

Nuevas funciones de Gcn2p en respuesta a estrés ácido y genotóxico

RAFAEL APARICIO SANCHIS

**EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

“Nuevas funciones de Gcn2p en respuesta a estrés ácido y genotóxico”

Rafael Aparicio Sanchis

DIRECTORES

Dr. José Ramón Murguía Ibañez

Dr. Ramón Serrano Salom

Valencia, febrero 2014



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**“Nuevas funciones de Gcn2p
en respuesta
a estrés ácido y genotóxico”**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
Rafael Aparicio Sanchis

DIRECTORES

Dr. José Ramón Murguía Ibañez
Dr. Ramón Serrano Salom

Valencia, febrero 2014

Colección Tesis Doctorales

© Rafael Aparicio Sanchis

© 2014, de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València
Telf.: 963 877 012 / www.lalibreria.upv.es

ISBN: 978-84-9048-199-8 (versión CD)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

En memoria de:

ENRIQUE APARICIO APARICIO

(07/12/1946-08/06/2013)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que me habéis apoyado en todo aunque no entendieseis exactamente mi cometido y mi trabajo y sin vosotros nada de esto hubiese sido posible. Aunque solo tú mama podrás leer estas palabras, gracias por todo, se te quiere mucho, espero que estés orgullosa, como se que él lo estaría. A mis hermanos/as Enrique, Marisol y Mayte, y mis cuñados Eduardo y Adelino, quienes también me han apoyado siempre, y siempre están ahí. Siguiendo con la familia, también agradecer a mis sobrinas, Noelia, Yanira y Mireia, las cuales han ido creciendo a lo largo de está tesis y me han dado muchos momentos de alegrías y sonrisas.

A mis directores José Ramón Murguía y Ramón Serrano por permitirme realizar está tesis. Agradecer a JoseRa que me ha guiado día a día, contagiándome la curiosidad científica, compartiendo conmigo sus conocimientos y entusiasmo y por darme ánimos en los momentos difíciles que han surgido durante estos años. A Ramón que ha estado siempre dispuesto a resolverme dudas, por su apoyo en los momentos difíciles, y por contar conmigo en todo momento. Agradecer a Mariche por su trato, por su apoyo y ánimo transmitidos hacia mi, tanto a nivel profesional como personal. También agradecer a Pepe Gadea, con el que he tenido el placer de trabajar codo con codo durante un tiempo, en mi pequeña aventura con Gcn2p en *Arabidopsis thaliana*. A Markus y Payo por su gran compañerismo, trato y disposición en cualquier momento a resolver cualquier duda o aclaración, a Lynne por los Nespresso, de gran ayuda en el día a día. Por último, agradecer también la financiación económica de está tesis.

A mis compañeros de grupo y laboratorio 1.09, actuales y pasados como Miguel, Irene, Mónica, Amelia, Isabel, Silvia (que desgraciadamente ya no esta entre nosotros), Laura, Marta, Maki, Juan, Roser y otros que han estado menos tiempo como Marta Llorens, Raquel, Ivan y alguno más que se me olvida, pero ha sido un placer trabajar con todos vosotros. En especial a Juan, Roser, Marta Moreno, Maki, ha sido un placer

enseñaros y gracias por vuestra ayuda. A Alessandro y Alba, que serán los próximos doctores, ánimo con ello, a Sara, Elena, Dani, Pablo, Isa, Rosa gracias por vuestro compañerismo y los buenos momentos que he disfrutado en vuestra compañía tanto, en el laboratorio como en almuerzos, comidas, etc. También agradecer a antiguos miembros del laboratorio de los que también he gozado y aprehendido trabajando junto a ellos, como Fer, Julia, Leti, Paula, Cristina, Laura, Mar, Carol, Laia y alguno más que me dejó en el tintero. A Edu, Enric, Félix, Gaetano, Jesús, Lola, Marcos, Ceci, Alba, Vicent, Ana Cristina, Guillem, Jorge, Leda, Regina, Ana Jano, Bea, Sara os agradezco todos los buenos momentos compartidos.

A los compañeros del Master de Biología Molecular y Celular de Plantas: Laura, Patri, Vanesa, Juanvi, Cristina, Enric, Alessandro, Félix, Ceci, Antoni, Estefania, Lucía, Sofia, Marta, Anna, Fede, Liliam, etc. Gracias por las cenas de Master y demás eventos. Con especial aprecio a Ceci y Laura, Patri, Félix, por su gran amistad surgida durante este viaje común de la tesis doctoral.

A mis queridos Bea, Isa, Carlos, Vicent (“my brother”), Ali, Lluci, Leo, Josete, Jaime, que siempre estáis apoyándome. También a Raquel, Chus, Jero, María, Santi, Vici, Belén, Hugo, Ángel, Sergi y un largo etcétera a los que os veo menos por las circunstancias pero se os echa de menos y se agradecen los reencuentros. A los amigos con los que he convivido en algún momento durante la carrera o el doctorado como Pedro, Enrique, Joan, Marga, Adris.

RESUMEN

El control traduccional y la traducción selectiva de algunos mRNA representan un mecanismo regulador de las células para adaptarse a diversas condiciones fisiológicas y de estrés ambiental. En *Saccharomyces cerevisiae* la activación de la ruta de control traduccional GCN, cuyo transductor principal es la quinasa Gcn2p, favorece la adaptación a situaciones de estrés por falta de nutrientes. Gcn2p es activada por tRNA descargados durante condiciones de ayuno de aminoácidos. Gcn2p fosforila eIF2 α (Sui2p) en ser51 y esto inhibe la traducción general de los mRNA, al mismo tiempo que permite la traducción selectiva de determinados mRNA que son necesarios para la supervivencia celular. Uno de ellos es el mRNA de *GCN4*, un factor de transcripción que regula genes de biosíntesis de amino ácidos entre otros.

El pH intracelular modula la actividad de muchos sistemas celulares, pero los mecanismos de regulación y de percepción son en su mayoría desconocidos. Previamente en el grupo se han identificado dos genes de *S. cerevisiae* importantes para la tolerancia a la acidificación intracelular causada por ácidos débiles permeables: *LEU2* y *GCN2*. En la presente tesis se ha comprobado que *LEU2*, funciona eliminando la dependencia de la absorción de leucina extracelular en cepas con auxotrofia para este aminoácido. Además, se ha profundizado en los mecanismos moleculares por los cuales Gcn2p responde a pH ácido intracelular. La acidificación intracelular activa Gcn2p probablemente por la inhibición de las aminoacil-tRNA sintetasas porque se observa la acumulación de tRNA^{leu} descargados en condiciones sin ayuno de leucina. Gcn2p es requerida para el transporte de leucina y un mutante nulo *gcn2 Δ* es sensible al estrés ácido si es auxótrofo para leucina y Gcn4p no se requiere para la tolerancia a ácido. Además un mutante ser51>ala en eIF2 α es sensible a ácido, lo que sugiere que Gcn2p, mediante la fosforilación de eIF2 α , puede activar la traducción de un

regulador desconocido de transportadores de aminoácidos distinto de Gcn4p.

En relación al estrés genotóxico, evidencias previas muestran que Gcn2p está implicado en el control del ciclo celular en respuesta a daño al DNA regulando la transición de fase G1-S. Pero, ¿cómo ocurre esta respuesta de Gcn2p y qué efectores están implicados? Hemos descubierto que distintos agentes lesionantes del DNA activan la quinasa Gcn2p, entre ellos el agente alquilante MMS. Todos ellos de algún modo generan estrés replicativo. La caracterización genética con los mutantes de la ruta GCN muestra que Gcn1p/Gcn20p están implicados en la fosforilación de eIF2 α por Gcn2p en respuesta a MMS. Además Gcn1p y Gcn2p pueden tener un papel relacionado con la toxicidad por MMS independientemente del control traduccional. El rastreo de diversas proteínas de control de daño y/o de reparación del DNA muestra que las proteínas Xrs2p, Tel1p y Mag1p se requieren para la activación de Gcn2p provocada por MMS. Las dos primeras, actúan en una ruta de señalización y control de daño donde el complejo MRX es independiente del control traduccional. La activación de Gcn2p también es dependiente de la proteína de reparación codificada por *MAG1* (3-metiladenina DNA glicosilasa), la cuál es necesaria para la reparación del DNA debido a daño causado por agentes alquilantes como MMS. En la respuesta a MMS mediada por el control traduccional parece estar implicado el complejo epistático RAD52. Por lo tanto, Gcn2p está conectado funcionalmente con la maquinaria de reparación y/o control de daño en el DNA. La activación de Gcn2p por MMS está mediada por la inhibición de ciertas aminoacil-tRNA sintetasas. De ellas, parece tener un papel relevante Frs2p, la subunidad α de la fenilalanil-tRNA sintetasa citosólica.

RESUM

El control traduccional i la traducció selectiva d'alguns mRNA representen un mecanisme regulador de les cèl·lules per a adaptar-se a diverses condicions fisiològiques i d'estrés ambiental. En el llevat, *Saccharomyces cerevisiae* l'activació de la ruta de control traduccional GCN, de la qual la quinasa Gcn2p és el transductor principal, afavoreix l'adaptació a situacions d'estrés per falta de nutrients. Gcn2p és activada per tRNA descarregats durant condicions de dejuni d'aminoàcids. Gcn2p fosforila eIF2 α (Sui2p) en Ser51 i açò inhibeix la traducció general dels mRNA, alhora que permet la traducció selectiva de determinats mRNA que són necessaris per a la supervivència cel·lular. Un d'ells és el mRNA de *GCN4*, un factor de transcripció que regula gens de biosíntesi d'amino àcids entre altres.

El pH intracel·lular modula l'activitat de molts sistemes cel·lulars, però els mecanismes de regulació i de percepció són majoritàriament desconeguts. Prèviament en el grup s'ha identificat dos gens de *S. cerevisiae* importants per a la tolerància a l'acidificació intracel·lular causada per àcids dèbils permeables: *LEU2* i *GCN2*. En la present tesi s'ha comprovat que *LEU2*, funciona eliminant la dependència de l'absorció de leucina extracel·lular en soques amb auxotrofia per a aquest aminoàcid. A més, s'ha aprofundit en els mecanismes moleculars pels quals Gcn2p respon a pH àcid intracel·lular. L'acidificació intracel·lular activa Gcn2p probablement per la inhibició de les aminoacil-tRNA sintetases perquè s'observa l'acumulació de tRNA^{leu} descarregats en condicions sense dejuni de leucina. Gcn2p és requerida per al transport de leucina i un mutant nul *gcn2 Δ* és sensible a l'estrés àcid sí aquest és auxòtrof per a leucina i Gcn4p no es requereix per a la tolerància a àcid. A més, un mutant ser51>ala en eIF2 α és sensible a àcid, la qual cosa suggerix que Gcn2p, per mitjà de la fosforilació de eIF2 α , pot activar la traducció d'un regulador desconegut de transportadors d' aminoàcids diferent de Gcn4p.

En relació a l'estrés genotòxic, evidències prèvies mostren que Gcn2p està implicat en el control del cicle cel·lular en resposta a dany al DNA regulant la transició de fase G1-S. Però, ¿com ocorre aquesta resposta de Gcn2p i quins efectors estan implicats? Hem descobert que distints agents lesionants del DNA activen la quinasa Gcn2p, entre ells l'agent alquilant MMS. Tots ells d'alguna manera generen estrés replicatiu. La caracterització genètica en els mutants de la ruta GCN mostra que Gcn1p/Gcn20p estan implicats en la fosforilació d'eIF2 α per Gcn2p en resposta a MMS. A més Gcn1p i Gcn2p pot tindre un paper relacionat amb la toxicitat per MMS independentment del control traduccional. El rastreig de diverses proteïnes de control de dany y/o de reparació del DNA mostra que les proteïnes Xrs2p, Tel1p i Mag1p es requereixen per a l'activació de Gcn2p provocada per MMS. Les dos primeres, actuen en una ruta de senyalització i control de dany on el complex MRX és independent del control traduccional. L'activació de Gcn2p també és dependent de la proteïna de reparació codificada per *MAG1* (3-metiladenina DNA glicosilasa), la qual és necessària per a la reparació de l'DNA a causa de dany causat per agents alquilants com MMS. En la resposta a MMS mediada pel control traduccional pareix estar implicat el complex epistàtic RAD52. Per tant, Gcn2p està connectat funcionalment amb la maquinària de reparació i/o control de dany en el DNA. L'activació de Gcn2p per MMS està mediada per la inhibició de certes aminoacil-tRNA sintetases. D'elles, pareix tindre un paper rellevant Frs2p, la subunitat α de la fenilalanil-tRNA sintetasa citosol-ica.

ABSTRACT

Translational control and selective translation of some mRNAs represents a regulatory mechanism of cell to adapt to various physiological and environmental stresses. In *Saccharomyces cerevisiae*, activation of the translational control pathway GCN, whose major transducer is Gcn2p kinase, favours adapt to stress by nutrient starvation. Gcn2p is activated by uncharged tRNA in amino acid starvation conditions. Gcn2p phosphorylated to eIF2 α (Sui2p) at ser-51 and this inhibits mRNA general translation, while enabling selective translation of some mRNA that are necessary for cellular survival. One is *GCN4* mRNA, a transcription factor that regulated biosynthesis gene activation between others.

Intracellular pH modulates many cellular systems, but mechanism of regulation and perception are mostly unknown. Previously in the group has identified two genes of *S. cerevisiae* important for tolerance to intracellular acidification by permeable weak acid: *LEU2* and *GCN2*. In this thesis, it was found that *LEU2* works by removing the dependence of extracellular leucine uptake in strains with leucine auxotrophy. Also, it was done on the molecular mechanisms by which Gcn2p respond to acid intracellular pH. Gcn2p intracellular acidification activates probably by inhibition of aminoacyl-tRNA synthetase because we observe the accumulation of uncharged tRNA^{leu} without leucine starvation. Gcn2p is required for leucine transport and knockout mutant *gcn2 Δ* is sensitive to acid stress if auxotrophy for leucine and Gcn4p isn't required for acid tolerance. Also, at ser51>ala eIF2 α mutant is acid sensitive; this suggests that Gcn2p, by phosphorylation of eIF2 α , can activate translation of unknown regulator of amino acid transporter different to Gcn4p.

In relation to genotoxic stress, previous evidence showed that Gcn2p is involved in cell cycle control in response to DNA damage by regulating the G1-S transition. But, how Gcn2p response happens and what effectors are involved? We have

discovered that different DNA-damaging agents activated Gcn2p kinase, including the alkylating agent MMS. All of them somehow generate replication stress. The genetic characterization of the mutants of GCN pathway shows that Gcn1p and Gcn20p are involved in the phosphorylation of eIF2 α by Gcn2p in response to MMS. Furthermore Gcn2p and Gcn1p may have a role associated with MMS toxicity independent of translational control.

Screening of various checkpoint and/or DNA repair proteins showed that Xrs2p, Tel1p and Mag1p are required for activation of Gcn2p induced by MMS. Xrs2p and Tel1p participate in signalling and checkpoint DNA damage pathway, where the MRX complex is independent of translational control. Gcn2p activation is dependent of repair protein encoded by *MAG1* (3-methyladenine DNA glycosylase), which is required for DNA damage repair due to alkylating agents such as MMS. In response to MMS-mediated translational control appears to be implicated RAD52 epistatic complex. Therefore Gcn2p is functionally connected with the DNA damage repair machinery and/or checkpoint. Gcn2p activation by MMS is mediated by inhibition of some aminoacyl-tRNA synthetases. Between this appear to have an important role Frs2p, α subunit of cytosolic phenylalanyl-tRNA synthetase.

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

ÍNDICE DE FIGURAS:.....	X
ÍNDICE DE TABLAS:.....	XII
LISTA ABREVIATURAS MÁS USADAS:.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Respuestas celulares al estrés.....	3
2. Control de la traducción en respuesta al estrés. La ruta GCN.....	5
3. Estrés ácido.....	15
A. La homeostasis del pH en levadura.....	15
B. Ácidos orgánicos como conservantes alimentarios. ...	18
.....	18
Bases químicas de los ácidos débiles.....	18
Efectos celulares en la levadura.	20
4. Estrés genotóxico.....	23
A. Rutas de control de ciclo celular en respuesta a lesiones en el DNA.	23
B. Mecanismos específicos de reparación de daño...30	
1) Señalización y reparación de roturas de doble hebra (DSB).....	30
2) Roturas de simple cadena y sitios abásicos en el DNA.	32
“ <i>Base Excision Repair</i> ” (BER).....	33
“ <i>Nucleotic Excision Repair</i> ” (NER):.....	34
“ <i>Error Free Post-Replication Repair</i> ” (PRR).....	34
3) Bases desapareadas.	35
OBJETIVOS:	37
II. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	39
1. Medios y ensayos de crecimiento celular.....	41
A. Cepas de levadura empleadas.	41
B. Medios de cultivo.	41
C. Ensayos de crecimiento en medio líquido.	50
D. Ensayos de crecimiento en medio sólido (“goteos”). .	53
.....	53
E. Ensayos clonogénicos de viabilidad.	53
F. Cultivo y manipulación de bacterias.	54

2.	Tratamientos.....	55
A.	Agentes para inducir la acidificación intracelular. .	55
B.	Agentes genotóxicos.	55
3.	Inmunodetección de proteínas.	58
A.	Extractos proteicos.	58
B.	Electroforesis.	58
C.	Transferencia a membrana.....	58
D.	Tinción de membrana con “ <i>Direct Blue 71</i> ”.	59
E.	Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.....	59
4.	Aislamiento de tRNA y análisis por “<i>Northern Blot</i>”.	61
A.	Aislamiento de tRNA.....	61
B.	Electroforesis y transferencia de membrana del tRNA.	62
C.	Marcaje de la sonda y detección de tRNA.....	62
5.	Transformación de bacterias y levaduras.....	64
A.	Preparación de células competentes de bacteria. .	64
B.	Purificación de plásmidos.	64
C.	Transformación en bacteria.	65
D.	Transformación en levadura.	65
6.	Ensayos enzimáticos.....	66
A.	Determinación del contenido celular de ATP.....	66
B.	Ensayo de actividad β -Galactosidasa.....	66
III.	NUEVO PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA Gcn2p DE LEVADURA EN LA TOLERANCIA A ESTRÉS ÁCIDO INTRACELULAR.	69
	RESULTADOS	71
1.	Resultados previos.	71
2.	<i>LEU2</i> restaura la sensibilidad del mutante nulo <i>gcn2Δ</i> a ácido acético.	71
3.	La acidificación no implica estrés energético. .	76
4.	Caracterización de mutantes de la ruta GCN en respuesta a ácido acético.....	78
5.	Gcn2p es activado por la acidificación intracelular sin ayuno de aminoácidos.	80

6.	La acidificación intracelular induce la acumulación de tRNA descargados y los mutantes haploinsuficientes de algunas aminoacil-tRNA sintetasas son hipersensibles a ácido acético.....	82
	DISCUSIÓN	87
IV.	NUEVO PAPEL DE LA QUINASA Gcn2p DE LEVADURA EN RESPUESTA A ESTRÉS GENOTÓXICO.....	91
	RESULTADOS:	93
1.	Activación de Gcn2p en respuesta a diferentes agentes genotóxicos.....	93
2.	Caracterización genética de los diferentes mutantes <i>gcn</i> en respuesta a MMS.....	96
3.	La supervivencia a MMS es independiente de fosforilación de la ser51 en eIF2 α	106
4.	Papel de las rutas de señalización y/o reparación del daño al DNA celular en la activación de Gcn2p por MMS.	108
5.	Papel de las rutas de reparación del daño en el DNA celular en la activación de Gcn2p por MMS.	113
6.	Análisis de traducción selectiva de Gcn4p en los mutantes de las rutas de reparación del DNA.	115
7.	Análisis de la implicación de tRNA descargados en la activación de Gcn2p en respuesta a MMS.	117
8.	Caracterización de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas seleccionados en el rastreo con MMS.....	121
9.	Caracterización de respuesta a MMS en cepas que sobreexpresan las diferentes aminoacil-tRNA sintetasas.....	125
	DISCUSIÓN	134
V.	CONCLUSIONES	143
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 01: Modelo del control traduccional de <i>GCN4</i> mediante la fosforilación de eIF2 por Gcn2p [modificado a partir de (Hinnebusch 2005)]	7
Figura 02: Esquema de la proteína Gcn2p de levadura.	9
Figura 03: Modelo del papel estimulador del complejo Gcn1p-Gcn20p en la activación de Gcn2p por presencia de tRNA descargados.	11
Figura 04: Esquema de las quinasas de eIF2 en mamíferos... ..	14
Figura 05: Respuesta adaptativa a estrés ácido en levadura. ..	21
Figura 06: Ciclo celular y puntos de control en <i>S cerevisiae</i> . ..	25
Figura 07: Activación de control de daño en respuesta a DSB en levadura.	31
Figura 08: Curva sigmoidea de crecimiento en levaduras.	52
Figura 09: Tolerancia al ácido conferida por la sobreexpresión de <i>LEU2</i> en medio sólido.	72
Figura 10: Tolerancia al ácido conferida por la sobreexpresión de <i>LEU2</i> en medio líquido.	74
Figura 11: Medición consumo ATP en condiciones de estrés ácido.	77
Figura 12: Sensibilidad a estrés ácido de los mutantes de la ruta GCN.	79
Figura 13: El estrés ácido intracelular activa Gcn2p.	81
Figura 14: El ácido acético induce la acumulación de tRNA ^{leu} descargados.	83
Figura 15: Representación gráfica del índice fenotípico en respuesta a ácido acético de mutantes haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetasas de levadura en comparación a la cepa silvestre.	86
Figura 16: Modelo propuesto del papel de Gcn2p en la homeostasis de pH.	90
Figura 17: Fosforilación de eIF2 α en respuesta a distintos genotóxicos.	94
Figura 18: Genotóxicos del DNA a distintas dosis activan Gcn2p.	95

Figura 19: Efecto del MMS en el mutante <i>gcn2Δ</i>	97
Figura 20: Efecto del MMS en el mutante <i>gcn1Δ</i>	98
Figura 21: Efecto del MMS en el mutante <i>gcn20Δ</i>	99
Figura 22: Efecto del MMS en el mutante <i>gcn3Δ</i>	101
Figura 23: Efecto del MMS en el mutante <i>gcn4Δ</i>	102
Figura 24: Crecimiento de mutantes <i>gcn</i> en distintas dosis de MMS	105
Figura 25: Caracterización mutante <i>Sui2Δ</i> S51A en respuesta a MMS	107
Figura 26: Análisis nivel fosforilación eIF2 α en mutantes de proteínas de control de daño al DNA:.....	109
Figura 27: Análisis del papel del complejo MRX en la fosforilación de eIF2 y en actividad β -Galactosidasa dependiente de la traducción de <i>GCN4</i>	112
Figura 28: Análisis de proteínas de reparación en respuesta a 0,02% de MMS en relación a fosforilación de eIF2 α	114
Figura 29: Actividad β -Galactosidasa en mutantes de rutas de reparación del DNA.	116
Figura 30: Viabilidad de mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetetas más sensibles a MMS.....	121
Figura 31: Análisis nivel fosforilación eIF2 α en mutantes haploinsuficientes en TRS en respuesta 0,1% MMS durante 2 horas.	123
Figura 32: Curso temporal de fosforilación de eIF2 α en mutante haploinsuficiente en <i>FRS2</i> tratado con 0,1% de MMS.	124
Figura 33: Análisis de fosforilación de eIF2 α inducida por MMS en el mutante de sobreexpresión de <i>FRS2</i>	126
Figura 34: Caracterización crecimiento sobreexpresando <i>FRS2</i> en mutantes defectivos en señalización de daño al DNA.	129
Figura 35: Análisis de nivel de fosforilación en mutantes deficientes en señalización de daño al DNA sobreexpresando <i>FRS2</i>	131
Figura 36: Fosforilación eIF2 α en BY4741 y <i>gcn2Δ</i> sobreexpresando <i>FRS2</i>	133
Figura 37: Modelo propuesto del papel de Gcn2p en estrés genotóxico.	142

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Proteínas de respuesta a daño al DNA:	28
Tabla 2: Plásmidos utilizados:	41
Tabla 3: Lista de cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas.	43
Tabla 4: anticuerpos usados en inmunodetección.....	60
Tabla 5: Valor de dosis inhibitoria del crecimiento al 50% por ácido acético (IC ₅₀ en mM) en mutantes haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetasas de levadura con el error estándar (EE).	85
Tabla 6: Valor de dosis inhibitoria al 50% por MMS (IC ₅₀ en mg ml ⁻¹) en mutantes haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetasas de levadura con el error estándar (EE). Error estándar de dos a cuatro experimentos independientes con tres replicas cada uno.	118
Tabla 7: Descripción de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas más sensibles a MMS.....	119
Tabla 8: IC ₅₀ en respuesta a MMS en aminoacil-tRNA sintetasas mitocondriales seleccionadas.....	120

LISTA ABREVIATURAS MÁS USADAS:

Nota: Siglas del término en inglés.

- ADP: Adenosina bifosfato.
- ATP: Adenosina trifosfato.
- aaTRS o TRS: aminoacil-tRNA sintetasas.
- DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- dsDNA: Ácido desoxirribonucleico de doble hebra o bicatenario.
- β -lap: Beta-lapachona.
- DB71: Colorante "*Direct Blue 71*".
- DDR: "*DNA damage response*".
- dNTP: Desoxinucleótido trifosfato.
- DSB: Rotura de doble hebra del DNA.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- GCN: Control General de Nutrientes.
- GDP: Guanosina bifosfato.
- GTP: Guanosina trifosfato.
- HisRS Dominio de Gcn2p relacionado con histidil-tRNA sintetasa.
- HU: Hidroxiurea.
- IC₅₀: Dosis inhibitoria del crecimiento al 50% del máximo.
- LB: Medio de cultivo Luria-Bertani para bacterias.
- MAPK: "*Mitogen-Activated Protein Kinases*".
- MMS: Metil metano sulfonato.
- mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.
- PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida.
- Phleo: Phleomicina.
- PIKK: Proteína quinasa similar a la fosfatidil-inositol 3-quinasa.
- PVDF: Fluoruro de polivinilideno.
- RNA: Ácido ribonucleico.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- SD: Medio mínimo sintético definido para levaduras.

- SDS: Dodecil sulfato sódico.
- ssDNA: Ácido desoxirribonucleico de simple hebra o monocatenario.
- TBS: Tampón salino de Tris ((hidroximetil) - aminometano).
- tRNA: Ácido ribonucleico transferente.
- uORF: Marco abierto de lectura corriente arriba de la región codificante.
- YPD: Medio complejo de Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa para levaduras.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Respuestas celulares al estrés.

Podemos definir como condiciones de estrés a cualquier alteración/es producidas en el entorno celular que provoca que en la célula se originen o activen mecanismos de percepción, regulación y respuesta que permiten su adaptación, crecimiento y proliferación. Los cambios en el medio externo en parámetros como la temperatura, el pH, concentración de solutos, la presencia de agentes tóxicos, la radiación, la variación en la disponibilidad de nutrientes, etc., pueden afectar al equilibrio interno, impidiendo o limitando los mecanismos biológicos que ocurren en condiciones normales. Estos desequilibrios pueden desencadenar alteraciones en procesos como la actividad enzimática, gradientes químicos, flujos metabólicos y además desestabilizar estructuras celulares y provocar otros cambios que al final afectan a la estabilidad global de la célula.

Nosotros elegimos como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por tratarse de un organismo eucariota unicelular que es capaz de responder a condiciones de estrés y cuyos procesos biológicos básicos están conservados en eucariotas superiores. La respuesta celular al estrés se desarrolla en fases sucesivas. Primero ocurre la percepción de los cambios que se están produciendo en su entorno y la señalización a nivel intracelular para activar mecanismos de respuesta. Durante la segunda fase, la célula activa mecanismos reguladores, los cuales permiten la adaptación a condiciones fisiológicas y de estrés ambiental, y constituyen la integración de diferentes actividades celulares que permitan el crecimiento y la proliferación de la célula sometida al estrés. La adaptación al estrés en levadura tiene normalmente un impacto muy importante a nivel de la expresión génica. Pero también existen respuestas a otros niveles, uno de los mecanismos de adaptación rápida es el control traduccional y la traducción selectiva de determinados mRNAs (Wek *et al.* 2006). La respuesta transcripcional a estrés

es transitoria, las células responden modificando su expresión génica y una vez recuperado el equilibrio, estos genes recuperan los niveles de expresión inicial (Parrou *et al.* 1997).

Todas las células experimenten una rápida reprogramación transcripcional en respuesta a los cambios ambientales mediante la movilización de activadores y represores de la transcripción (Hinnebusch and Natarajan 2002). Existen diferentes mecanismos para estimular la activación en respuesta a estrés: como liberación del efecto inhibitor de un represor, regulación de la localización nuclear de un activador transcripcional y estimulación de la síntesis de un activador, como en el caso del activador transcripcional Gcn4p, regulado por un mecanismo de control de la traducción en respuesta a ayuno de aminoácidos (Hinnebusch and Natarajan 2002). Este último mecanismo será explicado más detalladamente en la presente tesis.

2. Control de la traducción en respuesta al estrés. La ruta GCN.

La ruta de control general de nutrientes (GCN, “*general Control Noninducible or Nonderepressible*”) regula la traducción del factor de transcripción Gcn4p (Hinnebusch 1997; Hinnebusch 2005), esta regulación ocurre a través de la quinasa central de la ruta Gcn2p. Así en respuesta a la escasez de nutrientes *S. cerevisiae* activa a Gcn2p, que fosforila la subunidad α del factor 2 eucariótico de iniciación de la traducción (eIF2 α) en la serina 51 (Hinnebusch 1997). eIF2 es responsable de llevar el metionil-tRNA iniciador cargado (Met-tRNA_i^{Met}) a la subunidad menor (40S) del ribosoma en el primer paso de la iniciación de la traducción.

El control traduccional y la traducción selectiva de los mRNAs es uno de los diferentes mecanismos reguladores de la célula para adaptarse a cambios en las condiciones fisiológicas y/o condiciones de estrés ambiental (Wek *et al.* 2006). Aunque la traducción de proteínas se divide en tres pasos: iniciación, elongación y terminación, y las tres fases están sujetas a mecanismos de control, la iniciación es el paso regulado en la mayoría de los casos. Varios factores eucarióticos de iniciación de la traducción (eIFs) participan en dicha fase y la regulan, entre ellos los factores eIF2B y eIF2 (Kimball *et al.* 1998; Kleijn *et al.* 1998). La traducción es el último paso del flujo de información genética. Por tanto, la regulación a este nivel proporciona una rápida respuesta celular a cambios en las condiciones fisiológicas.

Un paso fundamental en la iniciación de la traducción es la transferencia por eIF2 del metionil-tRNA iniciador cargado (Met-tRNA_i^{Met}) a la subunidad menor del ribosoma (40S) (Proud 2005). Este tRNA cargado se une al ribosoma en forma de un complejo ternario que contiene el propio Met-tRNA_i^{Met} y GTP y luego, una vez reconocido el codón de iniciación, se libera en forma de complejo binario eIF2-GDP, que es su forma inactiva.

Para unir otro Met-tRNA_i^{Met} debe regenerarse eIF2 activo (unido a GTP), siendo el factor eIF2B el que cataliza el reciclado de eIF2-GDP en eIF2-GTP (Figura 01). La forma activa de eIF2-GTP se requiere para cada ronda de iniciación de la traducción, de manera que la regulación de este paso puede controlar la síntesis global de proteínas en distintas condiciones (Hinnebusch 2005).

La fosforilación de eIF2 en su subunidad alfa (P-eIF2 α) transforma a eIF2 α -GDP de sustrato a inhibidor competitivo de eIF2B (Hinnebusch 2005), lo que impide la formación del complejo ternario (Figura 01). Dado que la concentración de eIF2 normalmente excede a la de eIF2B y que la fosforilación de eIF2-GDP aumenta su afinidad por eIF2B, niveles muy modestos de fosforilación de eIF2 α pueden reducir substancialmente la iniciación de la síntesis de proteínas, y alternativamente favorecer la traducción selectiva de determinados mRNAs (Krishnamoorthy *et al.* 2001), como el de *GCN4*, permitiendo a las células conservar recursos para manejar efectivamente las condiciones de estrés. eIF2B, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina, está formado por cinco subunidades, codificadas por cuatro genes esenciales (*GCD1*, *GCD2*, *GCD6*, *GCD7*) y uno no esencial *GCN3*. Gcn3p forma parte de la subunidad reguladora, así que un mutante *gcn3 Δ* es incapaz de activar la traducción de *GCN4* en condiciones de ayuno ya que eIF2B se hace resistente a la inhibición por eIF2 α fosforilado (Bushman *et al.* 1993).

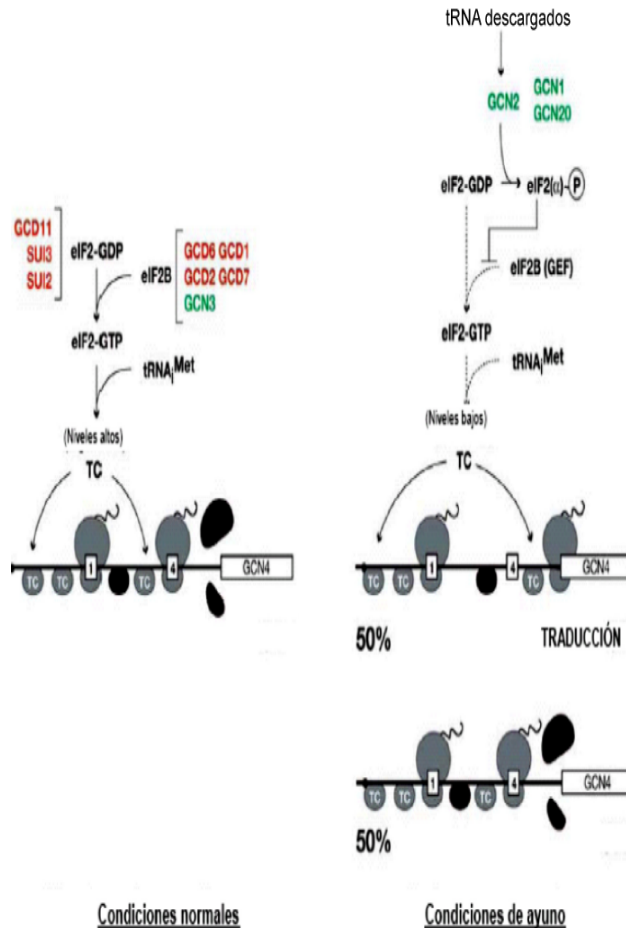


Figura 01: Modelo del control traduccional de *GCN4* mediante la fosforilación de eIF2 por Gcn2p [modificado a partir de (Hinnebusch 2005)]. En condiciones normales eIF2 es activado por unión con GTP, por la acción de eIF2B y lleva el $tRNA_{Met}$ hasta la subunidad menor del ribosoma propiciando el inicio de la traducción. Los altos niveles de complejo ternario bloquean la traducción del mRNA de *GCN4*. En condiciones de ayuno de aminoácidos el acumulo de tRNA descargados, junto a la interacción con Gcn1p-Gcn20p activan la quinasa Gcn2p que fosforila eIF2 y esto inhibe eIF2B. La caída de complejo ternario, bloquea la traducción general y estimula la traducción específica de determinados mensajeros, como el de *GCN4*, ya que se alivia la inhibición. Gcn4p es un factor de transcripción que regula a numerosos genes, entre otros los de biosíntesis de aminoácidos. Los genes en rojo son esenciales mientras que aquellos en verde no lo son.

La síntesis de proteínas se inhibe por las condiciones de estrés para evitar el mal plegamiento de las proteínas y comprometer la viabilidad celular. Esta respuesta forma parte de un mecanismo protector que se desencadena por distintos estímulos y se conoce como “respuesta integral o general al estrés”. La inhibición de la traducción se logra por modificaciones postraduccionales de eIF2 α (Sonenberg and Hinnebusch 2007). Diferentes estreses activan a Gcn2p en levadura. Aunque la ruta canónica es en respuesta a ayuno de aminoácidos, se ha descrito la activación en respuesta a otros estreses como ayuno de purinas (Rolfes and Hinnebusch 1993), limitación de glucosa o crecimiento en fuente de carbono no fermentable como etanol (Yang *et al.* 2000), alta salinidad (Goossens *et al.* 2001; Narasimhan *et al.* 2004), tratamiento con el agente alquilante metil metano sulfonato (MMS) (Natarajan *et al.* 2001) y tratamiento con rapamicina (inhibidor de las quinasas Tor1p y Tor2p) (Valenzuela *et al.* 2001; Cherkasova and Hinnebusch 2003; Kubota *et al.* 2003). Se ha propuesto que Gcn2p se activa en células con ayuno de aminoácidos mediante inhibición de las quinasas TOR y consiguiente defosforilación de la serina 577 de Gcn2p (Hinnebusch 2005).

En la levadura de gemación *S. cerevisiae*, la fosforilación de eIF2 α controla un programa de expresión génica en respuesta a ayuno de nutrientes (Hinnebusch 2005). La única quinasa de eIF2 α existente en esta levadura está codificada por el gen *GCN2* (Krishnamoorthy *et al.* 2001; Wek *et al.* 2006). El ayuno de cualquier aminoácido dispara la activación de Gcn2p (Wek *et al.* 1995) y, consistentemente, Gcn2p se une a muchos tipos de tRNA descargados con afinidades similares, pero muestra una afinidad reducida por la forma cargada de cualquier tRNA. La activación de Gcn2p necesita dimerización (Qiu *et al.* 2001; Narasimhan *et al.* 2004), lo cuál depende de aproximadamente los últimos 160 residuos del dominio C-terminal de la proteína (CTD), la zona más potente de dimerización (Garcia-Barrio *et al.* 2000) (Figura 02). Un tramo del CTD enriquecido en residuos de lisina es requerido para la unión a tRNA “*in vitro*” (Dong *et al.* 2000). La activación de

Gcn2p por tRNA descargados también requiere interacción directa con el complejo regulador Gcn1p-Gcn20p (García-Barrio *et al.* 2000; Sattlegger and Hinnebusch 2005) y de este complejo con el ribosoma (Marton *et al.* 1997) (Figura 02 y 03). El dominio N-terminal de Gcn2p se une al dominio C-terminal de Gcn1p, y esta unión es ayudada por Gcn20p (Kubota *et al.* 2001; Kubota *et al.* 2003). Se ha sugerido que el complejo Gcn1p-Gcn20p facilita la unión de tRNA descargados al sitio A del ribosoma y su posterior transferencia hasta el dominio HisRS de Gcn2p para la activación de su actividad quinasa (Hinnebusch and Natarajan 2002) (Figura 03). Se ha propuesto que la interacción del dominio HisRS unido a tRNA interacciona físicamente con el dominio quinasa para activarlo (Qiu *et al.* 2001) y para ello se produce un cambio conformacional en Gcn2p.

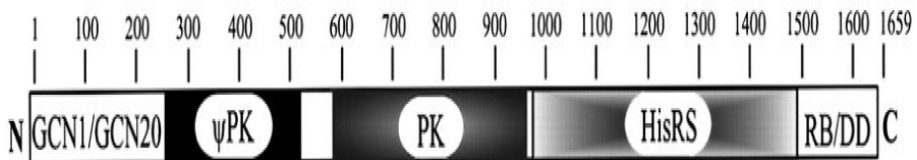


Figura 02: Esquema de la proteína Gcn2p de levadura.

El polipéptido de 1659 residuos [numeradas en la parte superior de extremo amino (N) a extremo carboxilo (C) terminal] se representa de forma esquemática como cajas rectangulares subdivididas en las siguientes áreas funcionales: la región conservada N-terminal requerida para la interacción con el complejo Gcn1p-Gcn20p (García-Barrio *et al.* 2000), un dominio degenerado de actividad catalítica, proteína quinasa o pseudo quinasa (Ψ PK), el dominio catalítico proteína quinasa (PK), un dominio relacionado con histidil-tRNA sintetasa (HisRS), y en la región C-terminal el dominio requerido para la unión de los ribosomas y la dimerización (RB/DD). [Modificado a partir de (Qiu *et al.* 2001)].

Gcn2p regula la traducción selectiva del factor de transcripción Gcn4p. Esta regulación es ejecutada por cuatro pautas de lectura localizadas en la región 5' no traducida del mRNA de *GCN4* (uORFs, de “*untranslated Open Reading Frame*”), que lo hacen hipersensibles a los niveles de eIF2 (Hinnebusch 2005).

En células sin limitación de nutrientes, las uORFs bloquean eficientemente la traducción de *GCN4*, aunque en realidad son la uORF1 y la uORF4 las principales responsables (Abastado *et al.* 1991; Hinnebusch 1997). De acuerdo con el mecanismo de escaneo de la iniciación de la traducción, cada una de estas cuatro uORFs del mRNA de *GCN4* debería ser seleccionada como sitios de iniciación antes de llegar al codón de iniciación de Gcn4p. Finalizada la traducción de una ORF, la reiniciación de otra más a la derecha (hacia el 3') es generalmente poco eficiente pues el ribosoma se desprende del mRNA al terminar la traducción (Rodríguez Hernández 2006). Así, la subunidad 40S que ha escaneado la uORF1 se une al complejo ternario (eIF2-GTP-Met_i-tRNA^{Met}), a continuación se forma el ribosoma completo (al unirse la subunidad 60S), se traduce el péptido codificado y finalmente el ribosoma se libera del mRNA (separándose las subunidades 40S y 60S), impidiendo así alcanzar las siguientes ORFs. La reducción de los niveles activos de eIF2 implica la reducción del complejo ternario, lo que permite que la subunidad 40S escanee y llegue hasta uORF1 pero con cierta probabilidad (en la figura 01 el 50%) no se una al complejo ternario y pase de largo continuando el escaneo hasta uORF4, en donde de nuevo, debido a la escasez de complejo ternario, con cierta probabilidad pasa de largo y continua, por lo que aumenta la cantidad de ribosomas que llegan a traducir *GCN4* (Cigan *et al.* 1988; Dever *et al.* 1992). Ello permite que sobre un 50% de las subunidades 40S que finalizaron el escaneo del uORF1 y uORF4 retomen el escaneo más abajo (a la derecha) e inicien la traducción de Gcn4p (Hinnebusch 2005) (Figura 01).

