

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la formación de P-bodies y de la función
de la proteína Pat1 en situaciones de estrés que afectan a la
integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Verónica Pulido Sanz

Directores

Francisco Javier Arroyo Nombela

José Manuel Rodríguez Peña

Raúl García Sánchez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Caracterización de la formación de *P-bodies* y de la función de la proteína Pat1 en situaciones de estrés que afectan a la integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Verónica Pulido Sanz

DIRECTORES

Francisco Javier Arroyo Nombela

José Manuel Rodríguez Peña

Raúl García Sánchez

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- BIO2016-79289-P: “Mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales en el control de la expresión génica dependientes de la ruta de integridad celular en levadura”. (2016-2020). Financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.
- S2017/BMD-3691: “InGEMICS-CM: Ingeniería Microbiana, Salud y Calidad de Vida”. Financiado por la Comunidad Autónoma de Madrid (2018-2019).
- El proyecto de investigación “Genómica Funcional de Levaduras y Hongos” convocatorias GR105/18; GR29/20 y GR17/21. Financiados por la Universidad Complutense de Madrid.

Así como a la concesión a la doctoranda de los siguientes contratos:

- Contrato de Ayudante de Investigación Empleo Joven de la Comunidad de Madrid (PEJ16/MED/AI-1772). (07/04/2017 – 07/04/2019)
- Personal de apoyo a la investigación (PAI) con cargo al proyecto de investigación S2017/BMD-3691. (21/10/2019 -11/04/2021)

A mis padres

*The first and simplest
emotion which we
discover in the human
mind, is curiosity*

Edmund Burke

Agradecimientos

Y como todo tiene su fin, llegó la hora de escribir la última página de la tesis, ese trocito que va dedicado a todas aquellas personas que han hecho posible, de una u otra forma, que esta etapa termine después de casi 5 años. Ha sido una etapa intensa, tanto laboral como personalmente, con días muy buenos y días peores pero el balance final siempre será positivo y eso es gracias a todas las personas que me han acompañado en este gran viaje.

En primer lugar, he de agradecer inmensamente a mis directores Javier y Jose por acogirme en su grupo, por darme la oportunidad de hacer la tesis y cumplir uno de mis sueños. Me faltan palabras para agradecer lo que hacéis por todos nosotros, pero en especial por vuestra comprensión hacía a mí y mi situación personal, gracias por recordarnos día y día que aquí no solo se viene a trabajar, sino también a disfrutar de la ciencia aunque a veces nos llevemos algún que otro disgusto; sin vosotros la familia que es la U4 no sería posible.

Mención aparte se merece mi otro director, Raúl, por estar codo con codo en la poyata conmigo, enseñarme prácticamente todo lo que he aprendido aquí y también a no rendirse con los experimentos y pelear una vez más cuando parece que ya está todo perdido; esas entradas de Pat1 nos han costado pero las hemos conseguido gracias a querer intentarlo una vez más. Eres brillante Raúl y quiero que lo recuerdes siempre, miles de gracias.

A mis compañeras de laboratorio, mi familia de la U4, que han hecho que venir a trabajar cada día fuera un placer. Belén gracias por toda la ayuda que me has prestado siempre que te lo he pedido sin ninguna queja, por darme tu punto de vista tanto en seminarios como en el día a día y por ser la DJ del labo, haciendo que nuestros días sean más alegres. Eres un espejo en el que mirarse tanto laboral como personalmente.

A mi “hermana de tesis” Moni, juntas empezamos este viaje y lo vamos a acabar prácticamente a la vez. He tenido la inmensa suerte de coincidir contigo en esta etapa y me llevo un montón de cosas aprendidas de ti, tu profesionalidad, tus consejos farmacéuticos y de lectura y un montón de imanes de tus viajes, no sabes la ilusión que me hace que te acuerdes de mi prácticamente siempre que te vas de viaje. Sé que te va a ir muy bien en la vida, hagas lo que hagas y espero que seas muy feliz, no mereces menos.

A Yuli, la rusa más española que existe, eres la alegría en persona y es una suerte que aterrizaras en nuestro grupo. Nos trajiste alegría y tienes una forma de trabajar que todos deberíamos copiarte. Tu poyata impoluta ensombrece a las nuestras; nunca estaremos a tu altura Yulita ni en orden y limpieza ni en conjuntar ropa y coche.

A Soni, desde que te fuiste, la U4 no es lo mismo. Fue una suerte trabajar contigo porque siempre estás dispuesta a ayudar y a aprender cosas nuevas. Eras el timón de este barco que se quedó un poco a la deriva sin ti, espero que algún día ocupes ese puesto en el departamento que tanto te mereces.

A Graciela, estás poco por la U4 pero siempre que vienes estás dispuesta a ayudarnos a todos y a resolvernos cualquier problema, hablar contigo siempre me aporta calma.

A las chicas nuevas, Alba, Saray y Laura, con las que he compartido menos ratos que con los demás pero que han sido igual de importantes en estos últimos (y duros) meses. Espero que disfrutéis mucho de esta etapa.

A Lu, mi argentina, estuviste pocos meses en Madrid pero dejaste mucha huella. No pudimos despedirnos como hubiéramos querido pero sé que la vida nos volverá a juntar, aquí o al otro lado del Atlántico.

Al resto de unidades del departamento, gracias por toda la ayuda que me habéis prestado, en forma de kits, células, cristales para el Western-blot o simplemente una palabra de ánimo en el momento adecuado. Ha sido un placer pasar todos estos años aquí y siempre tendré un gran recuerdo de todos vosotros.

A nuestros técnicos y secretarias, que siempre están cuando los necesitamos (a todas horas) y siempre dispuestos a ayudar. A Merche, por toda la compañía que me hiciste cuando estaba sola por el COVID en la U6 y todo lo que te has preocupado por mí siempre; te mereces ser muy feliz.

También han formado parte de esta etapa cuatro personas que llegaron como compañeras y me llevo como amigas, Su, Ioana, Sandra y Jenny, gracias por dejarme disfrutar de vuestra compañía siempre, por nuestros viajes por Europa (todos con algún percance, algunos en forma de osos) y por todo en general. Aunque sin duda una parte esencial de este viaje ha sido Su; desde el primer día hemos compartido prácticamente todo sin estar en la misma unidad, risas, lágrimas y demás dramas varios derivados de realizar un doctorado. Esta etapa sin ti habría sido infinitamente más dura y, por supuesto, mucho más aburrida.

Pero no solo debo agradecer este trabajo a las personas que compartieron mi día a día en el trabajo, también se lo debo a las primeras personas que confiaron en mí y dejaron un juego de pipetas y unos experimentos en mis manos, Víctor, María y Jose del IIB. Hace ya varios años que forme parte de vuestro grupo como estudiante de último año de licenciatura. Gracias por enseñarme todo lo que no enseñan en la carrera. Los tres sois los “culpables” de que ahora esté escribiendo estas líneas y espero que os haga tanta ilusión como me hace a mí que estéis aquí.

A María Frías, eres una estrella, te lo digo mil veces y no me cansaré de repetírtelo; tú mereces un hueco especial aquí por ser de las primeras que creyó en mi desde los primeros años de la carrera y alegrarte siempre de todo lo bueno que me pasa. Gracias por alojarme en tu casa y pasar unos días geniales juntas en los Alpes.

Fuera de la ciencia tengo la inmensa suerte de estar siempre rodeada de personas maravillosas a las que quiero desde que tengo uso de razón; mis amigas de toda la vida, Belén, Carmela, Cris, Patri, Alba y Sonia. Hace tantos años que somos amigas que no me imagino la vida sin vosotras, sois más que amigas, sois mis hermanas. Gracias por intentar entender lo que hago, sin tener mucha idea y por tener siempre las mejores palabras en el momento adecuado.

A mis tatas, que son demasiado pequeñas aún, pero precisamente por eso me alegran la vida a diario.

A mis abuelos, no habéis llegado a ver en que me he convertido pero sé que donde quiera que estéis, estaréis orgullosos de vuestra nieta pequeña.

Y por último y no menos importante, a las personas más importantes de mi vida, a las que debo la vida y a las que va dedicada esta tesis; mis padres. Gracias por creer en mí, por apoyarme en cada decisión que he tomado y por transmitirme el valor del trabajo y del esfuerzo. Todo lo que soy es gracias a vosotros y no tendría vidas para agradecerlos todo lo que hacéis por mí siempre, a cualquier hora del día y en cualquier momento que lo necesito. Os quiero mucho.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS.....	21
LISTADO DE TABLAS.....	24
ABREVIATURAS.....	25
RESUMEN.....	31
SUMMARY	34
INTRODUCCIÓN.....	37
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO MODELO EN INVESTIGACIÓN.	39
1.2. LA PARED CELULAR DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
1.3. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs.	43
1.3.1. La ruta de integridad celular (CWI).	45
1.3.2. Sensores.....	47
1.3.3. Rho1 y Pkc1.	48
1.3.4. Módulo de MAPKs.....	49
1.3.5. Factores de Transcripción de la ruta CWI: Rlm1 y Swi4/6.	50
1.3.6. Control de la expresión génica en condiciones de estrés sobre la pared celular a través de las rutas de MAPKs.	52
1.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
1.4.1. Transcripción.....	54
1.4.2. Regulación de la transcripción en condiciones de estrés sobre la pared celular.....	57
1.4.3. Degradación de mRNA en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
a. Degradación de mRNA vía 5' → 3'.	60
b. Degradación de mRNA vía 3' → 5'.	61
1.5. GRÁNULOS CITOPASMÁTICOS RNA-PROTEÍNA EN LEVADURA.	63
1.5.1. Gránulos de estrés.....	64
1.5.2. <i>P-bodies</i>	65
1.6. LA PROTEÍNA Pat1.	70
1.6.1. Papel de Pat1 en la degradación y traducción de mRNAs.	71
1.6.2. Pat1 y <i>P-bodies</i>	73
ANTECEDENTES.....	75
OBJETIVOS.....	79
MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
4.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	85
4.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
4.1.2. <i>Escherichia coli</i>	87
4.2. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.	88
4.2.1. Determinación del crecimiento.....	88

4.2.2. Cultivo y recogida de células.	88
4.3. PLÁSMIDOS.	90
4.4. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	92
4.4.1. Transformación de bacterias.	94
4.4.2. Transformación de levaduras.	94
4.5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS.	95
4.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido.	95
4.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT.	96
4.6.1. Lisis celular y obtención del extracto proteico total.	96
4.6.2. Electroforesis de proteínas.	97
4.6.3. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.	97
4.6.4. Inmunodetección.	97
4.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.	98
4.7.1. Entrecruzamiento in vivo y recogida de las células.	99
4.7.2. Lisis celular y aislamiento de cromatina.	100
4.7.3. Inmunoprecipitación y purificación del DNA.	100
4.7.4. Cálculo de la tasa de enriquecimiento mediante PCR cuantitativa.	102
4.8. ANÁLISIS TRANSCRIPTACIONAL MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA.	104
4.8.1. Extracción de RNA.	104
4.8.2. Síntesis, marcaje e hibridación de cDNA.	105
4.8.3. Análisis de imágenes, procesamiento de datos y métodos estadísticos.	105
4.9. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.	107
4.10. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.	108
4.11. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.	110
4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	111
RESULTADOS.	113
5.1. EL ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> INDUCE LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i>	115
5.2. PERFIL TEMPORAL DE FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> EN PRESENCIA DE AGENTES QUE INTERFIEREN CON LA INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR.	118
5.3. PARTICIPACIÓN DE RUTAS DE MAPKs EN LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> CONSECUENCIA DEL ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.	119
5.4. LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE Slt2 ES ESENCIAL PARA LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i>	121
5.5. LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA cAMP-PKA BLOQUEA LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.	124
5.6. mRNAs DE GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI LOCALIZAN EN <i>P-BODIES</i> EN SITUACIONES DE ESTRÉS.	126
5.7. ESTUDIO DEL PERFIL TEMPORAL DE FORMACIÓN DE GRÁNULOS DE mRNA DE <i>MLP1</i>	130
5.8. LA SOBREENPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI AUMENTA LA SENSIBILIDAD A ZIMOLIASA Y CASPOFUNGINA EN CEPAS MUTANTES DEFICIENTES EN <i>P-BODIES</i>	131
5.9. RASTREO PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE LEVADURA DEFECTIVAS EN LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> EN SITUACIONES DE DAÑO SOBRE LA PARED CELULAR.	134
5.10. LOS MUTANTES DEFICIENTES EN LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> MUESTRAN ALTERADOS LOS NIVELES DE GRÁNULOS DE mRNA DE <i>MLP1</i>	141

5.11. ESTUDIO DE POSIBLES INTERACCIONES ENTRE Sit2 Y PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA FORMACION DE <i>P-BODIES</i>	142
5.12. PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI.	145
5.13. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI EN CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR EN AUSENCIA DE <i>PAT1</i>	148
5.14. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN GLOBAL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL MUTANTE <i>pat1Δ</i> ... 149	
5.14.1. Análisis del perfil global de expresión génica del mutante <i>pat1Δ</i> en condiciones basales. 150	
5.14.2. Análisis de la respuesta transcripcional a Rojo Congo.	151
5.15. LA AUSENCIA DE <i>PAT1</i> NO AFECTA A LA FOSFORILACIÓN DE LA MAPK Sit2.	154
5.16. LA UNIÓN Y LA PROGRESIÓN DE LA RNA POLIMERASA II EN LOS GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI DEPENDE DE Pat1.	155
5.17. LA ENTRADA DE Rlm1 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI EN CONDICIONES DE ESTRÉS DE PARED DEPENDE DE Pat1.	159
5.18. Pat1 ES NECESARIA PARA EL DESPLAZAMIENTO DE HISTONAS EN LOS PROMOTORES DE LOS GENES REGULADOS EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI.	162
5.19. Pat1 SE RECLUTA A LA REGIÓN CODIFICANTE DE LOS GENES <i>MLP1</i> Y <i>PIR3</i> EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI.	164
5.20. CINÉTICA DE UNIÓN DE Pat1 A LA ZONA CODIFICANTE DE LOS GENES <i>MLP1</i> Y <i>PIR3</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS.	167
5.21. LA UNIÓN DE Pat1 A LA REGIÓN CODIFICANTE DE <i>MLP1</i> Y <i>PIR3</i> DEPENDE DE Sit2.	168
5.22. Sit2 SE ASOCIA A LA ZONA CODIFICANTE DE LOS GENES <i>MLP1</i> Y <i>PIR3</i> DE MANERA Pat1 DEPENDIENTE.	169
5.23. LA PROTEÍNA Pat1 NO INTERACCIONA CON LA RNA POLIMERASA II NI CON Rlm1 EN CONDICIONES DE ESTRÉS DE PARED.	170
DISCUSIÓN	173
6.1. EL ESTRÉS DE PARED INDUCE EL ENSAMBLAJE DE <i>P-BODIES</i> EN <i>S. cerevisiae</i>	175
6.2. EL INCREMENTO EN LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> EN <i>S. cerevisiae</i> DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LA RUTA DE MAPKs DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI).	178
6.3. LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA cAMP/PKA BLOQUEA LA FORMACIÓN DE <i>P-BODIES</i> EN ESTRÉS DE PARED.	180
6.4. mRNAs CWI-DEPENDIENTES LOCALIZAN EN <i>P-BODIES</i>	183
6.5. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DE <i>S. cerevisiae</i> QUE NO FORMAN <i>P-BODIES</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.	185
6.6. Pat1: UN NUEVO ELEMENTO IMPLICADO EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE LA LEVADURA FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.	187
1: Salida de la histona H3 de los promotores:	188
2: Participación de Pat1 en la entrada de Rlm1 y Sit2:	189
3: Unión y progresión de la RNA Pol II en ausencia de PAT1:	190
CONCLUSIONES	195
BIBLIOGRAFÍA	199
ANEXOS	229

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
Figura 1.2: Esquema de las rutas de MAP quinasas en <i>S. cerevisiae</i>	45
Figura 1.3: Esquema de la ruta de integridad celular de <i>S. cerevisiae</i>	46
Figura 1.4: Esquema del proceso de transcripción en levaduras.	56
Figura 1.5: Esquema del proceso de inicio de la transcripción en condiciones de estrés de pared. .	58
Figura 1.6: Esquema de un mRNA maduro.....	59
Figura 1.7: Esquema de la degradación citoplasmática de mRNA en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	62
Figura 1.8: Esquema del “ciclo del mRNA”.	68
Figura 1.9 Esquema de los diferentes dominios de Pat1	72
Figura 4.1: Esquema de los pasos realizados en un experimento de ChIP estándar.	99
Figura 4.2: Esquema general del proceso de síntesis, marcaje de cDNA e hibridación de microarrays mediante la tecnología <i>Affymetrix</i>	106
Figura 5.1: El estrés de pared induce la formación de PBs.	116
Figura 5.2: El estrés de pared no induce la formación de gránulos de estrés.....	117
Figura 5.3: Cinética de formación de PBs tras el tratamiento con RC y ZYM.....	119
Figura 5.4: La ruta CWI controla la formación de PBs en condiciones de estrés sobre la pared celular.	120
Figura 5.5: La actividad catalítica de Sit2 es esencial por la formación de PBs bajo condiciones de estrés de pared	122
Figura 5.6: La inhibición de la actividad catalítica de Sit2 bloquea el ensamblaje de PBs a lo largo del tiempo en condiciones de estrés de pared.....	123
Figura 5.7: Sit2 no interviene en la formación de PBs en estrés osmótico u oxidativo.	124
Figura 5.8: La activación de la ruta PKA inhibe la formación de PBs en condiciones de estrés de pared	126
Figura 5.9: Esquema de la construcción realizada para la visualización al microscopio confocal de fluorescencia de gránulos de mRNA.	127
Figura 5.10: El estrés de pared induce la localización en PBs de mRNAs de genes CWI dependientes.	129
Figura 5.11: La formación de gránulos de mRNA bajo condiciones de estrés de pared está asociada con la formación de PBs:	131
Figura 5.12: La sobreexpresión de <i>MLP1</i> y <i>CRG1</i> en condiciones de estrés de pared afecta al crecimiento de mutantes que no forman PBs.....	133
Figura 5.13: Visualización de Dcp2-GFP mediante microscopía confocal de fluorescencia en los mutantes que no forman PBs en condiciones de estrés de pared.	136
Figura 5.14: La activación de la ruta CWI no está afectada en el grupo de mutantes que no forman PBs en presencia de RC y ZYM.	139
Figura 5.15: La cantidad de Dcp2-GFP no se encuentra comprometida en mutantes que no ensamblan PBs en presencia de RC y ZYM	139
Figura 5.16: Cuantificación de gránulos citoplasmáticos correspondientes a Dhh1-GFP en los mutantes identificados en el rastreo.	140
Figura 5.17: Cuantificación de gránulos de mRNA de <i>MLP1</i> en los mutantes que no forman PBs.	142
Figura 5.18: Estudio de interacciones entre componentes estructurales de PBs y la MAPK Sit2... ..	143
Figura 5.19: Las proteínas identificadas a partir de los mutantes que no forman PBs en estrés de pared no interaccionan con Sit2.....	145

