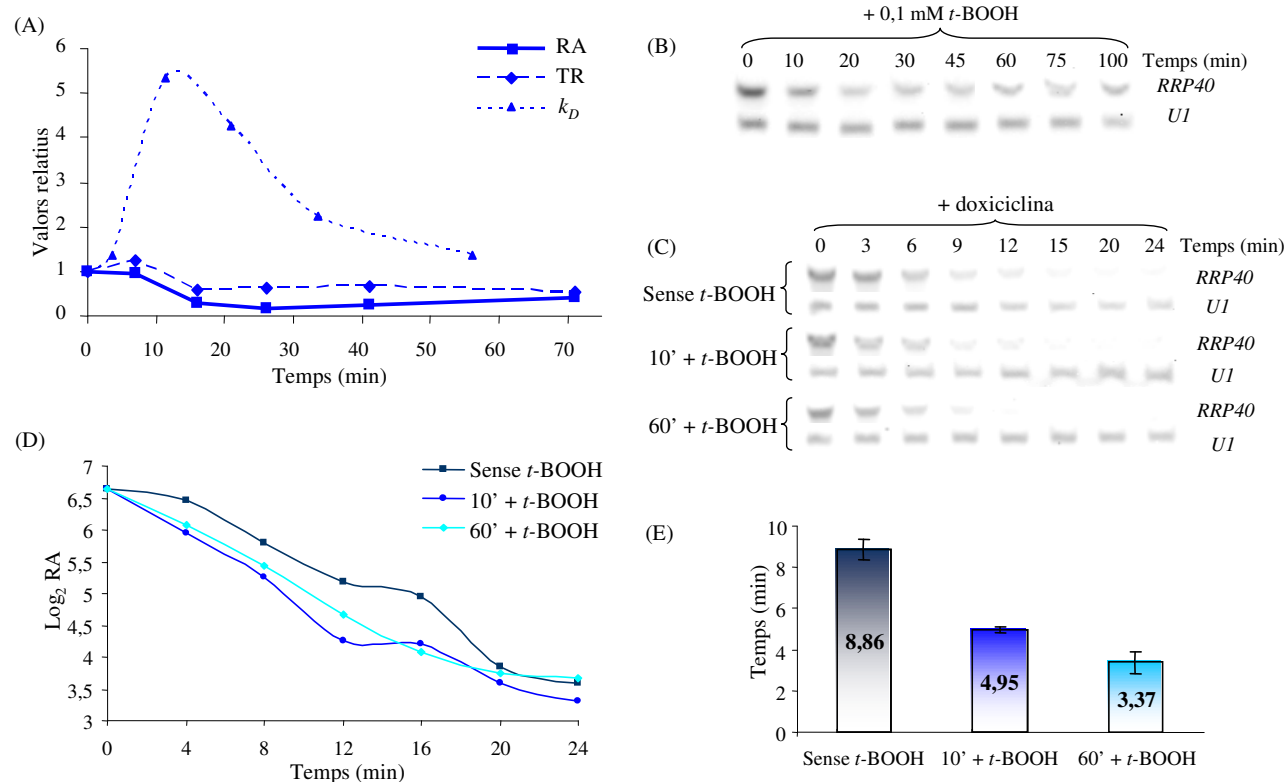


**Il·lustració 40.** Paràmetres de transcripció del gen *FIT3* durant l'estrès oxidatiu amb *t*-BOOH. (A) Dades d'RA, TR i  $k_D$  pel gen *FIT3*. La representació gràfica es fa amb les mitjanes dels experiments GRO i, també, amb la TD matemàtica predita, relativitzant els valors a la unitat i respecte el  $t_0$ . (B) Northern blot de la cinètica d'estrès oxidatiu per al gen *FIT3* i el control de càrrega *U1*. (C) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació del tancament de l'expressió de *FIT3*, en la soca *tetO<sub>2</sub>-FIT3/tetR'* (MML990) respecte al  $t_0$ , en un cultiu creixent exponencialment als 10 minuts de l'addició de *t*-BOOH i als 60 minuts posteriors a aquest estrès. S'hi inclou la vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) d'aquest mRNA en els tres casos, amb l'error estàndard de les quantificacions realitzades.

### 2.2.2.1.- Exemples d'mRNAs que es desestabilitzen arran de l'estrès oxidatiu

El model matemàtic emprat en aquest treball prediu una desestabilització temporal dels mRNAs dels gens inclosos al grup 6 (Il·lustració 31), entre altres. En aquest grup hi ha un enriquiment de gens codificants per a proteïnes de la categoria funcional GO PR i PPR. S'estudia experimentalment aquesta predicció pels paràmetres de transcripció del gen *RRP40* (de la categoria PPR). Les dades de TR i RA obtingudes mitjançant la tècnica de GRO disminueixen en paral·lel a la previsió de desestabilització transitòria de les molècules d'mRNA (apartat A, Il·lustració 41) arran de l'estrès. S'analitza l'efecte en els nivells d'mRNA en un cultiu de cèl·lules salvatges després de l'addició de *t*-BOOH i es processen alíquotes per Northern blot, els resultats obtinguts confirmen la repressió del transcrit d'*RRP40* en aquest estrès (apartat B, Il·lustració 41). Seguidament es realitza una cinètica triple d'apagada d'expressió de la soca que expressa *RRP40* sota el promotor *tetO<sub>2</sub>* afegint doxiciclina al medi, en un cultiu sense tractament i en dos

altres cultius tractats, a un parell de temps diferents, posteriors a l'addició de l'estrès (apartat C, Il·lustració 41). D'aquesta manera es demostra que l'mRNA d'*RRP40* es desestabilitza dràsticament després de la imposició de l'estrès, ja que en condicions no estressants aquest mRNA té una vida mitjana de 8,7 minuts i en les cèl·lules estressades disminueix fins a 4,7 i 3,4 minuts, als 10 minuts i als 60 minuts posteriors a l'estrès oxidatiu, respectivament (apartats D i E, Il·lustració 41). Així, el treball experimental utilitzant el sistema del promotor *tet* regulable corrobora la predicció de la inducció de la desestabilització de l'mRNA en resposta a l'estrès oxidatiu.

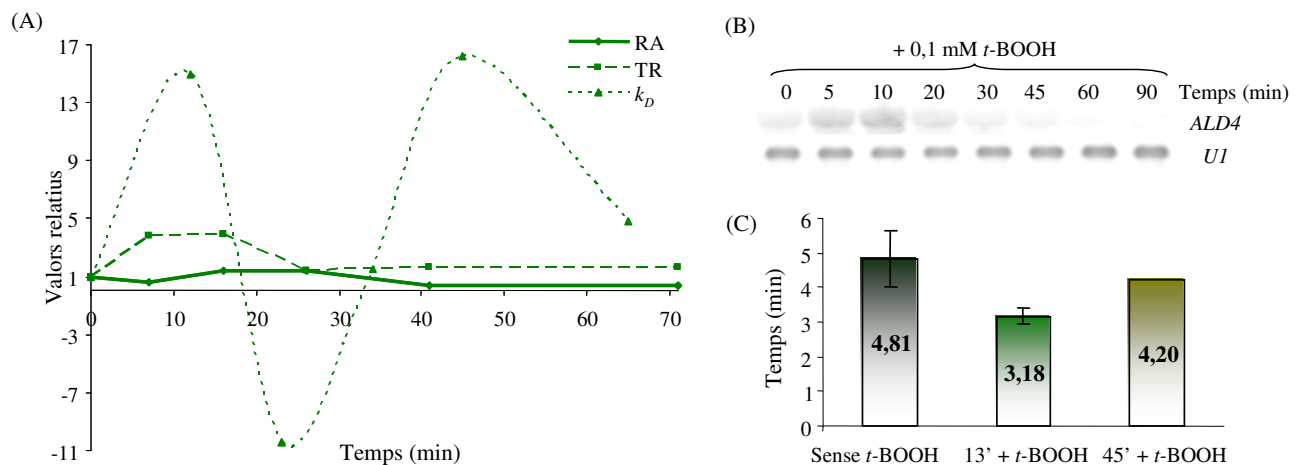


**Il·lustració 41.** Dades del transcrit *RRP40* en l'estrès oxidatiu. (A) Valors mitjans d'RA i TR determinats en els experiments GRO i  $k_D$  inferida matemàticament a partir d'aquests. (B) Cinètica d'estrès oxidatiu amb *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM analitzada per Northern Blot utilitzant la sonda d'*RRP40* i *U1* com a control de càrrega. (C) Anàlisi de la cinètica triple de tancament de l'expressió del gen en les cèl·lules *tetO<sub>2</sub>-RRP40/tetR'* (MML957): abans de l'estrès i als 10 i 60 minuts d'afegir l'agent oxidant. (D) Representació gràfica del logaritme en base 2 de la quantificació de la desaparició de les bandes d'mRNA en les tres cinètiques, respecte al temps. (E) Representació en diagrama de barres de les vides mitjanes de l'mRNA d'*RRP40* obtingudes en els tres cinètiques; s'assenyala en cada cas l'error estàndard.

Així doncs, es demostra que l'mRNA d'*RRP40* es reprimeix i es desestabilitza. Encara és més interessant el cas dels gens agrupats en els grups 8-12, els quals tenen una inducció de la TR i en canvi el seu mRNA es desestabilitza. Per estudiar aquesta particularitat s'escull el gen *ALD4*, una aldehyd

## Resultats

deshidrogenasa mitocondrial de la categoria funcional *GO* “Activitat Oxidoreductasa”. Aquest gen pertany al grup 10 (II·lustració 29) i en la II·lustració 31 es pot veure la predicció matemàtica de la seva  $k_D$ , la qual augmenta al llarg de l'estrès, indicant que els mRNAs d'aquest grup tendeixen a la desestabilització després de l'estrès oxidatiu. En l'apartat (A) de la II·lustració 42 s'observen les diferències copsades en els experiments de GRO entre la inducció de TR i d'RA; la primera molt més intensa que la segona. Per Northern blot es veu l'augment discret dels nivells d'mRNA d'*ALD4* en la cinètica d'estrès oxidatiu (apartat B, II·lustració 42). Per tant hi ha una certa inducció d'aquest gen, però no és paral·lela a l'increment de TR. Els experiments del càlcul de vides mitjanes amb la soca que té el promotor endogen substituït es mostren en l'apartat C de la II·lustració 42. La vida mitjana de l'mRNA d'*ALD4* en condicions no estressants és d'aproximadament 4,8 minuts. Després de l'estrès baixa (concretament fins a 3,18 als 13 minuts de l'addició del *t*-BOOH) i als 45 minuts de l'estrès oxidatiu aquest mRNA té una vida mitjana de 4,20 minuts. D'aquesta manera es ratifica la desestabilització d'un gen inclòs en els grups 8-12, tot i que el seu mRNA té una vida mitjana curta (al voltant de 5 minuts) i experimentalment és complicat determinar diferències inferiors a 1 o 2 minuts.



**II·lustració 42.** Paràmetres de la transcripció del gen *ALD4* en l'estrès oxidatiu. (A) Representació gràfica de les mitjanes d'RA, TR i  $k_D$ , determinades amb els experiments GRO; la relativització dels valors es fa respecte a la unitat i al  $t_0$ . (B) Northern blot de la cinètica de l'addició de *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM, en una soca salvatge i amb les sondes d'*ALD4* i el control *U1* de càrrega. (C) Histograma de les vides mitjanes d'aquest mRNA en la soca *tetO<sub>2</sub>-ALD4/tetR'* (MML1042) abans de l'estrès i als 13 i 45 minuts després de l'estrès oxidatiu. Les barres indiquen l'error estàndard entre els tres experiments de cinètiques de tancament duts a terme.

## **3a PART**

**Modulació del reguló Aft1 en resposta a  
l'estrès oxidatiu**

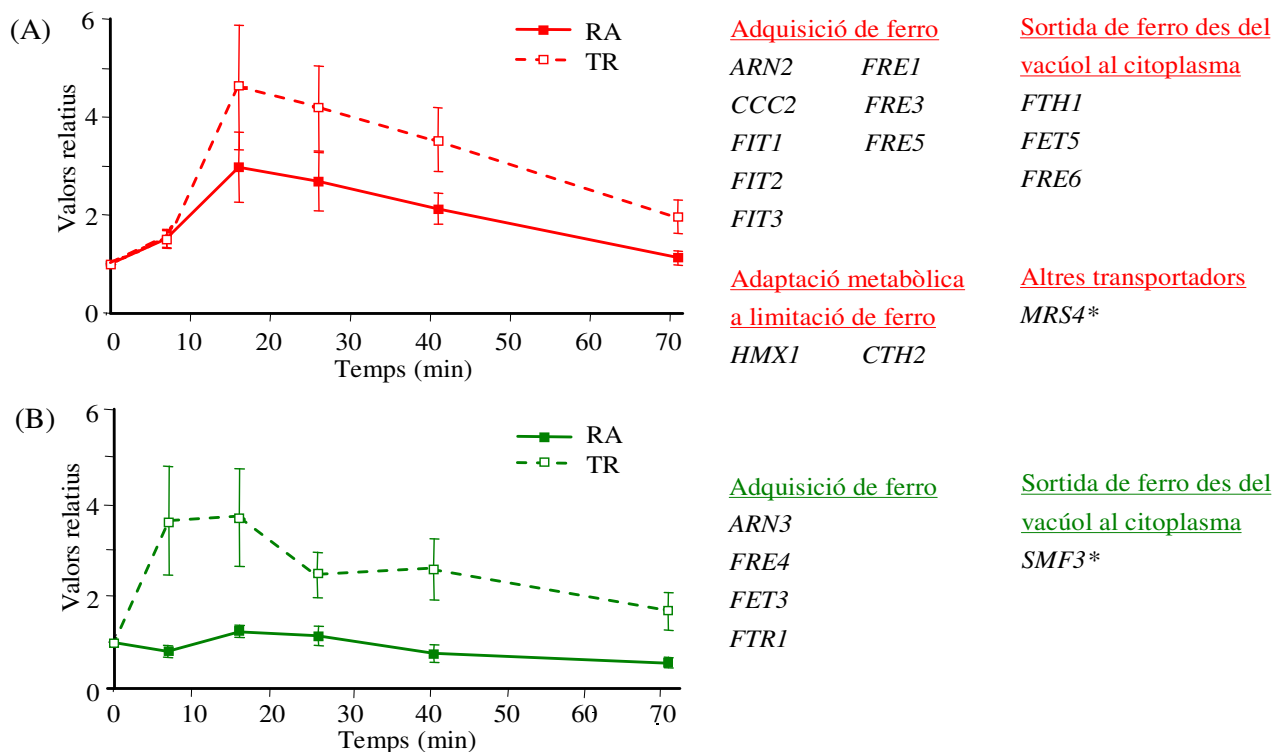




### 3.1.- Implicació del factor transcripcional Aft1 en resposta a l'estrès oxidatiu

#### 3.1.1.- L'estrès oxidatiu indueix la transcripció dels gens involucrats en el sistema d'alta afinitat de captació de ferro

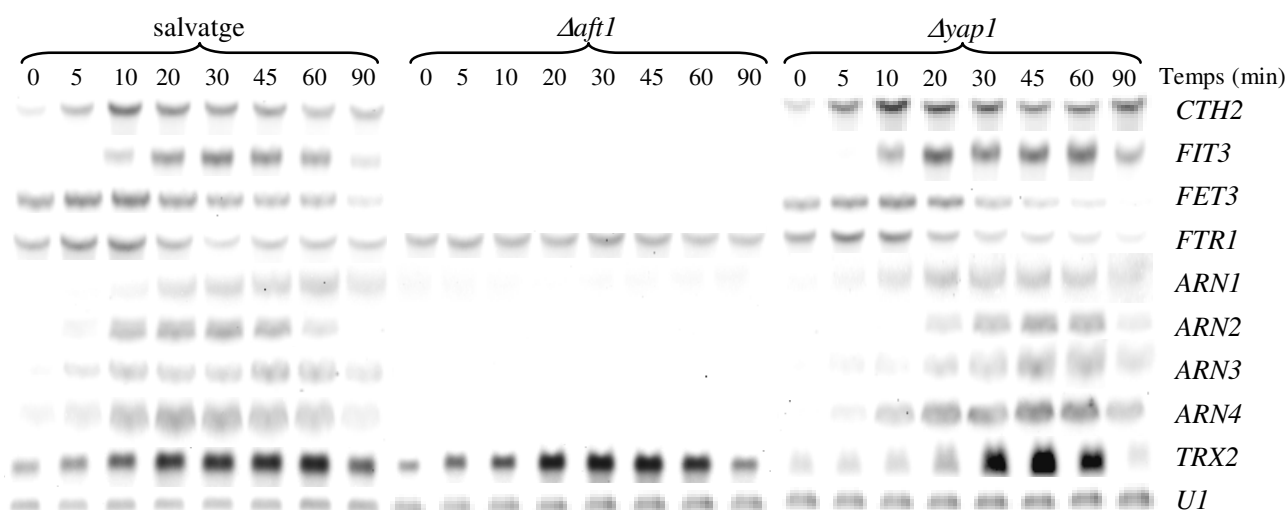
L'estudi de la resposta transcripcional a estrès oxidatiu del llevat *S. cerevisiae* utilitzant la tècnica GRO indica que un gran nombre dels gens que constitueixen el sistema d'alta afinitat de captació de ferro dependents d'Aft1 tenen la TR induïda arran de l'addició de *t*-BOOH al medi de cultiu. En estudiar en profunditat els membres del reguló Aft1 es detecten dos patrons ben definits d'aquests gens durant la resposta transcripcional a l'estrès oxidatiu. Un grup presenta una regulació positiva i transitòria de la TR i simultàniament s'observa l'increment temporal de l'RA (apartat A de la Il·lustració 43). L'altre grup té també un augment de la TR, però l'RA es manté bàsicament constant, pronosticant una forta desestabilització d'aquests mRNAs (apartat B, Il·lustració 43). Hi ha uns pocs gens, però que també pertanyen al reguló Aft1 (com *FRE2*, *FRE7* i *VHT1*) que mostren una disminució de la TR paral·lela a un desens de l'RA al llarg de la cinètica d'estrès segons els experiments de GRO.



**Il·lustració 43.** Dades de la resposta a estrès oxidatiu dels gens diana d'Aft1/Aft2 analitzats per GRO. Els gens regulats preferentment per Aft2 es marquen amb asteriscs. Només es consideren els gens pels quals existeixen valors de GRO en la cinètica de resposta a estrès oxidatiu (o com a màxim que en falti un punt) en almenys dos experiments independents. (A) Gens que regulen positivament els nivells d'RA de TR al llarg de la resposta. (B) Gens que tenen la TR induïda, però no l'RA durant l'estrès oxidatiu.

## Resultats

Per confirmar les dades GRO, s'analitza per Northern blot l'expressió d'alguns mRNAs representatius del reguló de ferro després d'afegir *t*-BOOH en condicions normals de ferro (medi YPD). Se sap que tots els gens provats són regulats per Aft1 (Philpott i Protchenko, 2008; Shakoury-Elizeh *et al*, 2004) i alguns d'ells també per Aft2 (Blaiseau *et al*, 2001). Alguns d'aquests gens s'indueixen ràpidament i de forma transitòria, arribant aproximadament a un màxim als 10 minuts de l'estrès per després tornar als nivells basals (*CTH2*) o inferiors (*FET3*, *FTR1*) als 60 minuts després de l'estrès (II·lustració 44). Els membres de la família ARN i *FIT3* presenten uns nivells basals d'expressió gairebé indetectables en condicions fisiològiques, i s'indueixen més tardanament, al voltant dels 30 minuts de l'estrès, per després tornar als nivells basals. Amb aquest experiment es demostra la dependència d'Aft1 en l'expressió d'aquests gens durant l'estrès oxidatiu.



**II·lustració 44.** Expressió dels gens del reguló d'Aft1 en les soques salvatge,  $\Delta aft1$  i  $\Delta yap1$  arran de l'estrès oxidatiu. Processament per Northern blot de cinètiques d'estrès oxidatiu provocat per l'addició de 0,1 mM de *t*-BOOH en cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD. S'utilitzen les sondes d'alguns gens regulats per Aft1. S'inclouen també la sonda de *TRX2* com un gen control de la resposta antioxidant dependent de Yap1 i la d'*UI* com un control de càrrega. Les soques utilitzades són: W303-1A (tipus salvatge), MML348 ( $\Delta aft1$ ) i W303yap1 ( $\Delta yap1$ ).

Els gens estudiats es poden dividir en dos grups segons el grau d'inducció soferta, que són qualitativament concordants amb les dades GRO esmentades anteriorment: els que tenen un notable augment en els nivells d'mRNA (d'almenys 4 vegades respecte als nivells basals) on s'hi troben *CTH2*, *FIT3*, *ARN1*, *ARN2* i *ARN4*, i els que augmenten discretament els nivells d'mRNAs fins només 1,5-1,8 vegades. Aquest últim inclou *FTR1*, *FET3* i *ARN3*. *TRX2*, un gen conegut per la seva forta inducció en resposta als oxidants, ha estat utilitzat com a gen control de l'estrès (II·lustració 44).

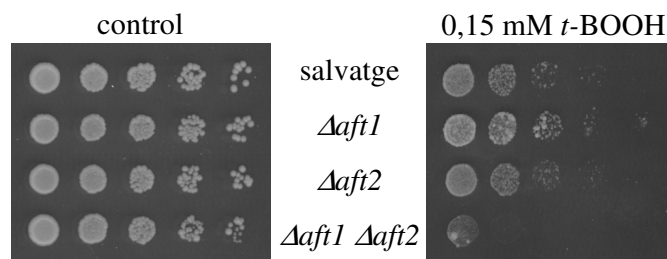
La inducció transcripcional d'aquests gens en resposta a l'estrès oxidatiu no es produeix en un mutant  $\Delta aft1$  (II·lustració 44), la qual cosa indica que aquesta inducció depèn exclusivament del factor Aft1.

Els nivells basals d'*FTR1*, però, no disminueixen en absència d'*AFT1*, tot i que la regulació positiva i modesta que presenta transitòriament en les cèl·lules salvatges després de l'estrès se suprimeix.

Com que el factor de transcripció Yap1 és el principal regulador de la resposta a estrès oxidatiu en *S. cerevisiae* (Moye-Rowley, 2003) s'analitza també l'expressió dels gens dependents d'Aft1 en un mutant  $\Delta yap1$ . En tots els casos l'expressió gènica després d'afegir *t*-BOOH és semblant a la de les cèl·lules salvatges (només *ARN2-4* endarrerixen uns minuts el seu pic d'inducció en absència de Yap1), contràriament al gen *TRX2*, regulat per Yap1, l'expressió del qual resulta més endarrerida i menys sostinguda en el temps en el mutant  $\Delta yap1$  (II-lustració 44). Aquests resultats constaten que la regulació dels gens del reguló Aft1 durant un estrès oxidatiu és totalment dependent d'Aft1 i dona suport a la separació entre el reguló Aft1 i el reguló Yap1 en condicions d'estrès oxidatiu.

### 3.1.2.- Importància dels factors de transcripció Aft1 i Aft2 en resposta a l'estrès oxidatiu

La manca dels gens *AFT1* i *AFT2* dona hipersensibilitat a peròxid d'hidrogen (Blaiseau *et al*, 2001). En el fons genètic W303 es revalida que els mutants simples  $\Delta aft1$  i  $\Delta aft2$  no mostren diferències de creixement relatives a les de les cèl·lules de tipus salvatge en plaques d'YPD amb *t*-BOOH, mentre que la soca doble mutant és hipersensible a aquest agent (II-lustració 45). Així, almenys Aft1 o Aft2 són necessaris per a l'òptima tolerància a *t*-BOOH.



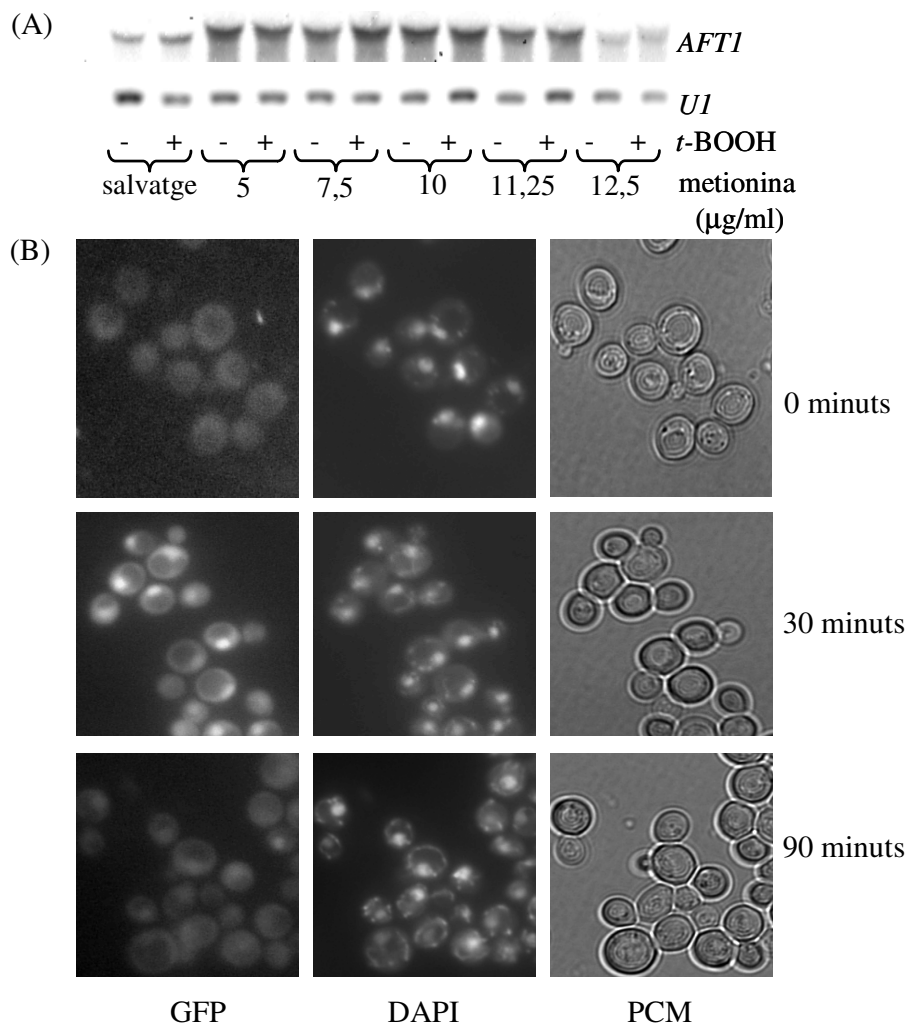
**II-lustració 45.** Assajos de creixement en dilucions seriades en plaques YPD amb 0,15 mM de *t*-BOOH en les socs: W303-1A (soca salvatge), MML348 ( $\Delta aft1$ ), MML1086 ( $\Delta aft2$ ) i MML1088 ( $\Delta aft1 \Delta aft2$ ).

### 3.1.3.- L'estrès oxidatiu afecta transitòriament la compartimentació d'Aft1

La funció d'Aft1 està regulada per la seva compartimentació nuclear en condicions de restricció de ferro cel·lular (Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002). Per tant, per confirmar si es produeix l'activació d'Aft1 durant l'estrès oxidatiu es fa un seguiment de la seva localització cel·lular després d'aquest estrès. Per això es construeix una versió d'Aft1 etiquetada amb GFP (*GFP-AFT1*) en un plàsmid centromèric. Aquest es transforma en una soca  $\Delta aft1$  i s'empra per al seguiment de la localització subcel·lular de la proteïna *in vivo* després de l'estrès oxidatiu, mitjançant microscòpia de fluorescència. Aquesta versió d'Aft1 està sota el control transcripcional del promotor *MET25* en lloc de l'endogen. Es comproven els nivells d'mRNA

## Resultats

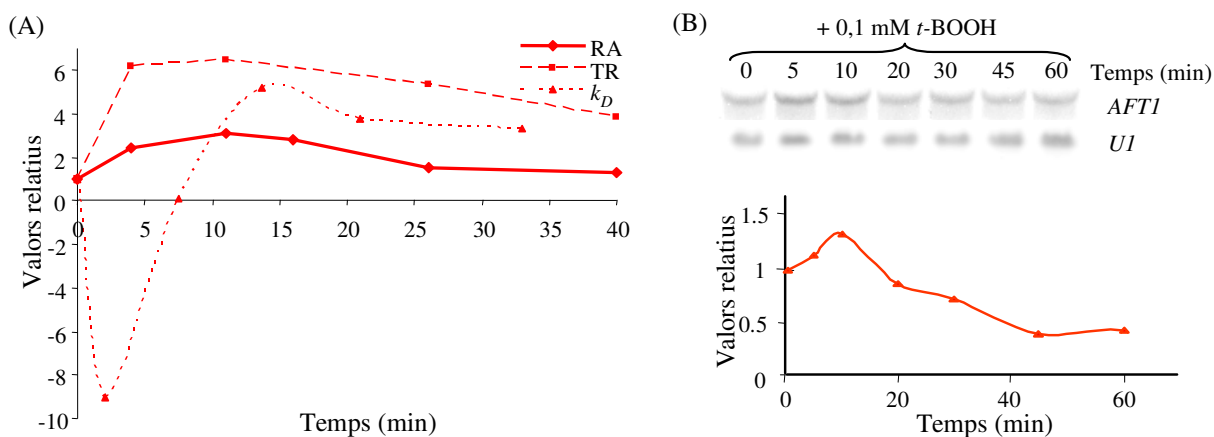
d'*AFT1* en cultius d'aquesta soca amb diverses concentracions de metionina, i es comparen amb els nivells d'mRNA expressats sota el propi promotor. S'estableix que una concentració de metionina de 12,5 µg/ml en el medi de creixement resulta en uns nivells d'expressió d'Aft1 similars als fisiològics, i no resulten afectats en resposta a l'estrès oxidatiu (apartat A, II-lustració 46). En analitzar els cultius cel·lulars que expressen la proteïna GFP-Aft1 amb aquesta concentració de metionina per microscòpia de fluorescència, s'observa la localització nuclear transitòria de la proteïna Aft1 després de 30 minuts de la presència de *t*-BOOH (com es mostra en la colocalització amb la tinció nuclear DAPI), en contrast amb la dispersió general de la tinció citoplasmàtica observada en les cèl·lules en condicions no estressants i als 90 minuts de l'addició de *t*-BOOH (apartat B, II-lustració 46). Aquesta localització nuclear transitòria d'Aft1 és paral·lela a la inducció de TR temporal dels gens dependents d'Aft1 durant l'estrès oxidatiu (II-lustració 43).



**II-lustració 46.** Localització transitòria d'Aft1 al nucli arran de l'estrès oxidatiu. (A) Cèl·lules  $\Delta aft1$  (MML348) transformades amb el plàsmid pMM412 (que conté una construcció *GFP-AFT1* sota el promotor *MET25*) creixen exponencialment en medi SD amb les concentracions de metionina indicades per regular l'expressió gènica en el marc del promotor *MET25*. La presa de mostres es realitza sense (-) o després de 20 minuts amb 0,1

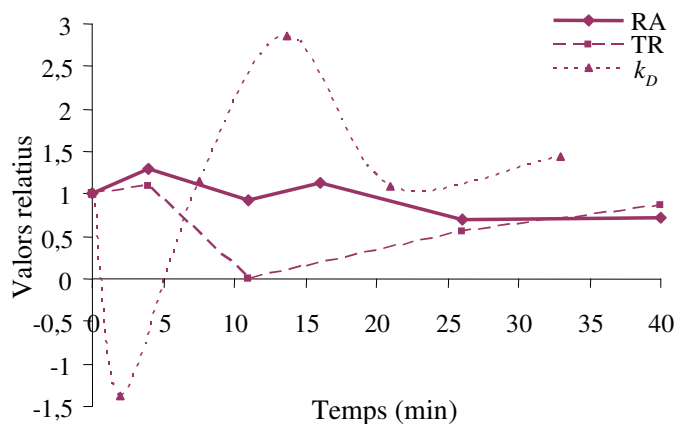
mM *t*-BOOH (+) i s'analitza per Northern blot amb la sonda *AFT1*. L'*UI* s'utilitza com a control de càrrega. Els dos carrils de més a l'esquerra corresponen a mostres de W303-1A que expressen *AFT1* sota en seu propi promotor. (B) La proteïna de fusió *GFP-Aft1* expressada en pMM412 i transformada en les cèl·lules MML348 es visualitza per microscòpia de fluorescència en el temps indicat després d'afegir al cultiu 0,1 mM de *t*-BOOH. Aquestes cèl·lules són cultivades fins a fase exponencial en medi SD amb 12,5 µg/ml de metionina.

La inducció del reguló Aft1 observada podria ser, almenys en part, secundària a la inducció de l'expressió d'*AFT1* després de l'addició de *t*-BOOH. Els paràmetres de transcripció obtinguts amb els experiments de GRO mostren que tot i que la TR augmenta sostingudament de manera considerable, l'RA ho fa més lleugerament, degut a una desestabilització primerenca aguda, tal com prediu la  $k_D$  matemàtica. Les nostres dades experimentals indiquen que els nivells d'mRNA d'*AFT1* no pateixen una inducció significativa després de l'estrès oxidatiu (Il·lustració 47). De fet, hi ha una disminució sostinguda dels seus nivells en comparació amb els nivells en els cultius no tractats. Per tant, podem concloure que l'activació del reguló Aft1 en l'estrès oxidatiu no depèn d'un augment dels seus nivells d'expressió, fet que apunta a una activació posttranscripcional.



**Il·lustració 47.** Expressió del gen *AFT1* després d'un estrès oxidatiu. (A) Valors mitjans de TR, RA i  $k_D$  dels experiments de GRO en condicions d'estrès oxidatiu. (B) Anàlisi per Northern blot de l'mRNA d'*AFT1* arran de l'addició de *t*-BOOH (a una concentració de 0,1 mM en els temps indicats) en cèl·lules de la soca salvatge W303-1A. Els senyals de l'mRNA d'*AFT1* es quantifiquen i es divideixen pels senyals respectius en el temps del control de càrrega *UI*; la representació gràfica es realitza respecte el temps de tractament i es relativitza per la unitat segons el primer valor de  $t_0$ .

D'altra banda, l'mRNA del gen *AFT2* es reprimeix en resposta a estrès oxidatiu, segons les dades mitjanes dels experiments GRO. La TR cau al voltant dels 10 minuts de l'addició de *t*-BOOH i l'RA es manté al llarg de la cinètica al voltant del valor inicial. La TD inferida prediu una forta desestabilització inicial i una posterior recuperació, que no afecta al nivell d'mRNA a temps tardans perquè la TR té un rescat molt lent.



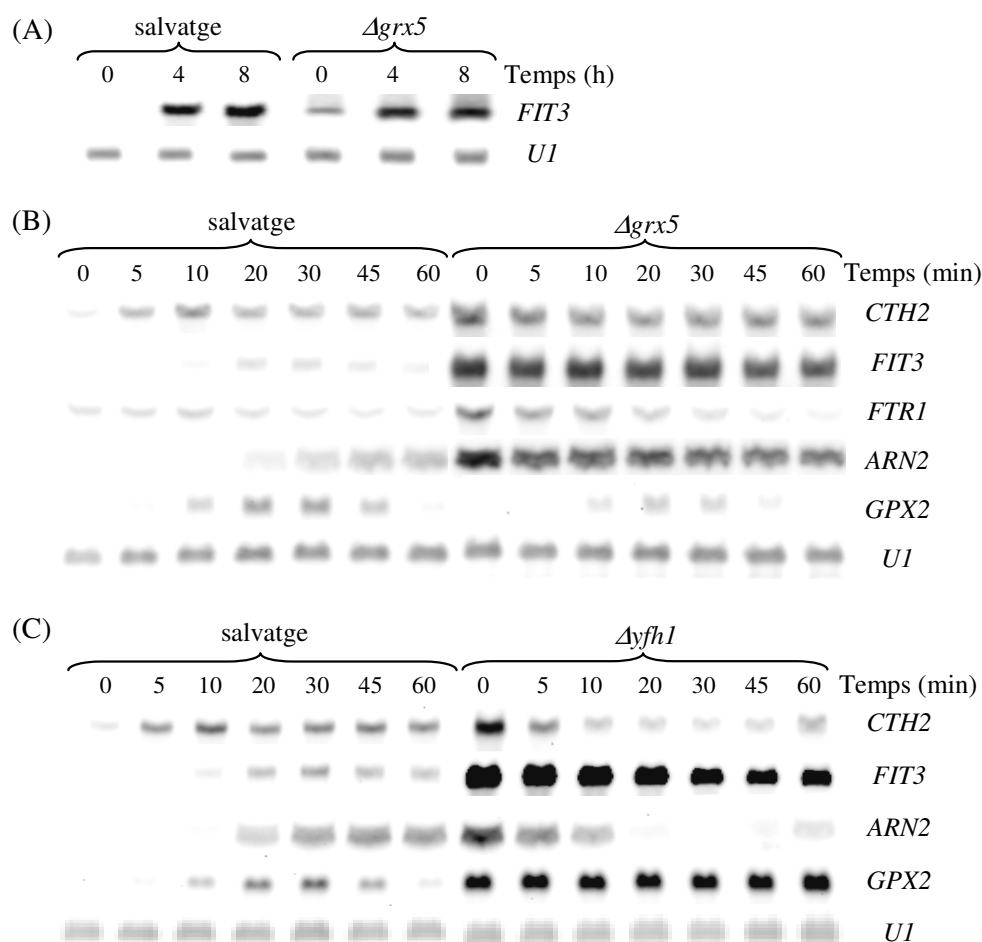
**Il·lustració 48.** Patró d'expressió del factor de transcripció Aft2 després de l'estrès oxidatiu. Es representen els valors mitjans dels experiments GRO de la cinètica d'addició de 0,1 mM de *t*-BOOH al llarg del temps. Els paràmetres mostrats són RA, TR i  $k_D$ , predita teòricament.

### 3.2.- El reguló Aft1 no s'activa en estrès oxidatiu en absència de síntesi d'ISC

En *S. cerevisiae*, la síntesi d'ISC es produeix al mitocondri (Lill i Muhlenhoff, 2008). Diversos estudis han demostrat que en absència d'un mecanisme funcional per a la síntesi d'ISC, els gens regulats per Aft1 s'expressen constitutivament inclús en condicions de repleció de ferro (Belli *et al*, 2004; Foury i Talibi, 2001; Hausmann *et al*, 2008). Aquest fet pot estar relacionat amb l'exigència d'una molècula mitocondrial sensora de l'estat de ferro cel·lular que contingui ISC i que regularia l'activació d'Aft1 (Rutherford *et al*, 2005). La glutaredoxina monotidòlica Grx5 és un dels components mitocondrials de la maquinària de síntesi ISC (Rodríguez-Manzanque *et al*, 2002). La seva deleció resulta en múltiples deficiències en els enzims dependents d'ISC (Chen *et al*, 2002; Muhlenhoff *et al*, 2003). Per tant, s'empra un mutant  $\Delta grx5$  per determinar si, en absència de síntesi d'ISC, Aft1 resulta encara activat després de l'estrès oxidatiu. Amb el mateix objectiu s'estudia també un mutant d'una altra proteïna de la matriu mitocondrial, Yfh1, que promou l'ensamblatge dels ISC.

Com es va descriure prèviament (Belli *et al*, 2004), les cèl·lules  $\Delta grx5$  mostren major expressió constitutiva dels gens regulats per Aft1 que les cèl·lules de tipus salvatge, encara que aquests nivells d'expressió basal són més baixos que els resultants quan aquestes cèl·lules creixen en medi amb baixes concentracions de ferro, després de l'addició de ferrocina (apartat A, Il·lustració 49). Aquesta observació suggereix un mecanisme de detecció addicional per a la manca de ferro independent a la maquinària mitocondrial de la síntesi d'ISC, com també han proposat altres autors (Kumanovics *et al*, 2008). Contràriament, quan les cèl·lules  $\Delta grx5$  s'exposen a un estrès oxidatiu, els nivells d'expressió dels gens analitzats no augmenten per sobre dels nivells basals (apartat B, Il·lustració 49). De fet, es produeix una lleugera disminució dels nivells d'mRNA en els moments tardans de l'estrès, molt notable en el cas d'*FTR1*. Quan s'estudia, de la mateixa manera, un mutant nul pel gen de la frataxina *YFH1*, els nivells

basals d'expressió de diversos gens del reguló Aft1 no s'indueixen a causa de l'estrès oxidatiu per sobre dels seus nivells basals (apartat C, II·lustració 49). Aquests resultats indiquen que l'activació d'Aft1 en l'estrès oxidatiu requereix ISC funcionals.



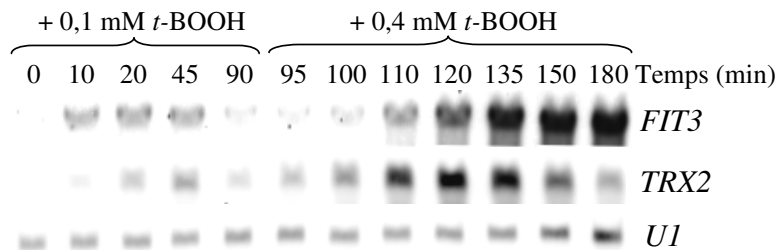
**II·lustració 49.** El reguló Aft1 no s'activa arran de l'estrès oxidatiu quan manca un mecanisme funcional per a la síntesi d'ISC. (A) Northern blot de l'expressió de *FIT3* en cèl·lules W303-1A (tipus salvatge) i MML100 ( $\Delta grx5$ ) creixent en medi YPD, afegint 2 mM de ferrocina al  $t_0$ . S'empra la sonda d'*UI* com a control de càrrega. (B) Northern blot amb les sondes dels gens del reguló Aft1 en cèl·lules de tipus salvatge (W303-1A) i  $\Delta grx5$  (MML100) en fase exponencial del creixement en medi YPD i addicionant *t*-BOOH a una concentració final de 0,1 mM. S'inclou també la sonda de *GPX2* com un gen de resposta a estrès oxidatiu i *UI* com control de càrrega. (C) Anàlisi de l'expressió dels gens del reguló Aft1 (*CTH2*, *FIT3* i *ARN2*) per Northern blot en les mateixes condicions que l'apartat (B), però per les soques salvatge (W303-1A) i  $\Delta yfh1$  (MML298). S'observa també l'expressió dels gens *GPX2* i *UI*.

Desconeixem el mecanisme d'activació d'Aft1 després d'un estrès oxidatiu. Per tal d'estudiar si aquesta activació és reversible s'aplica un segon estrès oxidatiu una vegada les cèl·lules s'han recuperat del primer estrès, és a dir, un cop els nivells d'expressió dels mRNAs dels gens del reguló Aft1 han recuperat els seus nivells basals (als 90 minuts posteriors a l'estrès inicial). S'addiciona *t*-BOOH a una concentració



## Resultats

de 0,1 mM a un cultiu de cèl·lules salvatges creixent en fase exponencial i als 90 minuts es torna a afegir el mateix agent oxidant a 0,4 mM (II-lustració 50). D'aquesta manera s'observa la reversibilitat del sistema d'activació de la resposta a estrès oxidatiu, ja que als 90 minuts del primer estrès la transcripció dels gens *FIT3* (representatiu del reguló Aft1) i del *TRX2* (representatiu de la resposta a dany oxidatiu) recuperen pràcticament els nivells basals d'expressió. Amb el segon estrès, l'expressió dels dos gens segueix presentant una inducció major a l'anterior. Mentre que *TRX2* tendeix a tornar altra vegada al nivell basal als 90 minuts durant el segon estrès, el de *FIT3* encara continua augmentant els seus nivells notablement. Així doncs, els gens del reguló es tornen a induir arran d'un segon estrès oxidatiu, indicant que el sistema d'activació d'Aft1 en un estrès oxidatiu moderat és reversible i dependent de la dosi d'agent oxidant.



**II-lustració 50.** Resposta transcripcional a dos estressos oxidatius consecutius. Processament per Northern blot de dues cinètiques d'addició de *t*-BOOH, la primera a una concentració de 0,1 mM en cèl·lules del tipus salvatge creixent en medi YPD fins a 90 minuts i la segona en afegir el mateix agent oxidant a 0,4 mM, es recullen mostres fins als 180 minuts. En la figura s'observa l'expressió del gen *FIT3* del reguló Aft1, *TRX2* de la resposta antioxidant i *U1* com a control de càrrega.

### 3.3.- La via reductiva del sistema d'alta afinitat de captació de ferro durant estrès oxidatiu

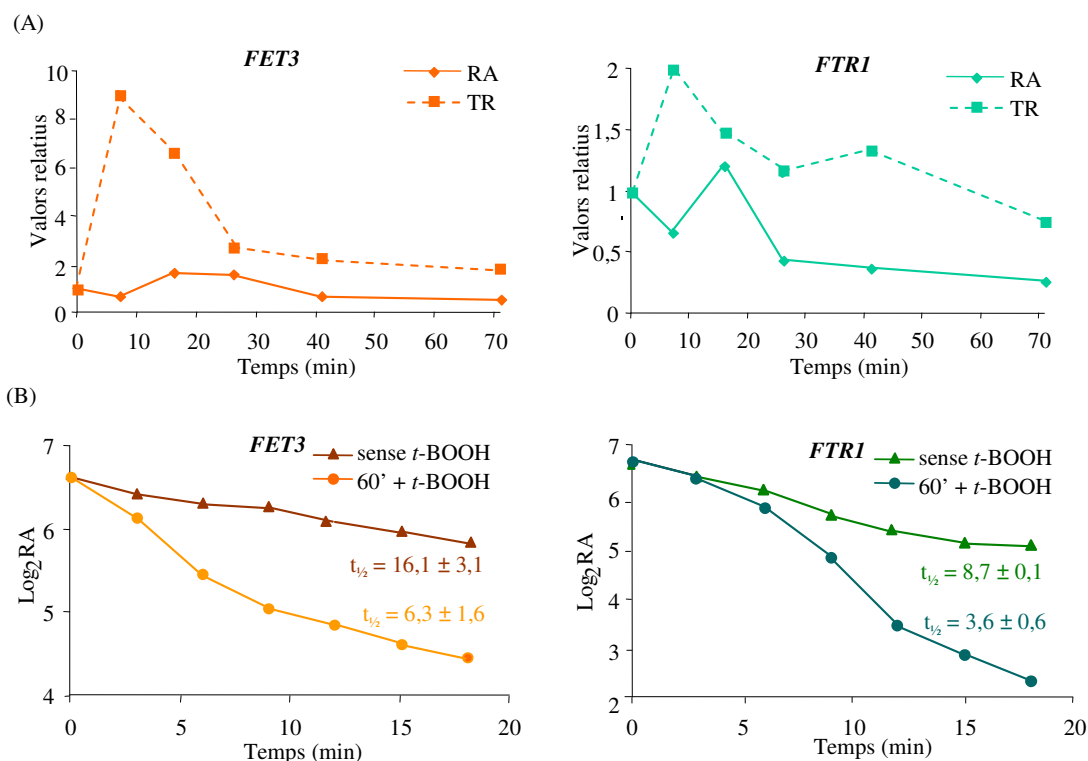
#### 3.3.1.- L'estrès oxidatiu afecta a la degradació dels mRNAs dels gens responsables de la via reductiva de captació de ferro

Les dades obtingudes de les anàlisis GRO suggereixen que l'estrès oxidatiu provoca canvis en la TD de l'mRNA del conjunt dels gens del reguló Aft1 de l'apartat B de la II-lustració 43. Es tracta de la desestabilització d'aquests mRNAs arran de l'estrès oxidatiu, la qual explicaria per què tot i l'augment de TR, els respectius nivells d'mRNA romanen aproximadament constants. Entre aquests gens es troben *FET3* i *FTR1*, dos components clau de la via reductiva del sistema d'alta afinitat de captació de ferro.

L'apartat (A) de la II-lustració 51 mostra els valors experimentals establerts per la TR i l'RA d'aquests gens en l'anàlisi GRO. Per confirmar la desestabilització teòrica predita per aquests mRNAs, se substitueixen els promotors endògens de *FET3* i *FTR1* pel promotor *tetO<sub>2</sub>*. La TD experimental de l'mRNA es calcula per l'aturada d'expressió del gen sota el control del promotor *tetO<sub>2</sub>* després d'afegir al medi de

cultiu doxiciclina a una concentració final de 10 µg/ml i processant les mostres recollides al llarg del temps per Northern blot. Per a cada experiment, es determinen les TDs just abans de l'estrès oxidatiu i als 60 minuts després d'afegir l'agent oxidant. Com que la TD inicial de l'mRNA segueix una cinètica de primer ordre, la vida mitjana dels mRNAs es calcula a partir dels pendents de les corbes logarítmiques que sorgeixen en representar gràficament la desaparició de cada mRNA, com s'explica anteriorment.

La vida mitjana de l'mRNA de *FET3* és d'aproximadament 16,1 minuts en les cèl·lules no estressades i disminueix a 6,3 minuts després de 60 minuts del tractament amb *t*-BOOH (apartat B, Il·lustració 51). Aquests valors indiquen que hi ha un efecte fort de desestabilització de l'mRNA d'aquest gen arran de l'estrès oxidatiu. De la mateixa manera, per *FTR1* les dades de vida mitjana en condicions no estressants són de 8,7 minuts en les cèl·lules que creixen en fase exponencial i es redueixen a 3,6 minuts en les cèl·lules que pateixen estrès oxidatiu.



**Il·lustració 51.** Efectes de desestabilització en els mRNAs codificants pel complex Fet3/Ftr1 de la via reductiva en el sistema de captació de ferro. (A) Les dades GRO de l'evolució de la TR i l'RA en cèl·lules salvatges W303-1A, després de l'addició de *t*-BOOH 0,1 mM al  $t_0$  en els cultius creixent de manera exponencial. (B) Les soques que expressen *FET3* (panell de l'esquerra, MML1099) o *FTR1* (panell dret, MML1093) sota el control del promotor *tetO<sub>2</sub>* creixen exponencialment en medi YPD i s'hi afegeix doxiciclina a 10 µg/ml a cèl·lules no exposades a estrès i a cèl·lules després dels 60 minuts de l'addició de 0,1 mM de l'agent oxidant. En cada cas, es prenen al·lotes en el moment 0 i a temps successius, després de l'addició de doxiciclina. S'aïlla l'RNA total i s'analitza per Northern blot. Els gràfics representen l'evolució de l'RA determinada experimentalment en escala logarítmica en funció del temps. En la il·lustració apareixen els valors mitjans de vida mitjana ( $t_{1/2}$ ) més l'error

## Resultats

estàndard d'un total de tres experiments independents. La  $t_{1/2}$  es calcula amb la regressió lineal dels valors experimentals obtinguts.