En células sometidas a ayuno de aminoácidos se produce un acumulo de tRNAs descargados que estimulan la actividad quinasa de Gcn2p (Figura 03). La fosforilación de eIF2 en su subunidad α , provoca la disminución de niveles de eIF2 activo que alivian la inhibición por los uORFs, favoreciendo la traducción de *GCN4* a la vez que se produce una inhibición general de la traducción (Hinnebusch 2005). El aumento en los niveles de la proteína Gcn4p estimulan la expresión de muchos genes, entre ellos aquellos implicados en

las rutas de biosíntesis de aminoácidos (Natarajan *et al.* 2001; Hinnebusch and Natarajan 2002).

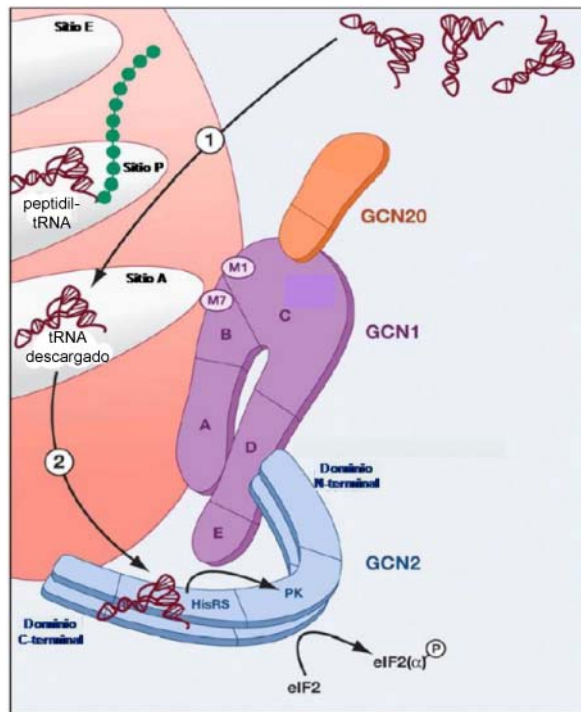


Figura 03: Modelo del papel estimulador del complejo Gcn1p-Gcn20p en la activación de Gcn2p por presencia de tRNA descargados. Gcn2p se representa como un dímero con el tRNA unido al dominio homólogo a HisRS (histidil-tRNA sintetasa de levadura) y activando el dominio PK (Proteína quinasa). Tanto el complejo Gcn1p-Gcn20p como Gcn2p pueden unirse al ribosoma. En este caso se postula que el tRNA descargado actúa como ligando activador para la unión [Modificado a partir de (Hinnebusch 2005)].

La traducción de *GCN4* también puede inducirse independientemente de Gcn2p. Por ejemplo, *GCN4* se induce durante el paso de un medio rico en aminoácidos a un medio mínimo de una manera dependiente de PKA y de las uORFs, (Tzamarias *et al.* 1989). Otro ejemplo es la desrepresión de *GCN4* en un mutante *bud27Δ* (Gstaiger *et al.* 2003), proceso que ocurre por rutas dependientes e independientes de Gcn2p

a la vez. Aunque el mecanismo de esta inducción es aún desconocido se postula que requiere la participación de eIF2B.

Por otro lado, en la actividad del factor de transcripción Gcn4p influyen procesos reguladores que actúan sobre su estabilidad o su función (Rodríguez Hernández 2006). En este último caso es importante Cpc2p, como proteína que inhibe la actividad Gcn4p (Hoffmann *et al.* 1999; Hinnebusch and Natarajan 2002), o la ubiquitilación de H2B por Paf1p, que inhibe la unión de Gcn4p al promotor de *ARG1* (Crisucci and Arndt 2012).

En mamíferos, la fosforilación de eIF2 α es controlada por cuatro proteína quinasas (Dever 2007). Estás son la quinasa dependiente de RNA de doble cadena, PKR (de "*double-stranded RNA activated protein kinase*" =PRKR=EIF2AK2), el inhibidor controlado por grupos Hemo, HRI (de "*Haem-regulated inhibitor*"), la quinasa de eIF2 α pancreática o proteína quinasa del retículo endoplasmático similar a PKR, PER/PERK (de "*pancreatic eIF2 α /PKR-endoplasmic reticulum-related kinase*") y la quinasa central del control general de nutrientes GCN2 (de "*general control nonderepressible-2*"), cada una de las cuales se activa por distintos estreses que disminuyen la síntesis de proteínas. PKR por presencia de RNA de doble cadena después de la infección por virus (Meurs *et al.* 1990; Icelly *et al.* 1991; Mellor *et al.* 1994b), HRI en deficiencia de grupos hemo, y por choque térmico y osmótico (Chen *et al.* 1991; Mellor *et al.* 1994a), PEK/PERK activado por proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (Harding *et al.* 2000) e hipoxia y GCN2 activado por limitación de nutrientes (Yang and Hinnebusch 1996; Hinnebusch 1997) e irradiación con luz ultravioleta (Figura 04). La activación de cualquiera de las quinasas conduce a una inhibición general de la iniciación de la traducción consistente con la supresión de los niveles del complejo ternario y además estimula específicamente la traducción del mRNA de *ATF4*.

Llama la atención, que GCN2 de mamíferos parece regular la memoria (Costa-Mattioli *et al.* 2007) y la conducta (Hao *et al.* 2005) a través del mismo mecanismo traduccional que señala la disponibilidad de aminoácidos en levadura, i.e., en respuesta a tRNA descargados. Al ser una de las vías principales que regula la proliferación celular además de el control de la traducción, la fosforilación de eIF2 α está involucrada casualmente en el desarrollo de patologías humanas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento y diabetes (Costa-Mattioli *et al.* 2007). Queda por determinar cómo la fosforilación de eIF2 α contribuye a las condiciones de estas enfermedades.

Gcn2p es la única quinasa de eIF2 α conservada en la evolución en hongos, plantas y animales (Sood *et al.* 2000; Costa-Mattioli *et al.* 2009). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha identificado un ortólogo de Gcn2p, AtGCN2, que restaura el crecimiento en el mutante *gcn2* Δ de levadura en presencia de un inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos (Zhang *et al.* 2003). AtGCN2 responde a condiciones de privación de aminoácidos y purina, choque por frío, reacción a herida e irradiación UV, fosforilando eIF2 (Lageix *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2008). La actividad de AtGCN2 correlaciona con una disminución de la síntesis global de proteínas (Lageix *et al.* 2008). Se desconoce el significado fisiológico de la fosforilación de eIF2 en plantas, pero la activación de *AtGCN2* después de producirse una herida o por tratamiento con las fitohormonas ácido salicílico, metil-jasmonato o aminociclopropano-1-carboxílico (ACC; precursor de etileno), sugiere que AtGCN2 puede desempeñar un papel importante, pero todavía no caracterizado, en respuesta a estrés abiótico y biótico (Lageix *et al.* 2008).

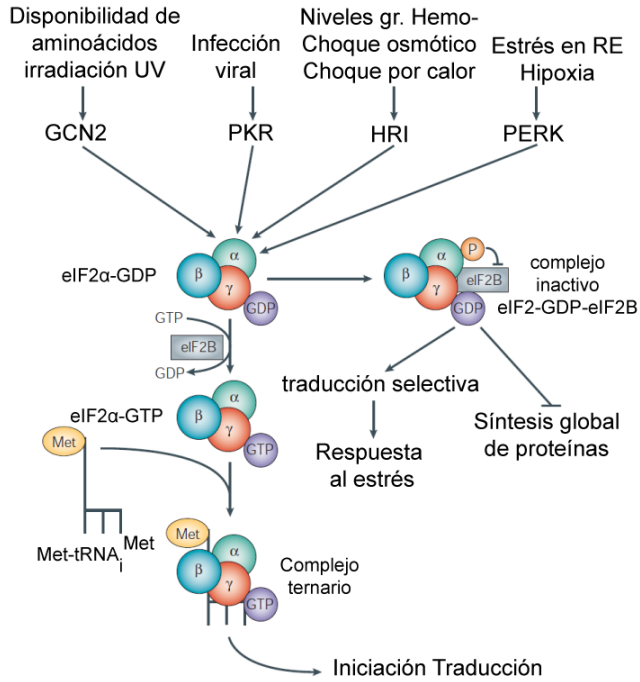


Figura 04: Esquema de las quinasas de eIF2 en mamíferos.

Muchas condiciones de estrés producen la fosforilación de factor de iniciación eucariótico-2α (eIF2α), que se lleva a cabo por cuatro proteínas quinasas distintas: “*general control nonderepressible-2*” (GCN2), proteína quinasa dependiente de RNA (PKR), inhibidor regulado por grupo Hemo- (HRI) y quinasa del retículo endoplasmático similar a PKR (PERK). eIF2α es una subunidad de eIF2 (junto con eIF2β y eIF2γ) que es parte del complejo ternario. El complejo ternario formado por eIF2-GTP y Met-tRNA_i^{Met}. Una vez se entrega el tRNA_i^{Met} al ribosoma, GTP es hidrolizado durante la iniciación de la traducción, eIF2 necesita recargarse después de cada ronda de la iniciación. Esta activación se lleva a cabo por el intercambiador de GDP a GTP, eIF2B. La fosforilación de eIF2α inhibe el intercambio por eIF2B. Dando como resultado la inhibición de la traducción global y la traducción selectiva de un subconjunto de mRNA que permite a las células adaptarse a condiciones de estrés. RE, retículo endoplasmático, UV =ultravioleta. Modificado de (Holcik and Sonenberg 2005).

3. Estrés ácido.

A. La homeostasis del pH en levadura.

La homeostasis del pH intracelular es una actividad fundamental para las células vivas (Gillies 1981; Harold 1986), ya que este parámetro afecta a la mayoría de funciones celulares, incluyendo el crecimiento (Gillies 1981; Epel and Dubé 1987; Perona and Serrano 1988) y la muerte (Gottlieb *et al.* 1996; Ludovico *et al.* 2001), además de procesos fisiológicos y metabólicos como la glucólisis y gluconeogénesis, entre otros. Las respuestas celulares a la acidificación intracelular pueden constituir un mecanismo de transducción de señal ancestral y se ha propuesto que, el estrés ácido generado por ácidos carboxílicos durante la fermentación de azúcares determinó la evolución temprana de bombas de protones en las bacterias primitivas (Raven and Smith 1976).

En levadura, la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Pma1p) genera un gradiente electroquímico de protones que impulsa el transporte activo secundario y regula el pH intracelular y extracelular (Serrano 1991). Esta bomba de protones es activada por la acidificación intracelular (Eraso and Gancedo 1987) y su actividad es crucial para la tolerancia al estrés ácido intracelular causado por ácidos débiles (Vallejo and Serrano 1989; Holyoak *et al.* 1996; Macpherson *et al.* 2005). El mecanismo ocurre del siguiente modo: los ácidos débiles como el acético cruzan la membrana plasmática en forma no disociada, abundante en el medio extracelular de pH ácido, y al llegar al citoplasma se disocian soltando un protón debido a que el pH citosólico, del orden de 7,2-7,4, es mayor que el pK_a del ácido. Las formas aniónicas resultantes de la disociación de los ácidos débiles en el interior celular se retienen, mientras que los protones son secretados al exterior celular mediante la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática codificada por el gen esencial *PMA1* (Serrano 1989), con el consiguiente consumo energético en forma de ATP. Dada la

necesidad de un equilibrio eléctrico durante el bombeo de protones, el transporte de potasio (K^+) al interior de la célula también se activa en condiciones de acidificación intracelular (Yenush *et al.* 2002). En este caso, el mecanismo molecular es parcialmente conocido. Se ha identificado una interacción sensible al pH entre la proteína fosfatasa Ppz1p y su subunidad inhibidora Hal3p (Yenush *et al.* 2002; Yenush *et al.* 2005). Las concentraciones de K^+ son el principal determinante de varios parámetros fisiológicos como el volumen celular, la turgencia, o la fuerza iónica citoplasmática (Wyn Jones and Pollard 1983; Serrano 1996). La homeostasis del potasio es regulada, entre otros, por el sistema transportador Trk1p-Trk2p, que acumula potasio en el interior de la célula en contra del gradiente químico (Mulet *et al.* 1999; Ramirez and Peña 2000). A pH intracelular alto (7,2-7,4) Hal3p no puede unirse a Ppz1p, que defosforila Trk1p e inhibe su actividad. Ello tiene sentido fisiológico porque el pH intracelular alto correlaciona con concentraciones altas de K^+ intracelular debido al intercambio “protón expulsado-potasio tomado” que hacen las células. A pH intracelular bajo, Hal3p se une e inhibe a Ppz1p, y esto se traduce en aumento de la fosforilación y la activación de Trk1p, el principal transportador de alta afinidad de K^+ inactivado por Ppz1p. De acuerdo con esta evidencia, el pH intracelular bajo correlaciona con concentraciones bajas de K^+ intracelular ya que cuando este catión sale de las células estas toman protones (Yenush *et al.* 2002). Las proteínas quinasa Hal4p-Hal5p activan Trk1p aumentando así la toma de K^+ y disminuyendo el potencial de membrana (Mulet *et al.* 1999; Ariño *et al.* 2010). Hal4p-Hal5p son importantes determinantes de la homeostasis iónica y de tolerancia a sal en *S. cerevisiae*. (Mulet *et al.* 1999).

El pH intracelular es un parámetro estrechamente regulado con un papel permisivo para muchas funciones celulares. El pH intracelular puede tener una función reguladora actuando como un segundo mensajero de las condiciones de estrés externas (Perona and Serrano 1988; Felle 2001; Yenush *et al.* 2005; Pedersen 2006). La concentración de protones (H^+) libres en las células está en el mismo rango, 10^{-6} - 10^{-7} M, que la

concentración de calcio libre. El papel del calcio como mensajero secundario o señal reguladora está bien establecido pero la función reguladora del protón es poco conocida. Los dominios de proteínas especializadas en la unión de calcio (motivos tipo mano EF y motivos C2) actúan como receptores de calcio, pero los protones se unen a todas las proteínas, cuyos grupos histidina constituyen un importante tampón celular (Hochachka and Somero 2002). En consecuencia, se han identificado muy pocos receptores de protones implicados en regulación celular.

En las células de levadura hay dos vías de señalización activadas por acidificación intracelular. La proteína quinasa A (Tpk1p-Tpk3p) es activada por adenosin monofosfato cíclico (cAMP) producido por la adenilato ciclasa (Cyr1p) en respuesta a la acidificación intracelular a través de Ras1p (Stark 2004). La relevancia de esta vía para la tolerancia a estrés ácido es desconocida. La vía Hog1p MAP quinasa es activada en respuesta a varios tipos de estrés (calor, osmótico y oxidativo) y también por la acidificación citosólica (Schüller *et al.* 1994). La mayoría de los genes inducidos por la acidificación intracelular depende de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p, que están regulados por la MAP quinasa Hog1p y forman parte de la "respuesta general de estrés" (Gasch *et al.* 2000; Causton *et al.* 2001; Schüller *et al.* 2004). La mutación de estos genes (con la excepción de *PDR12*) no afecta a la tolerancia a ácidos orgánicos débiles utilizados para generar la acidificación intracelular (Schüller *et al.* 2004). No obstante, Hog1p es importante debido a que es activado por fosforilación y desencadena la endocitosis de Fps1p, la porina utilizada por el ácido acético para entrar en las células (Mollapour and Piper 2007).

El rastreo de la colección de mutantes nulos de levadura (Winzeler *et al.* 1999; Giaever *et al.* 2002) para la sensibilidad al estrés ácido intracelular generado por ácidos orgánicos débiles (Mollapour *et al.* 2004; Schüller *et al.* 2004; Kawahata *et al.* 2006; Mira *et al.* 2010a), ha identificado un grupo de genes de levadura requeridos para la tolerancia al ácido. Las

funciones celulares representados en la mayoría de los estudios son: la biosíntesis de triptófano (*TRP1*, *TRP2*, *TRP5*), biosíntesis del ergosterol (*ERG2*, *ERG3*, *ERG6*, *ERG28*), flujo de salida de carboxilatos (*PDR12*), la absorción de potasio (*TRK1*), el transporte de leucina (*BAP2*), el bombeo de protones en la vacuola (subunidades de H⁺-ATPasa vacuolar: *TFP1*, *VMA2*, *VMA22*), el tráfico de vesículas (*VPS16*, *VPS24*, *PEP5*), la glucólisis (*PFK1*, *PFK2*, *TPD3*, *PDC1*) y factores de transcripción (*GAL11*, *WAR1*).

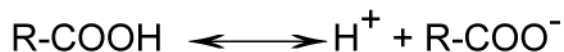
Estos resultados “ómicos” han confirmado algunos de los mecanismos de homeostasis del pH intracelular, tales como la inhibición de la captación de triptófano por ácidos orgánicos débiles y la necesidad de la biosíntesis de triptófano en estas condiciones (Bauer *et al.* 2003). *PDR12* codifica un ABC (“*ATP Binding Cassette*”) ATPasa que cataliza el flujo de salida de aniones orgánicos (Piper *et al.* 1998) y *WAR1* codifica un factor de transcripción específico para la expresión de *PDR12* (Schüller *et al.* 2004). La biosíntesis de ergosterol se requiere para la localización correcta de transportadores de la membrana plasmática y muchos de ellos podrían ser importantes para la tolerancia al estrés ácido (Klemm *et al.* 2009). Por otra parte, el tráfico de vesículas está controlado por el pH celular (Brett *et al.* 2005). Los mutantes nulos de la H⁺-ATPasa vacuolar no crecen en medios con valores bajos de pH (Serrano 1991), y el importante papel de la fosfofructoquinasa (*PFK1* y *PFK2*) se han descrito por estudios bioquímicos que muestran la inhibición de esta enzima limitante de la glucólisis por pHs ácidos (Krebs *et al.* 1983; Holyoak *et al.* 1996).

B. Ácidos orgánicos como conservantes alimentarios.

Bases químicas de los ácidos débiles.

La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos aumenta con la disminución del pH. Esta acción se fundamenta en la inhibición del crecimiento de microorganismos en alimentos de origen vegetal tanto sólidos como líquidos que

tienen un pH ácido. La base bioquímica de tal fenómeno es común a pesar de la variabilidad estructural existente entre los ácidos débiles. En solución acuosa ligeramente ácida, los ácidos débiles se encuentran en equilibrio dependiente del pH entre la forma no disociada del ácido (R-COOH) y sus respectivos aniones (R-COO⁻), e.g. ácido acético/acetato (Piper *et al.* 1998; Lambert and Stratford 1999). Un ácido débil por definición es aquel que es capaz de aportar protones (H⁺) al medio pero también es capaz de aceptarlos, y dentro de estos se incluyen los ácidos orgánicos. La constante de equilibrio de disociación de la reacción de equilibrio ácido-base nos mide el nivel de disociación:



La constante de acidez (K_a) que mide el grado de disociación iónica (aunque es más común expresarlo como $\text{p}K_a = -\log K_a$) que nos da la concentración de la forma no disociada del ácido, un $\text{p}K_a$ alto se corresponde a un ácido débil, el $\text{p}K_a$ del ácido acético en disolución acuosa a 25°C es 4,76:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+] + [\text{R-COO}^-]}{[\text{R-COOH}]} \quad \text{o} \quad \text{p}K_a = -\log_{10} K_a$$

El valor de pH en el cuál coexiste la misma proporción de ácido no disociado y sus respectivos iones cargados se define como $\text{p}K_a$ (Lambert and Stratford 1999). La proporción de ácido disociado y no disociado se suele calcular mediante la ecuación de Henderson-Haseelbalch:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \left(\frac{[\text{R-COO}^-]}{[\text{R-COOH}]} \right)$$

Los ácidos débiles como acético, benzoico, propiónico y sórbico son los principales ácidos orgánicos conservantes de alimentos de origen vegetal (con pH ligeramente ácido debido

al contenido de las vacuolas) usados en la industria alimentaria (Primo-Yúfera 1997). El mecanismo de acción de los ácidos débiles como conservantes consiste en la difusión del ácido lipofílico no disociado a través de la membrana plasmática hacia el citoplasma. De modo que en el exterior celular, a un pH menor que el pK_a del ácido débil, se favorece la forma no disociada, estado en que ejercen con más vigor su acción antimicrobiana los ácidos débiles, favoreciendo la entrada a las células por difusión a través de la membrana plasmática o a través de porinas, proteínas de membrana que forman poros para el transporte de moléculas pequeñas y sin carga. Recientemente ha sido descrito que el ácido acético puede entrar en la célula de levadura por difusión facilitada mediante la porina Fps1p (Mollapour and Piper 2007). En el citoplasma, a un pH próximo a la neutralidad ($pH=7-7,5$) se produce la disociación del ácido con la liberación de H^+ y su correspondiente contraión ($R-COO^-$) (Mira *et al.* 2010a). Debido a su carga estos iones no son capaces de cruzar la membrana y se acumulan en el interior celular, con la consiguiente acidificación del medio interno y posible toxicidad del anión (Krebs *et al.* 1983) (Figura 05). En función del pH del medio y del pK_a del ácido débil habrá un acumulo mayor o menor de formas tóxicas, aunque es difícil separar el efecto del pH ácido y el efecto del anión del ácido débil dentro de la célula. La actividad antimicrobiana puede tener otras aplicaciones, así está descrito que ácidos débiles de cadena corta, en particular ácido acético, potencian la acción fungicida de fluconazol (un inhibidor de la síntesis de esteroides) hacia *Candida albicans* en condiciones donde el fungicida solo no es efectivo (Moosa *et al.* 2004).

Efectos celulares en la levadura.

En condiciones aerobias *S. cerevisiae* puede usar ácidos orgánicos de cadena corta, como fuente de carbono (Thomas *et al.* 2002). Para adaptarse a esta fuente pobre de carbono se producen cambios metabólicos (Paiva *et al.* 2004). La maquinaria de traducción se moviliza y se activa también la biogénesis mitocondrial (Flores *et al.* 2000). La glucosa se

metaboliza a través de la glucólisis y reprime la expresión de genes involucrados en la gluconeogénesis, la respiración y en el metabolismo de otras fuentes de carbono (Gancedo 1998). El acetato es un sustrato no fermentativo, que se metaboliza a Acetil-CoA y entra en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en el del glioxilato (Flores *et al.* 2000).

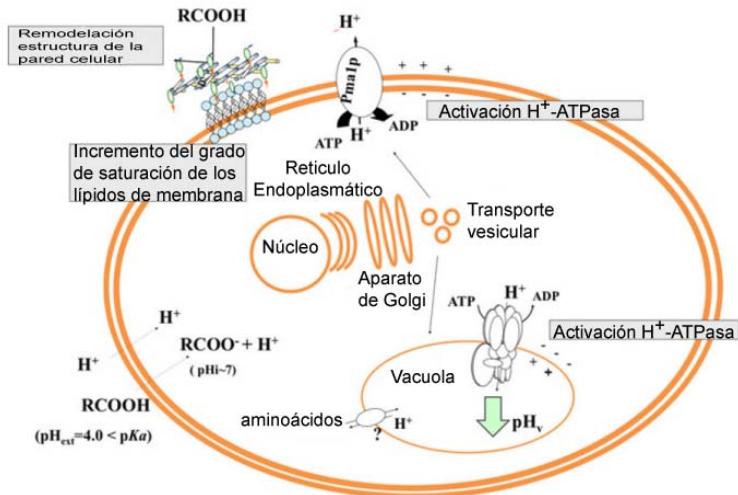


Figura 05: Respuesta adaptativa a estrés ácido en levadura.

El esquema muestra la difusión simple de un ácido débil a través de la membrana plasmática, la disociación en el citoplasma a pH más neutro ($\text{pH} \approx 7$). Se producen cambios en la pared celular y la membrana plasmática, así como la activación de las H^+ -ATPasa citoplasmática y vacuolar para mantener la homeostasis del pH. Modificado de (Mira *et al.* 2010b).

Además de afectar la homeostasis del pH interno, los ácidos débiles también tienen un impacto en la organización y la función de los lípidos en las membranas celulares, con tendencia a ser más inhibitorios cuando se vuelven más hidrofóbicos (Stratford and Anslow 1996; Piper *et al.* 1998; Fernandes *et al.* 2003). Esta pérdida de integridad de la membrana plasmática altera la permeabilidad a iones y pequeños metabolitos (Mira *et al.* 2010b). Un menor gradiente de pH provoca la inestabilidad de los transportadores de

membrana, afectándose el transporte activo (Piper *et al.* 1998). Cuando un cultivo de levadura en crecimiento exponencial es sometido a una concentración inhibitoria de ácido débil, se produce una parada transitoria del crecimiento y la población de células entra en un período de latencia. Durante esta fase se produce una reducción de la viabilidad celular dependiendo del nivel de estrés inducido por el ácido débil y de la gravedad de la inhibición del crecimiento. El crecimiento exponencial se puede reanudar después de un periodo de tiempo más o menos prolongado (Mira *et al.* 2010b). Está inhibición del crecimiento tiene varias causas. Así el pH ácido inhibe la fosfofructoquinasa y por tanto la glucólisis, y en consecuencia se produce una caída de los niveles de ATP (Pearce *et al.* 2001). En condiciones de un estrés ácido severo se activa el programa de muerte celular (Ludovico *et al.* 2001) después de la liberación del citocromo C mitocondrial al citosol y la producción de especies reactivas de oxígeno (Ludovico *et al.* 2002).

La adaptación a estrés ácido suave desencadena diferentes respuestas, destacando la activación de las H⁺-ATPasas de membrana plasmática y vacuolar que bombean protones fuera del citosol para restablecer la homeostasis de pH. La remodelación de la membrana plasmática, en concreto el grado de saturación de los lípidos que afecta a la permeabilidad pasiva, y la pared celular, que resulta debilitada por el pH ácido, son otras respuestas importantes (Figura 05). La eliminación de aniones de los ácidos débiles es esencial, y varios transportadores específicos han sido descritos en relación a distintos ácidos débiles y en particular transportadores relacionados a resistencia multi-drogas (PDR de “*pleiotropic drug resistance*” y MDR de “*multidrug resistance*”) (Mira *et al.* 2010b).

4. Estrés genotóxico.

A. Rutas de control de ciclo celular en respuesta a lesiones en el DNA.

Las células eucariotas sufren continuamente daños en su DNA por agentes ambientales genotóxicos que pueden ser físicos como radiación ionizante (IR) y luz ultravioleta (UV) o químicos como los agentes quimioterapéuticos usados en tratamiento de distintos tipos de cáncer. Así, algunas de las lesiones provocadas por estos genotóxicos son: alquilaciones en guaninas provocadas por metil metano sulfonato (MMS) o temozolomida, entrecruzamientos de hebras provocado por cisplatino, mitomicina C (MMC), psolareno o gas mostaza nitrogenada, inhibidores de topoisomerasas como camptotecina (CPT) y etoposido que producen SSB (de “*simple strand break*”) y DSB (de “*double strand-break*”) respectivamente. (Ciccia and Elledge 2010). Otra fuente de daño al DNA son condiciones de estrés endógeno que resultan en errores en la replicación del DNA y son causados por subproductos de procesos intracelulares como especies reactivas del oxígeno (Lindahl 1993).

Los “*checkpoints*” o controles de daño al DNA, son rutas de señalización no esenciales que controlan la capacidad de detener la progresión del ciclo celular y activar programas de expresión génica en respuesta al daño en el DNA, favoreciendo así la reparación del mismo (Lowndes and Murguia 2000; Zhou and Elledge 2000; Bartek and Lukas 2007). Muchos de estos genes están regulados transcripcionalmente y responden también a diversos estreses (Clémenson and Marsolier-Kergoat 2009). Estas rutas regulan todas las respuestas celulares a daño en el DNA (DDR) como modificación de histonas, cambios postraduccionales de proteínas implicadas en reparación del DNA y desencadena la apoptosis o muerte celular programada (Clémenson and Marsolier-Kergoat 2009). Los defectos en la señalización del daño al DNA impiden la

capacidad de reparación de lesiones, produciendo predisposición a cáncer en seres humanos (Nyberg *et al.* 2002). El daño al DNA no reparado produce inestabilidad genómica, apoptosis o senescencia, lo cuál afecta enormemente al desarrollo de los organismos y a procesos de envejecimiento así como a inmunodeficiencias y desordenes neuronales. Los estudios de respuestas celulares a agentes que dañan al DNA desde levaduras a humanos han revelado que muchas de las mismas proteínas clave se emplean para reparar el daño al DNA en todo el reino eucariota, manteniéndose la arquitectura básica de las rutas de “*checkpoint*” de daño al DNA a través de la evolución.

El mejor ejemplo para ello lo constituye la familia génica que codifica las proteínas quinasas conocidas como PIKK (proteínas quinasas similares a fosfatidil-inositol 3-quinasa) la cuál incluye a ATM (proteína ataxia telangiectasia mutada presente en mamíferos y plantas), la serina/treonina quinasa ATR (llamada proteína relacionada con ataxia telangiectasia o “ATM-Rad3-related protein” presente en mamíferos y plantas), rad3⁺ (*Schizosaccharomyces pombe*), Tel1p y Mec1p (*S. cerevisiae*) (Zhou and Elledge 2000; Abraham 2001). Tel1p es homólogo de ATM mientras que Mec1p está relacionado con ATR y rad3⁺. La deficiencia de ATM en las células de mamíferos conduce al síndrome de ataxia telangiectasia, un síndrome de predisposición a cáncer, caracterizado por hipersensibilidad a genotoxinas que producen roturas de doble hebra (Abraham 2001).

La activación del mecanismo de control de daño al DNA resulta en parada del ciclo celular durante las fases G1 o G2 en respuesta al DNA dañado (Lydall and Weinert 1996). El punto de control de fase G1 induce la detención del ciclo celular en o antes del punto de comienzo o “*start*”, antes de convertirse en células irreversiblemente comprometida con el próximo ciclo celular (Finn *et al.* 2011). También ocurre una disminución en la velocidad de replicación del DNA y de la progresión del ciclo celular cuando el daño aparece durante la fase S (Lowndes and Murguia 2000). Dicho control evita la aparición de orígenes

tardíos de replicación cuando la replicación se halla bloqueada (Santocanale and Diffley 1998). El bloqueo de la replicación puede deberse a la inhibición de la síntesis por ayuno de desoxirribonucleótidos fosfatos (dNTPs) o por estrés que alteran las proteínas de replicación y ambos desencadenan un control de daño. Existe también un control mitótico interno (Figura 06).

Los sensores detectan daño en el DNA manifestado por anomalías estructurales. Existen varias proteínas que funcionan coordinadamente como complejos multiproteicos que se consideran como los verdaderos sensores de daño al DNA, o los más cercanos a ellos, y forman parte de los controles de daño en G1 y G2. La mayoría de estos complejos fueron identificados por estudios genéticos de amplio espectro realizados en levadura, donde defectos en los controles de daño al DNA causan hipersensibilidad a agentes genotóxicos (Menacho-Marquez 2007).

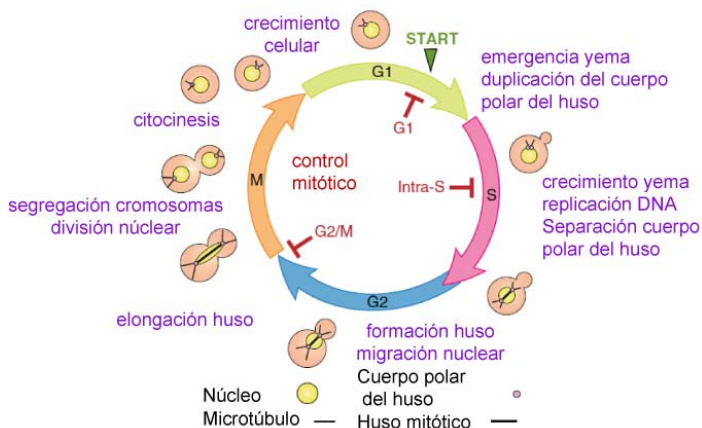


Figura 06: Ciclo celular y puntos de control en *S. cerevisiae*.

En el esquema se describe los fenómenos que ocurren en la célula en cada fase del ciclo, así como la morfología característica de cada fase. Indicando algunos de los puntos de control del ciclo celular; G1 que bloquea en el comienzo o *start*, *intra-S* que reduce la tasa de replicación, el punto de control de la transición G2-M que arresta el ciclo en esta transición y el control mitótico interno [Modificado de (Finn *et al.* 2011)].

En *S. cerevisiae* el regulador central de las vías de control de daño al DNA es Mec1p. Mec1p forma parte de un complejo multiproteico con Lcd1p (también conocida como Ddc2p o Pie1p), el cuál se recluta en las lesiones al DNA y es esencial para los “*checkpoint*” de daño y replicación de DNA (Paciotti *et al.* 1998), en concreto para el control de daño en la fase S (Longhese *et al.* 2003). Experimentos “*in vitro*” demuestran que el complejo Mec1p-Lcd1p se une al DNA (Rouse and Jackson 2002 a), por lo tanto este complejo podría considerarse como un autentico sensor de daño al DNA. Adicionalmente, Mec1p muestra un papel redundante con Tel1p tras el daño al DNA (Morrow *et al.* 1995) Resulta interesante que los ortólogos humanos de Mec1p y Dcd2p, ATR y ATRIP, exhiban características similares. Mec1p, y su ortólogo ATR, tienen un papel en la transducción de señal de variedad de lesiones en el DNA y de estrés replicativo, como estancamiento de la horquilla de replicación, mientras que Tel1p y ATM responden específicamente a roturas de doble banda en el DNA (DSB) (Nyberg *et al.* 2002; Longhese *et al.* 2003).

Se considera el complejo abrazadera o “RFC-*like*” (Rad24p-Rfc2-5p) y el cargador del complejo abrazadera o “PCNA-*like*” (Rad17p-Mec3p-Ddc1p) como sensores de daño en las primeras fases de reconocimiento del mismo en G1, G2 y en menor extensión en fase S (Branzei and Foiani 2006). En todos los puntos de control tiene gran importancia las proteínas adaptadoras/mediadoras Rad9p y Mcd1p. Mcd1p se requiere para la activación del punto de control en fase S. Sgs1p es también parte del control de fase S en una rama paralela a la de Rad24p, pero no funciona en los controles de daño al DNA de G1 o G2-M (Frei and Gasser 2000). Se han identificado ortólogos de las proteínas mencionadas anteriormente, y otras implicadas en estos mecanismos de control de daño en el DNA, en muchas especies incluyendo humanos (Tabla 1).

Aunque existe una vasta variedad de lesiones, todas ellas generan una eficiente respuesta al daño al DNA. Por lo

tanto, parece lógico pensar que existe un “adaptador” que reclute las proteínas necesarias para la señalización del sitio de daño y su procesado, o que se produzca un procesado de las lesiones para llegar a una estructura común más fácilmente reconocible por los complejos. Las evidencias sugieren que tras el daño al DNA se genera una estructura intermedia desconocida, probablemente por su naturaleza transitoria, que es reconocida por los distintos complejos de control de daño. Una estructura candidata es el DNA de simple hebra o monocatenario (ssDNA del término “*single-stranded DNA*”). Apoya esta hipótesis por un lado la generación de esta estructura durante diferentes vías de reparación, por otro lado, está la proteína RPA (“*replication protein A*” codificada por *RFA1*) que está relacionada con el reconocimiento de estrés replicativo. RPA normalmente cubre los ssDNA formados en procesos de reparación y en mutantes carentes de la misma se observa un deficiente control del daño al DNA y por último los complejos Mec1p-Lcd1p y RPA pueden ser purificados a partir de extractos celulares mediante ssDNA (Alani *et al.* 1992).

Tabla 1: Proteínas de respuesta a daño al DNA:

Función	Clase funcional	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	Mamíferos
Sensor	PIKK	Mec1p	Rad3	ATR
		Tel1p	Tel1	ATM
	Subunidades PIKK	Lcd1p	Rad26	ATRIP
		(Ddc2p)		
	complejo "PCN-like"	Rad17p/	Rad9/	hRAD9/
		Ddc1p/	Rad1/	hRAD1/
		Mec3p	Hus1	hHUS1
	complejo "RFC-like"	Rad24p/	Rad17/	hRAD17/
		RFC2-5	RFC2-5	RFC2-5
	complejo MRX/MRN	Mre11p/	Mre11/	hMRE11/
Rad50p/		Rad50/	hRAD50/	
	Xrs2p	Nbs1	hNBS1	
Adaptador/ mediador	BRCT	Dpb11p	Cut5	TopBP1
		Rad9p	Crb2	BRCA1
				53BP1
				MDC1
		Mrc1p	Mrc1	Claspin
Efector	Quinasa	Chk1p	Chk1	hCHK1
		Rad53p	Csd1	hCHK2

Como se puede ver en la tabla 1 existen diferentes proteínas que con otras adaptadoras forman complejos que actúan como sensores de daño y su reclutamiento en el sitio de daño en el DNA genera una serie de eventos de señalización secuenciales en el tiempo y espacio, reclutando a otros complejos. El complejo Rad24p ("RFC-like") dirige al complejo Rad17p ("PCN-like") sobre los sitios de daño (Kondo *et al.* 2001). La carga del complejo Rad17p sobre las lesiones requiere el complejo Rad24p, pero no el Mec1p-Ddc2p (Longhese *et al.* 2003). De forma similar, la unión de Ddc2p al DNA asistiría la correcta carga de Mec1p independientemente de los complejos Rad24p y Rad17p (Rouse and Jackson 2002 a). Datos en mamíferos y levadura han mostrado que la inmovilización forzada por proteínas con función de sensor de la cromatina es suficiente para forzar la cascada de eventos de

la ruta DDR en ausencia de daño al DNA (Bonilla *et al.* 2008; Soutoglou and Misteli 2008).

Los transductores reciben y amplifican esta señal transmitiéndola corriente abajo, a través de una cascada de fosforilación, hasta las proteínas efectoras. Las cuales regulan la respuesta global al daño en el DNA. En levadura están implicadas cuatro proteínas quinasas: Mec1p, Dun1p, Rad53p y Chk1p (Nyberg *et al.* 2002). Rad53p y Chk1p desempeñan un papel clave en los puntos de control de daño y replicación del DNA. Ambas tienen un papel en la cascada de señalización posterior al de Mec1p y Tel1p y son fosforiladas después del daño al DNA de forma dependiente de Mec1p y Tel1p (Sanchez *et al.* 1996; Zhou and Elledge 2000; Usui *et al.* 2001). Rad53p además bloquea la salida mitótica (Sanchez *et al.* 1999) La transmisión de señal hasta los efectores es mediada por la fosforilación de Rad9p de forma dependiente de Mec1p. Rad9p se requiere para la unión entre la función de reconocimiento de daño en el DNA con los efectores corriente abajo actuando como adaptador. Así la activación de Rad53p por Mec1p requiere la interacción de Rad53p con Rad9p. Rad9p fosforilada por Mec1p, interactúa con Rad53p y desencadena la liberación de Rad53p activa (Sanchez *et al.* 1996; Gilbert *et al.* 2001). Chk1p es específico del punto de control de daño G2-M (Gardner *et al.* 1999; Sanchez *et al.* 1999). Por otro lado, en respuesta a estrés replicativo, parece ser que el adaptador que activa a Rad53p es Mrc1p, que es hiperfosforilado, como ocurre con Rad9p, en respuesta al bloqueo de la replicación (Alcasabas *et al.* 2001). Dun1p se requiere para la expresión de genes *RNR*, ya que regula la función del represor transcripcional Ctr1p (Zhou and Elledge 1993), además fosforila a Sml1p promoviendo su degradación (Zhao *et al.* 2001). Los genes *RNR* codifican subunidades de la ribonucleótido reductasa, la cuál regula el balance de dNTPs, aumentando sus niveles de 6 a 8 veces en respuesta a daño en el DNA (Chabes *et al.* 2003). La actividad de *RNR* es regulada postranscripcionalmente por el inhibidor Slm1p (Branzei and Foiani 2006). De este modo parece que Dun1p regula el paso final de la vía de Rad53p regulando la

disponibilidad de dNTPs. Otros posibles efectores de Rad53p son Rnr3p, Nup1p, Nup2p y Nup60p, dado que se ha demostrado que estas proteínas son fosforiladas tras tratamiento con MMS en sitios consenso de fosforilación de esta quinasa (Smolka *et al.* 2007). Por lo tanto, Mec1p tiene ambas funciones de detección y transductor de la señal de daño al DNA, controlando el estado de fosforilación de distintas proteínas de respuesta a daño (Ddc2p, Rad9p, Mrc1p y Rad53p). Otra diana de Mec1p es la histona H2A, induciendo al ser fosforilada una alteración de la cromatina en la vecindad de la lesión para permitir su reparación (Downs *et al.* 2000).

B. Mecanismos específicos de reparación de daño.

1) Señalización y reparación de roturas de doble hebra (DSB).

La ruta principal de reparación de DSB en organismos unicelulares es la recombinación homóloga que en *S. cerevisiae*, implica al complejo MRX. La vía de señalización comienza con la unión de MRX a la lesión y el reclutamiento de Tel1p, que se une a Xrs2p y fosforila a la propia Xrs2p y a Mre11p y Sae2p. Por lo tanto, en el reconocimiento de DSB están implicados la unión de Tel1p/ATR y MRX/MRN a la lesión (Clémenson and Marsolier-Kergoat 2009). Tel1p/ATM fosforila el residuo serina 129 y 139 de la histona H2A de levadura y la variante H2AX de mamíferos respectivamente (γ -H2A y γ -H2AX), dicha modificación es un evento temprano de la respuesta a daño al DNA (Downs *et al.* 2000; Burma *et al.* 2001; Ward and Chen 2001; Shroff *et al.* 2004). El complejo MRX con su actividad nucleasa inicia la detención del ciclo activando la señalización por cascada de fosforilaciones dependientes de Tel1p y Mec1p (Figura 07).