Figura 5.20: Las proteínas Dhh1, Lsm1, Pat1 y Xrn1 son necesarias para la inducción transcripcional de genes regulados por la ruta CWI.....	146
Figura 5.21: La delección de <i>PAT1</i> reduce la expresión de genes regulados por la ruta CWI en presencia de RC.....	149
Figura 5.22: Gráfica de dispersión de los ratios normalizados de expresión génica (RC +/- RC -) en las cepas WT y <i>pat1Δ</i>	151
Figura 5.23: Efecto de la ausencia de Pat1 sobre los niveles de expresión génica en presencia y ausencia de RC.....	153
Figura 5.24: La fosforilación de Sit2 en condiciones de estrés no está afectada en un mutante <i>pat1Δ</i>	155
Figura 5.25: La unión de la RNA Pol II al gen <i>MLP1</i> se encuentra parcialmente afectada en la cepa <i>pat1Δ</i> en condiciones de estrés de pared	157
Figura 5.26: La entrada de la RNA Pol II a la zona promotora y codificante de los genes <i>SRL3</i> y <i>PIR3</i> depende parcialmente de Pat1.	159
Figura 5.27: La ausencia de Pat1 no afecta a la cantidad de Rlm1	160
Figura 5.28: Efecto de la ausencia de Pat1 en la entrada de Rlm1 a los promotores de genes CWI-dependientes.....	162
Figura 5.29 Desplazamiento de la histona H3 en el promotor de los genes regulados por la ruta CWI.	164
Figura 5.30: Pat1 no se recluta a los promotores de los genes regulados por la ruta CWI en condiciones de estrés.....	165
Figura 5.31: La proteína Pat1 es reclutada a la región codificante de los genes <i>MLP1</i> y <i>PIR3</i>	167
Figura 5.32: Cinética de unión de Pat1 a la zona codificante de los genes <i>MLP1</i> y <i>PIR3</i>	168
Figura 5.33: La unión de Pat1 a las regiones codificantes de <i>MLP1</i> y <i>PIR3</i> tras la exposición a RC depende de Sit2.	169
Figura 5.34: La unión de Sit2 al ORF de <i>MLP1</i> y <i>PIR3</i> depende de Pat1 en condiciones de estrés de pared	170
Figura 5.35: Estudio de la interacción entre la RNA Pol II y Rlm1 con Pat1	171
Figura 6.1: Esquema de los dos mecanismos propuestos para explicar el control de la ruta PKA en la formación de PBs en condiciones de estrés de pared	183
Figura 6.2. Esquema global de la regulación transcripcional de los genes dependientes de la ruta CWI en condiciones de estrés de pared.....	191

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1: Relación de componentes de <i>P-bodies</i> presentes en todos los organismos eucariotas...	67
Tabla 1.2: Pat1 en algunos organismos eucariotas	70
Tabla 4.1: Cepas que se han utilizado en este trabajo, incluyendo su genotipo y su procedencia.	86
Tabla 4.2: Plásmidos utilizados en este trabajo	92
Tabla 4.3: Relación de anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western-blot.	98
Tabla 4.4: Relación de anticuerpos utilizados para ChIP en este trabajo.	101
Tabla 4.5: Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de ChIP.	103
Tabla 4.6: Relación de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de expresión génica por PCR cuantitativa.	108
Tabla 5.1: Relación de mutantes en los que la formación de PBs está afectada debido al tratamiento con RC y ZYM.	137
Tabla 5.2: Agrupación funcional de los genes inducidos tras el tratamiento con RC en la cepa silvestre dentro de los grupos definidos según el tipo de dependencia de Pat1.	154
TABLA 1.1S: Genes inducidos basalmente en ausencia de <i>PAT1</i>	231
TABLA 1.2S: Genes reprimidos basalmente en ausencia de <i>PAT1</i>	233
TABLA 2.1S: Genes inducidos en la cepa WT (BY4741) por RC (30 µg/ml) durante 2 horas.	234
TABLA 2.2S: Genes reprimidos en la cepa WT (BY4741) por RC (30 µg/ml) durante 2 horas.	236
TABLA 3.1S: Agrupación de los genes inducidos por RC (30 µg/ml, 2 h) en la cepa silvestre (BY4741) respecto a su dependencia de <i>PAT1</i>	237
TABLA 4.1S: Comparativa de la respuesta transcripcional a RC Pat1-dependiente respecto a la observada en los mutantes <i>swi3Δ</i> , <i>gcn5Δ</i> y <i>rlm1Δ</i>	241

ABREVIATURAS

	µg	Microgramo
	µl	Microlitro
	µm	Micrómetro
	µM	Concentración micromolar
	Δ	Delección
	°C	Grado centígrado
	2,3-DMB-PP1	2,3-dimetilbencil-pirazol-pirimidina
A	ATP	Trifosfato de Adenosina
B	BC	Blanco de Calcoflúor
C	cAMP/PKA	Ruta AMP cíclico-Proteín quinasa A (<i>Cyclic 3',5' Adenosine Monophosphate – Proteína Kinase A</i>)
	CAS	Caspofungina
	Cdna	DNA complementario
	ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina (<i>Chormatin Immuno Precipitation</i>)
	CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
	cRNA	RNA complementario
	CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
	Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
	CTD	Dominio carboxilo terminal (<i>Carboxi-Terminal Domain</i>)
	C-terminal	Carboxi terminal
	CWI	Ruta de integridad celular (<i>Cell Wall Integrity pathway</i>)
D	DF	Factor implicado en degradación de mRNA (<i>Decay Factor</i>)
	D.O	Densidad óptica
	DNA	Ácido desoxirribonucleico
	DTT	Ditiotreitol
E	EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
F	FISH	Hibridación Fluorescente In Situ (<i>Fluorescent In Situ Hybridation</i>)
G	G	Gramo
	G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
	GAL1/10	Promotor inducible por galactosa
	GAP	Proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase Activating Protein</i>)
	GDP	Guanosina difosfato (<i>Guanosine Diphosphate</i>)
	GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>)
	GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
	GST	Glutation S-Transferasa
	GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine Triphosphate</i>)
	GTP	Trifosfato de guanosina
	GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H	H	hora
	HC	Alta concentración (<i>High Concentration</i>)
	HLM	Motivos ricos en helices de leucina (<i>helice leucine-rich motifs</i>)
	HOG	Ruta de alta osmolaridad (<i>High Osmolarity Glycerol</i>)
I	IBFG	Instituto de Biología Genómica y Funcional
	IR	Infrarrojo
K	Kb	Kilo bases
	kDa	Kilo Dalton
L	L	Litro
	LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
	LC	Baja concentración (<i>Low Concentration</i>)
M	M	Concentración molar
	MADS	MCM1-Agr80-Deficiens Serum response factor
	MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos. (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
	MAPKK	MAPK quinasa quinasa
	MAPKKK	MAPK quinasa quinasa quinasa
	Mg	Miligramo
	Min	Minuto

ABREVIATURAS

	ml	Mililitro
	MMS	Metilmetasulfonato
	mM	Concentración milimolar
	mRNA	RNA mensajero
N	N-terminal	Amino terminal
	ng	nanogramo
	nm	Nanómetro
	NPC	Complejo de poro nuclear (Nuclear Pore Complex)
	NP-40	Nonidet-40
O	ORF	Región codificante de un gen (<i>Open Reading Frame</i>)
P	P	Valor estadístico P
	PABPs	Proteínas de unión a la cola de Poli A (<i>PolyA Binding Proteins</i>)
	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
	pb	Pares de bases
	PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
	PBs	P-bodies (<i>Processing bodies</i>)
	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
	PEG	Polietilenglicol
	PIC	Complejo de Pre-iniciación (<i>Pre-Initiation Complex</i>)
	PKA	Proteín quinasa A
	PKC	Proteín quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	PrLD	Dominio ricos en glutamina y/o asparagina similar a priones (<i>Prion-like domain</i>)
	PSA	Persulfato amónico
	P-Slt2	Slt2 fosforilada
Q	qPCR	PCR cuantitativa
R	RC	Rojo Congo
	RNA	Ácido ribonucleico
	RNA pol	RNA Polimerasa (I, II y III)
	RNA Pol II	RNA Polimerasa II
	RNA-seq	Secuenciación de RNA mensajero
	RNPs	Ribonucleoproteínas
	rpm	Revoluciones por minuto
	rRNA	RNA ribosómico
S	s	segundo
	SBF	Complejo heterodimérico formado por Swi4 y Swi6 (<i>Swi Binding Factors</i>)
	SC	Medio de cultivo sintético completo
	SDS	Dodecilsulfato sódico
	Ser	Serina
	SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
	SGs	Gránulos de estrés (<i>Stress granules</i>)
	snoRNA	RNAs reguladores de pequeño tamaño (<i>Small Nucleolar RNA</i>)
T	TAE	Solución Tris-Acetato-EDTA
	TEMED	Tetrametiletilendiamina
	Thr	Treonina
	T-PBS	Solución PBS-Tween-20 al 0,1%
	tRNA	RNA de transferencia
	TSS	Sitio de inicio de la transcripción (<i>Transcription start site</i>)
U	U	Unidad enzimática
	USAL	Universidad de Salamanca
	UV	Ultravioleta
W	WT	Cepa silvestre
Y	YPD	Medio de crecimiento rico de levaduras (<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>)
	YPG	Medio de crecimiento rico de levaduras con galactosa (<i>Yeast extract Peptone Galactose</i>)
Z	ZYM	Zimoliasa

RESUMEN/SUMMARY

Caracterización de la formación de *P-bodies* y de la función de la proteína Pat1 en situaciones de estrés que afectan a la integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Introducción:

La pared fúngica es una estructura dinámica y esencial cuya función es proteger a la célula frente a condiciones medioambientales adversas, garantizando la viabilidad celular. La adaptación de la levadura a situaciones que producen alteraciones sobre la pared celular está regulada principalmente por la ruta de MAPKs de integridad celular (CWI), vía la MAPK Slt2, la cual se activa por fosforilación bajo estas condiciones. Esta activación induce cambios en el programa transcripcional de la célula con el fin de adaptarse al estrés.

En múltiples situaciones de estrés, las células eucariotas, incluidas las levaduras, acumulan agregados citoplasmáticos formados por mRNA y proteínas, como los *Processing-bodies* (PBs). Los PBs se han asociado tanto con degradación de mRNA, ya que en su proteoma abundan elementos pertenecientes a la maquinaria de degradación de mRNA, como con su almacenaje para su posterior traducción. De hecho, se ha descrito el tránsito de mRNAs entre polisomas y PBs, lo que sugiere su participación en la regulación de la expresión génica a través del control de la traducción de mRNAs. Los PBs también se han relacionado con distintas enfermedades humanas poniendo de relevancia su importancia biológica.

En estudios previos del grupo, se identificaron componentes de PBs relacionados con la maquinaria celular de degradación de mRNA (Pat1, Dhh1, Xrn1 y Lsm1) que son necesarios para la óptima expresión de genes regulados por la ruta CWI. Esta observación constituye la base de este trabajo, consistente en estudiar la relación entre la ruta CWI y la formación de PBs en situaciones de estrés sobre la pared y la función de Pat1 en la regulación de la expresión génica en dichas condiciones.

Objetivos y Resultados:

El objetivo principal de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales que influyen en el control de la expresión génica en *S. cerevisiae* en situaciones de estrés sobre la pared.

RESUMEN

Concretamente, se ha estudiado la participación de la ruta CWI en la formación de PBs y gránulos de mRNA y la identificación de elementos esenciales para su ensamblaje en estas condiciones. Además, se ha analizado el papel de Pat1, componente estructural de PBs, en la respuesta transcripcional global de la célula en condiciones de activación de la ruta, su implicación en el reclutamiento de la maquinaria transcripcional a genes CWI-dependientes y su posible papel en elongación.

Mediante microscopia de fluorescencia confocal, se ha estudiado cómo los compuestos Rojo Congo (RC) y zimoliasa (ZYM), que afectan a la integridad de la pared de *S. cerevisiae*, están directamente implicados en el incremento del ensamblaje de PBs, alcanzándose el pico máximo de ensamblaje de PBs tras 1-3 horas de tratamiento, siendo este fenómeno dependiente de la actividad quinasa de Slt2 e independiente de Rlm1 (factor de transcripción de la ruta CWI). Además, empleando métodos de visualización *in vivo* de mRNAs tras el tratamiento con ZYM, hemos demostrado que mRNAs de los genes *MLP1*, *PIR3* y *CRG1*, dependientes de la ruta CWI, colocalizan con PBs y que la sobreexpresión de algunos de estos genes en cepas defectivas en PBs aumenta la sensibilidad a agentes causantes de daño en pared como ZYM o caspofungina.

En cuanto a la participación de otras rutas de señalización en la formación de PBs en estas condiciones, en este trabajo se ha demostrado la conexión entre el estado de fosforilación de la proteína Pat1, dependiente de la actividad de la proteína quinasa A, y el ensamblaje de PBs, siendo estos resultados coincidentes con los descritos previamente para otros tipos de estrés.

Tras establecer la conexión entre la ruta CWI y la formación de PBs, se llevó a cabo un rastreo fenotípico sobre una subcolección de 259 mutantes de *S. cerevisiae* carentes en genes relacionados con actividades quinasa, fosfatasa o conectados funcionalmente, directa o indirectamente, con Slt2, dirigido a la identificación de elementos necesarios para la formación de PBs tras la exposición a RC y ZYM, habiéndose identificado 11 cepas mutantes defectivas en PBs en estas condiciones.

En un segundo bloque de trabajo se ha estudiado la participación de la proteína Pat1, implicada en *decapping* de mRNA, en la respuesta transcripcional global de la célula en respuesta a RC mediante *microarrays* de DNA. Además, se observó que el desplazamiento de la histona H3 y el reclutamiento de Rlm1 y la RNA Polimerasa II a los promotores de genes regulados a través de la ruta CWI es Pat1-dependiente. Por

otro lado, la unión de Pat1 a las regiones codificantes de estos genes de manera Slt2-dependiente, tras el tratamiento con RC, sugiere la participación de Pat1 en el proceso de elongación de la transcripción.

Conclusiones:

Los resultados obtenidos permiten concluir que la exposición de la levadura a compuestos que interfieren con la integridad de la pared celular, RC y ZYM, favorece el ensamblaje de PBs siendo este efecto dependiente de la ruta CWI y más específicamente de la actividad de la MAPK de la ruta, Slt2. Además, los PBs detectados contienen mRNAs de genes CWI-dependientes. Estos resultados sugieren la participación de PBs en situaciones de estrés como centros reguladores del metabolismo del mRNA. Además, se han identificaron nuevos elementos necesarios para el ensamblaje de estas estructuras en presencia de RC y ZYM, aunque no se detectó su interacción con Slt2.

El análisis de la respuesta transcripcional global de la levadura tras la exposición a RC en la cepa *pat1Δ* permitió establecer que aproximadamente el 65% de los genes que se inducen en una cepa silvestre en estas condiciones son Pat1-dependientes, entre los que se encuentran *MLP1*, *PIR3* y *SRL3*. Es importante destacar que la formación del complejo de pre-inicio de la transcripción de genes CWI-dependientes es parcialmente dependiente de Pat1 y, además, Pat1 se une a la zona codificante de estos genes. Todos estos resultados sugieren que Pat1 juega un papel relevante en la respuesta transcripcional adaptativa desencadenada por daños sobre la pared celular de la levadura.

Characterization of P-body assembly and Pat1 protein function in stress situations in which *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity is affected.

Introduction

The fungal cell wall is a dynamic and essential structure whose function is to protect the cell against adverse environmental conditions, ensuring cell viability and survival. The adaptation of yeast to situations that can produce damage to the cell wall is mainly regulated by MAPK Cell Wall Integrity (CWI) pathway, via the MAPK Slt2, which is activated by phosphorylation under these conditions. This activation induces changes in the transcriptional program of the cell to adapt it to stress and survive under adverse conditions.

In multiple stress situations, eukaryotic cells, including yeasts, accumulate cytoplasmic aggregates consisting of mRNA and proteins, such as *Processing-bodies* (PBs). PBs have been associated with mRNA degradation due to elements belonging to the mRNA degradation machinery being abundant in their proteome, and with mRNAs storage sites for subsequent translation. The movement of mRNAs between polysomes and PBs has been described, suggesting their involvement in the regulation of gene expression through the control of mRNA translation. PBs have also been linked to several human diseases, highlighting their biological importance.

In previous work by our research group, it was found that some structural components of PBs related to the cytoplasmatic mRNA degradation machinery (Pat1, Dhh1, Xrn1, and Lsm1) are necessary for the optimal expression of genes regulated by the CWI pathway. This observation is the basis of this work, which consists of studying the relationship between the CWI pathway and the formation of PBs in situations of cell wall stress and the role of Pat1 in the regulation of gene expression under these conditions.

Objectives and Results:

The principal aim of this work has been the study of the transcriptional and post-transcriptional mechanisms that have an important role in the control of gene expression in *S. cerevisiae* under wall stress, studying specifically the involvement of

the CWI pathway in the formation of PBs and mRNA granules and the identification of essential elements for their assembly under these conditions.

In addition, we analyzed the functional role of the protein Pat1, a structural component of PBs, in the transcriptional response under situations that affect the cell wall integrity. Pat1 is involved in the recruitment of the transcription machinery to coding and promoter regions of genes induced under CWI-induced conditions and its possible role in the elongation of the nascent transcripts.

Using confocal fluorescence microscopy, we have studied how the compounds Congo red (CR) and zymolyase (ZYM), which interferes with the integrity of the *S. cerevisiae* cell wall, are directly involved in the increase of PBs assembly, reaching the maximum peak of PBs assembly after 1-3 hours of treatment, being this phenomenon dependent on the kinase activity of Slt2 and independent of Rlm1 (transcription factor of the CWI pathway). Furthermore, using *in vivo* visualization methods of mRNAs after ZYM treatment, we have shown that mRNAs of the CWI pathway-dependent genes *MLP1*, *PIR3* and *CRG1* colocalize with PBs and that overexpression of some of these genes in PB-defective strains increases sensitivity to wall-damaging agents such as ZYM or caspofungin (CAS).

Regarding the involvement of other signaling pathways in the formation of PBs under these conditions, this work has demonstrated the connection between the phosphorylation state of the Pat1 protein, dependent on the activity of protein kinase A, and the assembly of PBs, and these results are similar to previously described for other types of stress.

After establishing the connection between the CWI pathway and PBs formation, a phenotypic screening was carried out on a subcollection of 259 *S. cerevisiae* mutants that are lacking in genes related to kinases, phosphatases, or are functionally connected, directly or indirectly, with Slt2. As a result of this study, we identified 11 essential elements required for PB formation after exposure to CR and ZYM.

The second part of this doctoral thesis has been focused on the participation of the Pat1 protein, involved in mRNA *decapping*, in the global transcriptional response of the cell to CR treatment, using DNA *microarrays*. Furthermore, using chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments, it was observed that histone H3 displacement and recruitment of Rlm1 and RNA Polymerase II to the promoters of genes regulated through the CWI pathway is Pat1-dependent. On the other hand, the binding of Pat1 to the coding regions of these genes occurs in an Slt2-dependent

SUMMARY

manner after CR treatment. This result suggests the involvement of Pat1 in the transcription elongation process.

Conclusions:

The results obtained in this work, allow us to conclude that exposure of yeast to compounds that interfere with the integrity of the cell wall, RC and ZYM, promote the assembly of PBs, this effect being dependent on the CWI pathway and more specifically on the activity of the MAPK Slt2. In addition, the PBs detected contain CWI-dependent gene mRNAs. These results suggest the involvement of PBs in stress situations as regulatory sites of mRNA metabolism. In addition, new elements required for the assembly of PBs in the presence of CR and ZYM have been identified, although their interaction with Slt2 was not detected.

Analysis of the genome-wide transcriptional response after exposure to CR in the *pat1Δ* mutant strain revealed that almost 65% of the genes that are induced in a wild-type strain under these conditions are Pat1-dependent, including *MLP1*, *PIR3*, and *SRL3*. Most importantly, the formation of the transcription pre-initiation complex (PIC) in CWI-dependent genes is partially dependent on Pat1 and Pat1 also binds to the coding region of these genes. All these results suggest that Pat1 plays a relevant role in the adaptive transcriptional response triggered by damage to the yeast cell wall.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO EN INVESTIGACIÓN.

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular que se ha empleado desde la antigüedad para la fabricación de pan y bebidas fermentadas, como cerveza y vino, y que se extiende por una gran variedad de hábitats alrededor de todo el planeta.