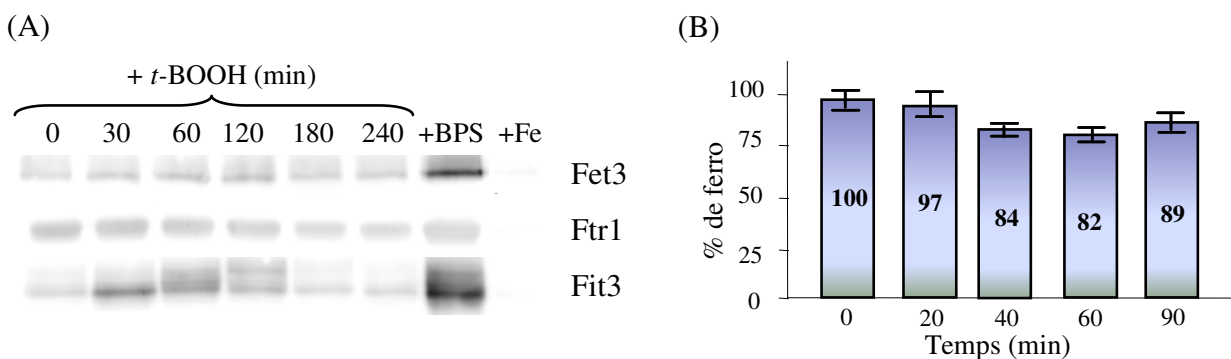
En canvi, segons les dades obtingudes anteriorment s'observa que l'mRNA de *FIT3* no pateix cap desestabilització. L'activitat de Fit3 és necessària tant per a la via reductiva, com per a la no reductiva del sistema d'alta afinitat de captació de ferro. De fet, la vida mitjana de l'mRNA d'aquest gen és de 7,6 i 8,9 minuts, abans i 60 minuts després d'aplicar l'estrès, respectivament i s'ha vist que aquest mRNA s'estabilitza transitòriament arran d'estrès oxidatiu (Il·lustració 40). La disminució de les vides mitjanes dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* confirma les prediccions fetes amb les dades de GRO i explicaria no només l'absència de paral·lelisme entre l'augment de TR en els primers moments de l'estrès, sinó també els nivells d'mRNA més baixos que els basals observats en temps més tardans de la cinètica d'estrès.

### **3.3.2.- Els nivells de proteïna de Fet3 i Ftr1 no es veuen significativament afectats arran de l'estrès oxidatiu**

Un cop es determina que la transcripció dels gens de la via reductiva de l'adquisició de ferro d'alta afinitat no s'indueix en resposta a l'estrès oxidatiu, contràriament als components de la via no reductiva, és interessant conèixer l'efecte de l'estrès en els nivells proteics. Per esbrinar si els nivells de proteïnes són semblants als dels mRNAs, s'etiqueten els gens *FTR1* i *FET3* amb un epítot 3xHA, en el mateix marc de lectura del promotor de cada gen. Els experiments que es realitzen són cinètiques d'estrès oxidatiu addicionant *t*-BOOH als cultius de les soques marcades amb l'epítot. S'analitzen mostres de diferents temps al llarg de l'estrès per Western blot. En paral·lel, també s'estudia Fit3 com un control de gen necessari tant per a la via reductiva com per a la no reductiva. A més, s'examinen els nivells de proteïna en condicions de limitació de ferro (amb l'addició de BPS) i de replació de ferro (afegint  $\text{FeSO}_4$ ) en cultius creixent exponencialment.

Els nostres resultats mostren que no s'indueix Fet3 després d'aplicar l'estrès (apartat A, Il·lustració 52) i que la proteïna Ftr1 manté un descens sostingut dels seus nivells en cèl·lules estressades. Altrament, els nivells de Fit3 s'indueixen transitòriament en addicionar *t*-BOOH. Entre 60 i 120 minuts de l'estrès apareix una banda de migració més lenta, que apunta a modificacions posttraduccionals de Fit3 a causa de l'estrès oxidatiu. Aquests resultats indiquen que els nivells de proteïna són força paral·lels al comportament dels nivells d'mRNA en resposta a estrès oxidatiu. Així doncs, els nivells de proteïna dels components essencials de la via reductiva no augmenten després de l'addició de l'agent oxidant.

També es mesuren els nivells de ferro intracel·lular en les condicions d'estrès i es confirma que aquests es mantenen pràcticament constants, amb una lleugera disminució en els temps intermedis (apartat B, Il·lustració 52).



**II·lustració 52.** Nivells proteics de Fet3, Ftr1 i Fit3 i percentatge de ferro intracel·lular en resposta a l'estrès oxidatiu. (A) Nivells de proteïna Fet3, Ftr1 i Fit3 arran de l'addició de 0,1 mM de *t*-BOOH. S'utilitzen les soques que expressen les versions etiquetades amb HA (integrades cromosòmicament) de les respectives proteïnes expressades sota els seus promotors endògens: MML1174 per Fet3, MML1159 per Ftr1, i MML1172 per Fit3. Les cèl·lules creixen fins a fase exponencial en medi YPD abans d'afegir l'agent oxidant al  $t_0$ . En els dos carrils de la dreta es mostren els nivells de proteïna en medi YPD limitat de ferro (4 hores amb 0,15 mM de BPS) i en medi YPD amb repleció de ferro (12 hores amb 2 mM de sulfat amònic ferrós). (B) El contingut de ferro intracel·lular no augmenta després de l'estrès oxidatiu. El contingut total de ferro en les cèl·lules estressades es determina en mostres de cultius creixement exponencialment de la soca W303-1A en el medi YPD on s'afegeix 0,1 mM de *t*-BOOH al  $t_0$ . Les dades es relativitzen respecte al valor 100 en el moment 0. Les barres representen la desviació estàndard de la mitjana de tres experiments independents.

### 3.3.3.- La funcionalitat de la via reductiva s'afecta negativament amb l'estrès oxidatiu

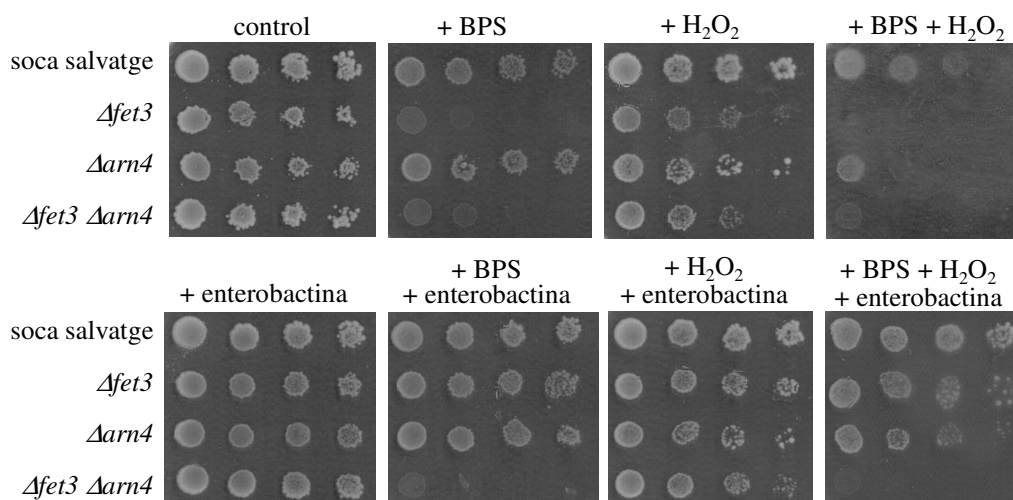
L'estrès oxidatiu indueix la desestabilització dels mRNAs de *FET3* i *FTR1*. Aquest fet contrasta amb els nivells dels mRNAs codificants per les proteïnes de la via no reductiva, mediada per la intervenció dels sideròfors, i suggereix que les cèl·lules de llevat en condicions d'estrès necessiten mantenir la via reductiva en nivells baixos d'activitat. La hipòtesi proposada és que les cèl·lules d'*S. cerevisiae* en resposta a estrès oxidatiu tendeixen a desviar l'absorció de ferro cap a la via no reductiva, per tal d'evitar els efectes tòxics del ferro en presència d'oxidants, quan aquest es transporta a través de la via reductiva.

Per aquest motiu les cèl·lules de tipus salvatge que creixen en condicions limitades de ferro (en medi que conté BPS) són hipersensibles a una dosi moderada d'oxidants (0,3 mM de peròxid d'hidrogen) en comparació amb les mateixes cèl·lules creixent en concentracions normals de ferro (primera fila dels panells superiors de la II·lustració 53). El fenotip de sensibilitat de les cèl·lules de tipus salvatge al peròxid en presència del quelant de ferro BPS és rescatat quan s'addiciona al medi el sideròfor enterobactina i, per tant, quan el ferro s'acomplexa a aquest quelant en la seva forma fèrrica, (primera fila dels panells superiors de la II·lustració 53). En aquestes condicions, la majoria de ferro és internalitzat com a ferro acomplexat a sideròfor a través de la via no reductiva (Heymann *et al*, 2000; Yun *et al*, 2001).

## Resultats

Per veure l'efecte nociu que causa l'estrès oxidatiu quan el ferro internalitza per la via reductiva, s'analitzen els fenotips de creixement d'un mutant  $\Delta fet3$ , el qual té una via reductiva no funcional (Askwith *et al*, 1994) i un mutant  $\Delta arn4$ , incapaç d'assimilar ferro fèrric unit al sideròfor enterobactina a través de la via no reductiva (Heymann *et al*, 2000; Yun *et al*, 2001). En condicions normals de ferro, les cèl·lules que no tenen Fet3 són més sensibles als nivells moderats de peròxid d'hidrogen que les cèl·lules de tipus salvatge (panells superiors de la II·lustració 53). Atès que en aquestes condicions experimentals (sense sideròfors afegits al medi) se suposa que només Fet4 (del sistema de captació de ferro de baixa afinitat) intervé en l'absorció de ferro, les dades de dilucions seriades apunten a una certa sensibilitat d'aquest sistema a condicions d'estrès oxidatiu. Com és d'esperar, en condicions de limitació de ferro, l'absència de Fet3 deroga gairebé totalment el creixement cel·lular independentment a la presència o absència d'oxidant. El creixement del mutant  $\Delta arn4$  en condicions normals de ferro s'afecta molt lleugerament per la dosi emprada de peròxid d'hidrogen. Tot i això, en condicions de baixos nivells de ferro i en presència de l'agent oxidant la inhibició del creixement és encara més prominent que en les cèl·lules de tipus salvatge (panells superiors de la II·lustració 53), fet que dóna suport a la hipersensibilitat a peròxid de la via d'adquisició de ferro Fet3/Ftr1.

Quan el ferro disponible en el medi està vinculat a enterobactina, en presència de BPS, els mutants  $\Delta fet3$  i  $\Delta arn4$  creixen de manera similar a les cèl·lules salvatges, fet que concorda amb treballs d'altres grups (Yun *et al*, 2001). L'addició de peròxid d'hidrogen en aquestes condicions gairebé no té efecte en la soca  $\Delta fet3$  (amb una via reductiva no funcional), però té un cert efecte negatiu en la soca  $\Delta arn4$  (en la qual només la via reductiva és funcional per a la captació del ferro unit a sideròfors) (Philpott i Protchenko, 2008; Yun *et al*, 2001) (panells inferiors, II·lustració 53). En conjunt, aquests resultats indiquen que l'absorció de ferro per la via reductiva resulta més sensible a estrès oxidatiu que per la via no reductiva.



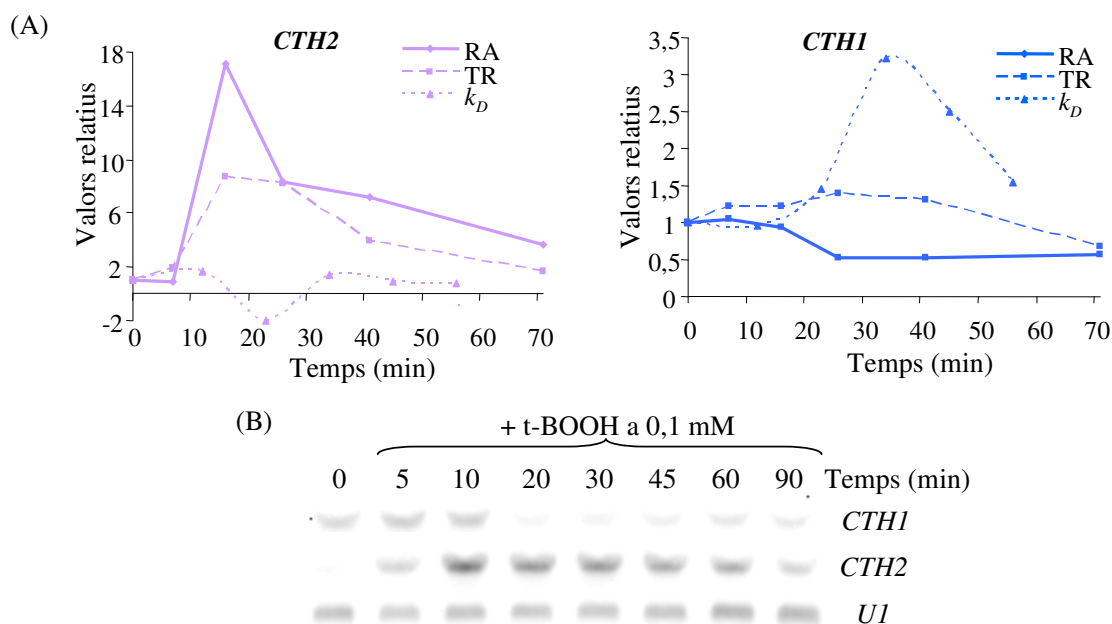
**II·lustració 53.** Assajos de sensibilitats de soques mutants per a la via reductiva i no reductiva del sistema d'alta afinitat de captació de ferro. Dilucions seriades en medi SD en limitació de ferro (afegint BPS 0,1 mM) i en

estrès oxidatiu (addicionant  $H_2O_2$  0,3 mM) amb i sense 0,01 mM d'enterobactina, en les soques de tipus salvatge (W303-1A), MML1109 ( $\Delta fet3$ ), MML1101 ( $\Delta arn4$ ) i MML1112 ( $\Delta fet3 \Delta arn4$ ).

### 3.4.- Cerca de proteïnes candidates a la desestabilització dels mRNAs de la via reductiva en resposta a l'estrès oxidatiu

#### 3.4.1.- Cth2 no afecta la TD dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* durant l'estrès oxidatiu

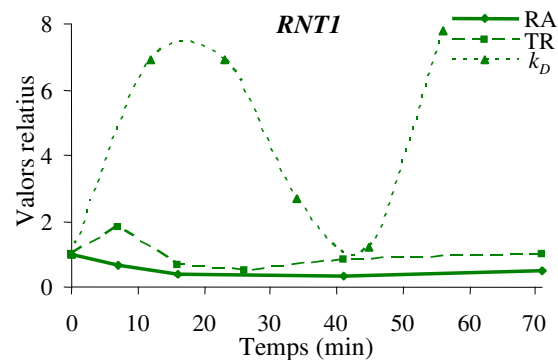
Cth2 i el seu paràleg Cth1 són membres de la família de proteïnes CCCH de dits de zinc d'unió a RNA, que reconeixen ARE en el 3'UTR de trànscripats específics. La unió de Cth2 a aquestes ARE porta a la desestabilització i conseqüent degradació dels seus mRNAs diana. Aquestes dues proteïnes formen part del reguló Aft1 (Puig *et al*, 2005). L'mRNA de *CTH2* s'indueix en estrès oxidatiu. Per contra, els nivells d'mRNA de *CTH1* disminueixen en presència de *t*-BOOH (apartat B, Il·lustració 54). Les anàlisis GRO també indiquen que la TR de *CTH2* augmenta sostingudament durant aquest estrès i es prediu que el seu mRNA s'estabilitza. En el cas de *CTH1*, la seva TR no s'indueix i, a més, el seu mRNA es desestabilitza (apartat A, Il·lustració 54). A més, un 65% dels 85 gens sobreexpressats en un  $\Delta cth2$  que es desestabilitzen en depleció de ferro (Puig *et al*, 2005) també tenen una desestabilització predita en les dades GRO de la cinètica d'estrès oxidatiu.



**Il·lustració 54.** Dades de transcripció dels gens *CTH1* i *CTH2* en estrès oxidatiu. (A) Valors mitjans dels experiments GRO (de TR i RA) i estimació matemàtica de la  $k_D$ . S'observa la regulació positiva per l'mRNA de *CTH2* i la negativa pel de *CTH1*. (B) Cinètica d'addició de *t*-BOOH en cèl·lules salvatges (W3031A) processada per Northern blot; s'analiza l'expressió dels gens *CTH1* i *CTH2*, utilitzant com a control la sonda d'*U1*.

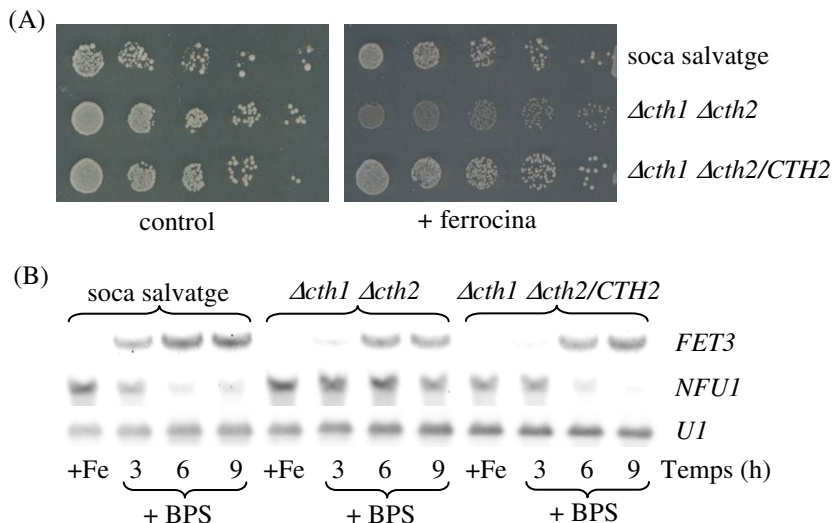
## Resultats

S'ha descrit un altre sistema de degradació d'alguns mRNAs del sistema d'alta afinitat d'adquisició de ferro: la via de l'RNasa III, Rnt1. En condicions de repleció de ferro alguns dels gens del reguló Aft1 presenten nivells d'expressió majors en absència d'Rnt1 (Lee *et al*, 2005). Els paràmetres de transcripció obtinguts en els experiments GRO pel gen *RNT1* es reprimeixen en l'estrès oxidatiu (II·lustració 55). A més, en l'estudi de Lee i col·laboradors (2005) es demostra que en el cas d'*FTR1* no hi ha diferències en els nivells d'mRNA en cèl·lules de tipus salvatge i mutades ( $\Delta rnt1$ ). Els resultats dels experiments GRO per aquest gen mostren una repressió de l'RA durant tota la cinètica, tot i que la seva TR s'indueix transitòriament en els primers minuts de l'estrès. La  $k_D$  predita, tot i que oscil·la, mostra una forta desestabilització en els primers minuts de l'addició de *t*-BOOH.



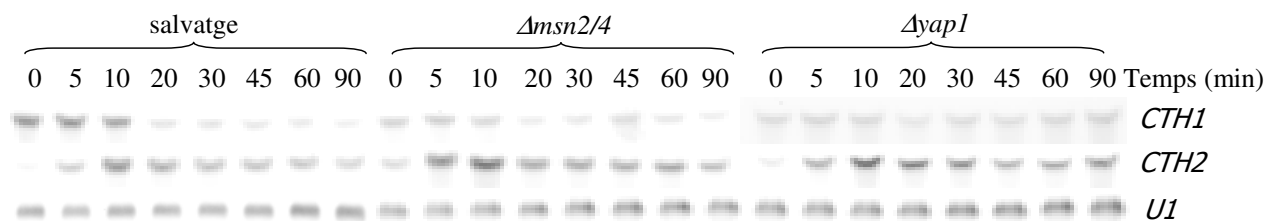
**II·lustració 55.** Valors mitjans per al gen *RNT1* dels experiments de GRO durant l'estrès oxidatiu. Es representen els paràmetres d'RA, TR i  $k_D$  al llarg de la cinètica d'addició de *t*-BOOH.

Per tant, entre els factors que regulen l'estabilitat dels mRNAs i que participen en l'homeòstasi del ferro, ens hem centrat en el possible paper de Cth2 en els canvis d'estabilitat dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* després d'afegir l'agent oxidant. Amb aquest objectiu, es construeix un mutant doble  $\Delta cth1 \Delta cth2$  en el fons W303 emprat en aquest estudi, i d'aquesta es deriva una soca que expressa *CTH2* integrant la seva ORF sota el seu propi promotor mitjançant un plàsmid. El doble mutant es comporta de la manera esperada, segons la literatura (Puig *et al*, 2005) en: (i) una reducció del creixement en condicions de privació de ferro, i (ii) majors nivells d'un mRNA diana de Cth2 com és el cas d'*NFUI* (el qual codifica per una proteïna involucrada en el metabolisme del ferro en el mitocondri) en les mateixes condicions de depleció de ferro (II·lustració 56). Aquests fenotips es restauren en les soques derivades expressant *CTH2*.



**II·lustració 56.** Comportament del mutant  $\Delta cth1 \Delta cth2$  en el fons W303. (A) Assaig de dilucions seriades en medi SC en privació de ferro (addicionant ferrocina a 0,75 mM) de la soca salvatge (W303-1A), el mutant doble  $\Delta cth1 \Delta cth2$  (MML1081) i el mutant doble que expressa  $CTH2$  en un plàsmid integrat (MML1082). (B) Cinètica de privació de ferro (afegint BPS a 0,1 mM) analitzada per Northern blot amb les tres soques esmentades, s'utilitza una sonda d'un gen del reguló Aft1 ( $FET3$ ), una sonda d'un gen diana de Cth2 ( $NFUI$ ) i una sonda d'un gen d'expressió constitutiva ( $U1$ ), com a control de càrrega.

D'altra banda s'analitza la dependència de l'expressió de  $CTH1$  i  $CTH2$  de Yap1 i Msn2/4 durant l'estrès oxidatiu. La II·lustració 57 mostra que aquests factors transcripcionals no intervenen en la resposta transcripcional dels gens  $CTH1$  i  $CTH2$  a estrès oxidatiu, ja que l'mRNA de  $CTH1$  es reprimeix i  $CTH2$  es continua induint transitòriament. En la II·lustració 44 es demostra la dependència d'Aft1 per a la inducció del transcrit de  $CTH2$  amb l'addició de  $t$ -BOOH al medi.

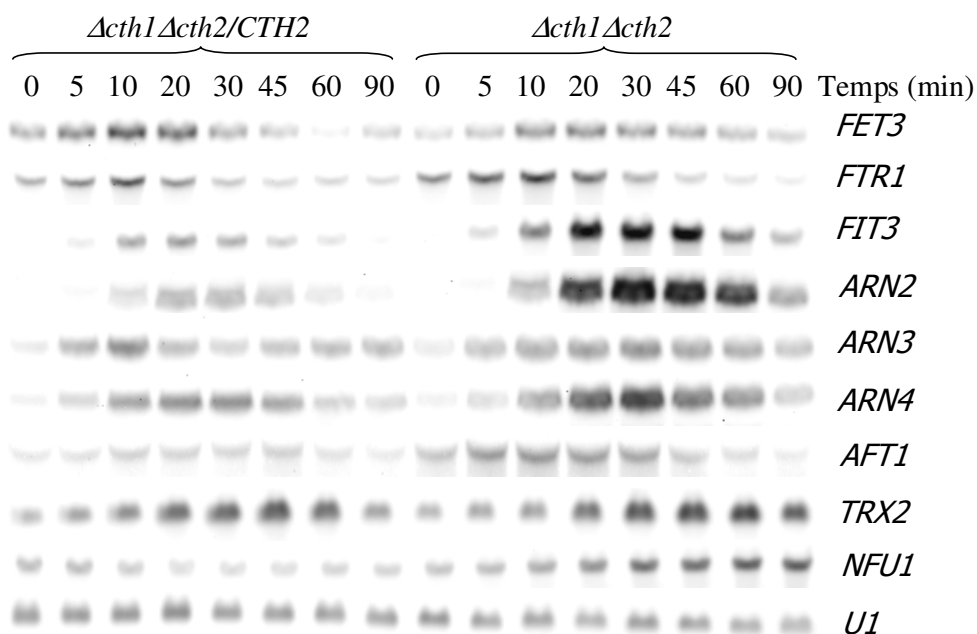


**II·lustració 57.** Expressió de  $CTH1$  i  $CTH2$  durant l'estrès oxidatiu en les soques  $\Delta msn2/4$  i  $\Delta yap1$ . Anàlisi per Northern blot de cultius creixent exponencialment amb l'addició de 0,1 mM de  $t$ -BOOH. En el processament, s'afegeix la sonda dels gens  $CTH1$  i  $CTH2$ , i l' $U1$  com a control de càrrega. Les soques utilitzades són: W303 (salvatge), Wmsn2msn4 ( $\Delta msn2/4$ ) i W303yap1 ( $\Delta yap1$ ).



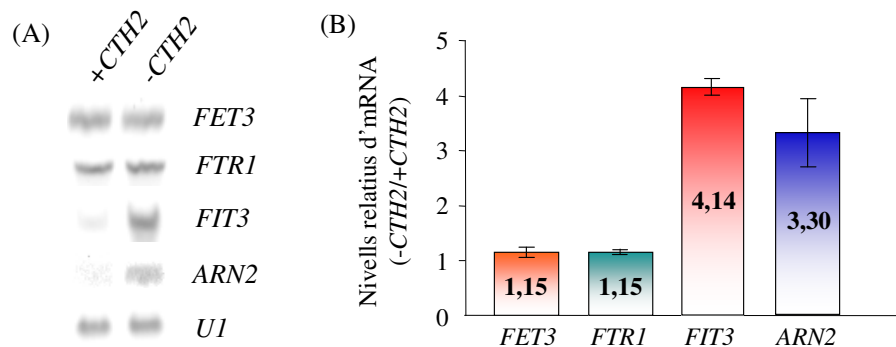
## Resultats

Seguidament, s'analitzen alguns trànscripats del reguló Aft1 en la soca doble mutant  $\Delta act1 \Delta act2$  i la soca  $\Delta act1 \Delta act2$  que expressa *CTH2* en estrès oxidatiu. En les dues soques s'indueixen els gens testats. A primer cop d'ull, sembla que el doble mutant tingui nivells d'inducció dels mRNAs majors al llarg de la cinètica d'estrès oxidatiu, però en realitzar una quantificació acurada, considerant els nivells basals en cada cas, es veu com el doble mutant no té majors nivells relatius de tots els mRNAs. *FET3* i *FTR1* tenen una inducció molt semblant a la inducció observada en la cinètica de les cèl·lules salvatges W303-1A (II-lustració 58, comparada amb la II-lustració 44); en el cas d'*ARN3* sembla que es perd la repressió transitòria. No obstant, altres mRNAs tenen una inducció més dràstica en la soca  $\Delta act1 \Delta act2$  comparada a la  $\Delta act1 \Delta act2/CTH2$  o a la salvatge. Aquest és el cas de *FIT3*, *ARN2* i *ARN4*. També cal esmentar que els nivells transcripcionals d'*AFT1* són més elevats. L'expressió de *TRX2* indica que aquest gen s'indueix normalment en front a estrès oxidatiu, per tant la soca sense *CTH2* respon a l'addició de *t*-BOOH. El trànscrip d'*NFU1* sota aquest estrès disminueix en la soca que expressa *CTH2*, però s'acumula al llarg de la cinètica quan manca aquest gen, fet que corrobora que Cth2 és actiu durant l'estrès oxidatiu per *t*-BOOH.



**II-lustració 58.** Efecte de Cth2 en l'expressió dels gens del reguló Aft1 arran d'un estrès oxidatiu. L'anàlisi de Northern blot mostra l'expressió dels gens dels cultius MML1082 (+*CTH2*) i MML1081 (-*CTH2*) creixent exponencialment en medi YPD tractat amb 0,1mM de *t*-BOOH als temps indicats. S'inclou la sonda *TRX2* com a control de la resposta a estrès oxidatiu, la sonda *NFU1* com a control d'un mRNA diana de l'activitat de Cth2 i la sonda *U1* com a control de càrrega.

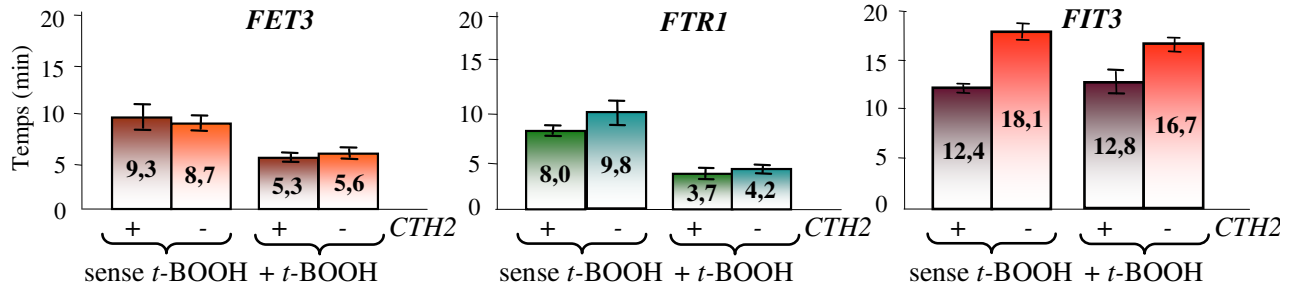
Per estudiar més en detall els nivells d'mRNA dels gens de la via reductiva i de dos gens de la via no reductiva (*FIT3* i *ARN2*) es processen per Northern blot cèl·lules en condicions no estressants d'aquestes soques i se'n quantifiquen els nivells basals d'aquests quatre trànscrips. Els resultats indiquen que mentre els nivells d'mRNA de *FET3* i *FTR1* són pràcticament iguals en presència i absència de *CTH2*, l'absència de *CTH2* contribueix a un augment en 3 i 4 vegades dels nivells de l'mRNA d'*ARN2* i *FIT3*, respectivament (Il·lustració 59).



**Il·lustració 59.** Quantificació dels nivells basals d'expressió (en cèl·lules creixent en fase exponencial en medi YPD) de quatre gens del reguló Aft1. Per aquest experiment es cultiven les soques: MML1081 (-*CTH2*) i MML1082 (+*CTH2*). (A) Exemple de processament per Northern blot dels nivells basals de *FET3*, *FTR1*, *FIT3* i *ARN2*, utilitzant la sonda d'*UI* com a control de càrrega. (B) Histograma que representa la quantificació relativa dels nivells d'expressió de cada gen en absència de *CTH2* versus la presència de *CTH2*. Les barres mostren l'error estàndard de tres experiments independents.

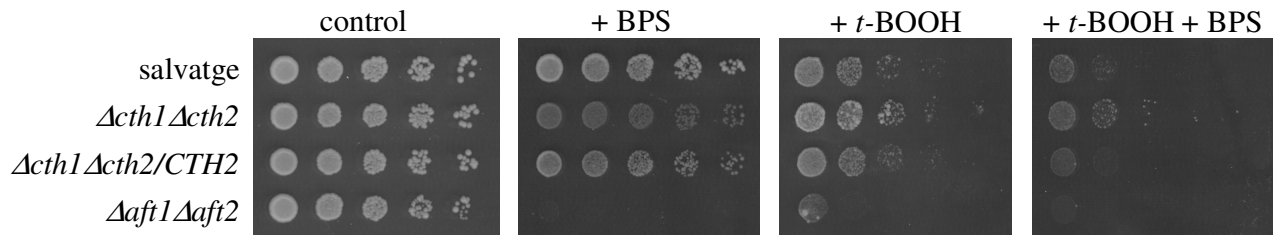
Aquestes dades suggereixen que la manca de *CTH2* podria tenir un efecte sobre l'estabilitat dels mRNAs d'alguns gens del reguló Aft1 en condicions basals de creixement exponencial, però no sobre l'expressió de l'mRNA en resposta a l'estrès oxidatiu. Per tal d'aprofundir en la contribució dels efectes de Cth2 en la vida mitjana d'alguns gens del reguló es mesuren les TDs de l'mRNA de *FET3*, *FTR1* i *FIT3* abans i 60 minuts després de l'addició de l'oxidant en les soques  $\Delta act1\Delta act2$  i  $\Delta act1\Delta act2/CTH2$  (Il·lustració 60). Aquestes dades s'obtenen expressant els tres gens sota el promotor regulable *tetO<sub>2</sub>* en les dues soques esmentades i realitzant les cinètiques de tancament d'expressió en absència i en presència de l'agent oxidant. No hi ha diferències significatives en les vides mitjanes dels mRNAs codificants per Fet3 i Ftr1 en ambdues soques i en les dues condicions. No obstant això, l'absència de *CTH2* estabilitza significativament l'mRNA de *FIT3*, indicant que la proteïna pot estar activa en les dues condicions. Aquests resultats estan d'acord amb els nivells constitutius més elevats de l'mRNA de *FIT3* en les cèl·lules  $\Delta act1\Delta act2$  (Il·lustració 59).

## Resultats



**Il·lustració 60.** Vides mitjanes dels mRNAs de *FET3*, *FTR1* i *FIT3* en les soques que expressen o no *CTH2*. Es calculen les  $t_{1/2}$  dels basals (en cultius creixent exponencialment en medi YPD) i als 60 minuts després de la presència de 0,1 mM de *t*-BOOH. S'empren les següents soques per als seus respectius gens sota el promotor *tetO<sub>2</sub>*: MML1123 (+*CTH2*) i MML1122 (-*CTH2*) per *FET3*, MML1116 (+*CTH2*) i MML1114 (-*CTH2*) per *FTR1*, i MML1119 (+*CTH2*) i MML1120 (-*CTH2*) per *FIT3*.

A més d'això, s'assagen les soques  $\Delta act1\Delta act2$  i  $\Delta act1\Delta act2/CTH2$  en plaques amb medi ric que conté *t*-BOOH i/o BPS (Il·lustració 61). S'observa que el doble mutant no és més sensible a l'agent oxidant que la soca corresponent amb *CTH2* i, en condicions d'estrès oxidatiu més depleció de ferro  $\Delta act1\Delta act2$  presenta una sensibilitat lleugerament inferior a la de les cèl·lules que expressen *CTH2*. La soca control  $\Delta aft1\Delta aft2$  confirma la seva sensibilitat a l'estrès oxidatiu i l'esgotament de ferro. Per tant, *Cth2* no sembla tenir un paper biològic rellevant en la resposta a l'estrès oxidatiu.



**Il·lustració 61.** Comportament del mutant  $\Delta act1\Delta act2$  en estrès oxidatiu. Assaig de dilucions seriades en medi YPD en privació de ferro (addicionant ferroquina a 0,75 mM) i/o estrès oxidatiu (afegint *t*-BOOH a 0,25 mM) de la soca salvatge (W303-1A), el mutant doble  $\Delta act1\Delta act2$  (MML1081),  $\Delta act1\Delta act2/CTH2$  (MML1082) i  $\Delta aft1\Delta aft2$  (MML1088).

### 3.4.2.- Cerca de proteïnes d'unió a RNA i RNases implicades en la supervivència cel·lular en front de l'estrès oxidatiu i depleció de ferro

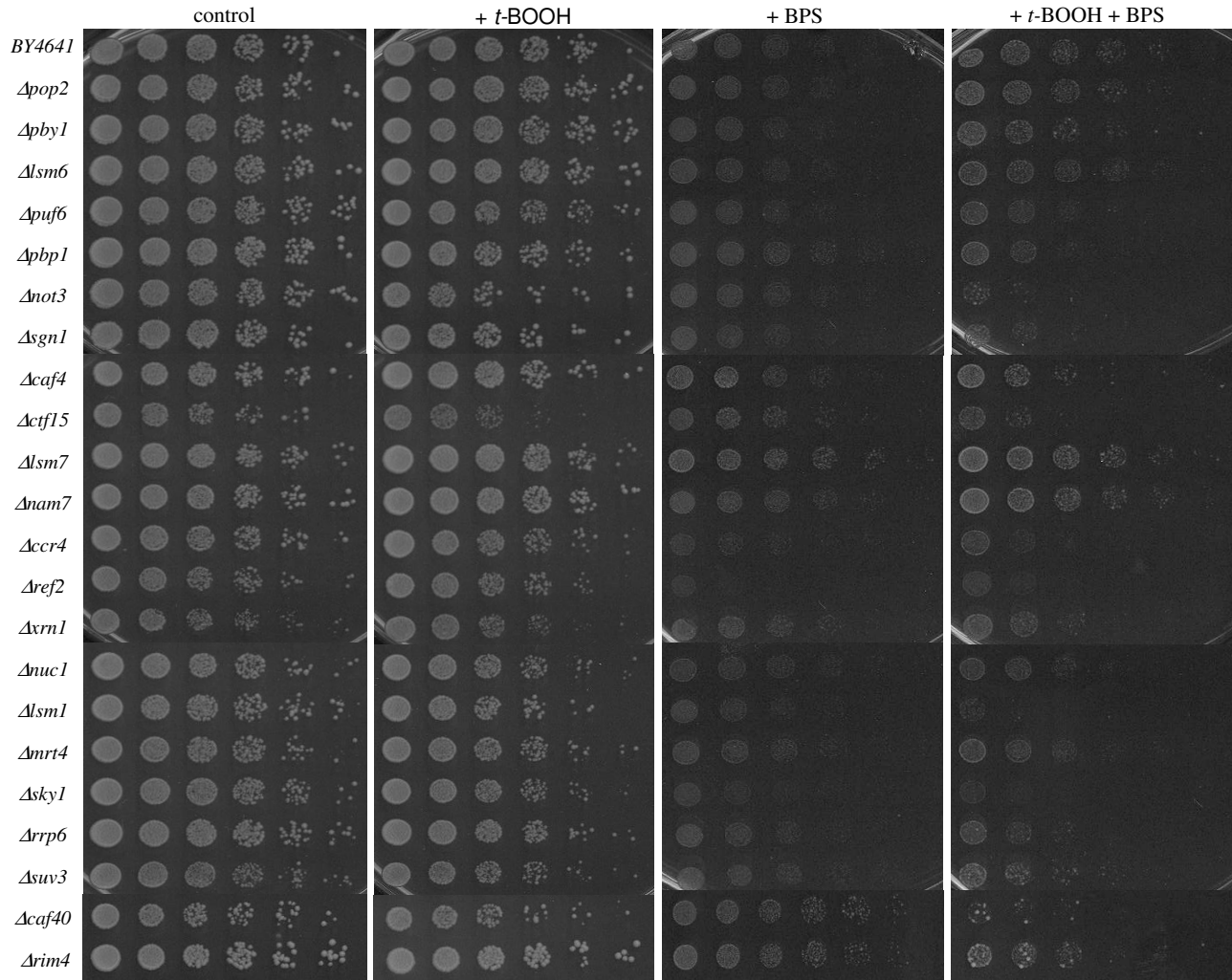
Per tal de trobar proteïnes responsables de la degradació dels mRNAs codificants per *FET3* i *FTR1* es realitza un assaig de sensibilitat d'algunes soques delecionades pels gens codificants per proteïnes d'unió a RNA i RNases. En els experiments s'utilitzen soques de la col·lecció de mutants nuls viables Euroscarf del fons genètic BY4741, moltes d'elles incloses en les categories funcionals GO "Catabolisme i Degradació d'mRNAs", seguidament es mostra la Taula 13 que les resumeix:

CATABOLISME d'mRNA		PROCÉS CATABÒLIC d'RNA		MISCEL·LÀNIA	
soca	ORF	soca	ORF	Soca	ORF
<i>Δism7</i>	YNL147W	<i>Δdhh1</i>	YDL160C	<i>Δedc2</i>	YER035W
<i>Δnam7</i>	YMR080C	<i>Δnuc1</i>	YJL208C	<i>Δtho1</i>	YER063W
<i>Δcth1</i>	YDR151C	<i>Δdbr1</i>	YKL149C	<i>Δmot2</i>	YER068W
<i>Δism6</i>	YDR378C	<i>Δmsu1</i>	YMR287C	<i>Δcaf16</i>	YFL028C
<i>Δtpa1</i>	YER049W	<i>Δrnh1</i>	YMR234W	<i>Δpan2</i>	YGL094C
<i>Δpuf4</i>	YGL014W	<i>Δrny1</i>	YPL123C	<i>Δedc1</i>	YGL222C
<i>Δxrn1</i>	YGL173C	<i>Δsuv3</i>	YPL029W	<i>Δcaf130</i>	YGR134W
<i>Δupf3</i>	YGR072W	<b>PROCÉS CATABÒLIC d'mRNA TRANSCRIT AL NUCLI, DEGRADACIÓ DEPENDENT DE DEADENILACIÓ</b>		<i>Δpbp1</i>	YGR178C
<i>Δlrp1</i>	YHR081W	soca	ORF	<i>Δrim4</i>	YHL024w
<i>Δism12</i>	YHR121W	<i>Δpuf1</i>	YJR091C	<i>Δnot3</i>	YIL038C
<i>Δnmd2</i>	YHR077C	<i>Δctf15</i>	YJL140W	<i>Δair1</i>	YIL079C
<i>Δism1</i>	YJL124C	<i>Δccr4</i>	YAL021C	<i>Δsgn1</i>	YIR001C
<i>Δmrt4</i>	YKL009W	<i>Δpuf3</i>	YLL013C	<i>Δpan3</i>	YKL025C
<i>Δcth2</i>	YLR136C	<i>Δdcs1</i>	YLR270W	<i>Δcbt1</i>	YKL208W
<i>Δnmd4</i>	YLR363C	<i>Δpuf2</i>	YPR042C	<i>Δcaf4</i>	YKR036C
<i>Δrrp6</i>	YOR001W	MISCEL·LÀNIA		<i>Δynt20</i>	YLR059C
<b>PROCÉS CATABÒLIC d'mRNA TRANSCRIT AL NUCLI, NSD EXONUCLEOLÍTIC 3'-5'</b>		soca	ORF	<i>Δrex3</i>	YLR107W
soca	ORF	<i>Δhek2</i>	YBL032 W	<i>Δanab6</i>	YML117W
<i>Δski8</i>	YGL213C	<i>Δpby1</i>	YBR094W	<i>Δadi1</i>	YMR009w
<i>Δski2</i>	YLR398C	<i>Δngr1</i>	YBR212W	<i>Δcbc1</i>	YMR125W
<i>Δski7</i>	YOR076C	<i>Δpbp2</i>	YBR233W	<i>Δctl1</i>	YMR180C
<i>Δski3</i>	YPR189W	<i>Δpat1</i>	YCR077C	<i>Δsky1</i>	YMR216C
<b>REGULACIÓ DE L'ESTABILITAT DELS mRNAs</b>		<i>Δair2</i>	YDL175C	<i>Δcaf120</i>	YNL278W
soca	ORF	<i>Δref2</i>	YDR195W	<i>Δcaf40</i>	YNL288W
<i>Δrmd9</i>	YGL107C	<i>Δpuf6</i>	YDR496C	<i>Δpop2</i>	YNR052C
<i>Δpub1</i>	YNL016W	<i>Δedc3</i>	YEL015W	<i>Δdcs2</i>	YOR173W
		<i>Δfir1</i>	YER032W	<i>Δcaf20</i>	YOR276W
				<i>Δcbc2</i>	YPL178W

**Taula 13.** Soques delecionades pels gens codificants per proteïnes involucrades en la degradació d'mRNA. S'indica la categoria funcional GO que es relaciona amb les proteïnes.

## Resultats

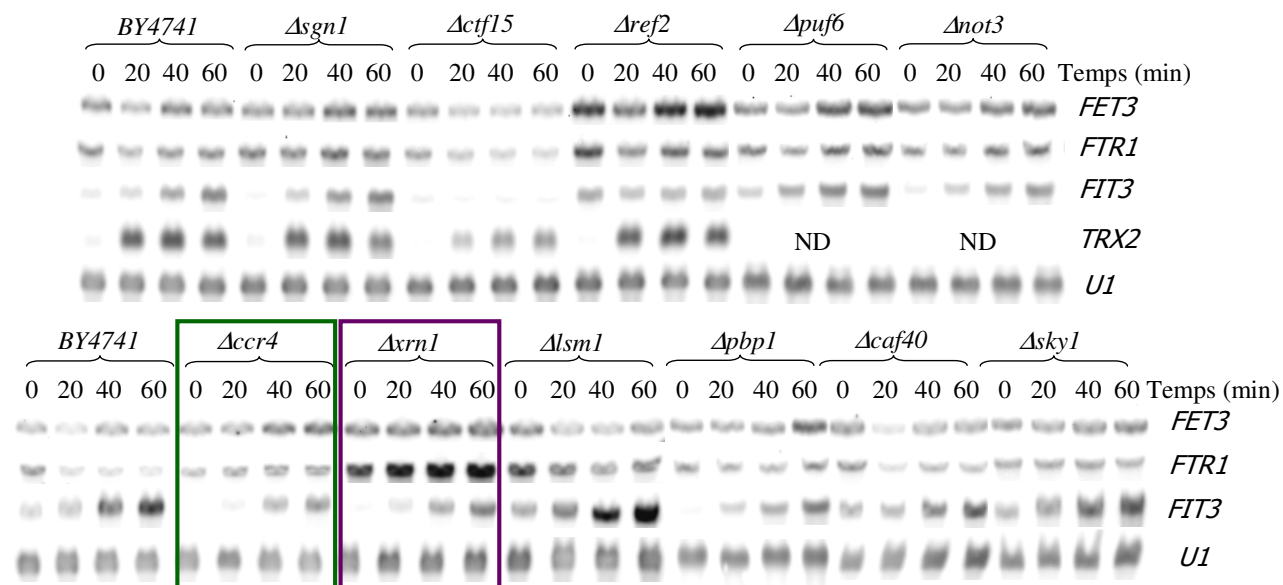
S'estudia la capacitat de creixement de les 73 soques en estrès oxidatiu i/o depleció de ferro. Per fer-ho es proven diverses concentracions de *t*-BOOH i BPS i s'escullen 0,8 mM i 0,1 mM, respectivament. Aquestes dosis afecten al creixement de la soca BY4741, però en permeten la seva supervivència. Després de plaquejar-les, es descarten 52 soques mutades i es repeteixen les sensibilitats amb 21 soques candidates (II·lustració 62).



**II·lustració 62.** Assaig de sensibilitats en estrès oxidatiu i en privació de ferro de les soques mutants per proteïnes involucrades en la degradació d'mRNA. El plaquetge es porta a terme a partir de les soques creixent exponencialment en medi líquid YPD i es realitza per quadruplicat en una placa de medi sòlid YPD (control), una placa que conté 0,8 mM de *t*-BOOH (estrès oxidatiu), una placa amb 0,1 mM de BPS (depleció de ferro) i una placa amb la combinació dels dos estressos (potenciadora de l'efecte).

Seguidament, se seleccionen 11 soques interessants per tenir el creixement limitat en la combinació dels dos estressos i s'analitzen per Northern blot després d'aplicar als respectius cultius en fase exponencial l'estrès oxidatiu. Els nivells d'expressió dels gens de la via reductiva d'aquestes soques es comparen amb els nivells d'expressió de la soca salvatge (BY4741) (II·lustració 63). La majoria de soques presenten un

nivell més baix dels mRNA codificants per gens del reguló Aft1, fet que concorda amb una menor supervivència de les cèl·lules en presència d'un quelant de ferro al medi. No obstant, la quantificació de les bandes permet una anàlisi molt detallada de la variació de l'expressió i d'aquesta manera es conclou que la soca  $\Delta xrn1$  i la soca  $\Delta ccr4$  tenen un perfil de transcripció induït de *FET3* i *FTR1*, en comparació amb el de la soca salvatge, els quals es reprimeixen.



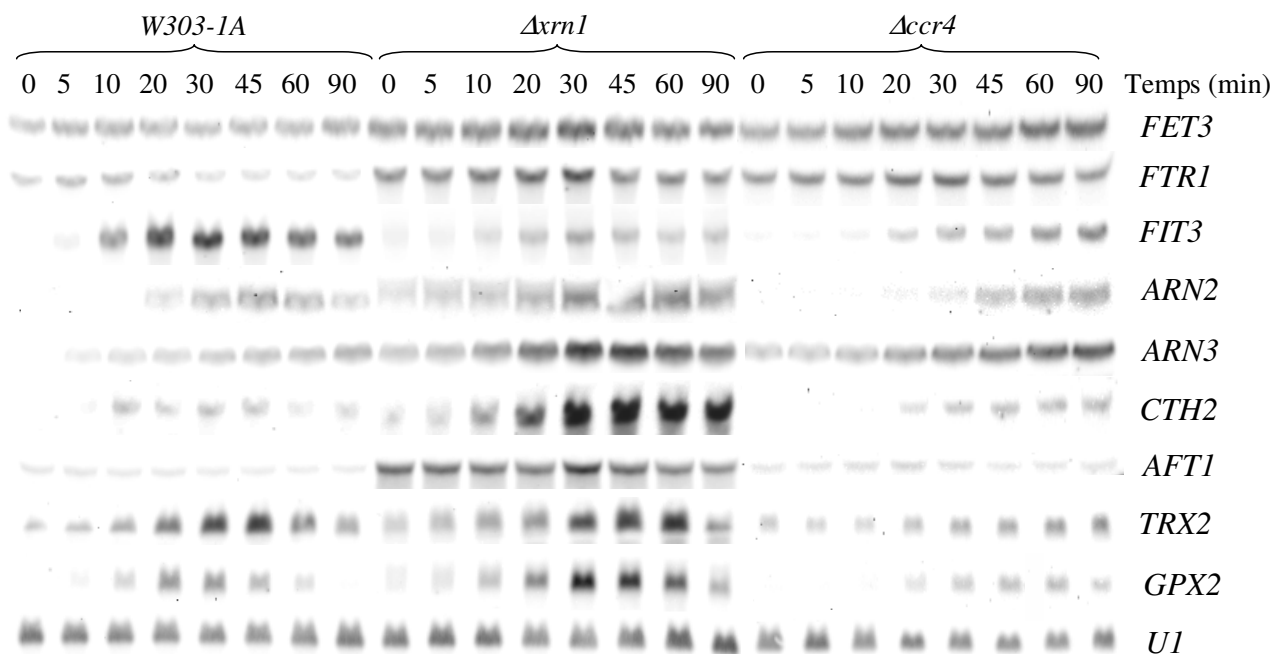
**Il·lustració 63.** Anàlisi de l'expressió de gens del reguló Aft1 en mutants per a proteïnes implicades en la degradació de l'mRNA. Les soques mutades (Taula 13) es deixen créixer fins a fase exponencial, al  $t_0$  s'afegeix *t*-BOOH a una concentració de 0,8 mM i es recullen alíquotes de cultiu a diversos temps. Aquestes es processen per Northern blot i, finalment, s'afegeixen les sondes dels gens del reguló Aft1: *FET3*, *FTR1*, *FIT3* i el control de càrrega *U1*; per algunes soques també es comprova l'expressió de *TRX2*, com a control de l'estrès oxidatiu.

D'una banda, *Xrn1* és una exonucleasa 5'-3' conservada evolutivament, que forma part dels *P*-*bodies* implicats en la degradació de l'mRNA (Sheth i Parker, 2003) i en diverses funcions en *S. cerevisiae* meiosi, processos mediat pel microtúbul, creixement filamentós, maduració de l'rRNA i manteniment dels telòmers (Askree *et al*, 2004; Kim i Kim, 2002; Solinger *et al*, 1999). Per l'altra banda, *Ccr4* és un component de la deadenilasa citoplasmàtica majoritària involucrat en la regulació de l'expressió gènica, que escurça la cua poli(A) dels mRNAs (Tucker *et al*, 2001).