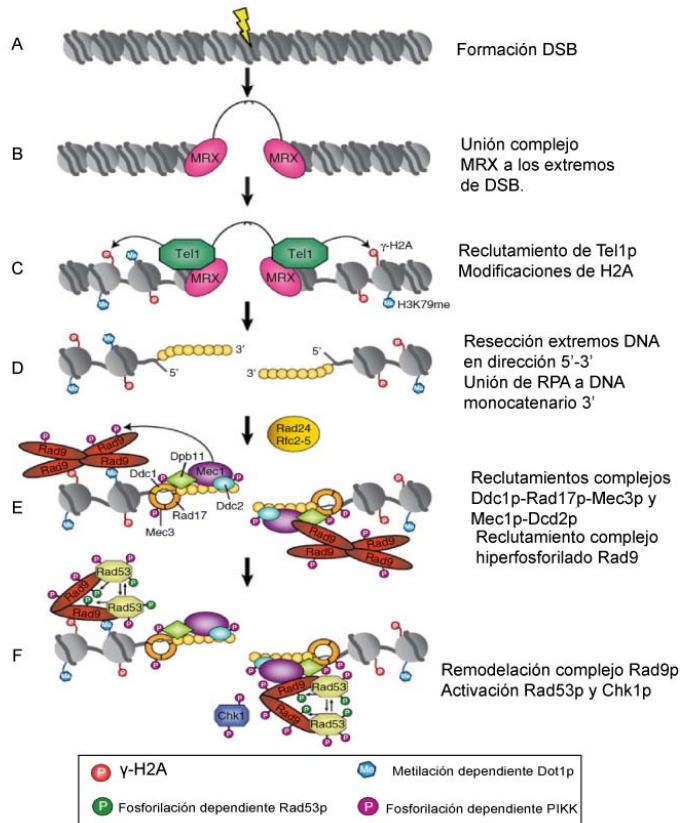


Figura 07: Activación de control de daño en respuesta a DSB en levadura. A continuación de la formación de rotura de doble cadena en el DNA (A), se produce el reconocimiento por complejo MRX (B), el reclutamiento de Tel1p que fosforila a la histona H2A (C). Comienza la resección del daño, el ssDNA formado es rápidamente recubierto por el complejo RPA (D) esto promueve el reclutamiento independiente de los complejos Ddc1p-Rad17p-Mec3p (ayudado por complejo Rad24p-Rfc3-5p) y Mec1p-Dcd2p. Dpb11p es reclutado por unión a Dcd1p fosforilado, lo que permite el reclutamiento del complejo formado por 4 unidades de Rad9p, hiperfosforilado que se une a H2A modificada (E). La remodelación de Rad9p permite la fosforilación y activación de las quinasas efectoras Rad53p y Chk1p que regulan distintas respuestas como arresto de ciclo, activación de reparación, transcripción, etc. Adaptado de (Finn *et al.* 2011).

En levadura las roturas de doble hebra también son reconocidas independientemente, por otro complejo de reparación llamado Ku (Yku70p-Yku80p), dicha unión abre una

ventana a la reparación de DSB por NHEJ (de “*Non-homologous End-Joining*”) (Clerici *et al.* 2008). El complejo MRN desempeña un papel crítico en el reconocimiento del daño al DNA, en los mecanismos de señalización y reparación, así como en el mantenimiento de la integridad cromosómica en la célula (Assenmacher and Hopfner 2004). La reparación de DSB mediante recombinación homóloga, se ve restringida a las fases S y G2 cuando la actividad de la quinasa dependiente de ciclinas (CDK) es alta y hay disponible una cromátida hermana para usar como molde en la reparación. Por lo tanto el control por CDK de la resección de DSB ocurre a través del balance entre NHEJ y HR (Finn *et al.* 2011).

La reparación de las DBS por unión no homóloga de extremos es un mecanismo que los eucariotas superiores usan preferentemente, mientras que en *S. cerevisiae* se ve restringido a la fase G1 del ciclo cuando la actividad CDK es baja, esto permite una lenta resección y aumenta la afinidad del complejo Ku70p-Ku80p a unirse a la lesión (Clerici *et al.* 2008). Los extremos de la lesión son estabilizados por MRX y Ku70p-Ku80p, que se unen independientemente. Esta ruta de reparación consiste en que el complejo DNA ligasa IV repara la rotura. Está compuesto por la DNA ligasa Dnl4p (también llamada Lig4p) que forma un heterodimero con el cofactor Lif1p (XRRC4 en humanos), el cuál se une al regulador Nej1p. Este complejo se recluta en el extremo del DNA lesionado cuando previamente se ha unido el complejo Ku70p-Ku80p permitiendo la ligación y reparación.

2) Roturas de simple cadena y sitios abásicos en el DNA.

Las roturas de simple hebra (SSB) son generadas como consecuencia de IR y estrés oxidativo (presencia de especies reactivas de oxígeno o ROS) o indirectamente durante la reparación por escisión de bases (BER de “*Base Excision Repair*”) de sitios abásicos (AP) o bases alteradas, como 8oxo-7,8-dihidroguanina (8oxoG) o 3-metil-Adenina (N³-meA), que activa los miembros del sistema PARP (“*Poly ADP-Ribose*

Polymerase”) (Caldecott 2008). Los sitios apurínico/apiridímico o sitios abásicos (“*AP site*”) son una de las lesiones espontáneas más frecuentes en el DNA. Se ha descrito que el agente alquilante MMS produce como lesiones indirectas sitios AP, los cuáles se producen después de la eliminación de los productos de la alquilación (N^7 -meG y N^3 -meG) por la N^3 -metA glicosilasa Mag1p (Boiteux and Guillet 2004). El daño en las bases puede deberse a diversos procesos como metilación, deaminación y oxidación (Lindahl and Nyberg 1974; Rydberg and Lindahl 1982; Cadet *et al.* 1997). Estas bases dañadas o erróneas pueden ser eliminadas por la acción de endonucleasas de sitios AP o DNA N-glicosilasas con actividad AP liasas que generan SSB con extremos 5' o 3' bloqueados respectivamente, que pueden llegar a ser tóxicas sí son convertidos en DSB después de la replicación o pueden bloquear la misma.

“*Base Excision Repair*” (BER):

Las endonucleasas de sitios AP son Apn1p y Apn2p, teniendo una mayor actividad Apn1p que tiene el 97 % de actividad en la célula y Apn2p el 3% restante (Popoff *et al.* 1990; Ramotar *et al.* 1991). Apn1p protege a la célula de daño endógeno o exógeno por estrés oxidativo y alquilación en el DNA (Boiteux and Guillet 2004). El mutante nulo de ambas proteínas es hipersensible a agentes alquilantes como MMS y agentes oxidantes.

En *S. cerevisiae* existen tres proteínas DNA N-glicosilasas que son: Ntg1p, Ntg2p y Ogg1p que reparan daño oxidativo y tienen actividad AP liasa (Girard and Boiteux 1997) creando extremos 3'- $\alpha\beta$ -insaturados-aldehídicos (3'dRP). Se ha observado que Ntg1p y Ntg2p protege a las células deficientes en *APN1* de la letalidad de MMS, pero su acción es deletérea en un doble mutante nulo *apn1 Δ apn2 Δ* (Boiteux and Guillet 2004). En *S. cerevisiae*, el extremo 5'-deoxiribosa-fosfato (5'dRP) de SSB es eliminado por Rad27p específicamente (Wu and Wang 1999).

“Nucleotic Excision Repair” (NER):

Esta vía de reparación está involucrada en la reparación de sitios AP siendo un refuerzo del sistema BER y endonucleasas de 3'dRP por el complejo Rad1p-Rad10p. NER esta compuesta por diferentes proteínas que forman 4 complejos llamados NEF (*“nucleotic excision factor”*): Así Rad1p, Rad10p y Rad14p forman NEF1, Rad4p y Rad23p el NEF2, Rad2p junto con subunidades del factor de transcripción TFIIH (*“transcription factor RNA Polymerase Holoenzyme”*) forman NEF3 y Rad7p, Rad16p que son subunidades de NEF4.

“Error Free Post-Replication Repair” (PRR)

Los sitios AP pueden bloquear la maquinaria de replicación y traducción. El bloqueo de las horquillas de replicación puede generar vacíos (*“gap”*) monocatenario que son el sustrato para la vía de reparación post-replicación o PRR. Esta ruta de reparación esta compuesta de 3 subrutas, dos que eliminan errores y una que genera mutagénesis. PRR requiere los productos de *RAD6* y *RAD18* (Boiteux and Guillet 2004), el primero codifica una E2 o ubiquitina-conjugada y el segundo una E3 o ubiquitina ligasa. Rad6p y Rad18p forman un heterodimero que se une a ssDNA, siendo el regulador central de PRR. Las subruta de eliminación de errores dependen de *RAD5* y *POL30*, mientras que la mutagénica de *REV3* (Xiao *et al.* 2000; Broomfield *et al.* 2001). En esta ruta también esta implicada la desosicitidil-transferasa Rev1p.

De modo que la eliminación de errores en PRR es un proceso de recombinación que puede tener un papel relevante en la tolerancia a sitios AP inducidos secundariamente por luz UV y agentes genotóxicos (Friedberg *et al.* 2006).

En conjunto los sitios AP son reparados o tolerados por dos mecanismos que colaboran entre sí; BER y NER, además por la acción de ciertas proteínas pueden generar lesiones secundarias como ssDNA con extremos 3' o 5' bloqueados que resultan más tóxicos que el propio sitio AP, especialmente los

3', y que deben ser reparados. Así sí se acumula un exceso de ssDNA-3' y puede generarse DSB y colapso de horquillas de replicación (Boiteux and Guillet 2004).

3) Bases desapareadas.

Los errores de bases, producidos en la replicación dan lugar a bases desapareadas, son reparados por el mecanismo denominado MMR ("*Mismatch Repair*"). Este mecanismo tiene importancia en el mantenimiento de un ratio normal de mutación, actúa en la fase de mitosis y en el entrecruzamiento durante la recombinación meiótica. La identificación de los errores cometidos por la polimerasa ocurre mientras interactúa con las horquillas de replicación del DNA (Plys *et al.* 2012). En *S. cerevisiae* hay dos complejos de reconocimiento o sensor: un heterodimero formado por Msh2p-Msh6p se encarga del reconocimiento de desajustes entre bases y pequeños bucles de inserción o deleción y el segundo heterodimero Msh2p-Msh3p reconoce además grandes bucles de inserción/deleción (Jiricny 2006). Para la posterior reparación se necesita la interacción con el heterodimero Mlh1p-Pms1p, siendo muy importante el modo de unión de con Mlh1p (Plys *et al.* 2012). La nueva hebra de DNA sintetizada es cortada y sirve como molde para una nueva replicación o re-replicación.

Aunque se han desvelado algunos de los mecanismos clave de la respuesta al daño al DNA, aun quedan por descubrir rutas que conectan las proteínas de "*checkpoint*" con las maquinarias del ciclo celular y la reparación del DNA. Recientemente identificamos un nuevo "*checkpoint*" de daño al DNA que regula la transición G1-S en levadura (Menacho-Marquez *et al.* 2007). Este "*checkpoint*" depende enteramente de la quinasa Gcn2p, que regula la traducción en respuesta a ayuno de aminoácidos. Gcn2p parece regular el *checkpoint* a través de mecanismos dependientes e independientes de la traducción, reflejando así nuevos aspectos de esta importante quinasa. Se desconoce completamente como el daño al DNA activa Gcn2p, y cuáles son los sustratos que median su regulación del ciclo celular y/o la reparación del DNA. El

Introducción_____

presente proyecto de investigación abordara estas importantes preguntas.

OBJETIVOS:

A. Analizar las respuestas y dianas moleculares de la acidificación intracelular causada por ácidos débiles en la levadura *S. cerevisiae*:

1. Caracterización del fenotipo de sensibilidad de *gcn2Δ* a estrés por ácidos débiles.
2. Análisis de la aparición en la célula de estrés energético como consecuencia de la acidificación celular.
3. Caracterización de los mutantes de la ruta GCN en esta respuesta.
4. Caracterización del papel de los tRNA descargados y las aminoacil tRNA-sintetasas en respuesta a estrés por ácido.

B. Estudiar el papel desempeñado por Gcn2p en relación a la respuesta celular a estrés genotóxico y búsqueda de posibles dianas moleculares.

1. Caracterización genética y bioquímica de la activación de Gcn2p por agentes lesionantes de DNA.
2. Análisis del papel de las proteínas de control del ciclo y reparación de daño en el DNA en la activación de Gcn2p en esta respuesta.
3. Análisis de la activación del control traduccional por daño al DNA y caracterización genética de dicha respuesta.
4. Análisis de la implicación de las aminoacil tRNA-sintetasas en la activación de Gcn2p por lesionantes del DNA.

II. MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Medios y ensayos de crecimiento celular.

A. Cepas de levadura empleadas.

La lista de cepas empleadas en la presente tesis se muestra en la tabla 3. Por comodidad, las cepas diploides haploinsuficientes se nombrarán por su nombre común en mayúsculas. Las cepas indicadas se han transformado con los plásmidos descritos en la tabla 2.

Tabla 2: Plásmidos utilizados:

p180	Región 5' no traducida (5'-UTR) del mRNA de <i>GCN4</i> fusionada a <i>lacZ</i> en YCp50	(Yang <i>et al.</i> 2000)
pGAL1- <i>FRS2</i>	Aislado de cepa homónima. Subunidad α de fenilalanil-tRNA sintetasa citoplasmática bajo control del promotor de <i>GAL1</i> .	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
pUN100	Centromérico de sobreexpresión del gen <i>LEU2</i> para complementar auxotrofia de leucina.	(Elledge and Davis 1988)

B. Medios de cultivo.

Los medios estándares para el cultivo de levaduras que han sido utilizados son YPD, (“*Yeast Extract-Peptone-Dextrose*”, medio rico o complejo). [1% (peso/volumen) de extracto de levadura, 2% (peso/volumen) peptona, 2% (peso/volumen) de glucosa (dextrosa)], o sustituyendo glucosa por galactosa (YPGal) o rafinosa (YPRaf) en la misma concentración. Otro medio estándar usado es medio sintético SD (de “*Synthetic Defined*” o medio mínimo) (Sherman 2002). En el medio SD se utilizan como fuente de diversos nutrientes “*Yeast Nitrogen Base w/o amino acids*” (0,7% peso/volumen), glucosa (2% peso/volumen) y para ajustar el pH utilizamos 50

mM de ácido succínico llevado a pH 4 o 5,5 con Tris. Las soluciones de aminoácidos y bases nitrogenadas se preparan en agua concentradas X100, i.e., 10 mg/ml para aminoácidos excepto histidina y las bases nitrogenadas que es a 3 mg/ml, se esterilizan en autoclave (salvo metionina y triptófano que al ser inestables se filtran) y se guardan a temperatura ambiente. Las concentraciones de aminoácidos Se añaden a razón de 10 ml por litro en medio líquido o 0,25 ml por placa Petri para cepas con las auxotrofías correspondientes (Sherman 2002). En el caso de utilizar medios sólidos en placa se le añadió 2% (peso/volumen) de Bapto-agar (Pronadisa).

Tabla 3: Lista de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas.

Nombre	Genotipo relevante	Referencia
BY4741	MATa; <i>leu2</i> Δ0; <i>his3</i> Δ0; <i>met15</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0	(Euroscarf)
<i>gcn1</i> Δ	BY4741; <i>gcn1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>gcn2</i> Δ	BY4741; <i>gcn2</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>gcn3</i> Δ	BY4741; <i>gcn3</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>gcn4</i> Δ	BY4741; <i>gcn4</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>gcn20</i> Δ	BY4741; <i>gcn20</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>apn1</i> Δ	BY4741; <i>apn1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>mag1</i> Δ	BY4741; <i>mag1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>mgt1</i> Δ	BY4741; <i>mgt1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>mlh1</i> Δ	BY4741; <i>mlh1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>pms1</i> Δ	BY4741; <i>pms1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad1</i> Δ	BY4741; <i>rad1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad6</i> Δ	BY4741; <i>rad6</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad14</i> Δ	BY4741; <i>rad14</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad18</i> Δ	BY4741; <i>rad18</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad50</i> Δ	BY4741; <i>rad50</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad51</i> Δ	BY4741; <i>rad51</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rad52</i> Δ	BY4741; <i>rad52</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rev1</i> Δ	BY4741; <i>rev1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>rev3</i> Δ	BY4741; <i>rev3</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>sgs1</i> Δ	BY4741; <i>sgs1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>msd1</i> Δ	BY4741; <i>msd1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>msm1</i> Δ	BY4741; <i>msm1</i> ::KanMX4	(Euroscarf)
<i>mst1</i> Δ	BY4741; <i>mst1</i> ::kanMX4	(Euroscarf)
<i>slm5</i> Δ	BY4741; <i>slm5</i> ::kanMX4	(Euroscarf)
<i>yer087w</i> Δ	BY4741; <i>yer087w</i> ::kanMX4	(Euroscarf)

W303.1a, <i>sml1</i> Δ	MATa, <i>leu2-3,112 his3-11, ura3-1, ade2-1, trp1-1, can1-100, rad5-535 sml1-1</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>mec1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1; mec1::TRP1</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1; tel1::HIS3</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>mec1</i> Δ <i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1; mec1::TRP1 tel1::HIS3</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>xrs2</i> Δ	W303.1a; <i>xrs2::LEU2</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>mre11</i> Δ	W303.1a; <i>mre11::HIS3</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>rad50</i> Δ	W303. 1a; <i>rad50::TRP1</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>xmr</i> Δ	W303. 1a; <i>xrs2::LEU2 mre11::HIS3 rad50::TRP1</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>xrs2</i> Δ <i>mec1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1; mec1::TRP1 xrs2::LEU2</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>xrs2</i> Δ <i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, tel1::HIS3 xrs2::LEU2</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
<i>xrs2</i> Δ <i>mec1</i> Δ <i>tel1</i> Δ <i>sml1</i>	<i>sml1-1, xrs2::LEU2 mec1::TRP1 tel1::HIS3</i>	(D'Amours and Jackson 2001)
W303::p180	W303.1a <i>sml1</i> Δ p180::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>xrs2</i> Δ::p180	W303.1a, <i>sml1</i> Δ <i>xrs2::LEU2</i> p180::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>mre11</i> Δ::p180	W303.1a, <i>sml1</i> Δ <i>mre11::HIS3</i> p180::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad50</i> Δ::p180	W303.1a, <i>sml1</i> Δ, <i>rad50::TRP1</i> p180::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo

mrxΔ::p180	W303.1a, <i>sml1Δ xrs2::LEU2 mre11::HIS3 rad50::TRP1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
BY4741::p180	BY4741, p180::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>pms1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>pms1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>mag1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>mag1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rad1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad50Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rad50 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad51Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rad51 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad52Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rad52 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rev1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rev1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rev3Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rev3 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>mlh1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>mlh1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad6Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rad6 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>apn1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>apn1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>mgt1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>mgt1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>rad14Δ</i> ::p180	BY4741, <i>rad14 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>sgs1Δ</i> ::p180	BY4741, <i>sgs1 p180::URA3</i>	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
BY4743	<i>MATa/α lys2Δ0/LYS met15Δ0/MET15 his3Δ1/his3Δ ura3Δ0/ura3Δ01 leu2Δ0/leu2Δ0</i>	(Euroscarf)
ALA1/YOR335C	BY4743, <i>ala1::KanMX4/ALA1</i>	(Euroscarf)
MSR1/YHR091C	BY4743, <i>msr1::KanMX4/MSR1</i>	(Euroscarf)
YDR341C	BY4743, <i>ydr341c::KanMX4/YDR341C</i>	(Euroscarf)

DED81/YHR019C	BY4743, <i>ded81::KanMX4/DED81</i>	(Euroscarf)
SLM5/YCR024C	BY4743, <i>slm5::KanMX4/SLM5</i>	(Euroscarf)
DPS1/YLL018C	BY4743, <i>dps1::KanMX4/DPS1</i>	(Euroscarf)
MSD1/YPL104W	BY4743, <i>msd1::KanMX4/MSD1</i>	(Euroscarf)
YNL247W	BY4743, <i>ynl247w::KanMX4/ YNL247W</i>	(Euroscarf)
GUS1/YGL245W	BY4743, <i>gus1::KanMX4/GUS1</i>	(Euroscarf)
MSE1/YOL033W	BY4743, <i>mse1::KanMX4/MSE1</i>	(Euroscarf)
GLN4/YOR168W	BY4743, <i>gln4::KanMX4/GLN4</i>	(Euroscarf)
GRS1/YBR121C	BY4743, <i>grs1::KanMX4/GRS1</i>	(Euroscarf)
GRS2/YPR081C	BY4743, <i>grs2::KanMX4/GRS2</i>	(Euroscarf)
HTS1/YPR033C	BY4743, <i>hts1::KanMX4/HTS1</i>	(Euroscarf)
ILS1/YBL076C	BY4743, <i>ils1::KanMX4/ILS1</i>	(Euroscarf)
ISM1/YPL040C	BY4743, <i>ism1::KanMX4/ISM1</i>	(Euroscarf)
CDC60/YPL160W	BY4743, <i>cdc60::KanMX4/CDC60</i>	(Euroscarf)
NAM2/YLR382C	BY4743, <i>nam2::KanMX4/NAM2</i>	(Euroscarf)

KRS1/YDR037W	BY4743, <i>krs1::KanMX4/KRS1</i>	(Euroscarf)
MSK1/YNL073W	BY4743, <i>msk1::KanMX4/MSK1</i>	(Euroscarf)
MES1/YGR264C	BY4743, <i>mes1::KanMX4/MES1</i>	(Euroscarf)
MSM1/YGR171C	BY4743, <i>msm1::KanMX4/MSM1</i>	(Euroscarf)
FRS1/YLR060W	BY4743, <i>frs1::KanMX4/FRS1</i>	(Euroscarf)
FRS2/YFL022C	BY4743, <i>frs2::KanMX4/FRS2</i>	(Euroscarf)
MSF1/YPR047W	BY4743, <i>msf1::KanMX4/MSF1</i>	(Euroscarf)
YER087W	BY4743, <i>yer087w::KanMX4/ YER087W</i>	(Euroscarf)
YHR020W	BY4743, <i>yhr20w::KanMX4/ YHR020W</i>	(Euroscarf)
DIA4/YHR011W	BY4743, <i>dia4::KanMX4/DIA4</i>	(Euroscarf)
SES1/YDR023W	BY4743, <i>ses1::KanMX4/SES1</i>	(Euroscarf)
MST1/YKL194C	BY4743, <i>mst1::KanMX4/MST1</i>	(Euroscarf)
MSW1/YDR268W	BY4743, <i>msw1::KanMX4/MS W1</i>	(Euroscarf)
THS1/YIL078W	BY4743, <i>ths1::KanMX4/THS1</i>	(Euroscarf)
WRS1/YOL097C	BY4743, <i>wrs1::KanMX4/WRS1</i>	(Euroscarf)

MSY1/YPL097W	BY4743, <i>msy1::KanMX4/MSY1</i>	(Euroscarf)
TYS1/YGR185C	BY4743, <i>tys1::KanMX4/TYS1</i>	(Euroscarf)
VAS1/YGR094W	BY4743, <i>vas1::KanMX4/VAS1</i>	(Euroscarf)
URA10/ YMR271c	BY4743; YMR271c::kanMX4/ YMR271c	(Euroscarf)
Y258	<i>MATa pep4-3, his4-580, Ura3-53, leu2-3,112</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>ILS1</i>	Y258, pGAL1- <i>ILS1::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>KRS1</i>	Y258,pGAL1- <i>KRS1::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>DED81</i>	Y258, pGAL1- <i>DED81::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>SLM5</i>	Y258, pGAL1- <i>SLM5::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>MSM1</i>	Y258, pGAL1- <i>MSM1::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>GRS1</i>	Y258, pGAL1- <i>GRS1::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>MSD1</i>	Y258, pGAL1- <i>MSD1::URA3</i>	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)

pGAL1- <i>GUS1</i>	Y258, pGAL1- <i>GUS1</i> ::URA3	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>FRS2</i>	Y258, pGAL1- <i>FRS2</i> ::URA3	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>MST1</i>	Y258, pGAL1- <i>MST1</i> ::URA3	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
pGAL1- <i>YER087W</i>	Y258, pGAL1- <i>YER087W</i> ::URA3	Phizicky, EM. and Snyder M. (Gelperin <i>et al.</i> 2005)
H1645	<i>MATa ura3-52 leu2-3, -112 trp1-Δ63 sui2Δ, p919 [SUI2, URA3]</i>	Hinnebusch, A.G.
<i>SUI2</i> (WT)	H1645 <i>p919Δ pRS-65 [pRS414 SUI2-TRP1]</i>	(Hueso <i>et al.</i> 2012)
<i>sui2Δ</i> S51A	H1645 <i>p919Δ pRS-67 [pRS414 SUI2 S51A-TRP1]</i>	(Hueso <i>et al.</i> 2012)
<i>mec1Δ</i> ::pGAL1- <i>FRS2</i>	<i>mec1Δ</i> , pGAL1- <i>FRS2</i> ::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>mec1Δtel1Δ</i> ::pGAL1- <i>FRS2</i>	<i>mec1Δtel1Δ</i> , pGAL1- <i>FRS2</i> ::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
BY4741::pGAL1- <i>FRS2</i>	BY4741, pGAL1- <i>FRS2</i> ::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo
<i>gcn2Δ</i> ::pGAL1- <i>FRS2</i>	<i>gcn2Δ</i> , pGAL1- <i>FRS2</i> ::URA3	Aparicio-Sanchis, R. este trabajo

C. Ensayos de crecimiento en medio líquido.

La capacidad de crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó midiendo la absorbancia o densidad óptica (DO u OD) a 660 nm de dichos cultivos a lo largo del tiempo (Burke D. *et al.* 2000). Un valor DO = 1 equivale aproximadamente a una concentración de células de levadura de 1 mg de peso fresco/ml.

Los cultivos se crecieron en microplacas de 100 pocillos y se monitorizaron mediante el analizador Bioscreen C[®] (Thermo Labsystems[®]). Cuantificamos el crecimiento registrando la densidad óptica con un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de absorbancia. Las condiciones de crecimiento fueron 28°C sometiendo a agitación vigorosa los 30 segundos previos a la lectura de absorbancia. La lectura se realizó cada 20 o 30 minutos, según experimento, durante 3 a 5 días. Para inocular estos cultivos se partió de cultivos celulares saturados de una noche, los cuales se diluyeron 1/200, para el arranque del experimento en el medio correspondiente. En estas condiciones se realizó el tratamiento con las dosis de drogas o compuesto indicado en cada experimento, utilizando como control sin tratamiento, 1 volumen de agua. Este aparato tiene la ventaja de poder trabajar con muchos cultivos celulares simultáneos y cuantificar el crecimiento a lo largo del tiempo de modo automatizado. Se realizaron dos a cuatro experimentos independientes con 3 réplicas por condición y cepa. El procesamiento de los datos sigue la siguiente secuencia: las medidas han de ser corregidas, para hacer comparables las medidas del analizador con absorbancia reales a 660 nm de cultivos crecidos en condiciones óptimas, y para corregir la pérdida de linealidad de la lectura de absorbancia con respecto a la concentración de células a partir de determinados valores (Warringer and Blomberg 2003), utilizando el siguiente ajuste:

$$DO_{\text{corregida}} = DO_{\text{medida}} + 0.449 \cdot (DO_{\text{medida}})^2 + 0.19 \cdot (DO_{\text{medida}})^3.$$

Realizamos el promedio entre las réplicas, se elimina el fondo de DO dado por el medio. Con este dato se puede representar la curva de crecimiento de cada cepa en cada concentración. La curva de crecimiento típica sigmoidal nos proporciona una herramienta de comparación de fenotipos de crecimiento. Como observamos en la figura 08 se utilizan varios parámetros, primero diferencias en la fase de adaptación o “lag”, el cuál se observa por un desplazamiento de la curva, segundo diferencias en la fase exponencial de crecimiento, pudiendo existir variaciones en el tiempo de generación implicando diferencias de pendiente y por último en la fase estacionaria, donde se da el máximo crecimiento del cultivo o rendimiento de cultivo, el cuál puede variar en respuesta al tratamiento alcanzando un mayor o menor absorbancia o densidad óptica. Estos parámetros se obtienen matemáticamente, así representando la DO frente a tiempo en escala semilogarítmica, estando la ordenada en escala logarítmica. De las curvas obtenidas se realiza un ajuste de regresión lineal fiable (R^2 próximo a 1) de los datos de la fase exponencial, calculando la pendiente de la recta obtenida que corresponde con la tasa de crecimiento (μ en h^{-1}) y del que se puede obtener el tiempo de generación o duplicación ($t_d = \ln 2 / \mu$). Calculamos la fase “lag” como el valor X (tiempo) del último punto inicial que no se ajusta a la curva. El rendimiento del cultivo lo obtenemos como el valor moda de las DO reales de la fase estacionaria.

En los casos de rastreo con las cepas haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas se cuantificó el efecto de las condiciones de cultivo en el crecimiento de cada cepa con el parámetro de porcentaje relativo (R), según la siguiente formula:

$$R = ((CT - C_0) - (TT - T_0) / (CT - C_0)) * 100$$

Para el rastreo con ácido acético, R es el porcentaje de crecimiento a $DO=1,5$ del control sin acético. La diferencia $(CT - C_0)$ es el crecimiento de la cepa sin tratar y $(TT - T_0)$ es el

crecimiento en la cepa tratada en la condición de cultivo correspondiente.

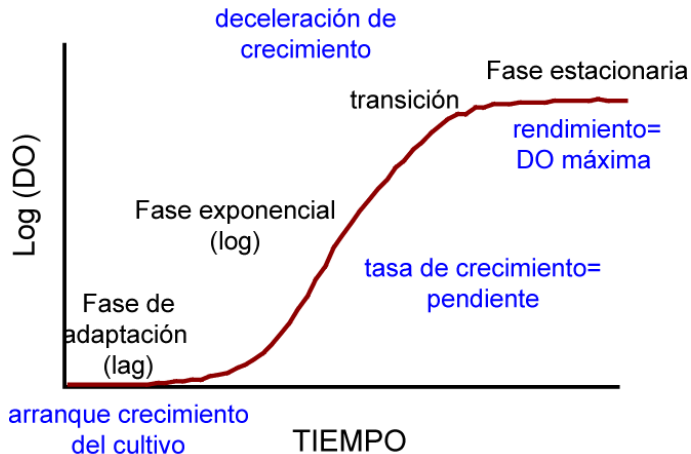


Figura 08: Curva sigmoidea de crecimiento en levaduras.

Al representar la densidad óptica frente al tiempo obtenemos una curva sigmoidea de crecimiento con 5 fases: Fase de adaptación (lag), fase exponencial (máxima velocidad de duplicación, metabolismo fermentativo), fase de transición (no hay división, se produce el cambio diaúxico a metabolismo respiratorio), fase estacionaria (los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular) y fase de muerte (decrece el número de células, no se muestra en la figura). A partir de los datos de Bioscreen C® podemos generar gráficas de distintas cepas y tratamientos y comparar parámetros visualmente o representarse en escala semilogarítmica y calcular matemáticamente los distintos parámetros.

Para el rastreo con MMS, R es el porcentaje de crecimiento a 50h. La diferencia (CT – C0) es el crecimiento de la cepa sin tratar y (TT – T0) es el crecimiento en la cepa tratada en la condición de cultivo correspondiente. Con este dato se representa el porcentaje de crecimiento frente a dosis de MMS en cada cepa, para ello se utilizó el “software SigmaPlot 10” (“systat software, Inc.”).

Para cuantificar la dosis que producía una inhibición del crecimiento del 50% (IC₅₀) realizamos un ajuste farmacológico con el “software SigmaPlot 10”. Representamos el logaritmo en base 2 de la relación de la IC₅₀ de cada cepa y valor IC₅₀ de la cepa utilizada de referencia. Lo que definimos como índice

fenotípico. La media de la máxima concentración inhibitoria (IC_{50}) es una medida de la eficacia de un compuesto en la inhibición de la función biológica o bioquímica.

En general, los cultivos y subcultivos se inocularon a partir de un precultivo de 2-3 ml. crecido toda la noche a 28°C hasta la saturación. Posteriormente se hicieron las diluciones adecuadas en volúmenes mayores de cultivo realizando los tratamientos indicados en cada experimento en la mitad de la fase exponencial de crecimiento (DO_{660nm} 0,4-0,5 en medio mínimo). En estas DO se separan en varios subcultivos para cada dosis de tratamiento y añadiendo al control sin tratamiento el mismo volumen de agua, o en el caso de tratamiento con ácido acético, agua equilibrada con succinato a pH 5,5. En el caso de de cepas de sobreexpresión bajo el promotor de *GAL1* (pGAL1) fueron crecidas en precultivos con YPRafinosa, lavadas y subcultivadas en YPD y medio inductivo YPGalactosa en paralelo, al menos seis horas para provocar la inducción.

D. Ensayos de crecimiento en medio sólido (“goteos”).

Realizamos diluciones decimales seriadas de cultivos líquidos de distintas cepas de levadura con sus tratamientos correspondientes y transferimos aproximadamente 3 μ l de cada dilución, con la ayuda de un replicador (*Sigma-Aldrich chemie R-2383, Steinhem Germany*) a placas de medio sólido con las condiciones diferenciales a estudiar. Posteriormente incubamos las placas entre 2-4 días en estufa a 28°C. En el análisis del crecimiento tuvimos en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observa crecimiento como el tamaño de colonia.

E. Ensayos clonogénicos de viabilidad.

Para determinar el porcentaje de células viables en un cultivo líquido de levaduras, sometido al tratamiento indicado en cada experimento, realizamos diluciones seriadas hasta una densidad de 3000 células/ml y extendimos 0,1 ml a placas de

medio sólido. Las placas se incubaron a 28°C y se analizaron cuantificando las colonias cuando estas tuvieron un diámetro de 1-2 mm (2-5 días).

F. Cultivo y manipulación de bacterias.

Para el cultivo y manipulación de bacteria se siguieron métodos estándar (Amberg *et al.* 2005). El medio de cultivo utilizado ha sido: Luria-Bertani (LB, 1% Bapto-Triptona, 0,5% Extracto de levadura, 1% cloruro sódico, ajustado a pH 7 con NaOH 1M. En caso necesario suplementado con ampicilina a concentración final 100 µg/ml.

2. Tratamientos.

A. Agentes para inducir la acidificación intracelular.

Nosotros utilizamos ácido acético añadido al medio concentraciones de 25, 30, 50, 75 y 100 mM, indicadas en cada ensayo, estabilizado con succinato pH 4, como control usamos medio preparado en las mismas condiciones sin acético.

B. Agentes genotóxicos.

- Beta-lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-nafto [1,2-b] pirano-5,6-diona; Sigma): Es un agente antitumoral que produce roturas de doble banda en el DNA y retraso en la progresión G1-S (Menacho-Marquez 2007). El mecanismo por el cuál las causa aún es desconocido, aunque se ha sugerido que inhibe la actividad catalítica de topoisomerasa I de modo distinto a camptotecina (Li *et al.* 1993). El fármaco se disolvió a una concentración de 2 mg/ml (100X; equivale 8,2 mM) en DMSO, separado en alícuotas que se conservaron hasta su uso a -20°C. En los tratamientos está solución de partida se diluyó en el medio de cultivo a la concentración deseada que fue 2,5 µg/ml. La concentración final de DMSO nunca fue superior al 0,1%.

- Camptotecina (Sigma): Es un agente citotóxico que se une irreversiblemente al complejo DNA-topoisomerasa I, produciendo un complejo ternario que evita la religación del DNA (Hertzberg *et al.* 1989). Causa daño al DNA induciendo la formación de roturas de simple hebra y apoptosis (Ciccia and Elledge 2010), se usa como agente anticancerígeno. Este compuesto se diluyó en DMSO a la concentración 50 mM y fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

- Cis-platino (cis-diaminoplatino (II) dicloruro, Sigma): es un potente agente antineoplásico que induce

aductos dentro de una hebra de DNA, es decir, entrecruzamientos (Siddik 2003; Huang *et al.* 2005; Ciccia and Elledge 2010). Se preparo diluyendo en DMSO a una concentración de 50 mM y se guardo a -20°C hasta su utilización.

- Metil metano sulfonato (MMS Sigma): Es un agente alquilante del DNA que transfiere grupos metilo a las bases nitrogenadas (Chang *et al.* 2002), preferentemente 7meG, pero también 3meA y 3meG. También produce el bloqueo de la progresión de las horquillas de replicación (Longhese *et al.* 2003). Estas lesiones pueden evolucionar por procesos metabólicos a otras como sitios abásicos (AP) y en algunas ocasiones a DSB (Lundin *et al.* 2005). Este compuesto se diluyó en agua a una concentración 100 veces la deseada, finalmente se diluye en el medio de cultivo a la concentración final indicada en cada ensayo.

- Phleomicina (de *Streptomyces verticillus*; Sigma): Es un glicopéptido radiomimético, estructuralmente relacionado al antibiótico bleomicina. La phleomicina bloquea la entrada en fase-S del ciclo celular y produce daño en el DNA por DSB (He *et al.* 1996; Nakada *et al.* 2003). Este compuesto se disolvió en agua a una concentración de 25 mg/ml y conservado a -20°C hasta su utilización.

- Hidroxiurea (Sigma): Es un inhibidor específico de la síntesis de DNA y un agente antineoplásico específico de fase-S (Szekeres *et al.* 1997; Chang *et al.* 2002). El mecanismo de acción de hidroxiurea involucra la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) (Szekeres *et al.* 1997), causando una reducción de los niveles de dNTPs lo que interfiere con la progresión de la horquilla de replicación (Soriano-Carot *et al.* 2012). En todos los casos la cantidad de hidroxiurea necesaria se pesó y se disolvió directamente en el medio de cultivo.

- Nocodazol (metil [5-(2-tienil-carbonil)-1H-benzimidazol-2-yl]]-carbamato; Sigma): Es una agente

antitumoral que produce la disrupción de microtúbulos y la función del huso en la mitosis, debido a su unión a β -tubulina evita la formación de uno de los dos puentes disulfuro entre moléculas. probablemente porque su unión directa a tubulina causa cambios de conformación con está prolina (Lee *et al.* 1980). Arresta el ciclo celular en la transición G2-M. El nocodazol fue disuelto en el solvente DMSO a una concentración de 1 mg/ml y se conservo a -20°C hasta su utilización.

- 5-Fluorouracilo (5-FU) (Sigma): Es un antimetabolito que se une de forma irreversible a la enzima timidilato sintasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina, bloqueando así su biosíntesis (Elstein *et al.* 1997; Peters *et al.* 2002). Como consecuencia los niveles celulares de dTTP se agotan, inhibiendo la replicación del DNA y la transcripción génica, provocando la parada del ciclo celular en la fase S (Wadler *et al.* 1998; Takeda *et al.* 1999). En células humanas induce la apoptosis dependiente de p53 (Takeda *et al.* 1999; De Angelis *et al.* 2006). El 5-FU se disolvió en DMSO a una concentración 100 veces a la que se deseó finalmente y se guardo a -20°C hasta su utilización. Las dosis correspondientes de trabajo se indican en cada experimento.

3. Inmunodetección de proteínas.

A. Extractos proteicos.

Tras el tratamiento correspondiente indicado en cada ensayo, a partir de 5 ml. de cultivo, se recogieron las células por centrifugación de 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, resuspendimos el sedimento celular en 150 μ l de tampón de carga de proteínas Laemmli 2X (diluido con agua a partir de 5X: 7.5% SDS, 0,1 M DTT, 10 mM EDTA, 30% sacarosa, 0,01% de azul de bromofenol, 0,3 M Tris llevado a pH 6,8 con HCl) (Laemmli 1970). Las muestras se incubaron a 95°C durante 10 minutos para producir la lisis celular. Posteriormente se centrifugaron y se almacenaron para su uso posterior a -80°C. Se cargaron en el gel de electroforesis cantidades equivalente de proteína para cada muestra.

B. Electroforesis.

La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles discontinuos de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE) utilizando el sistema "*MiniProtean tetracell*" (BioRad). Se utilizaron geles al 10% para anticuerpo anti-P-eIF2 α . Para la polimerización se utilizó como catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^-$) que se añade en forma de persulfato amónico (APS, 50 μ l al 10%) y como iniciador TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) (5 μ l). La electroforesis se realizó a diferencia de potencial constante de 80 V en tampón de electroforesis SDS-PAGE (Glicina 192 mM, SDS 0.1% pH 8.3 con Tris Base). En todos los casos se utilizaron marcador preteñido de peso molecular: "*PageRuler*TM" (10-170 kDa, de Fermentas).

C. Transferencia a membrana.

La transferencia a membrana de Polivinilidenofluoruro (PVDF) se realizó mediante transferencia en semiseco con el

equipo “*Trans-Blot semidry*” (BioRad). Para ello se montó el sándwich sobre el ánodo de platino, colocamos papel de filtro extra grueso (BioRad), sobre él la membrana, sobre ella el gel y finalmente otro papel de filtro. Todo se embebió con tampón de transferencia semiseco (48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% metanol, 10% SDS pH 9.2) antes de la colocación en el sistema de transferencia. Se transfirió a amperaje constante de 150 mA (2,5 mA/cm²) durante 30-40 minutos.

D. Tinción de membrana con “*Direct Blue 71*”.

Para confirmar la carga uniforme de las muestras en el gel, teñimos la membrana tras la transferencia, siguiendo el protocolo publicado en (Walker *et al.* 2002). (Una vez concluyo la transferencia sumergimos la membrana en 50 ml de solución de trabajo (0,008% (p/v) de *DB71*) durante 5 minutos en agitación. Se retiró la solución. Hicimos lavados de la membrana 2 o 3 veces con solución de lavado (40% etanol, 10% ácido acético glacial, agua milliQ hasta 1l) durante unos minutos. Escaneamos y desteñimos totalmente la membrana aplicando solución de desteñido (50% etanol absoluto, 15% bicarbonato sódico 1 M, ajustando volumen agua milliQ a 1 l).

E. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana.

La membrana se bloquea, sumergiéndola en solución TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl con Tween20 al 0.1%) con leche en polvo desnatada (Sveltesse®, Nestlé) al 1%, durante 1 h en agitación. La inmunodetección (Harlow 1988) comenzó con la incubación de la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación a 4°C (Tabla 4). La membrana se sometió a 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente 45-60 minutos en agitación a temperatura ambiente (Tabla 4) (Anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa, BioRad) diluido 1:10000 en TBS-T. Se elimina el exceso de anticuerpo con tres lavados de 5 minutos cada uno

con TBS-T. La detección de proteínas se hizo mediante un sistema de quimioluminiscencia “*ECL Plus o ECL prime Western Blotting Detection System*” (GE Healthcare-Amersham Biosciences) siguiendo protocolo del fabricante. Tras su secado la membrana se colocó en un *Hypercassette* (GE Healthcare) y se sometió a análisis autoradiográfico con una película fotográfica (*Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX*). En la figuras se muestra resultados de un experimento representativo de al menos dos independientes por duplicado, siendo los resultados esencialmente similares. Las películas así como las membranas teñidas son escaneadas, éstas imágenes digitalizadas en formato tif son analizadas con el “*software*” *ImageJ*, utilizando la herramienta “*Analyze gel*” para determinar la densitometría en unidades arbitrarias, obteniendo la densidad o intensidad de la banda en relación a la intensidad de proteína total y la muestra de referencia, la cuál es la cepa control sin tratar o el tiempo 0 según se indica en cada experimento, teniendo un valor de 1, la ausencia de banda se indica con valor 0.

Tabla 4: anticuerpos usados en inmunodetección.

Nombre	Descripción	Dilución	Origen
Anti Fosfo-eIF2 α (PeIF2 α)	Anticuerpo policlonal de conejo que reconoce la serina 51 fosforilada de la subunidad α del factor 2 eucariótico de iniciación de la traducción (eIF2).	1:2000 TBS-T	Cell Signalling Technology
Anti IgG de conejo	Anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano	1:10000 TBS-T	BioRad

4. Aislamiento de tRNA y análisis por “Northern Blot”.

A. Aislamiento de tRNA.

Los RNA de bajo peso molecular, como el caso de los tRNA, se extrajeron recogiendo 40 ml del cultivo celular en YPD líquido. Para mantener constante el pH del medio se añadió tampón succinato. Los precipitados fueron resuspendidos en 1 ml de solución ACE (0,3 M Acetato sódico, 100 mM Na-EDTA (Na-Ácido etilendiaminotetraacético) pH 4,5) y transferidos a un tubo especial resistente al homogenizador celular tipo “*BeadBeater*”. En dicho tubo, previamente añadimos un volumen aproximado de 1 ml de bolas de vidrio lavadas con ácido. Las muestras fueron homogeneizadas a máxima velocidad en tres ciclos de 2 minutos de agitación y 10 de reposo.

Las células lisadas (aproximadamente 500-700 μ l) fueron transferidas a un nuevo tubo para su extracción dos veces con fenol ácido. Recuperamos el sobrenadante y lo diluimos en 1 volumen de etanol al 70%. Utilizamos el “*Kit RNAeasy*” (Quiagen®). Para RNA de bajo peso molecular, se cargo el volumen recuperado de células lisadas en la columna del “*kit*”, centrifugamos y recogimos el líquido filtrado (“*Flow Through*”), posteriormente se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto, dejamos reposar en hielo de 1 a 2 horas. Luego se concentro durante 30 minutos en centrifuga de 4°C (centrifuga con termostato). Se resuspendió el precipitado en 500 μ l de ACE y añadimos etanol absoluto dejando precipitar toda la noche a -20°C. Resuspendimos el tRNA en 20 μ l de ACE10 (10 mM acetato sódico, 1 mM Na-EDTA, pH 4.5). El tRNA fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro para muestras de 1 μ l (*NanoDrop*TM 1000).

B. Electroforesis y transferencia de membrana del tRNA.

Los tRNA se separaron mediante electroforesis en gel continuo de poliacrilamida (14% acrilamida/bisacrilamida 29:1, urea 8 M, AcNa 0,1 M, TBE 0,25X, pH 4.5, 60 μ l 10% APS, 6 μ l TEMED) utilizando el tampón de electroforesis acetato sódico 0,1 M pH 5. La electroforesis se llevó a cabo en cámara a 4°C.

Mediante la medida de concentración de las muestras fue determinado el volumen de muestra a cargar en cada pocillo (normalmente el correspondiente a 10-15 ng), se prepararon las muestras, se incubaron 10 minutos a 65°C y luego se dejaron en hielo 5 minutos y se añadió un volumen igual de tampón de carga (0,1 M acetato sódico pH 5, 8 M urea, 0,05% azul de bromofenol (BFB), 0,05% XC (“Xylene Cyanole”)). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 90 V.

Los tRNA se transfirieron a una membrana de nylon *N-Hybond N⁺* (GE Healthcare) utilizando como disolución de transferencia TBE 1X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8), en semiseco (“*Trans-Blot semidry*” BioRad®). Posteriormente, el tRNA se entrecruzo covalentemente con la membrana mediante luz ultravioleta utilizando el transiluminador Stratalink® 1800 de Stratagene®, que emite 0,12 Julios a una longitud de onda de 254 nm. La membrana se puede almacenar a -20°C.

C. Marcaje de la sonda y detección de tRNA.

Marcamos la sonda con oligonucleótidos marcados en extremo 3' con dioxigenina y enzima TdT (deoxinucleotidil transferasa terminal) (Roche™), siguiendo las indicaciones del fabricante. Introdujimos en un tubo 1 μ l de oligo (100 pmoles) y 9 μ l de agua “*milliQ*” estéril. En el control 5 μ l de oligo control (vial Kit) y completamos hasta 10 μ l con agua “*milliQ*” estéril. Añadimos a cada tubo los reactivos del kit en los volúmenes indicados (tampón de reacción 5X: Solución CoCl₂, di-

deoxinucleótidos unidos a dioxigenina (DIG-ddUTP) y enzima transferasa terminal). Se centrifugó y mezcló posteriormente incubando a 37°C durante 15 minutos. Se paró la reacción en hielo añadiendo 2 µl EDTA 0,2M pH 8.

Para la hibridación se utilizó "*DIG High Prime DNA Labelling and Detection Started Kit II*" (Roche®). La membrana se prehibridó en 10ml de solución de hibridación ("*DIG Easy Hyb*") a 47°C durante 30 minutos. La hibridación se realizó durante toda la noche a 47°C con la misma solución a la que añadimos 4 µl de la sonda marcada, previamente desnaturalizada (95°C durante 10 minutos). Posteriormente a la hibridación, se realizaron tres lavados con 10 ml de solución de lavado 2X SSC (NaCl 0,9 M, citrato sódico 0,09 M) 0,1%(v/v) SDS). Un primer lavado rápido a temperatura ambiente y luego dos a temperatura de hibridación durante 15 minutos. La membrana se equilibro durante 5 minutos en tampón de ácido maleico (0,1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl, pH 7,5 ajustado con NaOH). Posteriormente se incubo 30 minutos en la solución de bloqueo en tampón maleico a 25°C. La membrana se incubo con solución del anticuerpo secundario (1:10000 anti DIG-AP en tampón maleico) durante 30 minutos. Tras la incubación se lavo con solución de lavado (0,1 M ácido maleico, 0,15 M NaCl, pH 7,5 ajustado con NaOH, 0,3% Tween20) 2 veces durante 15 minutos. Posteriormente la membrana se equilibro con tampón de detección (0,1M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5) durante 5 minutos.

La detección se realizo exponiendo la membrana a 0,1 ml de solución CSPD del kit durante 5 minutos. Tras su secado se coloco en un *Hypercasstette* (GE Healthcare) y se sometieron a análisis autorradiográfico con una película fotográfica (*Fuji Medical X-Ray Film 100NIF Super RX*).

5. Transformación de bacterias y levaduras.

A. Preparación de células competentes de bacteria.

Las células bacterianas empleadas en esta tesis pertenecen a la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (*F'* Φ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR* *recA1* *relA1* *endA1* *hsdR17*(*rK**mK*⁺) *phoA* *supE44* λ ⁻¹ *thi-1*).

Para la preparación de células competentes utilizamos el método descrito en (Taylor *et al.* 1993). Para un cultivo crecido en 200 ml de medio SOB (2% Bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MgSO₄) en agitación hasta fase exponencial (DO₆₅₀=0,4-0,8). Enfriamos el cultivo unos minutos en hielo, se vertió en tubos "Sorvall" (Thermo Scientific®) estériles concentrando las células en centrifuga "Beckman" refrigerada (4 °C) a 5000 rpm durante 5 minutos. Resuspendimos las células, manteniendo la cadena de temperatura, en 10 ml de TB frío (500 ml; 2,42g PIPES, 8 ml CaCl₂ 1 M, 28 ml de KCl 3 M, 20 ml MnCl₂ 1 M y 344 ml agua "milliQ" estéril) en cada tubo. Dejamos reposar 10 minutos en hielo y volvimos a centrifugar 5 minutos a 5000 rpm (4°C). Las células fueron resuspendidas en 4 ml TB frío. Se une todo en un tubo, se añadió 0,750 ml de DMSO, agitando al mismo tiempo. Dejamos en hielo 10 minutos y se separó en alícuotas de 100 μ l congelamos rápidamente y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

B. Purificación de plásmidos.

El plásmido p180 fue purificado de una cepa de *Escherichia coli* mediante "Quiagen® Plasmid Midi Kit" siguiendo protocolo del fabricante. La cepa, propia del laboratorio, fue crecida en medio LB con antibiótico.

Para transformar 2 cepas defectivas en control de daño al DNA con la cepa inducible *FRS2* bajo el plásmido GAL1

(Codifica subunidad α de la fenilalanil-tRNA sintetasa) se purificó dicho plásmido. El primer paso fue aislar el DNA de dicho mutante, utilizamos el protocolo de extracción de DNA para miniprep de 40 ml descrito en (Amberg *et al.* 2005). El DNA purificado se concentró y se usó para transformar células de *E. coli*, como se describe a continuación. Posteriormente se purificó con “*Quiagen® Plasmid Midi Kit*” siguiendo protocolo del fabricante.

Una vez purificado el plásmido, cuantificamos la concentración y pureza con el espectrofotómetro Nanodrop y fue separado en alícuotas de 50 μ l para almacenaje a -20°C hasta su utilización.

C. Transformación en bacteria.

La transformación de bacterias se usó un protocolo estándar por choque térmico como se describe en (Hanahan 1983; Amberg *et al.* 2005). Se mezclaron el DNA de interés con 100 μ l de bacterias en glicerol al 15%. Después de incubar 20 minutos en hielo, a la mezcla se le sometió a un choque térmico a 42°C durante 4 minutos, dejando reposar 10 minutos en hielo, se le añade 1 ml de LB y se deja recuperar una hora a 37°C . Después se sembraron las células en placas selectivas de LB-agar con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y dejando crecer un día a 37°C .

D. Transformación en levadura.

Transformación de distintas cepas (tabla 3) de levaduras con el plásmido p180 y la cepa BY4741 y los mutantes *gcn2* Δ , *mec1* Δ y *mec1* Δ *tel1* Δ con el plásmido purificado pGal1-*FRS2*, utilizando “*S cerevisiae Direct Transformation Kit*” (Wako™) siguiendo el protocolo del fabricante, el cuál tiene una eficiencia de transformación de 5×10^3 transformantes por μg de plásmido. Se sembraron en placas de SD-agar con sus respectivas auxotrofias y como agente selectivo ausencia de uracilo.

6. Ensayos enzimáticos.

A. Determinación del contenido celular de ATP.

Para la determinación del contenido de ATP, las células de levadura se homogeneizaron mezclando 250 μ l de cultivo con 50 μ l de ácido perclórico (11,6 M) reposar 5 minutos en hielo, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se recogió 200 μ l de muestra que se neutralizó con 1 volumen de KOH/KHCO₃ 0,4 M y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, y la cantidad de ATP se determinó en el sobrenadante como se describe en (Wilson *et al.* 1976) utilizando un luminómetro para microplaca de 96 pocillos “*Glomax*” (Promega).

B. Ensayo de actividad β -Galactosidasa.

Para valorar la expresión del factor de transcripción Gcn4p, en respuesta a tratamiento con MMS, se utilizó la técnica del gen reportero β -galactosidasa (Miller 1972; Serrano *et al.* 1973; Serebriiskii and Golemis 2000). En este caso el método de detección usado ha sido el del orto-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG, Merck). Las cepas transformadas con plásmido p180, reportero de actividad GCN4-lacZ, se crecieron en medio mínimo suplementado con las auxotrofias correspondiente en cada caso, hasta la mitad de la fase exponencial y tratados dos horas con 0,02% de MMS llevando en paralelo un control sin tratamiento del mismo cultivo.

Tomamos 2 ml de cultivo y lo centrifugamos durante 1 minuto. Resuspendimos las células en 100 μ l de solución GTED20 (Glicerol 20%, Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM y Ditiotretitol (DTT) 1 mM). Se permeabilizaron las células añadiendo 6 μ l de TET (Tolueno, Etanol y Tritón X-100 al 10% en proporciones 1:4:1, respectivamente) y agitando con “*vortex*” durante 3 minutos. La reacción se llevó a cabo con 10 μ l de estas células a las que se añade 190 μ l de “*buffer-Z*”

(Fosfato sódico 0,1 M pH 7, KCl 10 mM, SO₄Mg 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM) y 40 μl de ONPG 13,3 mM. Cuantificamos los ensayos mediante unidad internacional de actividad enzimática que se obtiene a partir de la actividad específica arbitraria, que se definen del siguiente modo:

$$(1000 \times A_{420} \times V_r) / (t \times p \times V_c \times A_{660})$$

Donde A_{420} es la absorbancia a 420 nm (el coeficiente de extinción del ONPG a 420 nm es 4,5 unidades de absorbancia por mM y por cm de paso de luz), V_r el volumen final de reacción, t el tiempo de reacción en minutos, p el paso de luz en las condiciones de medida, V_c el volumen equivalente de cultivo utilizado en ml y A_{660} la turbidez del cultivo. En nuestro caso que analizamos las muestras en lector para microplaca "*multiSkan FC*" (Thermo scientific®) V_r toma un valor de 0,34 y p de 0,5, aplicando estas correcciones quedando la formula:

$$(680 \times A_{420}) / (t \times V_c \times A_{660})$$

En unidades de nmol por minuto y por mg de proteína total.

**III. NUEVO PAPEL DE LA
PROTEÍNA QUINASA
Gcn2p DE LEVADURA EN
LA TOLERANCIA A
ESTRÉS ÁCIDO
INTRACELULAR.**

RESULTADOS

1. Resultados previos.

Previamente se identificaron dos genes importantes para la tolerancia a la acidificación celular por ácido acético, *LEU2* y *GCN2*. *LEU2* anula el requerimiento de leucina en cepas auxotrofas y disminuye la sensibilidad a ácido acético. El análisis de sensibilidad a ácido de los componentes de la ruta GCN, indica que la quinasa Gcn2p se requiere para la tolerancia a ácido en cepas auxotrofas para leucina, pero sin embargo no se requiere Gcn4p (Hueso *et al.* 2012). Además la sobreexpresión de *GLC7'*, que codifica la proteína truncada de la fosfatasa 1 con fenotipo dominante negativo, permite un incremento de la fosforilación de eIF2 α y un aumento de crecimiento en presencia de estrés ácido intracelular (Hueso *et al.* 2012). Se observa que el ácido acético no produce un ayuno de aminoácidos, indicando que el agotamiento de aminoácidos no es la causa de la activación de Gcn2p durante el estrés ácido, además la activación de Gcn2p se requiere para el transporte de aminoácidos (Hueso *et al.* 2012). La cepa auxotrofa para leucina y con una mutación en el sitio de fosforilación de Sui2p/eIF2 α (S51A) (Dever *et al.* 1992) es muy sensible al ácido acético siendo aliviada por suplementación del medio con un exceso de leucina (Hueso *et al.* 2012).

2. *LEU2* restaura la sensibilidad del mutante nulo *gcn2 Δ* a ácido acético.

Dado los resultados previos quisimos comprobar el fenotipo de sensibilidad a ácido acético en el cuál esta implicado Gcn2p mediante crecimiento en medio sólido. El mutante nulo *gcn2 Δ* es más sensible a ácido acético que la cepa control y este fenotipo se revierte por la expresión de *LEU2*. Efectivamente en la figura 09 observamos que *gcn2 Δ* es

más sensible a ácido acético que la cepa control y este fenotipo es revertido por transformación con el gen *LEU2* para corregir la auxotrofia de leucina.

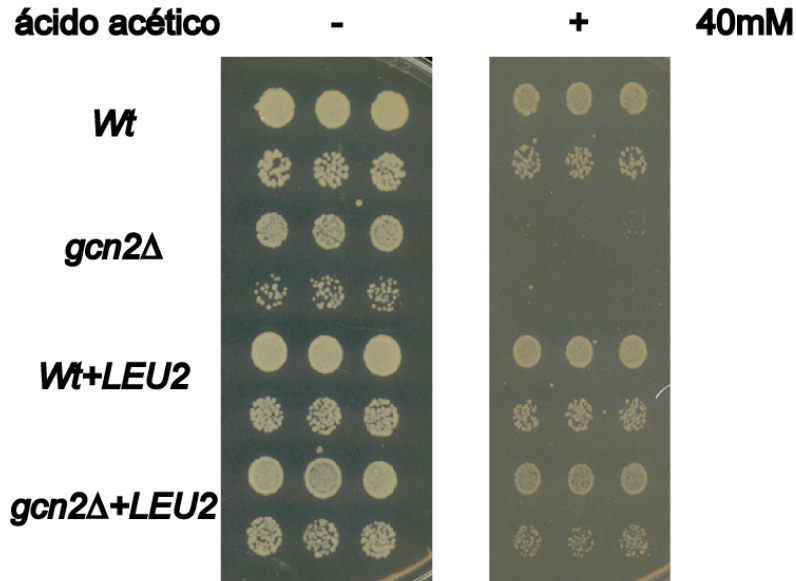
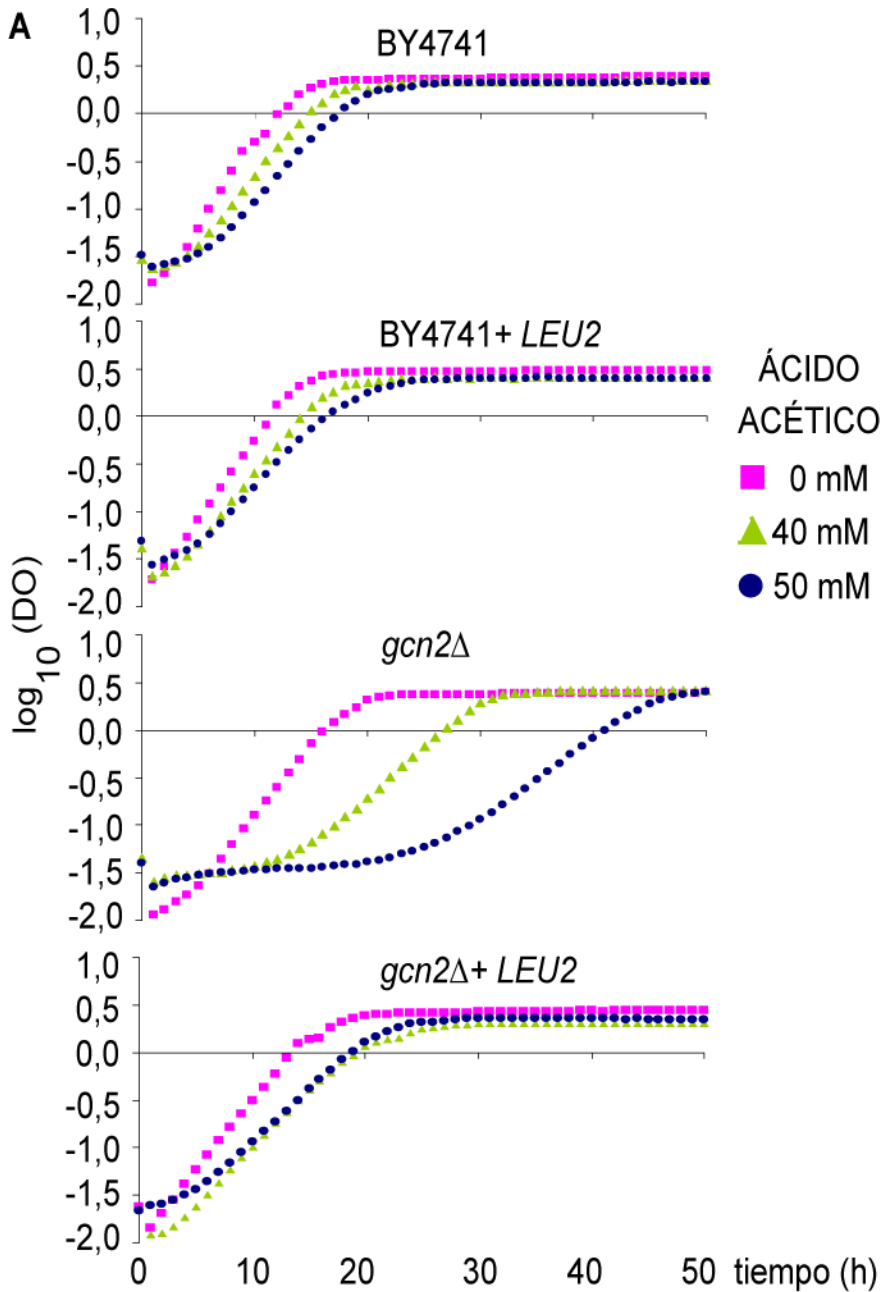


Figura 09: Tolerancia al ácido conferida por la sobreexpresión de *LEU2* en medio sólido.

Cepas BY4741 (*Wt*) y *gcn2Δ* sin y transformadas con el plásmido pUN100 que contiene el gen *LEU2*. Cultivos de una noche en medio SD (suplementado con adenina, metionina, histidina y leucina) se diluyeron 1/20 y 1/100 y detectados en placas YPD como control y en placas que contenían 40 mM de ácido acético (pH 4,0). El crecimiento se registró después de 2 días. Se muestra experimento representativo de tres independientes con resultados similares.

Para caracterizar con detalle el fenotipo de sensibilidad y rescate por *LEU2* analizamos el comportamiento de estas cepas en condiciones control y tratadas con 40 y 50 mM de ácido acético monitorizando el crecimiento mediante la plataforma Bioscreen C[®] (Thermo LabSystems[®]). Observamos que la fase de adaptación (“lag”) se incrementa en el mutante *gcn2Δ* con respecto de la cepa control (BY4741) en condiciones de tratamiento con ácido acético, en ambas cepas transformada con *LEU2* muestran una fase “lag” más corta con

respecto a las cepas sin transformar, llegando la cepa mutante a valores similares a la cepa control (Figura 10 A-B).



B. parámetros de crecimiento

cepas	mM ácido acético	fase "lag" (h)	tasa crecimiento (h^{-1})	rendimiento (DO)
BY4741	0	1	0.163	2.305
	40	5	0.146	2.232
	50	6	0.125	2.136
BY4741 + LEU2	0	1	0.165	2.948
	40	3	0.135	2.519
	50	2	0.110	2.487
<i>gcn2</i> Δ	0	1	0.135	2.537
	40	13	0.098	2.579
	50	24	0.078	2.503
<i>gcn2</i> Δ + LEU2	0	2	0.096	2.962
	40	4	0.115	2.008
	50	6	0.103	2.189

Figura 10: Tolerancia al ácido conferida por la sobreexpresión de *LEU2* en medio líquido.

A. Experimento de crecimiento en medio líquido monitorizado con Bioscreen C[®]. Representación semilogarítmica del crecimiento en medio YPD como control sin ácido (cuadrado fucsia), y tratado con 40 mM (triángulo verde) y 50 mM (circulo azul) de ácido acético (pH 4). Cultivos de BY4741 (Wt; *leu2* Δ) y *gcn2* Δ transformadas con el plásmido pUN100 que contiene el gen *LEU2* (indicado como + *LEU2*). Se muestran datos de un experimento representativo de 2 independientes con 3 replicas.

B. Tabla con parámetros de crecimiento obtenidos: fase de latencia o "lag" (h), tasa de crecimiento (h^{-1}) y rendimiento (DO) calculados como se indica en materiales y métodos del experimento representativo representado en A.

En la figura 10 se observa la sensibilidad del mutante *gcn2* Δ a acético tanto por incremento de fase de latencia como una menor pendiente en la recta correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. Así calculando la tasa de crecimiento se observa que disminuye con el tratamiento con acético en todas las cepas excepto en el mutante expresando *LEU2*, aunque este presenta un menor valor en condición sin acético. En cuanto al rendimiento, en la cepa control aumenta al expresarse *LEU2* tanto sin como con tratamiento con acético, mientras que el mutante *gcn2* Δ que presenta un mayor

rendimiento que la cepa control no se ve aumentado con la expresión de *LEU2*. En conjunto nos indica que la sensibilidad a ácido acético que presenta *gcn2Δ* se ve revertida por la expresión del gen *LEU2*, teniendo efecto en la fase de adaptación y exponencial de crecimiento.

3. La acidificación no implica estrés energético.

En la acidificación intracelular por ácidos débiles, los protones se secretan al exterior mediante la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática codificada por el gen esencial *PMA1* (Serrano 1978; Serrano 1989), con el consiguiente consumo de ATP. El retraso en el crecimiento que se observa en respuesta a la acidificación intracelular puede deberse a un efecto por estrés energético y no por el efecto directo de la acidificación. En tal caso, disminuyen los niveles de ATP en la célula en estas condiciones. Para analizar si la acidificación intracelular por ácido acético afecta al contenido de ATP de la célula medimos el contenido en ATP en células en condiciones sin estrés y con 50 mM de ácido acético a distintos tiempos. Después de la incubación de la cepa silvestre hasta 2 horas con 50 mM de ácido acético no se ha observado diferencias en los niveles de ATP en comparación a la condición control (Figura 11A), pero sí se observa una reducción del crecimiento del 50% a partir de una hora (Figura 11B).

Por lo tanto, estos resultados indican que el estrés ácido no provoca un estrés energético en la célula y el defecto en el crecimiento se debe a un efecto distinto a la caída de los niveles de ATP celulares.

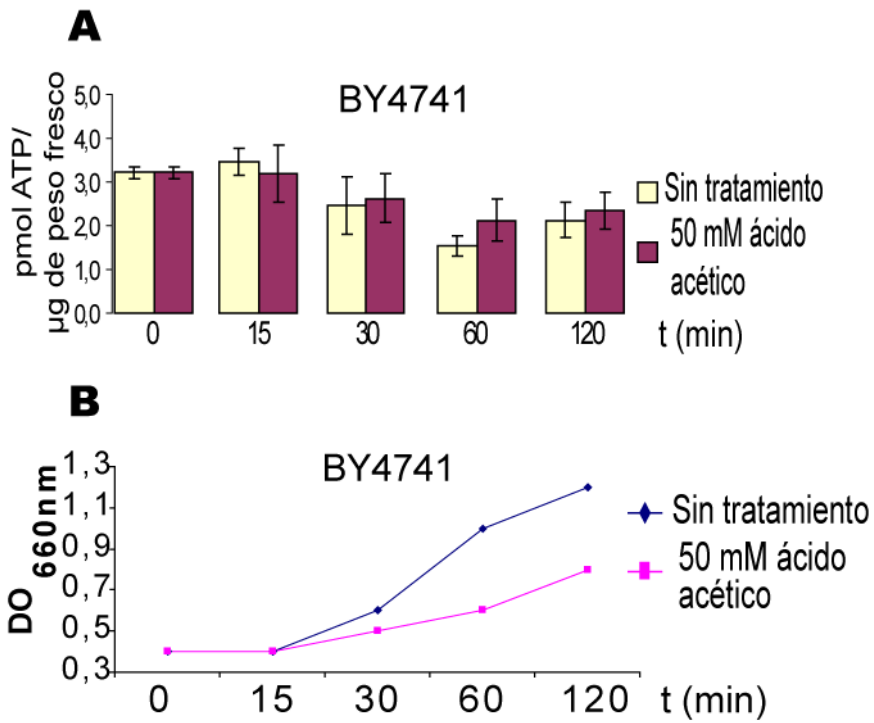


Figura 11: Medición consumo ATP en condiciones de estrés ácido.

A) Medición de niveles de ATP en pmol/μg de peso fresco con desviación estándar de la media de tres experimentos independientes con tres replicas cada uno de muestras a distintos tiempos de crecimiento de la cepa silvestre BY4741 en condiciones control y con 50 mM de ácido acético. B) Representación del crecimiento de los cultivos anteriores mediante densidad óptica medida a $\lambda=660$ nm frente a tiempo.

4. Caracterización de mutantes de la ruta GCN en respuesta a ácido acético.

Como el mutante *gcn2Δ* presenta sensibilidad a acético quisimos saber si los adaptadores de tRNA Gcn1p y Gcn20p, así como Gcn3p, que codifica para la subunidad α de eIF2B, presentan esta sensibilidad a ácido acético, lo que indicaría una posible implicación de tRNA descargados. Para esta caracterización monitorizamos el crecimiento de los mutantes nulos en comparación a la cepa silvestre con diferentes dosis de ácido acético durante 48 horas. Como se muestra en la figura 12, observamos un defecto de crecimiento dependiente de la dosis de acético en todas las cepas. La inhibición del crecimiento más clara se da a 100 mM de ácido acético, En esta dosis la cepa silvestre inicia el crecimiento exponencial antes que el resto de mutantes, y los mutantes *gcn1Δ* y *gcn2Δ* no inician el crecimiento antes de las cuarenta horas, *gcn3Δ* y *gcn20Δ* comienzan a crecer un poco antes de las cuarenta horas (Figura 12). Este dato indica que estas proteínas participan en la respuesta a acidificación intracelular.

A la dosis de 50 mM no se observan apenas diferencias en el crecimiento entre los mutantes y la cepa silvestre, y curiosamente a 25 mM los mutantes *gcn1Δ*, *gcn2Δ* y *gcn20Δ* crecieron ligeramente mejor que la cepa silvestre y que *gcn3Δ* (Figura 12). Es posible que en esta dosis más baja la acidificación sea menor y no se requieran estas proteínas para su respuesta. En conjunto estos datos indican que la sensibilidad a ácido acético fue dependiente de la dosis, y que Gcn1p, Gcn2p y Gcn20p se requirieron para la respuesta a altas dosis de ácido acético.

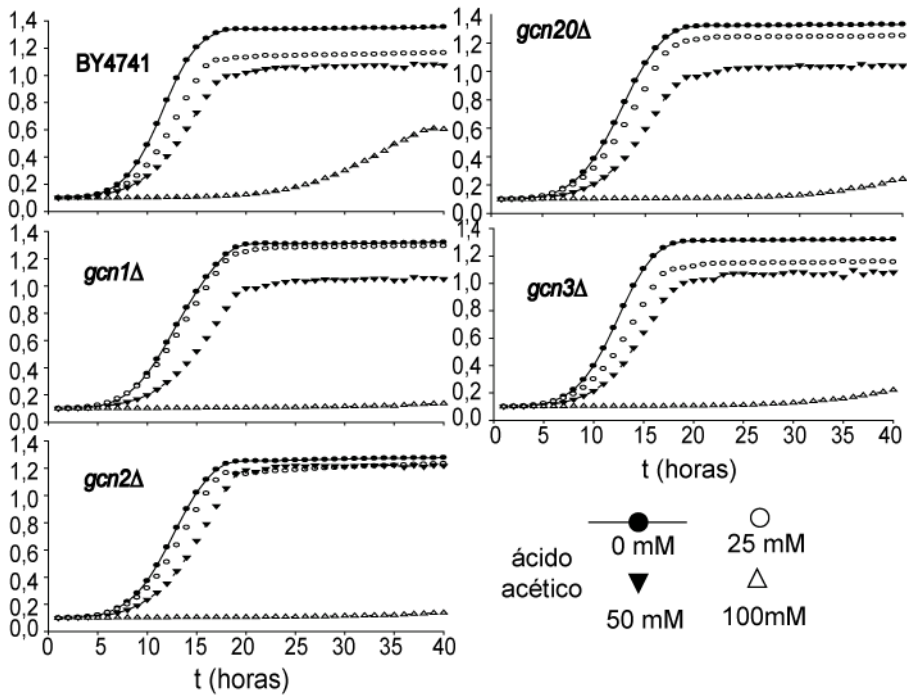


Figura 12: Sensibilidad a estrés ácido de los mutantes de la ruta GCN. Crecimiento en medio líquido de la cepa control (BY4741) y los mutantes de la ruta GCN: *gcn2Δ*, *gcn1Δ*, *gcn20Δ* y *gcn3Δ* en YPD sin acético (círculo negro) y en YPD suplementado con ácido acético a 25 mM (círculo blanco), 50mM (triángulo invertido negro) y 100 mM (triángulo). D.O. es la absorbancia medida mediante la plataforma Bioscreen C® frente a tiempo. Se muestra un experimento representativo de dos independientes con tres replicas con resultados similares.

5. Gcn2p es activado por la acidificación intracelular sin ayuno de aminoácidos.

La acidificación intracelular inhibe la absorción de aminoácidos y Gcn2p es importante para la tolerancia al estrés por ácido y para la activación de varios transportadores (datos previos), por lo tanto era lógico probar si la acidificación intracelular activa a la quinasa Gcn2p. Para ello, detectamos la activación de Gcn2p, analizando el estado de fosforilación de su principal sustrato, eIF2 α , mediante inmunodetección con un anticuerpo específico para la forma fosforilada en la serina 51 (Goossens *et al.* 2001). El nivel de la fosforilación de eIF2 α aumenta después de 30-180 minutos de incubación con ácido acético (Figura 13A), lo que sugiere que Gcn2p ha sido activado por la acidificación intracelular. Este aumento de la fosforilación de eIF2 α depende de Gcn2p y de las proteínas adaptadoras Gcn1p y, en menor medida, Gcn20p, ya que en dichos mutantes nulos se pierde la fosforilación total o parcialmente (Figura 13B).

Estos datos sugieren que podría estar ocurriendo un ayuno de aminoácidos a consecuencia del estrés ácido, ayuno que activaría a Gcn2p. Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 1 de este capítulo, no se produce ayuno de aminoácidos y por lo tanto, puede no ser la causa de la activación de Gcn2p durante el estrés ácido (Hueso *et al.* 2012).

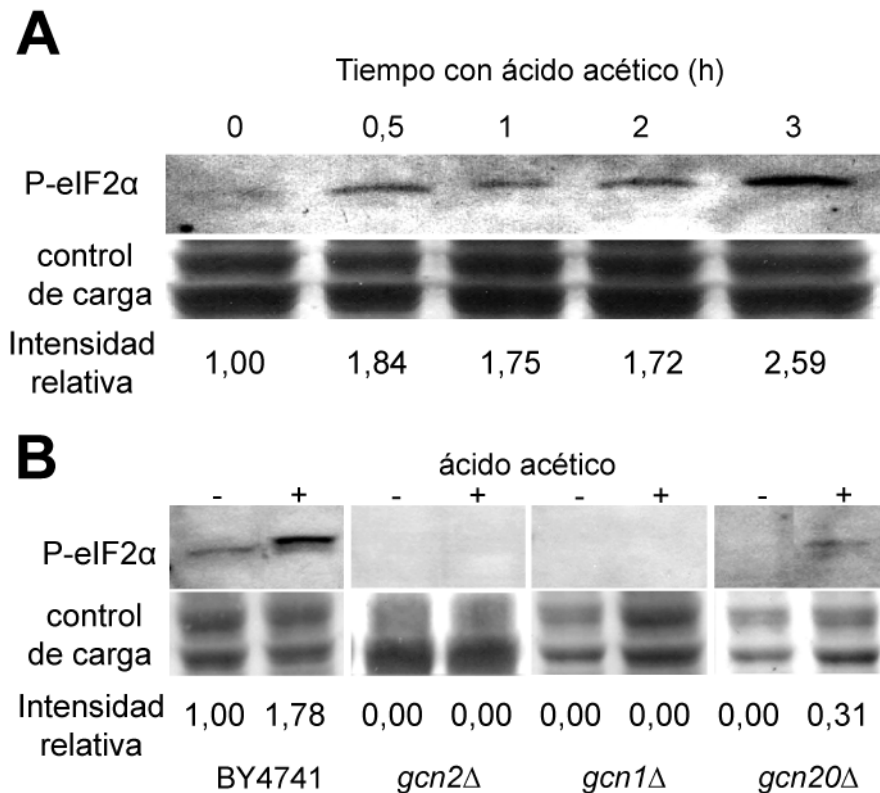


Figura 13: El estrés ácido intracelular activa Gcn2p.

(A) La activación de Gcn2p por acidificación intracelular se midió mediante la fosforilación de eIF2 α en diferentes momentos después de la adición de 60 mM de ácido acético (pH 4,0) a las células en crecimiento de la cepa BY4741 (panel superior). Un control de carga de proteínas formado por dos bandas representativas de la tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71* se muestra en el panel inferior. (B) Inducción por ácido acético de la fosforilación de eIF2 α depende de Gcn1p, Gcn2p y Gcn20p, se observa niveles de fosforilación en los distintos mutantes en comparación a la cepa control BY4741. La duración de la incubación con 60 mM de ácido acético fue de 3 h, un control de carga de proteínas se muestra como en (A). (- = control sin ácido acético). Se muestra la intensidad relativa en unidades arbitrarias, de la banda P-eIF2 α con respecto a proteína total y como referencia muestra BY4741 sin acético (tiempo 0 en A y - en B) obtenidos con el "software ImageJ". En la figuras se muestra resultados de un experimento representativo de al menos tres independientes, siendo esencialmente similares.

6. La acidificación intracelular induce la acumulación de tRNA descargados y los mutantes haploinsuficientes de algunas aminoacil-tRNA sintetasas son hipersensibles a ácido acético.

En el apartado anterior se ha visto que la activación de Gcn2p en respuesta a ácido acético depende de las proteínas adaptadoras de tRNA Gcn1p y, en menor medida, de Gcn20p, pero esta respuesta ocurre sin ayuno de aminoácidos. En condiciones de ayuno de aminoácidos se produce una acumulación de tRNA descargados que junto a estas proteínas adaptadoras activan a Gcn2p. Estos datos sugieren que es importante probar si durante la acidificación intracelular se produce una acumulación de tRNA descargados. Si esto ocurre indicaría que de algún modo el estrés ácido interfiere en la carga de tRNA. Como una primera aproximación, nosotros específicamente detectamos mediante hibridación las formas cargadas y/o descargadas de tRNA^{leu} de la cepa silvestre (BY4741, mediante análisis Northern en condiciones control y tratadas con 60 mM de ácido acético a pH 4 durante 1 hora). El estrés ácido desencadena la descarga del tRNA^{leu} y disminuyen los niveles de tRNA^{leu} cargado (Figura 14). Como la leucina no se agota, esto puede ser explicado si las aminoacil-tRNA sintetasas son inhibidas no sólo por el agotamiento de aminoácidos (Hinnebusch 2005), sino también por la acidificación intracelular.

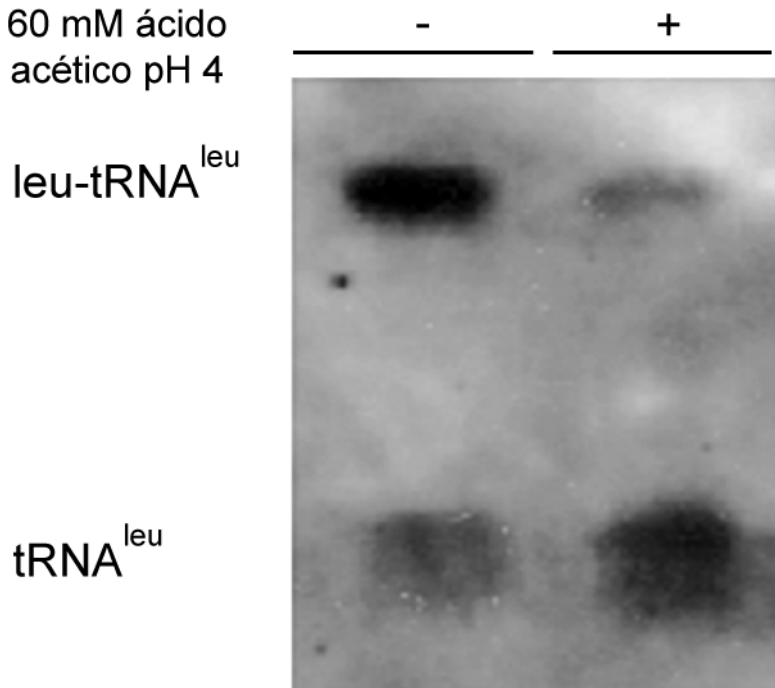


Figura 14: El ácido acético induce la acumulación de tRNA^{leu} descargados. La cepa silvestre BY4741 fue tratada con 60 mM de ácido acético (pH 4,0) durante 1 h y en paralelo sin tratamiento y las formas del tRNA cargada (leu-tRNA^{leu}) y no cargadas (tRNA^{leu}) fueron detectados por análisis de transferencia Northern con sondas de oligonucleótidos específicos.