El genoma de *S. cerevisiae* consta de 16 cromosomas en los que se encuentran repartidos aproximadamente 6000 genes y fue el primer genoma de un organismo eucariota del que se obtuvo su secuencia completa (Goffeau et al., 1996). El extenso conocimiento que se tiene actualmente sobre su biología y genética ha hecho posible su uso, no sólo en alimentación, sino también en biotecnología con la producción de hormonas recombinantes, vacunas etc. (Kumar & Kumar, 2019).

En investigación, el uso de *S. cerevisiae* como organismo modelo está ampliamente extendido para el estudio de procesos biológicos a nivel celular y molecular, ya que presenta numerosas características que lo convierten en un organismo idóneo como modelo de experimentación. Por ejemplo, su cultivo es sencillo, económico y, en condiciones óptimas, su tiempo de generación, según la cepa es de 90-120 minutos, lo cual facilita su manejo en el laboratorio al poder obtener una gran cantidad de células en un corto espacio de tiempo. Su modificación genética es viable y sencilla, ya que presenta mucha facilidad para la recombinación homóloga haciendo posible la integración a nivel genómico de DNAs exógenos y la eliminación de sus propios genes. Además, dado que puede alternar un ciclo vegetativo haploide y otro diploide mediante reproducción sexual, es posible su uso en estudios de genética mendeliana (Hanson, 2018).

El amplio conocimiento de este microorganismo permite el estudio de la biología de organismos eucariotas superiores debido a la conservación funcional de muchos procesos bioquímicos que se dan en la célula, incluyendo aquellos conservados en mamíferos relacionados con trastornos patológicos como procesos proliferativos (Malumbres & Barbacid, 2009), degenerativos (Verduyck et al., 2016) e infecciosos, además de ser un sistema ideal para el estudio de patologías mitocondriales (Lasserre et al., 2015). Todo ello es posible porque aproximadamente el 31% del genoma de *S. cerevisiae* codifica para proteínas homólogas humanas (Botstein et al., 1997). Además, no está considerado un hongo patógeno, lo que hace fácil y segura

1.INTRODUCCIÓN

su manipulación y su uso para ensayar tratamientos frente a otros hongos que sí lo son (Hughes, 2002).

1.2. LA PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*.

La pared celular de *S. cerevisiae* es una estructura dinámica y esencial que se encarga de proteger a la célula frente a condiciones potencialmente dañinas que puedan aparecer en el medio que la rodea, garantizando así la viabilidad celular.

Esta estructura es una envoltura rígida que se encuentra localizada en la cara externa de la membrana plasmática, en contacto directo con el medio extracelular. Una de sus funciones principales es mantener la presión de turgencia establecida en el interior celular como consecuencia de las diferencias de concentración osmótica que pueden darse con respecto al medio externo, evitando así la lisis celular (Svoboda, 1981; Kliss et al., 2006). De la misma manera, actúa como una barrera permeable que permite la absorción y eliminación de sustancias a través de transportadores transmembrana presentes en ella, facilita la comunicación célula-célula y la protege frente a diferentes tipos de estrés que pudieran dañarla, remodelándose constantemente para adaptarse a las condiciones externas y del ciclo vital de la célula manteniendo en todo momento su morfología (Orlean, 2012). La esencialidad de la pared celular para la viabilidad de la célula, junto con el hecho de que sus componentes y los correspondientes procesos enzimáticos no estén presentes en mamíferos, hace de esta estructura una diana ideal para el desarrollo de nuevos tratamientos antifúngicos (Tada et al., 2013; Gow et al., 2017; Cortés et al., 2019).

La pared celular (Figura 1.1) está formada por una estructura dispuesta en láminas con una capa interna de glucano y quitina y una capa más externa compuesta por manoproteínas. Todos estos componentes se enlazan unos a otros, formando una red que garantiza la funcionalidad de la estructura (Orlean, 2012; Free, 2013)

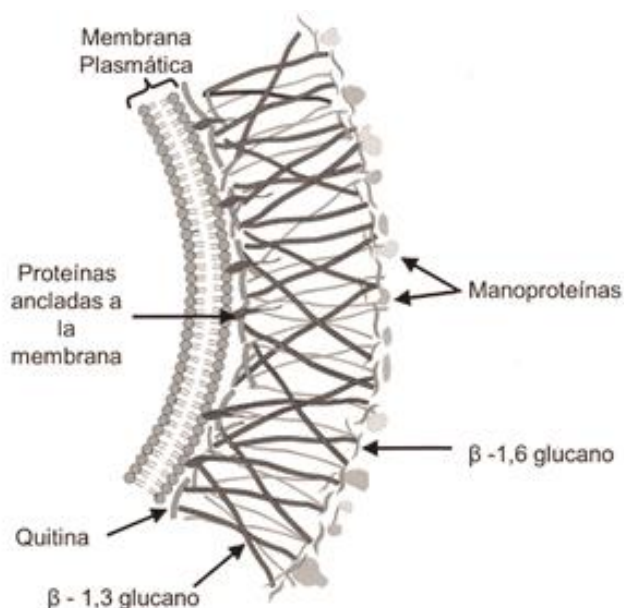


Figura 1.1: Esquema de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de (Selitrennikoff, 2001).

El componente más abundante de la pared es el glucano, representando alrededor del 50-60% de la composición de la misma. Está formado por dos tipos de polímeros diferentes, el β -1,3 glucano y el β -1,6 glucano. Ambos están formados por la asociación de glucosas unidas entre sí mediante enlaces O-glucosídicos β -1,3 o β -1,6 respectivamente. El β -1,3 glucano es sintetizado por el complejo enzimático β -1,3 glucán sintasa, presente en la membrana plasmática, y es el componente mayoritario de la pared. Los polímeros recién sintetizados de β -1,3 glucano salen al espacio periplásmico donde son elongados por la familia de proteínas Gas1 y Bgl2 que se encargan, además, de unir entre sí cadenas de β -1,3 glucano a través de sus extremos reductores, formando entrecruzamientos y dando lugar a una estructura tridimensional ramificada que rodea la célula y que sirve de soporte y de unión para el β -1,6 glucano y la quitina (Mouyna et al., 2000; Aimanianda et al., 2017). La biosíntesis del β -1,6 glucano no está totalmente caracterizada, y aunque parece producirse en la superficie celular, requiere de pasos previos en el citosol, con la participación de proteínas secretadas por el aparato de Golgi (Orlean, 2012; Cabib & Arroyo, 2013). Los enlaces entre los polímeros de β -1,3 glucano y β -1,6 glucano también son catalizados por las proteínas Gas1 y Bgl2. El β -1,6 glucano sirve de andamio para la unión de la quitina y de las manoproteínas (Aimanianda et al., 2017; Cabib & Arroyo, 2013)

1.INTRODUCCIÓN

La quitina es un polímero lineal formado por cadenas de entre 120 y 170 residuos de N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -1,4 (Cabib et al., 1983). Estas cadenas se organizan formando microfibrillas que se localizan en la cara próxima a la membrana plasmática, confiriendo a la pared resistencia frente a la tracción. Como se mencionaba anteriormente, la mayor parte de la quitina está asociada a la fracción de glucano y solo una pequeña fracción aparece libre (Cabib & Durán, 2005; Orlean, 2012). La quitina es sintetizada por las quitín sintetasas Chs1, Chs2 y Chs3 (Cabib et al., 2001). Los enlaces entre el glucano y la quitina son catalizados por la familia de proteínas Crh; Crh1, Crh2 y Crr1 (Rodríguez-Peña et al., 2000; Cabib et al., 2007; Cabib, 2009; Mazáñ et al., 2013; Arroyo et al., 2016).

Las manoproteínas que forman parte de la pared celular incluyen proteínas sin actividad enzimática, como aglutininas y floculinas que intervienen en adhesión (Dranginis et al., 2007) y proteínas con actividad hidrolasa o transglicosilasa que intervienen en la remodelación de la pared (Cabib et al., 2007).

Las situaciones de estrés pueden alterar la estructura y función de la pared conduciendo a la activación de una respuesta celular conocida como “mecanismo compensatorio” (Popolo et al., 2001; Smits et al., 2001), que permite a la célula variar la composición y estructura de la pared adaptándose a cada tipo de estrés específico y así sobrevivir a las nuevas condiciones. Los cambios que se producen en la célula debido a este “mecanismo compensatorio” los podemos resumir en: **(a)** un incremento en el contenido de quitina de la pared celular (Smits et al., 1999.); **(b)** cambios en la asociación entre diferentes polímeros de la pared (Kapteyn et al., 1999); **(c)** un incremento de distintas proteínas de pared celular (de Nobel et al., 2000; Kapteyn et al., 1999; Jung & Levin, 1999) **(d)** una redistribución celular transitoria de la enzima β -1,3 glucán-sintasa, encargada de sintetizar el polímero β -1,3 glucano (Delley & Hall, 1999) y **(e)** una respuesta transcripcional estímulo-específica que incluye diversos genes relacionados con la biogénesis de la pared celular (Lagorce et al., 2003; García et al., 2004; García et al., 2009; García et al., 2017; Sanz et al., 2018)

Muchos de estos fenómenos, especialmente la respuesta transcripcional, se encuentran regulados principalmente por la ruta de MAPKs (del inglés *Mitogen-activated protein kinases*, proteínas quinasas activadas por mitógenos) de integridad celular o CWI (*Cell Wall Integrity* por sus siglas en inglés), aunque, como se describirá más adelante, existen otras rutas de señalización implicadas.

1.3. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs.

Toda célula viva es capaz de detectar cambios en las condiciones ambientales que la rodean, como la presencia de diferentes estímulos físicos o químicos, y responder adecuadamente frente a estas condiciones adversas, permitiendo su adaptación y supervivencia.

Estas respuestas están mediadas en su mayoría a través de rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs. Estas rutas constan de un módulo conservado de proteínas quinasas, a través de las cuales se transmiten de manera secuencial eventos de fosforilación de un elemento del módulo a otro, permitiendo la amplificación de señales iniciada en la superficie celular (Cargnello & Roux, 2011). La familia de las proteínas MAPK está altamente conservada a lo largo del dominio eucariota y son las encargadas de controlar una gran variedad de procesos intracelulares como crecimiento, división, metabolismo, diferenciación y supervivencia (Papa et al., 2019; Sun et al., 2015). La actividad de las MAPKs está finamente regulada en la célula y su desregulación está ligada a patologías como cáncer, enfermedad de Parkinson, inflamación, diabetes e hipertrofia cardíaca (Kim & Choi, 2010; Low & Zhang, 2016; Bohush et al., 2018).

Una vez que el estímulo activa el primer componente de la cascada, la MAPKKK (*MAPK kinase kinase* o *MEKK*) fosforila a la MAPKK (*MAPK kinase* o *MEK*), que a su vez fosforila a la MAPK provocando un cambio conformacional que conduce a su activación. Una vez activada, la MAPK fosforila a diversos elementos, principalmente factores de transcripción, que van a generar una respuesta adecuada. En general, van a modificar la expresión génica, regular el metabolismo, la morfología celular o la progresión a través del ciclo celular, con el objetivo de sobrevivir y contrarrestar ese estímulo potencialmente dañino. Normalmente, la inducción de estas rutas es temporal y está regulada por fosfatasas que reconocen la forma activada, y por tanto fosforilada, de la MAPK, revirtiendo la activación una vez que la célula ha respondido y se ha adaptado al estímulo (Martín et al., 2005; González-Rubio et al., 2019).

Las MAPKKKs contienen un dominio regulador en su extremo N-terminal y un dominio Ser/Thr proteína quinasa en el extremo C-terminal. En condiciones de activación, la MAPKKK fosforila dos residuos de serina o treonina de posiciones

1.INTRODUCCIÓN

conservadas en el *loop* de activación de su diana MAPKK, que posee una actividad proteín quinasa dual específica, capaz de fosforilar a residuos tanto de serina o treonina como de tirosina. Esta MAPKK activada fosforila ambos residuos de treonina y tirosina en el lugar de activación de la MAPK. Esta cascada de fosforilaciones activa a la MAPK causando cambios conformacionales importantes para su actividad. Finalmente, la MAPK fosforila a sus sustratos correspondientes.

En *S. cerevisiae* se han identificado cinco MAPKs (Fus3, Kss1, Hog1, Slt2 y Smk1) (Hunter, 1997; Qi & Elion, 2005; Chen & Thorner, 2007), cada una de las cuales media un tipo de respuesta biológica diferente especializada y dependiente de estímulo (Figura 1.2). Por ejemplo, Fus3 es necesaria para el apareamiento, Kss1 regula el crecimiento invasivo y la integridad celular en respuesta a defectos en la glicosilación de proteínas, Hog1 es la responsable de mediar la respuesta de la célula frente a un aumento de la osmolaridad en el medio extracelular y Slt2 se induce principalmente en respuesta a situaciones que dañan la pared celular y también por otros estreses (hipoosmótico, oxidativo y choque térmico, entre otros). Por último, Smk1 está implicada en el proceso de esporulación. La especificidad de respuesta está controlada a través de proteínas transmembrana que actúan como sensores y que son capaces de activarse en presencia de una señal extracelular y transducir la misma según el tipo de daño, a través de un módulo concreto de MAPKs, hacia los sustratos adecuados, cuya actuación desencadena la respuesta oportuna frente a un estímulo determinado. Algunas de estas rutas comparten elementos como la MAPKKK Ste11, que actúa tanto en condiciones de alta osmolaridad como de escasez de nutrientes fosforilando a MAPKKs diferentes en cada caso (Figura 1.2), y por tanto, deben estar finamente reguladas para que no se produzca señalización cruzada inapropiada (*crosstalk*) entre ellas (Saito, 2010).

1.INTRODUCCIÓN

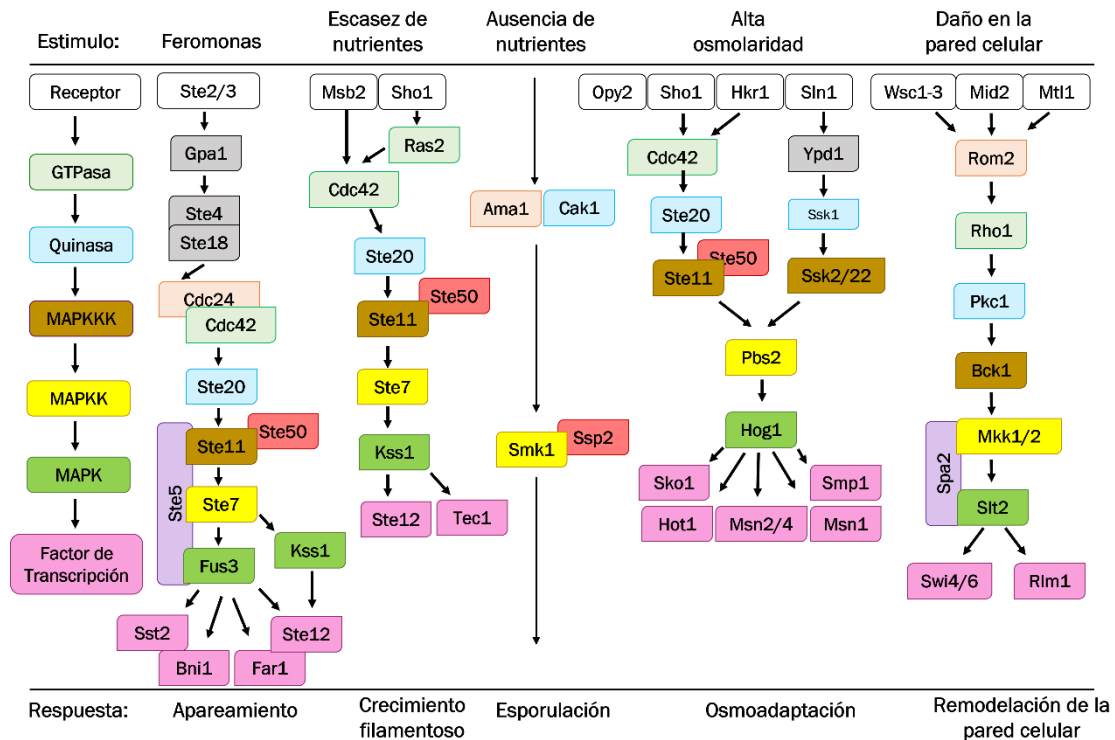


Figura 1.2: Esquema de las rutas de MAP quinasa en *S. cerevisiae*. Se muestran los principales componentes que las integran, así como los estímulos que las activan y las respuestas celulares que originan (Adaptado de Chen & Thorner, 2007).

1.3.1. La ruta de integridad celular (CWI).

La ruta de integridad celular o CWI (*Cell Wall Integrity*) (Figura 1.3) es la ruta principal de MAPKs implicada en el mantenimiento y la estabilidad de la pared celular frente a agresiones que amenazan su estructura, aunque también es requerida durante los diferentes estadios del ciclo vegetativo de la levadura (Levin, 2011). Para detectar alteraciones en la pared celular, esta ruta utiliza una serie de mecanosensores transmembrana característicos, Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1 (Jendretzki et al., 2011). Estos sensores son capaces de reconocer señales producidas en la pared celular y transmitir la misma hacia las proteínas GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) Rom1 y Rom2, que activan a su vez a la proteína G pequeña con actividad GTPasa, Rho1 (Krause et al., 2012). Una vez que Rho1 está activa, es capaz de interactuar con la proteína quinasa C o Pkc1 (Heinisch y Rodicio, 2018), la cual, mediante su capacidad de fosforilación, es la última responsable de activar el módulo de MAPKs. La MAPKKK Bck1 fosforila a las MAPKK Mpkk1 y Mpkk2, que fosforilan y activan finalmente a la MAPK Sit2. Una vez activada, Sit2 actúa sobre los factores de transcripción presentes en el núcleo celular, Rlm1 y

1.INTRODUCCIÓN

Swi4/6, que son los responsables de llevar a cabo cambios importantes en la expresión génica (Levin, 2011; Sanz et al., 2018)

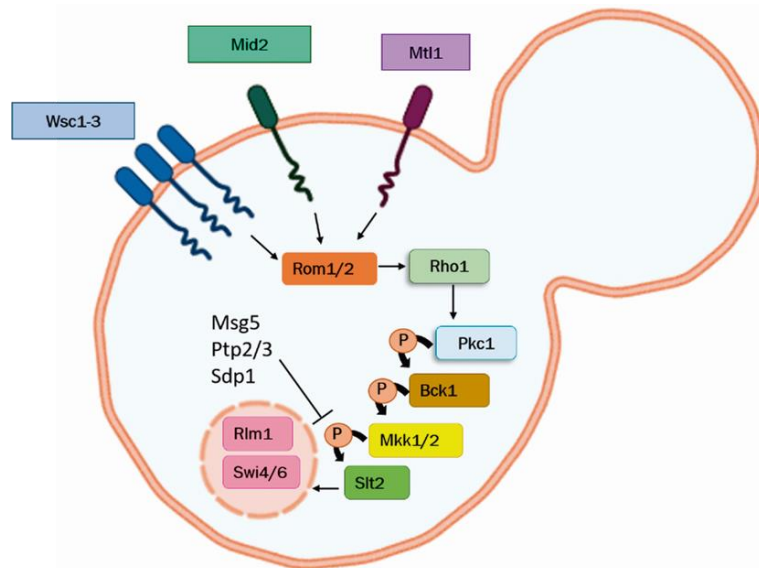


Figura 1.3: Esquema de la ruta de integridad celular de *S. cerevisiae*.