En el fons W303 els mutants  $\Delta xrn1$  i  $\Delta ccr4$  tenen uns nivells d'expressió dels gens *FET3*, *FTR1* i *FIT3* semblants al fons BY4741, després d'estrès oxidatiu (Il·lustració 64). En observar detingudament la cinètica d'addició de l'agent oxidant, es veu com els trànscrips de *FET3* i *FTR1* s'acumulen amb el temps, sobretot en les últimes mostres en el cas de  $\Delta ccr4$ , i amb un màxim d'inducció cap als 30 minuts en el  $\Delta xrn1$ . L'augment dràstic i sostingut de l'mRNA de *FIT3* en la soca salvatge no es repeteix en les soques mutants. En  $\Delta xrn1$  la inducció és més minsa i en  $\Delta ccr4$  més tardana en el temps. El trànscrip d'*ARN2* té uns nivells més elevats al llarg de la cinètica d'estrès oxidatiu en  $\Delta xrn1$ , i en  $\Delta ccr4$  és més tardana. L'mRNA

## Resultats

d'ARN3 té nivells més alts i s'acumula amb l'addició de l'oxidant, en els dos mutants. Pel que fa a l'expressió de *CTH2*, en el cas de  $\Delta xrn1$  té una inducció més elevada que la soca salvatge i arriba a acumular-se enormement; en el cas del mutant  $\Delta ccr4$  té un augment més tardà en el temps. Els nivells d'mRNA d'*AFT1* són més alts en el  $\Delta xrn1$ , fet que podria explicar perquè en general en aquest mutant s'assoleixen nivells de trànscrips més alts; contràriament, en  $\Delta ccr4$ , els nivells d'expressió d'*AFT1* són iguals que en la soca salvatge. L'expressió de dos gens de resposta a estrès oxidatiu (*TRX2* i *GPX2*) indiquen com les soques mutades es comporten en front aquest estrès:  $\Delta xrn1$  ho fa de manera semblant a la salvatge; en canvi  $\Delta ccr4$  indueix el trànscrip de *TRX2* a nivells bastant més baixos que la soca salvatge, i el de *GPX2* més tardanament que en la cinètica típica de resposta a estrès oxidatiu d'aquest mRNA.

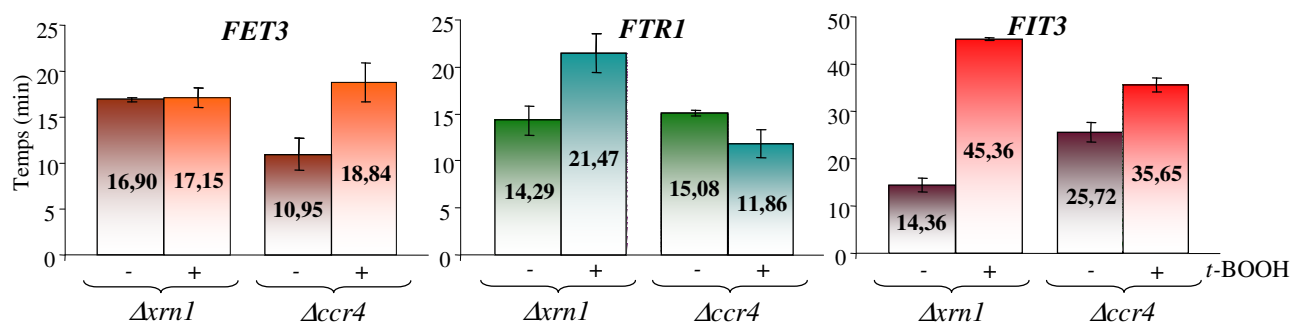


**Il·lustració 64.** Expressió dels gens del reguló Aft1 en les soques  $\Delta xrn1$  i  $\Delta ccr4$  arran de l'estrès oxidatiu. Processament per Northern blot de les cinètiques resultants de l'addició de 0,1 mM *t*-BOOH en cèl·lules creixent exponencialment en medi YPD; s'utilitzen les sondes d'alguns gens regulats per Aft1. S'inclouen també les sondes de *TRX2* i *GPX2* com a gens control de la resposta antioxidant i *UI* com a control de càrrega. Les soques utilitzades són: W303-1A (tipus salvatge), MML1196 ( $\Delta xrn1$ ) i MML1192 ( $\Delta ccr4$ ).

Seguidament, amb l'objectiu d'esbrinar la participació de les proteïnes Xrn1 i Ccr4 en l'estabilitat dels mRNAs dels gens de la via reductiva del sistema d'adquisició de ferro d'alta afinitat, s'analitzen cinètiques d'apagada dels mRNAs d'aquests gens sota el promotor *tetO<sub>2</sub>* en soques delecionades per aquests dos gens. Els resultats obtinguts abans i 60 minuts després de l'addició d'oxidant es mostren a la Il·lustració 65. Amb la manca d'Xrn1, l'mRNA de *FET3* perd la desestabilització després de l'estrès oxidatiu; l'mRNA d'*FTR1* sembla estabilitzar-se molt més i l'mRNA de *FIT3*, que s'estabilitza ja a nivells basals ho fa dràsticament amb l'addició d'oxidant, comparada amb la vida mitjana que té aquest missatger en una soca



salvatge (II·lustració 40). En les soques delecionades per *CCR4*, l'mRNA de *FET3* sembla tenir una vida mitjana inferior en condicions basals que en la soca salvatge (II·lustració 51) i en resposta a l'estrès oxidatiu perd la desestabilització que ocorre en la soca salvatge. L'mRNA d'*FTR1* també té una vida mitjana major en la soca  $\Delta ccr4$  sense estrès i no disminueix significativament per efecte de l'estrès (el grau de desestabilització és molt menor que en la soca salvatge). L'mRNA de *FIT3*, que (com en la soca  $\Delta xrn1$ ) s'estabilitza en condicions fisiològiques, després de l'estrès la seva vida mitjana augmenta. En conclusió, tant Xrn1 com Ccr4 contribueixen en la desestabilització dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* després d'afegir *t*-BOOH. A més, sembla que Xrn1 afecta en major grau a la vida mitjana d'*FTR1* i Ccr4 ho fa a la de *FET3*. Les dues proteïnes participen en la degradació de l'mRNA de *FIT3* tant en condicions fisiològiques com després de l'addició de l'agent oxidant. Prèviament s'ha mostrat l'increment transitori de la vida mitjana de l'mRNA de *FIT3* després de l'estrès oxidatiu (II·lustració 40). És possible que Xrn1 i Ccr4 participin en la recuperació de la TD de l'mRNA d'aquest gen pròpia de les cèl·lules no tractades.



**II·lustració 65.** Vides mitjanes dels mRNAs de *FET3*, *FTR1* i *FIT3* en els mutants  $\Delta xrn1$  i  $\Delta ccr4$ . Es calculen les  $t_{1/2}$  dels mRNAs de cultius que creixen exponencialment i als 60 minuts després d'afegir 0,1 mM de *t*-BOOH. S'empren les següents soques amb els gens del reguló Aft1 sota el promotor *tetO<sub>2</sub>*: MML1222 ( $\Delta xrn1$ ) i MML1237 ( $\Delta ccr4$ ) per *FET3*, MML1224 ( $\Delta xrn1$ ) i MML1239 ( $\Delta ccr4$ ) per *FTR1*, i MML1241 ( $\Delta xrn1$ ) i MML1243 ( $\Delta ccr4$ ) per *FIT3*.

El creixement de les soques emprades en condicions d'estrès oxidatiu, depleció de ferro i amb els dos estressos es mostra a la II·lustració 66. Cal destacar que la soca *tetO<sub>2</sub>-FTR1* en les plaques que contenen BPS i l'agent oxidant són més sensibles que les cèl·lules salvatges, és a dir, la sobreexpressió d'*FTR1* comporta una forta toxicitat en aquestes condicions.

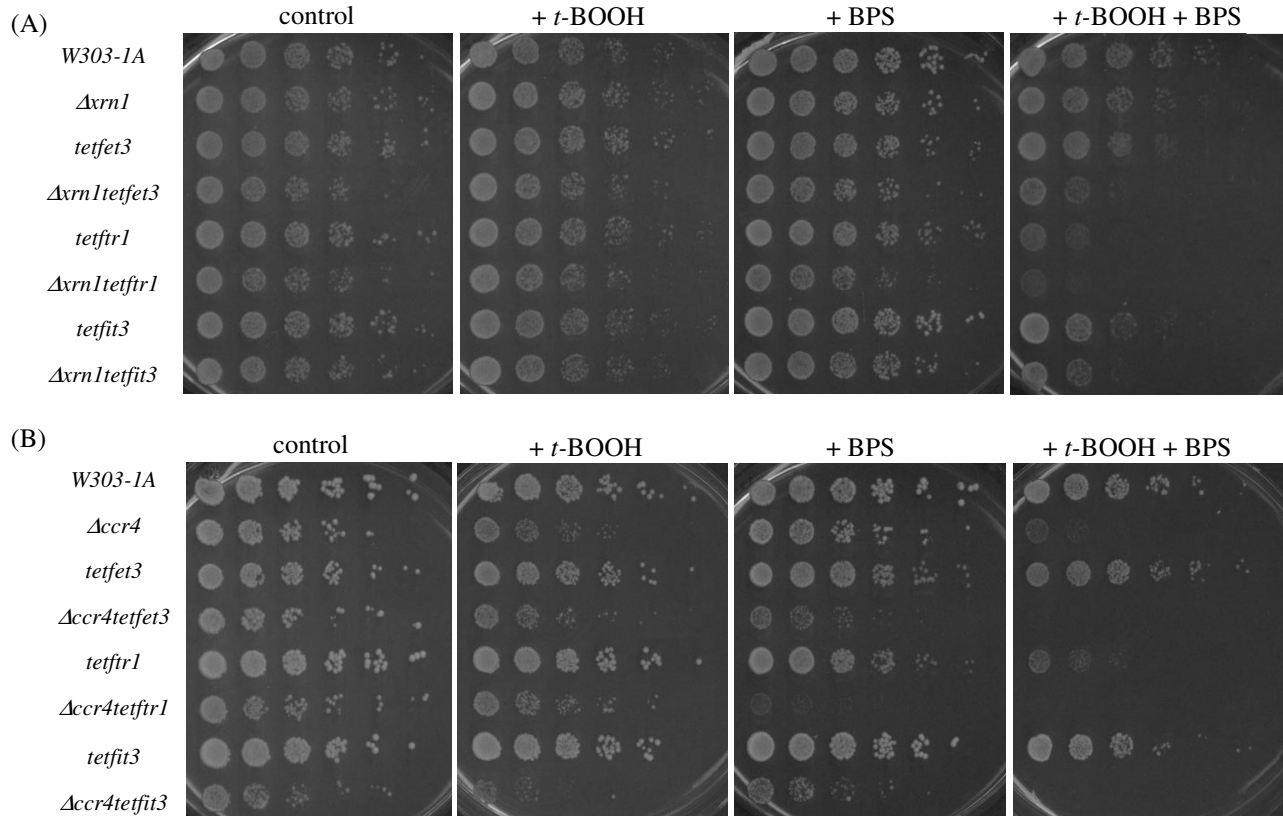
La delecio d'*XRN1* (apartat A, de la II·lustració 66) no sembla ésser gaire important per a les cèl·lules creixent en les dues condicions, però en combinar aquesta mutació amb els gens *FET3*, *FTR1* o *FIT3* sota el promotor sobreexpressor *tetO<sub>2</sub>*, s'incrementa el grau de sensibilitat respecte als mutants simples en presència dels dos agents.

La soca  $\Delta ccr4$  (apartat B, de la II·lustració 66) creix més lentament que la soca salvatge en medi ric, i en afegir-hi un agent estressant encara és més sensible. Tot i així, té dificultats més severes de creixement en presència dels dos agents. En combinar aquesta mutació amb la sobreexpressió dels tres gens



## Resultats

sota el promotor *tetO<sub>2</sub>* la sensibilitat que s'observa és major que en els mutants simples, però hi ha diferències segons el gen sobreexpressat. La soca *tetO<sub>2</sub>-FTR1 Δccr4* és realment més sensible en condicions de privació de ferro, i la soca *tetO<sub>2</sub>-FIT3 Δccr4*, en condicions d'estrès oxidatiu. Cap de les tres soques doble mutants creix en presència dels dos estressos.

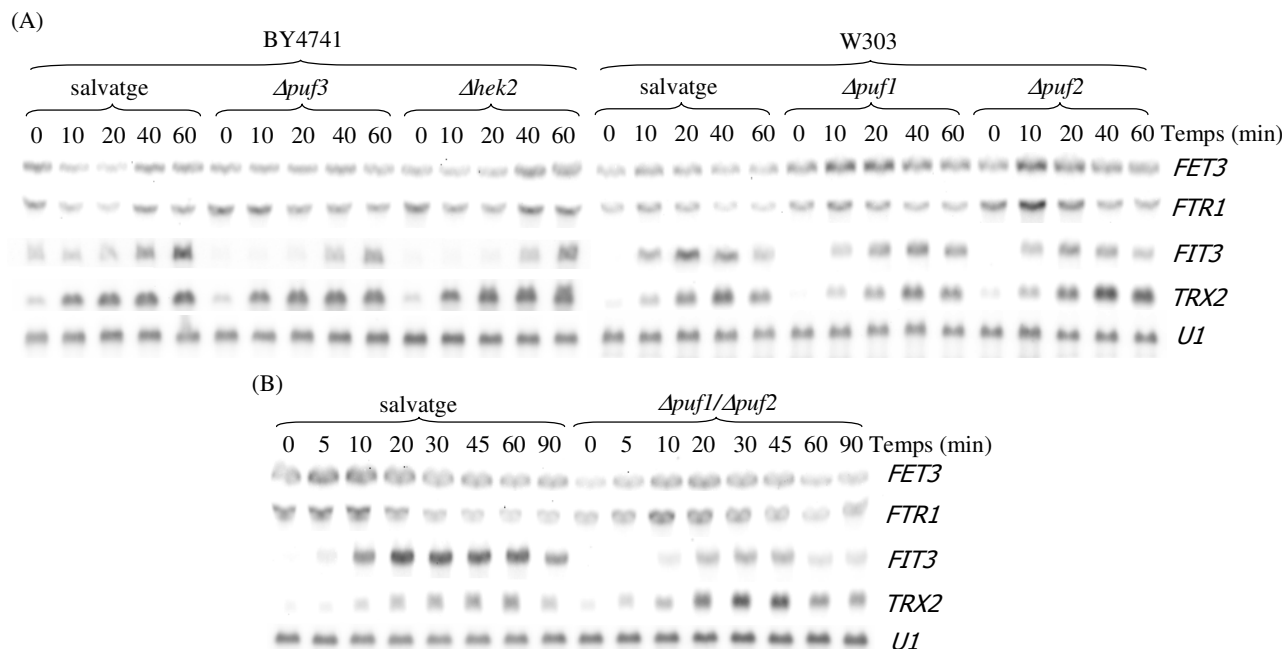


**Il·lustració 66.** Assaig de sensibilitats de les soques mutants que sobreexpressen *FET3*, *FTR1* i *FIT3* combinades amb els mutants  $\Delta xrn1$  o  $\Delta ccr4$ . Es plaquegen cultius creixent exponencialment en medi líquid YPD quatre vegades: en una placa de medi sòlid YPD (control), una placa amb l'agent oxidant (+ *t*-BOOH), una placa amb l'agent quelant de ferro (+ BPS) i una placa que combina els dos estressos (+ *t*-BOOH + BPS). (A) Plaques amb 0,1 mM de BPS i/o 0,25 mM de *t*-BOOH, segons l'ocasió, que contenen les soques: W303-1A (salvatge), MML1196 ( $\Delta xrn1$ ), MML1099 (*tetO<sub>2</sub>-FET3/tetR'*), MML1222 (*tetO<sub>2</sub>-FET3/tetR'*,  $\Delta xrn1$ ), MML1093 (*tetO<sub>2</sub>-FTR1/tetR'*), MML1224 (*tetO<sub>2</sub>-FTR1/tetR'*,  $\Delta xrn1$ ), MML990 (*tetO<sub>2</sub>-FIT3/tetR'*) i MML1241 (*tetO<sub>2</sub>-FIT3/tetR'*,  $\Delta xrn1$ ). (B) Plaques amb 0,1 mM de BPS i/o 0,1 mM de *t*-BOOH, segons el cas, que tenen les soques: W303-1A (salvatge), MML1192 ( $\Delta ccr4$ ), MML1099 (*tetO<sub>2</sub>-FET3/tetR'*), MML1237 (*tetO<sub>2</sub>-FET3/tetR'*,  $\Delta ccr4$ ), MML1093 (*tetO<sub>2</sub>-FTR1/tetR'*), MML1239 (*tetO<sub>2</sub>-FTR1/tetR'*,  $\Delta ccr4$ ), MML990 (*tetO<sub>2</sub>-FIT3/tetR'*) i MML1243 (*tetO<sub>2</sub>-FIT3/tetR'*,  $\Delta ccr4$ ).

### 3.4.3.- Cerca bibliogràfica d'altres proteïnes d'unió a RNA i RNases candidates a degradar mRNA en condicions d'estrès oxidatiu

S'analitza l'estudi de Hogan i col·laboradors (2008) en el qual troben dianes a 40 RBPs d'*S. cerevisiae* pels mRNAs dels gens *FET3*, *FTR1* i d'altres gens del reguló Aft1 que també es desestabilitzen en un estrès oxidatiu. S'obté que Hek2 té entre les seves dianes l'mRNA de *FET3* i Puf2, el d'*FTR1*. Hek2 és una proteïna d'unió a RNA associada a diverses funcions (Denisenko i Bomsztyk, 2002; Irie *et al*, 2002), la qual s'ha trobat que interacciona amb mRNAs codificants per proteïnes associades a paret cel·lular o membrana (Hasegawa *et al*, 2008). Puf2 és un membre de la família de proteïnes PUF definides per la presència de dominis homòlegs Pumilio que els confereixen activitat d'unió a RNA. Aquesta proteïna, com també Puf1, uneix preferentment mRNAs codificants per proteïnes associades a membrana (Gerber *et al*, 2004). Puf3 està implicada en la degradació d'mRNAs codificants per proteïnes mitocondrials i la seva expressió correlaciona positivament en certes condicions estressants, com estrès oxidatiu i estrès tèrmic (Foat *et al*, 2005).

L'expressió dels gens *FET3* i *FTR1* en els mutants nuls d'aquestes proteïnes es mostra en la Il·lustració 67. En l'apartat (A) es veuen els nivells dels transcrits en els mutants simples, després de l'addició de l'agent oxidant. En l'apartat (B) s'utilitza en el doble mutant  $\Delta puf1/\Delta puf2$ , per evitar un possible solapament de la funció d'aquestes dues proteïnes. En cap dels casos hi ha una diferència notable d'expressió. A més, les soques mutants per aquests gens no presenten especial sensibilitat a l'estrès oxidatiu, ni a deficiència de ferro, ni a la combinació dels dos estressos.



**Il·lustració 67.** Transcripció dels gens del reguló Aft1 en mutants simples i dobles per a proteïnes de la família PUF i la proteïna Hek2 després de l'addició de *t*-BOOH. Cinètiques de l'estrès oxidatiu aplicades a cultius

## Resultats

creixent exponencialment en medi YPD de diverses soques mutants. S'analitzen per Northern blot amb les sondes: *FET3*, *FTR1* i *FIT3* del reguló Aft1, *TRX2* com a control de la resposta a estrès oxidatiu i *U1* per comprovar la càrrega. (A) Les tres primeres soques analitzades pertanyen al fons genètic BY4741: salvatge (BY4741) i els mutants simples  $\Delta puf3$  i  $\Delta hek2$  (Taula 13). Les mostres es prenen després d'afegir *t*-BOOH a una concentració de 0,8 mM. Les tres últimes soques pertanyen al fons genètic W303: W303-1A (salvatge), MML1247 (*Apuf1*) i MML1249 (*Apuf2*) i corresponen a alíquotes de cultius estressats amb 0,1 mM de *t*-BOOH. (B) Mostres processades de la cinètica d'estrès oxidatiu a 0,1 mM de *t*-BOOH per al doble mutant  $\Delta puf1/\Delta puf2$  (MML1254), comparada amb la soca salvatge (W303-1A).

Hogan i col·laboradors (2008) defineixen diversos motius diana consens per algunes RBPs. No obstant, però, no es troben regions significativament específiques en els mRNAs desestabilitzats del reguló Aft1, comparativament amb els estabilitzats en l'estrès oxidatiu.

## V. DISCUSSIÓ



## 1.- La resposta transcripcional d'*S. cerevisiae* front a l'estrès tèrmic i oxidatiu

En aquest treball s'analitzen diferents paràmetres de transcripció en resposta a dos estressos moderats, tèrmic i oxidatiu, a nivell del genoma complet d'*S. cerevisiae* mitjançant la tècnica de GRO. Aquesta tècnica permet obtenir dos variables de la transcripció simultàniament: l'RA i la TR. A partir d'aquestes es pot inferir l'estabilitat de l'mRNA. Dels càlculs matemàtics en resulten perfils de  $k_D$  que prediuen la tendència global de l'estabilitat de cada mRNA durant la resposta a l'estrès.

És important destacar que amb aquesta metodologia s'obtenen dades de TR per als dos estressos, impossibles de tenir mitjançant les tècniques de microxips convencionals. D'aquesta manera es pot analitzar l'evolució de la TR i l'RA durant la resposta a estrès i definir així les semblances i divergències per a cada gen, ja que l'RA d'un gen individual és el resultat de les seves TR i TD. A més, amb aquest procediment som capaços de relacionar grups de gens induïts transcripcionalment de manera simultània, tot i que l'RA no segueixi un patró comú (com és el cas del reguló Aft1 en resposta a estrès oxidatiu, discutit en l'apartat 2), o detectar gens que, tot i no presentar un increment en l'RA, augmenten la seva transcripció arran d'un estrès. En aquest sentit les nostres anàlisis mostren un altre tipus de comportament interessant compartit pels gens inclosos en els grups 8-12 en l'estrès oxidatiu (II-lustració 29), així com els inclosos en els grups 7-10 en l'estrès tèrmic (II-lustració 11). Aquests gens presenten una inducció en el paràmetre TR que no es correspon amb els seus nivells d'mRNA reprimits o gairebé constants, fet que revela un important efecte de desestabilització causat per aquests estressos, tal com prediuen les  $k_D$  matemàtiques dels nostres estudis (II-lustració 13 i II-lustració 31). D'altra banda, els nivells d'mRNA dels gens dels grups 15-16 (de l'estrès tèrmic) i 1-2 (de l'oxidatiu) presenten un increment al llarg de la cinètica, tot i la disminució de la TR, apuntant a què l'estabilització de l'mRNA, predita també teòricament, és la causa de l'augment de l'expressió dels gens d'aquests grups. En aquests dos exemples esmentats són principalment fenòmens posttranscripcionals de desestabilització o estabilització els responsables directes dels canvis en els patrons d'expressió, encara que hi hagi o no variació de la TR. Aquest fet ocorre en aproximadament el 30% del genoma d'aquest microorganisme en resposta a un estrès tèrmic o oxidatiu. Els gens del grup 6 (en l'estrès tèrmic, II-lustració 11), que inclouen les categories "Metabolisme d'Aminoàcids" i "Metabolisme d'Àcids Carboxílics") i del grup 7 (en l'oxidatiu, II-lustració 29), amb la majoria dels gens PR, II-lustració 33) mostren una davallada significativa dels nivells d'RA al llarg de la cinètica tot i que només s'observa una breu fluctuació negativa de la TR, fet que suggereix que fenòmens de desestabilització serien els responsables de perllongar la repressió dels nivells d'expressió en resposta a estrès. Aquests exemples il·lustren la influència de l'estabilitat de l'mRNA en la regulació gènica, així com, la capacitat de diferenciar aquests comportaments amb les eines utilitzades en aquest treball. A més, es proposa que

## Discussió

l'anàlisi dels canvis en la TR mitjançant la tècnica GRO, capaç de detectar pics d'inducció petits i breus, pot millorar les cerques per als gens que pertanyen al mateix reguló, ja que aquests canvis són la conseqüència principal de l'acció de factors de transcripció (Bussemaker *et al*, 2001).

Certament, un nombre significatiu de gens en resposta a l'addició de *t*-BOOH pateixen canvis modestos en els nivells dels paràmetres de transcripció. Aquest és el cas del grup 5 en l'estrès oxidatiu (439 gens), que es caracteritza per una repressió moderada (menys del 50% de disminució en comparació amb el temps 0) de la TR i l'RA i s'enriqueix en els gens implicats en la secreció de proteïnes. Els grups 11, 12, 22, 23 i 24 també mostren més aviat valors constants de TR i RA, sense estar enriquits en categories funcionals particulars. En total, menys d'una quarta part del genoma del llevat manté valors estables (canvis de menys de 2 vegades) d'ambdós paràmetres, TR i RA, en les condicions d'estrès oxidatiu aplicades. Aquest fet contrasta amb la resposta transcripcional després de l'estrès tèrmic, en la qual algun dels dos paràmetres (TR o RA) varia més del 50% en comparació amb el temps 0. Per tant, en general en un xoc per calor els paràmetres d'expressió varien intensament per respondre a aquest estrès.

En el xoc per calor s'observa una estabilització generalitzada de l'mRNA, ja que arran d'aquest xoc l'RA d'aquestes cèl·lules pateix un augment general i mantingut sostingudament al llarg de la cinètica, mentre que tan sols hi ha un increment inicial i transitori de la TR<sub>II</sub> que posteriorment disminueix. Per tant, els efectes d'estabilització de l'mRNA contribueixen a assolir i mantenir nivells globals més elevats de l'RA en les condicions descrites. Aquestes dades contrasten amb el comportament general de desestabilització predit en la resposta del llevat en front un estrès oxidatiu moderat. En les condicions emprades la TR<sub>II</sub> no canvia significativament durant l'interval de temps examinat, a excepció d'una breu inducció en els primers minuts de tractament. Tot i així, en les dues condicions d'estrès utilitzades, s'observen tant grups de gens que mostren valors induïts de TR, com altres que els tenen reprimits. Quan s'estudien individualment les cinètiques de TR i d'RA i seguidament s'agrupen els gens per homologia de perfils de resposta, els patrons presenten diversitat de comportament, reflectida en la classificació en setze grups en resposta a l'estrès tèrmic (II·lustració 11) i vint-i-cinc a l'estrès oxidatiu (II·lustració 29). En contrastar els patrons de les dues respostes transcripcionals a estrès destaca la uniformitat dels perfils transcripcionals arran del xoc tèrmic, en comparació amb l'oxidatiu, en el qual hi ha més heterogeneïtat. II·lustra l'homogeneïtat de la resposta transcripcional a estrès tèrmic el fet que gairebé la meitat dels gens d'*S. cerevisiae* s'agrupen en dos perfils de cinètiques (els grups 11-12), els quals presenten la TR i l'RA induïdes. En els dos grups es prediu un efecte d'estabilització de l'mRNA, fet que concorda amb la predicció global d'estabilització en resposta a aquest estrès. La concentració de la majoria dels gens en un petit nombre de grups en la resposta transcripcional a estrès tèrmic contrasta amb la dispersió de la resposta a estrès oxidatiu on, a més, el nombre de grups també és major. En aquest estrès, la major part dels gens es reprimeixen, i molts d'aquests ho fan a nivell de TR.

La resposta transcripcional d'*S. cerevisiae* a un xoc tèrmic presenta dues divisions principals en la classificació dels gens segons la inducció (grups 11-16, el 56%) o la repressió de l'RA (grups 1-10, el 44%). Els grups que presenten un augment de l'mRNA en resposta a estrès tèrmic s'agrupen en la branca inferior, la qual és difícil de definir com a branca pròpiament, ja que el braç de sortida té una longitud mínima, no comparable amb la de la primera branca, ni amb les dues subdivisions d'aquesta. Per tant, els grups 11-16 tenen poca relació entre ells i la ramificació on es troben podria originar-se directament de l'arrel de l'arbre. Els gens corresponents a aquests grups, tot i tenir un increment en l'RA, divergeixen en les cinètiques de TR. Els perfils del petit nombre de gens inclosos en els grups 15-16 presenten una TR estable o que disminueix, fet que indica que l'augment d'RA depèn exclusivament dels efectes d'estabilització de l'mRNA. Com ja s'ha comentat aquesta situació hagués passat inadvertida en anàlisis estàndards de microxips de DNA. Els nivells dels mRNAs dels gens del grup 14, en els que es preveu una estabilització notable, s'indueixen molt més intensament (unes 4 o 5 vegades aproximadament) que el que s'esperaria en conseqüència a la inducció moderada de la seva TR. En aquest cas l'acumulació d'mRNA en la resposta al xoc per calor sembla ser deguda no només a l'augment de la transcripció de l'mRNA, sinó també als efectes d'estabilització. Els grups 11-13 inclouen al voltant de la meitat dels gens estudiats, i en tots tres grups l'augment de l'RA és paral·lel a la regulació positiva de la TR, més o menys sostinguda. Els grups 11-12 són els més nombrosos i allotgen un 45% dels gens analitzats. En aquests grups la resposta de xoc tèrmic també està modulada pels efectes d'estabilització de l'mRNA (tot i el pic de desestabilització inicial i transitori predit per als gens del grup 11). Els gens de la categoria funcional CCP pertanyen majoritàriament als grups 11-12, i l'anàlisi específica dels seus paràmetres de TR, RA i  $k_D$  (Il·lustració 13) mostra que l'RA d'aquests augmenta més tardanament i lenta que les seves TRs, reforçant el paper combinat de la TR i l'estabilitat de l'mRNA per tal d'assolir nivells alts dels trànscrips dels gens implicats en els mecanismes de degradació, per a l'eliminació de les proteïnes danyades per calor. El complex del proteosoma citoplasmàtic participa en la degradació de diverses proteïnes intracel·lulars i és necessari per al funcionament òptim de les cèl·lules en condicions normals, així com per a la seva supervivència en condicions d'estrès (Karpov *et al*, 2009); l'activitat del proteosoma és fonamental, juntament amb el plegament de proteïnes per a superar l'estrès tèrmic (Riezman, 2004). En l'experiment de xoc tèrmic dut a terme, el factor de transcripció Rpn4, específic de gens del proteosoma en *S. cerevisiae* (Mannhaupt *et al*, 1999) augmenta la seva expressió, fet que concorda amb els nivells d'mRNAs del proteosoma. En estudiar en detall els gens del CCP en resposta a estrès oxidatiu s'observa que presenta una inducció general dels valors de TR i una gran heterogeneïtat en els patrons d'RA, fet que suggereix que els canvis en l'estabilitat de l'mRNA defineixen el perfil diferencial d'RA de cada gen del CCP en resposta a estrès oxidatiu.

Altres categories funcionals *GO* enriquides en els grups que presenten inducció de la TR i l'RA són les següents. (i) La categoria de "Reticle Endoplasmàtic" (grup 11), un compartiment de plegament de proteïnes amb ambient oxidant en el qual resideixen nombroses xaperones que faciliten i promouen el



## Discussió

plegament de polipèptids (Kaufman, 1999). Recentment, s'ha descrit un solapament parcial de la resposta a xoc tèrmic i la Resposta a Proteïnes Desplegades (UPR) que s'indueix arran d'estrès al reticle endoplasmàtic per les proteïnes mal plegades (Liu i Chang, 2008). Aquests dos tipus d'estrès comparteixen diverses dianes de transcripció. (ii) La categoria de "Transport d'Electrons" (grup 12) en la qual la resposta a estrès implica un increment dels requeriments energètics, així com, també, el transport de metabòlits (Gasch, 2003) i la inducció dels gens de la respiració (Causton *et al.*, 2001). En els nostres experiments d'estrès tèrmic s'indueixen transcripcionalment un 94% dels gens i a nivell d'RA un 67% de la categoria GO "Respiració Cel·lular"; en canvi en l'estrès oxidatiu s'indueixen a nivell de TR un 57% dels gens d'aquesta categoria i un 21% en RA. Aquestes observacions apunten al fet que la cèl·lula que pateix estrès oxidatiu reprimeix la respiració per evitar més generació de ROS. Contràriament, un cultiu creixent a 37°C presenta un metabolisme més ràpid i una taxa de creixement més alta. Per tant, el llevat respondria transcripcionalment per enfrontar-se a les imminents necessitats energètiques degudes a aquestes majors reaccions biosintètiques. A més, a diferència de la resposta a estrès oxidatiu, després d'un estrès tèrmic s'indueixen totes les Hsps estudiades, moltes de les quals hidrolitzen ATP. En aquest sentit, a més, s'observen tendències semblants en els mRNAs dels gens que pertanyen a la categoria funcional "Catabolisme de Glucosa". D'altra banda, independentment del medi (fermentatiu o oxidatiu), el nivell intracel·lular de ROS augmenta amb l'increment de temperatura, i per tant, es produeix estrès oxidatiu (Sugiyama *et al.*, 2000). Aquests fets podrien comportar un augment en l'expressió dels gens implicats en el transport d'electrons. (iii) La categoria "Regulació de la Transcripció" (grup 13), sense diferències quantitatives entre l'expressió de reguladors negatius i positius. Així, s'observa que en aquest estrès les cèl·lules de llevat realitzen una gran inversió en la modificació de la transcripció, ja que segons les dades obtingudes en l'experiment de xoc tèrmic tan sols un 4% dels gens (grups 6 i 15, Il·lustració 11) presenten una TR pràcticament constant. Per tant, la resposta transcripcional a l'estrès tèrmic ocorre a nivell general, és a dir, s'esdevenen canvis en els patrons de transcripció de la majoria dels gens d'*S. cerevisiae*. A més, els nivells dels transcrits dels gens de la categoria funcional "Regulació de la Transcripció" (inclosos en aquests grups) es mantenen elevats fins als darrers temps de la cinètica. (iv) Un altre cas amb paràmetres de TR i RA elevats és el dels 39 gens de la categoria GO "Plegament de Proteïnes" (on s'inclouen alguns gens d'Hsps), la majoria dels quals es distribueixen entre els grups 11 i 12. La importància de les funcions d'aquests gens per a restaurar la funcionalitat de les proteïnes després d'un xoc tèrmic explica la inducció de l'RA corresponent observada en altres anàlisis genòmiques (Gasch *et al.*, 2000; Trott i Morano, 2003). No obstant, el present estudi aporta el pes de la influència de l'estabilització de l'mRNA al llarg de la cinètica de resposta, ja que els nivells d'mRNA es modulen per la seva TD (Il·lustració 16). Analitzant en profunditat els paràmetres transcripcionals dels gens de 10 Hsps en l'estrès tèrmic es fa palesa una regulació diferencial en la TD d'aquests mRNAs. És a dir, tots els mRNAs de les Hsps en aquestes condicions s'indueixen a nivell de TR i RA (Il·lustració 17), però uns quants s'estabilitzen i d'altres es desestabilitzen,

fet que modifica notablement els seus perfils d'expressió. Aquestes TDs característiques es comproven pels mRNAs d'*HSP42* i *HSP104*, els quals tenen unes vides mitjanes més altes amb l'estrès, i *HSP12* i *HSP26*, que, contràriament, es desestabilitzen. L'estabilització o desestabilització temporal contribueix a perllongar o escurçar la inducció de l'RA en la cinètica de resposta. Aquesta regulació positiva o negativa de la vida mitjana dels mRNAs arran de l'estrès tèrmic podria estar relacionada amb uns requeriments cel·lulars diferents dels nivells d'aquestes proteïnes al llarg de l'estrès tèrmic. Aquestes quatre Hsps estan implicades en l'ESR (Gasch, 2003) i la seva expressió en resposta a estrès, com ja s'ha comentat, resulta de la combinació de l'acció dels seus activadors transcripcionals (Hsf1, Msn2/4, Yap1, Skn7, Aft1, etc.) i els canvis en la vida mitjana del seu mRNA. D'altra banda, s'ha descrit que els mRNAs codificants per Hsps es degraden específicament per la via mediada per la repressió de l'inici de la traducció, la qual s'activa en alentir-se l'inici de la traducció (Heikkinen *et al*, 2003). A 37°C, els nivells d'aquests mRNAs es regulen per aquesta via de degradació per permetre la quantitat necessària d'mRNA codificant per Hsps al llarg de l'estrès; a 41°C, en canvi, aquests mRNAs s'estabilitzen i queden disponibles per a traduir-se un cop superat l'estrès, ja que la funcionalitat de les estructures macromoleculares es recupera en assolir les condicions normals de creixement (Bond, 2006). No obstant, l'estudi de Heikkinen i col·laboradors (2003) no es pot comparar amb el nostre, ja que només mostren dades d'experiments realitzats a 37°C en soques salvatges i mutades.

En canvi, en l'estrès oxidatiu, els nostres resultats mostren que no tots aquests gens s'indueixen. Els paràmetres transcripcionals de la categoria funcional *GO* "Plegament de Proteïnes" són molt dispersos entre els 25 grups de gens. Mentre que en la resposta a estrès tèrmic s'indueixen transcripcionalment un 93% dels transcrits d'aquesta categoria i un 66% ho fan a nivell d'RA, en resposta a estrès oxidatiu, un 63% ho fa a nivell de TR i només un 24% ho fa en RA. Aquestes dades mostren la transcendència de la TD en la modulació de l'expressió dels gens de la categoria *GO* "Plegament de Proteïnes" en resposta a aquests estressos. A més, s'ha descrit que en resposta a estrès oxidatiu s'indueixen diverses Hsps (Godon *et al*, 1998). En cercar els factors de transcripció associats a gens d'Hsps apareixen uns quants activadors documentats -entre ells Skn7- en tots ells excepte en *HSP10*, *HSP60* i *HSP150*, que són justament els gens que codifiquen per les Hsps que no s'indueixen en afegir *t*-BOOH (Il·lustració 36). Skn7 és requerit per a l'òptima inducció dels gens Hsps en resposta a estrès oxidatiu (Raitt *et al*, 2000). D'altra banda, en condicions d'estrès oxidatiu els mRNAs d'*HSP42* i *HSP104* també s'estabilitzen. S'ha comprovat, a més, que l'mRNA d'*HSP12* (dades no mostrades) s'indueix en aquest estrès i es desestabilitza, com en el cas de l'estrès per calor. Per tant, en els nostres experiments els mRNAs dels gens *HSPs* induïts en els dos estressos semblen compartir, a més, els efectes d'estabilitat de l'mRNA.

Els grups 1 i 2, de la classificació realitzada en l'estrès tèrmic, constitueixen altres exemples de gens en els que la cinètica de TR no ve acompanyada de canvis en l'RA. En aquest cas, els valors d'RA segueixen essent bàsicament constants després del xoc per calor, mentre que els nivells de TR disminueixen

## Discussió

després d'una petita inducció inicial. Aquest seria un altre cas en el que els experiments de microxips de DNA convencionals no serien capaços de revelar la modulació dels nivells d'mRNA per canvis en la taxa de degradació en la resposta a xoc tèrmic.

En contrast amb la tendència global a l'estabilització de l'mRNA, en diversos grups de gens (els grups 3-10) es prediu que els seus mRNAs es desestabilitzen arran del xoc tèrmic. Els grups 3-6 (675 gens) mostren una disminució de l'RA probablement deguda a la combinació de la repressió de la TR i els efectes de la degradació de l'mRNA. Les categories *GO* "Estructura i Biogènesi Ribosomal" queden sobrerrepresentades en alguns d'aquests grups. Altres autors han descrit que els nivells d'mRNA de les PR i PPR decreixen en un xoc tèrmic, com també ho fa la síntesi de PR en aquestes condicions (Herruer *et al*, 1988; Li *et al*, 1999). L'anàlisi detallada de les categories PR i PPR mostra que la forta desestabilització dels seus mRNAs juntament amb la inhibició de la TR són responsables de la repressió de l'RA, com es discuteix posteriorment. Aquestes dades teòriques es corroboren amb la disminució de la vida mitjana mesurada experimentalment en l'mRNA d'*RRP40* i *RPS6A*, dos gens d'aquesta categoria funcional.

Altres gens, involucrats en el metabolisme de biomolècules, que formen part de la categoria *GO* "Metabolisme d'Àcids Carboxílics" i el "Metabolisme d'Aminoàcids" (enriquets en el grup 6) segueixen una tendència similar: de nou forts efectes de desestabilització de l'mRNA contribueixen a la repressió temporal de gens implicats en el metabolisme durant l'estrès tèrmic. Cal assenyalar que aquesta repressió no és paral·lela als efectes fenotípics en la taxa de creixement. Entre aquests trànscrips que es reprimeixen i que, a més, es desestabilitzen es troben, també, les categories funcionals segons *GO* "Activitat RNA Helicasa Dependent d'ATP" i "Activitat Lligasa de tRNA" (enriquets en el grup 4), possiblement per estalviar energia i per reduir la traducció (discutit més endavant).

Els grups 7-10 mostren efectes divergents sobre els paràmetres d'RA i TR, ja que la inducció més o menys sostinguda de la TR no és paral·lela al perfil de l'RA. Per tant, en el xoc tèrmic s'esdevenen efectes forts de desestabilització de l'mRNA en aquests grups. Un comportament semblant també s'observa en alguns grups de gens en resposta a l'estrès oxidatiu (grups 8-12). Els gens de la categoria funcional *GO* "Activitat ATP Sintasa Transportadora d'Hidrogen" estan sobrerrepresentats en el grup 7. Així doncs, efectes de desestabilització de l'mRNA podrien tenir una contribució interessant en la limitació de l'activitat H<sup>+</sup>-ATPasa, la qual cosa estalviaria consum d'ATP i afavoriria la conservació d'energia per a superar situacions d'estrès. Això concordaria amb la inducció transcripcional d'una proteïna de xoc tèrmic, l'Hsp30, que és un regulador negatiu de la H<sup>+</sup>-ATPasa (McCallum *et al*, 2000). Una segona categoria *GO* sobrerrepresentada en aquests grups són les "Xaperonines del Complex CCT/TRiC". Diversos estudis han suggerit que les proteïnes CCT poden exercir una funció protectora sobre les cadenes de polipèptid naixent després de sortir del ribosoma (Etchells *et al*, 2005; Kabir i Sherman, 2008; McCallum *et al*, 2000), fent palesa la seva possible participació en la maquinària de síntesi de proteïnes. La seva presència en el grup 10 (mRNAs reprimits) concorda amb l'aturada de la síntesi de proteïnes durant l'estrès. Els gens associats a la

categoria funcional “Matriu Mitocondrial”, “Biosíntesi de Glicoproteïnes” i “Via Secretora” tenen molts dels seus membres en aquests grups amb forts efectes de desestabilització (Il·lustració 11).

Com ja s’ha comentat, en l’anàlisi de la resposta transcripcional del llevat a l’estrès oxidatiu moderat els gens resulten classificats en 25 grups, els quals es poden subdividir en dues grans branques. En la primera es troben els gens que reprimeixen la seva TR al llarg de l’estrès i en la segona, els gens de TR induïda (Il·lustració 29). Els grups 1-7 tenen la TR reprimida o gairebé plana, acompanyada d’uns nivells d’mRNA pràcticament iguals als basals o també reprimits. En el grup 8-12 la TR augmenta, però no ho fa l’RA; i en els 13-25 hi ha una inducció de TR, acompanyada d’un increment d’RA.

Els grups 6 i 7 (el 29% dels gens) mostren una gran disminució de l’RA acompanyada per un descens de la TR, que és més dràstic en els gens del grup 6. Els dos grups inclouen la majoria dels gens implicats en “Estructura i Biogènesi dels Ribosomes” (PR i PPR), i per tant, el comportament dels seus transcrits estaria en concordança amb la inhibició de la síntesi proteica observada després de l’aplicació de l’estrès (Shenton *et al*, 2006). No obstant, la repressió de la TR no és l’única responsable de la disminució de l’RA d’aquests gens. El model matemàtic utilitzat en aquest treball prediu, també, una desestabilització considerable de les molècules d’mRNA durant l’estrès, que seria coresponsable d’aquest descens. En analitzar els gens codificants per PR i PPR separatament de la resta dels gens dels grups 6 i 7 s’observa una caiguda de la TD més forta encara que la de la resta dels gens inclosos en aquests grups. Aquestes dades es confirmen amb els nostres experiments de mesura de la vida mitjana de l’mRNA d’*RRP40*. La desestabilització dels mRNAs d’aquests gens es manté durant almenys 60 minuts després d’afegir l’agent oxidant. Així doncs, la repressió de l’expressió dels gens codificants per PR i PPR i la subsegüent inhibició de la síntesi de proteïnes en resposta a estrès s’explicaria, almenys en part, per l’efecte additiu de la inhibició de la transcripció i l’augment de la TD dels mRNAs corresponents. Aquesta resposta és comuna en els dos tipus d’estrès analitzats, tèrmic i oxidatiu, fet que fa palesa la seva importància en la supervivència de les cèl·lules en front condicions d’estrès.

La majoria dels grups entre el 8 i el 25 (el 41% dels gens) mostren una inducció immediata de la TR arran de l’estrès oxidatiu. Per a alguns d’ells, l’increment d’RA s’endarrereix uns minuts en relació amb la TR, com s’esperaria si els canvis en l’RA fossin conseqüència directa dels canvis de TR (Perez-Ortin *et al*, 2007). No obstant això, els grups 8-12, en són una excepció, com ja s’ha comentat. Els grups 13, 15, i 16 són representatius d’un comportament aproximadament paral·lel entre la TR i l’RA. Aquests tres grups estan enriquits en les categories funcionals de: “Metabolisme d’Aminoàcids”, “Síntesi de Trehalosa” i “Metabolisme del Sofre”, respectivament. L’activació de la “Síntesi de la Trehalosa” com un mecanisme de protecció en resposta a diferents estressos ambientals, com és l’estrès oxidatiu, ja ha estat descrita (Gasch *et al*, 2000). La inducció de diferents vies de biosíntesi d’aminoàcids com a resposta a les condicions d’estrès moderat podria ser una estratègia d’adaptació per a preparar les cèl·lules per quan es reiniciï la síntesi de proteïnes. És especialment rellevant la forta inducció dels gens de la ruta de biosíntesi d’aminoàcids amb

## Discussió

grups sulfur observada en aquest estudi. No s'ha trobat en la literatura la inducció d'aquesta via en resposta a majors concentracions d'agents oxidants (Gasch *et al*, 2000), tot i que sí que s'ha descrit en estudis genòmics i proteòmics de la resposta a l'addició de cadmi (Fauchon *et al*, 2002) i arsenit (Thorsen *et al*, 2007). La inducció de la via dels aminoàcids amb grups sulfur donaria lloc a majors nivells de glutatió (el qual necessita cisteïnes per a la seva síntesi), requerit per a la resposta redox apropiada enfront condicions oxidants. El glutatió és el substrat de les glutaredoxines, un grup de tiol oxidoreductases que participen en la resposta a estrès oxidatiu (Herrero *et al*, 2008; Toledano *et al*, 2007). Els gens codificants per aquestes proteïnes, juntament amb altres oxidoreductases i d'altres enzims de detoxicació de ROS s'indueixen a nivell de TR en el present estudi i es distribueixen entre els diferents grups, especialment en els grups 8 i 9. La inducció de les TRs i la dispersió de les seves RAs suggereix l'especificitat en la regulació posttranscripcional de la resposta oxidativa. Els patrons de resposta transcripcional dels gens codificants per oxidoreductases incloses en els grups 8-12 mereix especial atenció ja que l'increment temporal de la TR no s'acompanya de canvis significatius en l'RA, amb la predicció d'una desestabilització temporal d'aquests mRNAs en resposta a l'estrès oxidatiu. Emprant eines *in silico* no s'han detectat seqüències específiques en el promotor o en la regió terminadora dels gens de la categoria "Activitat Oxidoreductasa" que poguessin explicar aquestes diferències entre la TR i l'RA. Aquest comportament també el presenten els perfils dels paràmetres de la transcripció dels gens codificants per les altres categories funcionals GO sobrerepresentades en aquests grups, com són "Processos de Biosíntesi d'Aminoàcids", "Activitat Oxidoreductasa" i "Metabolisme d'Àcids Carboxílics" (grup 8) i "Mitochondri" (grup 10). És a dir, en resposta a estrès oxidatiu s'indueix la transcripció d'aquestes categories funcionals, però una forta regulació posttranscripcional en les TDs determina un biaix diferencial en els nivells d'mRNA dels seus membres, suggerint que l'especificitat de la resposta pot venir donada per canvis en l'estabilitat.

En analitzar en paral·lel els gens inclosos en els grups 7-10 de l'estrès tèrmic i els dels grups 8-12 de l'estrès oxidatiu es troben 290 gens amb un comportament comú en els dos estressos. Aquests gens pertanyen a categories funcionals variades, tot i que presenten un enriquiment en la categoria funcional segons GO del "Procés Metabòlic d'Amina". La repressió dels gens relacionats amb el metabolisme de grups amina i, per tant, en la síntesi d'aminoàcids podria ser deguda a l'alta susceptibilitat dels aminoàcids lliures, així com de les proteïnes per oxidar-se a causa de les ROS (Stadtman i Levine, 2003). Aquesta repressió podria corelacionar amb la repressió de les proteïnes ribosomals i conseqüent aturada de la síntesi de proteïnes, típicament descrita en la resposta a estrès. A més, aquest procés té molta despesa energètica. En aquest sentit, la cèl·lula estalviaria consumir ATP reduint la traducció en resposta a estressos (Causton *et al*, 2001; Gasch *et al*, 2000). Segons els nostres resultats, un 90% dels gens implicats en "Traducció" es reprimeixen a nivell transcripcional en un estrès oxidatiu i un 60% en un estrès tèrmic. La inhibició de la síntesi de proteïnes que s'esdevé després d'un estrès oxidatiu no només vindria causada per la repressió transcripcional de la maquinària de la traducció (tant a nivell de TR, com a nivell de desestabilització de

l'mRNA), sinó també per la inhibició de l'inici de la traducció i per la dissociació i/o alentiment de la circulació dels ribosomes per les molècules d'mRNA, produint-se així un control de la maquinària traduccional posterior a l'inici de la traducció que permet modular el proteoma al llarg de l'estrès (Shenton *et al*, 2006; Swaminathan *et al*, 2006).

D'aquesta manera, es potencia l'efecte regulador en múltiples nivells, transcripcional, posttranscripcional i traduccional en resposta a l'estrès, i es fa palesa la necessitat de coordinar aquests processos moleculars. A més, després d'un estrès oxidatiu, els mRNAs associats als ribosomes codifiquen per molècules protectores d'estrès, entre altres, i és específicament per aquests mRNAs pels que s'incrementa la producció de proteïna (Bond, 2006; Hilgers *et al*, 2006). En augmentar la concentració d'agent oxidant, creix l'associació de poliribosomes, els quals poden servir per emmagatzemar mRNA, i així activar-se ràpidament un cop superat l'estrès (Shenton *et al*, 2006). En l'estrès tèrmic també s'ha descrit que els mRNAs codificants per Hsps es transporten específicament al citosol per a ser traduïts, mentre que altres mRNAs s'acumulen al nucli (Rollenhagen *et al*, 2004).