Aunque los resultados previos sugieren que la inhibición del transporte de aminoácidos puede ser la principal causa de inhibición del crecimiento por ácido acético en las cepas auxotróficas, la inhibición de aminoacil-tRNA sintetasas también podría contribuir al efecto del ácido. Para probar esta posibilidad, se determinó la concentración de ácido acético que produce una inhibición del crecimiento del 50% (IC₅₀) en cepas diploides haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetasas (Hueso *et al.* 2012). La razón de usar este tipo de mutantes es que las mutaciones nulas de sintetasas citosólicas de levadura son letales, mientras que las mutaciones nulas de sintetasas mitocondriales de levadura son viables. Mediante el uso de cepas haploinsuficientes diploides, se podría comparar

todos los mutantes de las sintetetasas con una reducción del 50% de la dosis génica (Hueso *et al.* 2012).

Para ello se llevaron a cabo cultivos de todas las cepas haploinsuficientes en condiciones control así como con 25, 50, 75 y 100 mM de ácido acético, monitorizando el crecimiento durante 3-4 días con la plataforma Bioscreen[®]. Obteniendo la concentración de acético que inhibe un 50% el crecimiento como se describe en la sección de ensayos en medio líquido de materiales y métodos. Los resultados que se muestran en la tabla 5 y en la figura 15 indican que aproximadamente un tercio de los mutantes de las aminoacil-tRNA sintetetasas son más sensibles a ácido acético que la cepa silvestre, con reducciones en valores de la IC₅₀ del ácido acético de 5 al 20%.

El hecho de que al reducir un 50% la dosis génica de muchos aminoacil-tRNA sintetetasas aumenta la sensibilidad al ácido apoya la hipótesis de que la inhibición por ácido de estas enzimas importantes contribuye a la inhibición de crecimiento de la levadura.

Tabla 5: Valor de dosis inhibitoria del crecimiento al 50% por ácido acético (IC₅₀ en mM) en mutantes haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetetas de levadura con el error estándar (EE).

Nombre cepa	IC ₅₀ (mM) ± EE	nombre cepa	IC ₅₀ (mM) ± EE
WT	74,0 ± 0,1	TYS1	73,5 ± 0,1
DPS1	77,9 ± 0,1	YHR020W	73,0 ± 5,1
CDC60	75,7 ± 0,1	YERO87W	72,9 ± 0,1
MSM1	75,3 ± 0,1	GRS1	72,7 ± 1,6
MSD1	74,9 ± 0,1	SES1	71,8 ± 2,9
MSR1	74,7 ± 0,1	ISM1	71,3 ± 5,2
WRS1	74,5 ± 0,1	GLN4	70,8 ± 7,3
MSE1	74,4 ± 0,1	GUS1	70,2 ± 2,3
MST1	74,4 ± 0,1	VAS1	69,8 ± 2,9
NAM2	74,4 ± 0,1	HTS1	67,4 ± 0,3
MSK1	74,3 ± 0,1	FRS2	66,9 ± 3,1
THS1	74,3 ± 0,1	ALA1	66,2 ± 0,2
ILS1	73,9 ± 0,1	DED81	65,8 ± 2,1
MSY1	73,9 ± 0,1	MSF1	64,3 ± 3,5
YNL247W	73,9 ± 0,1	DIA4	64,1 ± 0,1
MES1	73,8 ± 0,1	FRS1	62,8 ± 0,1
KRS1	73,8 ± 0,1	YDR341C	62,8 ± 1,5
MSW1	73,5 ± 0,1	SLM5	58,0 ± 5,5

Estos datos se observan gráficamente en la figura 15 siguiente donde se representa el índice fenotípico, el cuál se calcula como el logaritmo en base 2 de la relación entre el valor de concentración de ácido acético que produce una inhibición del crecimiento del 50% de la cepa y de la cepa silvestre.

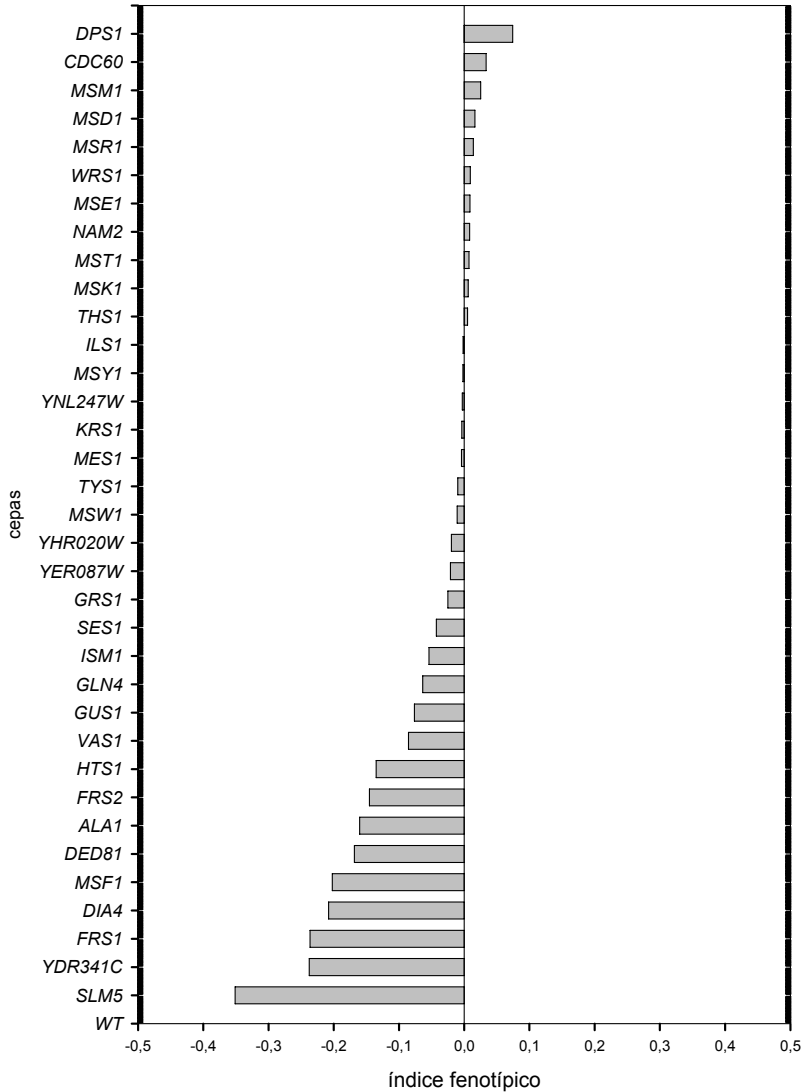


Figura 15: Representación gráfica del índice fenotípico en respuesta a ácido acético de mutantes haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetasas de levadura en comparación a la cepa silvestre.

DISCUSIÓN

En resultados previos del grupo se identificaron dos genes importantes para la tolerancia a estrés por acidificación intracelular causada por ácidos débiles permeables: *LEU2*, implicado en la biosíntesis de leucina, y *GLC7'*, que codifica una proteína fosfatasa 1 truncada que tiene un fenotipo dominante negativo, reduciendo la actividad del tipo silvestre Glc7p y aumentando el nivel de la fosforilación de eIF2 α . Se ha observado que la sobreexpresión de *GLC7'* mejoraba el crecimiento en condiciones de estrés ácido (Hueso *et al.* 2012). La expresión de *LEU2* revierte el requerimiento de leucina en cepas auxotrofas, indicando que el estrés ácido intracelular inhibe la absorción de leucina por la célula. Por lo tanto, la limitación del crecimiento por acidificación intracelular se debe en gran parte a limitación del transporte de leucina. La relación directa de *GLC7'* con *GCN2* nos llevo a encaminar la investigación para determinar el papel de Gcn2p en la tolerancia a estrés ácido intracelular. Previamente se había observado la sensibilidad de mutantes en diversos componentes de la ruta a ácido acético, indicando que están implicados en la respuesta a estrés ácido intracelular en cepas auxotrofas para leucina. Nosotros corroboramos la sensibilidad estos mutantes a estrés ácido intracelular (Figura 10) y la tolerancia conferida por *LEU2* (Figura 09 y 10).

Gcn2p es una proteína quinasa conservadas en todos los eucariotas que forma parte de una vía de respuesta a estrés activado por ayuno de aminoácidos, el ayuno de purina, la limitación de la glucosa, altos niveles de salinidad, daño en el DNA y, en el caso de las plantas, reacción a herida (Hinnebusch and Natarajan 2002) y el tratamiento con fitohormonas ácido salicílico, metil-Jasmonato u el precursor de etileno ACC (Lageix *et al.* 2008). El mecanismo de esta vía implica un único control de la traducción, donde Gcn2p es activado por los tRNA descargados y fosforila eIF2 α . Este causa la inhibición de la síntesis de proteínas en general, y la

traducción selectiva del mRNA de Gcn4p, factor de transcripción tipo bZIP (“*Basic leucine Zipper*”), en levadura. El mRNA de este factor contiene pequeños marcos de lectura abierta en 5’ de sus regiones codificantes que se traducen ineficazmente en condiciones normales (Hinnebusch 2005; Wek *et al.* 2006). eIF2 α y Gcn4p son los únicos efectores conocidos de la señalización por Gcn2p en la levadura (Natarajan *et al.* 2001; Hinnebusch 2005) por lo que ha sido una sorpresa al descubrir que Gcn2p se activa por estrés ácido intracelular y que es necesario para la tolerancia a este estrés, independientemente de Gcn4p (datos previos). Además, el estrés ácido intracelular no activa la traducción de Gcn4p, medido por la expresión de la fusión *GCN4-lacZ* (Mueller and Hinnebusch 1986; Hinnebusch 2005) (G. Hueso, Murguía JR y R. Serrano, trabajo no publicado). La fosforilación de eIF2 α se requiere para la tolerancia a ácido (Hueso *et al.* 2012), y para esta fosforilación se requiere Gcn2p, Gcn1p y en menor medida Gcn20p (Figura 13). Por lo tanto el papel de la ruta Gcn2p/eIF2 α en estrés ácido podría revelar una nueva diana de esta importante respuesta traduccional al estrés.

El significado fisiológico de la activación de Gcn2p por estrés ácido intracelular puede explicarse por la inhibición del transporte de aminoácidos a pH ácido intracelular y por la activación del transporte de aminoácidos por Gcn2p. El transporte de aminoácidos en la levadura opera por un mecanismo de simporte de H⁺ (Serrano 1991) y la acidificación intracelular reduce la fuerza motriz del gradiente electroquímico de protones, inhibiendo la absorción de aminoácidos. Además no se ha observado diferencias en los niveles de ATP en condiciones de acidificación intracelular (Figura 11A). La activación de Gcn2p podría contrarrestar parcialmente esta inhibición y en el caso de la cepa mutante *leu2 Δ* , esto podría mejorar la absorción de leucina y el crecimiento celular bajo estrés ácido. (Hueso *et al.* 2012)

La activación de Gcn2p por el estrés ácido intracelular correlaciona con la acumulación de tRNA^{leu} descargados (Figura 14) Un mecanismo obvio comenzaría con la inhibición

de la absorción de leucina seguido por el agotamiento celular de leucina, la inhibición de leucil-tRNA sintetasa y la unión de tRNA^{leu} descargado al dominio regulador similar a HisRS (histidil-tRNA sintetasa de levadura) de Gcn2p (Hinnebusch 2005). Sin embargo, la determinación del contenido de aminoácidos intracelulares indica que no hay ayuno de leucina y que la concentración de leucina, como de la mayoría de los aminoácidos, aumenta en condiciones de estrés ácido (datos previos) (Hueso *et al.* 2012). Una posible explicación sería que los tRNA descargados no se acumulan debido a la carencia de aminoácidos, sino como consecuencia de la inhibición de aminoacil-tRNA sintetetas a pH intracelular bajo. La actividad de estas enzimas tiene un pH óptimo en 7,5-8,0, con una caída dramática a valores de pH más ácido. Por ejemplo, a pH 6, la velocidad de reacción es sólo 8-9% de la óptima (Mitra and Mehler 1967; De Lorenzo and Ames 1970). La importancia de estas enzimas esenciales como dianas de estrés ácido intracelular es apoyada por nuestra observación de que la reducción del 50% de la dosis génica de muchas aminoacil-tRNA sintetetas aumenta la sensibilidad a ácido de las células (Tabla 5; Figura 15).

La inhibición de la aminoacil-tRNA sintetetas bajo condiciones de estrés tales como la acidificación intracelular puede explicar la activación de Gcn2p por tRNA descargados sin ayuno de aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de estrés por NaCl (Goossens *et al.* 2001; Zaborske *et al.* 2009), algunas aminoacil-tRNA sintetetas pueden ser inhibidas por altos niveles intracelulares de Na⁺, como se observo para varias enzimas intracelulares (Ludovico *et al.* 2002). Otra posibilidad es que las condiciones de estrés causen la acidificación intracelular, como se demuestra en el caso del choque térmico por calor (Weitzel *et al.* 1987), no investigado durante el estrés salino por NaCl. La inhibición de las aminoacil-tRNA sintetetas y la activación de Gcn2p por la acidificación intracelular y otros tipos de estrés pueden ser de relevancia general para las plantas y los animales, porque la vía Gcn2p/eIF2 α está conservada en los eucariotas (Hinnebusch and Natarajan 2002; Lageix *et al.* 2008). Así recientemente se ha descrito el papel

fundamental del control traduccional a través de la fosforilación de eIF2 α en la diferenciación de promastigote a amastigote en *Leishmania* spp.. Este proceso de diferenciación es inducido por la señalización del estrés debido a alta temperatura junto a una caída del pH (Cloutier *et al.* 2012).

Nosotros proponemos un modelo de la implicación de Gcn2p en la homeostasis del pH en levadura en el cual la acidificación intracelular inhibe las aminoacil-tRNA sintetasas y el transporte de aminoácidos. Esto produce un acumulo de tRNA descargados que activa a Gcn2p y fosforila eIF2 α , lo que provoca la traducción selectiva de una proteína desconocida (X) distinta de Gcn4p que activa el transporte de aminoácidos (Figura 16).

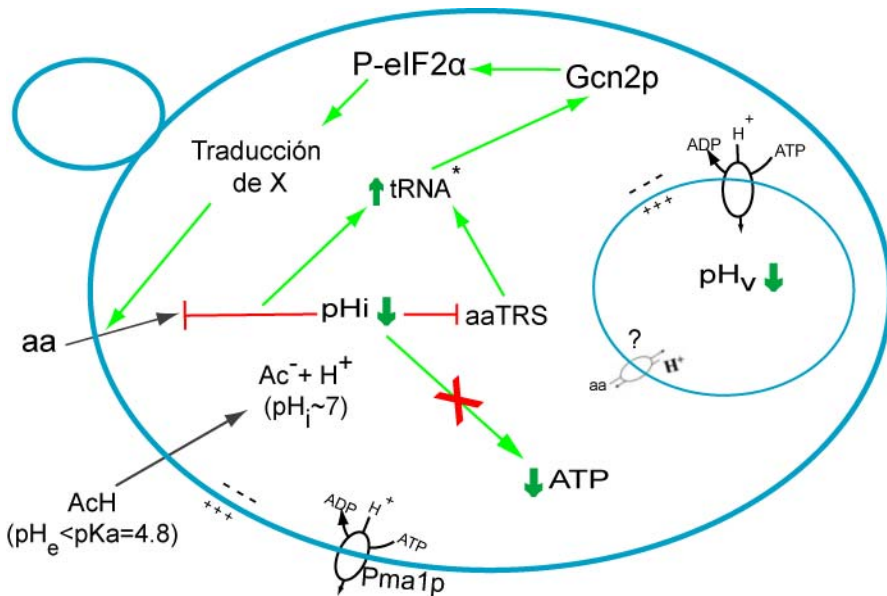


Figura 16: Modelo propuesto del papel de Gcn2p en la homeostasis de pH. Abreviaturas: AcH: ácido acético, Ac⁻: acetato, pHi: pH intracelular, pH_v: pH vacuolar, pH_e: pH extracelular, aaTRS: aminoacil-tRNA sintetasa, tRNA*: tRNA descargados, aa: aminoácidos.

**IV. NUEVO PAPEL DE LA
QUINASA Gcn2p DE
LEVADURA EN
RESPUESTA A ESTRÉS
GENOTÓXICO.**

RESULTADOS:

1. Activación de Gcn2p en respuesta a diferentes agentes genotóxicos.

La quinasa Gcn2p regula la traducción en respuesta a ayuno de aminoácidos y también regula la transición G1-S en respuesta al daño al DNA en levadura (Menacho-Marquez *et al.* 2007; Tvegard *et al.* 2007; Krohn *et al.* 2008). Quisimos evaluar la respuesta de Gcn2p a diversos agentes que producen lesiones en el DNA, para poder determinar si la respuesta de Gcn2p al daño al DNA es general o por el contrario es específica de un determinado tipo de lesión en el DNA. Para ello, analizamos el nivel de fosforilación de eIF2 α en la cepa silvestre BY4741 en respuesta a distintos tratamientos mediante inmunodetección con un anticuerpo que reconoce la serina 51 fosforilada de eIF2 α , la diana de fosforilación de Gcn2p.

Hicimos tratamientos a cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento durante 1 y 2 horas a las dosis indicadas para cada agente genotóxico. Observamos diferencias significativas en los niveles de fosforilación de eIF2 α en comparación con el control sin tratamiento, en respuesta a 5-Fluorouracilo, β -lapachona, Hidroxiurea, Metil metano sulfonato (MMS) y Phleomicina. El tratamiento con otros agentes como Camptotecina, Nocodazol y cis-Platino no incrementaron la fosforilación de eIF2 α de forma aparente (Figura 17).

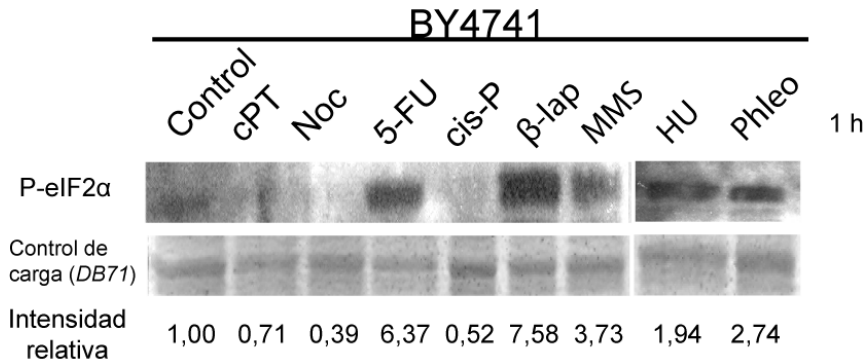


Figura 17: Fosforilación de eIF2 α en respuesta a distintos genotóxicos.

Inmunodetección de fosforilación de eIF2 α en cultivos de células silvestre BY4741, tratados durante una hora con: Camptotecina (cPT; 0,5 mM), Nocodazol (Noc; 10 μ g/ml), Fluorouracilo (5-FU; 40 μ M), Cis-platino (Cis-P; 0,5 mM), β -lapachona (β -lap; 20 μ g/ml) MMS (0,01%), Hidroxiurea (HU; 0,2 M), Phleomicina (Phleo; 2,5 μ g/ml). Como control de carga de proteínas se muestra una banda representativa de la membrana teñida con DB71 y en la parte inferior la intensidad relativa de la banda P-eIF2 α en relación a proteína total y como referencia el control sin tratar expresado en unidades arbitrarias, analizado con el "software ImageJ". En la figura se muestra resultado de un experimento representativo de dos independientes, siendo esencialmente similares.

El aumento de la fosforilación de eIF2 α en respuesta a lesionantes del DNA dependía estrictamente de la concentración de los mismos (Figura 18). En conjunto, estos resultados indican que el estrés genotóxico activa de forma robusta la fosforilación de eIF2 α , sustrato de Gcn2p. Dicha activación depende de la dosis y del tiempo de tratamiento con el agente lesionante, y muestra una cierta especificidad, ya que no todos los agentes lesionantes la inducen.

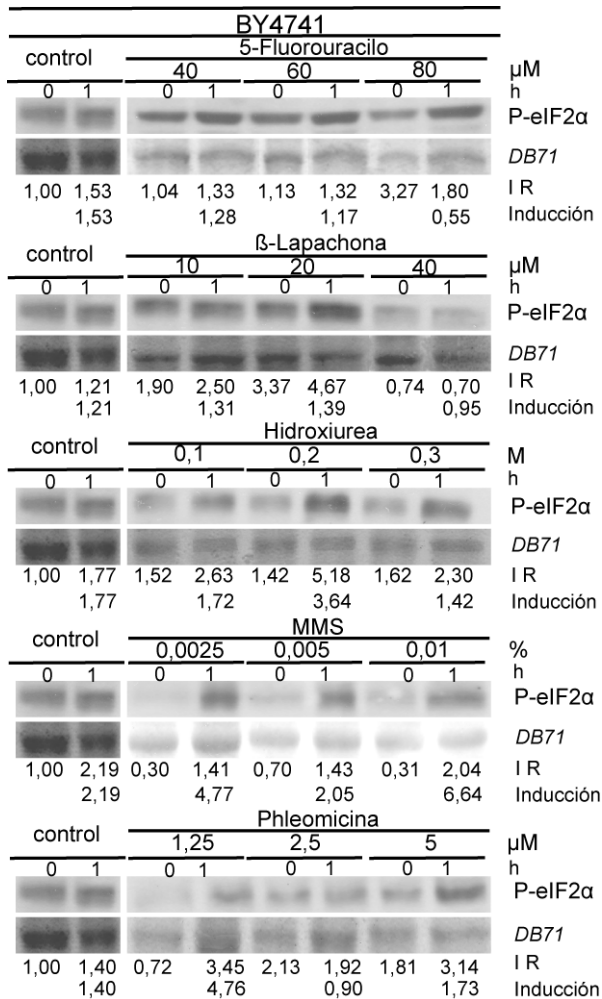


Figura 18: Genotóxicos del DNA a distintas dosis activan Gcn2p. Inmunodetección de fosforilación de eIF2α en cultivos celulares en fase exponencial de crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (0), tratados durante una hora (1) con distintas dosis de Phleomicina, Hidroxiurea (HU), Fluorouracilo (5-FU), MMS y β-lapachona o con mismo volumen de agua (Control). Se muestra un experimento de dos independiente con resultados similares. Control de carga de proteínas: Banda representativa de la tinción de membrana con *Direct blue 71*, en la parte inferior intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y como referencia el control sin tratar a tiempo 0 expresado en unidades arbitrarias (I R), analizado con el "software ImageJ", y el valor de inducción con respecto a tiempo 0.

2. Caracterización genética de los diferentes mutantes *gcn* en respuesta a MMS.

Para confirmar que el incremento en la fosforilación de eIF2 α se debe a la activación de la ruta GCN, llevamos a cabo una caracterización genética utilizando cepas mutantes nulas de diferentes componentes de la ruta GCN en el fondo genético BY4741. Utilizamos el agente genotóxico MMS porque había dado una respuesta más estable y robusta en comparación a los otros agentes utilizados. Además el fenotipo de activación de Gcn2p en respuesta a MMS está descrito previamente. (Menacho-Marquez *et al.* 2007; Krohn *et al.* 2008).

Realizamos el análisis del estado de fosforilación de eIF2 α y de la viabilidad celular en respuesta al tratamiento durante 2 horas con dosis crecientes de MMS, comparando los mutantes nulos de los componentes de la ruta con su fondo genético BY4741. En la cepa silvestre se observa un incremento del nivel de fosforilación de eIF2 α en función de la dosis de MMS. El tratamiento con MMS no induce la fosforilación de eIF2 α en *gcn2 Δ* (Figura 19A), lo que indica que es dependiente de Gcn2p. Por otro lado, analizando la supervivencia celular a MMS, el mutante nulo *gcn2 Δ* muestra más sensibilidad que la cepa silvestre sobre todo a las dosis más elevadas de MMS (Figura 19B). Estos resultados indican que la activación de Gcn2p se requiere para la supervivencia celular en presencia del agente MMS.

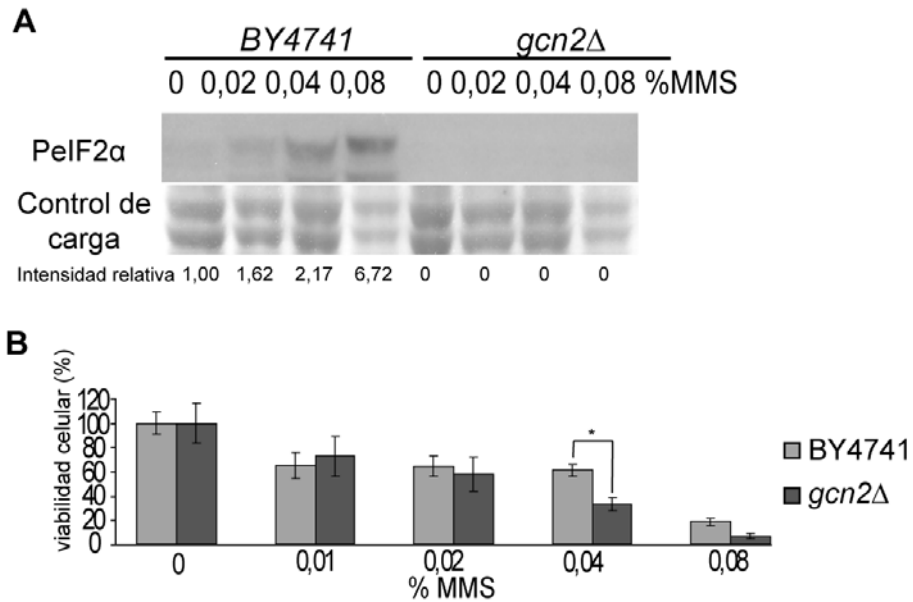


Figura 19: Efecto del MMS en el mutante *gcn2Δ*.

A. Inmunodetección de P-eIF2α en cultivos celulares de BY4741 y *gcn2Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga de proteínas: Dos bandas representativas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y el tiempo 0 de la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias. Estos valores se han obtenido con el "software *ImageJ*" como se indica en materiales y métodos. B. Ensayo clonogénico de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células BY4741 y *gcn2Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar (Barras de error= desviación estándar de la media, n=3, *P<0,05)

De forma similar a lo observado en el mutante *gcn2Δ*, no detectamos fosforilación de eIF2α en respuesta a MMS en el mutante *gcn1Δ* (Figura 20A). Por lo tanto, Gcn1p es necesario para la fosforilación de eIF2α en respuesta a MMS. Sorprendentemente el mutante *gcn1Δ*, muestra una mayor supervivencia en comparación a la cepa silvestre, en especial, en las dos dosis más bajas utilizadas de MMS (Figura 20B). Por lo tanto, Gcn1p, de alguna manera, contribuye en la toxicidad de MMS.

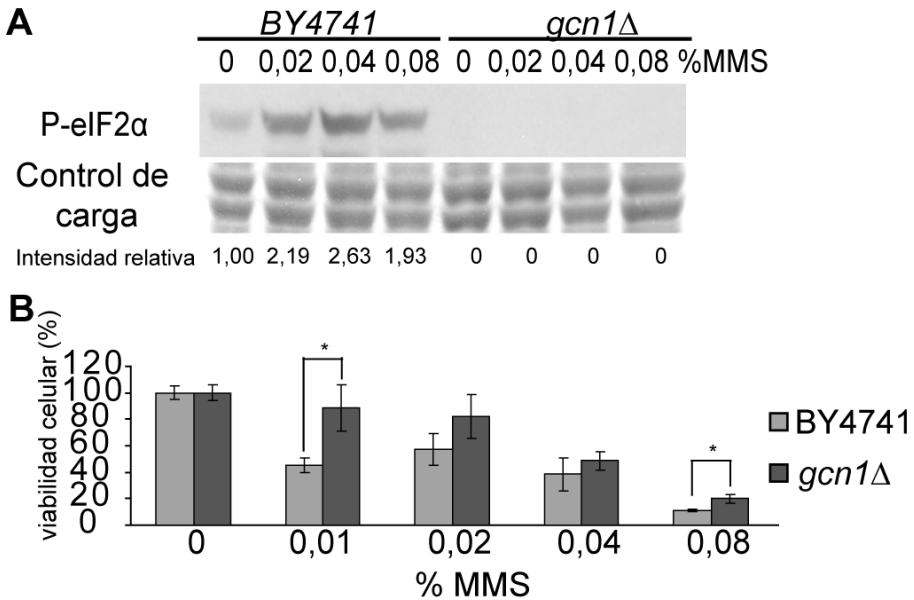


Figura 20: Efecto del MMS en el mutante *gcn1Δ*.

A. Inmunodetección de PeIF2α en cultivos celulares de BY4741 y *gcn1Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga de proteínas: Dos bandas representativas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y el tiempo 0 de la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias, si no hay señal se indica con 0. Estos valores se han obtenido con el “*software ImageJ*” como se indica en materiales y métodos. B. Ensayo clonogénico de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células BY4741 y *gcn1Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar (Barra error=desviación estándar de la media, n=3, *P<0,05).

Analizamos también el papel de Gcn20p en la respuesta a MMS, ya que las proteínas Gcn1p y Gcn20p se requieren para la activación de Gcn2p en células sometidas a ayuno de aminoácidos (Hinnebusch 2005). Estudiamos la fosforilación de eIF2α en respuesta a MMS en el mutante nulo *gcn20Δ*. Como se observa en la figura 21 el tratamiento con MMS induce la fosforilación de eIF2α, aunque es menor que la observada en la cepa silvestre (Figura 21A). Esto indica que la fosforilación de eIF2α en respuesta a MMS es parcialmente dependiente de Gcn20p. Por otro lado, el mutante nulo *gcn20Δ* presenta un

patrón de supervivencia celular frente a MMS similar al de la cepa silvestre (Figura 21B). Por lo tanto, Gcn20p no se requiere para la supervivencia celular en respuesta a MMS.

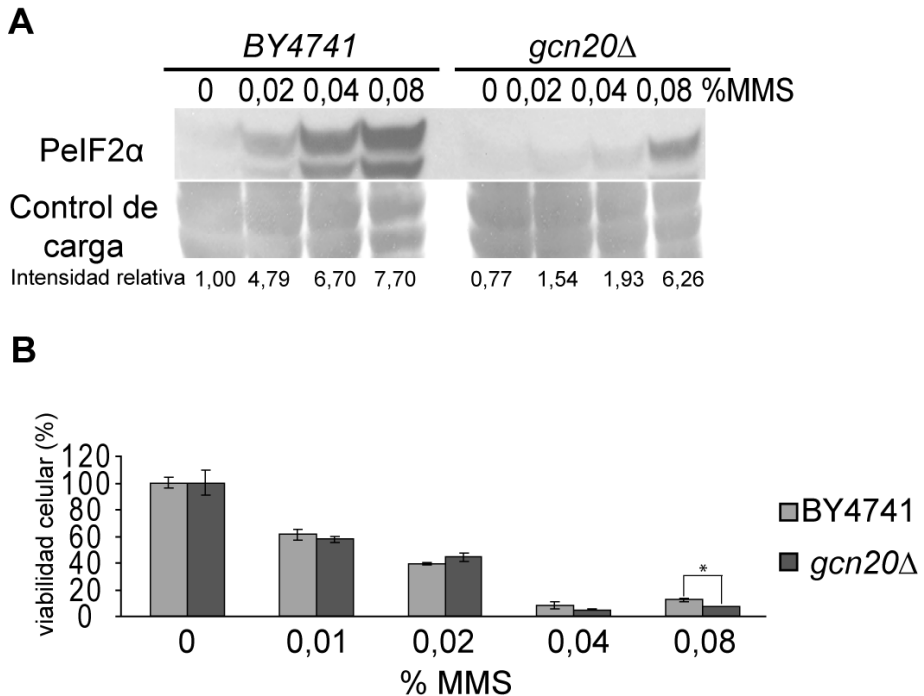


Figura 21: Efecto del MMS en el mutante *gcn20Δ*.

A. Inmunodetección de PelF2α en cultivos celulares de BY4741 y *gcn20Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga de proteínas: Dos bandas representativas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PelF2α en relación a proteína total y el tiempo 0 de la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias. Obtenido con el “*software ImageJ*” como se indica en materiales y métodos. B. Ensayo clonogénico de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células BY4741 y *gcn20Δ* tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar (Barra error= desviación estándar de la media, n=3, *P<0,05).

La fosforilación de eIF2α en respuesta a MMS, se modifica levemente en el mutante *gcn3Δ* con respecto a la cepa control (Figura 22A). Este hecho indica que Gcn3p no se requiere para la activación de Gcn2p por MMS. Además en el

ensayo de viabilidad, *gcn3Δ* muestra un patrón de supervivencia celular similar al mostrado por la cepa silvestre en respuesta a MMS. Solo se observan ligeras diferencias a las dosis más altas donde *gcn3Δ* es ligeramente más tolerante (Figura 22B). Esto indica que Gcn3p no está implicado en la toxicidad por MMS a las dosis ensayadas. Sin embargo está descrito que la mutación nula *gcn3Δ* aumenta la resistencia a 0,1 % de MMS. (Menacho-Marquez *et al.* 2007).

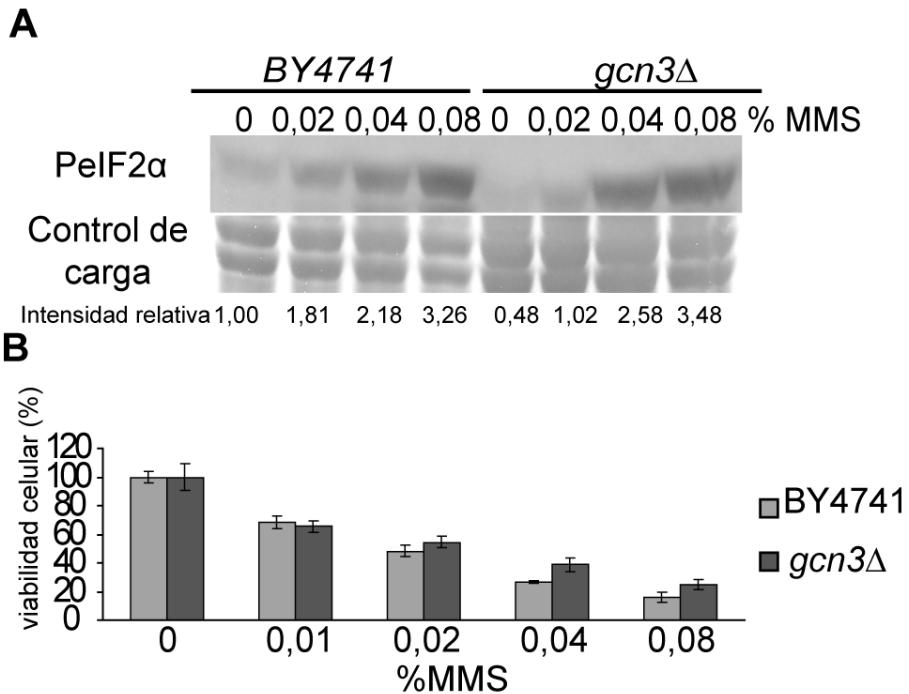


Figura 22: Efecto del MMS en el mutante *gcn3Δ*.

A. Inmunodetección de PeIF2α en cultivos celulares de BY4741 y *gcn3Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga de proteínas: Dos bandas representativas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y el tiempo 0 la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias. Obtenido con el “*software ImageJ*” como se indica en materiales y métodos. B. Ensayo clonogénico de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células BY4741 y *gcn3Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar (Barra error= desviación estándar de la media, n=3).

En el mutante nulo *gcn4Δ*, el tratamiento con MMS incrementa la fosforilación de eIF2α de manera similar o superior a la cepa silvestre (Figura 23A). Al estudiar la supervivencia celular a distintas dosis de MMS el mutante nulo *gcn4Δ* no manifiesta diferencias con el patrón de supervivencia de la cepa silvestre (Figura 23B). Estos resultados indican que Gcn4p no participa en la toxicidad de MMS.

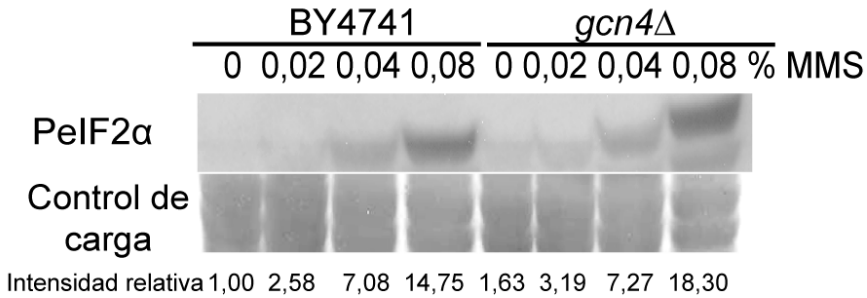
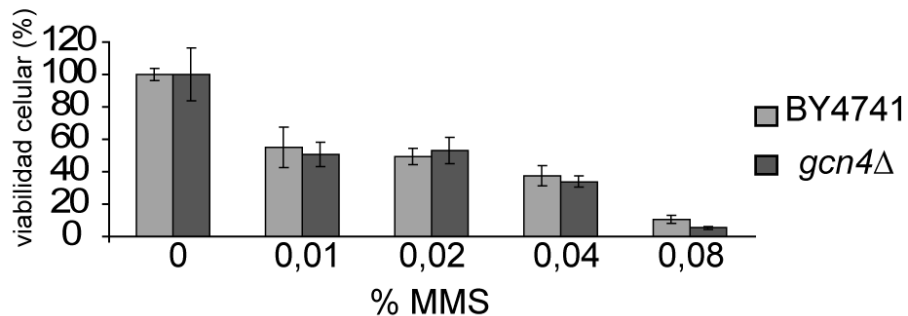
A**B**

Figura 23: Efecto del MMS en el mutante *gcn4Δ*.

A. Inmunodetección de PeIF2α en cultivos celulares de BY4741 y *gcn4Δ* tratados durante 2 horas con MMS a 0-0,02-0,04-0,08%. Control de carga de proteínas: Dos bandas representativas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad o densidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y el tiempo 0 de la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias. Obtenido con el “software *ImageJ*” como se indica en materiales y métodos. B. Ensayo clonogénico de viabilidad por crecimiento en placa YPD de células BY4741 y *gcn4Δ*, tras dos horas de tratamiento con MMS. Los resultados se presentan como el porcentaje de crecimiento en presencia de MMS respecto al control sin tratar (Barras de error= desviación estándar de la media, n=3).

Determinamos el crecimiento de todos los mutantes y la cepa silvestre en las concentraciones de MMS usadas durante tres días, mediante la plataforma Bioscreen C®. Los cultivos se realizaron como se indica en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Realizando los ajustes correspondientes

se obtienen las curvas de crecimiento representando absorbancia o densidad óptica (DO) frente a tiempo.

Observamos que la proliferación celular de todos los mutantes, así como la de la cepa silvestre se ve afectada de modo dependiente de la dosis de MMS siguiendo el mismo patrón, mostrando un retraso en el crecimiento o incluso inhibición del mismo a las mayores dosis ensayadas. Únicamente el mutante *gcn2Δ* muestra pequeñas diferencias (Figura 24).

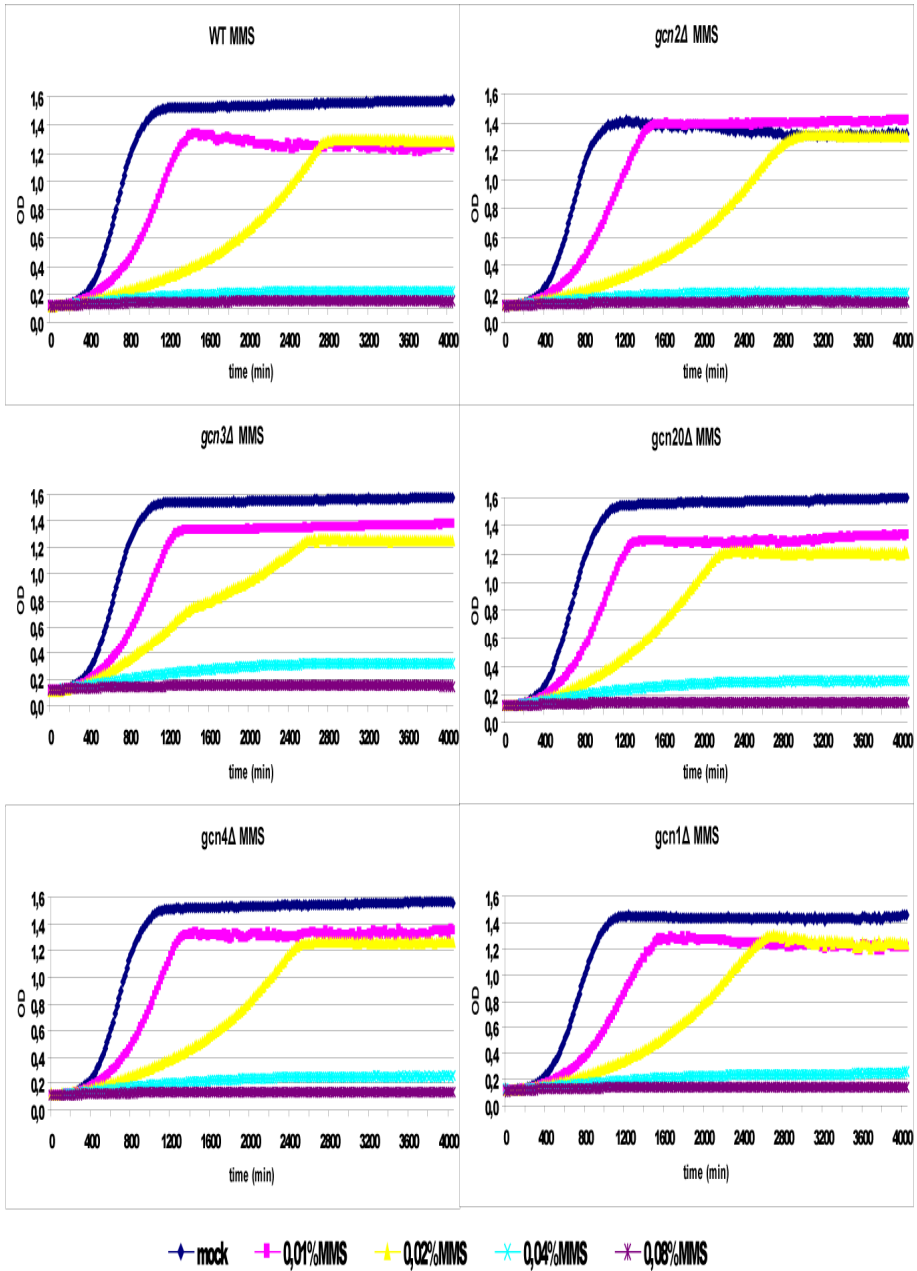


Figura 24: Crecimiento de mutantes *gcn* en distintas dosis de MMS.