En las últimas décadas, se han descrito diversas condiciones que conducen a la activación de la ruta CWI. Entre ellos, se encuentran tratamientos con agentes que interfieren de manera directa con el correcto ensamblaje de la misma, como el Rojo Congo o el Blanco de Calcoflúor, que son dos colorantes que muestran gran afinidad por la quitina (Ketela et al., 1999; de Nobel et al., 2000; García et al., 2004); la zimoliasa, que consiste en un cóctel enzimático que degrada la pared celular debido principalmente a su actividad β -1,3 glucanasa y quitinasa (Bermejo et al., 2008; García et al., 2009; Rodríguez-Peña et al., 2013); la caspofungina, un antifúngico de la familia de las equinocandinas que actúa inhibiendo a la actividad β -1,3 glucán-sintasa (Reinoso-Martín et al., 2003; García et al., 2017) y, más recientemente, el ácido poácico, que inhibe la síntesis, elongación y entrecruzamiento del β -1,3 glucano (Piotrowski et al., 2015; García et al., 2021). Otras situaciones que pueden dar lugar a células con una pared debilitada, y por tanto a la activación de la ruta, son mutaciones en genes que codifican para enzimas encargadas de la biosíntesis de los polisacáridos de la pared como *FKS1*, *GAS1* y *MNN9*, entre otros (de Nobel et al., 2000; Lagorce et al., 2003; Arias et al., 2011).

Igualmente se ha descrito la activación de la ruta CWI por múltiples estreses que no parecen perturbar específicamente la pared celular, pero sí son capaces de activar la ruta como, por ejemplo el plegamiento defectuoso de proteínas (Babour et

al., 2010; Chen et al., 2005), la exposición de las células a temperaturas elevadas (37°C-39°C) (Kamada et al., 1999.), choque hipoosmótico, (Davenport et al., 1995) tratamiento con feromonas, cafeína o vanadato (Martín et al., 2000), el estrés de retículo endoplasmático (Scrimale et al., 2009), defectos en la O-glicosilación de proteínas (Gentzsch & Tanner, 1996; Arroyo et al., 2011), estrés oxidativo (Alic et al., 2003) y condiciones de pH ácido (Claret et al., 2005) y básico (Serrano et al., 2006), entre otros.

1.3.2. Sensores.

La activación de la ruta CWI está mediada por la detección de señales específicas en la superficie celular por parte de una familia de proteínas transmembrana denominadas sensores (Elhasi & Blomberg, 2019; Lee et al., 2019). Estructuralmente están formados por un dominio pequeño citoplasmático, una región transmembrana y un dominio extracelular rico en residuos Ser/Thr, altamente O-manosilados, lo cual es esencial para la señalización (Lommel et al., 2004). Los sensores que participan en la activación de la ruta CWI son Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1 (Kock et al., 2015). La familia Wsc comparte una región rica en cisteínas en su extremo N-terminal. Mid2 y Mtl1 no poseen esta región, pero en su lugar existe una región rica en asparaginas a través de la cual se produce la N-glicosilación (Rodicio & Heinisch, 2010).

Es importante destacar que la funcionalidad de estos sensores es estímulo-dependiente, es decir, cada sensor transmite la señal independientemente según la naturaleza del estímulo, pudiendo en algunos casos actuar de forma cooperativa. Tanto Wsc1 como Mid2 participan en la respuesta de la célula a estrés térmico (Gray et al., 1997; Verna et al., 1997; Ketela et al., 1999). La activación de la ruta CWI por la exposición a caspofungina, pH alcalino o agentes que provocan defectos en el correcto plegamiento de proteínas depende exclusivamente de Wsc1 (Reinoso-Martín et al., 2003; Bermejo et al., 2008; Serrano et al., 2006; Kwon et al., 2016; Mizuno et al., 2018). Sin embargo, la respuesta a feromonas, Blanco de Calcoflúor, Rojo Congo, estrés hipoosmótico, pH ácido y vanadato es principalmente transmitida por el sensor Mid2 (Errede et al., 1995; de Nobel et al., 2000; Ketela et al., 1999; Martín et al., 2000; Hatakeyama et al., 2017). En cambio, Mtl1 se asocia principalmente con estrés oxidativo (Vilella et al., 2005). De forma sorprendente, en el caso del efecto debido al ácido poácico, no ha sido posible identificar el sensor o

1.INTRODUCCIÓN

sensores implicados (García et al., 2021). En algún caso, y como claro ejemplo del alto grado de complejidad de los procesos de señalización celular, se ha descrito la activación de la ruta CWI a través de sensores de otras rutas. Uno de los ejemplos más estudiados es el de la zimoliasa, donde la señal activadora procede de la proteína Sho1 de la ruta HOG (Bermejo et al., 2008; García et al., 2009; Rodríguez-Peña et al., 2013). Otro ejemplo de cooperación entre las rutas CWI y HOG para paliar el daño ocasionado en la pared celular se encuentra en el caso del estrés mediado por etanol, en el que la señal se transmite a través de los sensores Sho1 y Sln1 de la ruta HOG (Udom et al., 2019).

Aunque el mecanismo molecular preciso mediante el cual estos sensores son capaces de detectar el daño en la pared celular no es completamente conocido, los sensores Wsc1 y Mid2 parecen operar como mecanosensores que detectan cambios en la rigidez de la pared o de la membrana plasmática (Levin, 2005; Dupres et al., 2009; Hutzler et al., 2008; Heinisch et al., 2010; Elhasi & Blomberg, 2019). Como consecuencia del daño, el dominio intracelular del sensor interacciona con las proteínas Rom1/2. Estas proteínas son GEFs (Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, en inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*) de Rho1, es decir, estimulan el intercambio del nucleótido GDP por GTP, activando a la GTPasa Rho1 (Philip & Levin, 2001).

1.3.3. *Rho1* y *Pkc1*.

Rho1 es una proteína esencial que participa en la señalización mediada por la ruta CWI. Está implicada en diferentes procesos celulares como la biogénesis de la pared celular, la organización del citoesqueleto de actina y la secreción polarizada (Cabib et al., 1998; Perez & Rincón, 2010). Rho1 es una GTPasa perteneciente a la familia RHO que oscila entre dos estados: uno activo, unido a GTP y otro inactivo, cuando el GTP es transformado en GDP. Este proceso se encuentra regulado negativamente por proteínas activadoras de GTPasas denominadas GAP (*GTPases Activating Protein*) y positivamente por los factores intercambiadores de guanosina o GEF. Las GAPs implicadas en la regulación de Rho1 son Bem2 y Sac7 (Martín et al., 2000; Schmitz et al., 2002). Por el contrario, Rho1 se activa mayoritariamente a través de las GEFs Rom1 y Rom2 (Ozaki et al., 1996; Krause et al., 2012). Su función en la ruta CWI es activar a la proteína quinasa C codificada por el gen *PKC1* (Nonaka et al., 1995; Heinisch & Rodicio, 2018). Además, Rho1 actúa como una subunidad

reguladora del complejo β -1,3 glucán-sintasa, estimulando la actividad del mismo (Mazur & Baginsky, 1996).

1.3.4. Módulo de MAPKs.

Pkc1 fosforila al primer elemento del módulo de MAPKs, la MAPKKK Bck1, en varios residuos (Ser 939, Thr 1119, Ser 1134) que parecen ser los responsables de su activación, pues determinadas mutaciones en estas regiones producen una activación constitutiva de la proteína, y por tanto, de la ruta (Levin et al., 1994). Bck1 fosforila a las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 (Irie et al., 1993; Kamada et al., 1995; Paravieini & Friedli, 1996). La delección de cualquiera de las dos no impide el funcionamiento de la ruta, sino que es necesaria la delección de ambas (Irie et al., 1993; Jiménez-Sánchez et al., 2007). Estudios más recientes sugieren diferencias funcionales entre las dos, atribuyendo mayor importancia a Mkk1 en la señalización (Martín et al., 2000; Jiménez-Sánchez et al., 2007). Mkk1 y Mkk2 fosforilan y activan a la MAPK Slt2 (Torres et al., 1991). El efecto contrario lo ejercen las proteínas fosfatasa Ptp2 y Ptp3 (Mattison et al., 1999), la fosfatasa de especificidad dual Msg5 (Flández et al., 2004; González-Rubio et al., 2021) y Sdp1, que es específica de Slt2 (Collister et al., 2002). La desfosforilación e inactivación de las MAPKs por proteínas fosfatasas es una de las formas más directas de modular tanto la duración como la intensidad de la respuesta generada por las rutas de MAPKs. De lo contrario, la activación descontrolada de estas rutas podría ser perjudicial para la célula (Martín et al., 2005).

También se ha descrito un papel de retrofosforilación de Slt2 sobre las MAPKKs que actúan por encima de ella, sugiriendo que Slt2 podría tener cierto papel en la retroalimentación de la ruta (Jiménez-Sánchez et al., 2007). En cuanto a su localización, Slt2 se localiza predominantemente en el núcleo y en citoplasma, así como en el septo entre la célula madre e hija (Van Drogen & Peter, 2002).

Uno de los mecanismos que proporcionan especificidad en la señalización de las rutas de MAPKs son las interacciones específicas entre proteínas. Muchas de las proteínas que interaccionan con las MAPKs, como pueden ser activadores, sustratos o fosfatasas, contienen motivos conservados, conocidos como dominios *docking*, que se encuentran fuera de los dominios catalíticos y que median interacciones específicas y de alta afinidad con las MAPKs (Treisman, 1996; Tanoue & Nishida,

1.INTRODUCCIÓN

2002; Bardwell, 1996). Teniendo en cuenta que los dominios *docking* median la interacción de Slt2 con otros componentes de la ruta CWI, como Mkk1, Mkk2 y los factores de transcripción Rlm1 o Swi4, esto indicaría que Slt2 utiliza preferentemente este tipo de interacción para unirse con otras proteínas.

1.3.5. Factores de Transcripción de la ruta CWI: Rlm1 y Swi4/6.

La fosforilación por la MAPK Slt2 regula la activación de los factores de transcripción Rlm1 y SBF, hasta la fecha los dos únicos identificados, responsables de producir cambios importantes en la expresión génica (Madden et al., 1997; García et al., 2004; García et al., 2009; Sanz, et al., 2018).

SBF es un complejo heterodimérico formado por las proteínas Swi4 y Swi6 (Taba et al., 1991; Andrews & Herskowitz, 1989; Breeden & Nasmyth, 1987; Hendler et al., 2018; Lin et al., 2020). Swi4 es la subunidad de unión a DNA de secuencia específica, aunque para esta unión es indispensable Swi6, que es la subunidad reguladora. Este factor de transcripción participa principalmente en la activación de genes durante la transición G1/S en el ciclo celular, como las ciclinas *CLN1*, *CLN2*, *PCL1* y *PCL2* (Iyer et al., 2001; Igual et al., 1996). Existen evidencias de la relación entre el complejo SBF y la ruta de integridad como: **(a)** la sobreexpresión de Swi4 es capaz de suprimir el fenotipo de lisis celular de un mutante *slt2Δ* (Madden et al., 1997); **(b)** los mutantes *swi4Δ* y *swi6Δ* son hipersensibles a Blanco de Calcoflúor poniendo de manifiesto el papel de SBF en la biogénesis de la pared celular (Igual et al., 1996); **(c)** Slt2 se asocia con SBF *in vivo* (Madden et al., 1997) y con Swi4, pero no con Swi6, *in vitro* (Baetz et al., 2001); por último **(d)** Swi6 es fosforilado *in vivo* e *in vitro* por Slt2 en respuesta a estrés sobre la pared celular (Madden et al., 1997). También se ha observado que SBF juega cierto papel en la regulación de genes de respuesta a estrés sobre la pared celular (Kim & Levin, 2010; Kim et al., 2008; Sanz et al., 2012). El complejo SBF regula la activación transcripcional de los genes *FKS2* (Kim et al., 2008), *CHA1*, *YLR042C/NFG1* e *YLR013W/GAT3* (Kim & Levin, 2010), caracterizados por inducirse en situaciones de daño sobre la pared celular independientemente de Rlm1 (García et al., 2004). Estos genes son activados por la MAPK a través de un mecanismo no catalítico. En este caso, la forma no fosforilada de Slt2 y su pseudoquinasa Kdx1/Mlp1, forman un complejo con Swi4 que se asocia a los promotores de los genes diana independientemente de Swi6 (Kim & Levin,

2010; Kim et al., 2008). Sin embargo, el reclutamiento posterior de Swi6 es necesario para la activación de la transcripción.

El factor de transcripción Rlm1 es el encargado de controlar la expresión de la mayoría de los genes inducidos en situaciones de estrés sobre la pared celular. El gen *RLM1* fue identificado en un *screening* genético dirigido a la identificación de mutantes que eran resistentes a la inhibición del crecimiento causada al sobreexpresar el alelo hiperactivo *MKK1*^{S386P} (Watanabe et al., 1995). Este cambio de serina a prolina en la posición 386 de Mkk1 induce la activación constitutiva de la ruta CWI, incluso en ausencia de elementos que se encuentran situados por encima de la MAPKK en la ruta (Watanabe et al., 1995). El factor de transcripción codificado por el gen *RLM1* pertenece a la familia de las proteínas MADS (*Mcm1-Arg80-Deficiens-serum response factor*) compartiendo similitud con la subfamilia MEF2 en mamíferos. Las proteínas que pertenecen a esta familia presentan una región en el extremo N-terminal de aproximadamente 80 aminoácidos homóloga a dominios de unión a DNA y dimerización. Esta región, denominada dominio MADS o *MADS-box*, presenta los 16 primeros aminoácidos conservados en todas estas proteínas, siendo mayoritariamente residuos básicos y polares. La región básica tiene dos segmentos teóricos de α -hélices (Watanabe et al., 1995). En un principio, el dominio de unión a DNA del factor de transcripción Rlm1 se definió como CTAWWWWTAG, siendo W adenina o timina (Dodou & Treisman, 1997). Este dominio posteriormente se redefinió como TAWWWWTAG (Boorsma et al., 2004). Rlm1 es un sustrato de Slt2 *in vitro* y muestra *in vivo*, bajo condiciones de estrés mediado por cafeína, temperatura y daño sobre la pared, una fosforilación dependiente de Slt2 (Watanabe et al., 1997; Marín et al., 2009; Alonso-Rodríguez et al., 2016). La localización de Rlm1 es nuclear y es independiente de la presencia o no de estrés sobre la pared (Jung et al., 2002). La fosforilación de los residuos Ser27 y Thr439, así como de otros residuos adicionales, parecen ser los responsables de la activación de Rlm1 en respuesta a daños sobre la pared celular (Jung et al., 2002; Sanz et al., 2018). Entre los genes regulados por Rlm1 destaca el que codifica para la glucán sintasa *FKS1*, los genes implicados en la síntesis de quitina *GFA1* y *CHS3*, *CRH1* que codifica para la transglicosilasa responsable del entrecruzamiento quitina-glucano y genes de la ruta CWI como *SLT2*, *MLP1* y el propio *RLM1* (Sanz et al., 2016).

Paradójicamente, y a diferencia de lo que ocurre en mutantes deficientes en elementos de la ruta de integridad, la delección del gen *RLM1* no produce fenotipos

1.INTRODUCCIÓN

de sensibilidad a estímulos que afectan a la pared, excepto a cafeína (Watanabe et al., 1995). Sin embargo, la ausencia de Slt2 sí que produce fenotipos extremos en estas condiciones, sugiriendo que Slt2 puede tener dianas adicionales.

1.3.6. Control de la expresión génica en condiciones de estrés sobre la pared celular a través de las rutas de MAPKs.

Las situaciones que alteran la integridad de la pared celular activan el llamado “mecanismo compensatorio” (Popolo et al., 2001; Smits et al., 2001), cuyo principal resultado es el cambio en el programa transcripcional de la célula para su adaptación y supervivencia ante las nuevas condiciones. La adaptación de la levadura al estrés sobre la pared celular esta principalmente regulada por la ruta CWI. Como ya se ha comentado anteriormente, la activación de esta ruta produce la hiperfosforilación de Slt2, que activa a Rlm1, último responsable de desencadenar una respuesta transcripcional. Hay que tener en cuenta que, a diferencia de otras respuestas celulares a estrés, en las que la reacción al daño se produce de manera rápida, el tiempo de adaptación de la célula a daños en la pared celular es muy diferente, pues la ruta CWI se activa más lentamente, aunque de forma más prolongada en el tiempo. Slt2 se fosforila aproximadamente a los 15 minutos, alcanzando un valor máximo en torno a las 1-2 horas de exposición al estrés. Esta fosforilación se puede seguir detectando incluso después de 6 horas en la mayoría de los casos (García et al., 2004; de Nobel et al., 2000; Bermejo et al., 2008). Esta cinética indica la existencia de una larga respuesta transitoria para un grupo de genes, incluyendo aquellos relacionados con transducción de señales y construcción/remodelado de la pared, entre otros.

La utilización de técnicas de análisis genómico como los *microarrays* de DNA o *RNA-seq* ha sido fundamental para obtener los perfiles de expresión génica en múltiples situaciones experimentales, permitiendo la realización de estudios comparativos mediante diversas herramientas bioinformáticas. De esta manera, se han analizado los perfiles transcripcionales globales en respuesta a condiciones de estrés térmico (Jung & Levin, 1999), a varios compuestos que interfieren con la pared celular mediante diferentes mecanismos de acción como el Rojo Congo (García et al., 2004), la zimoliasa (García et al., 2009), la caspofungina (Reinoso-Martín et al., 2003; Agarwal et al., 2003; García et al., 2017), el ácido poácico (García et al., 2021)

o por compuestos que inhiben la O-manosilación de manoproteínas (Arroyo et al., 2011). Además, mutaciones en los genes importantes para la biogénesis de la pared celular como *FKS1*, *GAS1* y *MNN9* entre otros, dan lugar a células con una pared debilitada, a una activación basal de la ruta CWI y a una respuesta transcripcional característica (de Nobel et al., 2000; Lagorce et al., 2003). La comparación de los perfiles transcripcionales inducidos en estas condiciones indica que, aunque existen respuestas específicas, también se observan grupos comunes inducidos en múltiples condiciones, principalmente relacionadas funcionalmente con biogénesis de la pared, metabolismo y generación de energía, morfogénesis, transducción de señales y estrés en general. El análisis de los sitios de unión para diferentes factores de transcripción en los promotores de genes inducidos en respuesta al estrés de pared, indica que la mayor parte de ellos presentan motivos de unión para Rlm1, dato coherente con que la mayoría de la inducción transcripcional es dependiente de este factor de transcripción, así como de la MAPK Slt2 (Sanz et al., 2018).

Un mayor nivel de complejidad se ha descrito en la respuesta transcripcional consecuencia de tratamientos que implican la participación de otras rutas de señalización, además de la CWI. Así, en el caso del daño en pared causado por zimoliasa, además de activar la ruta de integridad, induce en menor medida la ruta HOG. De hecho, este daño es señalizado a través de una de las ramas de esta ruta, en concreto de la rama Hkr1 y Sho1, sugiriendo una conexión entre algún elemento de esta rama de la ruta HOG y la ruta CWI. De esta manera, el daño inducido por zimoliasa implicaría dos respuestas transcripcionales diferentes: una respuesta relacionada con estrés osmótico, mediada por la ruta HOG, y otra respuesta de mayor magnitud mediada por la MAPK Slt2 y el factor de transcripción Rlm1 (Bermejo et al., 2008; García et al., 2009). Por otro lado, la caspofungina, además de activar la ruta CWI, inhibe la ruta cAMP/PKA independientemente de la MAPK Slt2, dando lugar a una respuesta transcripcional acorde con el estado de activación de ambas rutas que sin embargo es dependiente totalmente del sensor Wsc1 (García et al., 2017). Finalmente, la respuesta generada por el ácido poácico activa en paralelo a las rutas CWI y HOG; sin embargo, el sensor a través del cual la célula trasmite el daño es actualmente desconocido (García et al., 2021).

1.INTRODUCCIÓN

1.4. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN *S. cerevisiae*.