Recentment s'ha proposat la idea de "regulons d'RNA", és a dir, els mRNAs codificats per proteïnes amb funcions relacionades es coordinarien posttranscripcionalment per diversos senyals presents en les seves regions UTR (Keene, 2007). L'estabilitat dels mRNAs a través de les seves regions 3'UTR és regulada per les RBPs, les quals reconeixen seqüències específiques en *cis* presents en aquestes regions (Garneau *et al*, 2007). Moltes proteïnes eucariotes exerceixen més d'una funció, i múltiples RBPs controlen específicament la seva expressió en cada ambient de manera que l'expressió de cada mRNA és el resultat de l'acció combinada de diversos factors de transcripció i vàries RBPs, les quals acompanyen els trànscrits des de que neixen fins que es degraden (Moore, 2005). A banda d'això, alguns autors exposen que els mRNAs que no es tradueixen es poden emmagatzemar en diverses estructures com els *P-bodies* o els grànuls d'estrès (Anderson i Kedersha, 2006; Eulalio *et al*, 2007; Parker i Sheth, 2007). En aquest sentit hi ha treballs que proposen que, en condicions d'estrès, es regularia l'expressió gènica endarrerint la traducció dels trànscrits emmagatzemats en els *P-bodies* per permetre la traducció preferent dels mRNAs que codifiquen per proteïnes de resposta a estrès sintetitzats *de novo* (Bond, 2006; Hilgers *et al*, 2006). No obstant això, s'ha descrit que en condicions d'estressos moderats les cèl·lules de llevat no incrementen la presència de *P-bodies* (Teixeira *et al*, 2005). Grousl i col·laboradors (2009) descriuen, però, la inducció de grànuls d'estrès en un xoc tèrmic sever (a 46°C). En cercar la categoria GO "Grànuls d'Estrès" en l'experiment de GRO en condicions d'estrès tèrmic s'observa que la majoria de gens presenten una repressió dels seus trànscrits. Entre els pocs gens que s'indueixen destaquen *PUB1* i *YGR250C*, els quals codifiquen per RBPs. Aquesta repressió generalitzada també s'observa en la categoria GO "*P-bodies*". Entre els trànscrits induïts d'aquesta categoria destaca *DCS2*, que codifica per una proteïna reguladora implicada en la modulació del metabolisme d'm<sup>7</sup>GpppX i en la inhibició de Dcs1 (Malys i McCarthy, 2006). També, en els nostres experiments d'estrès oxidatiu tots els trànscrits pertanyents a la categoria

## Discussió

“Grànuls d’Estrès” es reprimeixen, i també ho fan un 79% dels trànscrips de la categoria “*P-bodies*”. D’altra banda, a més, es proposa la idea de “reguló de degradació”, ja que els gens funcionalment relacionats tendeixen a tenir els seus productes d’mRNA coordinadament degradats (Hayles *et al*, 2010). Les múltiples funcions atribuïdes a aquests 290 gens reprimits en els dos estressos així com la manca de seqüències comunes en les seves regions 3’UTR significativament específiques fan difícil definir les causes o els elements comuns que indueixen la degradació d’aquestes molècules arran d’un estrès. Així doncs, la pregunta sobre quins són i com actuen els determinants moleculars causants de la manca de paral·lelisme entre ambdós paràmetres (TR i RA) resta pendent. Pel que fa a la importància de la transcripció inútil d’una subpoblació d’mRNA que serà immediatament degradada, es pot formular la hipòtesi que aquests gens poden venir induïts per un factor transcripcional comú a d’altres gens, els quals podrien ser requerits en condicions específiques d’estrès. Per tant, els elements promotors d’aquests gens serien responsables d’una resposta comuna de TR en front a diverses condicions. Més tard la quantitat d’RA d’un gen determinat seria finament modulada segons la resposta específica a cada estrès particular. La confirmació d’aquesta hipòtesi requeriria ampliar aquest tipus d’estudis a altres estressos.

Fins i tot per als gens (o grups de gens) que presenten una cinètica d’inducció transitòria de la TR paral·lela a l’RA, els canvis en la TD de l’mRNA poden influir en el patró de resposta. Els valors de  $k_D$  calculats amb el nou algoritme poden ser significatius, excepte en els casos de les respostes de TR molt ràpides i transitòries (generalment es limita als primers minuts de l’estrès) per als quals l’evolució lineal de la TR assumida entre els punts experimentals no es compleix, produint valors artefactuals negatius de  $k_D$ . No obstant, els valors negatius de  $k_D$  poden ajudar a identificar aquells gens que responen immediatament a l’estrès amb pics abruptes de TR de curta durada, que poden ser estudiats en el futur mitjançant un mostreig més freqüent. En qualsevol cas, els perfils de  $k_D$  calculats pel nou procediment mostren clarament que els canvis en l’estabilitat són característics de la majoria dels mRNAs després que l’estrès oxidatiu i que la part principal del seu canvi transitori es limita als primers 20 minuts.

Gràcies a la tècnica de GRO i a la formulació matemàtica de determinació de les TDs teòriques es poden identificar gens que s’indueixen a nivell de TR en un o els dos estressos, però presenten respostes diferents pel que fa a l’estabilitat. Aquest és el cas dels mRNAs pertanyents a la categoria funcional segons GO “Activitat Oxidoreductasa”, fet que s’ha corroborat experimentalment amb l’mRNA d’*ALD4*, el trànscrip del qual pateix una inducció de TR en els dos estressos, però, mentre que en l’estrès tèrmic s’observa un augment de l’RA, en l’estrès oxidatiu no. Aquestes diferències en l’estabilitat, com la resta de dades aportades en aquest treball, es demostren amb els estudis experimentals de quantificació de vides mitjanes d’mRNAs realitzats en els gens expressats sota el promotor *tetO<sub>2</sub>*. Les dades experimentals d’estabilitat dels mRNAs coincideixen qualitativament amb els resultats matemàtics predits per als exemples escollits de gens corresponents a diferents categories GO, tant pels mRNAs que s’estabilitzen, com per als que es desestabilitzen. Així, doncs, es validen les anàlisis. El present estudi mostra, per primera

vegada, el desenvolupament d'aquesta eina per a analitzar respostes cel·lulars dinàmiques. No obstant, els exemples analitzats per l'agrupació 11 dels experiments GRO d'estrès tèrmic, tot i que les dades matemàtiques de  $k_D$  presenten nivells de recuperació de la desestabilització en els darrers temps de la cinètica, les dades experimentals de vides mitjanes obtingudes a temps llargs després del xoc per calor són similars a les obtingudes a temps curts. Aquesta desconcordança podria ser deguda a possibles canvis en la dinàmica d'interacció de les molècules durant un estrès tèrmic. Per tant, podrien haver-hi canvis en la TR difícils de predir matemàticament que afectarien al resultat predit per l'algoritme teòric a temps llargs.

En resum, l'anàlisi de TR en resposta a un estrès és molt més informativa que la simple mesura dels canvis en l'RA. La determinació d'ambdós paràmetres permet fer inferències de l'estabilitat de l'mRNA i de com aquesta influeix en la resposta a cada estrès. A més, mitjançant un sistema genètic per a la regulació de l'expressió ectòpica de determinats gens sota estrès i en condicions que no influeixen en la fisiologia cel·lular, es poden confirmar experimentalment que els canvis en les TDs de l'mRNA són de fet part de la resposta a cadascun dels estressos. Això suscita l'interès en la recerca d'una connexió mecànica entre l'estrès i la degradació de les molècules d'mRNA en *S. cerevisiae*, com succeeix en el cas de la resposta a estrès oxidatiu en el llevat *Schizosaccharomyces pombe* (Rodríguez-Gabriel *et al*, 2003; Rodríguez-Gabriel *et al*, 2006). En aquest microorganisme l'RBP Csx1 estabilitza específicament els transcrits que contenen ARE arran d'un estrès oxidatiu. Csx1 actuaria de transductora de senyals generats per la MAPK activada per estrès. Aquesta proteïna s'associa i estabilitza l'mRNA d'*ATF1*, que codifica per un factor de transcripció que controla l'expressió de la majoria de gens induïts en resposta a estrès oxidatiu. En aquest sentit, s'ha descrit que les cèl·lules ajusten els nivells d'RA posttranscripcionalment per canvis en les TDs segons diversos estímuls, com poden ser canvis ambientals o la diferenciació (Guhaniyogi i Brewer, 2001).

## 2.- Modulació del reguló Aft1 en resposta a estrès oxidatiu

Utilitzant la metodologia de GRO, s'ha observat que els gens del reguló Aft1 augmenten transitòriament la seva TR després d'un estrès oxidatiu. Aquesta inducció va acompanyada de la internalització nuclear temporal del factor de transcripció Aft1. Fins ara s'havia descrit que Aft1 s'internalitzava al nucli en condicions de deficiència de ferro, on esdevenia actiu i induïa conseqüentment la transcripció del conjunt de gens que constitueixen el sistema d'alta afinitat d'adquisició de ferro (Yamaguchi-Iwai *et al*, 2002). Aft1 entra i surt del nucli de la cèl·lula de manera contínua. La internalització d'Aft1 al nucli ocorre gràcies a la interacció de Pse1 amb Aft1 (Ueta *et al*, 2003) i la seva sortida per l'activitat de l'exportina Msn5. En condicions de repleció de ferro, s'especula que el ferro mateix condueix a la dimerització d'Aft1 per a la seva exportació i, conseqüentment, inactivació (Ueta *et al*, 2007). A més, l'exportació d'aquest factor de transcripció depèn de la maquinària mitocondrial d'ensamblatge dels ISC. Alguns autors han vist que defectes en la maduració de les proteïnes mitocondrials



## Discussió

amb ISC s'associen amb l'acumulació de ferro al mitocondri i a l'activació constitutiva del reguló de ferro (Belli *et al*, 2004; Chen *et al*, 2002; Foury i Talibi, 2001). Les cèl·lules de llevat amb deleccions de gens codificants per a la maquinària mitocondrial de biosíntesi, ensamblatge i exportació d'ISC mostren respostes transcripcionals semblants, les quals se solapen amb la resposta transcripcional del llevat en manca de ferro (Lan *et al*, 2004; Puig *et al*, 2005; Shakoury-Elizeh *et al*, 2004). Ara bé, en absència dels components citosòlics d'ensamblatge d'ISC no es dona aquesta activació constitutiva d'Aft1 (Hausmann *et al*, 2008). La proteïna Atm1, la qual exporta els ISC del mitocondri al citosol, i el glutatió també són necessaris per a la regulació d'Aft1 (Rutherford *et al*, 2005). Això dona suport a la idea que alguna proteïna mitocondrial amb ISC detectaria els nivells de ferro de la cèl·lula de llevat, per una via en la qual les glutaredoxines monotioliques Grx3/Grx4, les quals interaccionen directament amb Aft1 (Ojeda *et al*, 2006; Pujol-Carrion *et al*, 2006), i les proteïnes Fra1/Fra2, de manera indirecta, regulen Aft1 al citosol (Kumanovics *et al*, 2008).

Encara que la localització nucleocitoplasmàtica d'Aft1 es produeix constitutivament l'exportina Msn5 promou l'exportació d'Aft1 al citosol en condicions de repleció de ferro, però no en privació d'aquest (Ueta *et al*, 2007). No és clara, però, la relació entre els mecanismes de biosíntesi dels ISC i l'exportació d'Aft1 via Msn5. És important destacar que part de l'activació d'Aft1 depèn de l'estat de ferro cel·lular, independentment de la síntesi d'ISC (Kumanovics *et al*, 2008). Segons els nostres resultats, en resposta a estrès oxidatiu, i a diferència del que succeeix en condicions de privació de ferro, l'activació d'Aft1 depèn de la biogènesi correcta dels ISC. Una de les possibles explicacions de l'activació transitòria d'Aft1 a conseqüència de l'estrès podria ser que el dany oxidatiu de l'hipotètic detector mitocondrial de ferro conduiria a l'acumulació d'Aft1 al nucli i a la conseqüent activació del reguló. Això explicaria per què un  $\Delta grx5$  o  $\Delta yfh1$ , amb la síntesi d'ISC afectada, no mostra activació del reguló Aft1 respecte als nivells basals en condicions d'estrès oxidatiu. No obstant això, hi ha altres conjectures possibles: (i) l'estrès oxidatiu podria inactivar directament algun component mitocondrial de la ruta biosintètica dels ISC; (ii) l'estrès oxidatiu podria alterar l'estat redox de les Cys291 i Cys293 d'Aft1, que són importants per a la seva compartimentalització nucleocitoplasmàtica (Ojeda *et al*, 2006; Ueta *et al*, 2007); (iii) l'estrès oxidatiu podria inactivar Grx3/Grx4, i provocar així l'activació d'Aft1.

El ferro és essencial per a la vida ja que és un component important de les molècules implicades en reaccions redox cel·lulars. No obstant, però, el ferro pot resultar també potencialment tòxic, ja que catalitza la formació d'oxiradicals, a conseqüència de la transferència d'un electró al dioxigen, generant  $O^{2-}$ , la molècula precursora del  $H_2O_2$ . Aquesta toxicitat del ferro augmenta sobretot en presència de peròxids, doncs, com altres metalls de transició, és un generador potent de ROS, ja que via reacció de Fenton catalitza la seva reducció parcial a  $OH^\bullet$ , un dels oxidants més potents en la natura que danya ràpidament les macromolècules (Halliwell i Gutteridge, 2007).

Els experiments de sensibilitat realitzats mostren que la presència d'Aft1/Aft2 és imprescindible per a la supervivència de les cèl·lules en condicions d'estrès oxidatiu. Aquests resultats indiquen que en aquestes condicions es requereix l'activació del sistema d'alta afinitat per l'adquisició de ferro. Sembla ser, doncs, que el sistema de baixa afinitat, regulat principalment per Fet4, és insuficient, fet que podria indicar que resulta malmès per l'estrès oxidatiu (discutit més endavant). És possible, a més, que en un ambient oxidant el ferro biodisponible fos menor i, a més, el ferro unit als ISC tendeix a alliberar-se. Per tant, les cèl·lules necessitarien augmentar la concentració de ferro intracel·lular, i per això activarien la via d'alta afinitat d'adquisició de ferro. En aquest sentit, Causton i col·laboradors (2001) ja descriuen com a gens induïts en l'ESR alguns dels gens involucrats en l'homeòstasi del ferro. Els organismes multicel·lulars també modulen l'adquisició de ferro en condicions d'estrès oxidatiu per tal d'abolir la toxicitat del ferro (De Freitas i Meneghini, 2001), a través de l'activitat de les proteïnes reguladores de ferro, Irf1/2 (Cairo i Recalcati, 2007).

La inducció de la TR causada per l'estrès oxidatiu ve acompanyada per un increment de l'RA en la majoria de gens del reguló Aft1, entre ells els gens de la família FIT i tres membres de la família ARN. Això suggereix que en condicions d'estrès oxidatiu les cèl·lules d'*S. cerevisiae* poden importar ferro a través de la via no reductiva de captació de ferro d'alta afinitat. Per contra, l'RA dels mRNAs dels dos components essencials de la via reductiva, la ferrooxidasa Fet3 i la permeasa Ftr1 (responsables de la internalització del ferro ferrós), no augmenta. Hem confirmat, a més, que, en paral·lel al contingut de l'mRNA, els nivells de les respectives proteïnes resten aproximadament constants en condicions d'estrès. En aquest treball es demostra que la disminució en l'RA d'aquests gens és el resultat de la desestabilització dels seus corresponents mRNAs després de l'estrès oxidatiu, contràriament a la situació de l'mRNA de *FIT3*, el qual també és necessari per a mantenir activa la via no reductiva, que s'estabilitza. Endemés, hem confirmat que els nivells de Fit3 sí augmenten després d'un estrès oxidatiu i que, en aquestes condicions, apareix transitòriament una altra forma proteica, fruit d'una possible modificació posttraduccional. Així, doncs, les cèl·lules de llevat contraresten la inducció dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* mitjançant fenòmens posttranscripcionals de desestabilització.

La hipòtesi del treball és que les cèl·lules de llevat haurien de mantenir la via reductiva d'alta afinitat reprimida després de l'aplicació d'un estrès oxidatiu a causa de l'activitat prooxidant de la forma ferrosa del ferro. L'ió ferrós s'incorpora a la cèl·lula per la membrana plasmàtica via el complex Ftr1/Fet3. La hipersensibilitat de les cèl·lules d'*S. cerevisiae* a estrès oxidatiu en condicions de deficiència de ferro, tal com s'exposa en aquest estudi, dona suport a aquesta hipòtesi (Il·lustració 58). En condicions naturals, on les cèl·lules de llevat poden disposar de sideròfors, les cèl·lules reorientarien l'absorció de ferro cap a la via no reductiva. De fet, *S. cerevisiae* no és sensible a estrès oxidatiu en presència de ferro fèrric acomplexat amb enterobactina com a única font de ferro. Així, en condicions d'estrès oxidatiu es reprimeixen els RAs dels gens de la via reductiva d'adquisició de ferro promovent d'aquesta manera el redireccionament de

## Discussió

l'absorció de ferro cap a la via no reductiva. Aquesta podria constituir una estratègia dels llevats per a la protecció contra els efectes nocius dels ions ferrosos durant el procés de l'absorció de ferro, en presència d'un agent oxidant.

En el present estudi es mostra que, en presència de ferro, condicions en les que el sistema de captació de ferro de baixa afinitat via Fet4 és la única via per a l'adquisició de ferro, les cèl·lules d'*S. cerevisiae* mutants  $\Delta fet3$  són hipersensibles a l'estrès oxidatiu (Il·lustració 50). Aquesta sensibilitat es reverteix amb l'addició d'enterobactina al medi. Aquests resultats suggereixen fortament que el sistema de baixa afinitat també és sensible a l'estrès oxidatiu. De fet, aquest sistema actua en anaerobiosi, mentre que el sistema d'alta afinitat funciona en condicions aeròbiques, ja que el complex Ftr1/Fet3 requereix oxigen (De Silva *et al*, 1995; Hassett *et al*, 1998). En aquest sentit, s'ha demostrat que en absència d'oxigen s'inhibeix la transcripció dels gens *FET3* i *FTR1*, mentre que s'indueixen els gens codificants per transportadors de sideròfors de manera dependent de ferro (Crisp *et al*, 2006). Les dades GRO dels experiments d'estrès oxidatiu indiquen que la permeasa del sistema de baixa afinitat, Fet4, reprimeix fortament la seva TR. Se sap que l'expressió de *FET4* augmenta en condicions d'hipòxia apuntant que aquest transportador constitueix el sistema primari d'adquisició de ferro en anaerobiosi (Philpott, 2006). El gen *FET4* està regulat per múltiples factors ambientals, com ara la limitació de ferro a través d'Aft1, l'estat dels nivells de zinc a través de Zap1 i la presència o absència d'oxigen a través de Rox1 (Waters i Eide, 2002). La repressió per Rox1 en condicions d'aerobiosi ajuda a minimitzar la toxicitat dels metalls, atenuant la transcripció de *FET4* per Aft1 i Zap1 en resposta a metalls (Jensen i Culotta, 2002; Waters i Eide, 2002). Les nostres dades de GRO també mostren que l'expressió de *ROX1* s'indueix fortament després de l'estrès oxidatiu, fet que podria explicar la repressió de la TR de *FET4* en aquestes condicions. Així, aquest mecanisme de repressió garantiria que *FET4* no intervingués en provocar toxicitat per metalls durant l'estrès oxidatiu. Aquesta hipòtesi seria conseqüent amb un possible efecte tòxic del peròxid en el sistema de baixa afinitat.

L'homeòstasi del ferro no només implica la regulació de l'adquisició de ferro, sinó també la capacitat d'emmagatzemar o alliberar ferro del vacúol (Philpott i Protchenko, 2008). Hem vist que l'estrès oxidatiu canvia els perfils d'expressió dels gens que són responsables de desviar el contingut de ferro vacuolar (Il·lustració 43). En aquest sentit, *FTH1* i *FET5* (que expressen els exportadors de ferro vacuolars) tenen induïdes les seves TRs i RAs. S'observa també una forta repressió de la TR i l'RA de l'importador vacuolar de ferro *CCCI*, l'expressió del qual és regulada pel factor transcripcional Yap5 de resposta a ferro (Li *et al*, 2008) i per efectes de desestabilització en l'mRNA provocats per Cth2 (Puig *et al*, 2005) en condicions de depleció de ferro. Les nostres dades a nivell d'expressió suggeririen que el ferro emmagatzemat al vacúol s'alliberaria al citosol en resposta a l'estrès oxidatiu per ajudar a mantenir el contingut de ferro citosòlic, mentre que la via reductiva de l'absorció de ferro continua estant reprimida.

Les proteïnes amb ISC realitzen funcions crucials per a les cèl·lules, ja que participen en una àmplia varietat de processos que impliquen transport i catàlisi d'electrons, com per exemple la respiració. Les cèl·lules de llevat defectives en la maquinària mitocondrial de biosíntesi d'ISC presenten adaptacions metabòliques semblants a la resposta transcripcional per depleció de ferro (Hausmann *et al*, 2008). En aquestes condicions, la respiració i el metabolisme de grups hemo es reprimeixen, per tal de minimitzar el consum de ferro. Segons les nostres dades GRO en resposta a l'estrès oxidatiu, la categoria funcional GO "Proteïnes Ferro-Sofre" presenta 11 membres que es reprimeixen a nivell d'RA (6 d'ells també ho fan per la TR) i la categoria "Biosíntesi de Grups Hemo" mostra 10 membres reprimits i 3 induïts, a nivell d'RA. També, Hausmann i col·laboradors (2008) descriuen la disminució de l'activitat respiratòria, compensada per la inducció dels gens involucrats en l'adquisició de glucosa. Les nostres dades indiquen que la majoria dels gens de la categoria funcional GO "Respiració Cel·lular" es reprimeixen i que 3 dels 4 gens per a la importació de glucosa s'indueixen. Per tant, la resposta transcripcional del llevat en condicions d'estrès oxidatiu presenta paral·lelismes amb les respostes d'adaptació metabòlica en situacions de depleció de ferro o deficiència de biosíntesi d'ISC, adreçades probablement a minimitzar el consum de ferro intracel·lular.

En *S. cerevisiae*, Cth2 i el seu homòleg Cth1 per una banda, i Rnt1 per l'altra causen la desestabilització específica o tallen diferents mRNAs en resposta a depleció i repleció de ferro cel·lular, respectivament, adoptant papers antagonistes importants en l'homeòstasi del ferro (Lee *et al*, 2005; Puig *et al*, 2005; Puig *et al*, 2008). L'anàlisi del transcriptoma d'*S. cerevisiae* en resposta a estrès oxidatiu només mostra una inducció forta i temporal de l'mRNA de *CTH2*, mentre que els mRNAs de *CTH1* i *RNT1* es reprimeixen. A més, Lee i col·laboradors (2005) no van trobar diferències en els nivells de l'mRNA d'*FTR1* entre la soca salvatge i la soca *Arnt1*. Degut a això, els nostres estudis se centren en el possible paper de Cth2 en la participació de la desestabilització dels mRNAs de *FTR1* i *FET3*. Es comprova que les vides mitjanes d'ambdós mRNAs són similars en cèl·lules  $\Delta$ *cth2* i cèl·lules que expressen *CTH2* després de l'addició de l'agent oxidant. Aquest resultat descartaria un paper específic de Cth2 en la regulació d'aquests gens en resposta a estrès oxidatiu. A més, hem observat que les cèl·lules que no tenen *CTH2* no mostren sensibilitat a aquest estrès. No obstant això, Cth2 sembla tenir un paper modulador constitutiu en els nivells de l'mRNA dels gens de la via no reductiva com *FIT3* o *ARN2*. De fet les TDs d'aquests mRNAs són més baixes en absència de Cth2.

En aquest treball es demostra la implicació de l'exonucleasa 5'-3' Xrn1 i de la deadenilasa Ccr4 en la desestabilització dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* en condicions d'estrès oxidatiu, ja que en la seva absència els dos mRNAs s'estabilitzen. Així, doncs, després d'un estrès oxidatiu, els dos mRNAs que codifiquen per les principals proteïnes de la via reductiva d'adquisició de ferro es degraden per una via que involucra la deadenilació de la cua poli(A) per Ccr4 i el tall 5'-3' de la exonucleasa Xrn1, típicament descrita com la via majoritària de degradació dels mRNAs (Parker i Song, 2004). S'ha descrit, que les regions AREs modulen la taxa d'escurçament de les cues poli(A) en cèl·lules de llevats i mamífers, en el que podria ser un

## Discussió

mecanisme conservat. Així, doncs, les ARE controlarien el procés de deadenilació, *decapping* i degradació 5'-3' (Vasudevan i Peltz, 2001). Aquestes estructures conservades permeten a les cèl·lules adaptar-se ràpidament a condicions ambientals alterades, com és el cas del canvi de glucosa a una altra font de carboni (Vasudevan i Peltz, 2001), la depleció de ferro on Cth1/2 reconeixen les ARE dels seus mRNAs diana (Puig *et al*, 2005; Puig *et al*, 2008) o l'estrès oxidatiu en el llevat *S. pombe* on Csx1 estabilitza els seus mRNAs diana (Rodríguez-Gabriel *et al*, 2003). Tot i això, no hem trobat regions homòlogues comunes en les regions 3'UTR dels mRNAs que poguessin senyalitzar una possible desestabilització en aquestes condicions d'estrès. Les proteïnes homòlogues a Csx1 en *S. cerevisiae* segons *GeneDB* són Nam8, proteïna localitzada al nucli que està involucrada en l'*splicing* de l'mRNA i la síntesi de proteïnes en el mitocondri (Asher *et al*, 1989), i Ngr1, que interacciona amb elements rics en (C/G)-U en el 3'UTR de l'mRNA de la porina mitocondrial, regulant-la negativament (Buu *et al*, 2004). Hi ha altres treballs que relacionen les modificacions posttranscripcionals arran de canvis ambientals amb la regulació de l'expressió gènica. Aquests són els casos de l'estabilització de l'mRNA de *CHO1* en deficiència respiratòria o de *SUA7* en estrès oxidatiu. (i) Cho1 és la fosfatidilserina sintasa que participa en la biosíntesi de fosfolípids. El seu mRNA s'estabilitza en cèl·lules que tenen inhibida la respiració, com també en mutants defectius per Ccr4, Dcp1 i Xrn1, indicant que es degrada per la via general de degradació 5'-3' dels mRNAs (Choi i Carman, 2007). (ii) Sua7 és el factor de transcripció TFIIB, un factor de transcripció general d'un conjunt específic de gens amb activitat mitocondrial i, per tant, relacionats amb entorns oxidatius. El control de l'expressió de *SUA7* en condicions oxidants ocorre tant a nivell transcripcional com en l'estabilitat del seu mRNA. Aquests dos esdeveniments s'associen a l'acció de Yap1, el qual activa la transcripció de *SUA7* en cèl·lules creixent exponencialment en ambient oxidant i, en la seva absència contribueix a l'augment de l'estabilitat del seu mRNA (Paes de Faria i Fernandes, 2006). Aquests autors defensen la idea de l'existència d'una RBP, que actuaria com a sensor d'oxidació, i que regularia l'estabilitat de l'mRNA per garantir l'RA de *SUA7* en condicions d'estrès oxidatiu. Altres estudis descriuen mecanismes específics de degradació de l'mRNA sense relacionar-los amb regions ARE. Com és el cas de la desestabilització de l'mRNA de *CLB2* que codifica per la ciclina de tipus B involucrada en la progressió del cicle cel·lular, responsable de l'activació de Cdc28 per promoure la transició de fase G2 a M. La degradació d'aquest mRNA la du a terme l'RNasa mitocondrial MRP. S'ha descrit que els mutants delecionats per aquesta proteïna presenten defectes en la sortida de mitosi, causats per l'increment de l'RA de *CLB2*. Així, en augmentar la Clb2 s'endarrereix l'anafase (Gill *et al*, 2004). Gill i col·laboradors troben que l'RNasa MRP talla la regió 5'UTR de l'mRNA de *CLB2* en diversos llocs, identifiquen aquests productes i caracteritzen la seva eliminació via l'exonucleasa 5'-3' Xrn1, i no via exosoma.

Els resultats obtinguts en el nostre treball indiquen que en absència d'Xrn1 o Ccr4 les cèl·lules de llevat no són capaces de suplir la deficiència de l'activitat RNasa amb la via secundària de degradació 3'-5' d'mRNAs a través de l'acció de l'exosoma citoplasmàtic, o les vies alternatives de degradació com són el

*deccapping* independent a deadenilació, i l'activitat endoribonucleolítica. La degradació que observem en els nostres estudis és important a nivell fisiològic ja que les soques delecionades per *XRNI* o *CCR4* són hipersensibles a estrès oxidatiu en condicions de depleció de ferro. Això suggeriria que la desestabilització dels mRNAs dels components de la via reductiva en resposta a estrès oxidatiu és requerida per evitar la toxicitat en les cèl·lules de llevat en condicions on es provoca una elevada inducció dels gens del reguló d'Aft1 (com es la privació de ferro). La soca  $\Delta ccr4$  presenta un creixement ja compromès en condicions d'estrès oxidatiu, fet perfectament compatible amb les múltiples funcions que porta a terme el complex Ccr4-Not (Azzouz *et al*, 2009; Cui *et al*, 2008). Tot i que el creixement de la soca  $\Delta ccr4$  és més lent que el de la soca salvatge, s'ha observat que en combinació amb la sobreexpressió d'alguns gens del reguló (*FTRI* especialment) augmenta la seva sensibilitat en les condicions esmentades. De manera semblant, la soca  $\Delta xrm1$ , que presenta una sensibilitat moderada a estrès oxidatiu, resulta molt sensible en combinació amb la sobreexpressió de *FET3*. Així, les soques que no poden degradar correctament els mRNAs de la via reductiva del sistema d'alta afinitat i, a més, sobreexpressen algun gen d'aquesta via són molt més sensibles a l'estrès oxidatiu en condicions de privació de ferro. En paral·lel, les nostres mesures del contingut de ferro total intracel·lular indiquen que no es produeix una acumulació de ferro en aquestes soques en les condicions esmentades. Això podria suggerir que no seria un increment del ferro intracel·lular *per se* sinó l'estat d'aquest ferro la causa de la potencial toxicitat cel·lular en combinació amb unes condicions oxidants.

L'activitat d'Xrm1 i Ccr4 no és exclusiva dels gens de la via reductiva de l'adquisició de ferro. Hem observat que en la seva absència l'mRNA de *FIT3* també s'estabilitza en condicions d'estrès oxidatiu. Per últim, els experiments realitzats amb les soques mutades pels gens de la família PUF i Hek2 suggeririen que aquestes proteïnes també podrien modular lleugerament l'expressió dels gens de la via reductiva. No obstant, però, no es pot concloure que aquesta modulació sigui específica de la resposta a estrès oxidatiu, ja que els nivells d'mRNA ja resulten modulats en condicions fisiològiques.

Tots aquests resultats suggeririen la possible existència d'un factor addicional, independent del factor transcripcional Yap1, que detectaria la presència d'oxidants i senyalitzaria la degradació d'alguns mRNAs específics del reguló Aft1, com serien els trànscrips de *FET3* i *FTRI*. D'altra banda, s'ha de tenir present que el sistema empleat per identificar possibles mRNases desestabilitzadores dels gens de la via reductiva presenta limitacions. D'aquesta manera, la proteïna en qüestió podria ser essencial. Fins i tot, podria tractar-se d'una proteïna estabilitzadora unida a l'mRNA de *FET3* i *FTRI* en condicions fisiològiques i que en condicions oxidants s'alliberés deixant aquests mRNAs susceptibles a l'activitat deadenilasa i exonucleasa. En aquest cas, una soca mutant defectiva per aquesta hipotètica proteïna desestabilitzaria el nivell basal d'aquests dos trànscrips i probablement seria sensible en un medi que tingués un quelant de ferro.

## Discussió

En resum, el present estudi proporciona evidències que indiquen que les cèl·lules de llevat en condicions d'estrès oxidatiu moderat reorientarien les estratègies d'adquisició de ferro intracel·lular per tal de mantenir la seva homeòstasi i minimitzar, així, els possibles efectes tòxics del ferro. En aquest sentit, els canvis en les estabilitats dels mRNAs de la via reductiva del sistema d'alta afinitat d'adquisició de ferro jugarien un paper crucial en aquestes estratègies.

## **VI. CONCLUSIONS**





Amb els resultats d'aquest treball s'ha arribat a les següents conclusions:

I. La tècnica GRO és un bon procediment per a l'anàlisi del transcriptoma global d'*S. cerevisiae* per tal d'estudiar la TR i els nivells d'mRNA durant una situació dinàmica, com ara la resposta a l'estrès tèrmic o oxidatiu.

II. El genoma d'*S. cerevisiae* varia els patrons de resposta transcripcional segons el tipus d'estrès. El canvi en els paràmetres de transcripció (TR o RA) en resposta a l'estrès tèrmic ocorre en gairebé tot el genoma, i en resposta a l'estrès oxidatiu, ho fa en aproximadament el 75% dels gens.

III. Les dades de TD obtingudes reflecteixen que en resposta a l'estrès tèrmic els mRNA tenen una tendència general a l'estabilització mentre que en resposta a l'estrès oxidatiu a la desestabilització.

IV. Els patrons dels nivells d'mRNA després d'un estrès tèrmic o oxidatiu no corresponen de manera directa als canvis dels perfils de TR en gran nombre dels gens, sinó que depenen notòriament dels canvis de la TD dels mRNAs. Per tant, la modulació posttranscripcional dels nivells d'mRNA per fenòmens d'estabilització o desestabilització en la resposta a estrès tèrmic i oxidatiu té un paper destacat.

V. Al voltant del 70% del genoma d'*S. cerevisiae* respon a estrès tèrmic i oxidatiu amb uns paràmetres de TR i RA bastant paral·lels. No obstant, però, el 25% dels gens presenten un increment en la TR però no augmenta el seu RA. En el cas de l'estrès tèrmic, hi ha un enriquiment dels gens que codifiquen per les categories funcionals GO "Activitat ATP Sintasa Transportadora d'Hidrogen" i les "Xaperonines del Complex CCT/TRiC". Pel que fa a l'estrès oxidatiu, hi ha una sobrerrepresentació de gens de les categories "Activitat Oxidoreductasa", "Biosíntesi d'Aminoàcids" i "Metabolisme d'Àcids Carboxílics".

VI. Durant la resposta a l'estrès tèrmic i l'oxidatiu, els mRNAs codificants per les categories funcionals GO PR i PPR responen transcripcionalment de manera homogènia: es reprimeixen a nivell de TR i RA. A més, els seus mRNAs es desestabilitzen, fet que contribueix a exacerbar aquesta repressió.

VII. Els mRNAs codificants per proteïnes implicades en el proteosoma indueixen les seves TRs en resposta a estrès tèrmic i oxidatiu. En la primera, aquesta pujada ve acompanyada de l'increment de l'RA, mentre que en la segona els perfils d'RA són molt dispersos. Per tant, aquests mRNAs tenen una regulació positiva i homogènia en resposta a estrès tèrmic, i més heterogènia en resposta a l'oxidatiu, en la qual els canvis en la TD representen el modulador final de l'expressió dels gens d'aquesta categoria funcional.

## Conclusions

VIII. En l'estrès tèrmic la TR dels gens associats a la categoria funcional "Plegament de Proteïnes" augmenta, tot i que fortes diferències en les  $k_D$  dels mRNAs dels diferents gens modulen específicament els seus nivells. L'expressió de tots els mRNAs codificants pels gens Hsps s'indueix, malgrat que l'RA ho fa amb diferències en el temps i la intensitat. En aquest sentit l'mRNA d'*HSP12* i *HSP26* es desestabilitzen, mentre que l'mRNA d'*HSP42* i *HSP104* s'estabilitzen.

IX. El sistema de transcripció regulada pel promotor *tet* és un mètode vàlid per a estudiar les vides mitjanes dels mRNAs en resposta a estrès.

X. Durant l'estrès oxidatiu s'activa la transcripció del gens del reguló Aft1, de manera totalment dependent d'aquest factor de transcripció i independent de Yap1. A més, aquest factor de transcripció entra al nucli transitòriament.

XI. L'absència d'Aft1 i Aft2 en les cèl·lules d'*S. cerevisiae* és letal en l'estrès oxidatiu.

XII. El reguló Aft1 no és capaç d'induir-se en cèl·lules defectuoses en la maquinària de biosíntesi d'ISC arran d'un estrès oxidatiu. Per tant, la correcta formació dels ISC és necessària per a la senyalització del reguló Aft1 en l'estrès oxidatiu.

XIII. Durant l'estrès oxidatiu, els nivells d'mRNA dels gens de la via no reductiva d'adquisició de ferro s'indueixen, mentre que els de la via reductiva es reprimeixen, tot i l'augment en la seva TR. Aquesta repressió ve causada per la desestabilització dels seus mRNAs.

XIV. Cth2 no és el responsable de la desestabilització específica dels mRNAs codificants pel complex Fet3/Ftr1 (components de la via reductiva) en resposta a estrès oxidatiu, però sí que modula els nivells basals d'altres mRNAs de gens del reguló Aft1.

XV. Xrn1 i Ccr4 són components de la maquinària de degradació dels mRNAs implicats en la desestabilització dels mRNAs de *FET3* i *FTR1* durant l'estrès oxidatiu, així com en els nivells basals de l'mRNA de *FIT3*.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**



- Adams CC, Gross DS. 1991. The yeast heat shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *J Bacteriol* 173: 7429-35
- Ahn SG, Thiele DJ. 2003. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev* 17: 516-28
- Alberola TM, Garcia-Martinez J, Antunez O, Viladevall L, Barcelo A, Arino J, Perez-Ortin JE. 2004. A new set of DNA microchips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int Microbiol* 7: 199-206
- Anderson GJ, Vulpe CD. 2009. Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci* 66: 3241-61
- Anderson P, Kedersha N. 2006. RNA granules. *J Cell Biol* 172: 803-8
- Aranda A, del Olmo MI M. 2003. Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* 20: 747-59
- Asher EB, Groudinsky O, Dujardin G, Altamura N, Kermorgant M, Slonimski PP. 1989. Novel class of nuclear genes involved in both mRNA splicing and protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Mol Gen Genet* 215: 517-28
- Askree SH, Yehuda T, Smolikov S, Gurevich R, Hawk J, Coker C, Krauskopf A, Kupiec M, McEachern MJ. 2004. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8658-63
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM, Kaplan J. 1994. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76: 403-10
- Ausubel FM, Kingston, RE., Brent, R., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, S. A. and Struhl, K. 1994-1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, cop: VB Chanda
- Azzouz N, Panasenko OO, Deluen C, Hsieh J, Theiler G, Collart MA. 2009. Specific roles for the Ccr4-Not complex subunits in expression of the genome. *Rna* 15: 377-83
- Babcock M, de Silva D, Oaks R, Davis-Kaplan S, Jiralerspong S, Montermini L, Pandolfo M, Kaplan J. 1997. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science* 276: 1709-12
- Badis G, Saveanu C, Fromont-Racine M, Jacquier A. 2004. Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol Cell* 15: 5-15
- Barnes CA. 1998. Upf1 and Upf2 proteins mediate normal yeast mRNA degradation when translation initiation is limited. *Nucleic Acids Res* 26: 2433-41
- Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R. 2007. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update. *Nucleic Acids Res* 35: D760-5
- Belli G, Gari E, Aldea M, Herrero E. 1998a. Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* 14: 1127-38
- Belli G, Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. 1998b. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 26: 942-7
- Belli G, Molina MM, Garcia-Martinez J, Perez-Ortin JE, Herrero E. 2004. *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J Biol Chem* 279: 12386-95
- Berlett BS, Stadtman ER. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-6

## Bibliografia

- Berriz GF, King OD, Bryant B, Sander C, Roth FP. 2003. Characterizing gene sets with FuncAssociate. *Bioinformatics* 19: 2502-4
- Berry DB, Gasch AP. 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell* 19: 4580-7
- Blaiseau PL, Lesuisse E, Camadro JM. 2001. Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J Biol Chem* 276: 34221-6
- Bond U. 1988. Heat shock but not other stress inducers leads to the disruption of a sub-set of snRNPs and inhibition of in vitro splicing in HeLa cells. *Embo J* 7: 3509-18
- Bond U. 2006. Stressed out! Effects of environmental stress on mRNA metabolism. *FEMS Yeast Res* 6: 160-70
- Bousquet-Antonelli C, Presutti C, Tollervey D. 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102: 765-75
- Bracken AP, Bond U. 1999. Reassembly and protection of small nuclear ribonucleoprotein particles by heat shock proteins in yeast cells. *Rna* 5: 1586-96
- Brown CE, Tarun SZ, Jr., Boeck R, Sachs AB. 1996. PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 5744-53
- Brown JL, North S, Bussey H. 1993. SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol* 175: 6908-15
- Burnie JP, Carter TL, Hodgetts SJ, Matthews RC. 2006. Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol Rev* 30: 53-88
- Bussemaker HJ, Li H, Siggia ED. 2001. Regulatory element detection using correlation with expression. *Nat Genet* 27: 167-71
- Buu LM, Jang LT, Lee FJ. 2004. The yeast RNA-binding protein Rbp1p modifies the stability of mitochondrial porin mRNA. *J Biol Chem* 279: 453-62
- Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 27393-8
- Cabiscol E, Belli G, Tamarit J, Echave P, Herrero E, Ros J. 2002. Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 44531-8
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL. 1997. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131: 1-87
- Cairo G, Recalcati S. 2007. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. *Expert Rev Mol Med* 9: 1-13
- Camier S, Seraphin B. 2007. [Destroy this (RNA) message after reading it!]. *Med Sci (Paris)* 23: 850-6
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12: 323-37
- Cohen BA, Pilpel Y, Mitra RD, Church GM. 2002. Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol Biol Cell* 13: 1608-14
- Costa NJ, Dahm CC, Hurrell F, Taylor ER, Murphy MP. 2003. Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 5: 291-305

- Courel M, Lallet S, Camadro JM, Blaiseau PL. 2005. Direct activation of genes involved in intracellular iron use by the yeast iron-responsive transcription factor Aft2 without its paralog Aft1. *Mol Cell Biol* 25: 6760-71
- Crisp RJ, Adkins EM, Kimmel E, Kaplan J. 2006. Recruitment of Tup1p and Cti6p regulates heme-deficient expression of Aft1p target genes. *Embo J* 25: 512-21
- Cui Y, Ramnarain DB, Chiang YC, Ding LH, McMahon JS, Denis CL. 2008. Genome wide expression analysis of the CCR4-NOT complex indicates that it consists of three modules with the NOT module controlling SAGA-responsive genes. *Mol Genet Genomics* 279: 323-37
- Culbertson MR, Neeno-Eckwall E. 2005. Transcript selection and the recruitment of mRNA decay factors for NMD in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 11: 1333-9
- Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. 2006. Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 751-61
- Chen OS, Hemenway S, Kaplan J. 2002. Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12321-6
- Chen OS, Crisp RJ, Valachovic M, Bard M, Winge DR, Kaplan J. 2004. Transcription of the yeast iron regulon does not respond directly to iron but rather to iron-sulfur cluster biosynthesis. *J Biol Chem* 279: 29513-8
- Choi HS, Carman GM. 2007. Respiratory deficiency mediates the regulation of CHO1-encoded phosphatidylserine synthase by mRNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282: 31217-27
- Chung N, Jenkins G, Hannun YA, Heitman J, Obeid LM. 2000. Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275: 17229-32
- De Freitas JM, Liba A, Meneghini R, Valentine JS, Gralla EB. 2000. Yeast lacking Cu-Zn superoxide dismutase show altered iron homeostasis. Role of oxidative stress in iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 11645-9
- De Freitas JM, Meneghini R. 2001. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutat Res* 475: 153-9
- De Freitas JM, Kim JH, Poynton H, Su T, Wintz H, Fox T, Holman P, Loguinov A, Keles S, van der Laan M, Vulpe C. 2004. Exploratory and confirmatory gene expression profiling of mac1Delta. *J Biol Chem* 279: 4450-8
- De Silva DM, Askwith CC, Eide D, Kaplan J. 1995. The FET3 gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J Biol Chem* 270: 1098-101
- Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J* 19: 5157-66
- Delaunay A, Pflieger D, Barrault MB, Vinh J, Toledano MB. 2002. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* 111: 471-81
- Denisenko O, Bomsztyk K. 2002. Yeast hnRNP K-like genes are involved in regulation of the telomeric position effect and telomere length. *Mol Cell Biol* 22: 286-97
- Dickson RC, Nagiec EE, Skrzypek M, Tillman P, Wells GB, Lester RL. 1997. Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *J Biol Chem* 272: 30196-200
- Doma MK, Parker R. 2006. Revenge of the NRD: preferential degradation of nonfunctional eukaryotic rRNA. *Dev Cell* 11: 757-8
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
- Duttagupta R, Vasudevan S, Wilusz CJ, Peltz SW. 2003. A yeast homologue of Hsp70, Ssa1p, regulates turnover of the MFA2 transcript through its AU-rich 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* 23: 2623-32



## Bibliografía

- Duttagupta R, Tian B, Wilusz CJ, Khounh DT, Soteropoulos P, Ouyang M, Dougherty JP, Peltz SW. 2005. Global analysis of Pub1p targets reveals a coordinate control of gene expression through modulation of binding and stability. *Mol Cell Biol* 25: 5499-513
- Eastmond DL, Nelson HC. 2006. Genome-wide analysis reveals new roles for the activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor (Hsf1) during the transient heat shock response. *J Biol Chem* 281: 32909-21
- Eckers E, Bien M, Stroobant V, Herrmann JM, Deponte M. 2009. Biochemical characterization of dithiol glutaredoxin 8 from *Saccharomyces cerevisiae*: the catalytic redox mechanism redux. *Biochemistry* 48: 1410-23
- Etchells SA, Meyer AS, Yam AY, Roobol A, Miao Y, Shao Y, Carden MJ, Skach WR, Frydman J, Johnson AE. 2005. The cotranslational contacts between ribosome-bound nascent polypeptides and the subunits of the hetero-oligomeric chaperonin TRiC probed by photocross-linking. *J Biol Chem* 280: 28118-26
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 9-22
- Fauchon M, Lagniel G, Aude JC, Lombardia L, Soularue P, Petat C, Marguerie G, Sentenac A, Werner M, Labarre J. 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol Cell* 9: 713-23
- Felice MR, De Domenico I, Li L, Ward DM, Bartok B, Musci G, Kaplan J. 2005. Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J Biol Chem* 280: 22181-90
- Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol Cell Biol* 17: 6982-93
- Finley D, Ozkaynak E, Varshavsky A. 1987. The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* 48: 1035-46
- Flattery-O'Brien JA, Dawes IW. 1998. Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *J Biol Chem* 273: 8564-71
- Foat BC, Houshmandi SS, Olivas WM, Bussemaker HJ. 2005. Profiling condition-specific, genome-wide regulation of mRNA stability in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17675-80
- Folch-Mallol J, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias Robles A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 46: 24-46
- Foury F, Talibi D. 2001. Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J Biol Chem* 276: 7762-8
- Fragiadakis GS, Tzamarias D, Alexandraki D. 2004. Nhp6 facilitates Aft1 binding and Ssn6 recruitment, both essential for FRE2 transcriptional activation. *Embo J* 23: 333-42
- Friant S, Meier KD, Riezman H. 2003. Increased ubiquitin-dependent degradation can replace the essential requirement for heat shock protein induction. *Embo J* 22: 3783-91
- Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrerio AL, Parker R, Dietz HC. 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295: 2258-61
- Froschauer EM, Schweyen RJ, Wiesenberger G. 2009. The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta* 1788: 1044-50
- Garcia-Martinez J, Aranda A, Perez-Ortin JE. 2004. Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms. *Mol Cell* 15: 303-13
- Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. 1997. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 837-48

- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113-26
- Garrido EO, Grant CM. 2002. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol* 43: 993-1003
- Gasch A. 2003. *Yeast Stress Responses. Topics in Current Genetics*. 11-68 pp: SaM Hohmann, PWH eds
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-57
- Gautschi M, Mun A, Ross S, Rospert S. 2002. A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4209-14
- Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. 2004. Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2: E79
- Ghezzi P, Bonetto V. 2003. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3: 1145-53
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20: 1425
- Gietz RD, Sugino A. 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74: 527-34
- Gilbert HF. 1995. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol* 251: 8-28
- Gill T, Cai T, Aulds J, Wierzbicki S, Schmitt ME. 2004. RNase MRP cleaves the CLB2 mRNA to promote cell cycle progression: novel method of mRNA degradation. *Mol Cell Biol* 24: 945-53
- Girard PM, Boiteux S. 1997. Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 79: 559-66
- Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J. 1998. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 22480-9
- Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426: 895-9
- Goldstein AL, McCusker JH. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541-53
- Goldstein AL, Pan X, McCusker JH. 1999. Heterologous URA3MX cassettes for gene replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 507-11
- Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, Greenblatt J, Emili A, Zhang Z, Houry WA. 2009. An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* 5: 275
- Gonzales FA, Zanchin NI, Luz JS, Oliveira CC. 2005. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in Pre-rRNA processing. *J Mol Biol* 346: 437-55
- Gorenstein C, Warner JR. 1976. Coordinate regulation of the synthesis of eukaryotic ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1547-51
- Grandi P, Rybin V, Bassler J, Petfalski E, Strauss D, Marzioch M, Schafer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervy D, Gavin AC, Hurt E. 2002. 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors. *Mol Cell* 10: 105-15

## Bibliografia

- Grant CM, Firoozan M, Tuite MF. 1989. Mistranslation induces the heat-shock response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 3: 215-20
- Grigull J, Mnaimneh S, Pootoolal J, Robinson MD, Hughes TR. 2004. Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* 24: 5534-47
- Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. 2008. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem* 283: 21837-41
- Grousl T, Ivanov P, Frydlova I, Vasicova P, Janda F, Vojtova J, Malinska K, Malcova I, Novakova L, Janoskova D, Valasek L, Hasek J. 2009. Robust heat shock induces eIF2alpha-phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 122: 2078-88
- Guhaniyogi J, Brewer G. 2001. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* 265: 11-23
- Gulshan K, Rovinsky SA, Coleman ST, Moye-Rowley WS. 2005. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J Biol Chem* 280: 40524-33
- Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR. 2004. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* 24: 5249-56
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed.* Oxford: Oxford University Press.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- Hargrove JL, Hulsey MG, Beale EG. 1991. The kinetics of mammalian gene expression. *Bioessays* 13: 667-74
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-8
- Hasegawa Y, Irie K, Gerber AP. 2008. Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast. *Rna* 14: 2333-47
- Hassett RF, Romeo AM, Kosman DJ. 1998. Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. *J Biol Chem* 273: 7628-36
- Hausmann A, Samans B, Lill R, Muhlenhoff U. 2008. Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 283: 8318-30
- Hayles B, Yellaboina S, Wang D. 2010. Comparing transcription rate and mRNA abundance as parameters for biochemical pathway and network analysis. *PLoS One* 5: e9908
- He F, Li X, Spatrick P, Casillo R, Dong S, Jacobson A. 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell* 12: 1439-52
- Heikkinen HL, Llewellyn SA, Barnes CA. 2003. Initiation-mediated mRNA decay in yeast affects heat-shock mRNAs, and works through decapping and 5'-to-3' hydrolysis. *Nucleic Acids Res* 31: 4006-16
- Hentze MW, Kuhn LC. 1996. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8175-82
- Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285-97
- Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780: 1217-35
- Herrero J, Valencia A, Dopazo J. 2001. A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 17: 126-36