Curvas de crecimiento de mutantes *gcn1Δ*, *gcn2Δ*, *gcn3Δ*, *gcn4Δ*, *gcn20Δ* en comparación al fondo silvestre BY4741 (WT) crecidos en medio líquido en microplaca de 100 pocillos con 0%, 0,01%, 0,02%, 0,04% y 0,08% de MMS en YPD y analizado mediante Bioscreen C[®]. Se muestra la representación gráfica de densidad óptica (OD) frente a tiempo tras los ajustes correspondientes.

3. La supervivencia a MMS es independiente de fosforilación de la ser51 en eIF2 α .

Quisimos comprobar si la citotoxicidad del MMS está mediada por el control traduccional, y por lo tanto del nivel de fosforilación de eIF2 α . Para ello analizamos la respuesta a MMS en el mutante de eIF2 α , *sui2 Δ S51A*. En dicho mutante la serina 51 que es la diana de fosforilación de Gcn2p se ha sustituido por una alanina (Hueso *et al.* 2012). En el mutante *sui2 Δ S51A*, realizamos un análisis del nivel de fosforilación de eIF2 α sin y con tratamiento con MMS así como de la viabilidad celular en respuesta a diferentes dosis de MMS.

Como era de esperar, no se detecta fosforilación de eIF2 α en el mutante *sui2 Δ S51A* tras 2h de tratamiento con 0,02% de MMS, pero sí en la cepa silvestre (Figura 25A). Al analizar la supervivencia celular de estas cepas en respuesta a tratamiento durante 2 horas con un rango de concentraciones de MMS se observa que no existen diferencias importantes entre el mutante de *SUI2* y su cepa silvestre (Figura 25B). Por lo tanto, la fosforilación de eIF2 no se requiere para la supervivencia celular al tratamiento con MMS. Dado que Gcn2p sí que se requiere para la supervivencia frente a MMS, la función de Gcn2p en relación a la toxicidad de MMS es independiente del control traduccional.

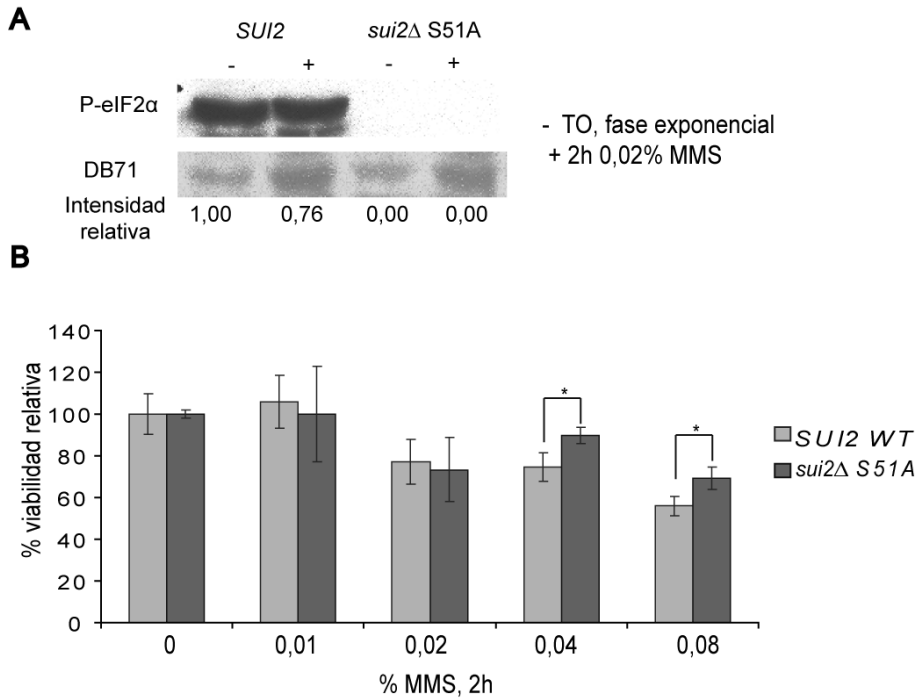


Figura 25: Caracterización mutante *Sui2Δ S51A* en respuesta a MMS.

A. Nivel de fosforilación de eIF2 α en cepa silvestre que expresa *SUI2* normalmente y mutante por la sustitución de serina 51 por alanina. Se muestran cultivos en fase exponencial (TO) y tras 2 horas de tratamiento con 0,02% de MMS. Control de carga de proteínas se muestra banda representativa de la tinción de membrana con colorante *DB71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PeIF2 α en relación a proteína total y el tiempo 0 de la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias. La ausencia de banda se indica con valor 0. La densitometría se ha analizado con el “*software ImageJ*” como se indica en materiales y métodos. B. Supervivencia celular relativa de las mismas cepas a diferentes dosis de MMS mediante ensayo clonogénico de viabilidad. Cultivos celulares en fase exponencial fueron tratados en cada dosis durante dos horas y sembrados por triplicado en placas YPD, analizados por conteo de colonias a los tres días. (n=3, barras de error= desviación estándar, * P<0,05).

4. Papel de las rutas de señalización y/o reparación del daño al DNA celular en la activación de Gcn2p por MMS.

MMS es un agente alquilante que produce alquilación de ambos tipos de bases nitrogenadas produciendo desapareamiento de bases y bloqueo de la maquinaria de replicación (Lundin *et al.* 2005). Ha quedado patente que la quinasa Gcn2p está implicada en la respuesta al daño al DNA por MMS. Ello sugiere que de alguna manera estará interconectada con las rutas de señalización y/o reparación del daño en el DNA. Así que nos planteamos explorar esta hipótesis midiendo el nivel de fosforilación de eIF2 α en respuesta a MMS en una serie de mutantes nulos de proteínas implicadas en estos procesos.

Comenzamos explorando genes que expresan proteínas de las rutas de control del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA. Para este objetivo se usó una serie de mutantes disponibles en el fondo genético W303, y se usó como cepa control la cepa W303.1a defectiva en *SML1*, dado que la mutación *sm1 Δ* suprime la letalidad del mutante nulo de *MEC1* (Corda *et al.* 2005). Se realizaron cultivos celulares en paralelo de cada mutante y la cepa control hasta la fase exponencial de crecimiento, donde separamos en dos condiciones y recogiendo muestras tras tratamiento durante 2 horas con 0,02% de MMS y sin tratamiento para analizar el nivel de fosforilación de eIF2 α .

En la figura 26 se observa que la cepa control responde a MMS aumentando la fosforilación de eIF2 α . En la cuantificación relativa con respecto a la cepa control sin tratar, se observa que la mayor parte de los mutantes presentan un nivel de fosforilación menor que la cepa control, aunque con el tratamiento con MMS el incremento de fosforilación es similar o superior que el mostrado en la cepa control.

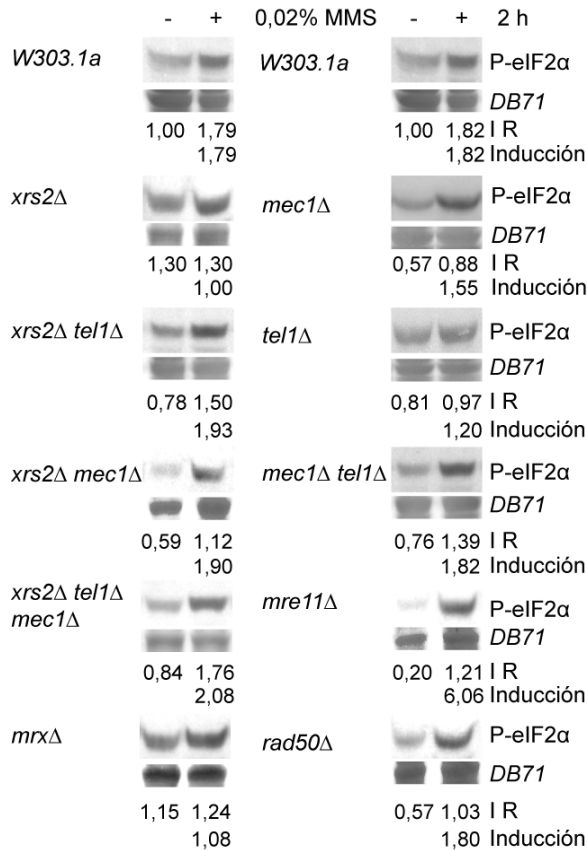


Figura 26: Análisis nivel fosforilación eIF2α en mutantes de proteínas de control de daño al DNA:

Las distintas cepas en fase exponencial tratadas con 0,02% MMS (+) y sin tratar (-) durante dos horas se analizaron por inmunodetección con anticuerpo que reconoce P-eIF2α. Control de carga de proteínas: Tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*, mostrando una banda representativa. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y la cepa control sin tratamiento como referencia expresado en unidades arbitrarias (IR), obtenido con el *software ImageJ* y el valor de inducción con respecto a sin tratar. La figura muestra un experimento representativo de al menos 2 independientes cada uno en duplicado. Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares.

Excepto en los mutantes *xrs2Δ*, *tel1Δ* y el triple mutante *mxrΔ*, que presentaron un defecto en la fosforilación en respuesta a MMS además de presentar un mayor nivel de fosforilación sin tratar con respecto al control (Figura 26). Esto

último sugiere una cierta activación de Gcn2p que puede estar causada por la proteína ausente del mutante. Dado que la deficiencia en respuesta a MMS se observa en el mutante *xrs2Δ* y el triple mutante *mrxΔ*, y no en los simples mutantes de los otros componentes del complejo indica que la deficiencia se debe, de alguna manera, a la pérdida de la proteína Xrs2p.

Hemos visto que Xrs2p se requiere en la activación de Gcn2p por MMS. Posteriormente quisimos determinar si esta respuesta esta mediada por el control traduccional. Para este objetivo transformamos la cepa control W303 y los distintos mutantes del complejo MRX con el plásmido reportero p180, (Tabla 2 y 3) que lleva la región reguladora del mRNA de *GCN4* unida al gen bacteriano *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, estando bajo el control de dicha región reguladora. Si el factor de transcripción Gcn4p es traducido selectivamente se puede detectar indirectamente mediante la actividad β -galactosidasa. Dada la variabilidad en el nivel basal de Pelf2 α observado, que pensamos que se puede atribuir al diferente comportamiento de estas cepas en crecimiento y a efecto del la proteína ausente, nos centramos en el complejo MRX que muestra un defecto más claro. De modo que si dichos mutantes presentan una mayor actividad que la cepa control indicaría que tienen una mayor traducción de Gcn4p o está aumenta.

Recogimos muestras de cultivos celulares simultáneos de los distintos mutantes del complejo MRX y la cepa control en fase exponencial de crecimiento y analizamos el nivel de fosforilación de eIF2 α tras dos horas sin tratamiento. Observamos que todos los mutantes muestran niveles de fosforilación similar o superior a la cepa control en estas condiciones. En especial, en la cuantificación relativa se observa el mayor nivel de fosforilación en el simple mutante nulo *xrs2Δ* y el triple *mrxΔ* y más leve en el *mre11Δ* (Figura 27A).

En paralelo recogimos muestras de cultivos tras 2 horas sin tratar y 2h con 0,02% de MMS y analizamos la actividad β -

galactosidasa, como se describe en el apartado correspondiente de materiales y métodos. Observamos en estas condiciones que hay una actividad baja, siendo en todos los mutantes menor que la actividad percibida en la cepa control (Figura 27B), y siendo el valor entre la mitad y un tercio del valor de la cepa control, en los mutantes *xrs2Δ* y *mrxd*. Resultados esencialmente similares se observa en la actividad de los mutantes y la cepa control tras 2 horas de tratamiento con MMS, aumentando las diferencias entre *xrs2Δ* y el triple mutante *mrxd* con respecto a la cepa control, ya que ambos presentan menor actividad que sin tratar, casi la mitad, esto correlaciona con el defecto de fosforilación en respuesta a MMS observado anteriormente. Mientras que la cepa control y los otros dos mutantes simples presentan valores ligeramente superiores en comparación a valores sin tratar (Figura 27C). Esto sugiere que, en estos mutantes que presentan una mayor fosforilación de eIF2 α en condiciones normales, no correlaciona con una mayor traducción selectiva de Gcn4p pudiendo ocurrir una activación constitutiva de Gcn2p. Además con el tratamiento de MMS disminuye tanto la traducción de Gcn4p como la fosforilación de eIF2 α , indicando que de algún modo Gcn2p no puede responder a MMS.

Resultados

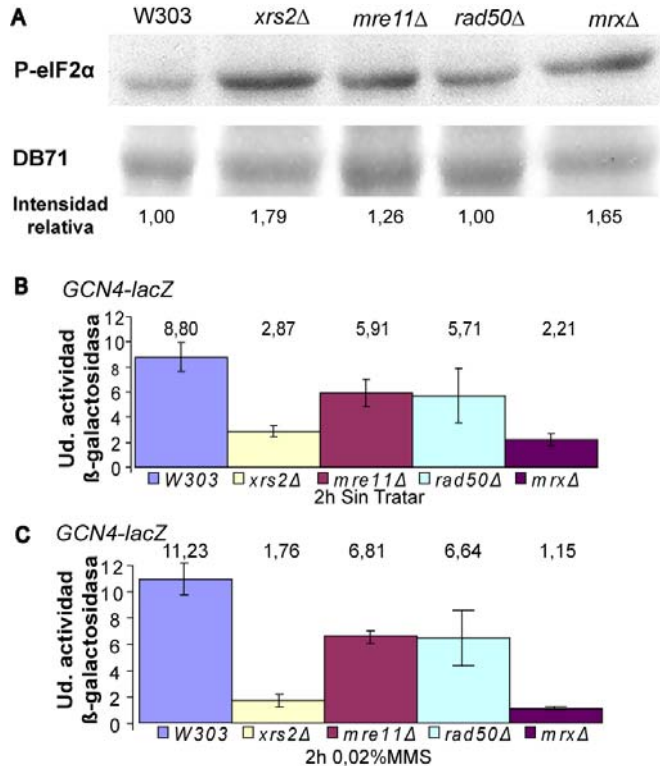


Figura 27: Análisis del papel del complejo MRX en la fosforilación de eIF2 y en actividad β-Galactosidasa dependiente de la traducción de *GCN4*.

A. Nivel de fosforilación de eIF2α en cepa control W303 y mutantes del complejo MRX transformados con plásmido p180 en fase exponencial de crecimiento. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y la cepa control como referencia expresado en unidades arbitrarias. Obtenido con el “*software ImageJ*” como se indica en materiales y métodos. La figura muestra un experimento representativo de al menos 2 independientes cada uno en duplicado. Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares.

B. actividad β-Galactosidasa en estas cepas en las mismas condiciones que A.

C. actividad β-Galactosidasa en estas cepas tratadas con 0,02% MMS durante 2 horas. La actividad se muestra en unidades de actividad enzimática (nmol por minuto y por mg de proteína) de 3 medidas independientes y el error estándar.

5. Papel de las rutas de reparación del daño en el DNA celular en la activación de Gcn2p por MMS.

Con el objetivo de explorar si las rutas de reparación del DNA median de alguna manera la activación de Gcn2p en respuesta a MMS, exploramos el estatus de fosforilación de eIF2 α en una serie de mutantes nulos de proteínas de reparación del DNA en el fondo genético BY4741. Estos mutantes son defectivos en las diferentes rutas de reparación de daño al DNA, acumulando lesiones en el DNA.

En la cepa silvestre se produce un aumento de fosforilación de eIF2 α como consecuencia del tratamiento con 0,02% MMS en el medio durante 2 horas (Figura 28). En general, observamos un aumento de fosforilación de eIF2 α en los mutantes como consecuencia del tratamiento con MMS, de forma similar al observado en la cepa silvestre o en algunos casos más leve como *rad6 Δ* , *rad1 Δ* , *rad50 Δ* y *rad51 Δ* , aunque estos presentan mayor fosforilación en condiciones sin MMS. Únicamente el mutante *mag1 Δ* presenta un defecto en la fosforilación en respuesta a MMS en comparación a la cepa silvestre (Figura 28). *MAG1* codifica una 3-metiladenina DNA glicosilasa, la cuál es una proteína necesaria para la reparación de lesiones en el DNA causados por agentes alquilantes, como el caso de MMS. Este hecho sugiere que en la activación de Gcn2p en respuesta a MMS se requiere la proteína de reparación Mag1p. Además esta activación se ve parcialmente afectada cuando faltan componentes de reparación del DNA mediante recombinación homóloga (Rad50p-51p), NER (Rad1p) y PRR (Rad6p) que reparan DSB (RH) y sitios AP (NER y PRR). Los sitios AP se producen indirectamente por MMS al eliminar los productos de la alquilación por Mag1p y pueden evolucionar a otro tipo de lesiones. En conjunto, estos datos sugieren una conexión funcional de Gcn2p con la maquinaria de reparación del DNA.

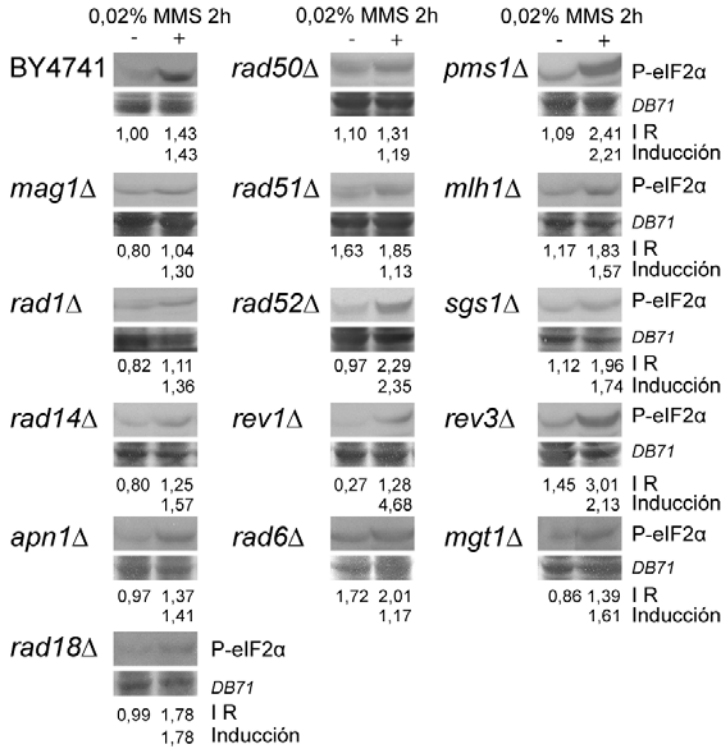


Figura 28: Análisis de proteínas de reparación en respuesta a 0,02% de MMS en relación a fosforilación de eIF2α.

Las distintas cepas en fase exponencial fueron tratadas con 0% (-) y 0,02% MMS (+) durante dos horas, se recogieron muestras y realizamos inmunodetección con anticuerpo que reconoce P-eIF2α (Ser51). Como control de carga se muestra banda representativa de la tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de intensidad relativa de la banda P-eIF2α en relación a proteína total y la cepa control con 0% MMS como referencia expresado en unidades arbitrarias (I R) obtenido con el "software ImageJ" como se indica en materiales y métodos. El valor de inducción es la relación entre el valor con MMS y sin tratar. La figura muestra un experimento representativo de al menos 2 independientes cada uno en duplicado. Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares.

6. Análisis de traducción selectiva de Gcn4p en los mutantes de las rutas de reparación del DNA.

Analizamos sí las proteínas de reparación del DNA median de alguna manera la traducción selectiva de *GCN4* en respuesta a MMS. Para ello, transformamos los mutantes nulos anteriores con el plásmido p180 (Tabla 2), que lleva la región reguladora del mRNA de Gcn4p controlando el gen bacteriano lacZ, el cual codifica para la enzima β -galactosidasa, como se indica en el apartado correspondiente de materiales y métodos.

Crecimos estos mutantes hasta la fase exponencial de crecimiento, recogimos muestras que procesamos como se indica en el apartado correspondiente de materiales y métodos para analizar la actividad β -galactosidasa. Observamos que en general, los valores de actividad β -galactosidasa son bajos, en condiciones control la mayor parte de mutantes presentan una menor actividad que la mostrada por la cepa silvestre, los mutantes *rad50* Δ y *rad6* Δ muestran una actividad similar a la cepa silvestre mientras que los mutantes *rad51* Δ y *rad52* Δ tienen una mayor actividad en comparación a la cepa silvestre (Figura 29) estos datos correlacionan con mayor fosforilación de eIF2 α en condiciones control observadas en la figura 28. Esto indica que la pérdida de Rad51p y Rad52p produce una mayor respuesta traduccional mediada por Gcn2p, aumentando la traducción selectiva. Por lo tanto parece existir una conexión entre Gcn2p y el grupo epistático RAD52 (del que entre otras proteínas forma parte Rad50p, Rad51p y Rad52p), esta implicado en reparación de daño en el DNA mediante recombinación homóloga.

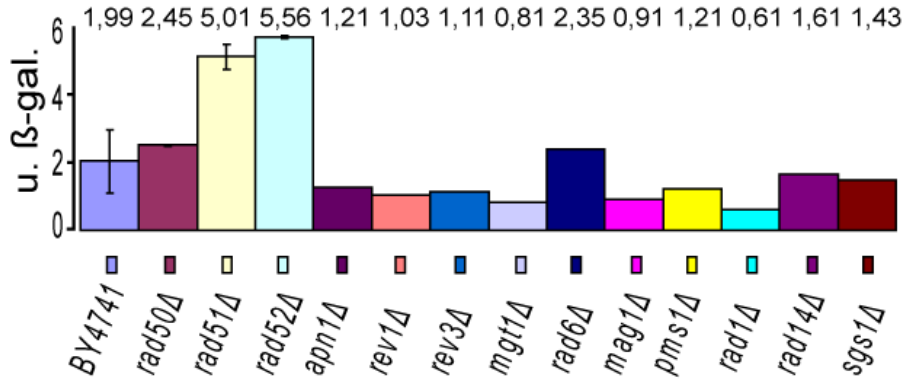


Figura 29: Actividad β-Galactosidasa en mutantes de rutas de reparación del DNA. Cultivos en fase exponencial se recogieron muestras y se evaluó actividad β-galactosidasa. La actividad se muestra en unidades de actividad enzimática (nmol por minuto y por mg de proteína) de 2 experimentos independientes con error estándar.

7. Análisis de la implicación de tRNA descargados en la activación de Gcn2p en respuesta a MMS.

Previamente hemos descrito que el tratamiento con MMS induce la activación de Gcn2p causando un incremento en la fosforilación de eIF2 α , dependiente de Gcn1p y de Gcn20p. Estos datos sugieren que, de alguna manera, el tratamiento con MMS produce el acumulo de tRNA descargados en ausencia de ayuno de nutrientes, aunque no sabemos que tRNA o tRNAs en particular para llevar a cabo una medición directa de este acumulo. Una posibilidad de que se produzca esa situación sería que las aminoacil-tRNA sintetasas se ven inhibidas en condiciones de estrés genotóxico, de forma similar a lo descrito para la activación de Gcn2p por estrés ácido. Por ejemplo, el MMS podría alquilar los tRNAs y evitar su carga con aminoácidos catalizada por las sintetasas. Para abordar esta hipótesis realizamos un rastreo utilizando la colección de mutantes haploinsuficientes en las aminoacil-tRNA sintetasas mediante cultivos simultáneos con distintas dosis de MMS utilizando la plataforma Bioscreen C[®]. Utilizamos como cepa de referencia una cepa isogénica que expresa *URA10*, es decir, una cepa diploide que expresa a niveles normales todas las aminoacil-tRNA sintetasas. La razón de usar mutantes haploinsuficientes es, como se ha mencionado anteriormente en la parte de estrés ácido, que las mutaciones nulas de sintetasas citosólicas de levadura son letales (las mutaciones nulas de sintetasas mitocondriales de levadura son viables). Mediante el uso de cepas haploinsuficientes diploides, se podría comparar todos los mutantes de las sintetasas con una reducción del 50% de la dosis génica (Hueso *et al.* 2012).

Se evaluó la sensibilidad a MMS monitorizando el crecimiento de cada mutante y la cepa de referencia a las siguientes dosis: 0, 0,1, 0,2, 0,4 y 0,8 mg/ml de MMS simultáneamente por triplicado durante al menos tres días. Las lecturas obtenidas se procesaron como se ha detallado en el

apartado correspondiente de materiales y métodos. Obteniendo las curvas de crecimiento para cada cepa y condición, posteriormente la curva de porcentaje de crecimiento frente a dosis para cada cepa, y el valor de IC_{50} de cada cepa utilizando el “software SigmaPlot10” (“systat software, Inc.”) utilizando como parámetro de crecimiento la absorbancia para un tiempo fijo de 50 horas. Las cepas más sensibles a MMS tienen una IC_{50} menor que la cepa silvestre ($IC_{50}= 0,22$), y las más tolerantes mayor valor en comparación a la cepa silvestre, existiendo varios mutantes que presentan un valor de IC_{50} muy similar al de está (Tabla 6).

Tabla 6: Valor de dosis inhibitoria al 50% por MMS (IC_{50} en $mg\ ml^{-1}$) en mutantes haploinsuficientes para diferentes aminoacil-tRNA sintetasas de levadura con el error estándar (EE). Error estándar de dos a cuatro experimentos independientes con tres replicas cada uno.

Cepas	$IC_{50}(mg/ml)\pm EE$	Cepas	$IC_{50}(mg/ml)\pm EE$
WT(URA10)	0,22±0,01	MSY1	0,20±0,01
YDR341C	0,28±0,11	CDC60	0,20±0,01
TYS1	0,24±0,00	VAS1	0,20±0,01
MSR1	0,23±0,02	ALA1	0,20±0,01
MSE1	0,23±0,01	NAM2	0,20±0,01
MSF1	0,23±0,01	YNL247W	0,20±0,02
MES1	0,23±0,04	MSW1	0,19±0,00
DPS1	0,23±0,03	SLM5	0,18±0,01
KRS1	0,23±0,02	SES1	0,17±0,01
DED81	0,22±0,01	DIA4	0,17±0,01
MSK1	0,22±0,01	GRS1	0,16±0,01
WRS1	0,22±0,01	FRS2	0,16±0,00
ILS1	0,22±0,00	MSD1	0,16±0,00
HTS1	0,21±0,01	YER087W	0,15±0,00
FRS1	0,21±0,01	GUS1	0,15±0,00
ISM1	0,21±0,02	MSM1	0,14±0,00
THS1	0,21±0,01	YHR020W	0,14±0,01
GLN4	0,21±0,04	MST1	0,13±0,00

Calculamos el índice fenotípico como el logaritmo en base 2 de la relación del valor de cada cepa con la cepa isogénica de referencia y tomamos como significativamente más sensibles valores superiores a -0,4, lo que significa 1,4 veces más sensible que la cepa silvestre isogénica. Siguiendo este criterio seleccionamos nueve mutantes haploinsuficientes de las aminoacil-tRNA sintetetasas que son más sensibles a MMS: *GRS1*, *SLM5*, *FRS2*, *MSD1*, *YER087W*, *GUS1*, *MSM1*, *YHR020W* y *MST1* (Tabla 8). En conjunto, estos datos sugieren que existen ciertas aminoacil-tRNA sintetetasas que de alguna manera se ve más afectadas por MMS que otras.

Tabla 7: Descripción de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetetasas más sensibles a MMS.

Descripción cepas más sensibles a MMS		Clase
MST1	treonil-tRNA sintetasa mitocondrial	II
YHR020W	desconocida similar a prolil-tRNA sintetasa citoplasmática	II
YER087W	similar a aminoacil-tRNA sintetasa mitocondrial	II
FRS2	subunidad alfa fenilalanil-tRNA sintetasa citoplasmática	II
MSM1	metionil-tRNA sintetasa mitocondrial	I
GRS1	glicil -tRNA sintetasa citoplasmática/ mitocondrial	II
GUS1	glutamil-tRNA sintetasa citoplasmática	I
MSD1	aspartil-tRNA sintetasa mitocondrial	II
SLM5	asparaginil-tRNA sintetasa mitocondrial	II

Dado que los mutantes de las aminoacil-tRNA sintetetasas mitocondriales sí son viables, ensayamos los genes seleccionados anteriormente analizando la sensibilidad a MMS en el fondo genético BY4741. Observamos que los mutantes

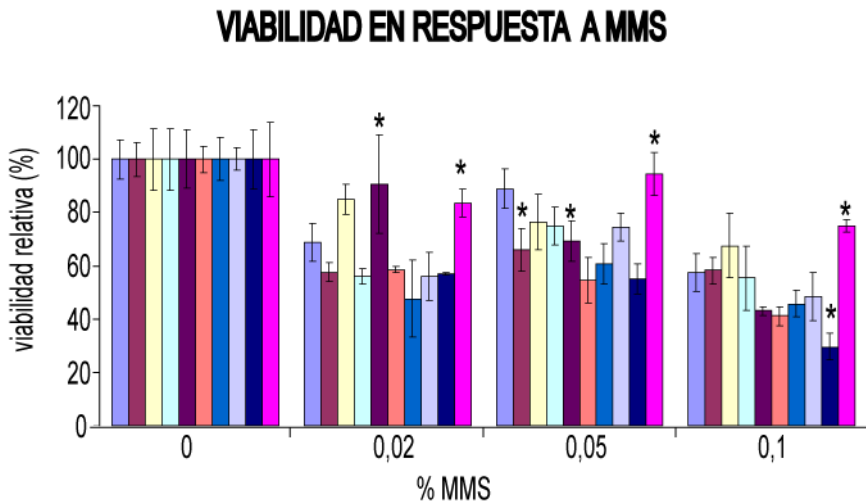
haploides nulos tienen valores de IC_{50} superiores a los obtenidos en sus respectivos mutantes diploides haploinsuficientes (tabla 8 y tabla 6) La cepa control BY4741 presenta una IC_{50} en respuesta a MMS de 0,234, observando ligeras diferencias en los mutantes, *msm1* Δ es ligeramente más tolerante (0,259), *yer087w* igual a la cepa control (0,235) y los otros 3 mutantes ligeramente más sensibles, aunque las diferencias no son significativas entre estos mutantes y la cepa control (tabla 8). Por lo tanto, la ausencia de estas enzimas no aumenta la sensibilidad a MMS, estos datos son consistentes con la hipótesis del efecto inhibitor sobre las aminoacil-tRNA sintetasas de MMS, ya que en ausencia de estas enzimas el MMS no tienen efecto tóxico en comparación al control.

Tabla 8: IC_{50} en respuesta a MMS en aminoacil-tRNA sintetasas mitocondriales seleccionadas.

cepas	IC_{50} (mg/ml MMS) \pm EE
BY4741	0,23 \pm 0,01
<i>msm1</i> Δ	0,26 \pm 0,02
<i>yer087w</i> Δ	0,24 \pm 0,01
<i>mst1</i> Δ	0,20 \pm 0,01
<i>msd1</i> Δ	0,19 \pm 0,01
<i>slm5</i> Δ	0,19 \pm 0,06

8. Caracterización de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas seleccionados en el rastreo con MMS.

Posteriormente, caracterizamos la respuesta de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas más sensibles a MMS. Por un lado quisimos ver si la sensibilidad a MMS, determinada como un defecto en el crecimiento en los cultivos celulares, correlaciona con una variación de la supervivencia celular a diferentes dosis de MMS. Para ello realizamos ensayos clonogénicos en placa, según el protocolo descrito en materiales y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 30.



■ WT ■ MST1 ■ FRS2 ■ YER087W ■ GRS1 ■ YHR020W ■ GUS1 ■ MSD1 ■ SLM5 ■ MSM1

Figura 30: Viabilidad de mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetasas más sensibles a MMS.

Ensayo por conteo en placa de colonias crecidas a partir de cultivos en fase exponencial tratados durante 2 horas a las concentraciones de MMS indicadas y sembradas en placa de YPD. Analizado a los tres días de crecimiento. Se representa el % relativo con respecto a 0% MMS de 9 mutantes más sensibles y la cepa isogénica, promedio de 3 experimentos con error estándar, * $P < 0,05$. WT= cepa isogénica, *URA10*.

Observamos ligeras diferencias de disminución de viabilidad en comparación con la cepa control en cada concentración de MMS, en concreto, MST1 y GRS1 a 0,05% y SLM5 a 0,1%, ninguna cepa mutante muestra diferencias significativas en todas las dosis de MMS en comparación con la cepa control, excepto MSM1 que parece más resistente. Por lo tanto, el tratamiento con MMS no afecta significativamente a la supervivencia celular, por lo que el defecto de crecimiento no conlleva una disminución diferencial de la supervivencia celular.

Posteriormente realizamos una caracterización bioquímica mediante análisis del nivel de fosforilación de eIF2 α en estos mutantes haploinsuficientes en comparación a la cepa control. Como estos mutantes han mostrado un comportamiento similar entre sí tanto el retraso en crecimiento como en viabilidad, decidimos ver la respuesta a una dosis más alta de MMS, así que analizamos la fosforilación tras dos horas de tratamiento con 0,1% de MMS. Tanto los mutantes como la cepa silvestre isogénica muestran fosforilación de eIF2 α , y solo el mutante haploinsuficiente en *FRS2* exhibe un mayor nivel de fosforilación en comparación a la cepa silvestre (Figura 31). *FRS2* codifica la subunidad α de la aminoacil-tRNA sintetasa de fenilalanina (Phe), que junto a la subunidad β son necesarias para la correcta actividad. Esto indica que una reducción a la mitad de la dosis génica de esta subunidad conlleva un incremento en la activación de Gcn2p en respuesta a MMS, y sugiere que Frs2p, de alguna manera, se ve afectada especialmente por MMS.

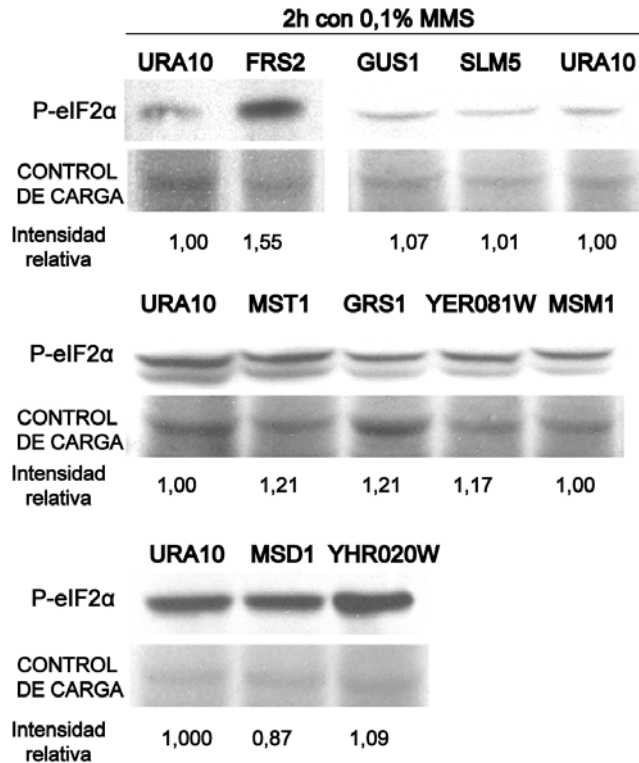


Figura 31: Análisis nivel fosforilación eIF2 α en mutantes haploinsuficientes en TRS en respuesta 0,1% MMS durante 2 horas.

Se muestra banda de P-eIF2 α en respuesta a 0,1% de MMS durante dos horas de estos mutantes en comparación a la cepa isogénica URA10. Debajo, control de carga de proteínas: Banda representativa mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. En la parte inferior se indica el valor de Intensidad relativa de la banda PeIF2 α en relación a proteína total y la cepa isogénica como referencia expresado en unidades arbitrarias. Obtenido con el *software* ImageJ como se indica en materiales y métodos. La figura muestra un experimento representativo de al menos 2 independientes cada uno en duplicado. Los resultados obtenidos fueron esencialmente similares.

Para corroborar este resultado realizamos un curso temporal con este mutante y analizamos el nivel de fosforilación de eIF2 α con 0,1% de MMS a distintos tiempos. La respuesta es dependiente del tiempo, incrementándose la fosforilación en función del mismo, siendo ligeramente mayor la fosforilación en el mutante de *FRS2* que en la cepa control,

aunque ambos muestran un pico entre 1,5 y 2 horas (Figura 32).

En conjunto, estos datos indican que el tratamiento con MMS interfiere selectivamente la función de un grupo de aminoacil tRNA sintetasas. El hecho de que en la cepa haploinsuficiente *FRS2* la activación de *gcn2p* por MMS se vea incrementada, sugiere que su inhibición contribuye mayoritariamente a la activación de la ruta GCN por MMS.

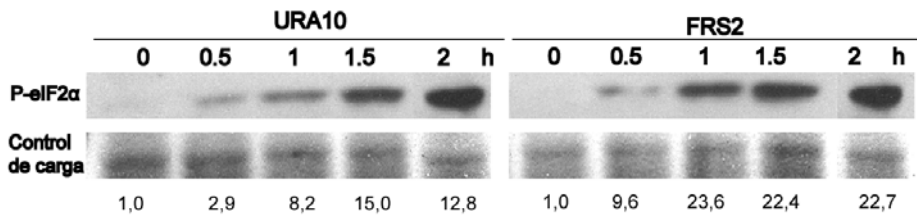


Figura 32: Curso temporal de fosforilación de eIF2α en mutante haploinsuficiente en *FRS2* tratado con 0,1% de MMS.

Comparación del nivel de fosforilación de eIF2α en cultivos de la cepa silvestre isogénica *URA10* y el mutante haploinsuficiente en *FRS2* en fase exponencial tratado con 0,1% de MMS y recogido a los tiempos indicados. En la parte inferior banda representativa de control de carga de proteína mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71* y el valor de Intensidad relativa de la banda PeIF2α en relación a proteína total y el tiempo 0 como referencia expresado en unidades arbitrarias. Obtenido con el *software* ImageJ como se indica en materiales y métodos.

9. Caracterización de respuesta a MMS en cepas que sobreexpresan las diferentes aminoacil-tRNA sintetasas.

Si efectivamente la inhibición de la actividad aminoacil-tRNA sintetasa media las respuestas celulares a MMS, y mas concretamente la activación de Gcn2p, entonces la ganancia de función de estas proteínas debería aliviar la toxicidad de MMS.

Para ello cuantificamos la viabilidad de una set de cepas que sobreexpresan las diferentes aminoacil tRNA sintetasas bajo regulación del promotor de *GAL1*. Estas cepas pertenecen a la colección comercial de open biosystems ("*yeast ORF Collection*", cuya relación está descrita en la tabla 3 y se describe en (Gelperin *et al.* 2005)). Como no disponemos de un mutante de sobreexpresión de la cepa isogénica usada anteriormente, utilizamos como referencia tres cepas que han mostrado un comportamiento similar a la cepa isogénica en los ensayos de pérdida parcial de función, estas son: DED81, ILS1 y KRS1 ya que en la colección no tiene una cepa control con el plásmido vacío. Realizamos ensayos creciendo cultivos de estas cepas en medio YPRafinosa, y subcultivando, tras lavado en YPGalactosa durante al menos 6 horas, para inducir la expresión. Analizamos el crecimiento mediante monitorización con la plataforma Bioscreen C[®] en YPD e YPGalactosa sin y con 0,02% de MMS, observamos que en todas las cepas hay un retraso en el crecimiento y el rendimiento de cultivo en YPGalactosa en comparación a YPD, y en ambos medios observamos un gran retraso en el arranque de cultivo, sin detectar diferencias claras entre cepas (datos no mostrados). Este resultado sugiere que no se detecta un fenotipo de alivio de toxicidad a MMS.

Analizamos la fosforilación de eIF2 α en el mutante de ganancia de función de *FRS2*, para ver si se mantiene el incremento observado en la pérdida parcial de función.

Observamos que al sobreexpresar *FRS2* en YPGalactosa existe una importante fosforilación de eIF2 α independiente de MMS y el tiempo, además de mostrar otras bandas con alto nivel de fosforilación, situadas aproximadamente a 58 y 77 KDa que coinciden con el tamaño de proteína esperado, de Frs2p nativa y sobreexpresada, que lleva un “tag” de 19 KDa, respectivamente (Figura 33). Este resultado inesperado sugiere dos posibilidades, o existe un exceso de proteínas que provoca la unión inespecífica del anticuerpo u otra posibilidad es que Frs2p sea un nuevo sustrato de Gcn2p.