La regulación de la expresión génica en *S. cerevisiae* es un proceso esencial para la rápida adaptación de la célula a los cambios que se producen en el medio externo. Esta regulación involucra procesos como el uso de diferentes fuentes de carbono, la adaptación de las vías metabólicas necesarias para la utilización de esos compuestos orgánicos, la reducción de la utilización de nutrientes en condiciones de escasez de los mismos, la respuesta a compuestos químicos potencialmente dañinos o incluso la respuesta a la aparición de feromonas en el medio iniciando el proceso de *mating* o el fenómeno de esporulación. La regulación de la expresión génica implica varios procesos que se describen a continuación de forma resumida.

1.4.1 Transcripción.

El proceso de transcripción es la primera etapa de la expresión génica y consiste en la síntesis de RNA a partir de un molde de DNA por medio de unas enzimas especializadas llamadas RNA polimerasas. La transcripción es un proceso crucial en todos los seres vivos; por ello está fuertemente regulada y las RNA polimerasas se encuentran altamente conservadas en la evolución. A diferencia de los organismos procariotas, que sólo presentan una RNA polimerasa que se encarga de transcribir todo el genoma, las levaduras, al igual que todos los organismos eucariotas, presentan tres RNAs polimerasas: la RNA polimerasa I, que se encarga de transcribir el RNA ribosómico (rRNA), la RNA polimerasa II, que transcribe el RNA mensajero (mRNA), el cual codifica para proteínas y otros RNAs no codificantes y la RNA polimerasa III, que lo hace sobre los RNA de transferencia (tRNA) y RNAs reguladores de pequeño tamaño (snoRNA) (Werner & Grohmann, 2011). En el caso de *S. cerevisiae*, la RNA polimerasa II consta de 12 subunidades. La subunidad mayor posee un dominio C-terminal, denominado CTD (*Carboxy-terminal domain*), que contiene repeticiones de la secuencia consenso YSPTSPS. Este dominio está muy conservado en la escala evolutiva y posee más repeticiones a medida que avanzamos en ella; en *S. cerevisiae* se han encontrado 26 repeticiones del mismo.

El proceso de transcripción de mRNAs, esquematizado en la Figura 1.4, se puede dividir en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. El inicio de la transcripción en eucariotas es un punto de regulación fundamental en la expresión génica en todos los organismos. En él participan un gran número de proteínas que abarcan desde

1.INTRODUCCIÓN

factores de transcripción o activadores transcripcionales, que se unen a secuencias específicas del DNA, hasta coactivadores transcripcionales, como los complejos remodeladores de cromatina ATP dependientes y los complejos modificadores de histonas, que producen una relajación de la estructura de dicha cromatina permitiendo la posterior entrada de los factores generales de la transcripción (GTFs) y de la polimerasa II para la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC) (Struhl, 1998; Pugh, 2000; Orphanides & Reinberg, 2002; Lee et al., 2007; Rando & Winston, 2012; Lin et al., 2020).

El PIC posicionado en el promotor es inactivo y se denomina complejo de transcripción cerrado. La transición al estado abierto, y por tanto activo, se produce mediante un cambio conformacional causado por la fosforilación del dominio CTD de la RNA polimerasa II, en el cual el DNA de doble cadena del promotor accede al centro activo de la polimerasa. Los factores que intervienen en este proceso provocan la separación de las dos hebras del DNA permitiendo que la cadena molde contacte con el centro activo y se inicie la síntesis de RNA (Hantsche & Cramer, 2016). A partir de este momento se inicia la etapa de elongación en la que la RNA polimerasa II abandona el promotor y avanza a lo largo de la secuencia codificante del DNA molde, asociada con los factores de elongación, sintetizando la cadena de RNA complementaria a dicha secuencia. Esta etapa está altamente regulada y coordinada con el procesamiento de los pre-mRNA y con otros procesos nucleares, como la modificación de histonas y la remodelación de la cromatina, reparación del DNA, recombinación y replicación (Selth et al., 2010; Chen et al., 2018). La desregulación o el mal funcionamiento de los factores implicados en la etapa de elongación están relacionados con enfermedades humanas graves como el cáncer y enfermedades autoinmunes, entre otras (Sharma, 2016).

Una vez que la RNA polimerasa II ha alcanzado las regiones 3' de los genes, reconoce las señales de terminación y cesa la síntesis de RNA, disociándose del complejo formado por el DNA molde y el RNA naciente (Porrúa & Libri, 2015). En este momento, el proceso de transcripción finaliza, la RNA polimerasa II se defosforila y se recicla para generar otro transcrito (Hahn & Young, 2011).

Posteriormente, las enzimas encargadas del *capping* introducen un nucleótido 7-metilguanosina en el extremo 5' del transcrito. A la vez se da el proceso de poliadenilación, donde una cola de adeninas se incorpora al extremo 3' del transcrito mediante la enzima poliA polimerasa. Estas dos acciones se llevan a cabo para

1.INTRODUCCIÓN

proteger al mRNA de la degradación y marcarlo para el transporte al citoplasma, donde deberá ser traducido a proteína.

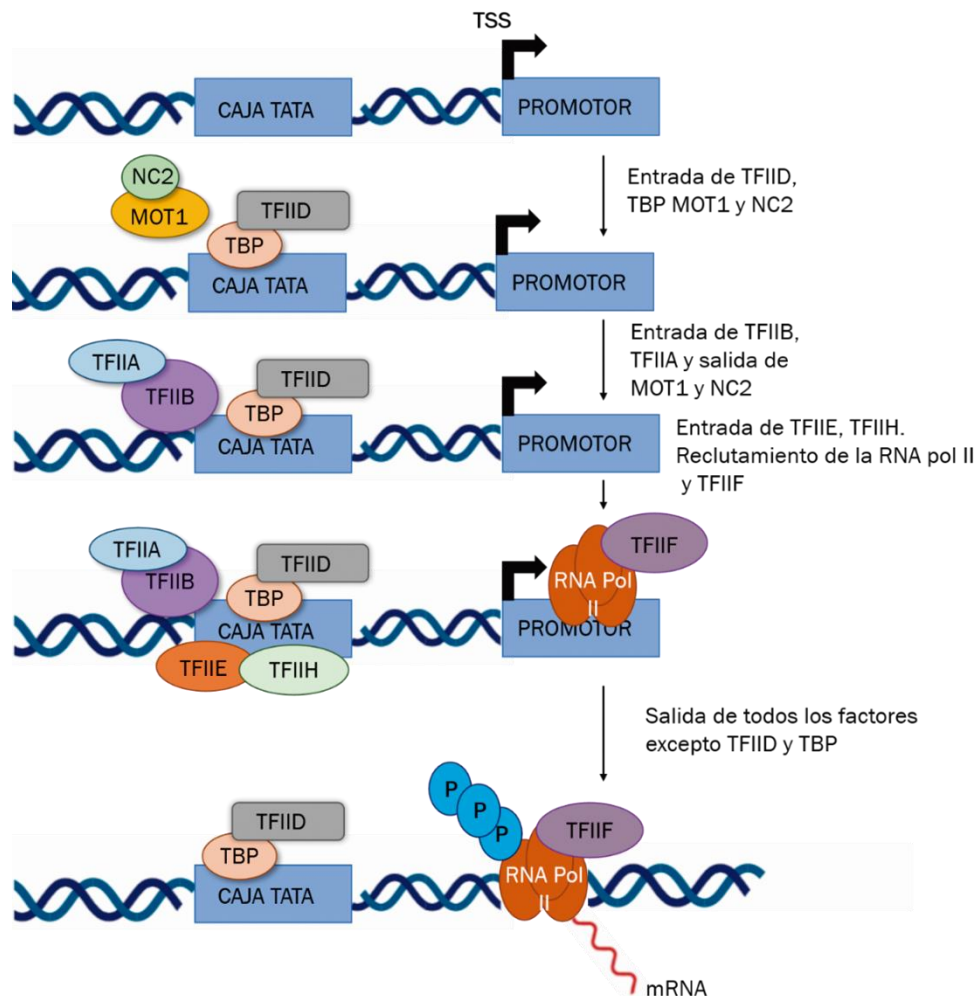


Figura 1.4: Esquema del proceso de transcripción en levaduras. En el primer paso de la transcripción, se une a los promotores de los genes el complejo multiproteico TFIID (*Transcription factor II D*) que contiene a la proteína TBP (*TATA binding protein*), Mot1 y el complejo NC2 (*Negative cofactor 2*), que ayudan a la TBP a posicionarse en el sitio correcto. Una vez posicionados, se inicia el reclutamiento de otros factores como TFIIA y TFIIB (*Transcription factor II A* y *Transcription factor II B*, respectivamente) que estabilizan la unión de la TBP y promueven la formación del PIC. A continuación se produce la unión, por un lado, de TFIIIE (*Transcription factor II E*), que recluta, junto con el complejo Mediator, a TFIIH (*Transcription factor II H*), el cual ayuda a la apertura de la doble hélice del DNA gracias a su actividad helicasa y, por otro, de la RNA polimerasa II que se une a TFIIIF (*Transcription factor II F*). Este último es el encargado de guiar a la polimerasa a lo largo del promotor. Una de las subunidades de TFIIH, Kin28, es la encargada del proceso de transición desde la fase de inicio a la fase de elongación fosforilando a la RNA polimerasa II en el dominio CTD, provocando un cambio conformacional y la entrada de más factores de elongación para seguir con la extensión del transcrito de mRNA. Durante la fase de elongación, el complejo remodelador de cromatina FACT (*FAcilitator of Chromatin Transactions*) facilita el tránsito de la RNA Pol II a largo del gen.

1.4.2. Regulación de la transcripción en condiciones de estrés sobre la pared celular.

Los cambios en las condiciones del medio externo pueden inducir en la levadura cambios en la transcripción. La supervivencia frente a condiciones ambientales desfavorables depende de la capacidad de la célula de producir una respuesta adaptativa rápida y específica frente a un determinado estrés. La mayoría de estas respuestas siguen un mecanismo similar: la actuación inmediata de la célula para paliar el daño, seguida rápidamente de una respuesta de protección global permitiendo a la célula sobrevivir momentos después del daño y prepararse para un estrés más severo y duradero (Proft & Struhl, 2004). Estas respuestas incluyen cambios transcripcionales a diferentes niveles, activando la de genes implicados en la respuesta a un determinado estrés.

La respuesta transcripcional inducida por la exposición a Rojo Congo ha sido ampliamente caracterizada durante los últimos años (Figura 1.5). El factor de transcripción Rlm1 es el responsable de la activación transcripcional de la mayoría de los genes que se inducen bajo condiciones de estrés de pared a través de la ruta CWI, como se deduce de la comparación de mutantes que presentan la delección de *RLM1* y la cepa silvestre (García et al., 2004; Sanz et al., 2012). Rlm1 es capaz de amplificar la respuesta transcripcional de los genes Rlm1-dependientes mediante retroalimentación positiva, uniéndose al promotor del gen de *RLM1* y *SLT2* e induciendo un aumento de la expresión de los mismos (García et al., 2016). Una vez que Rlm1 es activado por fosforilación por la MAPK Slt2, recluta al complejo remodelador de cromatina SWI/SNF hacia los promotores de los genes CWI-dependientes. La actividad del complejo SWI/SNF permite la reordenación de nucleosomas presentes en el DNA facilitando así la incorporación tanto de Rlm1 a sus sitios específicos como del resto de la maquinaria de transcripción, incluida la RNA Polimerasa II y sus cofactores (Sanz et al., 2012). En este proceso, es necesaria la cooperación de SWI/SNF con el complejo acetilador de histonas SAGA. La acetilación de las histonas presentes en el nucleosoma estabiliza la unión *in vitro* del complejo SWI/SNF a los nucleosomas (Hassan et al., 2001). Los nucleosomas acetilados por el complejo SAGA, son desplazados más fácilmente por el complejo SWI/SNF permitiendo así la entrada de la maquinaria transcripcional a los promotores de los genes dependientes de la ruta CWI (Sanz et al., 2016).

1.INTRODUCCIÓN

En cuanto a la MAPK Slt2, no sólo participa en el proceso de transcripción fosforilando a Rlm1, sino que también se asocia con el DNA a nivel de región promotora interactuando directamente con la RNA polimerasa II, comportándose en cierta medida como activador transcripcional. También se une a las regiones codificantes de genes CWI dependientes, sugiriendo un posible papel de Slt2 en la elongación (Kim & Levin, 2011; Sanz et al., 2018).

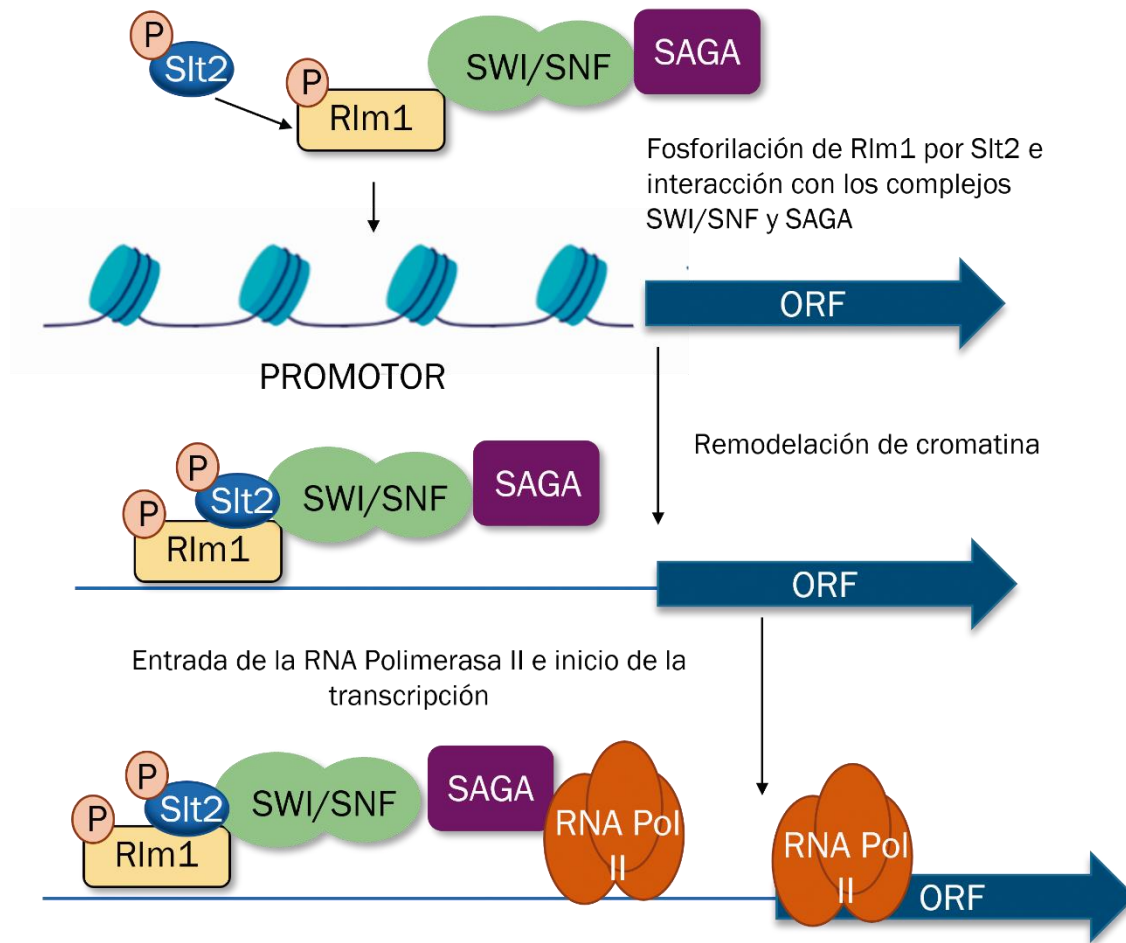


Figura 1.5: Esquema del proceso de inicio de la transcripción en condiciones de estrés de pared. La MAPK Slt2 fosforila al factor de transcripción Rlm1 que interacciona directamente con el complejo SWI/SNF. Rlm1 se posiciona en el promotor y se produce el remodelado de la cromatina por el complejo SWI/SNF con la ayuda de SAGA, permitiendo el desplazamiento de los nucleosomas y haciendo accesible la entrada de la RNA Polimerasa II y la maquinaria de transcripción para el inicio de la misma.

1.4.3. Degradación de mRNA en *Saccharomyces cerevisiae*.

La degradación del mRNA en células eucariotas es un proceso muy controlado y regulado que juega un importante papel en el control post-transcripcional de la

1.INTRODUCCIÓN

expresión génica. Todos los tipos de RNA de la célula eucariota son objeto de degradación por parte de la maquinaria celular. En el caso de las levaduras, esta degradación desempeña funciones importantes para el correcto funcionamiento de la célula. En primer lugar, las diferentes vías de degradación del mRNA contribuyen a que se mantengan unos niveles basales de expresión génica que pueden ser modulados en base a los requerimientos celulares. En segundo lugar, debido a los numerosos puntos de control que posee, la célula es capaz de degradar los tRNAs y rRNAs defectuosos, así como mRNAs aberrantes que pudieran dar lugar a proteínas anómalas. Aunque solo una minoría de los genes codificados en el genoma de *S. cerevisiae* posee intrones, éstos también son degradados, así como otros productos del metabolismo de RNA, RNAs antisentido, etc (Parker, 2012).

La mayor parte de los mRNA eucarióticos poseen una serie compuesta entre 80 y 250 residuos de adenina, en el extremo 3', que forman la llamada cola de poliA. Esta cola sirve de unión a proteínas especializadas y ayuda a proteger el mRNA de la destrucción enzimática en el citoplasma. Las colas de poliA son añadidas en el proceso de transcripción por las poliA polimerasas y son importantes para la exportación del mRNA desde el núcleo (Zhao et al., 1999). La cola de poliA protege al mRNA de la degradación enzimática por exonucleasas inespecíficas del citoplasma y, además, mediante la unión de las proteínas de unión a poliA (*PoliA binding proteins* PABPs), se estimula la degradación de esta cola y se aumenta la eficiencia de traducción. En el extremo 5' también poseen una señal que indica a la célula su naturaleza de mRNA y que consiste en un residuo de 7-metilguanosina unido al extremo 5' terminal del mRNA a través de un enlace 5'-5'-trifosfato. Esta estructura, denominada 5' *cap*, protege al mRNA de las ribonucleasas sirviendo también como punto de anclaje al ribosoma en el proceso de traducción. En la Figura 1.6 se muestra una representación de un mRNA eucariota maduro.



Figura 1.6: Esquema de un mRNA maduro.

La degradación citoplasmática del mRNA en *S. cerevisiae* puede ocurrir mediante dos vías principales: la vía en dirección 5'→ 3', que es la mayoritaria, y la vía del exosoma (dirección 3'→ 5').

1.INTRODUCCIÓN

Ambas vías deben empezar eliminando del extremo 3' de la cola de poliA, proceso que se conoce como *deadenilación* (Łabno et al., 2016). Este paso es crucial para la activación de la degradación del mRNA y esto se refleja en la existencia de múltiples enzimas (capaces de eliminar el extremo de poliA actuando en diferentes fases de la reacción) y de gran variedad de factores que regulan su actividad catalítica y su reclutamiento a sus respectivas dianas celulares (Goldstrohm & Wickens, 2008).

El proceso de deadenilación se lleva a cabo mediante la acción de dos complejos enzimáticos. Por un lado, el complejo Ccr4-Caf1-Not1, que consta de dos exonucleasas activas en dirección 3' → 5', Ccr4 y Caf1, y las proteínas accesorias Not1-5, Caf40 y Caf130. En levaduras, durante la fase de crecimiento exponencial, la deadenilación del mRNA por esta vía es la mayoritaria. En cuanto a las proteínas accesorias Not1-5, Caf40 y Caf130, no poseen actividad catalítica. Not1 actúa como proteína *scaffold* interaccionando con Ccr4 y Caf1, mientras que Caf40 y Caf130 ayudan al resto de proteínas Not a interaccionar con Not1 (Wahle & Winkler, 2013).