- Herruer MH, Mager WH, Raue HA, Vreken P, Wilms E, Planta RJ. 1988. Mild temperature shock affects transcription of yeast ribosomal protein genes as well as the stability of their mRNAs. *Nucleic Acids Res* 16: 7917-29
- Heymann P, Ernst JF, Winkelmann G. 2000. A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 13: 65-72
- Hilgers V, Teixeira D, Parker R. 2006. Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 12: 1835-45
- Hinnebusch AG. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* 59: 407-50
- Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. 2008. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* 6: e255
- Hohmann S, Mager W. 2003. *Yeast Stress Responses. Topics in Current Genetics*. 1-9 pp: SaM Hohmann, PWH eds
- Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L. 2002. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 27: 619-27
- Holmes LE, Campbell SG, De Long SK, Sachs AB, Ashe MP. 2004. Loss of translational control in yeast compromised for the major mRNA decay pathway. *Mol Cell Biol* 24: 2998-3010
- Houalla R, Devaux F, Fatica A, Kufel J, Barrass D, Torchet C, Tollervey D. 2006. Microarray detection of novel nuclear RNA substrates for the exosome. *Yeast* 23: 439-54
- Ikner A, Shiozaki K. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res* 569: 13-27
- Imai J, Maruya M, Yashiroda H, Yahara I, Tanaka K. 2003. The molecular chaperone Hsp90 plays a role in the assembly and maintenance of the 26S proteasome. *Embo J* 22: 3557-67
- Imlay JA, Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-9
- Inada T, Aiba H. 2005. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *Embo J* 24: 1584-95
- Irie K, Tadauchi T, Takizawa PA, Vale RD, Matsumoto K, Herskowitz I. 2002. The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *Embo J* 21: 1158-67
- Izquierdo A, Casas C, Muhlenhoff U, Lillig CH, Herrero E. 2008. *Saccharomyces cerevisiae* Grx6 and Grx7 are monothiol glutaredoxins associated with the early secretory pathway. *Eukaryot Cell* 7: 1415-26
- Jacobs Anderson JS, Parker R. 2000. Computational identification of cis-acting elements affecting post-transcriptional control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 28: 1604-17
- Jakobsen BK, Pelham HR. 1988. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol Cell Biol* 8: 5040-2
- Jensen LT, Culotta VC. 2002. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FET4 by oxygen and iron. *J Mol Biol* 318: 251-60
- Jentsch S, Schlenker S. 1995. Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* 82: 881-4
- Jung US, Levin DE. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 34: 1049-57
- Kabir MA, Sherman F. 2008. Overexpressed ribosomal proteins suppress defective chaperonins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 8: 1236-44

## Bibliografia

- Kaplan CD, Kaplan J. 2005. Regulatory oversight of the iron trade: posttranscriptional regulation in yeast. *Cell Metab* 2: 4-6
- Kaplan CD, Kaplan J. 2009. Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem Rev* 109: 4536-52
- Kaplan J, McVey Ward D, Crisp RJ, Philpott CC. 2006. Iron-dependent metabolic remodeling in *S. cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1763: 646-51
- Karpov DS, Preobrazhenskaia OV, Karpov VL. 2009. [Transcriptional regulation of proteasomal genes in eukaryotes]. *Mol Biol (Mosk)* 43: 243-52
- Kaufman BA, Kolesar JE, Perlman PS, Butow RA. 2003. A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 163: 457-61
- Kaufman RJ. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-33
- Keene JD. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8: 533-43
- Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423: 241-54
- Kim CH, Warner JR. 1983. Messenger RNA for ribosomal proteins in yeast. *J Mol Biol* 165: 79-89
- Kim IS, Moon HY, Yun HS, Jin I. 2006. Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol* 44: 492-501
- Kim J, Kim J. 2002. KEM1 is involved in filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 216: 33-8
- Kobayashi N, McEntee K. 1990. Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6550-4
- Kosower NS, Kosower EM. 1995. Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol* 251: 123-33
- Krems B, Charizanis C, Entian KD. 1996. The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet* 29: 327-34
- Kuai L, Das B, Sherman F. 2005. A nuclear degradation pathway controls the abundance of normal mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13962-7
- Kuge S, Jones N, Nomoto A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J* 16: 1710-20
- Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* 21: 6139-50
- Kumanovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, 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. *J Biol Chem* 283: 10276-86
- LaCava J, Houseley J, Saveanu C, Petfalski E, Thompson E, Jacquier A, Tollervy D. 2005. RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121: 713-24
- Lan CY, Rodarte G, Murillo LA, Jones T, Davis RW, Dungan J, Newport G, Agabian N. 2004. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* 53: 1451-69
- Lee A, Henras AK, Chanfreau G. 2005. Multiple RNA surveillance pathways limit aberrant expression of iron uptake mRNAs and prevent iron toxicity in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 19: 39-51

- Lee J, Romeo A, Kosman DJ. 1996. Transcriptional remodeling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271: 24885-93
- Lee SM, Park JW. 1998. Thermosensitive phenotype of yeast mutant lacking thioredoxin peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 359: 99-106
- Lewis MJ, Pelham HR. 1985. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. *Embo J* 4: 3137-43
- Li B, Nierras CR, Warner JR. 1999. Transcriptional elements involved in the repression of ribosomal protein synthesis. *Mol Cell Biol* 19: 5393-404
- Li L, Bagley D, Ward DM, Kaplan J. 2008. Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol Cell Biol* 28: 1326-37
- Lill R, Muhlenhoff U. 2008. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* 77: 669-700
- Lillie SH, Brown SS. 1994. Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 125: 825-42
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-77
- Liu Y, Liang S, Tartakoff AM. 1996. Heat shock disassembles the nucleolus and inhibits nuclear protein import and poly(A)<sup>+</sup> RNA export. *Embo J* 15: 6750-7
- Liu Y, Chang A. 2008. Heat shock response relieves ER stress. *Embo J* 27: 1049-59
- Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW, Grant CM. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 9: 1081-91
- Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Frohlich KU. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145: 757-67
- Mager WH, Ferreira PM. 1993. Stress response of yeast. *Biochem J* 290 ( Pt 1): 1-13
- Malys N, McCarthy JE. 2006. Dcs2, a novel stress-induced modulator of m7GpppX pyrophosphatase activity that locates to P bodies. *J Mol Biol* 363: 370-82
- Maniatis T, Reed R. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416: 499-506
- Mannhaupt G, Schnell R, Karpov V, Vetter I, Feldmann H. 1999. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett* 450: 27-34
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J* 15: 2227-35
- McCallum CD, Do H, Johnson AE, Frydman J. 2000. The interaction of the chaperonin tailless complex polypeptide 1 (TC1P1) ring complex (TRiC) with ribosome-bound nascent chains examined using photo-cross-linking. *J Cell Biol* 149: 591-602
- McCarthy JE. 1998. Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1492-553
- McClanahan T, McEntee K. 1986. DNA damage and heat shock dually regulate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 6: 90-6
- McKee AE, Silver PA. 2007. Systems perspectives on mRNA processing. *Cell Res* 17: 581-90

## Bibliografia

- Medicherla B, Goldberg AL. 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* 182: 663-73
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3: REVIEWS0004
- Miller MJ, Xuong NH, Geiduschek EP. 1979. A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5222-5
- Miller MJ, Xuong NH, Geiduschek EP. 1982. Quantitative analysis of the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 151: 311-27
- Milligan L, Torchet C, Allmang C, Shipman T, Tollervey D. 2005. A nuclear surveillance pathway for mRNAs with defective polyadenylation. *Mol Cell Biol* 25: 9996-10004
- Mogk A, Haslberger T, Tessarz P, Bukau B. 2008. Common and specific mechanisms of AAA+ proteins involved in protein quality control. *Biochem Soc Trans* 36: 120-5
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58: 459-81
- Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguéz P, Vera J, Mukherjee S, Valls J, Pujana MA, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J. 2006. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* 34: W486-91
- Moore MJ. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309: 1514-8
- Moraitis C, Curran BP. 2004. Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 313-23
- Morano KA, Liu PC, Thiele DJ. 1998. Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 1: 197-203
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-96
- Moye-Rowley WS. 2002. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid Redox Signal* 4: 123-40
- Moye-Rowley WS. 2003. Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot Cell* 2: 381-9
- Muhlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J* 22: 4815-25
- Muhlrad D, Parker R. 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370: 578-81
- Muhlrad D, Parker R. 2005. The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *Embo J* 24: 1033-45
- Muller EG. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* 266: 9194-202
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* 21: 4347-68
- Oberstrass FC, Lee A, Stefl R, Janis M, Chanfreau G, Allain FH. 2006. Shape-specific recognition in the structure of the Vts1p SAM domain with RNA. *Nat Struct Mol Biol* 13: 160-7

- Ojeda L, Keller G, Muhlenhoff U, Rutherford JC, Lill R, Winge DR. 2006. Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 17661-9
- Pacheco A, Pereira C, Almeida MJ, Sousa MJ. 2009. Small heat-shock protein Hsp12 contributes to yeast tolerance to freezing stress. *Microbiology* 155: 2021-8
- Paes de Faria J, Fernandes L. 2006. Protection against oxidative stress through SUA7/TFIIB regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 41: 1684-93
- Park HG, Han SI, Oh SY, Kang HS. 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cell Mol Life Sci* 62: 10-23
- Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH. 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 5723-32
- Parker R, Herrick D, Peltz SW, Jacobson A. 1991. Measurement of mRNA decay rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 194: 415-23
- Parker R, Song H. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11: 121-7
- Parker R, Sheth U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635-46
- Pedrajas JR, Kosmidou E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson JA, Wright AP, Spyrou G. 1999. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 6366-73
- Pedro-Segura E, Vergara SV, Rodriguez-Navarro S, Parker R, Thiele DJ, Puig S. 2008. The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase SDH4 mRNA in response to iron deficiency. *J Biol Chem* 283: 28527-35
- Perez-Ortin JE. 2007. Genomics of mRNA turnover. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6: 282-91
- Perez-Ortin JE, Alepuz PM, Moreno J. 2007. Genomics and gene transcription kinetics in yeast. *Trends Genet* 23: 250-7
- Philpott CC, Protchenko O, Kim YW, Boretsky Y, Shakoury-Elizeh M. 2002. The response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*: expression of siderophore-based systems of iron uptake. *Biochem Soc Trans* 30: 698-702
- Philpott CC. 2006. Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim Biophys Acta* 1763: 636-45
- Philpott CC, Protchenko O. 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 20-7
- Plummer JL, Smith BR, Sies H, Bend JR. 1981. Chemical depletion of glutathione in vivo. *Methods Enzymol* 77: 50-9
- Porrás P, Padilla CA, Krayl M, Voos W, Barcena JA. 2006. One single in-frame AUG codon is responsible for a diversity of subcellular localizations of glutaredoxin 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 16551-62
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. 2001. Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 49244-50
- Proud CG. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16: 3-12
- Puig S, Askeland E, Thiele DJ. 2005. Coordinated remodeling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* 120: 99-110



## Bibliografia

- Puig S, Vergara SV, Thiele DJ. 2008. Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab* 7: 555-64
- Pujol-Carrion N, Belli G, Herrero E, Nogues A, de la Torre-Ruiz MA. 2006. Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 119: 4554-64
- Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell* 11: 2335-47
- Rand JD, Grant CM. 2006. The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell* 17: 387-401
- Rendl LM, Bieman MA, Smibert CA. 2008. *S. cerevisiae* Vts1p induces deadenylation-dependent transcript degradation and interacts with the Ccr4p-Pop2p-Not deadenylase complex. *Rna* 14: 1328-36
- Rietsch A, Beckwith J. 1998. The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu Rev Genet* 32: 163-84
- Riezman H. 2004. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle* 3: 61-3
- Robinson MD, Grigull J, Mohammad N, Hughes TR. 2002. FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* 3: 35
- Rodrigues-Pousada CA, Nevitt T, Menezes R, Azevedo D, Pereira J, Amaral C. 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett* 567: 80-5
- Rodriguez-Gabriel MA, Burns G, McDonald WH, Martin V, Yates JR, 3rd, Bahler J, Russell P. 2003. RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *Embo J* 22: 6256-66
- Rodriguez-Gabriel MA, Watt S, Bahler J, Russell P. 2006. Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. *Mol Cell Biol* 26: 6347-56
- Rodriguez-Manzanique MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* 13: 1109-21
- Rollenhagen C, Hodge CA, Cole CN. 2004. The nuclear pore complex and the DEAD box protein Rat8p/Dbp5p have nonessential features which appear to facilitate mRNA export following heat shock. *Mol Cell Biol* 24: 4869-79
- Romero-Santacreu L, Moreno J, Perez-Ortin JE, Alepuz P. 2009. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 15: 1110-20
- Rouault TA, Tong WH. 2005. Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 345-51
- Rowley A, Johnston GC, Butler B, Werner-Washburne M, Singer RA. 1993. Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13: 1034-41
- Ruis H, Hamiltol B. 1992. *Regulation of yeast catalase genes*: CHS Press. 153-72 pp: MBoFRS Systems
- Rutherford JC, Jaron S, Winge DR. 2003. Aft1p and Aft2p mediate iron-responsive gene expression in yeast through related promoter elements. *J Biol Chem* 278: 27636-43
- Rutherford JC, Ojeda L, Balk J, Muhlenhoff U, Lill R, Winge DR. 2005. Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* 280: 10135-40
- Saavedra C, Tung KS, Amberg DC, Hopper AK, Cole CN. 1996. Regulation of mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10: 1608-20

- Sandqvist A, Sistonen L. 2004. Nuclear stress granules: the awakening of a sleeping beauty? *J Cell Biol* 164: 15-7
- Scandalios JG. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014
- Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32: 307-26
- Shakoury-Elizeh M, Tiedeman J, Rashford J, Ferea T, Demeter J, Garcia E, Rolfes R, Brown PO, Botstein D, Philpott CC. 2004. Transcriptional remodeling in response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15: 1233-43
- Shalgi R, Lapidot M, Shamir R, Pilpel Y. 2005. A catalog of stability-associated sequence elements in 3' UTRs of yeast mRNAs. *Genome Biol* 6: R86
- Shenton D, Smirnova JB, Selley JN, Carroll K, Hubbard SJ, Pavitt GD, Ashe MP, Grant CM. 2006. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem* 281: 29011-21
- Sherman F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350: 3-41
- Sheth U, Parker R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300: 805-8
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-9
- Simon JR, Treger JM, McEntee K. 1999. Multiple independent regulatory pathways control UBI4 expression after heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 31: 823-32
- Singer MA, Lindquist S. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* 16: 460-8
- Solinger JA, Pascolini D, Heyer WD. 1999. Active-site mutations in the Xrn1p exoribonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* reveal a specific role in meiosis. *Mol Cell Biol* 19: 5930-42
- Sonna LA, Fujita J, Gaffin SL, Lilly CM. 2002. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J Appl Physiol* 92: 1725-42
- Stadtman ER, Levine RL. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-18
- Sugiyama K, Izawa S, Inoue Y. 2000. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 15535-40
- Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J, Richardson DR. 2008. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol* 16: 261-8
- Swaminathan S, Masek T, Molin C, Pospisek M, Sunnerhagen P. 2006. Rck2 is required for reprogramming of ribosomes during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 17: 1472-82
- Tachibana T, Okazaki S, Murayama A, Naganuma A, Nomoto A, Kuge S. 2009. A major peroxiredoxin-induced activation of Yap1 transcription factor is mediated by reduction-sensitive disulfide bonds and reveals a low level of transcriptional activation. *J Biol Chem* 284: 4464-72
- Tamarit J, Irazusta V, Moreno-Cermeno A, Ros J. 2006. Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal Biochem* 351: 149-51
- Tang YC, Chang HC, Hayer-Hartl M, Hartl FU. 2007. SnapShot: molecular chaperones, Part II. *Cell* 128: 412
- Tatchell K, Robinson LC. 2002. Use of green fluorescent protein in living yeast cells. *Methods Enzymol* 351: 661-83

## Bibliografia

- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *Rna* 11: 371-82
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* 15: 319-26
- Thorsen M, Lagniel G, Kristiansson E, Junot C, Nerman O, Labarre J, Tamas MJ. 2007. Quantitative transcriptome, proteome, and sulfur metabolite profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to arsenite. *Physiol Genomics* 30: 35-43
- Toledano M, Delaunay A, Biteau B, Spector D, Azevedo D. 2003. *Oxidative stress responses in yeast. Topics in Current Genetics.* 242-87 pp: SaM Hohmann, PWH eds
- Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F. 2007. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett* 581: 3598-607
- Trott A, Morano K. 2003. *The yeast response to heat shock. Topics in Current Genetics.*: Springer-Verlag Berlin. 71-119 pp: SaM Hohmann, PWH eds
- Tsurugi K, Mitsui K. 1991. Bilateral hydrophobic zipper as a hypothetical structure which binds acidic ribosomal protein family together on ribosomes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 1318-23
- Tucker M, Valencia-Sanchez MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, Parker R. 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104: 377-86
- Ueta R, Fukunaka A, Yamaguchi-Iwai Y. 2003. Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 50120-7
- Ueta R, Fujiwara N, Iwai K, Yamaguchi-Iwai Y. 2007. Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18: 2980-90
- Ulbricht RJ, Olivas WM. 2008. Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability. *Rna* 14: 246-62
- Vainberg IE, Dower K, Rosbash M. 2000. Nuclear export of heat shock and non-heat-shock mRNA occurs via similar pathways. *Mol Cell Biol* 20: 3996-4005
- van Helden J. 2003. Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* 31: 3593-6
- van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R. 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295: 2262-4
- Vanacova S, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, Langen H, Keith G, Keller W. 2005. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* 3: e189
- Vasudevan S, Peltz SW. 2001. Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 7: 1191-200
- Vergara SV, Thiele DJ. 2008. Post-transcriptional regulation of gene expression in response to iron deficiency: co-ordinated metabolic reprogramming by yeast mRNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans* 36: 1088-90
- Vogel JL, Parsell DA, Lindquist S. 1995. Heat-shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. *Curr Biol* 5: 306-17
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-808

- Walsh P, Bursac D, Law YC, Cyr D, Lithgow T. 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep* 5: 567-71
- Wang Y, Liu CL, Storey JD, Tibshirani RJ, Herschlag D, Brown PO. 2002. Precision and functional specificity in mRNA decay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5860-5
- Wanke V, Accorsi K, Porro D, Esposito F, Russo T, Vanoni M. 1999. In budding yeast, reactive oxygen species induce both RAS-dependent and RAS-independent cell cycle-specific arrest. *Mol Microbiol* 32: 753-64
- Warner JR. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24: 437-40
- Waters BM, Eide DJ. 2002. Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* 277: 33749-57
- Welch WJ, Suhan JP. 1985. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J Cell Biol* 101: 1198-211
- Welch WJ. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72: 1063-81
- Wilusz CJ, Wilusz J. 2004. Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet* 20: 491-7
- Wong CM, Siu KL, Jin DY. 2004. Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *J Biol Chem* 279: 23207-13
- Wood MJ, Storz G, Tjandra N. 2004. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* 430: 917-21
- Wu LF, Hughes TR, Davierwala AP, Robinson MD, Stoughton R, Altschuler SJ. 2002. Large-scale prediction of *Saccharomyces cerevisiae* gene function using overlapping transcriptional clusters. *Nat Genet* 31: 255-65
- Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A, Klausner RD. 1995. AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14: 1231-9
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, Klausner RD. 1996. Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *Embo J* 15: 3377-84
- Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R. 2002. Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 18914-8
- Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, Sakurai H. 2008. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 7: 783-90
- Yost HJ, Petersen RB, Lindquist S. 1990. RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *Trends Genet* 6: 223-7
- Yost HJ, Lindquist S. 1991. Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 1062-8
- Yun CW, Bauler M, Moore RE, Klebba PE, Philpott CC. 2001. The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 276: 10218-23
- Zhao XJ, Raitt D, P VB, Clewell AS, Kwast KE, Poyton RO. 1996. Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 271: 25131-8



## **VIII. ARTICLES**



## HEAT SHOCK RESPONSE IN YEAST INVOLVES BOTH CHANGES IN TRANSCRIPTION RATES AND mRNA STABILITIES

**Laia Castells-Roca<sup>‡</sup>, José García-Martínez<sup>¶</sup>, Joaquín Moreno<sup>§</sup>, Enrique Herrero<sup>‡</sup>,  
José E. Pérez-Ortín<sup>§1</sup>, and Gemma Bellí<sup>‡1</sup>**

*From the <sup>‡</sup>Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques and IRBLleida, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, and the <sup>§</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas and <sup>¶</sup>Sección de Chips de DNA-Servicio Central de Ayuda a la Investigación Experimental, Universitat de València, 46100-Burjassot, Valencia, Spain*

<sup>1</sup>Both authors contributed equally to the senior authorship of this work



Cells respond to a variety of environmental stresses by reprogramming the expression of specific sets of genes which depend on the particular stress. In yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells, such response has been extensively studied at the genome level for a number of stresses (see Ref. 1 and 2, among others). Most genomic studies on stress responses involve the determination of mRNA amounts (here abbreviated as RA), although for each gene RA depends on the equilibrium between transcription rate (TR) and decay rate of each particular mRNA (3). We have recently shown that in the dynamic situation after application of an oxidative stress to yeast cells, transitory changes in the decay rate of different mRNA are as relevant as transcriptional shifts in modulating the RA changes occurring during adaptation to the stress (4).

The heat shock response in yeast is mediated by transcription factors Hsf1 and Msn2/Msn4, and involves upregulation of a number of genes for heat-shock proteins (Hsps) that participate in protein folding, trafficking and maturation, and genes for the protein degradation machinery, paralleled by downregulation of genes for ribosome biogenesis (5). Some Hsp genes are specific for one of the above transcription factors, while others are governed by both Hsf1 and Msn2/4 through the respective HSE and STRE promoter motifs. Heat shock factor Hsf1 is an essential protein in *S. cerevisiae* which not only participates in the heat shock response but also in adaptation to oxidative stress and glucose starvation (6, 7). The partially redundant zinc-finger transcription factors Msn2 and Msn4 mediate the response to a variety of cellular and environmental stresses including heat shock (known as the Environmental Stress Response, reviewed in Ref. 8). During adaptation to heat shock, both factors seem to play differential roles: Hsf1 would be essential for recovery from a short exposure to extreme temperature, while Msn2/4 would be required for long-term survival at high temperature (9). Recently, partial overlapping has been described between the heat shock response and the unfolded protein response which is induced upon endoplasmic reticulum stress generated by misfolded proteins (10). Both types of stresses share a number of transcription targets.

The Hsf1-mediated response of yeast cells subjected to heat shock has been studied at the systemic level through combination of microarray analysis of RA and promoter occupancy determination by chromatin immunoprecipitation (11). Heat shock mainly induces binding of Hsf1 to the promoters of its target genes, which represent nearly 3% of the yeast genome. In addition to genes for protein folding, degradation and trafficking, Hsf1 targets are also implicated in biological functions such as maintenance of cell integrity, molecular transport, cell signaling and transcription (6). One of the transcription factors whose expression is induced by Hsf1 is Pdr3, which itself upregulates expression of Rpn4 (12). This governs the expression of proteasome subunit genes (13). This regulatory circuit thus explains how the heat shock response includes activation of misfolded protein degradation at the proteasome. During a heat shock, ribosomal protein (RP) genes are downregulated (6, 14), as occurs during other environmental stresses (1, 4, 15). RP downregulation during a heat shock is accompanied by increased promoter occupancy of RP genes by nucleosomes and decreased histone H4 acetylation (14). In contrast, upregulation of other genes correlates with decreased promoter occupancy and histone acetylation, which establishes a relationship between the heat shock response and chromatin remodeling (14).

The above studies do not discriminate between the relative roles of TR and mRNA decay changes as determinants of the dynamics of mRNA levels during the heat shock response. The genomic run-on (GRO) methodology allows quantification of the TR and RA parameters for each particular gene at a genomic scale and subsequently, allows determining the relative values of mRNA decay rate ( $k_D$ ) for each gene (3, 16). It has been employed to determine changes in mRNA stability in the *S. cerevisiae* transcriptome during a nutritional shift from glucose to galactose (17) and during an oxidative stress (4). In the latter study, it was demonstrated that changes in mRNA stability modulate the stress response together with TR dynamics for particular gene subsets (4). In parallel, following a different approach other authors have demonstrated that alterations in mRNA decay rate determine the sustainability of the oxidative stress response for specific mRNAs (18). Modulation of mRNA stability also influences the response of yeast cells during an osmotic stress, as determined from studies using transcription inhibitors (19) or GRO (15) for mRNA decay determinations. In the present study we have employed the GRO approach to analyze the heat shock response in yeast cells at a genomic scale, and this has allowed us to demonstrate that, in addition to the response regulation at the transcriptional level, a second level of regulation occurs by differential modulation of stability of specific sets of genes.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Strains, Plasmids and Growth Conditions.* *S. cerevisiae* wild type strain W303-1A (*MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15*) and its derivative MML830 were employed. MML830 strain (4) was obtained by chromosomal integration of linearized plasmid pCM244, which codes for the doxycycline-activable *tetO<sub>2</sub>* promoter repressor tetR'-Ssn6. After employing the promoter substitution cassette from plasmid pCM224 (20), the following strains were obtained in which the endogenous promoters of several genes in MML830 were replaced by the *tetO<sub>2</sub>* promoter: MML863 (*tetO<sub>2</sub>-HSP104*), MML957 (*tetO<sub>2</sub>-RRP40*), MML980 (*tetO<sub>2</sub>-HSP42*), MML987 (*tetO<sub>2</sub>-HSP12*), and MML1042 (*tetO<sub>2</sub>-ALD4*). MML896 is a MML830 derivative with the *rps6A::kanMX4* and *rps6B::natMX4* deletions and transformed with plasmid pMM803. This is a *URA3* centromeric plasmid which derives from pCM188 (21) and contains the *RPS6A* open reading frame plus 339 bp of the 3'-UTR region of *RPS6A*, under the control of the *tetO<sub>2</sub>* promoter.

Cells were grown in rich YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or in defined SC-glucose medium (22). Doxycycline at 5 µg/ml was added for repressing genes under the *tetO<sub>2</sub>* promoter. Exponentially growing cultures in liquid medium ( $1.5\text{-}2 \times 10^7$  cells/ml) at 25°C were heat-shocked by adding an equal volume of fresh medium at 49°C, to immediately reach a final temperature of 37°C, and keeping them in a 37°C bath during the sampling interval.

*Genomic Run-on.* GRO analyses (three independent experiments) were done as in Ref. 17, with the modifications described in Ref. 4. Total RNA and poly(A) mRNA per cell were measured as in Ref. 17. Individual TR values obtained from GRO analyses are based on the determination of the number of RNA polymerase complexes interacting with each open reading frame at the time of sampling, but does not consider changes in the rates of nucleotide incorporation which may occur *in vivo* when the stress conditions are applied. In the particular case of the heat shock, the temperature shift from 25 to 37°C is expected to increase the nucleotide polymerization rate substantially. In the absence of direct experimental data about the temperature dependence of the *S. cerevisiae* RNA polymerase, we considered available values of 13 Kcal/mol (23) and 9.7 Kcal/mol (24) for the apparent activation energy of the elongation step in the case of the *Escherichia coli* RNA polymerase. Assuming Arrhenius dependence of the catalytic constant, these values predict that the elongation speed would be roughly doubled as a result of the temperature shift. Therefore, the GRO-determined TR values (except those of time 0) were multiplied by two for further calculations.

*Messenger RNA Decay Rate Calculations.* RAs were assumed to be at a steady state at the onset of stress. Therefore, the initial (steady-state) decay rate ( $k_D$ ) was calculated as the ratio of TR to RA values determined at time 0. After the onset of stress, under (presumably) non-steady-state conditions, the decay rates were inferred from the experimental values of TR and RA provided by the GRO technique along the time course. Assuming a linear variation of TR in between experimentally determined values, the following relation between TR, RA, and  $k_D$  has been postulated (3):

$$[(TR_2 - TR_1)/(t_2 - t_1)] - TR_2 \cdot k_D + RA_2 \cdot k_D^2 = [[(TR_2 - TR_1)/(t_2 - t_1)] - TR_1 \cdot k_D + RA_1 \cdot k_D^2] \cdot \exp -[k_D \cdot (t_2 - t_1)]$$

where  $TR_1$  and  $TR_2$ , and  $RA_1$  and  $RA_2$ , are the experimentally determined values for TR and RA at successive time points  $t_1$  and  $t_2$ . By numerically solving for  $k_D$  (using a bisection algorithm written as a Visual Basic for Applications program into a Microsoft Excel spreadsheet) in the above equation, a mean  $k_D$  value for the time interval between  $t_1$  and  $t_2$  was obtained. The absolute values of the deviations of the  $k_D$  for every gene from its initial steady-state value were summed up for all time points, and the sums for all the genes with values for six time points were ranked.

*Clustering Procedures.* Changes in TR and RA for all yeast genes were evaluated by cluster analysis of normalized averaged values. For cluster analysis of the results, we used the SOTA Tree server included in Gene Expression Pattern Analysis Suite v 3.1 (<http://www.gepas.org>) located at the web server of CIPF Bioinformatic Unit (cluster conditions as in Ref. 4). To test the potential enrichment in Gene Ontology (GO) categories in the different groups obtained in this study, we used the FuncAssociate

(<http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>) which uses a Monte Carlo simulation approach and accepts only significant GO categories according to the adjusted  $p$  value, computed from the fraction of 1000 simulations under the null-hypothesis with the same or smaller  $p$  value and after correction for multiple simultaneous tests.

**Northern Blot Analyses.** RNA electrophoresis, probe labeling with digoxigenin, hybridization and signal detection in a Lumi-Imager equipment (Roche Applied Science) were done as described previously (25). Gene probes were PCR-generated from genomic DNA, using oligonucleotides designed to amplify internal open reading frame regions. Background values were determined for a region lacking visible signal, of the same size as the measured band and adjacent to it, and such background was subtracted from the respective band signal value.

## RESULTS

**General Cell Response to Moderate Heat Stress.** It has been described that *S. cerevisiae* cells subjected to an intense heat shock treatment a transient growth arrest at the G1 stage of the cell cycle. After a time, cells spontaneously recover and resume cell cycle progression while still under high temperature conditions (26). To minimize undesirable side cell cycle effects, which could disturb the direct effects of heat shock on general transcription and mRNA stability, we employed mild stress conditions that did minimally affect exponential growth but still induced expression of the genes that take part in the heat shock response. For this purpose, we applied a thermal stress by shifting exponentially growing cells from 25 to 37°C, and studied the general transcriptional response of the cells after such stress. Other studies involving heat stress have employed a larger temperature change. In this study, the total amount of poly(A) mRNA per cell increased suddenly from 5 min upon the stress up to 20 min, slightly faster than cell proliferation rate, to then maintain the level achieved (Figure 1). Whole Pol II transcription initially increased smoothly relative to time 0, an effect also observed after carbon source shift as well as upon an oxidative stress (4, 17), to gradually decrease at later times to reach levels even lower than those at time 0. On the other hand, whole Pol I TR decreased abruptly upon stress. Comparison of the kinetics of mRNA levels and Pol II-dependent transcription during heat shock conditions suggested a general mRNA stabilization after a quick destabilization upon the heat shock.

**Effect of Moderate Heat Shock on mRNA Levels and Transcription Rates.** By using the GRO experimental procedures (17), we have determined the TR and RA values for every yeast gene during the *S. cerevisiae* cell response to moderate heat shock. Signals obtained for both parameters were normalized using a genomic DNA hybridization, to allow full comparison of values obtained for individual genes. These values are listed in Supplemental Table S1. Both TR and RA data were used to make clustering analyses. Relative values to  $t_0$  were used to avoid differences in scale for those two data sets. Therefore,  $t_0$  for TR and RA have a 0 value in the log scale. The 12-point profiles obtained reflect the variation of TR (first 6 points) and its consequence on RA (last 6 points, Figure 2). As in previous work (4), in our experimental conditions most mRNAs are not under steady-state conditions, and RA profiles depend on TR and on mRNA stability according to kinetic laws (3).

Supplemental Table S2 lists the genes included in each of the resulting 16 clusters. The cluster-profile tree (Figure 2) shows a main branch (clusters 1 to 10) which includes 2442 genes (45% of the total number), and is subdivided into two sub-branches. The first one (clusters 1 to 6) includes genes that display a decrease in TR levels along the time course, followed in most cases by a decrease in RA. They therefore correspond to repressed categories, and genes for ribosome biogenesis and assembly are abundant in them (Supplemental Table S2). Genes in such sub-branch (19% of the total) are regularly distributed among clusters, being clusters 3 and 4 (enriched in the 'Cytosolic ribosome' and 'rRNA processing' GO categories those containing the largest number of genes. Cluster 6 in this sub-branch is enriched in amino acid metabolism genes which also experience a decrease in both TR and RA. The most different behaviour is seen in clusters 1 and 2, where an initial slight TR increase is followed by a sustained downregulation of this parameter, whereas RA does not change significantly during the experiment. This points to a late stabilization of mRNAs in these two clusters. The second sub-branch in the upper part of the tree (clusters 7 to 10, 26% of the total genes) has a different behaviour. Thus, TR is temporarily and moderately upregulated, whereas RA remains

unchanged in most of the cases (clusters 7 to 9) or even decreases (cluster 10), suggesting strong destabilization effects.

The lower part of the tree (clusters 11 to 16, Figure 2) is not clearly divided into separated branches. In all cases, RA is upregulated upon the heat shock, which in most cases is paralleled by a more or less sustained increase of TR. The exception are clusters 15 and 16, where TR remains constant (cluster 15) or decreases (cluster 16) while RA increases, suggesting mRNA stabilization effects. Remarkably, clusters 11 and 12 group together 45% of the total genes analyzed in this study, which points to a rather homogeneous behaviour among yeast genes in the response to heat shock. In both clusters, TR displays a strong upregulation upon the stress, but while in cluster 11 (enriched in the 'Proteasome complex' GO category, see below) there is a delayed but sustained increase in RA, in cluster 12 the RA increase is more immediate and stronger. These differences point to certain differences in mRNA stability upon the heat shock between genes of clusters 11 and 12. A more stringent clustering analysis of the 1761 genes of cluster 11 resulted in four subgroups (Supplemental Figure S1). Proteasome complex genes became mostly grouped in the lower subgroup of 415 genes in this Figure S1, which denotes a homogeneous behaviour of this GO category genes.

**Effect of Heat Shock on mRNA Stability.** We employed the absolute values of TR and RA obtained by the GRO procedures to estimate the mRNA first-order degradation constants ( $k_D$ , a measure of mRNA instability). For that purpose, we used a mathematical approach which considers non-steady state conditions for the TR and RA parameters during the time course (see Ref. 3 and 4 for details). Because  $k_D$  is computed from absolute values of TR and RA, which have to be calculated by comparison with external data sets, the associated error might be enlarged by the mathematical manipulation. Therefore, the  $k_D$  values obtained for individual genes (Supplemental Table S1) are probably too noisy to allow further investigation. However, our analysis showed that functionally related genes follow similar behaviours in the TR plus RA profiles. Consequently, we used average profiles of gene groups to describe the kinetic behaviour of mRNA stability. The average data for each one of the 16 clusters are shown in Figure 3. It should be remarked that represented  $k_D$  values are relative to the initial (steady state) value. Therefore,  $k_D$  values over 1 denote mRNA destabilization while values under 1 are indicative of stabilization effects.

All clusters show alterations of their  $k_D$  upon the stress, but they tend to return, despite the differences, to values similar to initial ones or lower. Characteristically, many of the clusters display an immediate increase of  $k_D$  after heat shock. Thus, it seems that heat stress may cause a sudden and rather general mRNA destabilization during the first minutes. This is evident in clusters in the upper part of the tree in Figure 2 (clusters 1 to 10), but also in cluster 11 (Figure 3), and is in accordance with the conclusions from Figure 1. However, differences arise between clusters when the whole time course is considered. Focusing initially in the clusters 1-10 group, in cluster 1 the  $k_D$  value rapidly decreases after the initial temporary increase to reach values under one, confirming the predicted mRNA stabilization effects from the Figure 2 profiles. In contrast, in clusters 2 to 10 the  $k_D$  value remains over the unit value for most of the time course, and this increase is specially sustained in cluster 5 during the first 20 min after the heat shock. The consequence of such predicted mRNA destabilization for the genes in these clusters is that RA decreases more intensely than would be expected based only on the TR decrease (clusters 2-6) or that the RA kinetics does not parallel the TR temporary increase (clusters 7-10). The ribosome biogenesis genes specially enriched in clusters 3 and 4 would be downregulated through both decrease of the TA and mRNA destabilization.

On the other hand, in clusters 11 to 16 the  $k_D$  profile displays a different behaviour, with a more or less sustained decrease which points to mRNA stabilization effects (Figure 3). Such stabilization may contribute to the RA increase observed upon the stress in these clusters. In the case of clusters 15 and 16 the mRNA stabilization effect would be the only responsible of the RA increase, while in cluster 14 it would add to the modest TR increase, resulting in the significant RA upregulation observed. In the case of cluster 11, the initial  $k_D$  increase would reflect the initial delay in RA increase compared to cluster 12 (Figure 12). Keeping in mind that clusters 11-16 include a majority of the genes analyzed in this study, the predicted mRNA stabilization effects resulting from their  $k_D$  values are in accordance with the general heat shock-induced mRNA stabilization predicted after the initial destabilization (Figure 1).

**Experimental Determination of mRNA Decay Rate Using the tet Promoter.** The predictions on mRNA stability kinetics as determined from the GRO analyses were

experimentally tested for some genes. For this purpose, promoters of the corresponding genes were substituted by the doxycycline-regulatable *tetO<sub>2</sub>* promoter, and mRNA decay rates were determined in such strains by measuring mRNA signal levels in Northern blots from samples taken after the addition of doxycycline. Previously, we had shown that the repression of *tet* promoters using the activator (tTA)-repressor (tetR-Ssn6) dual system takes place very shortly after the doxycycline addition (25). For each experiment, mRNA decay rate was determined just before the heat shock and at two different times after the shift, which were selected based on the kinetics of decay according the  $k_D$  values predicted by the mathematical algorithm for each particular gene.

Heat shock gene *HSP42* is in cluster 12 (Supplemental Table S2). TR and RA for this gene increase upon the stress, as determined in the GRO experiments. Nevertheless, whereas TR levels decrease to the original values 15 min later, RA values are maintained high steadily, until finally approaching the initial level at much later times (Supplemental Table S1). This behaviour points to a mRNA stabilization effect. We confirmed by Northern analyses that *HSP42* mRNA level peaked around 10 min after the heat shock to decrease at later times (Figure 4A, upper panel). Increase of TR precedes that of the mRNA, and it is mathematically predicted that *HSP42* mRNA molecules are transitory stabilized few minutes after the heat shock. In this way, the transitory and modest TR induction combined with the mRNA stabilization would lead to the increment in mRNA levels. We employed the *tetO-HSP42* construct to confirm the above predictions. The *HSP42* mRNA half-life was determined before the stress and at min 4 and 45 after it. As expected, initial mRNA decay rates followed first-order kinetics, and half-lives were calculated from the slopes of the log curves. From a half-life value of 6.4 min during exponential growth, this increased to 8.1 min after 4 min of applying the stress, to decrease to again to 6.4 min after 45 min (Figure 4A, lower panel). Although the increase in mRNA half life immediately after the stress was modest, the differences were reproducible between experiments. Therefore, *HSP42* mRNA became transiently stabilized relative to unstressed cells, confirming the mathematical predictions. Similar results were obtained when we experimentally determined half-lives of some other genes included in cluster 12, such as *ALD4* (data not shown).

*HSP12* and *HSP26* (cluster 11) were also analyzed because of their different behaviour from other heat shock genes such as *HSP42*. As occurs in genes from cluster 12, TR and RA in cluster 11 genes both increase after the heat shock, as showed the GRO experiment, but whereas high TR levels peak 10 min upon the stress to decrease slowly up to the original values, the RA increase is significantly delayed, pointing to an important mRNA destabilization at initial times. In fact, it is mathematically predicted for cluster 11 that averaged mRNA molecules are transitory destabilized early after heat shock (Figure 3). Northern analyses confirmed that *HSP12* mRNA levels peak between 20 and 30 min after the shock (Figure 4B, upper panel). The particular predicted  $k_D$  values for *HSP12* follow the general trend of cluster 11 (Supplemental Table S1). Our experimental data indicate a half-life of 9.5 min in unstressed cells, which decreases to 4.9 and 5.3 after 4 and 45 min at 37°C (Figure 4B, lower panel). Half-lives of exponentially-growing steady-state cells at 25°C or 37°C are 9.3 and 6.2 min respectively (not shown in detail). These results therefore confirm the GRO analyses predictions on differential mRNA stability behaviour among *HSP* genes upon heat shock, although in the case of *HSP12* mRNA destabilization is maintained upon the stress for longer than mathematically predicted. Similar results were obtained when the *HSP26* gene was analyzed (data not shown).

Many genes for RP and rRNA-processing proteins are grouped in clusters 3 and 4 (Supplemental Table S2), characterized by TR and RA downregulation. Northern analysis confirmed the downregulation of mRNA levels of a representative gene of cluster 4 such as *RPS6A* upon heat shock (Figure 4C, upper panel). The mathematical inference of  $k_D$  values predicts a destabilization of genes in both clusters 3 and 4 (Figure 3). Decay kinetics was determined experimentally, and showed that *RPS6A* mRNA drastically destabilized upon the stress, from an initial half-life value of 9.4 min in non-stressed cells to 3.8 and 4.3 min after 4 and 45 min after the shift respectively (Figure 4c, lower panel). The analysis of steady-state cells growing exponentially at 25°C and 37°C indicated half-lives of 9.0 and 4.2 min, respectively. The results confirmed experimentally that for *RPS6A* (and also for *RRP40*, data not shown) mRNA destabilization contributed together with TR downregulation to the observed decrease in mRNA levels upon the heat shock.

**Correlation between Transcription Parameters and Gene Function.** In general, functionally-related genes tend to share similar mRNA behaviour when cells are subjected to environmental changes (27, 28). Thus, levels of mRNAs for RP and for rRNA-processing proteins decrease upon heat shock (1). In addition, heat shock transiently increases the rate of decay of RP mRNAs, which account for the specific severe decline in RP synthesis under these conditions (29, 30). We used GRO kinetic data on the moderate heat shock response to corroborate and extend these previous studies to TR and decay analysis of mRNAs for RP and rRNA-processing proteins. For this purpose, 119 RP genes [most of them in cluster 3 (70%) and 4 (24%) in Figure 2] for which time course data existed from at least two independent GRO experiments were selected. The global result for the whole group of genes (mean values) is shown in Figure 5A, whereas Supplemental Table S3 lists the results for the individual genes. RP mRNA levels display a decline that begins 10 min after the temperature shift, exhibiting the lowest value (about 50% relative to untreated cells) after 25 min. TR levels, however, show an abrupt decrease in less than 5 min upon the stress, to reach values about 45% relative to unstressed cells. No recovery of both parameters was observed in the course of the experiment (Figure 5A). Mathematical  $k_D$  determination predicts destabilization of RP mRNAs from min 10 after the stress, with a peak at min 20 (Figure 5B), which would explain the strong mRNA decrease at late times. As above indicated, we have experimentally confirmed the destabilization for the *RPS6A* and *RRP40* mRNAs (cluster 4). We analyzed also the mRNAs for rRNA processing proteins, with data for 108 genes most of them in clusters 3, 4 and 10 (Supplemental Table S3). In this category, RA values decrease progressively after the heat shock up to min 25. In contrast, TR decreases abruptly immediately upon the stress, although less intensely than in the case of RP mRNAs (Figure 5A). mRNAs for the rRNA processing proteins are predicted to destabilize immediately after the shock up to min 20 (Figure 5B). Therefore, for both GO categories involved in ribosome biogenesis heat shock induces mRNA downregulation, although the several processes concerning RNA metabolism are affected at different extents. Overall, both TR and mRNA destabilization contribute to mRNA downregulation.

A shift to a relatively high temperature can damage protein structures leading to the accumulation of unfolded proteins. In turn, cells induce the heat shock response. As a part of such adaptive response, cells express chaperones (31), ubiquitin and certain ubiquitination enzymes (32), which helps to prevent accumulation of misfolded aggregated proteins (33, 34). We therefore analyzed the profile of 15 genes included in the GO category 'Proteasome core complex' and also 18 genes corresponding to the "Proteasome regulatory particle" category (Figure 6 and Supplemental Table S4). Nearly all the genes are distributed among clusters 11 and 12, indicating a regular transcriptional behaviour of proteasome components. For the two GO categories, GRO experiments show that TR levels (mean values) increase transiently after the heat shock (Figure 6A). This increase precedes that of mRNA levels (Figure 6A), which augment steadily along the experimental time course. Late mRNA stabilization, as mathematically predicted (Figure 6B, and Supplemental Table S4), would contribute to this observed mRNA accumulation up to late points. We conclude that upregulation of proteasomal genes is successively caused by increase of TR followed by mRNA stabilization.

Another important component of the heat shock response is the enhancement of the protein refolding pathway in order to reconstitute unfolded proteins. In this process some Hsps play an important role (35). We therefore analyzed our GRO data for the 67 genes of the 'Protein folding' GO category (Supplemental Table S5). A majority of these genes become upregulated for TR and/or RA upon the stress and are included in clusters 11 (23 genes) and 12 (16 genes) or dispersed between clusters 7 to 10 (18 genes). This distribution denotes a quite regular behaviour in this functional category. However, two markedly different patterns exist among the upregulated genes. In the genes of clusters 11 and 12, both TR and RA increase upon the heat shock, TR preceding RA increase (Figure 7A). TR upregulation in cluster 11 genes is more intense than in cluster 12, and this is paralleled by a more sustained RA upregulation in cluster 11. However, in both cases evolution of  $k_D$  values after the heat shock predict a mRNA stabilization effect along most of the time course (Figure 7B), which would contribute together with TR upregulation to RA increase for these protein folding genes. In contrast with the above pattern, a different behaviour is observed for protein folding genes in clusters 7 to 10 (Figure 7A). Such genes display a very modest increase of TR which is not paralleled by RA. This remains constant along the entire experiment, pointing to a sustained mRNA destabilization. In fact, predicted  $k_D$  values in such genes remain high and only tend to recover to basal levels at late times (Figure 7B). Therefore, two main groups of genes involved

in protein folding can be established depending on the intensity of its upregulation upon the heat shock, and differential mRNA stability effects contribute to such response divergences. As expected, most of the *HSP* genes involved in protein folding are in the upregulated group of genes (clusters 11 and 12). On the contrary, among the non-upregulated protein folding genes (Supplemental Table S5) are seven members of the *CTT* family, which code for a Ctt complex functionally related to the protein biosynthetic machinery (36), and also *PIH1* (ORF *YHR034c*), which is involved in pre-rRNA processing (37).

## DISCUSSION

In this work we have analyzed the effect of a moderate heat shock on different mRNA parameters at the whole genome level using the GRO approach. From the TR and RA experimental data, changes in mRNA stability during the stress have been inferred. Thus, a global trend for mRNA stabilization is predicted upon such stress, since a general increase of RA is observed to reach levels which are then maintained at late times. In parallel, only an initial transient increase on Pol II-mediated TR takes place immediately upon the stress. Therefore, mRNA stabilization effects seem likely to contribute to reach and maintain the increased global RA value during the time course of the experiments described here. These data contrast with the general destabilization behaviour predicted to take place as a part of the yeast response against a moderate oxidative stress (Molina *et al.*, 2008). However, when the TR and RA kinetics are studied individually and then grouped, a diversity of behaviours is observed which becomes reflected in the sixteen clusters shown in Fig. 2. Remarkably, almost half of the *S. cerevisiae* genes for which data have been obtained become grouped in two clusters (11 and 12). Since in both of them some mRNA stabilization effects are predicted, this is in accordance with the global stabilization of cellular mRNA. The concentration of a majority of genes in a small number of clusters was not so evident in the previous GRO study on the oxidative stress response (Molina), in which case the number of clusters was also larger. Therefore, *S. cerevisiae* cells display a more homogeneous response in the case of thermal stress than upon oxidative stress.

Among the genes for which an accumulation of mRNA results from heat shock (clusters 11-16), different TR kinetics are observed. Thus, the small number of genes included in clusters 15 and 16 displays stable or decreased TR, indicating that RA upregulation results exclusively from mRNA stabilization effects. This is a situation that would have remained unnoticed in standard DNA microarray analyses. Remarkable stabilization is also predicted for cluster 14 genes, for which RA upregulation (about 4 or 5-fold) is much more intense than the moderate TR upregulation. Therefore, in this case the heat shock response seems to be contributed both by mRNA transcription and stabilization effects. Clusters 11 to 13 include about half of the studied genes, and in all three clusters, the increase of RA is accompanied by a more or less sustained TR upregulation. In these clusters, the heat shock response would also be contributed by mRNA stabilization effects, in spite of an initial transitory mRNA destabilization predicted for cluster 11 genes. Proteasome function genes are mostly included in clusters 11 and 12, and specific analysis of their RA, TR and  $k_D$  parameters reinforces the role of both TR and mRNA stability in modulating the protein degradation machinery for eliminating heat-damaged proteins. Interestingly, other GO categories involving endoplasmic reticulum, electron transport or transcription functions are also significantly overrepresented in one of clusters 11 to 13 for which the mentioned two aspects contribute to RA upregulation. This would also be the case for 39 genes of the GO category "Protein folding" (including a number of heat shock protein genes), which are distributed among clusters 11 and 12. The importance of these gene functions for restoring protein functionality upon heat shock explains the corresponding RA upregulation observed in other genomic analyses (1, 5), although the present study emphasizes the importance of mRNA stabilization in such stress response, at least at medium and late times.

Cluster 1 and 2 constitute other examples of genes for which TR kinetics is not paralleled by RA changes. In this case, RA values remain basically stable upon the heat shock while TR decreases after an initial moderate upregulation. Therefore, conventional DNA microarray experiments would be also unable to reveal the predictable mRNA stabilization effects modulating the heat shock response.

Contrasting with the global trend for mRNA stabilization, several groups of genes (clusters 3-10) are predicted to destabilize their mRNAs after heat shock. Clusters 3 to 6 (675 genes) display a RA decrease likely due to a combination of TR downregulation and mRNA

decay effects. Ribosomal structure and biogenesis categories are overrepresented in some of these clusters. This response is common with oxidative stress (Molina), concluding that in both stresses the downregulation of the expression of ribosome-related genes and the subsequent inhibition of protein synthesis following the stress results from additive contribution of inhibition of transcription and increased mRNA decay. Other genes involved in energy obtention (GO category “Carboxylic acid metabolism”) and amino acid metabolism would follow a similar trend, again emphasizing that mRNA destabilization effects contribute to the temporary metabolic downregulation occurring upon heat shock. It should be noted that this downregulation is not paralleled by phenotypic effects on growth rate.

Clusters 7 to 10 show divergent effects concerning the RA and TR parameters, as the more or less sustained TR upregulation is not paralleled by RA increase, which points to strong mRNA destabilization effects. Similar behaviour has been observed for some groups of genes upon oxidative stress (4). In the case of heat shock, genes of the GO category “Hydrogen-transporting ATP synthase activity” are overrepresented in cluster 7. Thus, mRNA destabilization effects may be relevant to limit H<sup>+</sup>-ATPase activity, thereby limiting ATP consumption and favoring energy conservation for further stress responses. Consistently, one heat shock protein, Hsp30, is a negative regulator of H<sup>+</sup>-ATPase activity (39). A second overrepresented GO category in such group of clusters is “Chaperonin-containing T-complex”, which includes the Cct proteins. Several studies have suggested that the Cct proteins may play a protecting role on nascent polypeptide chains after emerging from the ribosome (36, 39, 40), pointing to its possible involvement in the protein synthesis machinery. Their presence in cluster 10 would be in accordance with the protein synthesis block upon the stress.