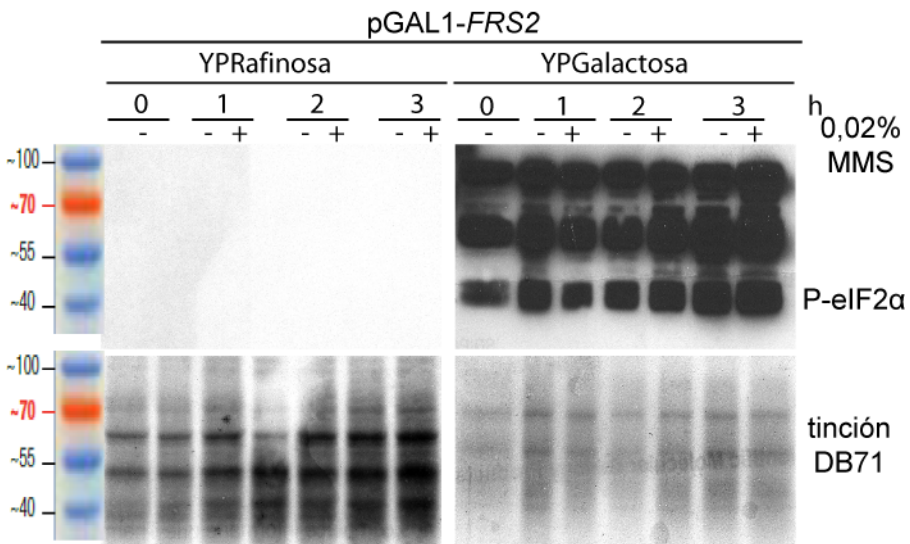


Figura 33: Análisis de fosforilación de eIF2 α inducida por MMS en el mutante de sobreexpresión de *FRS2*.

Comparación del nivel de fosforilación de eIF2 α en cultivos en fase exponencial tratados con 0,02% de MMS a tiempos 0, 1, 2 y 3h del mutante pGAL1-*FRS2* en comparación a sin tratar, en medio YPRafinosa y medio inductor YPGalactosa. En la parte inferior control de carga de proteínas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*.

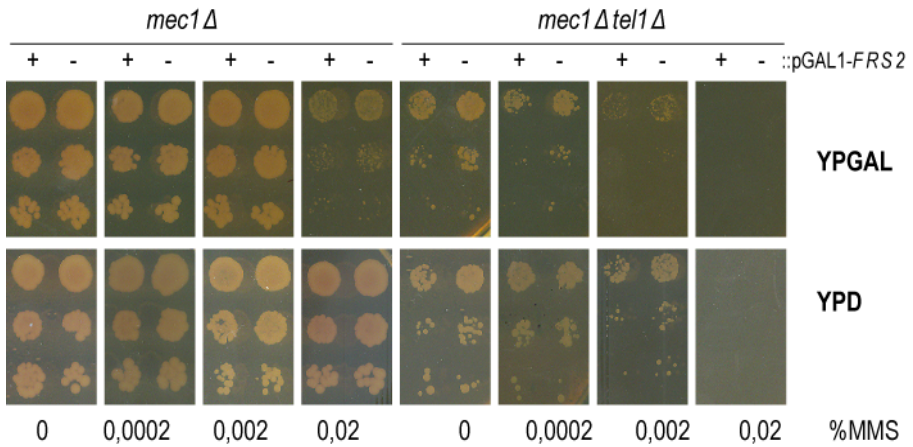
Los resultados de crecimiento sugirieron que el incremento de expresión constitutivo de aminoacil-tRNA sintetetas enmascara el efecto de MMS. Por ello decidimos evaluar el fenotipo de crecimiento y fosforilación de eIF2 α transformando con pGAL1-*FRS2* cepas defectivas en

señalización del daño en el DNA como *mec1Δ* y el doble mutante *mec1Δtel1Δ*. El simple mutante *tel1Δ* no lo pudimos transformar con pGAL1-*FRS2*, ya que resulto inviable. Analizamos la sensibilidad a distintas dosis de MMS por ensayo de crecimiento en medio sólido, no observamos diferencias en la sensibilidad entre los mutantes sin y transformados con pGAL1-*FRS2*, en ambos medios. El doble mutante fue mucho mas sensible que el simple en todas las condiciones (Figura 34A). Este resultado sugiere que la sobreexpresión de *FRS2* no afecta diferencialmente la supervivencia a MMS en las condiciones ensayadas.

Analizamos el crecimiento mediante la plataforma Bioscreen C[®], observando que ambas cepas crecen peor en YPGalactosa en comparación a YPD. En el mutante *mec1Δ* observamos un crecimiento similar sin y con pGAL1-*FRS2* en YPD con independencia de MMS, excepto un ligero defecto de crecimiento de *mec1Δ::pGAL1-FRS2* a 0,002% de MMS en relación a *mec1Δ*. En YPGalactosa observamos un defecto de crecimiento al expresar *FRS2* sin MMS, pero a 0,0002% de MMS crece mejor que *mec1Δ*, y se igualan entre sí a 0,002% MMS (Figura 34B). Este resultado indica que el crecimiento de *mec1Δ* se ve afectado por la expresión de pGAL1-*FRS2* siendo más tolerante a dosis pequeñas de MMS y por lo tanto, alivia la sensibilidad a MMS.

Por otro lado el doble mutante *mec1Δtel1Δ* muestra un fuerte retraso en el crecimiento que es más acusado con la transformación con pGAL1-*FRS2* en condiciones sin MMS igualándose a 0,002% donde la transformación mejora el crecimiento. A mayor dosis de MMS en YPD, así como en YPGalactosa el crecimiento es inhibido completamente con independencia de MMS y la transformación o no con pGAL1-*FRS2* (Figura 34B). Este resultado indica que el doble mutante es hipersensible independientemente de la sobreexpresión de *FRS2*. En conjunto estos resultados sugieren un fenotipo de epistasia con Tel1p.

A



B

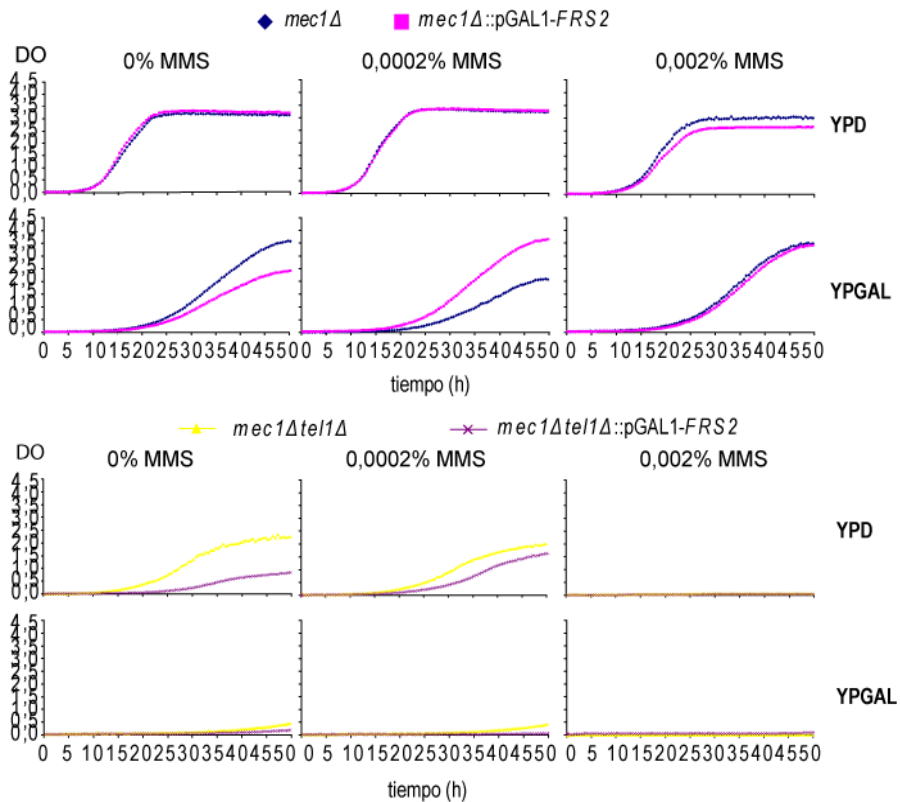


Figura 34: Caracterización crecimiento sobreexpresando *FRS2* en mutantes defectivos en señalización de daño al DNA.

Los mutantes *mec1Δ* y *mec1Δtel1Δ* fueron transformados con pGAL1-*FRS2* y crecidos en YPD e YPGAL, y tratados con 0-0,0002%-0,002%-0,02% de MMS. Como control se usaron cepas sin transformar. A. Análisis del crecimiento en placa en medios y condiciones indicadas, imágenes tomadas tras 3 días de crecimiento. B. Monitorización del crecimiento mediante plataforma Bioscreen C[®] se muestran gráficas de densidad óptica frente a tiempo en estas condiciones (No se muestran gráficas a 0,02% de MMS porque se inhibió completamente el crecimiento).

Realizamos análisis del nivel de fosforilación de eIF2 α en estas cepas comparando los mutantes sin transformar y transformados con pGAL1-*FRS2*, crecidos en medio YPD y medio inductor YPGalactosa y tratadas con distintas concentraciones de MMS durante 2 horas. En el mutante *mec1Δ* con *FRS2* observamos un ligero incremento de la fosforilación de eIF2 α a 0,02% de MMS en YPD, mientras que cuando crecen en YPGalactosa ocurre una disminución de la fosforilación al expresar *FRS2* comparando tanto con la cepa sin transformar como transformada crecidas en YPD, en todos los casos fue independiente de la dosis de MMS (Figura 35 superior). Este resultado sugiere que en el mutante *mec1Δ* la activación de Gcn2p disminuye con la sobreexpresión de *FRS2*.

Por otro lado el doble mutante *mec1Δtel1Δ* muestra una fosforilación que aumenta con la concentración de MMS en YPD. En YPGalactosa sin transformar la fosforilación disminuye un poco al aumentar la dosis de MMS y transformada muestra una alta fosforilación independientemente de MMS y se reproducen las bandas inespecíficas vistas anteriormente (Figura 35 inferior). Este resultado sugiere que la ausencia de Tel1p provoca un gran aumento de fosforilación de eIF2 α , apoyando el fenotipo de epistasia.

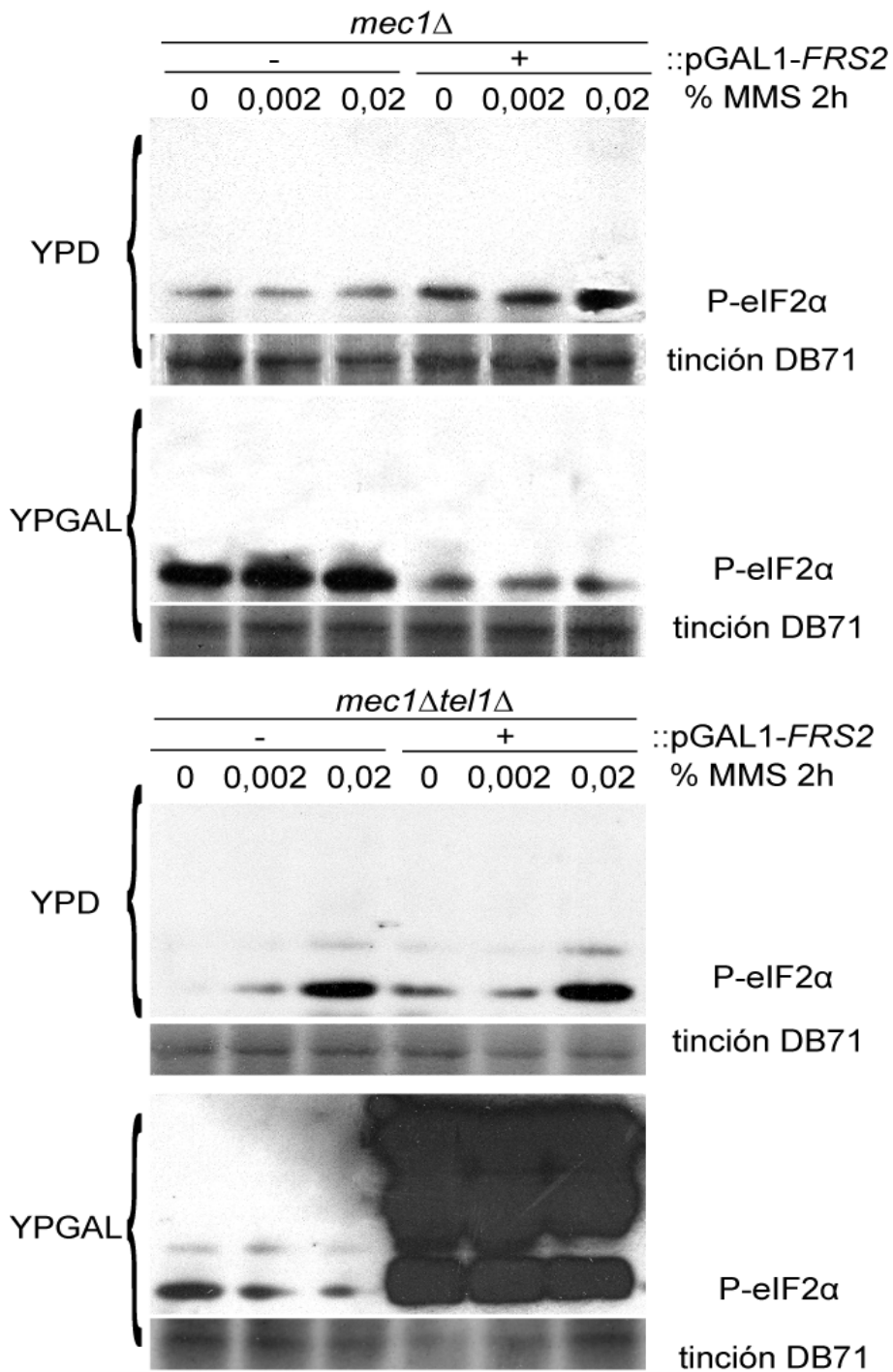


Figura 35: Análisis de nivel de fosforilación en mutantes deficientes en señalización de daño al DNA sobreexpresando *FRS2*.

-: sin transformar y +: transformado con pGAL1-*FRS2*. En la parte superior mostramos el mutante *mec1Δ* crecido en YPD e YPGAL hasta fase exponencial y tratados con 0, 0,002 y 0,02% MMS durante 2h e inmunodetección con anticuerpo P-eIF2α. En la parte inferior mutante *mec1Δtel1Δ* crecido y tratado en las mismas condiciones anteriores. Control de carga de proteínas mediante tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71* mostrando una banda representativa.

Con el objetivo de determinar la naturaleza de las bandas de fosforilación observadas previamente analizamos el nivel de fosforilación de eIF2α en el mutante *gcn2Δ* sobreexpresando *FRS2*. Transformamos el mutante *gcn2Δ* y su cepa silvestre con pGAL1-*FRS2*, analizamos el nivel de fosforilación de eIF2α en estas cepas crecidas en YPD y medio inductor YPGalactosa, realizando distintos tratamientos de MMS. Observamos que en la cepa silvestre BY4741 se produce un incremento de fosforilación de eIF2α con el aumento de dosis de MMS en YPD, sin y con la transformación, siendo mayor la intensidad. En YPGalactosa observamos la fosforilación de eIF2α al sobreexpresar *FRS2* sin variar con la dosis y apareciendo las bandas inespecíficas a 58 y 77 KDa aproximadamente. En el mutante *gcn2Δ* no observamos la fosforilación de eIF2α pero las bandas inespecíficas aparecen cuando se sobreexpresa *FRS2*, pero con menor intensidad mostrando una serie de bandas más pequeñas, un doblete entre 70 y 100 y un triplete entre 50 y 70KDa (Figura 36). Este resultado indica que Frs2p no es sustrato de Gcn2p y las bandas son un efecto inespecífico debido al exceso de proteína.

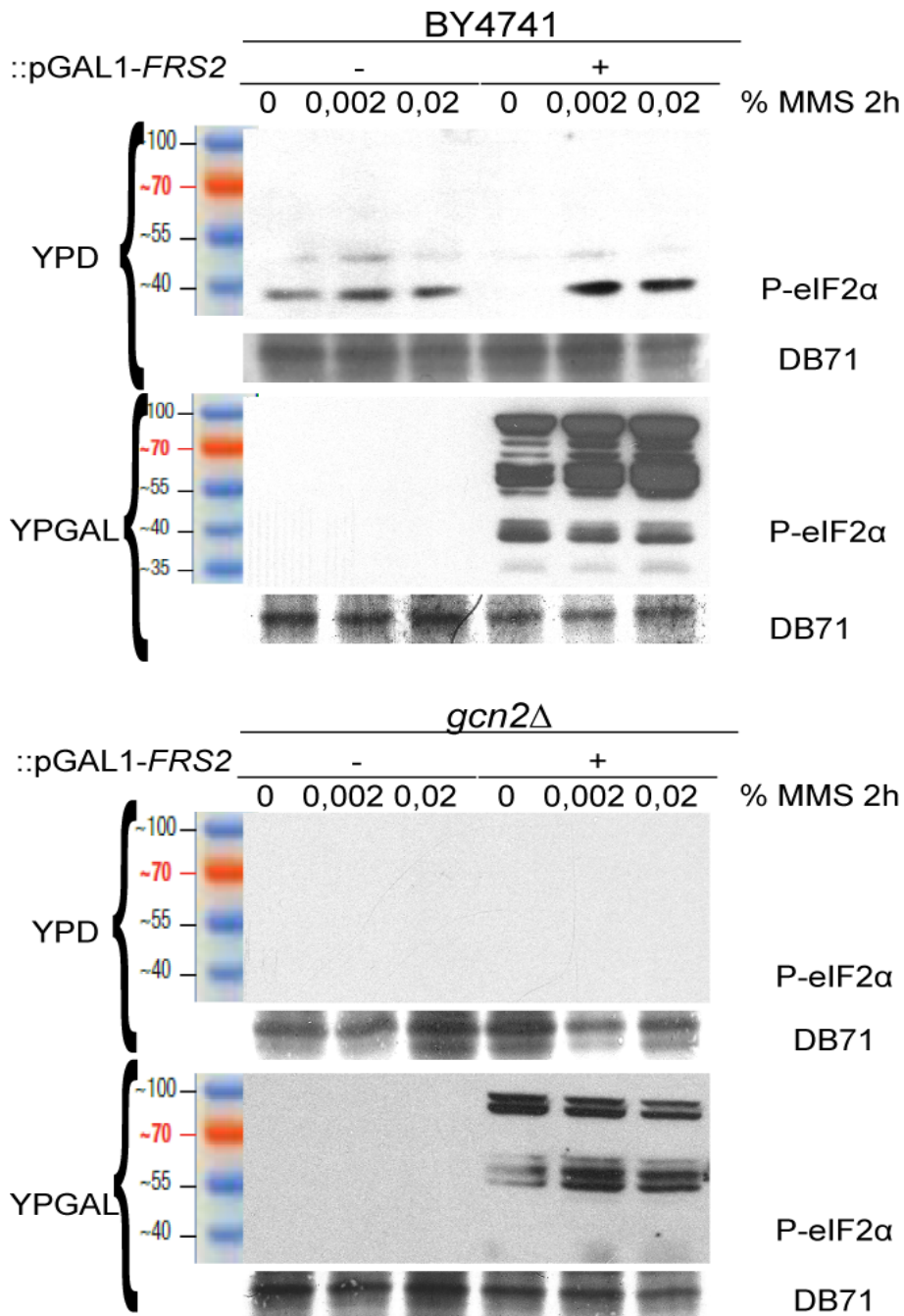


Figura 36: Fosforilación eIF2 α en BY4741 y *gcn2* Δ sobreexpresando *FRS2*. Análisis de nivel de fosforilación de células crecidas en YPD o YPGalactosa en fase exponencial y tratamientos con 0, 0,002 y 0,02% de MMS durante dos horas. -: Cepa sin transformar, +: cepa transformada con pGAL1-*FRS2*. Bajo de cada imagen se muestra el control de carga de proteínas mediante banda representativa de tinción de membrana con colorante *Direct Blue 71*. Parte superior cepa silvestre BY4741 y parte inferior mutante *gcn2* Δ .

DISCUSIÓN

La activación de los mecanismos de señalización y/o reparación del daño en el DNA son fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad genómica en las células. En este capítulo de la tesis se muestra una conexión funcional entre la quinasa Gcn2p y la estabilidad genómica. Los resultados obtenidos indican que Gcn2p es activada en respuesta a estrés genotóxico (Figura 17). Dicha activación depende de la dosis y del tiempo de tratamiento con el agente lesionante del DNA, y muestra una cierta especificidad, ya que no todos los agentes lesionantes la inducen (Figura 18). La caracterización genética de los mutantes de la ruta GCN en respuesta a MMS indica que la activación de Gcn2p se requiere para la supervivencia celular en presencia de MMS (Figura 19B), y Gcn1p, de alguna manera, contribuye en la toxicidad de MMS (Figura 20B). Además, la fosforilación de eIF2 α en respuesta a MMS depende de Gcn2p, Gcn1p y parcialmente a Gcn20p (Figuras 19A-20A-21A). Por otro lado, utilizando un mutante de eIF2 α (*sui2 Δ S51A*) incapaz de ser fosforilado, se ha observado que la fosforilación de eIF2 α no se requiere para la supervivencia celular al tratamiento con MMS y por lo tanto, indica que esta función de Gcn2p es independiente del control traduccional (Figura 25). Se ha analizado la conexión de la respuesta de Gcn2p a MMS con la ruta de señalización y/o reparación de daño al DNA y vemos que la activación de Gcn2p requiere las proteínas Tel1p, Xrs2p (Figura 26) y Mag1p (Figura 28) en respuesta a MMS. Posteriormente quisimos determinar si esta respuesta a MMS esta mediada por el control traduccional mediante el reportero *GCN4-lacZ*. Los resultados obtenidos indican que la fosforilación de eIF2 α no produce una traducción selectiva de Gcn4p en los mutantes del complejo MRX (Figura 27). Sin embargo, la pérdida de Rad51p y Rad52p si produce una respuesta traduccional mediada por Gcn2p, aumentando la traducción selectiva de Gcn4p en comparación a la cepa silvestre (Figura 29). Se ha determinado la implicación de los

tRNA descargados en la activación de Gcn2p en respuesta a MMS, en la cuál hay ciertas aminoacil-tRNA sintetetasas más sensibles a MMS (tablas 6 y 7). La fosforilación de eIF2 α es mayor en el mutante haploinsuficiente de FRS2 (Figura 31 y 32), pero Frs2p no es un sustrato de Gcn2p (Figura 36), como sugería la sobreexpresión (Figuras 33 y 35). Por último, los datos indican un fenotipo de espistasia entre Gcn2p y Tel1p en respuesta a MMS (Figuras 26, 28, 34 y 35).

Existen evidencias previas en nuestro grupo que demostraron que la quinasa Gcn2p también regula el control de transición G1-S en respuesta al daño al DNA en levadura de gemación (Menacho-Marquez *et al.* 2007), y también se ha descrito que GCN2 participa en la parada en G1, cooperativamente con PERK, en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático en mamíferos (Hamanaka *et al.* 2005).

En este capítulo se describe como Gcn2p es inducida por distintas lesiones en el DNA, en concreto: la alquilación de bases nitrogenadas producidas por MMS, depirimidinación del DNA producido por 5-FU, inhibición de la síntesis de ribonucleótidos por HU y oxidación de bases por especies reactivas de oxígeno generadas por β -lapachona. Por lo tanto, existe especificidad por ciertas lesiones, encajando con trabajos publicados en *Schizzosaccharomices pombe*. Uno de ellos, describe el control de transición G1-S dependiente de Gcn2p en respuesta a tratamiento con luz UV-C (Tvegard *et al.* 2007; Bøe *et al.* 2012) y también en respuesta a MMS o peróxido de Hidrógeno (Martín *et al.* 2013), pero no a otros agentes lesionantes como tratamiento PUVA (Psoraleno con luz UV-A o cercana) o a radiación ionizante (Krohn *et al.* 2008). Entonces, ¿Por qué Gcn2p se activa en respuesta a unos genotóxicos y no a otros? Los genotóxicos mencionados que activan Gcn2p tienen en común que dificultan o impiden la replicación normal del DNA y por lo tanto generan estrés replicativo. Esto sugiere una especificidad de la respuesta de Gcn2p a daño en el DNA relacionada con el control en la transición G1-S del ciclo celular y/o la replicación del DNA. Además datos en diversos organismos apoya la naturaleza

fundamental de esta función de “*checkpoint*” de Gcn2p (Tvegard *et al.* 2007).

Existe una activación clara de Gcn2p en respuesta a MMS que depende de las proteínas adaptadoras de tRNA Gcn1p y Gcn20p que unidos a Gcn2p la desplazan al ribosoma. Este resultado sugiere que también depende de tRNA descargado. Sin embargo, su misión no parece ser control traduccional como se ha observado en el análisis genético, ya que no observamos diferencias entre el mutante de eIF2 α y su control en respuesta a MMS. La activación de Gcn2p en respuesta a MMS se da en ausencia de ayuno de nutrientes (Natarajan *et al.* 2001). Por lo tanto, de alguna manera se generan tRNA descargados en respuesta a MMS. Una posibilidad sería la inhibición de aminoacil-tRNA sintetasas como se ha observado en la respuesta de Gcn2p a estrés ácido. El dato de que Gcn2p se requiere para la supervivencia celular a MMS independientemente de la fosforilación de eIF2 α y de Gcn1p, sugiere que Gcn2p puede tener al menos otra diana diferente a eIF2 α , que contribuye a la supervivencia celular. Esta hipótesis se ha propuesto en trabajos previos con *S. pombe* (Grallert and Boye 2007). De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha descrito en mamíferos que la metionil-tRNA sintetasa es fosforilada por Gcn2p tras tratamiento UV liberándose el supresor tumoral AIMP3/p18 (*aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3*) que se transloca al núcleo (Kwon *et al.* 2011). ¿Que posibles candidatos a ser sustratos de gcn2p? el análisis en “*yeast fitness database*” (FitDB) para buscar posibles candidatos mediante la herramienta “*cofitness interaction*” (Hillenmeyer *et al.* 2008; Hillenmeyer *et al.* 2010) sugiere que un posible candidato a efector de Gcn2p podría ser *TGS1*, que tiene función de RNA metiltransferasa y que se ha definido una posible interacción genética con *GCN2* (Costanzo *et al.* 2010), y con *GCN1* (Wilmes *et al.* 2008). Otros posibles efectores son *IPL1*, *TRS31*, *SPC3*, pues entre otros tienen mayor coeficiente de correlación en relación a *GCN2*, aunque habría que corroborarlo experimentalmente.

Alternativamente la fosforilación de eIF2 α podría tener otra función diferente al control traduccional, probablemente relacionado con replicación del DNA y/o estabilidad genómica. Esta posibilidad esta apoyada por el hecho de que el mutante *gcn1 Δ* es tolerante a MMS. Gcn1p recluta a Gcn2p llevándola a la vecindad del ribosoma. ¿Qué proteína es la nueva “Gcn1” de respuesta a daño al DNA?, dicha proteína se uniría a Gcn2p y lo llevaría al lugar donde ejerce esta nueva función., i.e. las lesiones en el DNA genómico. Esta nueva función en relación a la toxicidad de MMS, seria independiente de la fosforilación como se ha demostrado en nuestros resultados. En este sentido, un ejemplo reciente de funciones de Gcn2p independiente del control traduccional implica a la sulfiredoxina Srx1p, crucial para la defensa y la tolerancia a estrés oxidativo y para el incremento de la esperanza de vida replicativa en respuesta a restricción calórica (Molin *et al.* 2011).

En el rastreo de fosforilación de eIF2 α en mutantes de las rutas de señalización y/o reparación observamos una relación de Gcn2p con dos rutas de reparación de roturas de doble banda (DSB), tanto por recombinación homóloga a través del grupo epistático RAD52 y por el complejo MRX. Gcn2p podría participar en la señalización del daño al DNA a través del complejo MRX que recluta a Tel1p, y además podría regular la traducción de algún mRNA necesario para la reparación por recombinación homóloga. Esta función puede depender de la fase de ciclo celular ya que, el control por CDK de la eliminación o reparación de DSB ocurre a través del balance entre NHEJ y HR (Finn *et al.* 2011), En organismos procariotas donde están conservados los factores de iniciación de la traducción, denominándose IF (Kyrpides and Woese 1998), se ha descrito recientemente que la reparación de la inserción de transposones en el DNA de *Escherichia coli* ocurre vía replicación en la cuál está implicada el primosoma PriA y la maquinaria de la recombinación homóloga (Jang *et al.* 2012). En esta función está implicado IF2, homólogo de eIF2, formando parte en los mecanismos de adaptación tras daño en el DNA y reparación de roturas de doble cadena, y por lo tanto, en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Madison *et al.*

2012). Por lo tanto, estos datos en bacteria son consistentes con nuestras observaciones en *S. cerevisiae*.

En el presente capítulo se ha descrito un nuevo papel de las aminoacil-tRNA sintetetas relacionado con la estabilidad genómica, ya que existe inhibición de diversas aminoacil-tRNA sintetetas en respuesta a MMS. Entre estos mutantes haploinsuficientes más sensibles a MMS están enriquecidas las aminoacil-tRNA sintetetas mitocondriales. Esto indica que, de algún modo, la mitocondria se ve afectada por MMS. Por otro lado parece existir una mayor especificidad por las enzimas de clase II, (Tabla 7) éstas son específicas de los aminoácidos: glicina (Gly), alanina (Ala), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr), histidina (His), aspartato (Asp), asparagina (Asn), lisina (Lys) y fenilalanina (Phe), las cuales contienen tres motivos de secuencias típicas altamente conservadas, son dimericas o tetramericas y aminoacilan el grupo hidroxilo en posición 3' terminal del tRNA mensajero apropiado. Esta inhibición por MMS conllevaría la acumulación de tRNA descargados y la activación de Gcn2p, en ausencia de ayuno de nutrientes.

Este mecanismo en el cuál se inhiben las aminoacil-tRNA sintetetas se ha descrito con diversos agentes genotóxicos utilizados como antitumorales, como el caso de la inhibición de isoleucil-tRNA sintetetas (*ILS1*) en respuesta a reveromicina en levadura (Miyamoto *et al.* 2002) o la inhibición de treonil-tRNA sintetetas en respuesta a borrelidina, provocando arresto en fase S y apoptosis, a través de activación de Gcn2p, en células con leucemia linfática aguda (Habibi *et al.* 2012). Estos ejemplos ponen en relevancia que los aminoacil-tRNA sintetetas son buenos candidatos como diana antitumoral dado el papel relevante que tiene Gcn2p en la biología del cáncer. Además en los última década se han descrito la implicación de éstas enzimas en otras funciones celulares diferentes a la canónica y su relación con enfermedades infecciosas entre otras (Park *et al.* 2008; Dewan *et al.* 2013). Así se ha propuesto el desarrollo de nuevas terapias, frente a distintos virus siendo la diana las aminoacil-tRNA sintetetas del organismo hospedador (Dewan *et al.*

2013). Un ejemplo de estas terapias son los llamados “Trojan Horse AARS inhibitors”, que son un nuevo tipo de antibiótico derivados de moléculas naturales que con diversos mecanismos inhiben selectivamente la diana del patógeno (Dewan *et al.* 2013).

Las distintas quinasas de eIF2 en mamíferos pueden ejercer dos papeles opuestos en la biología del tumor, por un lado promover la supervivencia o por otro la inducción de apoptosis. Así una buena estrategia, en algunos casos, es el uso de inhibidores del transporte de nutrientes como un nuevo grupo de agentes antitumorales, debido a que se bloquea la progresión del ciclo celular en fase G1 mediante la activación de Gcn2p (Munn *et al.* 2005). La citotoxicidad de algunos agentes antineoplásicos como doxorubicina, etopósido y vorinostatato requieren la activación total de las quinasas GCN2 y/o PERK para la hiperfosforilación de eIF2 provocando muerte celular (Lou *et al.* 2010; Peidis *et al.* 2010a; Peidis *et al.* 2010b), aunque se desconoce el mecanismo concreto por el cuál aumenta esta toxicidad. En el microambiente de un tumor se produce un bajo flujo sanguíneo que produce agotamiento de nutrientes e hipoxia, que activa a GCN2 y el factor de transcripción ATF4, que regula genes de tolerancia al estrés oxidativo y la toma de nutrientes, claves para la supervivencia de distintos tipos de tumores (Wek *et al.* 2006; Ye *et al.* 2010). Por otro lado, se ha visto que algunos agentes quimioterapéuticos estimulan este microambiente, que parece dependiente del ayuno de asparragina, el cual genera resistencia a la quimioterapia (Richards and Kilberg 2006). Consistente con esto recientemente se ha definido a asparragina como el efector clave de la homeostasis de nutrientes dependiente de ATF4 en tumores (Ye *et al.* 2010). De hecho, la enzima L-asparraginasa, que cataliza la biodegradación de asparragina (Asn) es un agente quimioterapéutico usado en el tratamiento de leucemia linfática aguda infantil (Cooney and Handschumacher 1970; Ertel *et al.* 1979; Richards and Kilberg 2006). Por lo tanto, para mejorar la efectividad de estos genotóxicos se podrían combinar con la

inhibición de algún componente de la ruta GCN2/PERK-ATF4 (Moreno-Torres and Murguia 2011).

Alternativamente, Gcn2p media la inducción de apoptosis en respuesta a algún tratamiento, como se ha observado recientemente en respuesta a salicilato de sodio en fibroblastos embrionarios de ratón (Gentz *et al.* 2013). También se ha descrito que cambios en control traduccional de proteínas mitocondriales, por lo tanto implicadas en el metabolismo energético, son señalizados por la activación de las quinasas AMPK y GCN2 induciendo la autofagia en células de carcinoma colorrectal (Martínez-Reyes *et al.* 2012).

El mecanismo último a través del cual MMS activa Gcn2p aun se desconoce. La subunidad α de la fenilalanil-tRNA sintetasa citosólica, Frs2p parece tener un papel en la activación por MMS, ya que en el mutante haploinsuficiente observamos un mayor nivel de fosforilación de eIF2 α en comparación a la cepa isogénica y el resto de cepas haploinsuficientes en TRS más sensibles a MMS.

En los ensayos con cepas haploinsuficientes y de sobreexpresión no pudimos ensayar la fenilalanil-tRNA sintetasa completa, ya que las cepas de ambas subunidades tienen el mismo marcador imposibilitando obtener el doble mutante. Se podría ensayar bioquímicamente la pérdida de función mediante la utilización del análogo de fenilalanina Ocratoxina A que inhibe la fenilalanil-tRNA sintetasa (Konrad and Roschenthaler 1977; Roth *et al.* 1989). Esta aminoacil-tRNA sintetasa es de las más complejas de todas, y forma un tetrámero de Frs1p y Frs2p para estar activa, por lo tanto, ambas subunidades son necesarias para la actividad catalítica de la enzima. El hecho de que el haploinsuficiente FRS1 no es sensible sugiere que la diana es la subunidad FRS2. ¿Que consecuencias tendría esta inhibición? Por un lado la activación de Gcn2p y por otro lado la parada selectiva de la síntesis de proteínas ricas en fenilalanina. Esta hipótesis se esta explorando en el laboratorio.

La observación de nuevas bandas de fosforilación distintas a eIF2 α al sobreexpresar *FRS2* podía sugerir que Frs2p es un nuevo sustrato de Gcn2p lo cuál podría ser apoyado por el hecho que Gcn2p y Frs2p tienen en común un motivo compartido típico denominado tipo II de las aminoacil-tRNA y biotina sintetasas, este motivo está situado en la región similar a histidil-tRNA sintetasa (HisRS) de Gcn2p (Figura 03). Pero finalmente, al transformar el mutante *gcn2 Δ* con la sobreexpresión de *FRS2* indica que estas bandas de fosforilación no se deben exclusivamente a Gcn2p.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que Frs2p puede ejecutar un rol como mediador clave en la señalización de daño por MMS o pudiendo ser un marcador de pronóstico para terapias con agentes alquilantes. Esta idea no es descabellada ya que se ha identificado la interacción en humanos mediante HPLC-MS, entre FARSA (ortólogo de Frs2p) y la quinasa de eIF2 PKR (también denominada EIF2AK2) (Li *et al.* 2011). Además el producto del gen FARSA se ha demostrado que se expresa selectivamente en tumores, en células en una fase determinada de ciclo y de forma dependiente de la diferenciación por lo tanto, es el primer miembro de la familia de genes para aminoacil-tRNA sintetasa que muestra este tipo de expresión regulada (Sen *et al.* 1997).

El modelo que proponemos para el papel de Gcn2p en respuesta a estrés genotóxico en células de levadura conlleva una activación de Gcn2p en respuesta a la acumulación de tRNA descargados provocado por la inhibición de distintas aminoacil-tRNA-sintetasas por MMS, aunque no sabemos si esta inhibición ocurre por metilación directa o una acción indirecta sobre estas. En esta respuesta parece tener un papel destacado la proteína Frs2p, subunidad α de la fenilalanil-tRNA sintetasa, actuando de algún modo, en la señalización de este daño. La activación de Gcn2p conlleva la consecuente fosforilación de eIF2 α , indicando que funciona como señalización de daño por MMS, pero esta fosforilación no es indispensable para la supervivencia celular. La respuesta a

MMS esta mediada por dos vías distintas implicadas en la reparación de DSB, una a través del complejo MRX y otra del grupo epistático RAD52, en concreto Rad51p. Está señalización de daño media la modulación de las respuestas a daño al DNA, ya que Gcn2p regula el control en la transición G1-S en respuesta al daño al DNA (Hamanaka *et al.* 2005; Menacho-Marquez *et al.* 2007; Tvegard *et al.* 2007; Krohn *et al.* 2008). Gcn2p participa de alguna manera a través de otras proteínas en la reparación de daño, y en otras respuestas celulares a daño en el DNA (Figura 37).

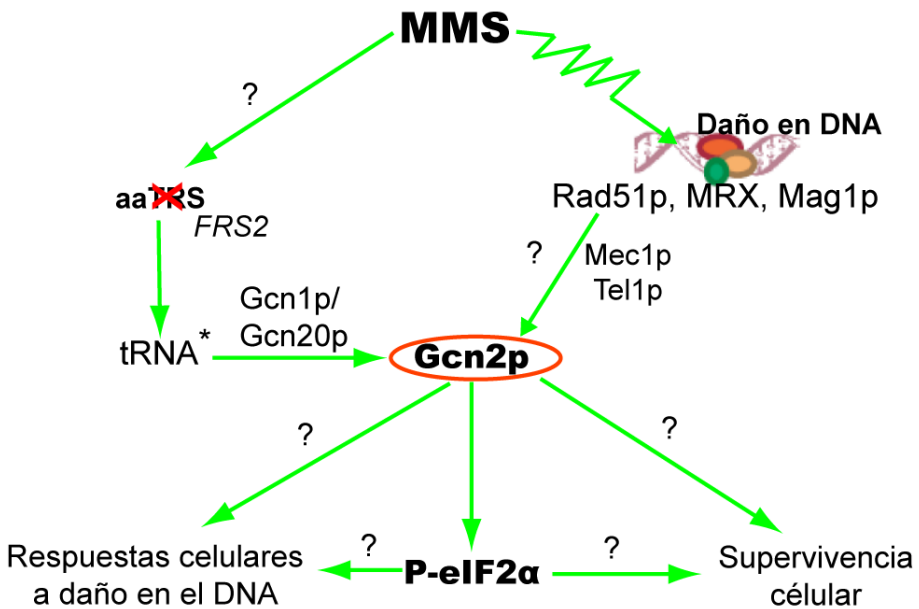


Figura 37: Modelo propuesto del papel de Gcn2p en estrés genotóxico. Abreviaturas usadas: aaTRS= aminoacil-tRNA sintetasa. MRX= complejo Mre11p-Rad50p-Xrs2p. tRNA*= tRNA descargados.

V. CONCLUSIONES.

1°. La sensibilidad de diversos componentes de la ruta GCN a estrés ácido indica que la ruta esta implicada en la respuesta a estrés ácido en cepas auxotrofas para leucina. El gen *GCN2* es necesario para la tolerancia a estrés ácido intracelular.

2°. La expresión de *LEU2* en el mutante *gcn2Δ* auxótrofo para leucina suprime el requerimiento de leucina, indicando que el estrés ácido intracelular inhibe la absorción de leucina por la célula. Por lo tanto, la limitación del crecimiento por acidificación intracelular se debe en parte a la limitación del transporte de leucina.

3°. La acidificación intracelular conferida por ácido acético no conlleva un estrés energético en la célula por lo que el defecto de crecimiento observado se debe a otras causas.

4°. La activación de Gcn2p por estrés ácido intracelular correlaciona con la acumulación de leucil-tRNA descargado en condiciones de estrés ácido. Esta acumulación podría deberse a la inhibición de la actividad la leucil-tRNA sintetasa, ya que los niveles de leucina no se agotan.

5°. Un tercio de los mutantes haploinsuficientes en aminoacil-tRNA sintetatas se ven más afectados por la acidificación intracelular, indicando que se produce una inhibición de estás enzimas pudiendo ser la causa del defecto en crecimiento.

6°. La activación de Gcn2p por estrés ácido induce la fosforilación de eIF2 α que promueve la traducción de una proteína desconocida que está implicada en la activación del transporte de aminoácidos.

7°. Gcn2p es un regulador clave en respuesta a estrés genotóxico, y más específicamente en respuesta a lesionantes del DNA que generan estrés replicativo.

8°. La activación de Gcn2p y consecuente fosforilación de eIF2 α en respuesta al agente alquilante MMS depende de las proteínas Gcn1p y Gcn20p sugiriendo la implicación de la acumulación de tRNA descargados.

9°. La fosforilación de eIF2 α en respuesta a MMS no se requiere para la supervivencia celular, indicando que la supervivencia es independiente del control traduccional.

10°. La activación de la quinasa Gcn2p por MMS es dependiente de las quinasas del control de daño al DNA Tel1p y Xrs2p y la proteína de reparación Mag1p, por lo tanto, Gcn2p está conectado funcionalmente con la maquinaria de control y/o reparación de daño en el DNA.

11°. La conexión funcional de Gcn2p con el grupo epistático RAD52 implicado en reparación de DSB por recombinación homóloga ocurre de modo dependiente del control traduccional. Mientras que la conexión con señalización de daño mediada por el complejo MRX es independiente del mismo.

12°. Diferentes aminoacil-tRNA sintetasas son inhibidas en respuesta a MMS sugiriendo una inhibición en su actividad y la consecuente acumulación de tRNA descargados.