El otro complejo enzimático encargado de la deadenilación de mRNA es el formado por las proteínas citoplasmáticas Pan2 y Pan3. Ninguna de estas dos proteínas es esencial para la levadura, pero su ausencia da lugar a transcritos con una cola de poliA mayor de lo habitual (Boeck et al., 1996). La subunidad catalítica del complejo es Pan2 y está conservada en todos los organismos eucariotas. Su actividad es dependiente de la proteína citoplasmática Pab1, que actúa uniéndose a la cola de poliA. Ambas proteínas interaccionan y la cola de poliA es degradada por Pan2 con la intervención de Pan3 (Wolf & Passmore, 2014).

Inicialmente, se pensó que ambos complejos actuaban de manera secuencial, siendo el complejo Pan2-Pan3 el primero en intervenir acortando la cola de poliA seguido por la eliminación completa de la misma por el complejo Ccr4-Caf1-Not1. Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que ambos complejos actúan sobre poblaciones diferentes de mRNAs (Sun et al., 2013).

a. Degradación de mRNA vía 5' → 3'.

En *S. cerevisiae*, la vía 5' → 3' de degradación de mRNA es la principal y comienza con la eliminación del residuo de 7-metilguanosina del extremo 5' del mRNA, en un proceso conocido como "*decapping*". Este proceso es llevado a cabo por el complejo enzimático Dcp1-Dcp2, pero requiere además de la acción de otros reguladores

1.INTRODUCCIÓN

específicos denominados “activadores del *decapping*” como Pat1, Dhh1, Edc3 y el complejo Lsm1-7. Todos estos factores están presentes en todos los organismos eucariotas (Parker, 2012). Dcp2 actúa como subunidad catalítica del complejo. Esta proteína presenta en el extremo C-terminal una extensión a la que se unen elementos reguladores, como los activadores del *decapping* mencionados anteriormente que regulan positivamente el proceso. Entre las posiciones aminoacídicas 350-375, existe un elemento inhibitorio que regula negativamente la actividad de Dcp2. La delección de esta región produce la activación constitutiva de la proteína y una pérdida de especificidad por el mRNA (He & Jacobson, 2015). El complejo Dcp1-Dcp2 existe predominantemente en una conformación catalíticamente inactiva y, una vez que reconoce el residuo de 7-metilguanosina del extremo 5' del mRNA, se activa mediante un cambio conformacional e hidroliza el residuo de 7-metilguanosina, liberando 7-metil-GDP y RNA 5' monofosfato (Mugridge et al., 2018).

Posteriormente a la eliminación del residuo de 7-metilguanosina, se produce la degradación del mRNA. La proteína encargada de llevar a cabo este proceso es la exonucleasa Xrn1 que reconoce el extremo 5' monofosfato generado en el *decapping* y rápidamente degrada al transcrito (Jiao et al., 2010). En levadura, Xrn1 se asocia con el complejo Dcp1-Dcp2 y activadores del *decapping* como el complejo proteico Lsm1-7, Dhh1 y Pat1. Esta unión estabiliza las regiones 3' de RNAs oligoadenilados y previene la degradación por la vía 3' → 5'.

b. Degradación de mRNA vía 3' → 5'.

Otra vía de degradación de mRNA en *S. cerevisiae* es la que ocurre en sentido 3' → 5' o vía del exosoma. Aunque la mayoría de los mRNAs se degradan en sentido 5' → 3', en algunas ocasiones, después del proceso de deadenilación, cuando el extremo 3' del mRNA queda desprotegido, las exonucleasas del exosoma citoplasmático pueden producir su degradación. El exosoma es una estructura esencial presente tanto en organismos procariotas como eucariotas que se encarga de la degradación de RNA. En eucariotas existen dos tipos de exosomas, el nuclear y el citoplasmático.

El exosoma citoplasmático de *S. cerevisiae* consta de un núcleo compuesto por 9 polipéptidos; 6 de ellos tienen actividad RNAsa y se disponen estructuralmente formando un anillo con un canal central prominente; las otras tres subunidades

1.INTRODUCCIÓN

contienen dominios de unión a RNA que favorecen la entrada de los mismos en el canal (Lorentzen et al., 2007; Chlebowsky et al., 2013). El exosoma citoplasmático interacciona con otros factores que facilitan la interacción con diferentes tipos de RNAs como el complejo SKI, compuesto por la RNA helicasa Ski2 y las proteínas de unión a RNA Ski3 y Ski8. La interacción entre el exosoma y el complejo SKI está mediada por la proteína Ski7 (Januszyk, 2014). En la Figura 1.7 se muestra una representación esquemática de las principales vías de degradación de RNA en *S. cerevisiae*.

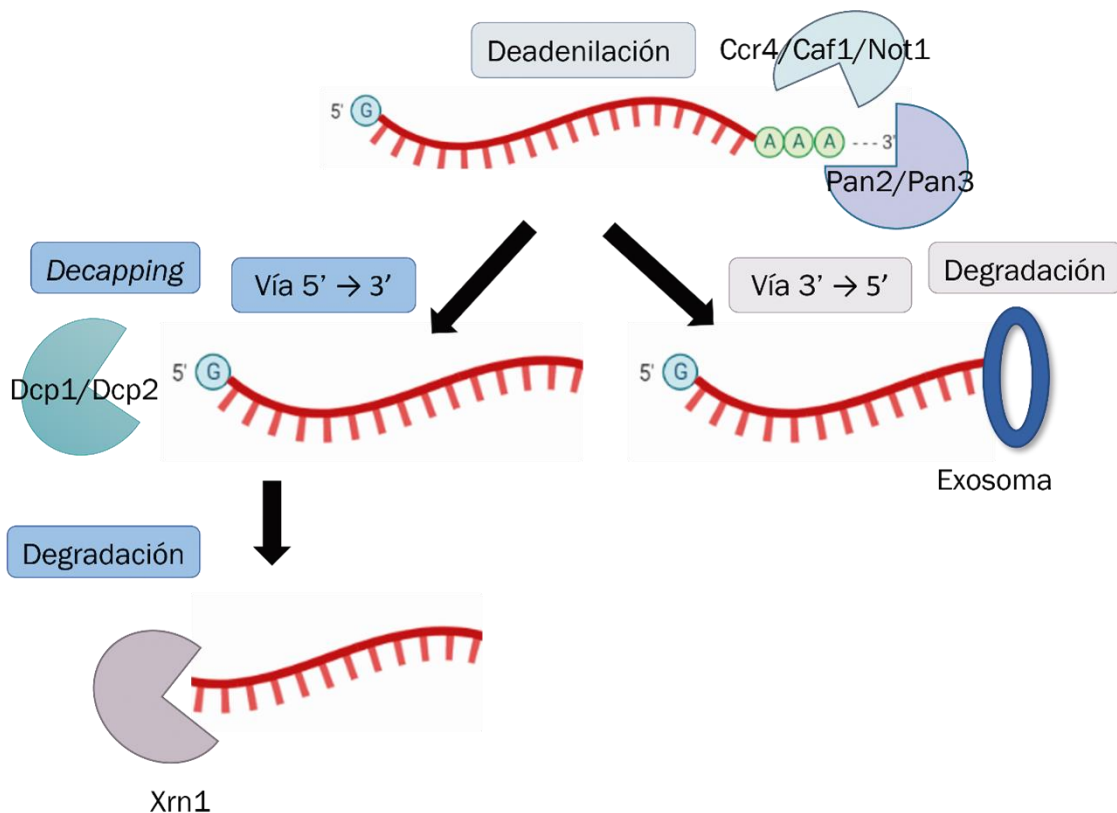


Figura 1.7: Esquema de la degradación citoplasmática de mRNA en la levadura *S. cerevisiae*.

Aunque estas dos vías de degradación de mRNA son las principales en *S. cerevisiae*, existen otras tres vías que son minoritarias y que se encargan de degradar principalmente transcritos aberrantes, impidiendo por tanto la síntesis de proteínas defectuosas. Estas tres vías son: **(a)** la *Nonsense-mediated decay* (NMD), que degrada transcritos que poseen codones de terminación prematuros; **(b)** la *No-go decay* (NGD), que elimina mRNAs que se han quedado estancados en la traducción como los que poseen estructuras secundarias en forma de *loops*, codones

poco frecuentes o mutaciones que cambian el marco de lectura del ribosoma (*Frameshift*) y (c) la *Non-stop decay* (NSD), que es la encargada de degradar transcritos que no poseen codones de terminación (Parker, 2012).

1.5. GRÁNULOS CITOPLASMÁTICOS RNA-PROTEÍNA EN LEVADURA.

La célula eucariota está compartimentada en distintos dominios funcionales por la presencia de una gran variedad de orgánulos intracelulares rodeados por membranas o sin ellas. Los primeros han sido ampliamente estudiados e incluyen estructuras como mitocondrias, el núcleo celular y el retículo endoplasmático. Los orgánulos sin membrana no están tan bien caracterizados, justamente debido a la carencia de membranas (Hyman et al., 2014). Sin embargo, es probable que ambos tengan funciones similares en la célula. Por ejemplo, las macromoléculas que participan en procesos celulares relacionados pueden concentrarse en estas estructuras para aumentar la eficiencia de las reacciones bioquímicas (Lin et al., 2015).

Aunque varios de estos orgánulos sin membrana, como el nucléolo o el centrosoma, han sido estudiados desde hace décadas, otros han sido caracterizados más recientemente. Muchas de estas estructuras muestran propiedades cercanas al estado líquido y su ensamblaje y desensamblaje ocurre rápidamente en respuesta a señales del medio exterior (Brangwynne et al., 2009; Weber & Brangwynne, 2012; Hyman et al., 2014; Banani et al., 2017). Estas estructuras están bien conservadas a lo largo de la escala evolutiva, sugiriendo que, probablemente, tienen importantes funciones en la célula eucariota. Los tipos de orgánulos sin membrana que han sido descritos hasta el momento en eucariotas son los *P-bodies* (PBs), gránulos de estrés (SGs), *U-bodies*, *sponge bodies*, gránulos polares o germinales, *cytoplasmatic lattices*, *Prion-protein induced RNP granules* y *Neuronal transport RNP granules* (Zolotukhin et al., 2013). Dentro de este conjunto, los mejor caracterizados hasta el momento son los *P-bodies* y los gránulos de estrés (Anderson & Kedersha, 2008; Buchan, 2014; Luo et al., 2018). Tanto los PBs como los SGs contienen distintos grupos de mRNAs y proteínas que rápidamente se agrupan en puntos discretos en el citoplasma en respuesta a condiciones específicas de estrés (Thomas et al., 2011).

1.INTRODUCCIÓN

Se piensa que la concentración de estas moléculas es el resultado de un cambio de transición de fase que producen gránulos de ribonucleoproteínas (RNP) a un estado líquido o de gel (Hyman et al., 2014; Banani et al., 2017; Boeynaems et al., 2018).

1.5.1. Gránulos de estrés.

Son agregados citoplasmáticos compuestos por proteínas y mRNA que se forman generalmente cuando se produce una inhibición del inicio de la traducción debido a diversos tipos de estrés como choque térmico, estrés oxidativo, hipoxia, ausencia de glucosa, etc. (Khong et al., 2018; Mahboubi & Stochaj, 2017). Se ha propuesto que actúan como lugar de almacenamiento de mRNAs que pueden ser inmediatamente traducidos cuando cesa el estrés que ha inducido su ensamblaje. Aunque se observaron por primera vez en células humanas, se han descrito en todos los organismos eucariotas. A diferencia de los PBs, que pueden estar presentes en el citoplasma bajo condiciones fisiológicas (Kulkarni et al., 2010), sólo aparecen en células sometidas a estrés.

En levadura, los gránulos de estrés están compuestos fundamentalmente por mRNAs y factores implicados en el inicio de la traducción como eIF4E, eIF4G, eIF4a, eIF3 y eIF2. Además, también aparece la subunidad pequeña del ribosoma (40S) y proteínas de unión a RNA como Pab1, Pub1, Pbp1 y Rie1, entre otras (Anderson & Kedersha, 2008).

En los últimos años, se ha incrementado el interés por el estudio de estas estructuras debido a que, además del efecto que pueden ejercer sobre la expresión génica, también se ha propuesto que jueguen, al igual que los PBs, un papel en la reprogramación de rutas de señalización implicadas en la respuesta a estrés (Kedersha et al., 2013; Buchan, 2014; Jain & Parker, 2013; Shah et al., 2014). De hecho, se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas humanas como la esclerosis lateral amiotrófica, la degeneración fronto-temporal y otras miopatías (Li et al., 2013; Ramaswami, 2014). La acumulación de gránulos debida a mutaciones en proteínas relacionadas con la autofagia también podría dar lugar a desórdenes neuromusculares (Li et al., 2016; Cipolat et al., 2016). Dado que pueden afectar a la señalización celular, podrían estar involucrados en tumorigénesis y progresión tumoral y en la resistencia a agentes quimioterapéuticos (Anderson et al., 2015; El-Naggar & Sorensen, 2018; Grabocka & Bar-Sagi, 2016). Además, han sido relacionados con la defensa del hospedador durante las infecciones virales actuando

como plataformas que potencian el reconocimiento del virus por el sistema inmune y la señalización antiviral (McCormick & Khapersky, 2017).

1.5.2. *P-bodies*.

Los *P-bodies* (PBs) son orgánulos formados por la agregación de proteínas y mRNA que fueron descritos por primera vez en 2003 (Sheth & Parker, 2003; Thomas et al., 2011; Buchan, 2014; Luo et al., 2018). Aparecen en el citoplasma de las células eucariotas, generalmente en respuesta a estrés (Jain & Parker, 2013). Estos orgánulos están muy conservados en la escala evolutiva, pues se han observado desde levaduras hasta eucariotas superiores.

Algunos estudios los asocian con patologías humanas como cáncer (Anderson et al., 2015) y enfermedades neurodegenerativas como la corea de Huntington (Savas et al., 2008) o la ataxia cerebrosespinal (Nonhoff et al., 2007). También se han encontrado evidencias que los relacionan con enfermedades autoinmunes como autoanticuerpos contra diferentes componentes de PBs, que podrían contribuir al desarrollo de patologías autoinmunes (Johnson et al., 2016). Sin embargo, su función biológica precisa es desconocida actualmente. En levadura se describieron inicialmente como puntos discretos en el citoplasma donde se localizaban las proteínas que componen la maquinaria de degradación del RNA (Sheth & Parker, 2003). Posteriormente, se observó que son estructuras dinámicas que están afectadas por las perturbaciones del medio extracelular como ausencia de glucosa y otros muchos tipos de estrés como radiación ultravioleta, estrés oxidativo y osmótico, temperatura, etanol o acidificación del medio mediada por NaN_3 en los que su formación está fuertemente inducida (Teixeira et al., 2005; Tkach et al., 2013; Shah et al., 2013). Además, en condiciones de estrés hiperosmótico, la formación de PBs se reduce en mutantes carentes de Hog1, la MAPK de la vía de señalización HOG (*High Osmolarity Glycerol pathway*); (Teixeira et al., 2005; Romero-Santacreu et al., 2009). Adicionalmente, la vía de señalización de la proteína quinasa A (PKA), una ruta clave en la señalización mediada por glucosa en levadura, juega un papel importante en la formación de PBs en *S. cerevisiae*; de hecho, en condiciones de activación de esta ruta se inhibe la formación de PBs, incluso en situaciones de estrés, mientras que la inhibición de la misma es suficiente para provocar la formación de PBs en ausencia de estrés (Shah et al., 2014; Ramachandran et al., 2011). En otras

1.INTRODUCCIÓN

ocasiones, son las propias proteínas implicadas en la señalización las que han sido localizadas en PBs, como es el caso de la proteína quinasa Hrr25, relacionada con meiosis (Zhang & Herman, 2020).

La composición proteica de los PBs depende tanto del organismo y del tipo celular como de las condiciones ambientales. Sin embargo, sí se han observado en todos los organismos eucariotas una serie de elementos comunes que, en su gran mayoría, corresponden con componentes de la maquinaria de degradación del mRNA (Tabla 1.1). Estas observaciones hicieron que inicialmente se asociara a estas estructuras con procesos de degradación del mRNA (Balagopal & Parker, 2009; Eulalio et al., 2007; Decker et al., 2007). Sin embargo, trabajos más recientes sugieren que la degradación de mRNA no ocurre en estas estructuras. Así, en mutantes de levadura y células de mamífero incapaces de formar PBs, no se han encontrado defectos significativos en la degradación de mRNA (Stoecklin et al., 2006; Eulalio et al., 2007; Decker et al., 2007). Además, se han hecho estudios con mutantes de levadura que carecen de algún elemento importante para el *decapping*, sugiriendo que la degradación del mRNA podría estar suprimida en PBs (Huch et al., 2016; Huch & Nissan, 2017). Finalmente, existen evidencias experimentales de mRNAs almacenados en PBs durante largos periodos de tiempo (Arribere et al., 2011; Zid & O'Shea, 2014; Hubstenberger et al., 2017; Standart & Weil, 2018).

1.INTRODUCCIÓN

Elementos comunes	Función	Organismo
Dcp1/Dcp2	Componentes del complejo encargado del <i>decapping</i> de mRNA. Dcp2 es la subunidad catalítica	Levadura (Sheth & Parker, 2003) Gusano (Squirrell et al., 2006) Mosca (Behm-Ansmant et al., 2006) Humano (Van Dijk et al., 2002)
Dhh1/me31B/RCK/p54	Helicasa. Estimulador del <i>decapping</i> de mRNA.z	Levadura (Sheth & Parker, 2003) Mosca (Eulalio et al., 2007) Humano (Cougot et al., 2004)
Pat1	Activador del <i>decapping</i> de mRNA y represor de la traducción	Levadura (Sheth & Parker, 2003) Mosca (Eulalio et al., 2007) Humano (Teixeira & Parker, 2007).
Lsm1-7	Complejo proteico implicado en la degradación de mRNA en el citoplasma.	Levadura (Sheth & Parker, 2003) Humano (Ingelfinger et al., 2002)
Xrn1	Exonucleasa que degrada en mRNA en dirección 5'→3'	Levadura (Sheth & Parker, 2003) Ratón (Bashkirov et al., 1997) Humano (Ingelfinger et al., 2002)
Edc3	Activador del <i>decapping</i> de mRNA	Levadura (Kshirsagar & Parker, 2004.) Mosca (Eulalio et al., 2007) Humano (Fenger-Grøn et al., 2005)
Scd6/CAR1/Rap55	Represor del inicio de la traducción	Levadura (Barbee et al., 2006), Gusano (Squirrell et al., 2006) Humano (Yang et al., 2006)
Ccr4/Pop2/Not1	Complejo encargado de la deadenilación de mRNA	Levadura (Sheth & Parker, 2003) Humano (Andrei et al., 2005)

Tabla 1.1: Relación de componentes de *P-bodies* presentes en todos los organismos eucariotas.

Por otro lado, como se ha indicado anteriormente, se han encontrado proteínas de señalización celular co-localizando con PBs, como proteínas quinasas o fosfatasa relacionadas entre otras funciones con el crecimiento celular (Kozubowski et al., 2011; Mitchell et al., 2013; Shah et al., 2014; Tudisca et al., 2010; Youn et al., 2018). Este hallazgo podría indicar la participación de estos orgánulos en la

1.INTRODUCCIÓN

regulación de rutas de señalización en periodos de estrés, alterando con ello la transducción de señales y permitiendo a la célula una mejor adaptación frente a las condiciones adversas (Kedersha et al., 2013; Shah et al., 2014; García et al., 2019). De hecho, se ha observado el tránsito entre mRNAs localizados en PBs y polisomas previo paso por gránulos de estrés (Brenques et al., 2005), lo que sugiere la relevancia de los mismos en el control post-transcripcional sobre mRNAs específicos en situaciones de estrés (Guzikowski et al., 2019), aunque aún se dispone de poca información en relación a su función en la supervivencia celular.