## REFERENCES

1. Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241-4257
2. Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., and Young, R.A. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 323-337
3. Pérez-Ortín, J.E., Alepuz, P., and Moreno, J. (2007) *Trends Genet.* **23**, 250-257.
4. Molina-Navarro, M.M., Castells-Roca, L., Bellí, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E., and Herrero, E. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 17908-17918
5. Trott, A., and Morano, K.A. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P.W.H., eds) Vol. 1, pp. 71-119, Springer-Verlag Berlin
6. Hahn, J.S., and Thiele, D.J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5169-5176
7. Yamamoto, A., Ueda, J., Yamamoto, N., Hashikawa, N., and Sakurai, H. (2007) *Eukaryot. Cell* **6**, 1373-1379
8. Estruch, F. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 469-486
9. Yamamoto, N., Maeda, Y., Ikeda, A., and Sakurai, H. (2008) *Eukaryot. Cell* **7**, 783-790
10. Liu, Y., and Chang, A. (2008) *EMBO J.* **27**, 1049-1059
11. Hahn, J.S., Hu, Z., Thiele, D.J., and Iyer, V.R. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5249-5256.
12. Hahn, J.S., Neef, D.W., and Thiele, D.J. (2006) *Mol. Microbiol.* **60**, 240-251
13. Mannhaupt, G., Schnall, R., Karpov, V., Vetter, I., and Feldmann, H. (1999) *FEBS Lett.* **450**, 27-34
14. Shivaswamy, S., and Iyer, V.R. (2008) *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2221-2234
15. Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E. and Alepuz, P. (2009) *RNA* **15**, 1110-1120
16. Pérez-Ortín, J.E. (2008) *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **6**, 282-291
17. García-Martínez, J., Aranda, A., and Pérez-Ortín, J.E. (2004) *Mol. Cell* **15**, 303-313
18. Shalem, O., Dahan, O., Levo, M., Rodríguez-Martínez, M., Furman, I., Segal, E., and Pilpel, Y. (2008) *Mol. Syst. Biol.* **4**, 223
19. Molin, C., Jauhainen, A., Warringer, J., Nerman, O., and Sunnerhagen, P. (2009) *RNA* **15**, 600-614
20. Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Yeast* **14**, 1127-1138
21. Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) *Yeast* **13**, 837-848
22. Sherman, F. (2002) *Methods Enzymol.* **350**, 3-41
23. Abbondanzieri, E.A., Shaevitz, J.W., and Block, S.M. (2005) *Biophys. J.* **89**, L61-L63
24. Mejia, Y.X., Mao, H., Forde, N.R., and Bustamante, C. (2008) *J. Mol. Biol.* **382**, 628-637
25. Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 942-947



## Articles

26. Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburne, M., and Singer, R.A. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1034-1041
27. Wu, L.F., Hughes, T.R., Davierwala, A.P., Robinson, M.D., Stoughton, R., and Altschuler, S.J. (2002) *Nat. Genet.* **31**, 255-265
28. Gash, A.P. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P.W.H., eds) Vol. 1, pp. 11-70, Springer-Verlag, Berlin
29. Herreur, M.H., Mager, W.H., Raué, H.A., Vreken, P., Wilms, E., and Planta, R.J. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 7917-7929
30. Li, B., Nierras, C.R., and Warner, J.R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5393-5404
31. Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) *Science* **295**, 1852-1858
32. Jentsch, S., and Schlenker, S. (1995) *Cell* **82**, 881-884.
33. Goldberg, A.L. (2003) *Nature.* **426**, 895–899
34. Medicherla, B. and Goldberg, A.L. (2008) *J. Cell Biol.* **182**, 663-673
35. Riezman, H. (2004) *Cell Cycle* **3**, 61-63
36. Etchells SA, Meyer AS, Yam AY, Roobol A, Miao Y, Shao Y, Carden MJ, Skach WR, Frydman J, and Johnson AE. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 28118-28126
37. Gonzales, F.A., Zanchin, N.I.T., Luz, J.S., and Oliveira, C.C. (2005) *J. Mol. Biol.* **346**, 437-455
38. Piper, P.W., Ortiz-Calderon, C., Holyoak, C., Coote, P., and Cole, M. (1997) *Cell Stress Chaper.* **2**, 12-24
39. McCallum, C.D., Do, H., Johnson, A.E., and Frydman, J. (2000) *J. Cell Biol.* **149**, 591-601
40. Kabir, M.A., and Sherman, F. (2008) *FEMS Yeast Res.* **8**, 1236-1244

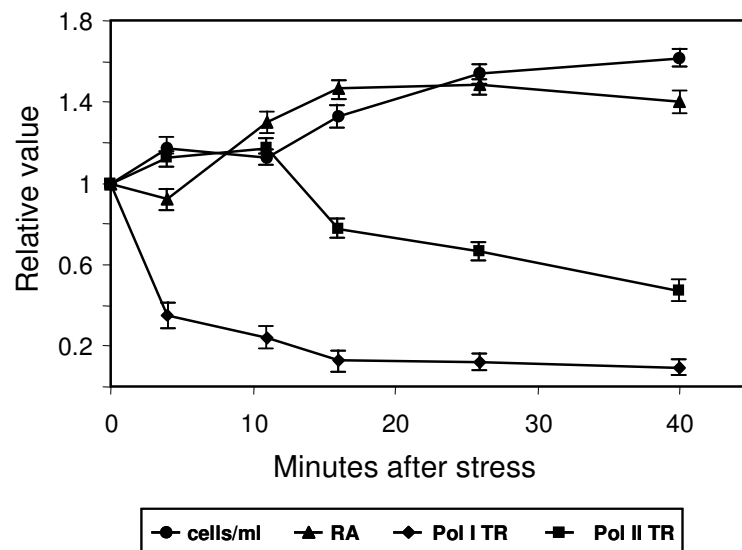


FIGURE 1. **Time course of the heat shock experiment.** At time 0, cells growing exponentially at 25°C were shifted to 37°C. At the indicated times, aliquots were taken to measure cell concentration, total mRNA per cells (RA) and Pol I and Pol II transcription rate (TR) per cells (see “Experimental Procedures”). The parameters were referred to the respective time 0 values. *Bars*: standard deviation (n = 3).

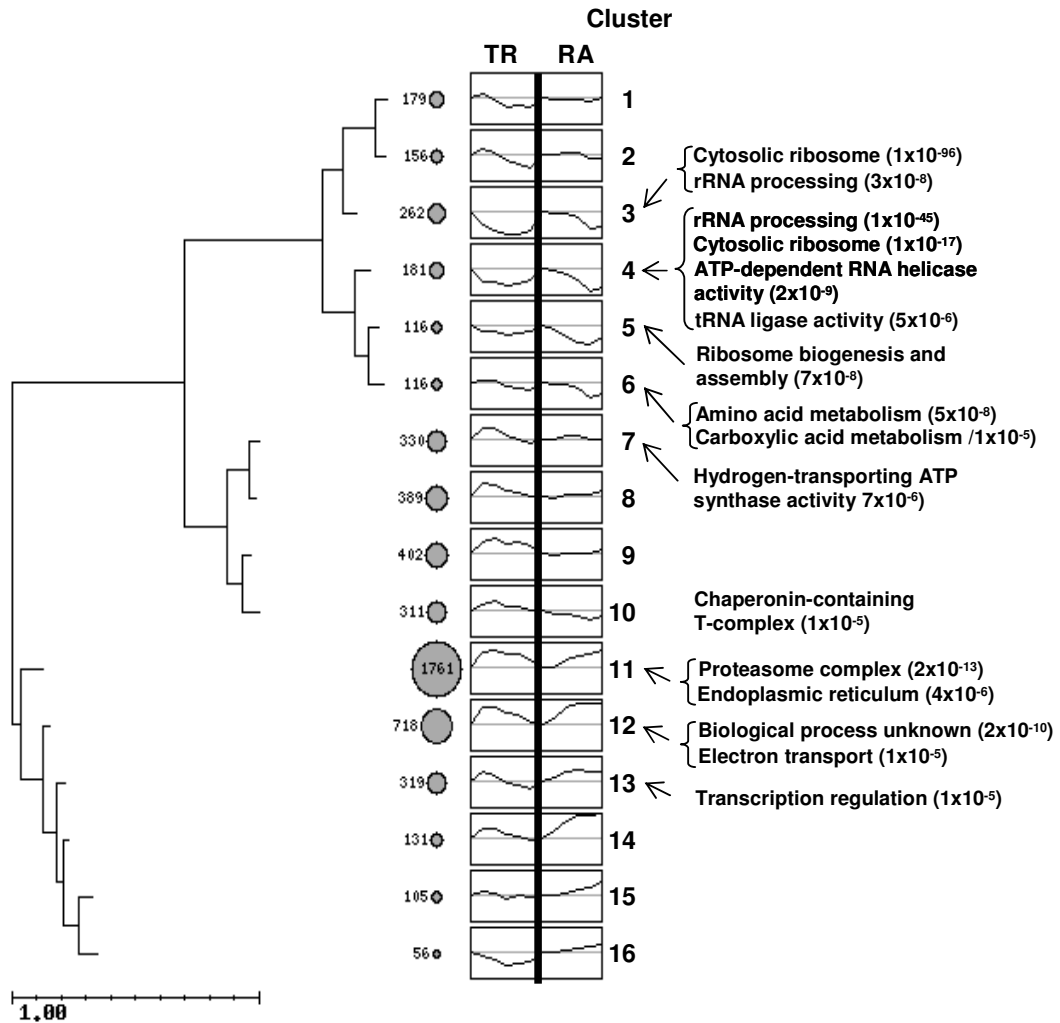
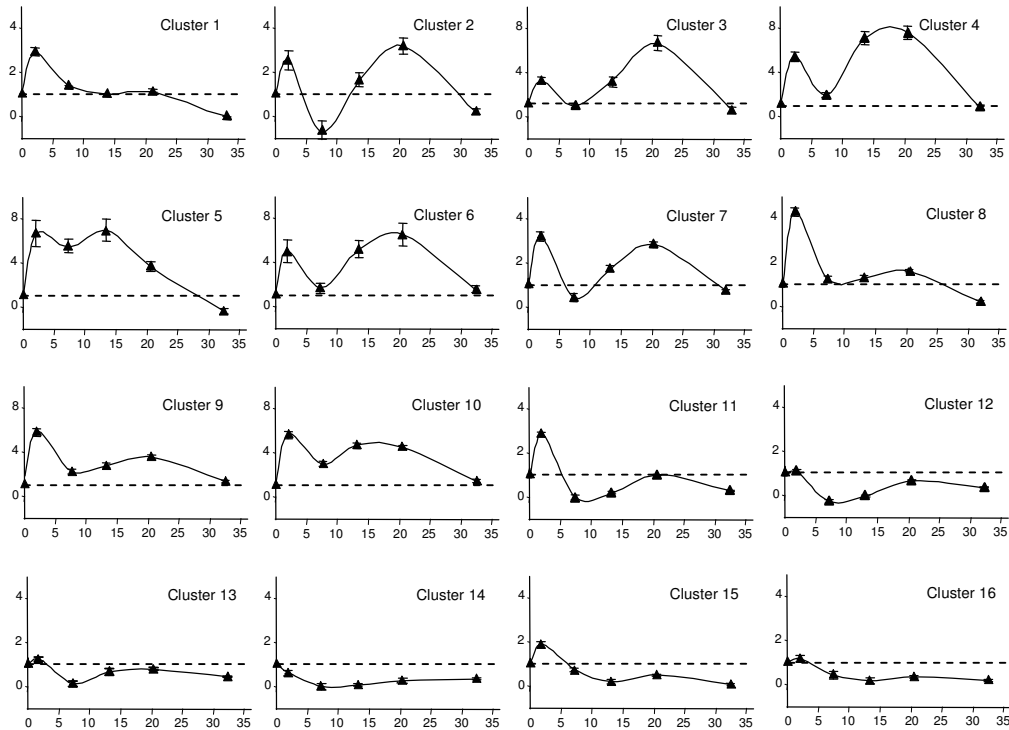
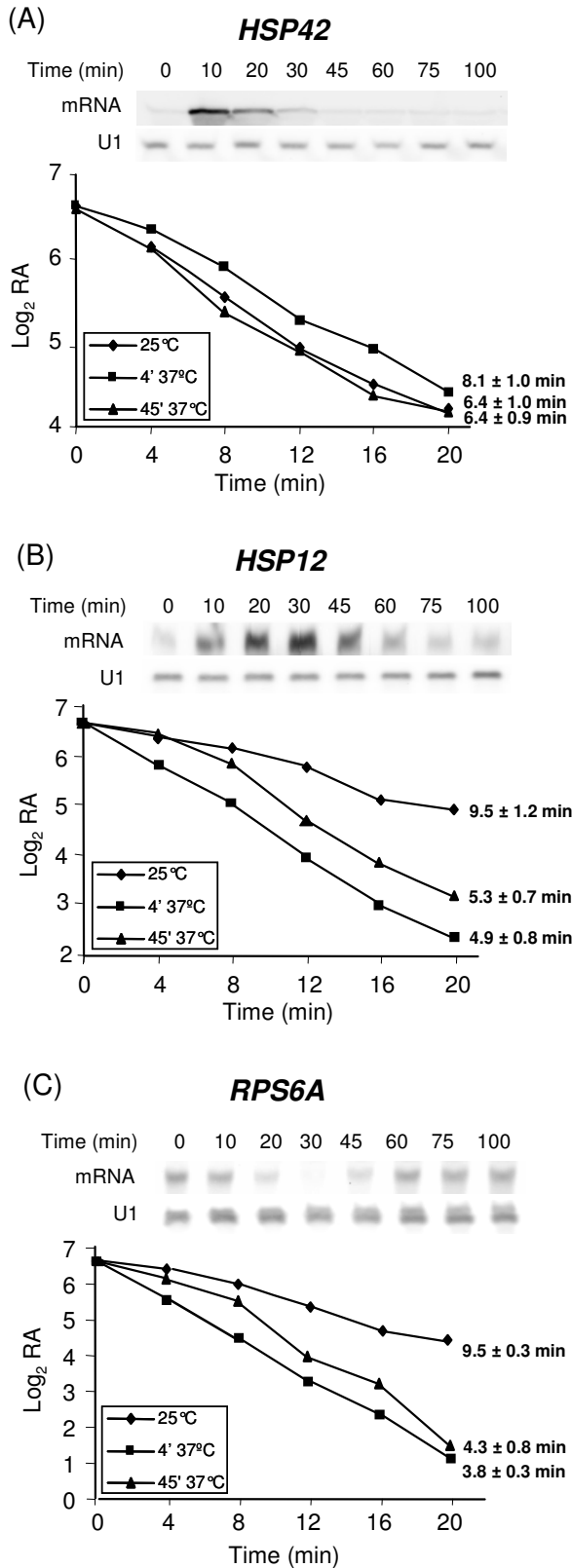


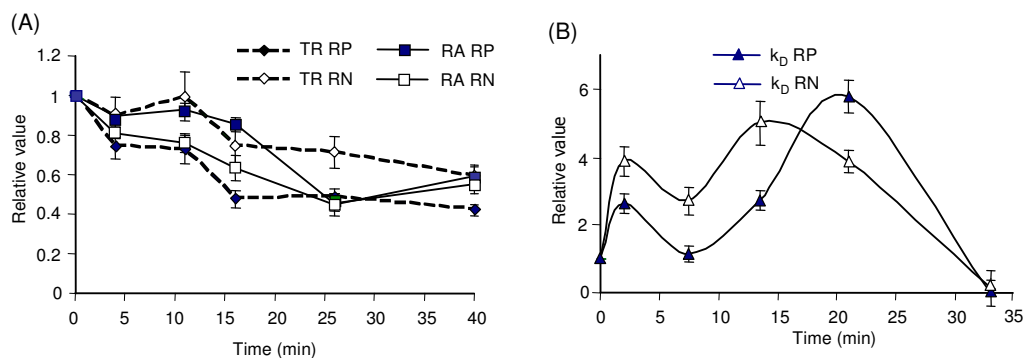
FIGURE 2. **Clustering of TR and RA data.** Time course profiles for both parameters were considered for clustering. Both data set series are given relative to time 0 to allow comparison between TR and RA data. The discontinuation between the last TR point and the time 0 RA value has no real meaning and is represented as a *vertical black bar*. For each cluster in the tree, the number of genes included and the data profiles are indicated. Ordinates are in log scale, and the *horizontal line* in each graph marks the time 0 level. The most significant GO categories ( $p$  value  $\leq 10^{-5}$ ) are shown. Individual data for each gene and the list of genes in each cluster can be seen in supplemental Tables S1 and S2 respectively. The *scale bar* in the *lower left side* reflects the distances between the cluster profiles.



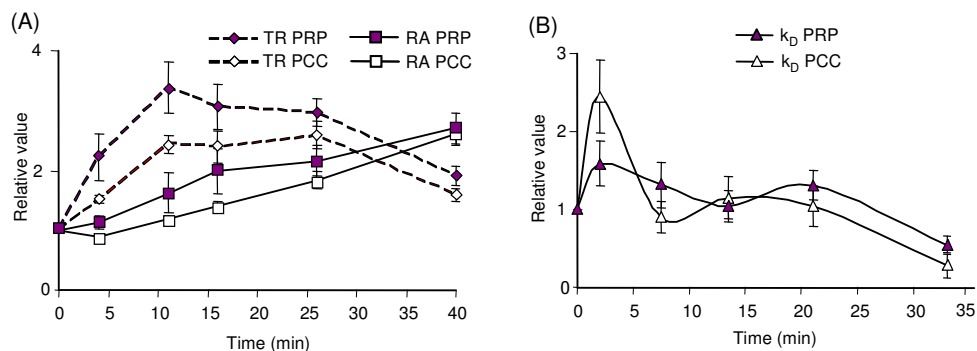
**FIGURE 3. Predicted stability of the mRNAs of the different gene clusters upon heat shock.**  $k_D$  values are represented in the y axis as a function of time (min) in the x axis (shift from 25 to 37°C at time 0). The graphics represent the mean  $k_D$  value corresponding to all the genes in the indicated cluster in relative units referred to the mean  $k_D$  value at time 0. The *horizontal line* marks the unit level. *Bars* represent the standard error for each time point. Note that two different  $k_D$  scales are employed depending on the cluster.



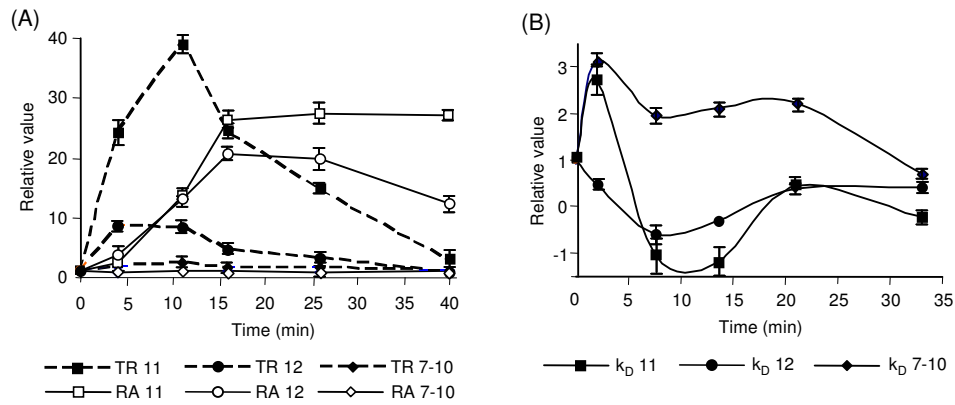
**FIGURE 4. Experimental determination of mRNA half-lives before and after heat shock.** Strains expressed *HSP42* (A, strain MML980), *HSP12* (B, strain MML987), or *RPS6A* (C, strain MML896) under the control of the *tetO<sub>2</sub>* promoter. Doxycycline (5 µg/ml) was added at time 0 to: cultures growing exponentially at 25°C, or cultures 4 and 45 min after being shifted to 37°C. In each case, aliquots were taken at time 0 and at successive times after the addition of doxycycline, for total mRNA isolation and determination of levels of the corresponding mRNA by Northern analysis. Graphics represent the evolution of experimentally determined relative RA in log scale as a function of time for a representative experiment. Mean half-life values plus standard deviation for a total of three independent experiments are also indicated. To determine these values, linear regression of experimental data was calculated, considering only the initial points for which linearity was maintained. The *upper panels* show Northern analyses of RA expressed under the respective own promoters in wild type W303-1A cells that were growing at 25°C, after being shifted at time 0 to 37°C. U1 is included as loading control.



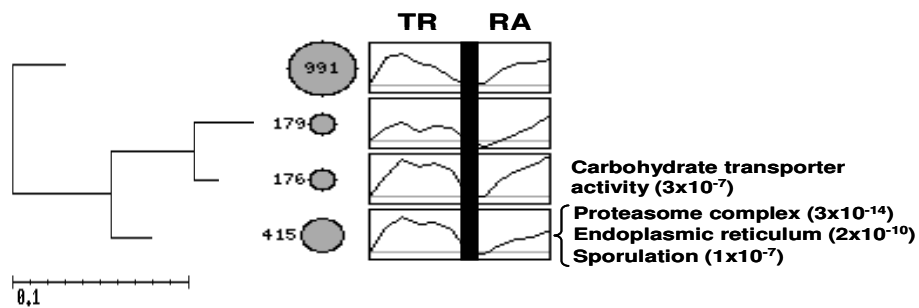
**FIGURE 5. TR and RA (A) and  $k_D$  (B) values of ribosomal protein (RP) and rRNA-processing (RN) genes after heat shock.** Genes in the GO categories “Ribosomal protein” and “rRNA processing” (listed in supplemental Table S3) were considered for analysis independently of the clusters in which they were included. Mean values for the three parameters and the two categories were calculated and plotted as a function of time after the heat shock from 25 to 37°C. In the graphics the values are represented relative to the mean value at time 0. Bars indicate the standard error for each time point.



**FIGURE 6. TR and RA (A) and  $k_D$  (B) values of proteasome core complex (PCC) and proteasome regulatory particle (PRP) genes after heat shock.** Genes in the GO categories “Proteasome core complex” and “Proteasome regulatory particle” (listed in supplemental Table S4) were considered for analysis independently of the clusters in which they were included. Mean values for the three parameters and the two categories were calculated and plotted as a function of time after the heat shock from 25 to 37°C. In the graphics the values are represented relative to the mean value at time 0. Bars indicate the standard error for each time point.



**FIGURE 7. TR and RA (A) and  $k_D$  (B) values of protein folding genes after heat shock.** Genes in the GO category “Protein folding” (listed in supplemental Table S5) were considered for analysis, after being subdivided between those in clusters 7-10, 11 or 12. Mean values for the three parameters were calculated and plotted as a function of time after the heat shock from 25 to 37°C. In the graphics the values are represented relative to the mean value at time 0. Bars indicate the standard error for each time point.



**FIGURE S1. Partition of genes in cluster 11 based on TR and RA kinetics.** Genes in cluster 11 of Figure 2 (listed in supplemental Table S2) were partitioned into subclusters using the same criteria as for the general clustering analysis. See legend of Figure 2 for details on the representation. The most significant GO categories in each resulting group ( $p$  value  $\leq 10^{-5}$ ) are shown at right.

# Comprehensive Transcriptional Analysis of the Oxidative Response in Yeast<sup>\*[S]♦</sup>

Received for publication, January 11, 2008, and in revised form, March 19, 2008. Published, JBC Papers in Press, April 17, 2008, DOI 10.1074/jbc.M800295200

María Micaela Molina-Navarro<sup>‡1</sup>, Laia Castells-Roca<sup>‡1</sup>, Gemma Bellí<sup>‡</sup>, José García-Martínez<sup>§</sup>, Julia Marín-Navarro<sup>¶</sup>, Joaquín Moreno<sup>¶</sup>, José E. Pérez-Ortín<sup>¶2</sup>, and Enrique Herrero<sup>‡2,3</sup>

From the <sup>‡</sup>Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques and IRBLleida, Universitat de Lleida, Montserrat Roig 2, 25008-Lleida and the <sup>§</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas and <sup>¶</sup>Sección de Chips de DNA-Servicio Central de Ayuda a la Investigación Experimental, Universitat de València, 46100-Burjassot Valencia, Spain

The oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae* has been analyzed by parallel determination of mRNA levels and transcription rates for the entire genome. A mathematical algorithm has been adapted for a dynamic situation such as the response to stress, to calculate theoretical mRNA decay rates from the experimental data. Yeast genes have been grouped into 25 clusters according to mRNA level and transcription rate kinetics, and average mRNA decay rates have been calculated for each cluster. In most of the genes, changes in one or both experimentally determined parameters occur during the stress response. 24% of the genes are transcriptionally induced without an increase in mRNA levels. The lack of parallelism between the evolution of the mRNA amount and transcription rate predicts changes in mRNA stability during stress. Genes for ribosomal proteins and rRNA processing enzymes are abundant among those whose mRNAs are predicted to destabilize. The number of genes whose mRNAs are predicted to stabilize is lower, although some protein folding or proteasomal genes are among the latter. We have confirmed the mathematical predictions for several genes pertaining to different clusters by experimentally determining mRNA decay rates using the regulatable *tetO* promoter in transcriptional expression conditions not affected by the oxidative stress. This study indicates that the oxidative stress response in yeast cells is not only conditioned by gene transcription but also by the mRNA decay dynamics and that this complex response may be particularly relevant to explain the temporary down-regulation of protein synthesis occurring during stress.

Cells react against environmental stresses through multiple responses that occur at transcriptional and post-transcriptional

levels to adapt themselves to the new conditions and counteract the possible macromolecular damage caused by the stress situation. Most systematic studies on such responses focus on changes in mRNA amounts (mRNA amount or concentration (*i.e.* amount per cell), indicated as RA) caused by the environmental stress, using the DNA array technology. In the case of *Saccharomyces cerevisiae*, transcriptome analyses have been reported for a number of stresses including oxidative, osmotic, and nutritional ones in addition to heat shock (1, 2). Levels of a particular mRNA at a given time are the result of a balance between transcription rate (TR)<sup>4</sup> and decay rate (commonly expressed as a half-life, or as a first-order kinetic constant of degradation,  $k_D$ ) (3). It is usually assumed that TR driven by specific transcriptional regulators plays the major role in the stress response. However, decay rate may change after the onset of an environmental stress and, in that instance, profiles of individual mRNAs may not directly reflect the corresponding TR profiles. We have developed a genomic run-on (GRO) methodology that allows quantifying TR and RA for each individual gene at a genomic scale (4). Moreover, mRNA half-lives can be obtained from TR and RA data under steady-state conditions. When applied to a nutritional shift from glucose to galactose, the GRO methodology showed that TR was the main determinant of RA, although some groups of genes were modulated at the mRNA decay level (4). More recently, we have developed a mathematical algorithm to determine mRNA half-life values from pointwise measurements of TR and RA in dynamic situations after the onset of an environmental stress when steady-state conditions cannot be assumed (3). Other groups have applied nuclear run-on approaches to culture cells. Fan *et al.* (5) determined RA and TR levels in human H1299 cells for about 1000 genes under non-stress and stress conditions, from which they inferred information on mRNA decay as well. Tennebaum *et al.* (6) developed the protocol “en masse run-on assay” in which the run-on profiling is combined with ribonomic profiling. Ribonomics is a term that defines the use of immunoprecipitated mRNP complexes to analyze the representation of individual mRNA species associated with a particular RNA-binding protein. The analyses of both kinds of data have led to the proposal that “post-transcriptional operons” (7) or “decay

\* This work was supported by Grants BFU2004-03167 and CSD2007-0020 (from the Ministerio de Educación y Ciencia) and 20055GR-00677 (from the Generalitat de Catalunya) (to E.H.) and BFU2006-15446-CO3-02 and BFU2007-67575-CO3-01/BMC (from the Ministerio de Educación y Ciencia) (to J. E. P.-O.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

♦ This article was selected as a Paper of the Week.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains seven supplemental tables.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to the paper.

<sup>2</sup> Both authors contributed equally to the senior authorship of this work.

<sup>3</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-973-702409; Fax: 34-973-702426; E-mail: enric.herrero@cmb.udl.cat.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: TR, transcription rate; pol I, RNA polymerase I; pol II, RNA polymerase II; GRO, genomic run-on; UTR, untranslated region; t-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; RP, ribosomal proteins; GO, Gene Ontology.



regulons" (8) work in the control of eukaryotic gene expression. Decay of eukaryotic mRNA molecules may occur through different pathways (9–14). Two general mechanisms operate in *S. cerevisiae*: deadenylation of the 3'-poly(A) tail followed by 3'-5' degradation of the mRNA by the exonucleolytic activity of the exosome or initial removal of the poly(A) tail followed by mRNA hydrolysis by the 5'-3'-exonuclease Xrn1.

*S. cerevisiae* is the first eukaryotic organism in which whole-genome studies have been done on mRNA stability in steady-state exponential growth conditions during glucose fermentation. In a first study (8), a temperature-sensitive RNA polymerase II (pol II) mutant was employed to switch off transcription and follow up mRNA levels at successive times for each transcript. In a second study (15), several chemical inhibitors of transcription were employed for the same purpose. Both studies showed that mRNA half-lives varied between a few minutes and more than 1 h and that mRNAs for proteins involved in ribosome biogenesis and rRNA processing were relatively unstable. A general correlation was also found between mRNA decay rates and the physiological function of the gene products (8). However, the experimental conditions employed for switching off transcription in the above studies caused a stress situation *per se* in yeast cells, which discards using a similar approach for analyzing mRNA kinetics after an experimentally induced stress (16).

Oxidative stress by external agents causes a transcriptional response in *S. cerevisiae* that involves a large number of genes (1), with the participation of the general stress response factor Msn2/4p and the oxidative stress-specific transcription factors Yap1 and Skn7 (17). Exposure of yeast cells to hydrogen peroxide results in increased levels of antioxidant proteins, heat shock proteins, components of the protein degradation machinery, and enzymes of the pentose phosphate pathway, which provides NADPH for some of the antioxidant systems (18, 19). In parallel, there is a down-regulation of the protein translation apparatus. This proteome pattern, although limited to about 20% of all expressed proteins in yeast cells, approximately parallels the transcriptome pattern (1), which indicates that the oxidative stress response mainly occurs through regulation of mRNA level. However, recent studies demonstrate that inhibition of protein synthesis occurring after an oxidative stress is not only caused by transcriptional down-regulation of the translation machinery but also by inhibition of translation initiation due to dissociation of ribosomes from mRNA and a slower rate of ribosomal runoff along mRNA molecules (20, 21). This illustrates the importance of the post-transcriptional level of regulation (22), which may also involve the regulation of mRNA translation efficiency by 3'-AU-rich elements, as is the case of the *MFA2* mRNA in *S. cerevisiae* (23). The oxidative stress response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* is in part regulated by the stabilization of *atf1*<sup>+</sup> mRNA mediated by the RNA-binding protein Csx1 and Upf1 (24, 25). The latter is a component of the nonsense codon-mediated mRNA decay system. Atf1 is a transcription factor that coordinates the expression of many stress response genes and itself is under regulation of the Sty1 mitogen-activated protein kinase pathway (26).

The above studies in yeast cells leave unanswered the specific role of TR and mRNA decay in establishing new mRNA levels as

a response to an oxidative stress. Here, we employ the GRO methodology to measure changes in TR and RA at a whole-genome level at different times after imposing an oxidative stress on yeast cells, and then we infer the evolution of mRNA half-lives after such a stress. Messenger RNA decay rates are validated for some genes whose expression becomes driven by the doxycycline-regulated *tet* promoter (27, 28), in conditions that do not cause an additional stress to yeast cells. Results indicate that for some functional groups of genes, changes in mRNA decay rates play an important role in the adaptation to oxidative stress.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Strains and Growth Conditions**—Wild type *S. cerevisiae* W303-1A (*MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp-11 his3-11,15*) was employed in the GRO experiments. MML830 is a derivative of the above strain by integration of EcoRV-linearized pCM244 (27). This plasmid codes for the tetR'-Ssn6 protein, which acts as repressor on *tetO* promoters after activation by doxycycline. The promoter-substitution cassette from plasmid pCM224 was employed for replacing the endogenous promoters of several genes in MML830 by the *tetO*<sub>2</sub> promoter, as described in Ref. 28. The resulting strains are: MML863 (*tetO*<sub>2</sub>-*HSP104*), MML957 (*tetO*<sub>2</sub>-*RRP40*), MML980 (*tetO*<sub>2</sub>-*HSP42*), and MML990 (*tetO*<sub>2</sub>-*FIT3*). In these strains, the gene expression driven by *tetO*<sub>2</sub> is up-regulated in the absence of doxycycline, whereas the addition of the antibiotic represses it (27).

Cells were grown in YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 28 °C. Doxycycline at 5 μg/ml was added for repressing genes under the *tetO*<sub>2</sub> promoter. Oxidative stress conditions were created by the addition of *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) at 0.1 mM. Experiments were initiated on exponential cultures that had been grown in such conditions for at least 10 generations, at concentrations of 1.5–2 × 10<sup>7</sup> cells/ml.

**Genomic Run-on**—Exponential cultures in 800 ml of YPD medium in 2-liter flasks shaken at 120 rpm were employed. Cell samples were taken at different times: *t*<sub>0</sub> (exponential growth in YPD medium, just before *t*-BOOH addition), *t*<sub>1</sub>, *t*<sub>2</sub>, *t*<sub>3</sub>, *t*<sub>4</sub>, and *t*<sub>5</sub>, corresponding to 7, 16, 26, 41, and 71 min, respectively, after the application of the oxidative stress. At every sampling time, two different aliquots were taken. One of them was immediately processed to measure TR, according to the GRO protocol (see below). Cells from the second aliquot were recovered, washed with cold distilled water, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until used for mRNA measurement.

The GRO protocol described previously (4) was used with the following modifications. Around 6 × 10<sup>8</sup> yeast cells were used to perform *in vivo* transcription. After spinning down cells, they were washed in cold water, and the cell pellet was resuspended in 900 μl of sterile cold water (final volume 950 μl). Then, the cell suspension was transferred to a fresh microcentrifuge tube, 50 μl of 10% *N*-lauryl sarcosine sodium sulfate (sarkosyl) were added, and cells were incubated for 20 min on ice. After the permeabilization step, cells were recovered by low speed centrifugation, and the supernatant was removed. *In vivo* transcription was performed by resuspending cells in 120 μl of 2.5× transcription buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 500 mM KCl, 80 mM MgCl<sub>2</sub>), 16 μl of AGC mix (10 mM each of CTP,

## mRNA Synthesis and Decay during the Yeast Oxidative Response

ATP, and GTP), 6  $\mu\text{l}$  of dithiothreitol (0.1 M), and 13  $\mu\text{l}$  of [ $\alpha$ - $^{33}\text{P}$ ]UTP (3000 Ci/mmol, 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ). Cells were maintained on ice at all times. The final volume was adjusted to 300  $\mu\text{l}$  with distilled water, and the mix was incubated for 5 min at 30  $^{\circ}\text{C}$  to allow transcription elongation. The reaction was stopped by adding 1 ml of cold distilled water to the mix. Cells were recovered by centrifugation to remove the non-incorporated radioactive nucleotide.

Total RNA was isolated using the Fast-Prep device (Bio101 Inc.) as described (4) except that acid phenol-chloroform (5:1) was used during cell breakage. Total extracted RNA was spectrophotometrically quantified. An aliquot was used for specific radioactivity determination in a scintillation counter. All the *in vivo* labeled RNA was used for hybridization.

Nylon filters made using PCR-amplified whole open reading frame sequences as probes (29) were used as described (4) except that hybridizations were conducted during 40–48 h. Filters were exposed for 5–7 days to an imaging plate (BAS-MP, FujiFilm), which was read in a phosphorimaging scanner (FLA-3000, FujiFilm).

**Measurement of RNA Levels**—As mentioned above, a second cell aliquot was taken at each sampling time and immediately frozen with liquid nitrogen. After thawing the samples on ice, total RNA was isolated following the same procedure described for GRO samples except that RNA was precipitated once with 1 volume of 5 M LiCl, washed with 70% ethanol, resuspended in distilled water, and reprecipitated with 0.1 volume of 3 M NaAcO and 2 volumes of cold 96% ethanol. Again, RNA yield was measured spectrophotometrically. About 30–40  $\mu\text{g}$  of DNA-digested total RNA were reverse-transcribed into cDNA as described (4) but using Invitrogen random hexamers for random priming. Hybridization was done in the same conditions as described for the GRO experiment except that labeled cDNA was at  $5 \times 10^6$  dpm/ml and that filters were exposed for 1–2 days to an imaging plate.

**Estimation of Total RNA and mRNA**—To facilitate further normalizations, we estimated the RNA amount obtained from a fixed amount of cells along the experiment. Thus, five different cell aliquots were taken at each of the six sampling times ( $t_0$ – $t_5$ ) from a mock experiment. Total RNA was extracted, using the same protocol described previously, and quantified. Poly(A) mRNA was estimated using a dot-blot procedure as described (4). Using these data, we calculated the proportion of poly(A) mRNA per  $\mu\text{g}$  of total RNA and, thus, per cell at each of the time points ( $t_0$ – $t_5$ , see Fig. 1).

**Quantification of Hybridization Signals and Normalization Procedures**—A total of six different nylon filters (one for each sampling time) were used. Filter combinations for the different hybridizations and replicates and image quantification were performed as described in Ref. 4. cDNA hybridizations were normalized within each experiment replicate by the global mean procedure. Correction factor to normalize between experiments was calculated from global mean values for the  $t_0$  sampling times. Reproducibility of the replicates was tested by the ArrayStat software (Imaging Research, Inc.), considering the data as independent and allowing the program to take a minimum number of valid replicates of 2 to calculate the mean values for every gene (only one of the three replicates is allowed

to be a removable outlier). Average cDNA values for each gene were finally corrected by the percentage of guanine residues in each probe-coding strand. Normalization between sampling points was made using the amount of mRNA/cell to give values of mRNA copies/cell for each gene in every time point. These values were used for cluster analysis and comparisons.

For normalizing the GRO hybridizations a different strategy was followed. First, we measured the total transcription per cell by using total dpm measured after extraction of the *in vivo* radioactively labeled RNA. The quantification of the extracted RNA allowed us to estimate the total transcription per cell. For each time point, we estimated  $\text{TR}_I$  (TR of pol I) by summing up the 16 signals from the specific probes (eight for 18 S and eight for 25 S regions) and  $\text{TR}_{II}$  (TR of pol II) by summing up the whole set of signals (5950 pol II probes) in every hybridization. Since it is known that at  $t_0$  (exponential growth in YPD), the ratio between  $\text{TR}_I$  and  $\text{TR}_{II}$  is about 2 (30) and that the estimated total transcription is, roughly, the sum of the contribution of these two polymerases, it is possible to determine the correction factor that fulfills these conditions. This factor was applied to the polymerase raw ratios for every sampling point. This allowed us to normalize the raw hybridization signals obtained for the RNA pol II probes. Statistical validation of replicates was performed as in cDNA values. After that, average TR values for each gene were finally corrected by the percentage of uracil residues present in each probe-coding strand. Again, the corrected average values were used for gene cluster analysis and other calculations.

**Northern Blot Studies**—RNA electrophoresis, probe labeling with digoxigenin, hybridization, and signal detection were done as described previously (27). Signals were quantified using the Lumi-Imager equipment (Roche Applied Science) software. Background values were determined for a region lacking visible signal, of the same size as the measured band and adjacent to it, and such background was subtracted for the respective band signal value.

**$k_D$  Calculations and Gene Classification According to Their Deviation from Constant Stability**—RAs were assumed to be at a steady state at the onset of stress. Therefore, the initial (steady-state)  $k_D$  was calculated as the ratio of TR to RA values determined at time 0. After the onset of stress, under (presumably) non-steady-state conditions, the decay rates were inferred from the experimental values of TR and RA supplied by the GRO technique along the time course. Assuming a linear variation of TR in between experimentally determined values, the following relation between TR, RA, and  $k_D$  has been demonstrated to hold (3)

$$\left[ \frac{(\text{TR}_2 - \text{TR}_1)}{(t_2 - t_1)} \right] - \text{TR}_2 \cdot k_D + \text{RA}_2 \cdot k_D^2 = \left[ \frac{(\text{TR}_2 - \text{TR}_1)}{(t_2 - t_1)} \right] - \text{TR}_1 \cdot k_D + \text{RA}_1 \cdot k_D^2 \cdot \exp \left[ -k_D \cdot (t_2 - t_1) \right] \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $\text{TR}_1$ ,  $\text{TR}_2$ , and  $\text{RA}_1$ , and  $\text{RA}_2$  are the experimentally determined values for TR and RA at successive time points  $t_1$  and  $t_2$ . By numerically solving for  $k_D$  (using a bisection algorithm written as a Visual Basic for Applications (VBA) program into a Microsoft Excel spreadsheet) in the above equation, a mean  $k_D$  value for the time interval between  $t_1$  and  $t_2$  was obtained. The absolute values of the deviations of the  $k_D$  for

every gene from its initial steady-state value ( $t_0$ ) were summed up for all time points, and the sums for 4961 genes (those with values for six time points) were ranked.

**Clustering Procedures**—Changes in TR and RA, as well as mRNA stability estimates for all yeast genes, were evaluated by cluster analysis of normalized averaged values. For cluster analysis of the results, we used the Gene Expression Pattern Analysis Suite v 3.1 (GEPAS) included in the web server of CIPF Bioinformatic Unit, as described (4).

To test the potential enrichment in Gene Ontology (GO) categories in the different groupings obtained in this study, we used the FuncAssociate server, which uses a Monte Carlo simulation approach and accepts only significant GO categories according to their adjusted  $p$  value (computed from the fraction of 1000 simulations under the null-hypothesis with the same or smaller  $p$  value and after correction for multiple simultaneous tests). Only GO categories with an adjusted  $p$  value below 0.05 were considered to be significant.

**Accession Numbers**—Gene Expression Omnibus (GEO) accession numbers for the whole experiment are GSE9645 (RA data) and GSE9663 (TR data).

## RESULTS

**General Cell Responses to Oxidative Stress**—At certain non-lethal concentrations, hydroperoxides and other oxidants cause temporary growth arrest at the  $G_1$  stage of the *S. cerevisiae* cell cycle (31, 32). To avoid growth arrest, which could mask the direct effects of oxidative stress on general transcription and mRNA stability, we first tested a range of  $t$ -BOOH concentrations. We looked for conditions that did not affect exponential growth (when compared with control untreated cultures) but still induced expression of three reporter genes (*TRR1*, *TRX2*, *HSP12*), which have been shown to be induced by oxidative stress in previous studies (1, 33). We observed that 0.1 mM  $t$ -BOOH was the highest concentration of this oxidant that fulfilled such requirements. Therefore, all subsequent experiments were carried out with  $t$ -BOOH at 0.1 mM.

We then studied the general transcriptional responses of the cell after an oxidative stress. The total amount of poly(A) mRNA per cell decreased smoothly in the course of the experiment, whereas, as expected, cells continued proliferating (Fig. 1). Whole pol II transcription initially increased relative to time 0, an effect also observed after carbon source shift (4), to decrease at later times to levels similar to time 0. Relative TR levels did not decrease as much as relative RA levels, a fact that suggests a general mRNA destabilization following a moderate oxidative stress.

**Effect of Oxidative Stress on mRNA Levels and Transcription Rates, Gene Profile Clustering**—We have used the GRO experimental procedures (4) to determine the TR and RA during the *S. cerevisiae* cell response to oxidative stress. Thus, both the TR and the RA have been obtained for every yeast gene. Because we normalized the signals obtained for both parameters using a genomic DNA hybridization, values for individual genes are fully comparable. To differentiate the behaviors of the yeast genes during the stress response, we made a clustering analysis using both TR and RA data (Fig. 2). Employing the two data series allows improving gene classification because of the use of

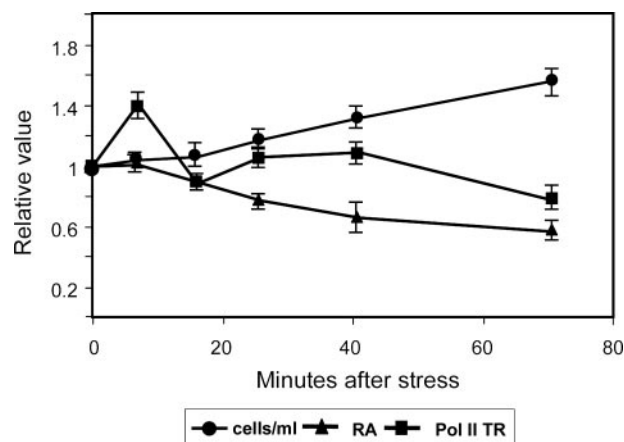


FIGURE 1. Time course of the oxidative stress experiment. At time 0, exponentially growing cells were treated with 0.1 mM  $t$ -BOOH. At the indicated times, aliquots were taken to measure cell concentration, total mRNA per cell (RA), and pol II TR per cell (see "Experimental Procedures" for details). The three parameters were referred to the respective time 0 values. Bars: standard deviation ( $n = 3$ ).

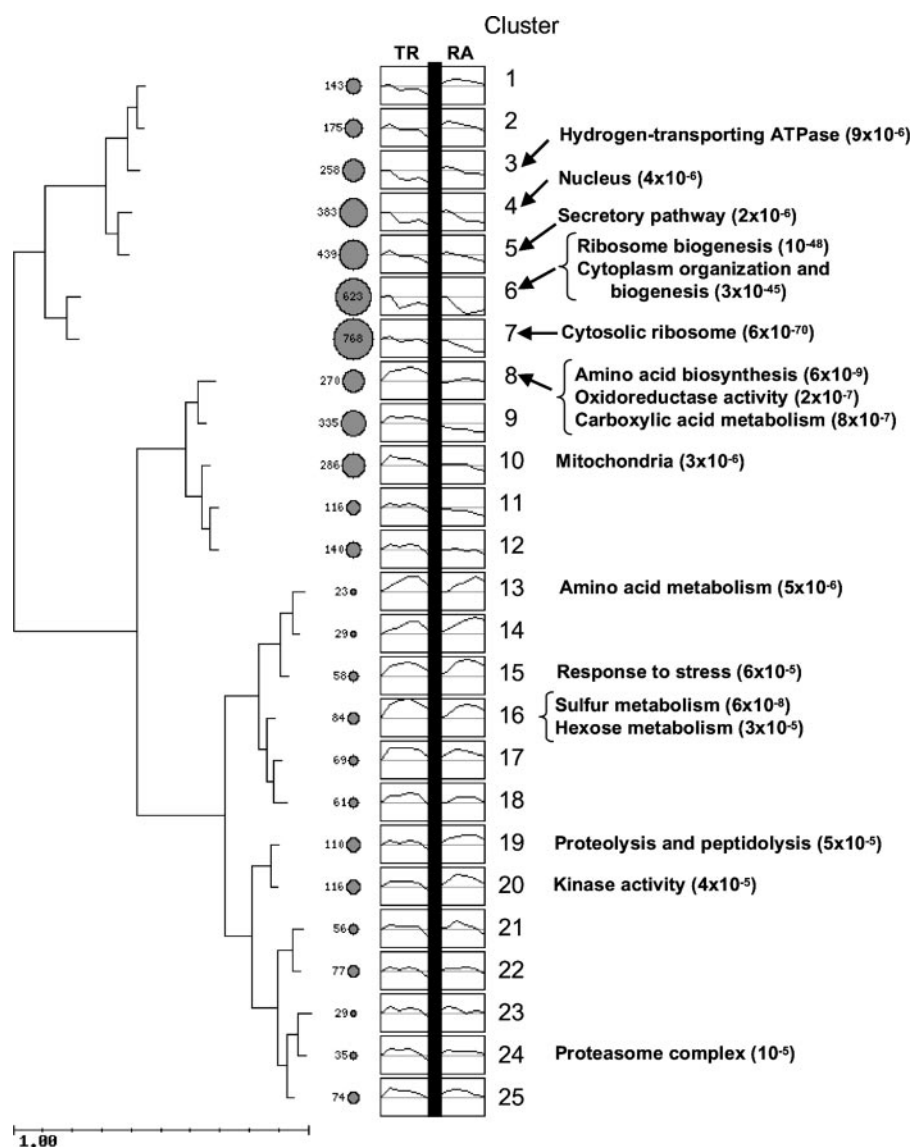
more experimental data points. Because the raw values, or even the absolute values (supplemental Table S1), are quite different in scale for those two data sets, we used relative values to  $t_0$ . Because of this, time points 0 for TR and RA have a 0 value in the log scale. The 12-point profiles obtained reflect the variation of TR (first six points: 0–5) and its consequence on the RA (last six points: 0–5, Fig. 2). It should be kept in mind that in our experiment, most mRNAs are probably not under steady-state conditions and that their profiles depend on TR and on mRNA stability according to kinetic laws (3).

Supplemental Table S2 lists the genes included in each cluster. In Fig. 2, the *upper main branch* of the tree (clusters 1–7) that includes 2789 genes (59%) corresponds to the genes that show a decrease in their TR along the time course. In most cases, it is followed by a decrease in RA. They correspond to repressed categories, mostly related with macromolecule biosynthesis (translation, ribosome biogenesis, transcription). The *lower main branch* of the tree (clusters 8–25) shows a transitory increase in TR that is mirrored by a transitory increase in RA in some cases (clusters 13–25, 821 genes, 17%) but not in others (clusters 8–12, 1147 genes, 24%). Clusters 13–25 correspond to genes in which RA is increased by oxidative stress (GO categories: response to stress or stimulus, ion transport, catabolism). These clusters show some differences in the timing of both peaks. In many cases, the TR peak precedes the RA one (clusters 13–19 and 22–25), but in two instances (clusters 20–21), the mRNA peaks before the TR. It is striking that clusters 8–12, however, do not show a peak in RA profile despite their TR peak. This suggests that a significant mRNA destabilization compensates (cluster 8) or even outbalances (clusters 9–12) the transcription increase. These clusters are enriched in GO categories for amino acid biosynthetic processes, oxidoreductase activity, carboxylic acid metabolism, and mitochondria. Some of these categories were analyzed further (see below).