13°. Parece existir una mayor activación de Gcn2p en el mutante de la subunidad alfa de la fenilalanil-tRNA sintetasa (*FRS2*) indicando que de algún modo se ve especialmente afectada por el MMS sugiriendo un rol en la señalización por este daño.

14°. Frs2p no actúa como un nuevo sustrato de Gcn2p en respuesta a MMS, pero sí tiene un papel importante en esta respuesta.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

Abastado, J. P., Miller, P. F., Jackson, B. M. and Hinnebusch, A. G. (1991). "Suppression of ribosomal reinitiation at upstream open reading frames in amino acid-starved cells forms the basis for *GCN4* translational control." Mol. Cell. Biol. **11**(1): 486-496.

Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes & Development **15**(17): 2177-2196.

Alani, E., Thresher, R., Griffith, J. D. and Kolodner, R. D. (1992). "Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein." Journal of Molecular Biology **227**(1): 54-71.

Alcasabas, A. A., Osborn, A. J., Bachant, J., Hu, F., Werler, P. J. H., Bousset, K., Furuya, K., Diffley, J. F. X., Carr, A. M. and Elledge, S. J. (2001). "Mrc1 transduces signals of DNA replication stress to activate Rad53." Nat Cell Biol **3**(11): 958-965.

Amberg, D. C., Burke, D. A. D., Strathern, J. N. and Cold Spring Harbor, L. (2005). Methods in Yeast Genetics 2005 Edition: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ariño, J., Ramos, J. and Sychrová, H. (2010). "Alkali Metal Cation Transport and Homeostasis in Yeasts." Microbiology and Molecular Biology Reviews **74**(1): 95-120.

Assenmacher, N. and Hopfner, K.-P. (2004). "*MRE11/RAD50/NBS1*: complex activities." Chromosoma **113**(4): 157-166.

Bartek, J. and Lukas, J. (2007). "DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation." Current Opinion in Cell Biology **19**(2): 238-245.

Bauer, B. E., Rossington, D., Mollapour, M., Mamnun, Y., Kuchler, K. and Piper, P. W. (2003). "Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong

influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants." European journal of biochemistry / FEBS **270**(15): 3189-3195.

Bøe, C. A., Krohn, M., Rødland, G. E., Capiaghi, C., Maillard, O., Thoma, F., Boye, E. and Grallert, B. (2012). "Induction of a G1-S checkpoint in fission yeast." Proceedings of the National Academy of Sciences **109**(25): 9911-9916.

Boiteux, S. and Guillet, M. (2004). "Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*." DNA Repair **3**(1): 1-12.

Bonilla, C. Y., Melo, J. A. and Toczyski, D. P. (2008). "Colocalization of Sensors Is Sufficient to Activate the DNA Damage Checkpoint in the Absence of Damage." Molecular Cell **30**(3): 267-276.

Branzei, D. and Foiani, M. (2006). "The Rad53 signal transduction pathway: Replication fork stabilization, DNA repair, and adaptation." Experimental Cell Research **312**(14): 2654-2659.

Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S. and Rao, R. (2005). "The yeast endosomal $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking." Molecular biology of the cell **16**(3): 1396-1405.

Broomfield, S., Hryciw, T. and Xiao, W. (2001). "DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Mutation Research/DNA Repair **486**(3): 167-184.

Burke D., Dawson D. and T., S. (2000). "Methods in yeast genetics (A cold Spring Harbor Laboratory course manual)." A cold Spring Harbor , New york, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2000 Edition).

Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. and Chen, D. J. (2001). "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to

DNA Double-strand Breaks." Journal of Biological Chemistry **276**(45): 42462-42467.

Bushman, J. L., Foiani, M., Cigan, A. M., Paddon, C. J. and Hinnebusch, A. G. (1993). "Guanine nucleotide exchange factor for eukaryotic translation initiation factor 2 in *Saccharomyces cerevisiae*: interactions between the essential subunits *GCD2*, *GCD6*, and *GCD7* and the regulatory subunit *GCN3*." Mol. Cell. Biol. **13**(8): 4618-4631.

Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J. L. (1997). Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 131, Springer Berlin Heidelberg. **131**: 1-87.

Caldecott, K. W. (2008). "Single-strand break repair and genetic disease." Nat Rev Genet **9**(8): 619-631.

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). "Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes." Molecular biology of the cell **12**(2): 323-337.

Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2010). "The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives." Molecular Cell **40**(2): 179-204.

Cigan, A. M., Feng, L. and Donahue, T. F. (1988). "tRNAⁱ(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation." Science **242**(4875): 93-7.

Clémenson, C. and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2009). "DNA damage checkpoint inactivation: Adaptation and recovery." DNA Repair **8**(9): 1101-1109.

Clerici, M., Mantiero, D., Guerini, I., Lucchini, G. and Longhese, M. P. (2008). "The Yku70-Yku80 complex contributes to

regulate double-strand break processing and checkpoint activation during the cell cycle." EMBO Rep **9**(8): 810-818.

Cloutier, S., Laverdière, M., Chou, M.-N., Boilard, N., Chow, C. and Papadopoulou, B. (2012). "Translational Control through eIF2alpha Phosphorylation during the *Leishmania* Differentiation Process." PLoS ONE **7**(5): e35085.

Cooney, D. A. and Handschumacher, R. E. (1970). "L-Asparaginase and L-Asparagine Metabolism." Annual Review of Pharmacology **10**(1): 421-440.

Corda, Y., Lee, S. E., Guillot, S., Walther, A., Sollier, J., Arbel-Eden, A., Haber, J. E. and Geli, V. (2005). "Inactivation of Ku-Mediated End Joining Suppresses *mec1Δ* Lethality by Depleting the Ribonucleotide Reductase Inhibitor Sml1 through a Pathway Controlled by Tel1 Kinase and the Mre11 Complex." Mol. Cell. Biol. **25**(23): 10652-10664.

Costa-Mattioli, M., Gobert, D., *et al.* (2007). "eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory." Cell **129**(1): 195-206.

Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E. and Sonenberg, N. (2009). "Translational Control of Long-Lasting Synaptic Plasticity and Memory." Neuron **61**(1): 10-26.

Costanzo, M., Baryshnikova, A., *et al.* (2010). "The Genetic Landscape of a Cell." Science **327**(5964): 425-431.

Crisucci, E. M. and Arndt, K. M. (2012). "Paf1 Restricts Gcn4 Occupancy and Antisense Transcription at the *ARG1* Promoter." Molecular and cellular biology **32**(6): 1150-1163.

Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R. and Thelander, L. (2003). "Survival of DNA Damage in Yeast Directly Depends on Increased dNTP Levels Allowed by Relaxed Feedback Inhibition of Ribonucleotide Reductase." Cell **112**(3): 391-401.

Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C. and Brown, G. W. (2002). "A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(26): 16934-16939.

Chen, J. J., Throop, M. S., Gehrke, L., Kuo, I., Pal, J. K., Brodsky, M. and London, I. M. (1991). "Cloning of the cDNA of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF-2 alpha) kinase of rabbit reticulocytes: homology to yeast *GCN2* protein kinase and human double-stranded-RNA-dependent eIF-2 alpha kinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(17): 7729-33.

Cherkasova, V. A. and Hinnebusch, A. G. (2003). "Translational control by *TOR* and *TAP42* through dephosphorylation of eIF2 α kinase *GCN2*." Genes & Development **17**(7): 859-872.

D'Amours, D. and Jackson, S. P. (2001). "The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation." Genes & Development **15**(17): 2238-2249.

De Angelis, P., Svendsrud, D., Kravik, K. and Stokke, T. (2006). "Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery." Molecular Cancer **5**(1): 20.

De Lorenzo, F. and Ames, B. N. (1970). "Histidine regulation in *Salmonella typhimurium*. VII. Purification and general properties of the histidyl transfer ribonucleic acid synthetase." The Journal of biological chemistry **245**(7): 1710-1716.

Dever, T. E., Dar A.C., Sicheri, F. (2007). The eIF2alpha kinases. Translational Control in Biology and Medicine. M. B. Mathews, Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B. (Ed). Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007: 319-345.

Dever, T. E., Feng, L., Wek, R. C., Cigan, A. M., Donahue, T. F. and Hinnebusch, A. G. (1992). "Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast." Cell **68**(3): 585-596.

Dewan, V., Reader, J. and Forsyth, K. M. (2013). "Role of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Infectious Diseases and Targets for Therapeutic Development." Top Curr Chem.

Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J. and Hinnebusch, A. G. (2000). "Uncharged tRNA Activates GCN2 by Displacing the Protein Kinase Moiety from a Bipartite tRNA-Binding Domain." Molecular Cell **6**(2): 269-279.

Downs, J. A., Lowndes, N. F. and Jackson, S. P. (2000). "A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair." Nature **408**(6815): 1001-1004.

Elstein, K. H., Mole, M. L., Setzer, R. W., Zucker, R. M., Kavlock, R. J., Rogers, J. M. and Lau, C. (1997). "Nucleoside-Mediated Mitigation of 5-Fluorouracil-Induced Toxicity in Synchronized Murine Erythroleukemic Cells." Toxicology and Applied Pharmacology **146**(1): 29-39.

Elledge, S. J. and Davis, R. W. (1988). "A family of versatile centromeric vectors designed for use in the sectoring-shuffle mutagenesis assay in *Saccharomyces cerevisiae*." Gene **70**(2): 303-312.

Epel, D. and Dubé, F. (1987). Intracellular pH and cell proliferation. In Control of Animal Cell Proliferation. A. L. Boynton, H. L. Leffert and eds., Academic Press, New York. **Vol. 2:** pp. 363–393.

Eraso, P. and Gancedo, C. (1987). "Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth." FEBS letters **224**(1): 187-192.

Ertel, I. J., Nesbit, M. E., Hammond, D., Weiner, J. and Sather, H. (1979). "Effective Dose of L-Asparaginase for Induction of

Remission in Previously Treated Children with Acute Lymphocytic Leukemia: A Report from Childrens Cancer Study Group." Cancer Research **39**(10): 3893-3896.

Felle, H. H. (2001). " pH: Signal and Messenger in Plant Cells." Plant Biology **3**(6): 577-591.

Fernandes, A. R., Durao, P. J., Santos, P. M. and Sa-Correia, I. (2003). "Activation and significance of vacuolar H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* adaptation and resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid." Biochem Biophys Res Commun **312**(4): 1317-24.

Finn, K., Lowndes, N. and Grenon, M. (2011). "Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks." Cellular and Molecular Life Sciences: 1-27.

Flores, C. L., Rodriguez, C., Petit, T. and Gancedo, C. (2000). "Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts." FEMS Microbiol Rev **24**(4): 507-29.

Frei, C. and Gasser, S. M. (2000). "The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci." Genes & Development **14**(1): 81-96.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. and Ellenburger, T. (2006). DNA repair and mutagenesis. Washington (D.C.), ASM press.

Gancedo, J. M. (1998). "Yeast Carbon Catabolite Repression." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(2): 334-361.

Garcia-Barrio, M., Dong, J., Ufano, S. and Hinnebusch, A. G. (2000). "Association of *GCN1-GCN20* regulatory complex with the N-terminus of eIF2[alpha] kinase *GCN2* is required for *GCN2* activation." EMBO J **19**(8): 1887-1899.

Gardner, R., Putnam, C. W. and Weinert, T. (1999). "RAD53, DUN1 and PDS1 define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast." EMBO J **18**(11): 3173-3185.

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." Molecular biology of the cell **11**(12): 4241-4257.

Gelperin, D. M., White, M. A., *et al.* (2005). "Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection." Genes & Development **19**(23): 2816-2826.

Gentz, S. H. L., Bertollo, C. M., Souza-Fagundes, E. M. and da Silva, A. M. (2013). "Implication of eIF2 α kinase GCN2 in induction of apoptosis and endoplasmic reticulum stress-responsive genes by sodium salicylate." Journal of Pharmacy and Pharmacology **65**(3): 430-440.

Giaever, G., Chu, A. M., *et al.* (2002). "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome." Nature **418**(6896): 387-391.

Gilbert, C. S., Green, C. M. and Lowndes, N. F. (2001). "Budding Yeast Rad9 Is an ATP-Dependent Rad53 Activating Machine." Molecular Cell **8**(1): 129-136.

Gillies, R. J. (1981). Intracellular pH and proliferation in yeast, Tetrahymena and sea urchin eggs. In Intracellular pH: its measurement, regulation and utilization in intracellular functions R. Nuccitelli, D. W. Deamer and eds.), Alan R. Liss, New York. **15**: 341-59.

Girard, P. M. and Boiteux, S. (1997). "Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Biochimie **79**(9-10): 559-566.

Goossens, A., Dever, T. E., Pascual-Ahuir, A. and Serrano, R. (2001). "The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in

yeast." The Journal of biological chemistry **276**(33): 30753-30760.

Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E. and Babior, B. M. (1996). "Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **93**(2): 654-658.

Grallert, B. t. and Boye, E. (2007). "The Gcn2 Kinase as a Cell Cycle Regulator." Cell Cycle **6**(22): 2768-2772.

Gstaiger, M., Luke, B., Hess, D., Oakeley, E. J., Wirbelauer, C., Blondel, M., Vigneron, M., Peter, M. and Krek, W. (2003). "Control of nutrient-sensitive transcription programs by the unconventional prefoldin URI." Science **302**(5648): 1208-12.

Habibi, D., Ogloff, N., Jalili, R., Yost, A., Weng, A., Ghahary, A. and Ong, C. (2012). "Borrelidin, a small molecule nitrile-containing macrolide inhibitor of threonyl-tRNA synthetase, is a potent inducer of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia." Investigational New Drugs **30**(4): 1361-1370.

Hamanaka, R. B., Bennett, B. S., Cullinan, S. B. and Diehl, J. A. (2005). "*PERK* and *GCN2* contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway." Mol Biol Cell **16**(12): 5493-501.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.

Hao, S., Sharp, J. W., Ross-Inta, C. M., McDaniel, B. J., Anthony, T. G., Wek, R. C., Cavener, D. R., McGrath, B. C., Rudell, J. B., Koehnle, T. J. and Gietzen, D. W. (2005). "Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex." Science **307**(5716): 1776-1778.

Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. and Ron, D. (2000). "Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell

Survival during the Unfolded Protein Response." Molecular Cell **5**(5): 897-904.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Harold, F. M. (1986). The vital force: a study of bioenergetics. W.H. Freeman and Co., New York: 473–522.

He, C. H., Masson, J.-Y. and Ramotar, D. (1996). "A *Saccharomyces cerevisiae* phleomycin-sensitive mutant, phi40, is defective in the *RAD6* DNA repair gene." Canadian Journal of Microbiology **42**(12): 1263-1266.

Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J. and Hecht, S. M. (1989). "On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex." Biochemistry **28**(11): 4629-4638.

Hillenmeyer, M. E., Ericson, E., Davis, R. W., Nislow, C., Koller, D. and Giaever, G. (2010). "Systematic analysis of genome-wide fitness data in yeast reveals novel gene function and drug action." Genome Biol **11**(3): R30.

Hillenmeyer, M. E., Fung, E., *et al.* (2008). "The Chemical Genomic Portrait of Yeast: Uncovering a Phenotype for All Genes." Science **320**(5874): 362-365.

Hinnebusch, A. G. (1997). "Translational Regulation of Yeast *GCN4*." Journal of Biological Chemistry **272**(35): 21661-21664.

Hinnebusch, A. G. (2005). "Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast." Annual Review of Microbiology **59**: 407-450.

Hinnebusch, A. G. and Natarajan, K. (2002). "Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress." Eukaryotic cell **1**(1): 22-32.

Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*, Oxford University Press, USA: 345-351.

Hoffmann, B., Mösch, H.-U., Sattlegger, E., Barthelmess, I. B., Hinnebusch, A. and Braus, G. H. (1999). "The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation." *Molecular microbiology* **31**(3): 807-822.

Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005). "Translational control in stress and apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(4): 318-327.

Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J. and Coote, P. J. (1996). "Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid." *Applied and environmental microbiology* **62**(9): 3158-3164.

Huang, R.-Y., Eddy, M., Vujcic, M. and Kowalski, D. (2005). "Genome-Wide Screen Identifies Genes Whose Inactivation Confer Resistance to Cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cancer Research* **65**(13): 5890-5897.

Hueso, G., Aparicio-Sanchis, R., Montesinos, C., Lorenz, S., Murguía, J. R. and Serrano, R. (2012). "A novel role for protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress." *The Biochemical journal* **441**(1): 255-264.

Icely, P. L., Gros, P., Bergeron, J. J., Devault, A., Afar, D. E. and Bell, J. C. (1991). "TIK, a novel serine/threonine kinase, is recognized by antibodies directed against phosphotyrosine." *Journal of Biological Chemistry* **266**(24): 16073-16077.

Jang, S., Sandler, S. J. and Harshey, R. M. (2012). "Mu Insertions Are Repaired by the Double-Strand Break Repair Pathway of *Escherichia coli*." *PLoS Genet* **8**(4): e1002642.

Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 335-346.

Kawahata, M., Masaki, K., Fujii, T. and Iefuji, H. (2006). "Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p." FEMS yeast research **6**(6): 924-936.

Kimball, S. R., Heinzinger, N. K., Horetsky, R. L. and Jefferson, L. S. (1998). "Identification of Interprotein Interactions between the Subunits of Eukaryotic Initiation Factors eIF2 and eIF2B." Journal of Biological Chemistry **273**(5): 3039-3044.

Kleijn, M., Scheper, G. C., Voorma, H. O. and Thomas, A. A. M. (1998). "Regulation of translation initiation factors by signal transduction." European Journal of Biochemistry **253**(3): 531-544.

Klemm, R. W., Ejsing, C. S., Surma, M. A., Kaiser, H. J., Gerl, M. J., Sampaio, J. L., de Robillard, Q., Ferguson, C., Proszynski, T. J., Shevchenko, A. and Simons, K. (2009). "Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network." The Journal of cell biology **185**(4): 601-612.

Kondo, T., Wakayama, T., Naiki, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2001). "Recruitment of Mec1 and Ddc1 Checkpoint Proteins to Double-Strand Breaks Through Distinct Mechanisms." Science **294**(5543): 867-870.

Konrad, I. and Rosenthaler, R. (1977). "Inhibition of phenylalanine tRNA synthetase from *Bacillus subtilis* by ochratoxin A." FEBS Lett **83**(2): 341-7.

Krebs, H. A., Wiggins, D., Stubbs, M., Sols, A. and Bedoya, F. (1983). "Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate." The Biochemical journal **214**(3): 657-663.

Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Zhang, F., Dever, T. E. and Hinnebusch, A. G. (2001). "Tight Binding of the Phosphorylated {alpha} Subunit of Initiation Factor 2 (eIF2{alpha}) to the Regulatory Subunits of Guanine Nucleotide Exchange Factor eIF2B Is Required for Inhibition of Translation Initiation." Mol. Cell. Biol. **21**(15): 5018-5030.

Krohn, M., Skjølberg, H. C., Soltani, H., Grallert, B. and Boye, E. (2008). "The G1-S checkpoint in fission yeast is not a general DNA damage checkpoint." Journal of Cell Science **121**(24): 4047-4054.

Kubota, H., Obata, T., Ota, K., Sasaki, T. and Ito, T. (2003). "Rapamycin-induced translational derepression of *GCN4* mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2alpha kinase *GCN2*." J. Biol. Chem.: C300133200.

Kubota, H., Ota, K., Sakaki, Y. and Ito, T. (2001). "Budding yeast *GCN1* binds GI domain to activate the eIF2alpha kinase *GCN2*." J. Biol. Chem.: M011793200.

Kwon, N. H., Kang, T., Lee, J. Y., Kim, H. H., Kim, H. R., Hong, J., Oh, Y. S., Han, J. M., Ku, M. J., Lee, S. Y. and Kim, S. (2011). "Dual role of methionyl-tRNA synthetase in the regulation of translation and tumor suppressor activity of aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional protein-3." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(49): 19635-19640.

Kyrpides, N. C. and Woese, C. R. (1998). "Universally conserved translation initiation factors." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(1): 224-228.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pelissier, M.-N., Espagnol, M.-C., Robaglia, C., Deragon, J.-M. and Pelissier, T. (2008).

"*Arabidopsis* eIF2alpha kinase *GCN2* is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding." BMC plant biology **8**(1): 134.

Lambert, R. J. and Stratford, M. (1999). "Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response." Journal of applied microbiology **86**(1): 157-164.

Lee, J. C., Field, D. J. and Lee, L. L. (1980). "Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin." Biochemistry **19**(26): 6209-15.

Li, C. J., Averboukh, L. and Pardee, A. B. (1993). "beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin." Journal of Biological Chemistry **268**(30): 22463-8.

Li, S., Wang, L., Berman, M., Kong, Y.-Y. and Dorf, Martin E. (2011). "Mapping a Dynamic Innate Immunity Protein Interaction Network Regulating Type I Interferon Production." Immunity **35**(3): 426-440.

Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature **362**(6422): 709-715.

Lindahl, T. and Nyberg, B. (1974). "Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid." Biochemistry **13**(16): 3405-3410.

Longhese, M. P., Clerici, M. and Lucchini, G. (2003). "The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **532**(1-2): 41-58.

Lou, J. J. W., Chua, Y. L., Chew, E. H., Gao, J., Bushell, M. and Hagen, T. (2010). "Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) Protein Synthesis by DNA Damage Inducing Agents." PLoS ONE **5**(5): e10522.

Lowndes, N. F. and Murguia, J. R. (2000). "Sensing and responding to DNA damage." Current Opinion in Genetics & Development **10**(1): 17-25.

Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M. T., Barrientos, A. and Côte-Real, M. (2002). "Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular biology of the cell **13**(8): 2598-2606.

Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leao, C. and Côte-Real, M. (2001). "*Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid." Microbiology **147**: 2409-2415.

Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A. S. H. and Helleday, T. (2005). "Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks." Nucleic Acids Research **33**(12): 3799-3811.

Lydall, D. and Weinert, T. (1996). "From DNA damage to cell cycle arrest and suicide: a budding yeast perspective." Current Opinion in Genetics & Development **6**(1): 4-11.

Macpherson, N., Shabala, L., Rooney, H., Jarman, M. G. and Davies, J. M. (2005). "Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts." Microbiology (Reading, England) **151**(Pt 6): 1995-2003.

Madison, K. E., Abdelmeguid, M. R., Jones-Foster, E. N. and Nakai, H. (2012). "A New Role for Translation Initiation Factor 2 in Maintaining Genome Integrity." PLoS Genet **8**(4): e1002648.

Martín, R., Berlanga, J. J. and de Haro, C. (2013). "New roles of the fission yeast eIF2 α kinases Hri1 and Gcn2 in response to nutritional stress." Journal of Cell Science **126**(14): 3010-3020.

Martínez-Reyes, I., Sánchez-Aragó, M. and Cuezva, J. M. (2012). "AMPK and GCN2-ATF4 signal the repression of mitochondria in colon cancer cells." Biochemical Journal **444**(2): 249-259.

Marton, M. J., Vazquez de Aldana, C. R., Qiu, H., Chakraborty, K. and Hinnebusch, A. G. (1997). "Evidence that *GCN1* and *GCN20*, translational regulators of *GCN4*, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase *GCN2*." Molecular and cellular biology **17**(8): 4474-4489.

Mellor, H., Flowers, K. M., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. (1994a). "Cloning and characterization of cDNA encoding rat hemin-sensitive initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase. Evidence for multitissue expression." Journal of Biological Chemistry **269**(14): 10201-10204.

Mellor, H., Flowers, K. M., Kimball, S. R. and Jefferson, L. S. (1994b). "Cloning and characterization of a cDNA encoding rat *PKR*, the double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor-2 kinase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1219**(3): 693-696.

Menacho-Marquez, M. (2007). Mecanismos moleculares involucrados en la citotoxicidad del agente antitumoral beta-lapachona. Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV).

Menacho-Marquez, M., Perez-Valle, J., Ariño, J., Gadea, J. and Murguía, J. R. (2007). "Gcn2p Regulates a G1/S Cell Cycle Checkpoint in Response to DNA Damage." Cell Cycle **6** (18): 2302-2305.

Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N. S. B., Kerr, I. M., Williams, B. R. G. and Hovanessian, A. G. (1990). "Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon." Cell **62**(2): 379-390.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory: 352-355.

Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F. and Sa-Correia, I. (2010a). "Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid." Microb Cell Fact **9**: 79.

Mira, N. P., Teixeira, M. C. and Sa-Correia, I. (2010b). "Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view." Omics **14**(5): 525-40.

Mitra, S. K. and Mehler, A. H. (1967). "The arginyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli*." The Journal of biological chemistry **242**(23): 5490-5494.

Miyamoto, Y., Machida, K., Mizunuma, M., Emoto, Y., Sato, N., Miyahara, K., Hirata, D., Usui, T., Takahashi, H., Osada, H. and Miyakawa, T. (2002). "Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Isoleucyl-tRNA Synthetase as a Target of the G1-specific Inhibitor Reveromycin A." Journal of Biological Chemistry **277**(32): 28810-28814.

Molin, M., Yang, J., Hanzén, S., Toledano, Michel B., Labarre, J. and Nyström, T. (2011). "Life Span Extension and H₂O₂ Resistance Elicited by Caloric Restriction Require the Peroxiredoxin Tsa1 in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular Cell **43**(5): 823-833.

Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schüller, C., Kuchler, K. and Piper, P. W. (2004). "Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative." Yeast (Chichester, England) **21**(11): 927-946.

Mollapour, M. and Piper, P. W. (2007). "Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1

aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid." Molecular and cellular biology **27**(18): 6446-6456.

Moosa, M. Y., Sobel, J. D., Elhalis, H., Du, W. and Akins, R. A. (2004). "Fungicidal activity of fluconazole against *Candida albicans* in a synthetic vagina-simulative medium." Antimicrob Agents Chemother **48**(1): 161-7.

Moreno-Torres, M. and Murguia, J. R. (2011). "Between Scylla and Charibdis: eIF2alpha kinases as targets for cancer chemotherapy." Clin Transl Oncol **13**(7): 442-5.

Morrow, D. M., Tagle, D. A., Shiloh, Y., Collins, F. S. and Hieter, P. (1995). "*TEL1*, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene *MEC1*." Cell **82**(5): 831-40.

Mueller, P. P. and Hinnebusch, A. G. (1986). "Multiple upstream AUG codons mediate translational control of *GCN4*." Cell **45**(2): 201-207.

Mulet, J. M., Leube, M. P., Kron, S. J., Rios, G., Fink, G. R. and Serrano, R. (1999). "A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter." Molecular and cellular biology **19**(5): 3328-3337.

Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. and Mellor, A. L. (2005). "GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase." Immunity **22**(5): 633-642.

Nakada, D., Shimomura, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2003). "The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment." Nucleic Acids Research **31**(6): 1715-1724.

Narasimhan, J., Staschke, K. A. and Wek, R. C. (2004). "Dimerization Is Required for Activation of eIF2 Kinase Gcn2 in

Response to Diverse Environmental Stress Conditions." Journal of Biological Chemistry **279**(22): 22820-22832.

Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G. and Marton, M. J. (2001). "Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast." Molecular and cellular biology **21**(13): 4347-4368.

Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W. and Weinert, T. A. (2002). "Toward Maintaining the Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints." Annual Review of Genetics **36**(1): 617-656.

Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P. and Longhese, M. P. (1998). "Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p." EMBO J **17**(14): 4199-209.

Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C. and Casal, M. (2004). "Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **21**(3): 201-10.

Park, S. G., Schimmel, P. and Kim, S. (2008). "Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(32): 11043-11049.

Parrou, J. L., Teste, M.-A. and François, J. (1997). "Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose." Microbiology **143**(6): 1891-1900.

Pearce, A. K., Booth, I. R. and Brown, A. J. P. (2001). "Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiology **147**(2): 403-410.

Pedersen, S. F. (2006). "The Na⁺/H⁺ exchanger *NHE1* in stress-induced signal transduction: implications for cell proliferation and cell death." Pflugers Archiv : European journal of physiology **452**(3): 249-259.

Peidis, P., Papadakis, A. I., Muaddi, H., Richard, S. and Koromilas, A. E. (2010a). "Doxorubicin bypasses the cytoprotective effects of eIF2alpha phosphorylation and promotes PKR-mediated cell death." Cell Death Differ **18**(1): 145-54.

Peidis, P., Papadakis, A. I., Rajesh, K. and Koromilas, A. E. (2010b). "HDAC pharmacological inhibition promotes cell death through the eIF2alpha kinases PKR and GCN2." Aging (Albany NY) **2**(10): 669-77.

Perona, R. and Serrano, R. (1988). "Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump." Nature **334**: 438-440.

Peters, G. J., Backus, H. H., *et al.* (2002). "Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism." Biochimica et biophysica acta **1587**(2-3): 194-205.

Piper, P., Mahé, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P. and Kuchler, K. (1998). "The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast." EMBO J **17**(15): 4257-4265.

Plys, A. J., Rogacheva, M. V., Greene, E. C. and Alani, E. (2012). "The Unstructured Linker Arms of Mlh1-Pms1 Are Important for Interactions with DNA during Mismatch Repair." Journal of Molecular Biology **422**(2): 192-203.

Popoff, S. C., Spira, A. I., Johnson, A. W. and Demple, B. (1990). "Yeast structural gene (*APN1*) for the major apurinic endonuclease: homology to *Escherichia coli* endonuclease IV."

Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(11): 4193-4197.

Primo-Yúfera, E. (1997). Química de Los Alimentos, Síntesis, Madrid: 426-429.

Proud, C. G. (2005). "eIF2 and the control of cell physiology." Seminars in cell & developmental biology **16**(1): 3-12.

Qiu, H., Dong, J., Hu, C., Francklyn, C. S. and Hinnebusch, A. G. (2001). "The tRNA-binding moiety in *GCN2* contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation." EMBO J **20**(6): 1425-1438.

Ramirez, J. and Peña, A. (2000). ""Intercambiadores catión/protón en levaduras." Rev. Latin.Microbiol **42**: 181-187.

Ramotar, D., Popoff, S. C., Gralla, E. B. and Demple, B. (1991). "Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation." Molecular and cellular biology **11**(9): 4537-4544.

Raven, J. A. and Smith, F. A. (1976). "The evolution of chemiosmotic energy coupling." Journal of theoretical biology **57**(2): 301-312.

Richards, N. G. J. and Kilberg, M. S. (2006). "Asparagine Synthetase Chemotherapy." Annual Review of Biochemistry **75**(1): 629-654.

Rodríguez Hernández, C. J. (2006). Identificación de nuevos mecanismos moleculares del inmunosupresor FK506 en *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV).

Rolfes, R. J. and Hinnebusch, A. G. (1993). "Translation of the yeast transcriptional activator *GCN4* is stimulated by purine

limitation: implications for activation of the protein kinase GCN2." Molecular and cellular biology **13**(8): 5099-111.

Roth, A., Creppy, E. E., Kane, A., Bacha, H., Steyn, P. S., Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1989). "Influence of ochratoxin B on the ochratoxin A inhibition of phenylalanyl-tRNA formation in vitro and protein synthesis in hepatoma tissue culture cells." Toxicol Lett **45**(2-3): 307-13.

Rouse, J. and Jackson, S. P. (2002 a). "Lcd1p Recruits Mec1p to DNA Lesions In Vitro and In Vivo." Molecular Cell **9**(4): 857-869.

Rydberg, B. and Lindahl, T. (1982). "Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction." EMBO J **1**(2): 211-6.

Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M. and Elledge, S. J. (1999). "Control of the DNA Damage Checkpoint by Chk1 and Rad53 Protein Kinases Through Distinct Mechanisms." Science **286**(5442): 1166-1171.

Sanchez, Y., Desany, B. A., Jones, W. J., Liu, Q., Wang, B. and Elledge, S. J. (1996). "Regulation of *RAD53* by the ATM-like kinases *MEC1* and *TEL1* in yeast cell cycle checkpoint pathways." Science (New York, N.Y.) **271**(5247): 357-60.

Santocanale, C. and Diffley, J. F. X. (1998). "A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication." Nature **395**(6702): 615-618.

Sattlegger, E. and Hinnebusch, A. G. (2005). "Polyribosome binding by *GCN1* is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{ α } kinase *GCN2* during amino acid starvation." The Journal of biological chemistry **280**(16): 16514-21.

Schüller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. and Ruis, H. (1994). "The HOG pathway controls osmotic

regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene." The EMBO journal **13**(18): 4382-4389.

Schüller, C., Mamnun, Y. M., Mollapour, M., Krapf, G., Schuster, M., Bauer, B. E., Piper, P. W. and Kuchler, K. (2004). "Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular biology of the cell **15**(2): 706-720.

Sen, S., Zhou, H., Ripmaster, T., Hittelman, W. N., Schimmel, P. and White, R. A. (1997). "Expression of a gene encoding a tRNA synthetase-like protein is enhanced in tumorigenic human myeloid leukemia cells and is cell cycle stage- and differentiation-dependent." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(12): 6164-6169.

Serebriiskii, I. G. and Golemis, E. A. (2000). "Uses of lacZ to study gene function: evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system." Anal Biochem **285**(1): 1-15.

Serrano, R. (1978). "Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular and Cellular Biochemistry **22**(1): 51-63.

Serrano, R. (1989). "Structure and Function of Plasma Membrane ATPase." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **40**(1): 61-94.

Serrano, R. (1991). Transport across Yeast Vacuolar and Plasma Membranes. In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

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

Serrano, R., Gancedo, J. M. and Gancedo, C. (1973). "Assay of Yeast Enzymes in situ. A potential tool in regulation studies." European Journal of Biochemistry **34**(3): 479-482.

Sherman, F. (2002). "Getting started with yeast." Methods in enzymology **350**: 3-41.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W. M., Petrini, J. H., Haber, J. E. and Lichten, M. (2004). "Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break." Current biology : CB **14**(19): 1703-1711.

Siddik, Z. H. (2003). "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance." Oncogene **22**(47): 7265-7279.

Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S.-h. and Zhou, H. (2007). "Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(25): 10364-10369.

Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. (2007). "New Modes of Translational Control in Development, Behavior, and Disease." Molecular Cell **28**(5): 721-729.

Sood, R., Porter, A. C., Olsen, D. A., Cavener, D. R. and Wek, R. C. (2000). "A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha." Genetics **154**(2): 787-801.

Soriano-Carot, M., Bano, M. C. and Igual, J. C. (2012). "The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress." Cell Division **7**(1): 1.

Soutoglou, E. and Misteli, T. (2008). "Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions." Science **320**(5882): 1507-10.

Stark, M. J. R. (2004). Protein phosphorylation and dephosphorylation. In *The Metabolism and Molecular*

Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. J. R. a. Dickinson and M. Schweizer, eds, CRC Press, Boca Raton: pp. 284–375.

Stratford, M. and Anslow, P. A. (1996). "Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids." FEMS Microbiol Lett **142**(1): 53-8.

Szekeres, T., Fritzer-Szekeres, M., Elford, H. L. and Jayaram, H. M. (1997). "The Enzyme Ribonucleotide Reductase: Target for Antitumor and Anti-HIV Therapy." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **34**(6): 503-528.

Takeda, H., Haisa, M., Naomoto, Y., Kawashima, R., Satomoto, K., Yamatuji, T. and Tanaka, N. (1999). "Effect of 5-Fluorouracil on Cell Cycle Regulatory Proteins in Human Colon Cancer Cell Line." Cancer Science **90**(6): 677-684.

Taylor, R. G., Walker, D. C. and McLnnes, R. R. (1993). "*E.coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing." Nucleic Acids Research **21**(7): 1677-1678.

Thomas, K. C., Hynes, S. H. and Ingledew, W. M. (2002). "Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids." Applied and environmental microbiology **68**(4): 1616-1623.

Tvegard, T., Soltani, H. I., Skjolberg, H. C., Krohn, M., Nilssen, E. A., Kearsy, S. E., Grallert, B. and Boye, E. (2007). "A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition." Genes & Development **21**(6): 649-654.

Tzamarias, D., Roussou, I. and Thireos, G. (1989). "Coupling of *GCN4* mRNA translational activation with decreased rates of polypeptide chain initiation." Cell **57**(6): 947-54.

Usui, T., Ogawa, H. and Petrini, J. H. J. (2001). "A DNA Damage Response Pathway Controlled by Tel1 and the Mre11 Complex." Molecular Cell **7**(6): 1255-1266.

Valenzuela, L., Aranda, C. and González, A. (2001). "TOR Modulates GCN4-Dependent Expression of Genes Turned on by Nitrogen Limitation." Journal of bacteriology **183**(7): 2331-2334.

Vallejo, C. G. and Serrano, R. (1989). "Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase." Yeast (Chichester, England) **5**(4): 307-319.

Wadler, S., Horowitz, R., Zhang, H.-Y. and Schwartz, E. L. (1998). "Effects of Perturbations of Pools of Deoxyribonucleoside Triphosphates on Expression of Ribonucleotide Reductase, a G1/S Transition State Enzyme, in p53-Mutated Cells." Biochemical Pharmacology **55**(9): 1353-1360.

Walker, J. M., Hong, H.-Y., Yoo, G.-S. and Choi, J.-K. (2002). Detection of Proteins on Blots Using Direct Blue 71. The Protein Protocols Handbook, Humana Press: 387-392.

Ward, I. M. and Chen, J. (2001). "Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress." Journal of Biological Chemistry **276**(51): 47759-47762.

Warringer, J. and Blomberg, A. (2003). "Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **20**(1): 53-67.

Weitzel, G., Pilatus, U. and Rensing, L. (1987). "The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast." Experimental Cell Research **170**(1): 64-79.

Wek, R. C., Jiang, H. Y. and Anthony, T. G. (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." Biochemical Society transactions **34**(Pt 1): 7-11.

Wek, S. A., Zhu, S. and Wek, R. C. (1995). "The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase

GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids." Molecular and cellular biology **15**(8): 4497-4506.

Wilmes, G. M., Bergkessel, M., *et al.* (2008). "A Genetic Interaction Map of RNA-Processing Factors Reveals Links between Sem1/Dss1-Containing Complexes and mRNA Export and Splicing." Molecular Cell **32**(5): 735-746.

Wilson, D. M., Alderette, J. F., Maloney, P. C. and Wilson, T. H. (1976). "Protonmotive force as the source of energy for adenosine 5'-triphosphate synthesis in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **126**(1): 327-337.

Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., *et al.* (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." Science (New York, N.Y.) **285**(5429): 901-906.

Wu, X. and Wang, Z. (1999). "Relationships between yeast Rad27 and Apn1 in response to apurinic/aprimidinic (AP) sites in DNA." Nucleic Acids Research **27**(4): 956-962.

Wyn Jones, R. G. and Pollard, A. (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. Encyclopaedia of Plant Physiology, Inorganic Plant Nutrition. eds., A. Lauchli and R. L. Bieleski., Springer Verlag, Heidelberg. **15**.

Xiao, W., Chow, B. L., Broomfield, S. and Hanna, M. (2000). "The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 Group Is Composed of an Error-Prone and Two Error-Free Postreplication Repair Pathways." Genetics **155**(4): 1633-1641.

Yang, R., Wek, S. A. and Wek, R. C. (2000). "Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase." Mol. Cell. Biol. **20**(8): 2706-2717.

Yang, W. and Hinnebusch, A. G. (1996). "Identification of a regulatory subcomplex in the guanine nucleotide exchange

factor eIF2B that mediates inhibition by phosphorylated eIF2." Mol. Cell. Biol. **16**(11): 6603-6616.

Ye, J., Kumanova, M., Hart, L. S., Sloane, K., Zhang, H., De Panis, D. N., Bobrovnikova-Marjon, E., Diehl, J. A., Ron, D. and Koumenis, C. (2010). "The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation." EMBO J **29**(12): 2082-2096.

Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J. and Serrano, R. (2005). "pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase." Molecular and cellular biology **25**(19): 8683-8692.

Yenush, L., Mulet, J. M., Ariño, J. and Serrano, R. (2002). "The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression." EMBO J **21**(5): 920-929.

Zaborske, J. M., Narasimhan, J., Jiang, L., Wek, S. A., Dittmar, K. A., Freimoser, F., Pan, T. and Wek, R. C. (2009). "Genome-wide analysis of tRNA charging and activation of the eIF2 kinase Gcn2p." The Journal of biological chemistry **284**(37): 25254-25267.

Zhang, Y., Dickinson, J. R., Paul, M. J. and Halford, N. G. (2003). "Molecular cloning of an arabidopsis homologue of GCN2, a protein kinase involved in co-ordinated response to amino acid starvation." Planta **217**(4): 668-675.

Zhang, Y., Wang, Y., Kanyuka, K., Parry, M. A. J., Powers, S. J. and Halford, N. G. (2008). "GCN2-dependent phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor-2alpha in Arabidopsis." Journal of Experimental Botany **59**(11): 3131-3141.

Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L. and Rothstein, R. (2001). "The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage." EMBO J **20**(13): 3544-3553.

Zhou, B.-B. S. and Elledge, S. J. (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.

Zhou, Z. and Elledge, S. J. (1993). "*DUN1* encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast." Cell **75**(6): 1119-1127.

Referencias electrónicas:

Euroscarf. "Euroscarf." 2013, from <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>.

FitDB. "yeast fitness database." 2013, from <http://fitdb.stanford.edu/>.

Publicaciones:

Relacionada con la tesis:

Hueso, G., Aparicio-Sanchis, R., Montesinos, C., Lorenz, S., Murguía, J. R. and Serrano, R. (2012). "A novel role for protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress." The Biochemical journal **441**(1): 255-264.

Otras:

Agostini, A., Mondragón, L., *et al.* (2012). "Targeted Cargo Delivery in Senescent Cells Using Capped Mesoporous Silica Nanoparticles." Angewandte Chemie International Edition **51**(42): 10556–10560.

Aparicio, F., Aparicio-Sanchis, R., Gadea, J., Sánchez-Navarro, J. Á., Pallás, V. and Murguía, J. R. (2011). "A Plant Virus Movement Protein Regulates the Gcn2p Kinase in Budding Yeast." PLoS ONE **6**(11): e27409.



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