El mecanismo y la direccionalidad mediante el cual mRNAs específicos transitan entre PBs, polisomas y gránulos de estrés sigue siendo poco claro. Uno de los modelos más aceptados es el llamado “Ciclo del mRNA” (Figura 1.8) (Decker & Parker, 2012).

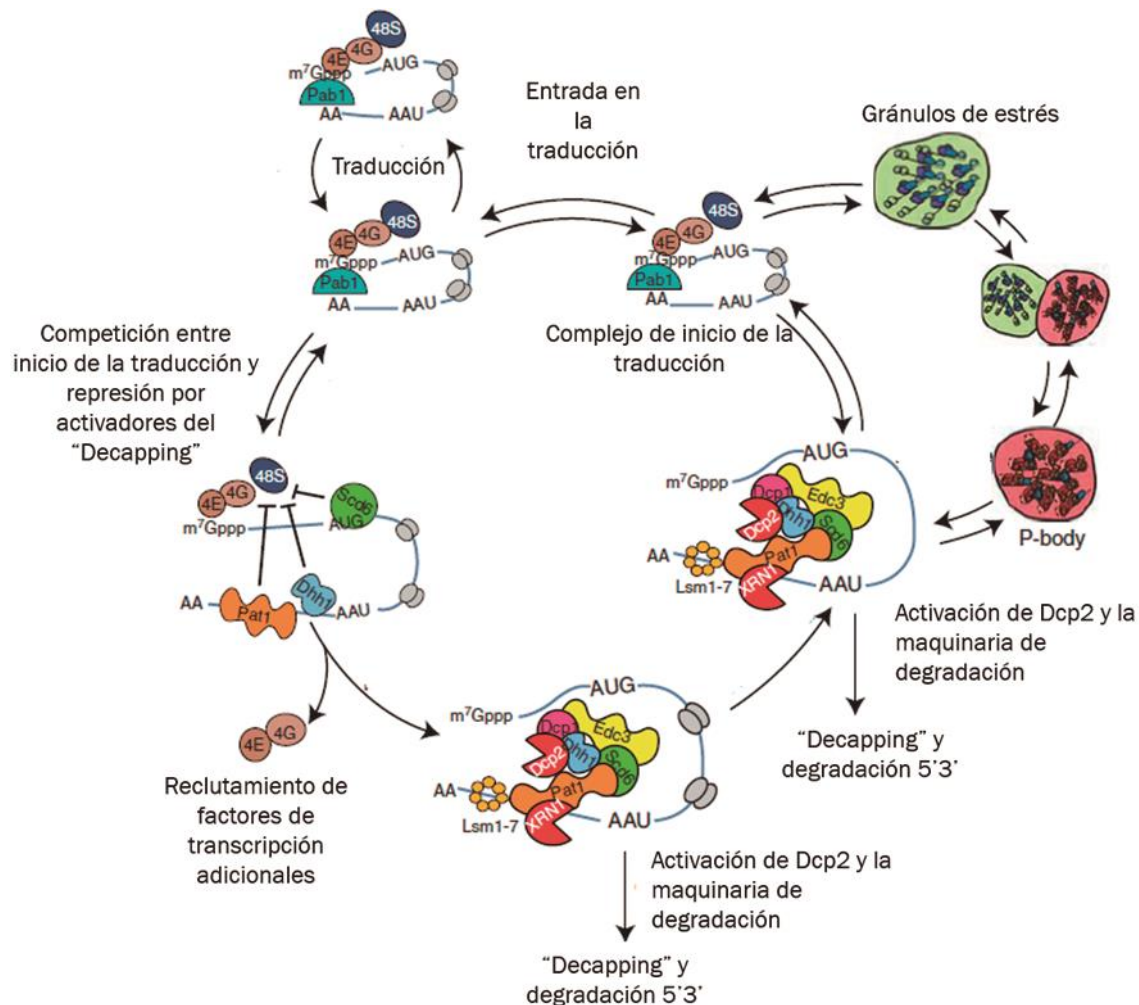


Figura 1.8: Esquema del “ciclo del mRNA”. Adaptado de Decker & Parker, 2012.

En este modelo se propone que los mRNAs que se acumulan en PBs, junto con los componentes de la maquinaria de degradación, pueden degradarse en el citoplasma, almacenarse en forma de PBs o reorganizarse intercambiando la maquinaria de degradación por factores de inicio de la traducción para ser traducidos en polisomas. Cuando el inicio de la traducción está inhibido, los mRNAs almacenados en PBs pueden también pasar a formar parte de SGs junto a factores de inicio de la traducción antes de su entrada en polisomas. La composición de los SGs puede variar dependiendo del organismo y del estrés que haya provocado su formación (Buchan et al., 2008; Aulas et al., 2015). Sin embargo, trabajos recientes utilizando sistemas de seguimiento de molécula única, han revelado que el movimiento de mRNAs entre SGs y PBs es poco significativo (Wilbertz et al., 2019).

Un aspecto importante, todavía por esclarecer, es la función en la levadura de los PBs. En la mayoría de los casos, cepas mutantes carentes de PBs visibles al microscopio de fluorescencia no presentan alteraciones fenotípicas incluso en condiciones de estrés, aunque también se han descrito otras situaciones donde los PBs parecen jugar un papel importante, como durante la fase estacionaria (Ramachandran et al., 2011), en situaciones de daño sobre el DNA (Tkach et al., 2013), sensibilidad a la luz ultravioleta (Teixeira et al., 2005) o en el mantenimiento de la homeostasis proteica en la célula (Nostramo et al., 2019).

Desde un punto de vista estructural cuantitativo, recientemente se han descrito dos tipos de proteínas dentro de los PBs: un tipo denominadas de alta concentración (*High concentration*, HC), por encontrarse en gran cantidad, y otro denominado de baja concentración (*Low concentration*, LC), por encontrarse en mucha menor cantidad (Xing et al., 2020). Dentro del primer grupo se encuentran Dcp2, Edc3, Pat1, Lsm1-7, Xrn1, Dhh1 y Upf1. Mientras que en el grupo LC se encuentran Not2, Ccr4, Pop2, Upf2, Upf3, Hek2, Eap1, Edc1, Bre5, Psp2, Sbp1 y Ssd1. Se ha propuesto que las proteínas del grupo HC tienen la capacidad de interaccionar entre ellas de forma cooperativa y, en combinación con su elevada concentración en PBs, apoyan la idea de su esencialidad para el ensamblaje de estas estructuras. De hecho, cepas mutantes en alguno de los tres componentes más abundantes, Dcp2, Pat1 y Edc3, son los más afectados en formación de PBs (Buchan et al., 2008; Decker et al., 2007; Teixeira & Parker, 2007)

Sin embargo, ninguno de los elementos LC son requeridos para el correcto ensamblaje de PBs. Estos distintos niveles de interacción entre componentes es lo

1.INTRODUCCIÓN

que puede explicar por qué, incluso en mutantes en elementos HC, todavía es posible detectar gránulos de menor tamaño (Rao & Parker, 2017).

1.6. LA PROTEÍNA Pat1.

Pat1 es una proteína multifuncional de unión a RNA muy conservada evolutivamente en los organismos eucariotas. Aunque inicialmente se identificó como una proteína de unión a la topoisomerasa II (X. Wang et al., 1996), interviene en varios procesos post-transcripcionales, como la degradación citoplasmática de mRNA. También interviene en el *splicing* de los mismos y además actúa como represor de la traducción (Marnef et al., 2012; Garre et al., 2018; Vindry et al., 2019; Lobel & Gross, 2020). Como se ha mencionado anteriormente, está muy conservada en la escala filogenética y se han encontrado homólogos de Pat1 en todos los organismos eucariotas (Tabla 1.2). En vertebrados existen dos proteínas redundantes Pat1 que, en humanos, son codificadas por los genes *PATL1* y *PATL2*.

Organismo	Nombre	Número de aminoácidos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pat1	796
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Pdc2	754
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Pat1	701
<i>Drosophila melanogaster</i>	HPat	968
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Patr-1	833
<i>Xenopus laevis</i>	xPat1a	733
	xPat1b	718
<i>Homo sapiens</i>	Pat1a	543
	Pat1b	770

Tabla 1.2: Pat1 en algunos organismos eucariotas

La ausencia de la proteína en embriones de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* resulta letal (Kamath et al., 2003; Pradhan et al., 2012) y en hembras de eucariotas superiores, como ratones y humanos, la delección de *PATL2* produce defectos en la maduración de oocitos que pueden conducir a

infertilidad (Chen et al., 2017; Maddirevula et al., 2017; Christou-Kent et al., 2018; Huang et al., 2018).

La proteína Pat1 se encuentra principalmente en el citoplasma de todos los organismos estudiados. Además, en hongos y humanos, Pat1 viaja también entre el núcleo y el citoplasma (Teixeira & Parker, 2007; Marnef et al., 2012; Vindry et al., 2017; Standart & Weil, 2018).

1.6.1. Papel de Pat1 en la degradación y traducción de mRNAs.

Pat1 actúa en el mecanismo de degradación de mRNAs a nivel del *decapping* (Bonnerot et al., 2000; Bouveret et al., 2000). Aunque el proceso de *decapping* es llevado a cabo por el complejo enzimático Dcp1/Dcp2, éste necesita de co-factores que hagan del proceso más rápido y eficiente. Entre esos co-factores se encuentra Pat1, que aparece como un componente crítico y central del proceso por dos razones principales: **(a)** la delección de *PAT1* en *S. cerevisiae* resulta en una fuerte inhibición del *decapping in vivo* (Bouveret et al., 2000; Tharun, 2009) y **(b)** más allá de que *DCP1* y *DCP2* se consideren genes esenciales en ciertos fondos genéticos, probablemente por presentar un crecimiento muy lento, la delección de *PAT1* muestra el fenotipo más extremo de todos los co-factores del *decapping*, con un fenotipo de crecimiento lento a 30°C y ausente a 37°C (Bonnerot et al., 2000). Además, en *S. cerevisiae*, se ha observado que en las cepas mutantes que carecen de la proteína, la vida media de algunos mRNAs es más larga comparada con la cepa silvestre (Hatfield et al., 1996; Bouveret et al., 2000; Nissan et al., 2010).

Pat1 se considera una plataforma central que recluta numerosos factores de la maquinaria de degradación de mRNA y usa diferentes regiones para interaccionar con ellos. La región N-terminal es la encargada de interaccionar con la helicasa Dhh1 (Sharif et al., 2013). Se ha propuesto que esta interacción modula la unión de Pat1 al RNA en la transición al *decapping*. La región central (*middle domain*) está implicada en la interacción de Pat1 con el complejo de Ccr4/Not1 en animales (Haas et al., 2010), pero esa interacción no se ha descrito aún en levadura. Finalmente, Pat1 posee un dominio C-terminal dispuesto en estructura de α -hélice con el que interacciona con las proteínas Lsm2 y Lsm3, pertenecientes al complejo Lsm1-7 (Wu et al., 2014; Fourati et al., 2014). La región C-terminal de Pat1 es importante también para la interacción con Dcp2 y Xrn1. Ambas proteínas se unen a una región

1.INTRODUCCIÓN

rica en hélices de leucina (*helice leucine-rich motifs*, HLM) (Charenton et al., 2017). Esta interacción ayuda al posicionamiento de estas proteínas sobre el extremo 5' del mRNA. En cuanto a Edc3, se ha descrito la interacción entre Pat1 y Edc3 en la extensión C-terminal, que solo poseen las proteínas Pat1 procedentes de hongos. Edc3 es una proteína *scaffold* que sirve de puente para la interacción de Pat1 con otros elementos como la subunidad pequeña del ribosoma Rps28 (Kolesnikova et al., 2013; Fourati et al., 2014). En cuanto a Scd6, la interacción con Pat1 se produce también en la extensión C-terminal (Fourati et al., 2014). Esta interacción es capaz de inhibir el inicio de la traducción tanto *in vitro* como *in vivo* ya que inhibe la formación de un complejo de pre-inicio de la traducción estable (Nissan et al., 2010).

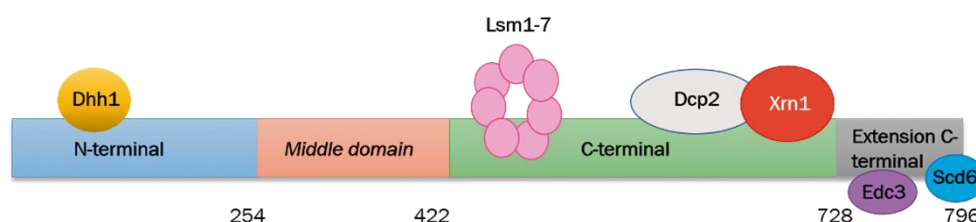


Figura 1.9 Esquema de los diferentes dominios de Pat1 y el lugar donde se produce la interacción con las proteínas Dhh1, Lsm1-7, Dcp2, Xrn1, Edc3 y Scd6.

En humanos, se han encontrado proteínas ligadas al proceso de *splicing* en el interactoma de Pat1b. Estas interacciones se dan con factores del complejo TRI-snRNP, que consiste en una serie de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas que se encargan de la escisión de intrones y la posterior unión de los exones del gen. En concreto, las interacciones descritas con Pat1b son con SART3, Lsm2-8, Prp3, Prp4 y Prp31, U4 y U6. En estudios basados en la cuantificación de la correcta inserción de los exones, se ha demostrado que Pat1b promueve la inclusión de los exones y el *splicing* alternativo, dando lugar a diferentes isoformas proteicas a partir de un mismo gen (Vindry et al., 2017).

Pat1 también afecta al proceso de traducción. Actúa como un elemento represor del inicio de la misma, aunque el mecanismo exacto a partir del cual se produce esta represión sigue siendo poco claro; se propone que pudiera ser por impedimento estérico, al estar posicionado el complejo Pat1-Lsm1-7 de tal manera que dificulta el acceso del ribosoma al mRNA (Vindry et al., 2017).

Sorprendentemente, en condiciones normales de crecimiento, también se ha descrito la entrada de Pat1 en los promotores de diversos genes como *TEF4*, que

codifica para la subunidad gamma (γ) del factor de elongación de la traducción eEF1B y *PMA1*, que codifica para una bomba de protones (Haimovich et al., 2013). Estos resultados indican que Pat1 no sólo interviene en la regulación postranscripcional de los mRNAs, sino que también podría tener otro papel a nivel de regulación de la transcripción.

En resumen, y como se ha comentado anteriormente, Pat1 interacciona con multitud de proteínas, sugiriendo que la verdadera función de la misma sea actuar como proteína *scaffold* para el anclaje de otras proteínas permitiendo así su actividad (Sachdev et al., 2019).

1.6.2. *Pat1* y *P-bodies*.

En las levaduras, la proteína Pat1 se localiza mayoritariamente en el citoplasma y en condiciones de estrés se concentra en PBs (Sheth & Parker, 2003; Pilkington & Parker, 2008).

Se ha demostrado que los niveles bajos de esta proteína, o incluso su ausencia completa, reducen la formación de PBs en número y alteran la localización de sus componentes (Teixeira & Parker, 2007; Marnef & Standart, 2010; Ayache et al., 2015; Wang et al., 2017). Por el contrario, la sobreexpresión de Pat1 conduce a un aumento notable de PBs, incluso en condiciones normales de crecimiento (Pilkington & Parker, 2008).

Un aspecto importante en la relación entre PBs y Pat1 es la observación de que la proteína quinasa A (PKA) fosforila a Pat1. La proteína PKA está regulada positivamente por las proteínas Ras1 y Ras2; por ello, se han hecho estudios en células que expresan el alelo dominante de Ras2, *RAS2^{val19}*, para determinar la relación entre la activación de PKA y la formación de PBs. Estos ensayos han mostrado que, en las células que expresan esta versión de Ras2, se produce una activación constitutiva de la ruta y, en estos casos, la formación de PBs está muy comprometida. Para identificar a Pat1 como el nexo entre la ruta PKA y la disminución en el ensamblaje de PBs, se emplearon versiones mutantes de Pat1, reemplazando la Ser456 y Ser457, que son diana de PKA, por alaninas, obteniéndose así una versión no fosforilable de Pat1. Como consecuencia, en condiciones de activación constitutiva de la ruta PKA, en las células que expresan la versión no fosforilable de Pat1, la formación de PBs no se ve afectada, demostrando

1.INTRODUCCIÓN

así que la fosforilación de Pat1 por PKA modula la formación de PBs (Ramachandran et al., 2011; Shah et al., 2013; Sachdev et al., 2019). Recientemente, se ha observado que una región rica en glutaminas situada en el extremo N-terminal de la subunidad Tpk2 de la proteína quinasa A es la responsable de facilitar el ensamblaje de PBs en condiciones de estrés por ausencia de glucosa, independientemente de la fosforilación de los residuos de serina de Pat1 (Barraza et al., 2021).

2. ANTECEDENTES

La adaptación de la levadura *S. cerevisiae* a situaciones que producen alteraciones sobre la pared celular, está regulada principalmente por la ruta de MAPKs de integridad celular (CWI). Esta ruta, está controlada en gran medida a través de la MAPK Slt2, la cual se activa por fosforilación bajo condiciones que comprometen la integridad de la pared celular. La activación de esta ruta, entre otros efectos, produce cambios importantes en el programa transcripcional de la célula.

Mediante el empleo de técnicas de análisis de expresión a gran escala como *Microarrays* de DNA y secuenciación de RNA (*RNA-seq*), nuestro grupo de investigación ha caracterizado la respuesta transcripcional de la célula bajo diferentes condiciones de estrés sobre la pared celular (Sanz et al., 2018; García et al., 2021). El análisis comparativo de los perfiles de expresión génica en estas condiciones ha permitido identificar un grupo de genes que se induce en la mayoría de las situaciones estudiadas (Arroyo et al., 2009). Dentro de este grupo se encuentra el gen *KDX1/MLP1*, que muestra altos niveles de activación transcripcional en condiciones de estrés de pared, y bajos niveles de expresión en condiciones fisiológicas de crecimiento (Rodríguez-Peña et al., 2008). Por este motivo, *MLP1* se ha utilizado como gen “modelo” para los diversos estudios sobre la ruta CWI presentados en este trabajo.

La señalización a través de esta ruta se puede monitorizar a través de sistemas reporteros transcripcionales basados en promotores de genes cuya expresión está regulada por la ruta CWI. Previamente a este trabajo, en nuestro laboratorio se desarrolló el plásmido pJS05, un sistema reportero que incluye el promotor del gen *MLP1* controlando la expresión de la secuencia codificante del gen de resistencia al antibiótico nourseotricina (*NAT1*), seguido de la zona 3'UTR nativa del gen *MLP1* (Rodríguez-Peña et al., 2008). Las células transformadas con este plásmido presentan un aumento de la resistencia a nourseotricina en condiciones de estrés de pared como consecuencia del aumento de la expresión de *MLP1*. Utilizando este plásmido, se llevó a cabo un rastreo genómico dirigido a la identificación de nuevos genes implicados en la regulación de la respuesta transcripcional de adaptación a daños sobre la pared celular. El fundamento de este estudio consistió en la identificación de mutantes de levadura en los que la transcripción de *MLP1*, como consecuencia del tratamiento con zimoliasa, se encontrara afectada. La zimoliasa conduce a la inducción de *MLP1* y, por tanto, en cepas transformadas con el

2. ANTECEDENTES

plásmido pJS05 a la de *NAT1*, permitiendo el crecimiento en presencia de 200 µg/ml de nourseotricina. Sin embargo, cepas mutantes defectivas en genes necesarios para la transcripción de *MLP1*, no son capaces de sobrevivir en presencia de 200 µg/ml nourseotricina (Arias et al., 2011). A partir de este rastreo, se identificaron varios genes pertenecientes a la maquinaria de degradación del mRNA que codifican para proteínas que se encuentran localizadas en *P-bodies* (PBs) como *dhh1Δ*, *lsm1Δ* y *pat1Δ*. La identificación de estos mutantes ha permitido hipotetizar la posible conexión entre la ruta CWI y el ensamblaje de PBs en condiciones de estrés sobre la pared celular en *S. cerevisiae*, cuya caracterización constituye la base del presente trabajo.