**Effect of Oxidative Stress on mRNA Stability**—The first-order degradation constants ( $k_D$ , a measure of mRNA instability) can be estimated from the absolute values of TR and RA obtained by normalization of the GRO data. In a different study, we



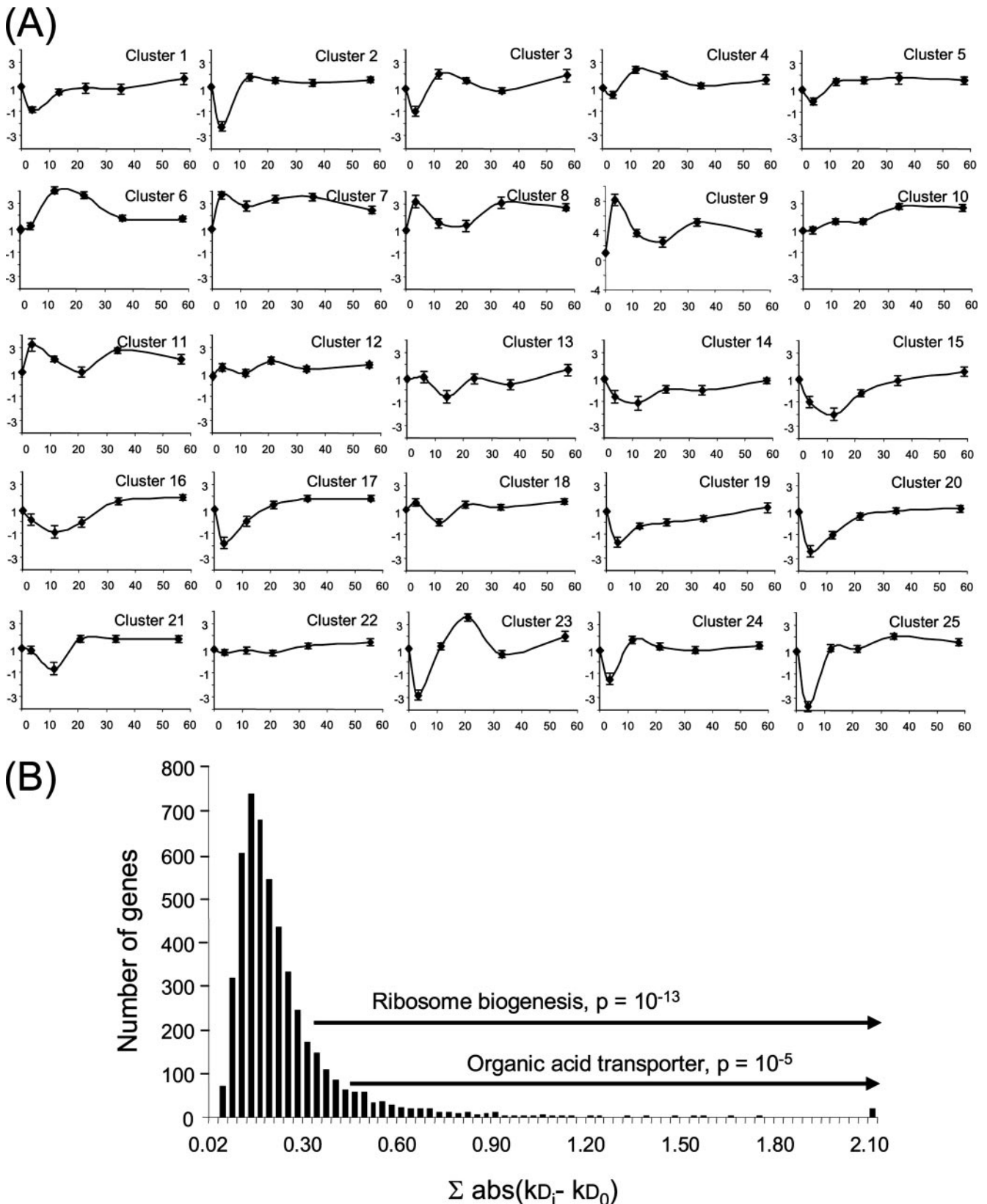
## mRNA Synthesis and Decay during the Yeast Oxidative Response



**FIGURE 2. Clustering of TR and RA data.** Time course (0, 1, 2, 3, 4, 5) profiles of both parameters were considered for clustering. Both data set series are given relative to time 0 to allow comparison between TR and RA data. The discontinuation between the last TR point and the time 0 RA value has no real meaning and, therefore, is represented as a vertical black bar. For each cluster in the tree, the number of genes contained and the data profiles are indicated. Ordinates are in log scale. The horizontal line in each graph marks the zero level. Only the most significant GO categories ( $p$  value  $\leq 5 \times 10^{-5}$ ) are shown. Individual data for each gene can be seen in supplemental Tables S1 and S2. The scale bar in the lower left side reflects the distances between the cluster profiles.

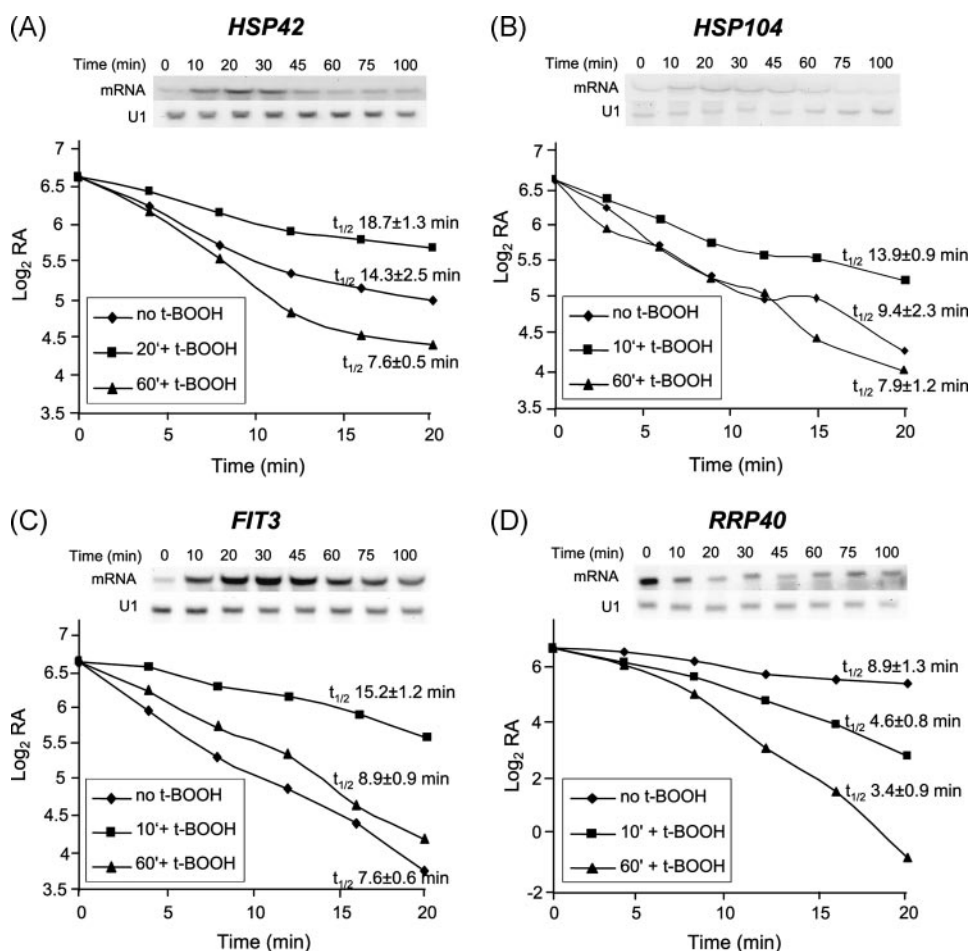
assumed steady-state conditions for most mRNAs and determined  $k_D$  by division of RA by TR (4). However, in the current experiment, steady-state conditions are not expected to hold, at least during the first minutes of stress. Therefore, we employ here a mathematical approach based on the integration of the kinetic equations between two consecutive time points assuming a linear behavior of TR during the interval (3). Because  $k_D$  is computed from absolute values of TR and RA, which have to be calculated by comparison with external data sets, the associated error might be enlarged by the mathematical manipulation. Therefore, the  $k_D$  values obtained for individual genes (supplemental Table S1) are probably too noisy to allow further investigation. However, our analysis showed that functionally related genes follow similar behaviors in TR+RA profiles.

Therefore, we used average profiles of gene groups to describe with more confidence the kinetic behavior of mRNA stability. The average data for each one of the 25 clusters are shown in Fig. 3A. Most clusters show an initial alteration of their  $k_D$ , but they tend to return to original values. Clusters 1–12, despite their differences, show a final  $k_D$  higher than the initial one. Clusters 13–25 return to almost identical value to their initial  $k_D$ , with a slight trend to destabilization. Some clusters with barely detectable differences in TR+RA profiles show clearly distinct  $k_D$  profiles (e.g. 9 versus 10, 23 versus 24), and some clusters with quite different TR+RA profiles (e.g. 7 versus 8) show very similar  $k_D$  profiles, indicating that changes in mRNA stability are not easily deduced from RA+TR profiles during a dynamic situation. Profiles for clusters 1–5 but also for 14–17, 19, 20, and 23–25 show an initial decrease in  $k_D$  followed by a fast recovery. The particular  $k_D$  profiles are, however, different. For all these genes, it seems that stress causes a sudden mRNA stabilization whether being transcriptionally activated or not. The consequence of that stabilization is that RA increases more in the cases of up-regulation or decreases less for genes that are down-regulated. In clusters 6–12, the  $k_D$  profile shows an opposite behavior with a sudden (clusters 6–9, 11, 12) or delayed (cluster 10) mRNA destabilization. It seems, therefore, that a main contribution to RA decrease in genes related to protein biosynthesis (mostly contained in clusters 6–7) is due to mRNA destabilization. Strikingly, some genes that showed a TR increase (clusters 8–11), including the ones for amino acid biosynthesis and those related to mitochondrial function, compensate or even down-regulate their RA by means of a hyperdestabilization of their mRNAs. Finally, only a small part of yeast genes (211, with no significant enrichment in specific GO categories) have approximately flat  $k_D$  profiles (clusters 12 and 22), indicating that regulation of the mRNA stability is a general feature (>95%) of the oxidative stress response. The significance of  $k_D$  as a regulatory mechanism is better seen when yeast genes are classified according to the magnitude of  $k_D$  deviation from the steady-state value (Fig. 3B and supplemental Table S3). Some GO categories appear significantly enriched within the most affected



**FIGURE 3. Predicted stability of mRNAs corresponding to the different gene clusters, after an oxidative stress.** *A*,  $k_D$  values are represented in the y axis as a function of time (min) in the x axis ( $t$ -BOOH added at time 0). The graphics represent the mean  $k_D$  value corresponding to all the genes in the corresponding cluster in relative units referred to the mean  $k_D$  value at time 0. Bars represent the standard error for each time point.  $k_D$  scale is the same for all clusters, except for cluster 9. *B*, histogram ranking total deviations from the initial  $k_D$  during stress. The sum of differences (in absolute values) between the calculated  $k_D$  and the initial steady-state  $k_D$  (i.e. the  $k_D$  at time 0) for all time points were calculated for the whole set of individual genes. The sum values were distributed in ranges, and the number of genes in each range interval is represented. Several GO categories related to ribosome biogenesis appear as statistically significant ( $p$  value is shown) when genes with  $\Sigma > 0.3$  are considered. In addition, the GO category "Organic Acid Transport" appears as significant when  $\Sigma > 0.48$  is considered. Individual data can be seen in supplemental Table S3.

## mRNA Synthesis and Decay during the Yeast Oxidative Response



**FIGURE 4. Experimental determination of mRNA half-lives before and after the addition of t-BOOH.** Strains expressed *HSP42* (A, strain MML980), *HSP104* (B, MML863), *RRP40* (C, MML957), or *FIT3* (D, MML990) under the control of the *tetO<sub>2</sub>* promoter. Doxycycline (5  $\mu$ g/ml) was added at time 0 to exponentially growing cultures of the corresponding strains at 28 °C that had not been exposed to t-BOOH or 10, 20, or 60 min after the addition of t-BOOH. In each case, aliquots were taken at time 0 and at successive times after the addition of doxycycline, for total mRNA isolation and determination of levels of the corresponding mRNA by Northern analysis. Graphics represent the evolution of experimentally determined relative RA in log scale as a function of time for a representative experiment. Mean half-life values ( $t_{1/2}$ ) plus standard deviation for a total of three independent experiments are also indicated. To determine  $t_{1/2}$  values, linear regression of experimental data (as represented in the figure) was calculated, exclusively considering only the initial points for which linearity was maintained. The upper panels show Northern analyses of RA expressed under the respective own promoters in wild type (W303-1A) cells growing exponentially after adding t-BOOH at time 0. U1 RNA is included as loading control.

by changes in stability. Genes belonging to ribosome biogenesis categories and organic acid transport are specially controlled by changes in their mRNA stability. This is the first time that such a detailed analysis of mRNA stability has been done for a dynamic situation in any organism.

Several clusters display statistically significant negative values for  $k_D$  at certain time points (particularly during the first stages of the experiment). Negative  $k_D$  values (which make obviously no biological sense) are indicative of a final excess of RA over what could be expected from a linear evolution of TR between the values experimentally determined at the beginning and the end of the time interval. We are not aware of any artifact (such as a methodological bias or a release of mRNAs from a previously undetected pool) that could cause an eventual increase of RA consistently affecting only certain clusters at definite time points. Therefore, we believe that a possible explanation of the negative  $k_D$  values is that TR did not evolve lin-

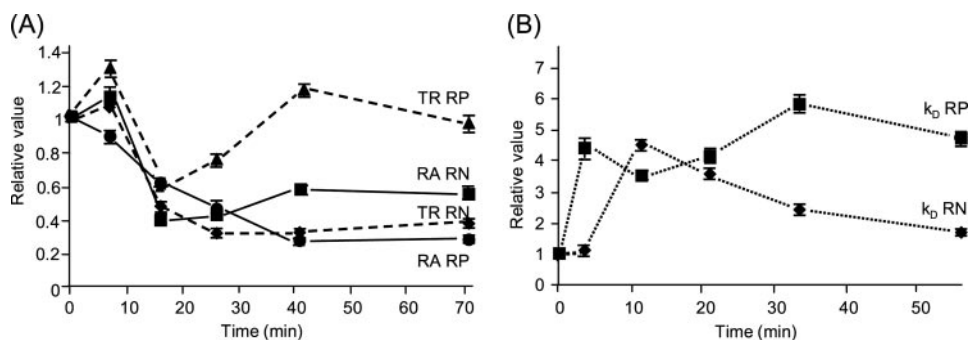
early during that time interval but followed instead a pronouncedly convex trajectory, peaking between the experimentally determined values. Indeed, it has been argued that a transient TR peak is a fit transcriptional strategy for a fast transition to a new mRNA level after an environmental shift (3). Consequently, the analysis of the  $k_D$  profiles suggests an (experimentally undetected) transient TR peak between 0 and 7 min or/and between 7 and 16 min for some clusters (Fig. 3A). This hypothesis will be investigated in the future.

**Experimental Determination of mRNA Decay Rate for Some Representative Genes**—We employed an experimental approach to confirm the kinetics of mRNA decay for some genes after application of an oxidative stress. For this purpose, promoters of the corresponding genes were substituted by the doxycycline-regulatable *tetO<sub>2</sub>* promoter, and mRNA decay rates were determined in the resulting strains by measuring mRNA signal levels in Northern blots at different times after the addition of doxycycline (see “Experimental Procedures”). Previously, we had shown that down-regulation of *tet* promoters using the activator (tTA)-repressor (tetR-Ssn6) dual system occurs very shortly after the addition of doxycycline (27). For each experiment, mRNA decay rate was determined just before the addition of t-BOOH and at two different times after the

addition of the oxidant, which were selected based on the kinetics of decay according the  $k_D$  values predicted by the mathematical algorithm for each particular gene (supplemental Table S1).

Heat shock genes *HSP42* and *HSP104* are in clusters 15 and 16 respectively (supplemental Table S2). In both cases, transcript level and TR, as determined in the GRO experiment, increase transiently after the addition of the oxidant and decrease to near original values at later times (supplemental Table S1). Increase of TR precedes that of mRNA, and it is mathematically predicted for clusters 15 and 16 that mRNA molecules are transiently stabilized (lower  $k_D$ ) at initial times after the onset of stress (Fig. 3A). Differences between genes in clusters 15 and 16 basically rely upon the fact that TR is more intensely up-regulated in the case of cluster 16 (Fig. 2). We confirmed by Northern analyses that *HSP42* mRNA level peaked around min 20 after the addition of the oxidant (Fig. 4A) following kinetics similar to that in the GRO experiment. The





**FIGURE 5. TR and RA (A) and  $k_D$  values (B) of ribosomal protein (RP) and rRNA-processing (abbreviated as RN in this figure) genes during oxidative stress.** Genes in the GO categories "Ribosomal Protein" (supplemental Table S4) and "rRNA Processing" (supplemental Table S5) were considered for analysis independently of the clusters in which they were included. Mean values for the three parameters and the two categories were calculated and plotted as a function of time after *t*-BOOH addition. Represented values are relative to mean values at time 0. Bars represent the standard error for each time point.

half-life of the *HSP42* mRNA was determined before the stress and at min 20 and 60 after it (Fig. 4A). As expected (34), initial mRNA decay rates followed first-order kinetics, and half-lives were calculated from the slopes of the log curves. From a half-life value of 14.3 min during exponential growth, this increased to 18.6 min after 20 min of applying the stress, to decrease to 7.6 min after 60 min in stress conditions (Fig. 4A). That is, *HSP42* mRNA became initially stabilized, and it was destabilized at later times relative to unstressed cells. Both the initial stabilization and the final destabilization confirmed the mathematical predictions (Fig. 3A, cluster 16). A similar picture was experimentally determined for *HSP104* mRNA. Thus, there was a temporary up-regulation of mRNA levels as determined by Northern analysis and an initial transitory increase of mRNA half-life (Fig. 4B). In this case, final decay rate 60 min after the stress was close to that of unstressed cells.

Members of clusters 19 and 20 experience a much higher and rapid increase in mRNA levels than in TR upon the oxidative stress (Fig. 2), which consequently predicts a temporary stabilization of mRNAs (Fig. 3A). We tested this prediction for *FIT3*, a member of cluster 20 that shows an intense transitory up-regulation of mRNA levels in response to peroxide (Fig. 4C). The *FIT3* product is a cell wall mannoprotein that binds siderophore-iron chelates, therefore facilitating iron uptake (35). *FIT3* mRNA half-life almost doubled 10 min after the stress relative to unstressed cells, whereas at 60 min, the mRNA half-life had approximately returned to the situation in untreated cells (Fig. 4C). This confirmed that initial stabilization of *FIT3* mRNA contributed to the transitory up-regulation of mRNA levels.

The mathematical model employed in this work predicts a temporary destabilization of mRNAs of genes in cluster 6 (Fig. 3A), which includes many genes for ribosomal proteins (RP) and for rRNA-processing proteins (supplemental Table S2). We tested this prediction for *RRP40* mRNA, whose levels and TR decrease after the onset of stress as determined by GRO, in parallel to a predicted transitory destabilization of mRNA molecules (supplemental Table S1). Northern analyses confirmed the down-regulation of *RRP40* mRNA levels upon oxidative stress (Fig. 4D). Decay kinetics showed that *RRP40* mRNA dramatically destabilized after imposing the stress, from an initial

half-life value of 8.7 min in unstressed cells to 4.7 and 3.4 min after 10 and 60 min of *t*-BOOH addition, respectively (Fig. 4D). Thus, the experimental work using the regulatable *tet* promoter system confirmed the prediction of a stress-induced mRNA destabilization.

*Correlation between Transcription Parameters and Gene Function—mRNA level profiles in response to environmental stresses tend to correlate among functionally related genes (36, 37). Thus, levels of mRNA for RP and for rRNA-processing proteins decrease upon oxidative stress (1). We extended*

these previous analyses to the other two mRNA-related parameters (TR, decay rate) from the GRO kinetic data (supplemental Table S1) in the oxidative stress response. 122 RP genes (most of them at cluster 7 in Fig. 2) for which time course data existed from at least two independent experiments were selected. Fig. 5 shows the global results for the whole group of genes (mean values), and supplemental Table S4 lists the results for the individual genes. Levels of mRNAs decrease steadily during the first 40 min of stress, maintaining afterward a constant value at less than 30% relative to non-stressed conditions, whereas TR decreased transitorily between 20 and 30 min to then recover afterward to control levels (Fig. 5A). This correlates with the predicted sustained destabilization of mRNAs (Fig. 5B). Similar general profiles were obtained for 135 genes in the "rRNA Processing" GO category (mainly in cluster 6 in Fig. 2), listed in supplemental Table S5. However, TR for rRNA-processing genes did not recover along the experimental period (Fig. 5A). mRNAs for this GO category were predicted to destabilize upon the stress, although at sustained lower levels than for RP mRNAs (Fig. 5B). The predicted destabilization correlates with the above results for *RRP40* mRNA (Fig. 4C). Interestingly, a modest initial up-regulation of TR was observed after oxidant addition for both RP and rRNA-processing genes (Fig. 5A).

The environmental stress response causes up-regulation of the mRNAs for proteasome subunits (1, 37). In the particular case of the oxidative stress response, it has also been shown that many proteasome subunit proteins are induced (18). We analyzed the profiles of 14 genes included in the GO category "Proteasome Core Complex" (Fig. 6 and supplemental Table S6). They are distributed among eight different clusters in Fig. 2, clusters 12 and 24 containing three genes each. In general, TR for proteasome core complex genes displayed a rapid and transitory induction to decrease below initial levels at later times (Fig. 6). This increase preceded that of mRNA levels. TR for most mRNAs coding for the proteasome core complex is coordinately up-regulated immediately after the onset of the oxidative stress, and this is followed by late repression. This by itself can explain the delayed parallel changes in mRNA levels. The coordinated behavior of TR for core proteasome genes can be related to the role of the Rpn4 transcription factor as regulator of expression of most proteasome yeast genes (38). However,

## mRNA Synthesis and Decay during the Yeast Oxidative Response

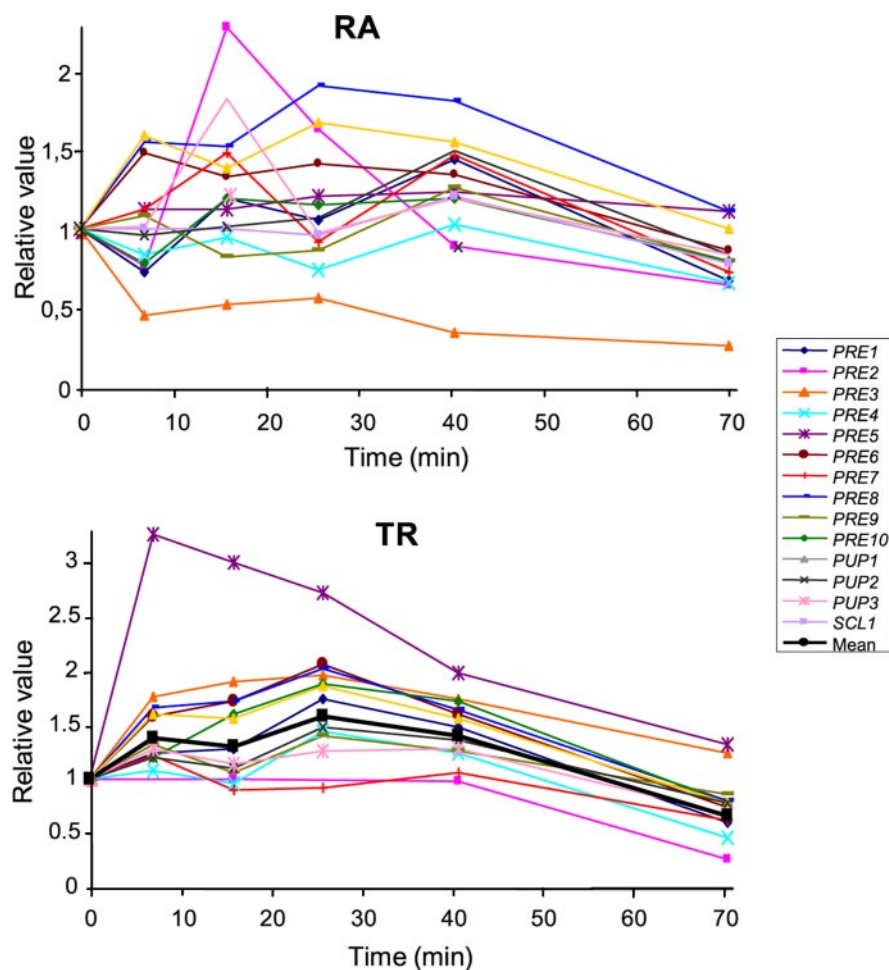


FIGURE 6. RA (upper panel) and TR value (lower panel) for genes in the GO category "Core Proteasome" as a function of time after application of an oxidative stress by *t*-BOOH. The respective genes are indicated at the right panel, and values are listed in supplemental Table S6. Represented values are relative to mean values at time 0.

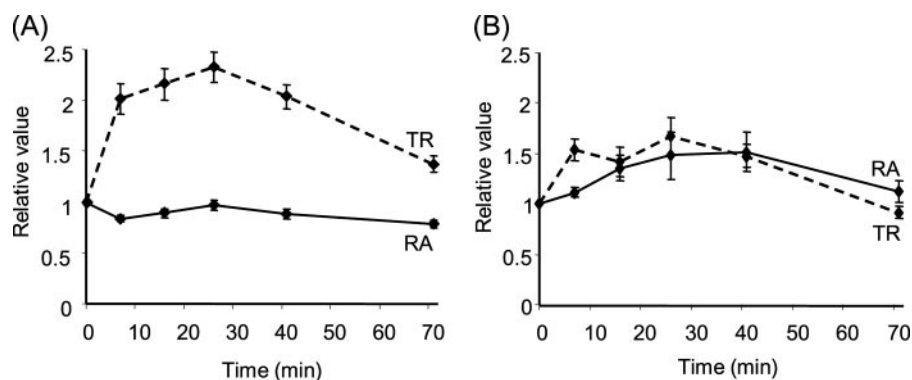


FIGURE 7. Mean TR and RA values for genes in the "Oxidoreductase Activity" GO category included in clusters 8–12 (A) or 1–7 and 13–25 (B), during oxidative stress. Represented values are relative to the unit value at time 0. Bars represent the standard error for each time point.

the RA profiles are much more variable, indicating that post-transcriptional mechanisms operate differentially on them. Analysis of genes in the GO category "Proteasome Regulatory Complex" resulted in similar patterns to those of the core complex (data not shown).

The GO category "Oxidoreductase Activity" is significantly overrepresented in cluster 8 (Fig. 2), and a number of additional

members of the category are in clusters 9–12 (supplemental Table S7). As indicated above, clusters 8–12 show an increase in TR not accompanied by RA increase. To further analyze this category, we divided oxidoreductase activity genes into those in clusters 8–12 and those in the rest of clusters (supplemental Table S7). When mean values of TR and RA are represented separately for both subgroups (Fig. 7), two different behaviors can be observed: those genes that expectedly show a parallelism between TR and RA, with a modest increase in TR preceding that of RA (clusters 1–7 and 13–25), and those that show a higher increase in TR while keeping RA basically constant, which predicts a destabilization of mRNAs (clusters 8–12). Promoter and 3'-untranslated region sequence *in silico* analysis did not evidence statistically significant enrichment of specific sequences in any of both groups of genes. Nevertheless, it is remarkable that up to one-third of oxidoreductase genes in clusters 8–12 (which would have not been detected in genomic studies strictly based on RA analyses) contain Yap1-recognizable sequences in their promoters and about 40% contain STRE sequences recognized by the Msn2/Msn4 factors. The presence of such sequences explains the TR increase upon the stress application.

## DISCUSSION

In this work, we have extended previous studies on the effect of oxidative stress on mRNA amounts at the whole transcriptome level (1, 2). Thus, we have carried TR analyses and consequently predicted effects of the stress on mRNA stability. Conditions were employed in which growth was not affected after the addition of the oxidant, thereby discarding transcriptome-level effects caused by growth rate changes. Globally, pol II-mediated transcription rate did not change significantly during the examined time interval, except for a brief up-regulation at the onset of stress. However, specific sets of genes displayed higher TR values, whereas others had their TR diminished in the oxidative conditions employed.



In most of the 4757 genes (about 80% of the yeast genome) for which complete TR and RA data were obtained in this study, changes in one or both parameters occurred during the oxidative stress response. It is interesting to note that our method detects changes in gene transcription due to oxidative stress that could not be detected by conventional analyses. Thus, 1147 genes belonging to clusters 8–12 do not show an increase in RA, the usual parameter evaluated by most DNA chip analyses, but they did show an increase in TR. This means that they suffer a general destabilization in their mRNA along the time course, as shown in Fig. 3A. Therefore, we have extended the group of transcriptionally induced genes by oxidative stress by more than 2-fold: 1968 genes showing TR increase *versus* 821 that only show increase in RA. Because changes in TR are the primary consequence of the action of transcription factors, we propose that the analyses of TR changes by the GRO methodology will improve the searches (*e.g.* Ref. 39) for genes belonging to the same regulon. On the other hand, 768 genes in cluster 7 (including most RP genes, Fig. 5A) that show a significant RA down-regulation over the time course only show a minute and fluctuating TR change. Both examples illustrate the influence of mRNA stability in gene regulation and the power of our approach to detect it. Certainly, for a significant number of genes, changes occurred at modest levels. This is the case for cluster 5 (439 genes), which is characterized by a modest down-regulation (less than 50% decrease when compared with time 0) of TR and RA and is enriched in genes involved in protein secretion. Clusters 11, 12, 22, 23, and 24 also display rather constant values of TR and RA, without being enriched in particular functional categories. In total, less than one-fourth of the yeast genome maintain rather stable values (less than 2-fold changes) of both TR and RA at the oxidative stress conditions applied in this study. Clusters 6 and 7 (1391 genes) exhibit a large decrease of RA accompanied by TR down-regulation, which is more dramatic in the genes of cluster 6. The two clusters include most of the genes implicated in ribosome structure and biogenesis (RP and rRNA-processing enzymes), and this reflects the inhibition of protein synthesis after application of oxidative stress (21). However, TR inhibition alone is not sufficient to explain the decrease in RA in clusters 6 and 7 genes. The mathematical model employed here predicts a significant destabilization of mRNA molecules upon stress, which would be co-responsible for such decrease. When genes for RP and for rRNA-processing enzymes are analyzed separately from other genes in the clusters to which they pertain, an even more dramatic increase in mRNA decay rate is predicted for both groups, and we have experimentally confirmed it for *RRP40*. In ribosome-related genes, mRNA destabilization is maintained for at least 60 min after the stress. We may conclude that the down-regulation in the expression of ribosome-related genes and the subsequent inhibition of protein synthesis after an oxidative stress result from additive contributions of inhibition of transcription and increased decay rate of the respective mRNAs.

Most of the clusters from 8 to 25 display an immediate induction of TR upon the oxidative stress. For some of them, RA increase is delayed a few minutes relative to TR, as would be expected whether changes in RA were a direct consequence of TR changes (3). However, there is the exception of clusters

8–12, already commented. Clusters 13, 15, and 16 are representative of those showing an approximate parallelism between TR and RA up-regulation. These three clusters are respectively enriched in amino acid metabolism, trehalose synthesis, and sulfur metabolism genes. Activation of trehalose synthesis as a protective mechanism in response to different environmental stresses, including oxidative stress, has already been described (1). Induction of a number of pathways of amino acid biosynthesis as a response to the moderate stress conditions employed here may be an adaptive strategy to prepare cells for protein synthesis recovery. Particularly relevant is the strong induction of the biosynthetic pathway for sulfur amino acids observed in this study. Such induction has not been reported in other studies on oxidative stress responses where a higher oxidant concentration was employed (1). However, induction of this pathway by cadmium (40) and arsenite (41) has been described using genomic and proteomic approaches. Up-regulation of the sulfur amino acid pathway would thus result in higher levels of glutathione (which requires cysteine for its synthesis) needed for the redox response against oxidant conditions. Glutathione is the substrate for glutaredoxins, a group of thiol oxidoreductases participating in the oxidative stress response (42, 43). These, together with other oxidoreductases and additional enzymes detoxifying reactive oxygen species, were induced in our study. They are distributed among different clusters, especially in clusters 8 and 9.

Even for the genes (or groups of genes) with the parallel kinetics of transitory up-regulation of TR and RA, changes in mRNA decay rate may influence the response pattern. The  $k_D$  values calculated with the new algorithm may be meaningful except for cases of very fast and transitory TR responses (usually restricted to the first minutes of stress) for which the assumed linear evolution of TR in between experimental points does not hold, producing artifactual negative values of  $k_D$ . Nevertheless, negative  $k_D$  values may help to identify genes that respond to stress through short-lived abrupt TR peaks, which may be studied in the future by means of a more frequent sampling. In any case, the  $k_D$  profiles calculated by the new procedure clearly show that changes in stability are characteristic of most of the mRNAs after the oxidative stress and that the main part of their change is transitory, restricted to the first 20 min. We have studied in detail some interesting examples, such as core proteasome genes, whose mRNA levels decay at late times more slowly than TR, suggesting that mRNA stabilization is part of the stress recovery response. It is also the case for a number of genes in the "Protein Folding" GO category (data not shown in detail). We have confirmed this prediction for two heat shock proteins in this category, *HSP42* and *HSP104*. In both cases, temporary stabilization may contribute to the fact that up-regulation of RA lasts longer than that of TR. We have tested the mathematical results for a total of four examples of genes corresponding to different clusters, including the mentioned *HSP42* and *HSP104* genes, and all of them qualitatively coincide with predictions (Fig. 4). In clusters 15 and 16, although the predicted  $k_D$  values at short times are not valid, the stabilization of the mRNA is corroborated. For some functional categories, such as ribosome biogenesis and organic acid transporter (Fig. 3B) and ribosomal proteins (Fig. 5), the influence of

## mRNA Synthesis and Decay during the Yeast Oxidative Response

mRNA stability is especially important as already suggested (8, 15). Our study shows, for the first time, the extension of such a mechanism for a dynamic response in a cell.

The behavior of oxidoreductase-coding genes in clusters 8–12 deserves special attention since temporary increase in TR is not accompanied by significant changes in RA, predicting temporary mRNA destabilization upon oxidative stress. A similar situation occurs with amino acid biosynthetic genes, which are also overrepresented in clusters 8–12. Using *in silico* tools, we have not been able to detect specific sequences in promoter or terminator regions of genes for oxidoreductases, which could explain such differences between TR and RA. This leaves open the question on the molecular determinants of the lack of parallelism between both parameters. Concerning the significance of the futile transcription of a subpopulation of mRNAs to be immediately degraded, we can hypothesize that such genes may also respond to other different stresses during which they would require high transcript levels. Therefore, the promoter elements of each particular gene would be responsible for a common TR response upon the diverse stresses, but later modulation of RA would accommodate the response to each specific stress. Testing this hypothesis will require to extend this type of studies to other stresses.

In summary, analysis of TR upon a stress gives significantly more information than simply measuring changes in RA. Importantly, determining both parameters allows making inferences on how mRNA stability influences the oxidative stress response. In addition, by using a genetic system for ectopic regulation of expression of particular genes under stress in conditions not additionally influencing the cell physiology, we have been able to confirm that changes in mRNA decay rates are indeed part of the oxidative stress response for certain groups of genes. This raises the interest in searching for a mechanistic connection between oxidative stress and decay of mRNA molecules in *S. cerevisiae*, as occurs in fission yeast through the Csx1 and Upf1 proteins and the Atf1-mediated stress response (24, 25).

### REFERENCES

1. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257
2. Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., and Young, R. A. (2001) *Mol. Biol. Cell* **12**, 323–337
3. Pérez-Ortín, J. E., Alepuz, P. M., and Moreno, J. (2007) *Trends Genet.* **23**, 260–267
4. García-Martínez, J., Aranda, A., and Pérez-Ortín, J. E. (2004) *Mol. Cell* **15**, 303–313
5. Fan, J., Yang, X., Wang, W., Wood, W. H., III, Becker, K. G., and Gorospe, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10611–10616
6. Tenenbaum, S. A., Carson, C. C., Atasoy, U., and Keene, J. D. (2003) *Gene (Amst.)* **317**, 79–87
7. Keene, J. D., and Tenenbaum, S. A. (2002) *Mol. Cell* **9**, 1161–1167
8. Wang, Y., Liu, C. L., Storey, J. D., Tibshirami, R. J., Herschlag, D., and Brown, P. O. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5860–5865
9. Wilusz, C. J., Wormington, M., and Peltz, S. W. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 237–246
10. Chen, C. Y., Gherzi, R., Ong, S. E., Chan, E. L., Rajmakers, R., Pruijn, G. J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001) *Cell* **107**, 451–464
11. Parker, R., and Song, H. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 121–127
12. Maquat, L. E. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 89–99
13. Newbury, S. F. (2006) *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 30–34
14. Simon, E., Camier, S., and Séraphin, B. (2006) *Trends Biochem. Sci.* **31**, 241–243
15. Grigull, J., Mnaimneh, S., Pootoolal, J., Robinson, M. D., and Hughes, T. R. (2004) *Mol. Cell Biol.* **24**, 5534–5547
16. Pérez-Ortín, J. E. (2008) *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **6**, 282–291
17. Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P. W. H., eds) Vol. 1, pp. 241–303, Springer-Verlag, Berlin
18. Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., and Labarre, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 22480–22489
19. Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., and Toledano, M. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 16040–16046
20. Swaminathan, S., Masek, T., Molin, C., Pospisek, M., and Sunnerhagen, P. (2006) *Mol. Biol. Cell* **17**, 1472–1482
21. Shenton, D., Smirnova, J. B., Selley, J. N., Carroll, K., Hubbard, S. J., Pavitt, G. D., Ashe, M. P., and Grant, C. M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 29011–29021
22. Sunnerhagen, P. (2007) *Mol. Genet. Genomics* **277**, 341–355
23. Vasudevan, S., Garneau, N., Khounh, D. T., and Reltz, S. W. (2005) *Mol. Cell Biol.* **25**, 9753–9763
24. Rodríguez-Gabriel, M. A., Burns, G., McDonald, W. H., Martin, V., Yates, J. R., III, Bähler, J., and Russell, P. (2003) *EMBO J.* **22**, 6256–6266
25. Rodríguez-Gabriel, M. A., Watt, S., Bähler, J., and Russell, P. (2006) *Mol. Cell Biol.* **26**, 6347–6356
26. Shiozaki, K., and Russell, P. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2276–2288
27. Bellí, G., Garí, E., Piedrafitá, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 942–947
28. Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Yeast* **14**, 1127–1138
29. Alberola, T. M., García-Martínez, J., Antúnez, O., Viladevall, L., Barceló, A., Ariño, J., and Pérez-Ortín, J. E. (2004) *Int. Microbiol.* **7**, 199–206
30. Warner, J. R. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 437–440
31. Lee, J., Romeo, A., and Kosman, D. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24885–24893
32. Wanke, V., Accorsi, K., Porro, D., Esposito, F., Russo, T., and Vanoni, M. (1999) *Mol. Microbiol.* **32**, 753–764
33. Ocón-Garrido, E., and Grant, C. M. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**, 993–1003
34. Hargrove, J. L., Hulsey, M. G., and Beale, E. G. (1991) *BioEssays* **13**, 667–674
35. Protchenko, O., Ferea, T., Rashford, J., Tiedeman, J., Brown, P. O., Botstein, D., and Philpott, C. C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 49244–49250
36. Wu, L. F., Hughes, T. R., Davierwala, A. P., Robinson, M. D., Stoughton, R., and Altschuler, S. J. (2002) *Nat. Genet.* **31**, 255–265
37. Gasch, A. P. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P. W. H., eds) Vol. 1, pp. 11–70, Springer-Verlag, Berlin
38. Mannhaupt, G., Schnell, R., Karpov, V., Vetter, I., and Feldmann, H. (1999) *FEBS Lett.* **450**, 27–34
39. Bussemaker, H. J., Hao, L., and Siggia, E. D. (2001) *Nat. Genet.* **27**, 167–171
40. Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J. C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M., and Labarre, J. (2002) *Mol. Cell* **9**, 713–723
41. Thorsen, M., Lagniel, G., Kristiansson, E., Junot, C., Nerman, O., Labarre, J., and Tamás, M. J. (2007) *Physiol. Genomics* **30**, 35–43
42. Toledano, M. B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D., and Tacnet, F. (2007) *FEBS Lett.* **581**, 3598–3607
43. Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., and Cabisco, E. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **10.1016/j.bbagen.2007.12.004**



## YEAST CELLS MODULATE THE HIGH-AFFINITY IRON UPTAKE SYSTEM UPON OXIDATIVE STRESS

Laia Castells-Roca, Enrique Herrero and Gemma Bellí\*

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, IRBLleida, Universitat de Lleida,  
Montserrat Roig 2, 25008-Lleida, Spain

Running head: Yeast iron uptake and oxidative stress

Abbreviations: BPS, bathophenanthroline sulfonate; DAPI, 4'-6'-diamino-2-phenylindole; GFP, green fluorescence protein; GRO, Genomic Run-On; HA, hemagglutinin; RA, mRNA amount; *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; TR, transcription rate

\*Address correspondence to: Gemma Bellí (gemma.belli@cmb.udl.cat)

**ABSTRACT**

*Saccharomyces cerevisiae* can import iron through a high-affinity system which is subdivided into an Ftr1/Fet3-mediated reductive and a siderophore-mediated non-reductive pathway. Expression of components of the high-affinity system is under the control of the Aft1 transactivator. Upon oxidative stress, Aft1 is transiently internalized into the nucleus and transcription of components of its regulon is activated. The mRNA levels of the non-reductive pathway genes also increase in parallel, but those of *FTR1* and *FET3* remain low due to destabilization of the mRNAs during the oxidative stress. Consequently, the respective protein levels remain low. The mRNA destabilization is not mediated by the RNA-binding protein Cth2, although this seems to modulate constitutively the levels of some mRNAs for the non-reductive pathway. Yeast cells are hypersensitive to peroxides in growth conditions where only the high-affinity reductive pathway is functional for iron assimilation. This reinforces the idea that upon oxidative stress *S. cerevisiae* cells redirect iron import through the non-reductive pathway to minimize oxidative damage caused by the ferrous ions imported through the Ftr1-Fet3 complexes. Cells assimilating iron through a Fet4-mediated low affinity system are hypersensitive to peroxides, in accordance with the specialization of this system for importing iron anaerobically.

**INTRODUCTION**

Iron is an essential element for almost all living organisms. It is required for biological processes such diverse as respiration, photosynthesis, nitrogen fixation, synthesis of nucleic acids or carbon metabolism. However, its availability from external sources in a soluble form is limited, and cells have developed complex mechanisms for iron sensing and internalization. On the other hand, high iron concentrations may be toxic for cell, among other reasons because it is prooxidant in the ferrous form. Consequently, the internalization of iron and its intracellular homeostasis must be tightly coordinated. In *Saccharomyces cerevisiae*, low-specificity mechanisms for iron uptake operate when external concentrations are high (Philpott, 2006). When iron is limited, a high-affinity uptake system is expressed under the control of the transcriptional activator Aft1 and its homologue Aft2 (Philpott, 2006; Philpott and Protchenko, 2008). Aft1 plays the central role in the upregulation of the high-affinity system. Aft2 activates the same pool of genes as Aft1 with a few exceptions, and its role seems to be more important in the absence of Aft1 (Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001). In low-iron conditions, Aft1 is internalized to the nucleus to activate the set of genes which constitute the Aft1 regulon (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). Aft1 interacts directly with the monothiol glutaredoxins Grx3/Grx4 (Ojeda *et al.*, 2006; Pujol-Carrion *et al.*, 2006) and indirectly with the Fra1/Fra2 proteins (Kumánovics *et al.*, 2008). This interaction plays a regulatory role on Aft1 transcriptional activity.

The *S. cerevisiae* high-affinity system for iron uptake operates through two parallel pathways (Philpott and Protchenko, 2008). The reductive pathway consists of the plasma membrane ferric reductases Fre1/Fre2, which convert ferric iron into the ferrous form (Yun *et al.*, 2001). This is then internalized through the complex formed by the copper-dependent ferroxidase Fet3 and the transporter Ftr1. Fre1 and Fre2 are also copper reductases, showing the relationship between iron and copper transport and the dependence of iron uptake on copper. The non-reductive pathway employs siderophore-ferric iron complexes that are transported across the plasma membrane by members of the ARN family (Arn1-4). Each of these ARN transporters has specificity for certain types of siderophore-iron complexes, although *S. cerevisiae* cells do not synthesize siderophores by themselves (Yun *et al.*, 2000a; Yun *et al.*, 2000b; Lesuisse *et al.*, 2001). The cell wall associated mannoproteins Fit1-3 facilitate the uptake of iron in either form across the cell wall, and their activity is therefore common for the reductive and non-reductive pathways (Protchenko *et al.* 2001). While uptake of siderophore-bound iron does not require a reductive step, two more ferric reductases (Fre3/Fre4) are able to reduce ferric iron bound to some siderophore types, followed by iron transport and reoxidation through the Ftr1/Fet3 complex (Yun *et al.*, 2001). The genes for the components of both the reductive and the non-reductive pathways are part of the Aft1 regulon, together with genes involved in intracellular movement and storage of iron (Philpott and Protchenko, 2008).

Two other members of the Aft1 regulon in *S. cerevisiae* are *CTH1* and *CTH2*, which code for two homologous mRNA-binding proteins. These form part of a CCCH zinc-finger protein family that regulates mRNA stability in diverse eukaryotic organisms including humans

(Puig *et al.*, 2005; Puig *et al.*, 2008). In iron-deprivation conditions, Cth2 activates the decay of mRNAs coding for iron-requiring proteins (Puig *et al.*, 2005). Therefore, in such conditions of iron deficiency, yeast cells activate expression of proteins for iron uptake via the high affinity system through Aft1, while through Cth2 expression of iron-requiring proteins is repressed, as a mechanism to facilitate iron homeostasis. Some overlapping exists between Cth2 and Cth1 functions. Nevertheless, in iron-deficiency conditions Cth1 preferentially affects the stability of mRNAs for mitochondrial activities involved in respiration and amino acid biosynthesis (Puig *et al.*, 2008). In addition, Rnt1 is a double-stranded RNA endonuclease which negatively regulates the stability of a subset of the Aft1 regulon genes in iron-replete conditions (Lee *et al.*, 2005).

The prooxidant action of ferrous iron (as of other transition metals) is due to its ability to catalyze the partial reduction of hydrogen peroxide into the hydroxyl radical, one of the strongest oxidants in nature, which rapidly can damage diverse cellular macromolecules (Halliwell and Gutteredge, 2007). The source of hydrogen peroxide can be external or may result from the dismutation of superoxide generated in a cellular redox process such as the mitochondrial electron transport. Due to the extreme oxidant activity of the hydroxyl radical, proteins bound to transition metals are especially prone to oxidative damage (Cabiscol *et al.*, 2000; Irazusta *et al.*, 2008). Oxidants such as peroxides generate an oxidative stress response acting at a transcriptional and translational level (Gasch *et al.*, 2000; Shenton *et al.*, 2006), which mainly cause induction of the cellular systems involved in detoxification of reactive oxygen species and in repairing macromolecular damage (Herrero *et al.*, 2008). A Genomic Run-On (GRO) methodology has been developed in yeast cells which allows comparing mRNA amounts (RA) and transcription rates (TR) for each individual genes at a genomic scale, and consequently use mathematical algorithms to deduce mRNA decay rates in both steady-state and dynamic growth situations (Pérez-Ortín *et al.*, 2007). We have employed the GRO strategy to analyze the transcriptional response upon oxidative stress caused by moderate concentrations of *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH) that do not alter cell growth significantly (Molina-Navarro *et al.*, 2008). In this study we demonstrated that RA and TR do not necessarily follow parallel kinetics and that modulation of mRNA stability plays an important role in the oxidative stress response for some functional categories of genes. Detailed analysis of the above data indicates that genes of the Aft1-regulated high-affinity iron uptake system display a variety of responses upon oxidative stress, including TR upregulation for many of them. In the present work, we study such responses in detail, determine the importance of changes in mRNA decay upon the stress occurring in a subset of genes, and analyze how oxidative stress may influence the high-affinity uptake of iron in *S. cerevisiae*.

## MATERIALS AND METHODS

### **Strains and Plasmids**

The strains employed in this work are listed in Table 1. They are derived from the wild type strain W303-1A. Knockout strains were obtained by standard procedures using the *kanMX4* (Wach *et al.*, 1994) and *natMX4* (Goldstein and McCusker, 1999) disruption cassettes. Substitution of the endogenous gene promoter by the *tetO<sub>2</sub>* promoter was done using the *kanMX4*-based substitution cassette and the approach described in Bellí *et al.* (1998a). Strains with the *tetO<sub>2</sub>* promoter constructions were generated from MML830, which carries the *EcoRV*-linearized chromosomally-integrated pCM244 plasmid. This plasmid codes for the tetR<sup>1</sup>-Ssn6 protein, which acts as a repressor of the *tetO<sub>2</sub>* promoter following activation by doxycycline (Bellí *et al.*, 1998b).

Plasmid pMM928 derives from the *LEU2* integrative plasmid Ylplac128 (Gietz and Sugino, 1988), and contains the *CTH2* open reading frame plus 820 and 306 bp of the upstream and downstream regions respectively, cloned between the *EcoRI* and *BamHI* vector sites. The same *CTH2* gene plus adjacent sequences were cloned in the *URA3* integrative plasmid (Gietz and Sugino, 1988) to generate pMM942. The *URA3* integrative plasmid pMM50 contains the sequence for the 3xhemagglutinine (HA) epitope (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002), and from it plasmids pMM950, pMM953 and pMM955 were constructed. Plasmid pMM950 was made in two steps by first cloning 791 bp of the upstream region plus the entire *FET3* open reading frame in phase with the 3xHA region plus the stop codon of the vector, and then cloning 381 bp of the downstream region of *FET3*. By similar approaches, pMM953 contains 750 bp of the *FIT3* upstream region, followed by the open reading frame plus the 3xHA tag region and 512 bp of the downstream region. Plasmid pMM955 contains 796 bp of the *FTR1*

upstream region, the open reading frame fused to the 3xHA tag region and 488 bp of the downstream region. These three plasmids were chromosomally integrated after linearization by *EcoRV* or *NcoI* digestion. Vector pUG35 (obtained from Dr. J. Hegemann, Institute für Mikrobiologie, Düsseldorf, Germany) is a centromeric plasmid with the *MET25* promoter and the gene for yEGFP. From it, plasmid pMM412 was obtained, with the *AFT1* open reading frame cloned between the *EcoRI* and *ClaI* sites of the vector, therefore coding for a GFP-Aft1 fusion protein.

### **Growth Conditions**

Cells were grown at 30°C, with shaking in the case of liquid cultures. YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) was employed as rich medium. Synthetic SD medium (Sherman, 2002) was also employed, added with 2% glucose and the specific auxotrophic requirements for each strain. The extracellular iron chelator bathophenanthroline sulfonate (BPS) was added for iron-limited media, at the concentrations indicated in each case. For iron-replete media, ferrous ammonium sulfate (Sigma) was added at 2 mM final concentration. Ferrozine (which is able to chelate intracellular and extracellular iron) was added at the concentrations indicated in each case for creating iron-deprivation conditions. Media were solidified by addition of 2% agar. Difco™ Agar Noble was employed for solidifying media employed in growth assays which involved iron-limited conditions.

### **Plate growth assays**

Exponential cultures at about  $2 \times 10^7$  cells/ml were serially diluted (1:5) and spotted onto plates of solid medium with the additions indicated in each case. Growth was recorded after three days of incubation at 30°C.

### **Determination of mRNA half-lives**

The methodology described in Molina-Navarro *et al.* (2008) were basically followed. Exponential cultures ( $1 \times 10^7$  cells/ml) of strains in which the endogenous promoter of the respective gene was substituted by the *tetO<sub>2</sub>* promoter were treated with doxycycline (10 µg/ml) added at time 0, and samples were taken at successive times for Northern blot analysis following by quantification of the mRNA signals. In parallel, an aliquot of the same culture was treated with 0.1 mM *t*-BOOH, 60 min later doxycycline was added to inhibit expression from the *tetO<sub>2</sub>* promoter and samples were successively collected as above for Northern blot analysis.

### **Northern Blot Analyses**

RNA isolation and electrophoresis, probe labeling with digoxigenin, hybridization, and signal detection were done as described previously (Bellí *et al.*, 1998b). Gene probes were generated by PCR from genomic DNA, using oligonucleotides designed to amplify internal open reading frame sequences. When required, blot signals were quantified using the Lumi-Imager equipment (Roche Applied Science) software. Background levels were determined for a region lacking visible signal, of the same size as the measured band and adjacent to it, and such background was subtracted for the respective band signal value.

### **Miscellaneous Methods**

Western blot analyses were done according to Bellí *et al.* (1998b), with anti-HA antibodies (Roche) at a 1:2,500 dilution. Intracellular iron was determined as in Tamarit *et al.* (2006). For DAPI nuclear staining of living cells expressing the GFP-Aft1 fusion proteins, samples from exponentially growing cultures were directly incubated with DAPI (5 µg/ml) during 40 min in the dark, before visualization with an Olympus BZ51 fluorescence microscope, with U-MNUA2 and U-MNUA3 filters respectively for DAPI and GFP staining.

## **RESULTS**

### **Oxidative Stress Induces Transcription of Genes Involved in the High Affinity Iron Uptake System**

Analysis of the GRO data from our previous studies on the yeast response to oxidative stress (Molina-Navarro *et al.*, 2008) indicates that a large number of the genes which constitute the Aft1-dependent high affinity iron uptake system upregulate their TR upon the stress by *t*-BOOH. Two well-defined patterns are observed (complete data in Supplementary Table S1). In one



group, a transitory upregulation of TR occurs which is paralleled by temporary increase of RA upon the stress (Figure 1A). In the other group, TR increases while RA remains basically constant, predicting a strong mRNA destabilization (Fig. 1B). Finally, a few genes which also pertain to the Aft1 regulon (such as *FRE2*, *FRE7* and *VHT1*) display a decrease in TR along the time course of the GRO experiments, in parallel to a decrease in RA (Supplementary Table S1).

To confirm the GRO data, we next analyzed by Northern blot the expression of some representative mRNAs of the iron regulon after *t*-BOOH addition in normal iron conditions (YPD medium). All the genes tested are known to be regulated by Aft1 (Shakoury-Elizeh *et al.*, 2004; Philpott and Protchenko, 2008), and some of them by Aft2 as well (Blaiseau *et al.*, 2001). Some of the genes were upregulated rapidly and transiently, peaking approximately at min 10 and returning to basal (*CTH2*) or lower levels (*FET3*, *FTR1*) after 60 min (Figure 2). The ARN family members and *FIT3* present almost undetectable basal levels of expression in physiological conditions, and became upregulated at later times upon the stress (about 30 min), then to return to basal levels. Among the studied genes, the induction-fold also established two groups of genes, which were qualitatively concordant with the above mentioned GRO data: those that have a remarkably increase in mRNA levels (at least 4-fold induction), and those that were induced only 1.5 to 1.8-fold. The latter included *FTR1*, *FET3* and *ARN3*. In the same oxidative conditions, a gene well-known for its responsiveness to oxidants such as *TRX2* displayed a very significant induction (Figure 2). Upregulation of all the tested genes upon the oxidative stress did not occur in a  $\Delta aft1$  mutant (Figure 2), indicating that such induction depends on the Aft1 factor. *FTR1* mRNA basal levels did not decrease in the absence of Aft1, but the modest and transitory upregulation occurring in wild type cells was abrogated in the mutant. Since Yap1 is the main regulator of the oxidative stress response in *S. cerevisiae* (Moye-Rowley, 2003), we also tested expression of the above Aft1-regulated genes in a  $\Delta yap1$  mutant. In all cases, gene expression after *t*-BOOH addition was similar to wild type cells, in contrast to the Yap1-regulated gene *TRX2*, whose expression was lower and delayed in the mutant (Figure 2). These results confirm that upregulation of the Aft1 regulon genes during an oxidative stress is entirely dependent on Aft1. In parallel, we also observed that *TRX2* upregulation was unaffected in  $\Delta aft1$  cells (Figure 2), supporting the separation between the Aft1 and the Yap1 regulons in oxidative stress conditions.

It has been reported that a mutant lacking Aft1 and Aft2 is hypersensitive to hydrogen peroxide (Blaiseau *et al.*, 2001). We confirmed that in the genetic background employed by us, the single  $\Delta aft1$  and  $\Delta aft2$  mutants did not show growth differences relative to wild type cells in YPD plates with *t*-BOOH, while the double mutant was hypersensitive to this agent (Supplementary Figure S1). Thus, at least Aft1 or Aft2 are required for optimal tolerance to *t*-BOOH.

### **Oxidative Stress Affects Aft1 Compartmentalization**

The Aft1 function is determined by its nuclear compartmentalization upon iron depletion (Yamaguchi-Iwai *et al.*, 2002). We therefore wondered whether the transient upregulation of the Aft1 regulon upon oxidative stress was the consequence of Aft1 translocation to the nucleus. To check this, a *GFP-AFT1* tagged version carried in a centromeric plasmid and transformed into a  $\Delta aft1$  strain was used to monitor by fluorescence microscopy the *in vivo* subcellular localization of the protein after peroxide stress. Such *AFT1* version was under transcriptional control of the *MET25* promoter instead of the endogenous one. Therefore, we checked *AFT1* mRNA levels with several concentrations of methionine in the culture, and compared them to the mRNA levels expressed under the own promoter. Methionine concentration of 12.5  $\mu\text{g/ml}$  in the growth medium resulted in expression levels of *AFT1* similar to the physiological ones, and they were not affected by the oxidative stress (Figure 3A). When cultures expressing the GFP-Aft1 protein with this methionine concentration were analyzed by fluorescence microscopy, a transitory nuclear localization of the tagged Aft1 protein was observed after 30 min in the presence of *t*-BOOH (as shown by colocalization with DAPI nuclear staining), in contrast to the in general dispersed cytoplasmic staining observed in unstressed cells and after 90 min of *t*-BOOH addition (Figure 3B). This transient nuclear location of Aft1 parallels the temporal TR upregulation of the Aft1-dependent genes upon the stress (Figure 1).

The observed upregulation of the Aft1 regulon could be at least in part secondary to upregulation of *AFT1* expression after *t*-BOOH addition. However, we observed that *AFT1* mRNA levels are not significantly upregulated upon the stress (Figure 3C). In fact, there is a sustained decrease compared to the levels in untreated cultures. Therefore, we can conclude that activation of the Aft1 regulon by oxidative stress occurs independently of Aft1 levels.



### ***The Aft1 Regulon Is not Activated by Oxidative Stress in the Absence of Fe-S Cluster Synthesis***

In *S. cerevisiae*, synthesis of iron-sulfur (Fe-S) clusters occurs entirely at the mitochondria (Lill and Mühlenhoff, 2008). Diverse studies have shown that in the absence of a functional machinery for Fe-S synthesis, the Aft1-regulated genes are constitutively expressed in iron-replete conditions (Foury and Talibi, 2001; Belli *et al.*, 2004; Hausmann *et al.*, 2008). This fact can be related to the requirement of a mitochondrial sensor of the cell iron status which would contain a Fe-S cluster and would mediate Aft1 activation (Rutherford *et al.*, 2005). Grx5 monothiol glutaredoxin is one of the mitochondrial components of the Fe-S cluster synthesis machinery (Rodríguez-Manzanique *et al.*, 2002). Therefore, we employed a  $\Delta$ grx5 mutant to determine whether in the absence of Fe-S cluster synthesis oxidative stress still activates the Aft1 regulon. As previously described (Belli *et al.*, 2004),  $\Delta$ grx5 cells display higher constitutive expression of Aft1-regulated genes than wild type cells, although this basal expression level is lower than that seen when such cells are grown in low-iron medium after ferrozine addition (Figure 4A). This observation suggests an additional sensing mechanism for iron starvation independent of the mitochondrial Fe-S synthesis machinery, as also proposed by others (Kumánovics *et al.*, 2008). On the contrary, when  $\Delta$ grx5 cells were exposed to an oxidative stress, the levels of the analyzed transcripts did not increase their expression over basal levels (Figure 4B). In fact, a slight decrease of mRNA levels occurred at advanced times after the stress, which is very remarkable in the case of *FTR1*. When a null mutant in the *YFH1* frataxin gene was analyzed in a similar way, basal expression levels of several Aft1 regulon genes were also not further induced upon oxidative stress (data not shown). These results would indicate that activation of Aft1 upon oxidative stress requires functional Fe-S clusters.

### ***Oxidative Stress Affects the Turnover of mRNAs Responsible for the Iron Uptake Reductive Pathway***

Our original GRO analyses suggest that oxidative stress provokes changes in the mRNA decay rate of the set of genes of the Aft1 regulon listed in Figure 1B. A destabilization of the mRNAs upon oxidative stress would explain why the respective mRNA levels remain approximately constant whereas the TR increases. Among these genes are *FET3* and *FTR1*, two key components of the reductive pathway of the high-affinity iron uptake system. Figure 5A shows the experimentally-determined RA and TR values for both mRNAs as determined in the GRO analyses. To confirm the theoretically predicted mRNA destabilization, the endogenous promoters of *FET3* and *FTR1* were substituted by the *tetO<sub>2</sub>* promoter. The mRNA decay rates were experimentally determined by Northern blot analyses of samples collected at different times after doxycycline addition for switching-off the promoter, as made before (Molina-Navarro *et al.*, 2008). For each experiment, mRNA decay rates were determined just before addition of the oxidant and 60 min after application of the stress. Initial mRNA decay rates followed first-order kinetics, and half-lives were calculated from the slopes of the log curves. For *FET3* mRNA, we obtained a half-life value of 13.0 min in unstressed cells, which decreased to 7.9 min after 60 min of *t*-BOOH treatment (Figure 5B), pointing to a strong destabilization effect. Similarly, for *FTR1* mRNA the half-life value decreased from 8.7 min in exponentially-growing unstressed cells to 3.6 min in stressed cells. In contrast, in a previous study (Molina-Navarro *et al.*, 2008) we observed that the mRNA of *FIT3*, whose activity is required for both the reductive and the non-reductive high-affinity pathways for iron uptake, does not suffer any destabilization. In fact, its half-values were 7.6 and 8.9 min respectively before and 60 min after the stress application (Molina-Navarro *et al.*, 2008). The destabilization effects on *FET3* and *FTR1* mRNAs confirm the GRO data predictions and would explain not only the absence of a parallelism with the TR increase at the initial times of the stress but also the lower than basal mRNA levels observed at more advanced times upon the stress.

### ***Cth2 Does Not Affect FET3 or FTR1 mRNA Decay Rate Upon Oxidative Stress***

*CTH2* is part of the Aft1 regulon (Puig *et al.*, 2005), and its mRNA is also upregulated upon oxidative stress (Figure 2A). On the contrary, the mRNA level for *CTH1* decreases in the presence of *t*-BOOH (data not shown). Our GRO analyses also indicate that the *RTN1* mRNA is downregulated upon oxidative stress (Molina-Navarro *et al.*, 2008), and a previous study (Lee *et al.*, 2005) has shown that in the case of *FTR1* there are not differences in mRNA levels between wild type and  $\Delta$ rtn1 cells. Consequently, among the factors regulating the stability of mRNAs involved in iron homeostasis, we focused our attention on the possible role of Cth2 in the

changes in *FET3* and *FTR1* mRNA stability after oxidant addition. With this objective, we constructed a double  $\Delta cth1\Delta cth2$  mutant in the W303 background employed in the present study, and from it a strain expressing Cth2 was derived by chromosomal integration of a plasmid with *CTH2* driven by the own promoter. The double mutant behaved as expected from a previous report (Puig *et al.*, 2005) with respect to: (i) reduced growth in iron-deprivation conditions, and (ii) higher levels of mRNA of a Cth2 target such as *NFU1* in these same iron-deprivation conditions (Supplementary Figure S2). Such phenotypes were rescued in the derivative expressing *CTH2*.

All four genes of the Aft1 regulon which were tested became induced in the strains expressing or non-expressing *CTH2*, following similar kinetics to that observed for the wild type strain W303-1A (Figure 6A, compare with Figure 2). In the case of the two analyzed genes that participate in the non-reductive pathway (*FIT3* and *ARN2*), the mRNA levels at the peak of induction were significantly higher in the  $\Delta cth1\Delta cth2$  mutant than in the  $\Delta cth1\Delta cth2/CTH2$  strain (Figure 6A). However, careful measurement of Northern blot mRNA levels along the experimental time course showed that the ratio between the levels at the peak and in basal conditions was similar in both *CTH2* and  $\Delta cth2$  strains. Quantification of mRNA levels in non-stress basal conditions indicated that the absence of Cth2 results in modest changes in the case of *FET3* and *FTR1* mRNAs, but much more significant (about three to four-fold higher) in the case of *FIT3* and *ARN2* (Figure 6B).

These results suggested that the absence of *CTH2* could have an effect on the stability of the mRNAs of some Aft1 regulon genes in basal exponential growth conditions, but not on the fate of mRNA expression upon oxidative stress. Therefore, we measured the decay rates of the *FET3*, *FTR1* and *FIT3* mRNAs before and 60 min after oxidant addition, in a *CTH2* and a  $\Delta cth2$  background (Figure 6C). No significant differences in decay rates were observed for *FET3* and *FTR1* mRNAs between both strains in any condition. However, the absence of *CTH2* significantly stabilizes the *FIT3* mRNA, indicating that the protein can be active in both conditions. These results are in accordance with the higher constitutive levels of *FIT3* mRNA in the  $\Delta cth1\Delta cth2$  cells (Figure 6B).

Besides that, we did growth assays of both  $\Delta cth1\Delta cth2$  and  $\Delta cth1\Delta cth2/CTH2$  strains in rich media plates added with *t*-BOOH and/or the iron chelator BPS (Figure 6D). We observed that the double mutant is not more sensitive to the oxidant than the corresponding *CTH2* strain, and in oxidative stress conditions plus iron limitation it exhibits slightly less sensitivity than the *CTH2* cells. As a control, the  $\Delta aft1\Delta aft2$  strain confirmed its sensitivity to oxidative stress and to iron depletion. Therefore, Cth2 does not seem to have a relevant biological role in the oxidative stress response.

#### ***Fet3 and Ftr1 Protein Levels Are Not Significantly Affected Upon the Oxidative Stress***

Contrary to components of the non-reductive pathway, the above results indicate that transcription of genes of the reductive pathway for high-affinity iron assimilation is not upregulated upon oxidative stress. To determine whether protein levels parallel those of mRNAs, we tagged Ftr1 and Fet3 with a 3xHA epitope, and expressed them under the own promoter, followed by determination of protein levels before and at successive times upon *t*-BOOH addition. In parallel, we also analyzed Fit3 as a control for the non-reductive pathway. Protein levels were also determined in iron-limited (by BPS addition) and iron-replete (by FeSO<sub>4</sub> addition) cultures. No induction was observed for Fet3 after applying the stress (Figure 7A). In the case of Ftr1, a sustained decrease in protein levels was observed in stressed cells. On the other hand, Fit3 levels are transiently induced upon *t*-BOOH addition, and a low-migration band appears after the stress, pointing to post-translational modifications of Fit3 due to the stress. These results indicate that protein levels approximately parallel the behaviour of mRNA levels upon the oxidative stress, and that essential components of the reductive pathway do not become upregulated at the protein level. Intracellular iron levels were measured in the above experimental conditions, and confirmed that they remain basically constant upon the oxidative stress, with a modest decrease at intermediate times (Figure 7B).

#### ***Functionality of the Reductive Pathway for High-Affinity Iron Uptake is Negatively Affected by Oxidative Stress***

The oxidative stress-induced destabilization of the *FET3* and *FTR1* mRNAs, which contrasts with the fate of the mRNAs for the siderophore-mediated, non-reductive pathway for iron uptake, suggests that yeast cells need to maintain the reductive pathway under low level of activity during such stress conditions. We hypothesized that under oxidative stress *S. cerevisiae*

cells would tend to divert iron uptake towards the non-reductive pathway, in order to avoid the toxic effect of iron when transported through the reductive pathway in the presence of oxidants. In accordance with this, wild type cells growing in iron-limited conditions (+ BPS) are hypersensitive to a moderate dose of oxidant (0.3 mM hydrogen peroxide) compared to the same cells growing in non-BPS normal iron conditions (Figure 8, first row of upper panels). The sensitive phenotype of the wild type cells to peroxide is rescued when ferric iron-enterobactin is added to the medium in the presence of the BPS (Figure 8, first row of lower panels). In these conditions, most iron is internalized as siderophore-bound iron through the non-reductive pathway (Heymann *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001).

To further confirm the deleterious effect of oxidative stress on the reductive pathway, we analyzed the growth phenotypes of a  $\Delta fet3$  mutant with a non-functional reductive pathway (Askwith *et al.*, 1994) and a  $\Delta arn4$  mutant which is unable to assimilate ferric iron bound to enterobactin through the non-reductive pathway (Heymann *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2001). In normal-iron conditions, cells lacking Fet3 are more sensitive to moderate levels of hydrogen peroxide than wild type cells (Figure 8, upper panels). Since in these experimental conditions (no siderophore added to the medium) it is supposed that only the Fet4-mediated low-affinity iron uptake system is working, the observations point to a certain sensitivity of this system to oxidative stress conditions. As expected, in iron-limited medium the absence of Fet3 almost totally abrogated cell growth independently of the presence or absence of oxidant. Growth of the  $\Delta arn4$  mutant in normal-iron medium was very modestly affected by hydrogen peroxide at the doses employed. However, in low-iron medium in the presence of the oxidant growth inhibition was even more prominent than in wild type cells (Figure 8, upper panels), which gives support to the hypersensitivity of the Fet3-Ftr1 pathway to peroxide. When iron-bound enterobactin was added to the growth medium in the presence of BPS, both  $\Delta fet3$  and  $\Delta arn4$  mutants grew similarly to wild type cells, in accordance with previous reports (Yun *et al.*, 2001). Addition of hydrogen peroxide in these conditions has almost no effect on  $\Delta fet3$  cells with a functional non-reductive pathway, but had some negative effect on  $\Delta arn4$  cells in which only the reductive pathway is functional for uptake of the siderophore-bound iron (Yun *et al.*, 2001; Philpott and Protchenko, 2008) (Figure 8, lower panels). Altogether, these results indicate that the reductive pathway for iron uptake is more sensitive to oxidative stress than the non-reductive pathway.

## DISCUSSION

GRO analyses allow simultaneous determination of RA and TR at a genomic scale, in contrast to other global genomic studies which exclusively determine relative transcript levels. Using the GRO approach, we have observed that the genes of the Aft1 regulon transiently increase their TR upon oxidative stress, which is accompanied by temporary nuclear internalization of the Aft1 factor. Aft1 activation is mediated by functional mitochondrial machinery for Fe-S cluster synthesis, but not by the cytosolic components of this machinery (Rutherford *et al.*, 2005). The Atm1 protein, which exports Fe-S clusters from the mitochondria to the cytosol, and glutathione are also needed for Aft1 activation (Rutherford *et al.*, 2005). This supports the idea that some mitochondrial Fe-S protein participates in sensing the iron status of the yeast cell, in a pathway in which the Grx3/Grx4 and the Fra1/Fra2 protein pairs play a regulatory role at the cytosol (Ojeda *et al.*, 2006; Pujol-Carrión *et al.*, 2006; Kumánovics *et al.*, 2008). Although nucleocytoplasmic shuttling of Aft1 occurs constitutively, the Msn5 exportin promotes Aft1 export to the cytosol in iron-replete conditions but not under iron deprivation (Ueta *et al.*, 2007). It is not clear, however, the relationship between the Fe-S biosynthetic machinery and Msn5-mediated export of Aft1. Importantly, part of Aft1 activation depends on the iron cellular status independently of the Fe-S cluster synthesis (Kumánovics *et al.*, 2008). In this scheme, oxidative damage of the Fe-S cluster(s) of the hypothetical mitochondrial iron sensor could lead to Aft1 accumulation at the nucleus and consequent activation of the regulon. This would explain why a Grx5-defective mutant which is affected in Fe-S synthesis does not show activation of the Aft1 regulon over basal levels upon oxidative stress. Nevertheless, other compatible scenarios are possible. For instance, oxidative stress could directly inactivate some mitochondrial component of the Fe-S biosynthetic machinery. Also, oxidative stress could alter the redox state of Cys291 and Cys293 of Aft1, which is important for nucleocytoplasmic compartmentalization of Aft1 (Ojeda *et al.*, 2006; Ueta *et al.*, 2007). Another possible effect of oxidative stress could be the

inactivation of Grx3/Grx4 and its possible regulatory role on Aft1 activity, which would become induced.

Oxidative stress-induced TR upregulation is followed by RA increase for a number of the Aft1 regulon genes, among them three members of the *ARN* family and the *FIT1-3* genes. This suggests that under oxidative stress *S. cerevisiae* cells can import iron through the non-reductive pathway. On the contrary, the RA of two essential components of the reductive pathway such as *FTR1* and *FET3* does not increase, and we have confirmed that the levels of the respective proteins remain approximately constant. Yeast cells must therefore counteract the TR upregulation of the *FTR1* and *FET3* mRNAs to keep RA at low levels. We have shown that this results from destabilization of the respective mRNAs upon the oxidative stress, contrary to the situation for *FIT3* mRNA which is also required to maintain active the non-reductive pathway.

In *S. cerevisiae*, Cth2 and its homologue Cth1 on one hand and Rnt1 on the other cause specific destabilization or cleavage of different mRNA subsets in response to low or high iron cell content respectively, having both Cth1/Cth2 and Rnt1 important antagonistic roles in iron homeostasis (Lee *et al.*, 2005; Puig *et al.*, 2005, 2008). In our GRO analyses, only *CTH2* mRNA is strongly and temporary induced upon the oxidative stress, while *CTH1* and *RNT1* mRNAs become downregulated. In addition, Lee *et al.* (2005) reported no differences in *FTR1* mRNA levels between wild type and  $\Delta rnt1$  strains. We tested the possible participation of Cth2 in the destabilization of *FTR1* and *FET3* mRNAs, and the half-life of both mRNAs followed the same patterns in  $\Delta cth2$  and *CTH2* cells upon the oxidative stress, discarding a specific role of Cth2 in the stress response of genes of the Aft1 regulon. In addition, cells lacking *CTH2* did not show any sensitivity to oxidative stress. However, Cth2 seems to play a constitutive modulatory role on the mRNA levels of genes of the non-reductive pathway such as *FIT3* or *ARN2*, and in fact the decay rates of these mRNAs are lower in the absence of Cth2. We have not explored this constitutive function of Cth2 further. The specific factors which destabilize the *FTR1* and *FET3* mRNAs upon oxidative stress also remain to be determined.

Why yeast cells keep the high-affinity reductive pathway at low activity after applying an oxidative stress? The ferrous form of iron is incorporated by the plasma membrane Ftr1-Fet3 complex, and such ferrous ion is a potent generator of toxic reactive oxygen species, especially in the presence of peroxides. Ftr1 and Fet3 proteins themselves could be damaged in such conditions. The hypersensitivity of *S. cerevisiae* cells to oxidative stress in low-iron conditions as reported in this study gives support to such hypothesis. In natural conditions where siderophores may be available, yeast cells would redirect iron uptake towards the non-reductive pathway. In fact, *S. cerevisiae* is not sensitive to oxidative stress when enterobactin-iron complexes are the only iron source. Redirecting iron uptake to the non-reductive pathway could be a strategy for protection against the harmful effects of ferrous ions on the iron uptake process itself.

In our study, *S. cerevisiae* cells are hypersensitive to oxidative stress in a  $\Delta fet3$  mutant in normal-iron growth conditions, where the Fet4-mediated low-affinity system would be the only mean for iron acquisition. The sensitivity is reverted by enterobactin addition to the medium. This suggests that the low-affinity system is sensitive to oxidative stress. This system acts in anaerobiosis, whereas the high affinity system functions in aerobic iron-depleted conditions because of the oxygen dependence of the Ftr1/Fet3 complex (de Silva *et al.*, 1995; Hasset *et al.*, 1998). Our GRO data indicate that the low-affinity system permease, Fet4, strongly downregulates its TR upon oxidative stress (Molina-Navarro *et al.*, 2008). *FET4* is regulated by multiple environmental factors, such as iron limitation via Aft1, zinc status via Zap1, and the presence or absence of oxygen via Rox1 (Waters and Eide, 2002). Repression by Rox1 in oxygenated conditions helps to minimize metal toxicity by attenuating *FET4* activation by Aft1 and Zap1 in response to metals (Jensen and Culotta, 2002; Waters and Eide, 2002). The GRO data also indicate that *ROX1* expression is highly induced after the oxidative stress, which could explain the downregulation of *FET4* TR in these conditions. Thus, the mechanism of repression would ensure that *FET4* is not active to contribute to metal toxicity during oxidative stress, and is consequent with the toxic effects of peroxide on the low-affinity system.

Iron homeostasis involves not only the regulation of iron acquisition, but also the ability to store or release iron from the vacuole (Philpott and Protchenko, 2008). Oxidative stress changes the expression pattern of genes that are responsible to divert vacuolar iron content (Fig. 1). Thus, *FTH1* and *FET5* (which express iron exporters) upregulate their TR and RA. We have also observed a strong downregulation of the TR and RA of the vacuolar iron importer *CCC1* (GRO data in Molina-Navarro *et al.*, 2008), whose expression is regulated by the iron-

responsive transcriptional factor Yap5 (Li *et al.*, 2008). In iron-deprived conditions, destabilization effects on *CCC1* mRNA by Cth2 contribute to decreasing the levels of this mRNA (Puig *et al.*, 2005). All these data suggest an iron release from the vacuole to the cytosol upon oxidative stress which would help to maintain the cytosolic iron content while the reductive pathway for iron uptake remains at low activity.

Summarizing, we have provided evidences that upon oxidative stress yeast cells redirect their strategies to maintain iron homeostasis in order to minimize the possible toxic effects of iron, and that changes in the stabilities of some mRNAs of the reductive pathway for iron import play an important role in such strategies.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Esther Prustjens and Mireia Aresté for experimental help, and Sergi Puig for the gift of biological material. This work was supported by grants BFU2004-03167 and CSD2007-0020 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) and 2005SGR-00677 (Generalitat de Catalunya).

### REFERENCES

- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P.S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D.M., Kaplan, J. (1994). The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* 76, 403-410.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (1998a). Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast* 14, 1127-1138.
- Bellí, G., Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998b). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 26, 942-947.
- Bellí, G., Molina, M.M., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E., and Herrero, E. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 5-deficient cells subjected to continuous oxidizing conditions are affected in the expression of specific sets of genes. *J. Biol. Chem.* 279, 12386-12395.
- Blaiseau, P.L., Lesuisse, E., and Camadro, J.M. (2001). Aft2p, a novel iron-regulated transcription activator that modulates, with Aft1p, intracellular iron use and resistance to oxidative stress in yeast. *J. Biol. Chem.* 276, 34221-34226.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., and Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 27393-27398.
- De Silva, D.M., Askwith, C.C., Eide, D., and Kaplan, J. (1995). The *FET3* gene product required for high affinity iron transport in yeast is a cell surface ferroxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 1098-1101.
- Foury, F., and Talibi, D. (2001). Mitochondrial control of iron homeostasis: a genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain. *J. Biol. Chem.* 276, 7762-7768.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241-4257.
- Gietz, R.D., and Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 3065-3073.

- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford: Oxford University Press.
- Hassett, R.F., Romeo, A.M., and Kosman, D.J. (1998). Regulation of high affinity uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 7628-7636.
- Hausmann, A., Samans, B., Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Cellular and mitochondrial remodelling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 283, 8318-8330.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., and Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 1217-1235.
- Heymann, P., Ernst, J.F., and Winkelmann, G. (2000). A gene of the major facilitator superfamily encodes a transporter for enterobactin (Enb1p) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 13, 65-72.
- Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., Cabisco, E., Ros, J., and Tamarit, J. (2008). Major targets of iron-induced protein oxidative damage in frataxin-deficient yeasts are magnesium-binding proteins. *Free Rad. Biol. Med.* 44, 1712-1723.
- Jensen, L.T., and Culotta, V.C. (2002). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* *FET4* by oxygen and iron. *J. Mol. Biol.* 318, 251-260.
- Kumánovics, A., Chen, O.S., Li, L., Bagley, D., Adkins, E.M., Lin, H., Dingra, N.N., Outten, C.E., Keller, G., Winge, D., Ward, D.M., and 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. *J. Biol. Chem.* 283, 10276-10286.
- Lee, A., Henras, A.K., and Chanfreau, G. (2005). Multiple RNA surveillance pathways limit aberrant expression of iron uptake mRNAs and prevent iron toxicity in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell* 19, 39-51.
- Lesuisse, E., Blaiseau, P.L., Dancis, A., and Camadro, J.M. (2001). Siderophore uptake and use by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 147, 289-298.
- Li, L., Bagley, D., Ward, D.M., and Kaplan, J. (2008). Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1326-1337.
- Lill, R., and Mühlhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669-700.
- Molina-Navarro, M.M., Castells-Roca, L., Bellí, G., García-Martínez, J., Marín-Navarro, J., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E., and Herrero, E. (2008). Comprehensive transcriptional analysis of the oxidative response in yeast. *J. Biol. Chem.* 283, 17908-17918.
- Moye-Rowley, W.S. (2003). Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot. Cell* 2, 381-389.
- Ojeda, L., Keller, G., Mühlhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R., and Winge, D. (2006). Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 17661-17669.
- Pérez-Ortín, J.E., Alepuz, P., and Moreno, J. (2007). Genomics and gene transcription kinetics in yeast. *Trends Genet.* 23, 250-257.
- Philpott, C.C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 636-645.
- Philpott, C.C., and Protchenko, O. (2008). Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 7, 20-27.

## Articles

Protchenko, O., Ferea, T., Rachford, J., Tiedman, J., Brown, P.O., Botstein, D., and Philpott, C.C. (2001). Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *276*, 49244-49250.

Puig, S., Askeland, E., and Thiele, D. (2005). Coordinated remodelling of cellular metabolism during iron deficiency through targeted mRNA degradation. *Cell* *120*, 99-110.

Puig, S., Vergara, S.V., and Thiele, D.J. (2008). Cooperation of two mRNA-binding proteins drives metabolic adaptation to iron deficiency. *Cell Metab.* *7*, 555-564.

Pujol-Carrión, N., Bellí, G., Herrero, E., Nogués, A., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2006). Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *119*, 4554-4564.

Rodríguez-Manzanegue, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J., and Herrero, E. (2002). Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell* *13*, 1109-1121.

Rutherford, J.C., Jaron, S., Ray, E., Brown, P.O., and Winge, D.R. (2001). A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1. *Proc. NatlAcad. Sci. USA* *98*, 14322-14327.

Rutherford, J.C., Ojeda, L., Balk, J., Mühlenhoff, U., Lill, R., and Winge, D.R. (2005). Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 10135-10140.

Shakoury-Elizeh, M., Tiedman, J., Rashford, J., Ferea, T., Demeter, J., Garcia, E., Rolfes, R., Brown, P.O., Botstein, D., and Philpott, C.C. (2004). Transcriptional remodelling in response to iron deprivation in *Saccharomycetes cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1233-1243.

Shenton, D., Smirnova, J.B., Selley, J.N., Carroll, K., Hubbard, S.J., Pavitt, G.D., Ashe, M.P., and Grant, C.M. (2006). Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* *281*, 29011-29021.

Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* *350*, 3-41.

Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeño, A., and Ros, J. (2006). Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal. Biochem.* *351*, 149-151.

Ueta, R., Fujiwara, N., Iwai, K., and Yamaguchi-Iwai, Y. (2007). Mechanism underlying the iron-dependent nuclear export of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *18*, 2980-2990.

Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1793-1808.

Waters, B.M., and Eide, D.J. (2002). Combinatorial control of yeast *FET4* gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J. Biol. Chem.* *277*, 33749-33757.

Yamaguchi-Iwai, Y., Ueta, R., Fukunaka, A., and Sasaki, R. (2002). Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *277*, 18914-18918.

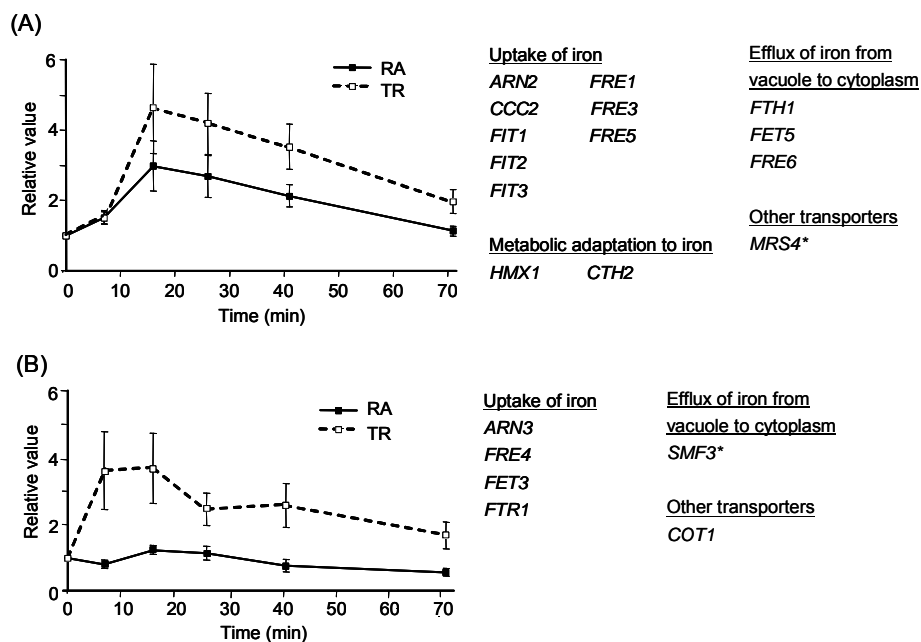
Yun, C.W., Bauler, M., Moore, R.E., Klebba, P.E., and Philpott, C.C. (2001). The role of the *FRE* family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *276*, 10218-10223.

Yun, C.W., Ferea, T., Rashford, J., Ardon, O., Brown, P.O., Botstein, D., Kaplan, J., and Philpott, C.C. (2000a). Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for two pathways of iron uptake. *J. Biol. Chem.* *275*, 10709-10715.

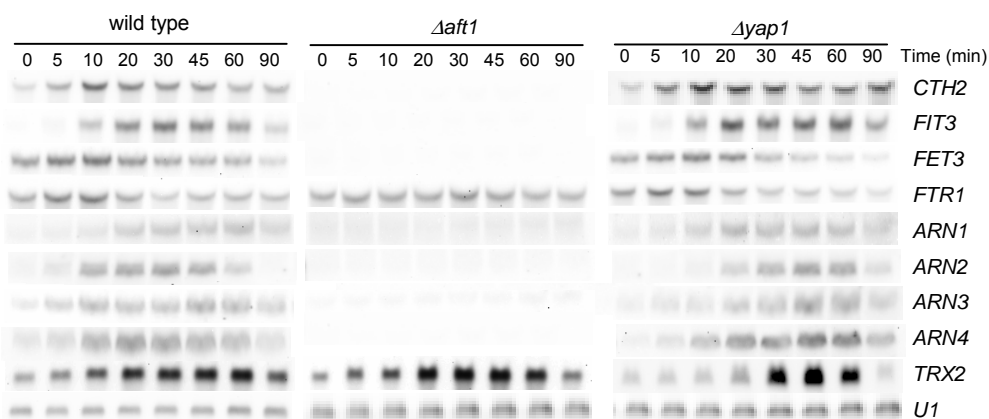
Yun, C.W., Tiedman, J.S., Moore, R.E., and Philpott, C.C. (2000b). Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J. Biol. Chem.* *275*, 16354-16359.



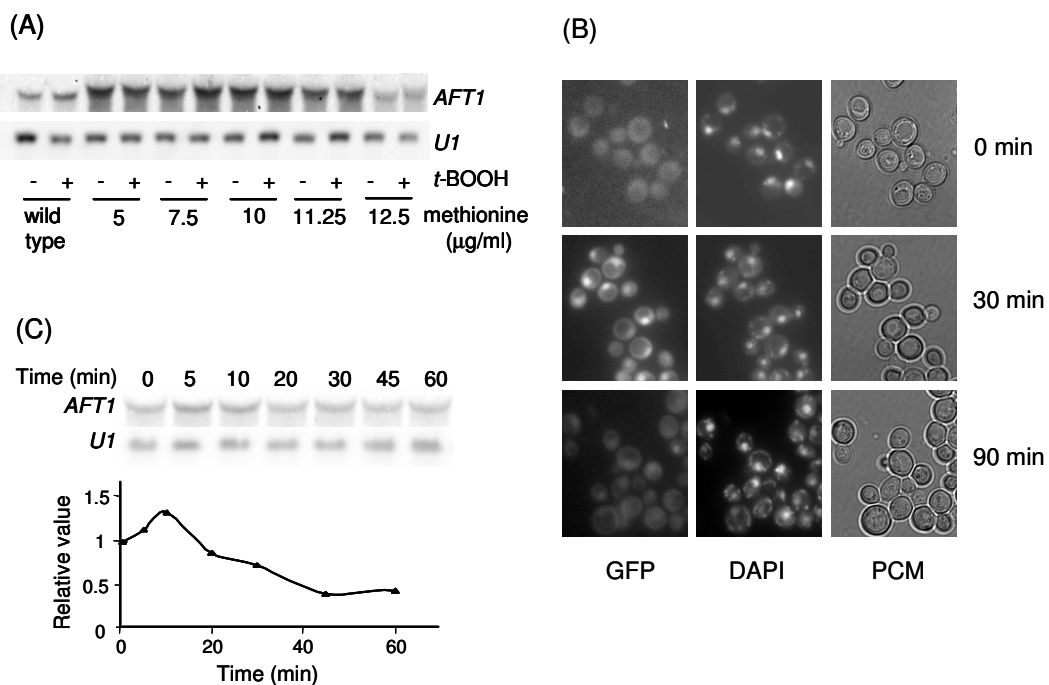




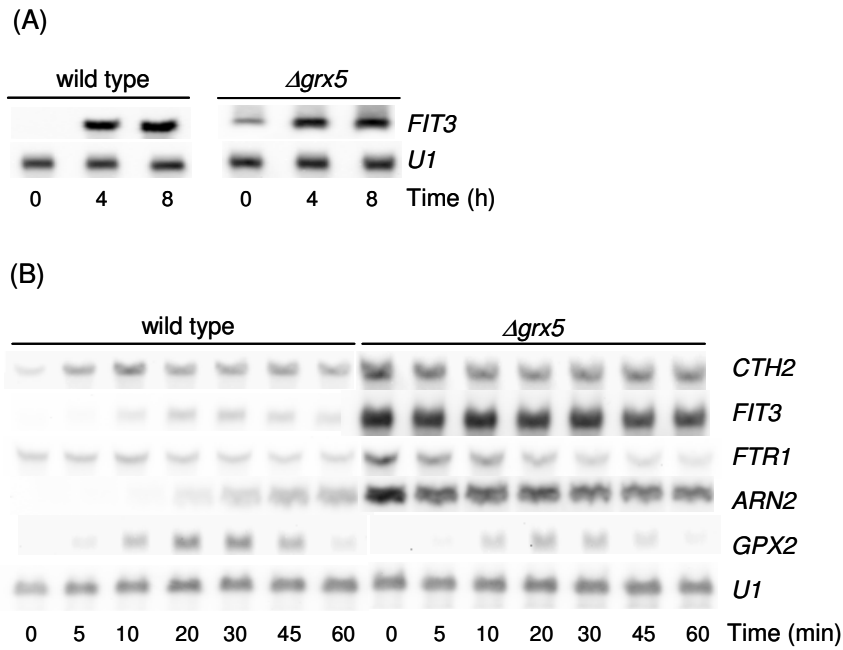
**Figure 1.** Genomic Run-On (GRO) analysis data of the oxidative stress response of Aft1/Aft2 target genes. Data were taken from Molina-Navarro *et al.* (2008), and are listed in Supplementary Table 1. The list of genes regulated by Aft1/Aft2 was taken from Philpott and Protchenko (2008). Asterisks mark the genes preferentially regulated by Aft2. Only are considered those genes for which GRO values existed for the entire time course (or at most one point was lacking) in at least two independent experiments. (A) Genes which upregulate both the mRNA levels (RA) and the transcription rate (TR) along the response. (B) Genes which upregulate TR but not RA along the response.



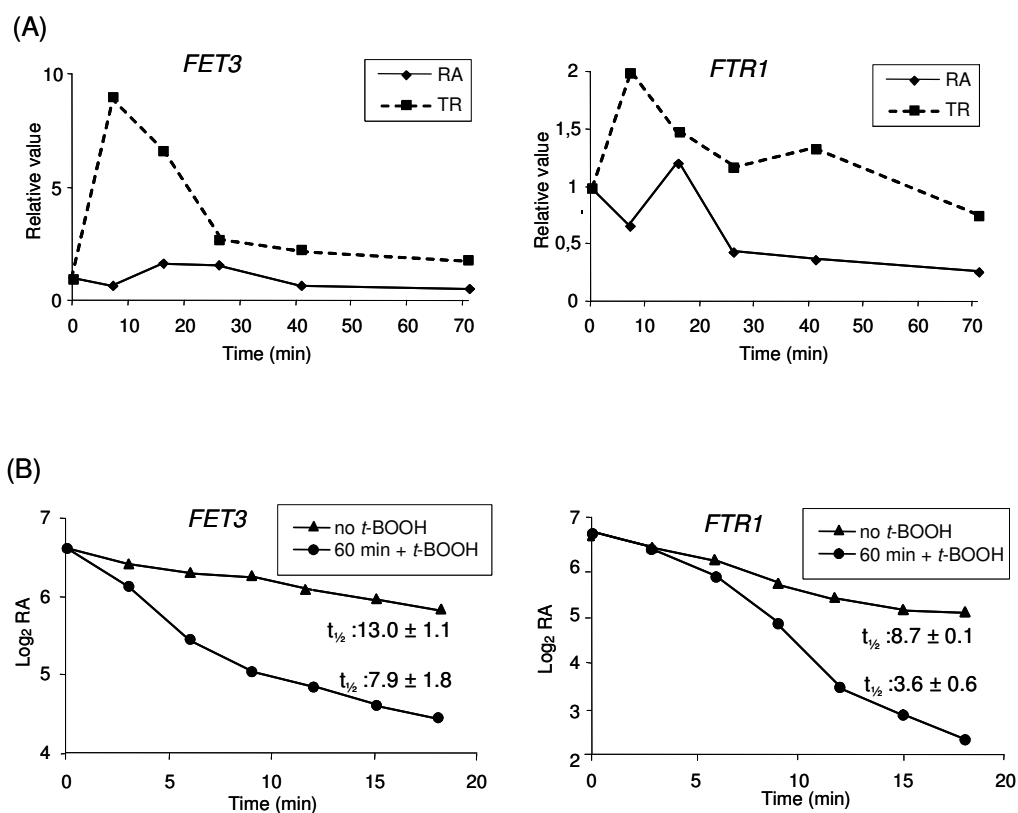
**Figure 2.** Northern blot analysis of genes regulated by Aft1 during the response to oxidative stress provoked by 0.1 mM *t*-BOOH added at time 0 to cells growing exponentially in YPD medium. *TRX2* is included as a gene responding to oxidants in a Yap1-dependent manner, and *U1* as a loading control. The following strains were employed: W303-1A (wild type), MML348 ( $\Delta aft1$ ) and W303yap1 ( $\Delta yap1$ ).



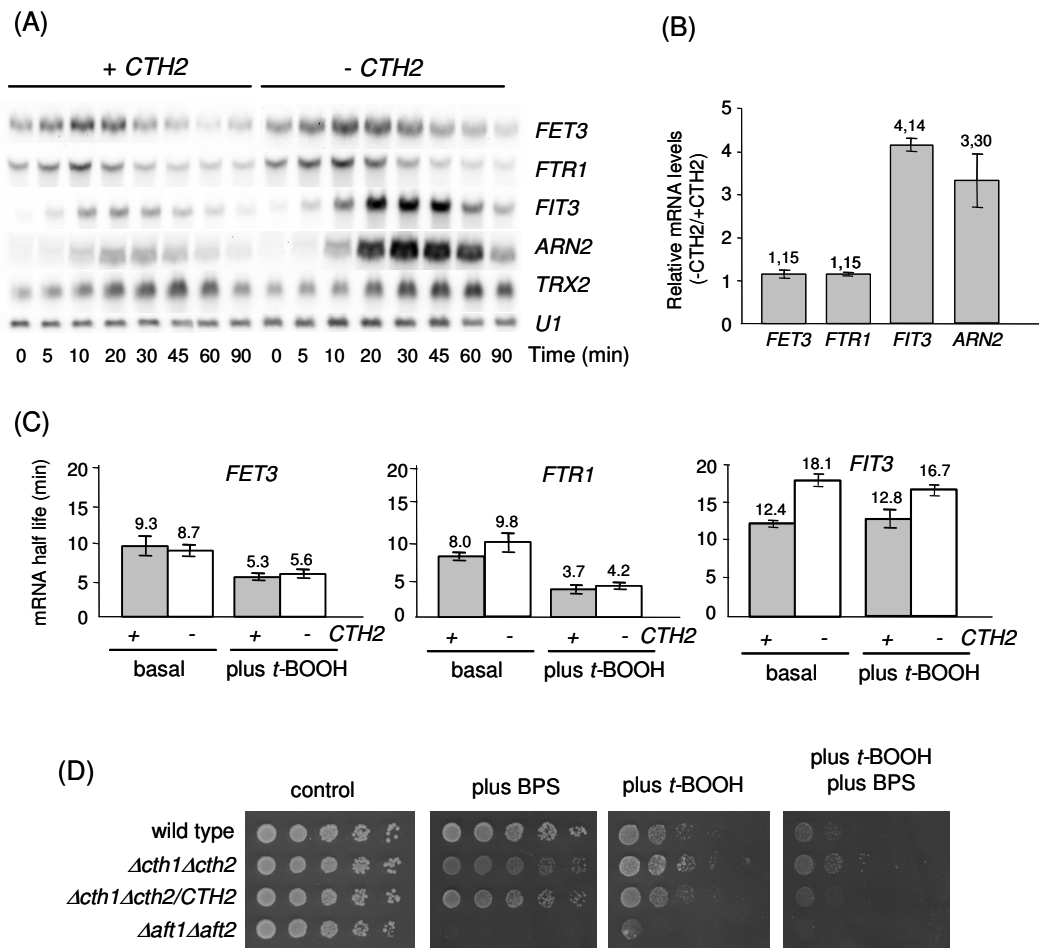
**Figure 3.** Aft1 is transiently localized into the nucleus upon oxidative stress. (A) Mutant  $\Delta aft1$  (MML348) cells transformed with plasmid pMM412 (which contains a *GFP-AFT1* construction under the *MET25* promoter) were grown exponentially in SD medium containing the indicated methionine concentrations to regulate gene expression under the *MET25* promoter. Samples without (-) or after 20 min with 0.1 mM *t-BOOH* (+) were analyzed by Northern blot with the *AFT1* probe. *U1* was used as loading control. The two most left lines correspond to samples from wild type W303-1A cells expressing *AFT1* under the own promoter. (B) The *GFP-Aft1* fusion protein expressed in pMM412-transformed MML348 cells was visualized by fluorescence microscopy at the indicated times after 0.1 mM *t-BOOH* addition. Cells were grown to exponential phase in SD medium containing 12.5 μg/ml of methionine. (C) Northern blot analysis of *AFT1* mRNA levels upon oxidative stress (0.1 mM *t-BOOH* at the indicated times) on wild type W303-1A cells. *AFT1* mRNA signals were quantified, divided by the respective *U1* loading control signal and plotted against treatment time, made relative to the unit value at time 0.



**Figure 4.** The Aft1 regulon is not activated by oxidative stress in the absence of functional machinery for the synthesis of Fe-S clusters. (A) Northern blot analysis of *FIT3* expression in W303-1A (wild type) and MML100 ( $\Delta grx5$ ) cells growing in YPD medium with 2 mM ferrozine added at time 0. *U1* was employed as loading control. (B) Northern blot analysis of the indicated genes in exponentially growing wild type (W303-1A) and  $\Delta grx5$  (MML100) cells in YPD medium, with 0.1 mM *t*-BOOH added at time 0. *GPX2* is included as a gene responding to oxidative stress, and *U1* as a loading control.



**Figure 5.** The half-lives of mRNAs of the reductive pathway for iron uptake decrease upon addition of *t*-BOOH. (A) GRO data of the evolution of RA and TR in wild type W303-1A cells, after addition of 0.1 mM *t*-BOOH at time 0 to exponentially-growing cultures. The data were taken from Supplementary Table S1. (B) Strains expressing *FET3* (left panel, MML1099) or *FTR1* (right panel, MML1093) under the control of the *tetO<sub>2</sub>* promoter were grown exponentially in YPD medium. Doxycycline (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added at time 0 to exponentially growing cultures that had not been exposed to *t*-BOOH or 60 min after the addition of 0.1 mM *t*-BOOH. In each case, aliquots were taken at time 0 and at successive times after the addition of doxycycline, for total mRNA isolation and determination of levels of the corresponding mRNA by Northern analysis. Graphics represent the evolution of experimentally determined relative RA in log scale as a function of time for a representative experiment. Mean half-life values ( $t_{1/2}$ ) plus standard deviation for a total of three independent experiments are also indicated. To determine  $t_{1/2}$  values, linear regression of experimental data was calculated.



**Figure 6.** Effect of Cth2 on the expression of the Aft1 regulon genes upon oxidative stress. (A) Northern blot analysis of the indicated genes in exponential cultures of MML1082 (+*CTH2*) and MML1081 (-*CTH2*) cells in YPD medium treated for the indicated times with 0.1 mM *t*-BOOH. *TRX2* is included as a control for genes responsive to oxidative stress, and *U1* as a loading control. (B) Quantification of basal levels of expression (untreated exponential cultures in YPD medium) of the indicated genes of the Aft1 regulon in MML1081 (-*CTH2*) cells relative to MML1082 (+*CTH2*) cells. Bars represent the mean plus standard deviation values of three independent experiments. (C) Half-lives of the mRNAs of the indicated genes in basal conditions (exponential growth in YPD medium) and after 60 min in the presence of 0.1 mM *t*-BOOH. Calculations were made as in Fig. 5B, and bars represent the mean plus standard deviation of three independent experiments. The following strains expressing the respective genes under the *tetO*<sub>2</sub> promoter were employed: MML1123 (+*CTH2*) and MML1122 (-*CTH2*) for *FET3*, MML1116 (+*CTH2*) and MML1114 (-*CTH2*) for *FTR1*, and MML1119 (+*CTH2*) and MML1120 (-*CTH2*) for *FIT3*. (D) Growth assays of serial dilutions of the following strains in YPD medium plates added with 0.075 mM BPS and/or 0.25 mM *t*-BOOH: W303-1A (wild type), MML1081 ( $\Delta$ *cth1*  $\Delta$ *cth2*), MML1082 ( $\Delta$ *cth1*  $\Delta$ *cth2*/*CTH2*) and MML1088 ( $\Delta$ *aft1*  $\Delta$ *aft2*).