3.OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo ha sido profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el control de la respuesta transcripcional y post-transcripcional en situaciones de estrés que comprometen la integridad de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae*. Esta aproximación se concreta en varios objetivos parciales.

1. Caracterización de la formación de *P-bodies* en situaciones de estrés sobre la pared celular.
 - 1.1. Estudio de la participación de la ruta de integridad celular (CWI) en la formación de los *P-bodies*.
 - 1.2. Análisis de la formación de gránulos de mRNAs de genes inducidos en condiciones de estrés y su asociación con *P-bodies*.
 - 1.3. Identificación de elementos esenciales para la formación de *P-bodies* y su relación con la MAPK de la ruta CWI Slt2.
2. Análisis de la participación de la proteína Pat1, implicada en degradación del mRNA y componente estructural de los *P-bodies*, en la inducción transcripcional de genes CWI-dependientes en condiciones de estrés sobre la pared de la levadura.
 - 2.1. Análisis de la expresión génica a escala global en respuesta a Rojo Congo en un mutante carente de *PAT1*.
 - 2.2. Estudio de la participación de Pat1 en el reclutamiento de la maquinaria transcripcional a los promotores de genes regulados por la ruta de integridad celular y su posible papel en elongación.

4.MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

4.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de la levadura *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se indican en la Tabla 4.1.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf, Alemania
<i>def1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>def1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>edc3Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>edc3::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>edc3Δpat1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pat1::KanMX4; edc3::HisMX6</i>	Este trabajo
<i>lcb5Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>lcb5::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>lsb6Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>lsb6::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>ism1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>ism1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>mkt1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>mkt1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>oca6Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>oca6::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>pat1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pat1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>pat1Δ-RLM1-HA</i>	Isogénica BY4741; <i>pat1::KanMX4; RLM1-3HA::LEU2</i>	Este trabajo
<i>pat1Δ-SLT2-HA</i>	Isogénica BY4741; <i>pat1::KanMX4; SLT2-3HA::HIS3</i>	Este trabajo
<i>PAT1-FLAG</i>	Isogénica BY4741, <i>PSH1-TAP::HIS3; PAT1-FLAG::URA3</i>	Munira A. Basrai Center for Cancer Research, MD, USA
<i>slt2Δ-PAT1-FLAG</i>	Isogénica BY4741, <i>PSH1-TAP::HIS3::PAT1-FLAG::URA3; Slit2::Kan::MX4</i>	Este trabajo
<i>pkh1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pkh1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>prp1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>prp1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>ptc6Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>ptc6::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>sko1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>sko1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>sky1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>sky1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>slt2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>slt2::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania
<i>yck2Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>yck2::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania

4. MATERIALES Y MÉTODOS

WT-GST	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-DCP1	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-DCP1	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-DCP2	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-DCP2	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-DHH1	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-DHH1	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-LCB5	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-LCB5	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-LSB6	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-LSB6	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-MKT1	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-MKT1	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-PAT1	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-PAT1	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-PRR1	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-PRR1	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-SKY1	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-SKY1	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-GST-PTC6	BY4741 + plásmido pEGH-GAL1/10p-GST-PTC6	Yeast GST Fusion collection and strains, Dharmacon, Laffayette CO, USA
WT-DCP2-mCherry	Isogénica BY4741; DCP2-mCherry-HisMX4	Este trabajo
WT-RLM1-HA	Isogénica BY4741; RLM1-3XHA::LEU2	Nuestro laboratorio (Sanz et al., 2012)
WT-RLM1-Myc	Isogénica BY4741; RLM1-13Myc::HisMX6	Nuestro laboratorio (García et al., 2016)
WT-SLT2-HA	Isogénica BY4741; SLT2-3HA::HIS3	Nuestro laboratorio (Sanz et al., 2018)

Tabla 4.1: Cepas que se han utilizado en este trabajo, incluyendo su genotipo y su procedencia.

La cepa *pat1Δ-RLM1-HA* se obtuvo por integración de la fusión RLM1-3xHA por recombinación homóloga en el locus de *RLM1*. Para ello se utilizó el plásmido pRS305, que contiene el epítipo 3xHA (que corresponde a los residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana) y en el que previamente se había

4. MATERIALES Y MÉTODOS

clonado la región correspondiente al ORF de *RLM1* (pRS305-*RLM1*-3xHA), linealizado con *HindIII*. Las colonias que han integrado la fusión se seleccionaron en medio sólido SC sin leucina.

Para la generación de la cepa WT-*DCP2*-mCherry se empleó una variante del plásmido pBS34, que contiene la secuencia del marcador mCherry (Hailey et al., 2002), en el cual se reemplazó el marcador de selección *KanR* por *HIS3MX6*. La amplificación del fragmento que incluye mCherry-*HIS3* se realizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos que incluyen la región específica de gen *DCP2*: R1 (ACGTATAACACTTATTCTT-GAATTCGAGCTCGTTTAAAC) y F2 (AATGAATTATGCATAGGAAG-CGGATCCCCGGGTAAATTA). El fragmento amplificado se integró en el genoma por recombinación homóloga en el locus *DCP2*, mediante la transformación de la cepa silvestre, utilizando como medio de selección medio SC carente de histidina.

Para la generación de mutantes delecionados en genes de interés se amplificó mediante PCR el módulo de selección, kanamicina o histidina, utilizando como DNA molde los plásmidos pFA6-*KanMX6* y pFA6-*HisMX6* (Longtine et al., 1998). Además, el módulo de selección se obtuvo flanqueado por secuencias cortas (40 nucleótidos aproximadamente) homólogas al gen que se quiere interrumpir antes del ATG y después del codón de terminación. Tras la transformación del producto de PCR obtenido, las células recombinantes se seleccionaron en medio sólido complementado con kanamicina (200 mg/ml) o medio sólido SC sin histidina.

Las cepas obtenidas se han comprobado mediante PCR o, en el caso de fusiones a los epítomos HA y mCherry, también por inmunodetección.

4.1.2. *Escherichia coli*.

Para la conservación y amplificación de los plásmidos utilizados en este trabajo, se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (*SupE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*) (Hanahan, 1983).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

Las células de *S. cerevisiae* se crecieron a 24°C y en agitación a 180 rpm para incubaciones en medio líquido y a 30°C en estático para incubaciones en medio sólido.

Los medios de cultivo utilizados fueron: medio rico YPD (20 g/l glucosa, 20 g/l peptona y 10 g/l de extracto de levadura), medio sintético completo SC (1,7 g/l bases nitrogenadas para levaduras, 5 g/l sulfato amónico, 20 g/l glucosa y 1,24 g/l de mezcla completa de aminoácidos, excepto el aminoácido utilizado como marcador de selección). Para los experimentos de sobreexpresión de proteínas se utilizó medio YPS, cuya composición es de 5 g/l de sacarosa, 20 g/l peptona y 10 g/l de extracto de levadura, suplementado con el 2% de galactosa cuando fue necesario. Para los medios sólidos la composición es idéntica añadiendo 20 g/l de agar.

Para el crecimiento de bacterias se utilizó el medio LB (*Luria-Bertani*) cuya composición es: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, y entre 5-10 g/l de cloruro sódico. Las cepas resistentes a ampicilina se crecieron en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España). Las bacterias fueron crecidas a 37°C en agitación a 180 rpm, para incubaciones en medio líquido y a la misma temperatura sin agitación para incubaciones en medio sólido.

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua desionizada y purificada mediante el sistema Millipore (Milli-Ro) y fueron esterilizados mediante autoclavado a una temperatura de 120 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

4.2.1. Determinación del crecimiento.

La determinación del crecimiento de *S. cerevisiae* se realizó por turbidimetría, midiendo su densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640 (Brea, CA, USA).

4.2.2. Cultivo y recogida de células.

En la mayoría de los experimentos realizados en este trabajo, se procedió inoculando las cepas de levadura a estudiar en el medio de cultivo líquido apropiado,

4. MATERIALES Y MÉTODOS

YPD, YPS o SC (este último si las cepas se encontraban transformadas con algún plásmido). Las células se cultivaron durante toda la noche a 24°C en agitación, de tal manera que al día siguiente la densidad óptica ($D.O_{600}$) no superara el valor de 1,5. A la mañana siguiente, se midió la turbidez de los cultivos y se diluyeron a una $D.O_{600} = 0,2$ en el volumen final deseado con YPD, si el medio de cultivo inicial era YPD o SC, y con YPS suplementado o no con 2% de galactosa si el medio inicial fue YPS. Los cultivos se incubaron durante 2 horas más a 24°C en agitación, consiguiendo así que después de este tiempo el cultivo esté en fase de crecimiento exponencial, ideal para la mayoría de los experimentos realizados.

Posteriormente, el cultivo se dividió en dos o tres partes iguales, dependiendo de cada experimento, añadiendo a uno o dos de ellos las drogas o tratamientos a ensayar y dejando el restante sin droga (control sin tratamiento), siendo este momento el tiempo cero del experimento. Los cultivos se incubaron seguidamente durante el tiempo indicado para cada tratamiento y experimento. Transcurrido el mismo, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 2500 rpm durante 3 minutos a 4°C y congeladas rápidamente en nitrógeno líquido.

Las drogas utilizadas para inducir la ruta de integridad celular de *S. cerevisiae* en este trabajo han sido:

Rojo Congo (RC) (MERCK, KGaA, Darmstadt, Alemania): Este compuesto se une a la quitina de la pared celular interfiriendo con la correcta formación de la misma. Para inducir la ruta en todos los experimentos se ha utilizado una concentración subletal de 30 µg/ml, disuelto en agua estéril, que se añade al medio de cultivo en el momento de su uso.

Zimoliasa 100T (ZYM) (ImmunO™, MP BIOMEDICALS, CA, USA): Mezcla de enzimas hidrolíticas procedentes del cultivo del microorganismo *Arthrobacter luteus*, constituida de manera principal por actividad β -1,3 glucanasa y proteasa que actúa digiriendo la pared celular de la levadura. Este preparado contiene 100.000 unidades enzimáticas por gramo. La ZYM 100T se disolvió según indicaciones de la casa comercial en una solución 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5 y glucosa al 5% (previamente esterilizada por filtración). Se ha utilizado en general una concentración final de 0,8 U/ml.

Caspofungina (CAS) donada amablemente por Merck Sharp and Dohme (MSD): Fármaco de la familia de las equinocandinas que actúa como inhibidor no

4. MATERIALES Y MÉTODOS

competitivo de la β -1,3 glucán-sintasa, impidiendo por tanto la incorporación de β -1,3-glucano a la pared celular. La CAS se ha preparado disolviéndola en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final de 2 mg/ml.

Blanco de Calcoflúor (BC) (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, USA): Este compuesto interacciona con la quitina de la pared celular de manera similar al RC. Se prepara disolviendo la cantidad deseada en agua estéril y se añade al cultivo en el momento de su uso. La concentración utilizada de BC en los experimentos descritos en este trabajo ha sido entre 0 y 200 μ g/ml.

4.3. PLÁSMIDOS.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se resumen en la siguiente Tabla 4.2.

Plásmido	Características	Procedencia
Dcp2-GFP (pRP1315)	Fusión de la proteína Dcp2 a GFP clonado en YCplac33. (URA3)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, (USA)
Edc3-mCherry	Fusión de la proteína Edc3 a mCherry clonado en YCplac33. (URA3)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, (USA)
Pat1-GFP (pRP1501)	Fusión de la proteína Pat1, con una delección entre los aminoácidos 10 y 131 a GFP. Clonado en YCplac33 (URA3)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, (USA)
MLP1-GFP	Fusión del promotor y ORF de <i>MLP1</i> a la proteína GFP en el vector YEp352 (URA3)	Nuestro laboratorio, (Rodríguez-Peña et al., 2008)
Pub1-mCherry (pRP1661)	Fusión de la proteína Pub1 a la proteína fluorescente mCherry clonado en YCplac33 (URA3)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, (USA)
Pab1-GFP (pRP1362)	Fusión de la proteína Pab1 a GFP clonado en YCplac33 (URA3)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, (USA)
U1A-GFP (pRP1194)	Promotor y ORF del gen <i>U1A</i> fusionado a GFP clonado en el vector YEp351 (LEU2)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, (USA)
PGK1-U1A (pRP1354)	Promotor y ORF de <i>PGK1</i> fusionado a 16 sitios de unión en tándem de la proteína U1A en la zona 3' UTR de <i>PGK1</i> . Clonado en el vector pRS426. (URA3)	Roy Parker. University of Colorado Boulder, CO, USA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

CRG1-U1A	Promotor y ORF de <i>CRG1</i> fusionado a 16 sitios de unión en tándem a la proteína U1A en la zona 3' UTR de <i>CRG1</i> . Clonado en el vector pRS426 (<i>URA3</i>)	Este trabajo
MLP1-U1A	Promotor y ORF de <i>MLP1</i> fusionado a 16 sitios de unión en tándem a la proteína U1A en la zona 3' UTR de <i>MLP1</i> . Clonado en el vector pRS426 (<i>URA3</i>).	Este trabajo
SRL3-U1A	Promotor y ORF de <i>SRL3</i> fusionado a 16 sitios de unión en tándem a la proteína U1A en la zona 3' UTR de <i>SRL3</i> . Clonado en el vector pRS426. (<i>URA3</i>)	Este trabajo
pRS316-Slt2 K54R (p2193)	Versión de Slt2 catalíticamente inactiva clonado en el vector pRS316 (<i>URA3</i>)	David E. Levin. School of Medicine Boston University, MA, USA
pRS305-RLM1-3HA	Plásmido pRS305-3HA al que se ha introducido un inserto de 2 kB perteneciente al ORF de <i>RLM1</i> (<i>LEU2</i>)	Nuestro laboratorio, (Sanz et al., 2012)
pRS423-Slt2-3HA	Fusión de Slt2 a la proteína HA. Clonado en el vector pRS423 (<i>HIS3</i>)	Este trabajo
pRS316-Slt2	Versión silvestre de Slt2 bajo el control de su promotor clonada en el vector pRS316 (<i>URA3</i>)	H. Martín. Depto. Microbiología y Parasitología Universidad Complutense de Madrid
pRS316-Slt2-as	Versión mutada de Slt2 capaz de aceptar análogos de ATP clonada en el vector pRS316 (<i>URA3</i>)	(Alonso-Rodríguez et al., 2016)
pEGH-GAL1/10p-GST	Vector que expresa el epítipo GST bajo el control del promotor <i>GAL1/10</i>	<i>Yeast GST Fusion collection and strains</i> , Dharmacon, Laffayette CO, USA
pEGH-GAL1/10p-GST-CRG1	Vector que expresa el gen <i>CRG1</i> fusionado al epítipo GST en el extremo N-terminal bajo el control del promotor <i>GAL1/10</i>	<i>Yeast GST Fusion collection and strains</i> , Dharmacon, Laffayette CO, USA
pEGH-GAL1/10p-GST-MLP1	Vector que expresa el gen <i>MLP1</i> fusionado al epítipo GST en el extremo N-terminal bajo el control del promotor <i>GAL1/10</i>	<i>Yeast GST Fusion collection and strains</i> , Dharmacon, Laffayette CO, USA
Pat1-SS	Versión silvestre de Pat1 clonado en pRS413 (<i>HIS3</i>)	Paul K. Herman. The Ohio State University, OH, USA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Pat1-EE	Versión de Pat1 en la que se han reemplazado las serinas 456 y 457 por ácido glutámico. Clonado en pRS413. (<i>HIS3</i>)	Paul K. Herman. The Ohio State University, OH. USA
Pat1-AA	Versión de Pat1 en la que se han reemplazado las serina456 y 457 por alanina. Clonado en pRS413. (<i>HIS3</i>)	Paul K. Herman. The Ohio State University, OH, USA
Ras2 ^{val19} (pTS120)	Contiene el alelo constitutivamente activado de Ras2 (alelo <i>val19</i>) clonado en YCplac111 (<i>LEU2</i>)	Michael N. Hall University of Basel, Suiza

Tabla 4.2: Plásmidos utilizados en este trabajo.

Los plásmidos *MLP1-U1A*, *CRG1-U1A* y *SRL3-U1A*, se obtuvieron reemplazando los fragmentos que contienen el promotor y el ORF por un lado y el 3'UTR por otro del gen *PGK1* en el plásmido pRP1354 (Tabla 4.2). Este reemplazo se llevó a cabo digiriendo el plásmido PGK1-U1A con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI* incluyendo la zona promotora y codificante de *PGK1* y con *SpeI* y *NotI* incluyendo la región 3'UTR. Las regiones promotora/codificante y 3'UTR correspondientes a los genes *MLP1*, *CRG1* y *SRL3* se obtuvieron mediante PCR a partir de DNA genómico en las que se incorporaron las dianas de restricción para las enzimas mencionadas anteriormente, procediendo a su ligación al plásmido pRP1354 previamente digerido con las enzimas arriba indicadas de forma consecutiva.

El plásmido pRS423-Slt2-HA, se construyó clonando el inserto conteniendo la región promotora de *SLT2* y el ORF de *SLT2* fusionado a 3xHA, obtenido a partir de la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI* del plásmido Yep352-Slt2-HA (Madden et al, 1997), en el plásmido pRS423 previamente linealizado con las mismas enzimas de restricción.

Todas las construcciones plasmídicas generadas se han verificado mediante análisis de restricción y secuenciación.

4.4. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

Las técnicas básicas de biología molecular como la digestión de DNA con enzimas de restricción, desfosforilación del extremo 5' del DNA, amplificación de DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ligación de ácidos nucleicos etc., se realizaron siguiendo los protocolos convencionales de laboratorio (Ausubel et al., 1993; Sambrook et al., 1989). Para la extracción y purificación de DNA plasmídico

4. MATERIALES Y MÉTODOS

procedente de bacterias, se inocularon células de *E. coli* en medio LB-Ampicilina y se crecieron a 37°C en agitación durante toda la noche. Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó el kit comercial de la casa Macherey-Nagel “*NucleoSpin Plasmid*” (Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la extracción de DNA plasmídico de levaduras, las células que portan el plásmido correspondiente se inocularon en 3 ml de YPD y crecieron a 24°C en agitación durante toda la noche. A la mañana siguiente, se centrifugaron los 3 ml de cultivo a temperatura ambiente y velocidad máxima durante 1 minuto y el pellet de células resultante se trató con 100 µl de buffer de lisis STET (0,8 g/l glucosa, 5% Tris pH 8 1M, 10% EDTA pH 8 0,5 M, 5% Tritón X-100). La suspensión de células se mantuvo en hielo y se transfirió a tubos eppendorf a los que se añadieron aproximadamente 50 µl de bolitas de vidrio de 1 mm de diámetro (Retsch, Alemania). Las células se rompieron en *Fast-Prep*® (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), aplicando un programa de 30 segundos a velocidad 5,5 m/s tres veces, permaneciendo en hielo entre rotura y rotura. Después de la tercera rotura, la muestra se hirvió durante 3 minutos a 100°C y el extracto celular se recuperó perforando la parte inferior del eppendorf con una aguja incandescente y centrifugando unos segundos a máxima velocidad para recuperar el eluido en eppendorf nuevos. Posteriormente se centrifugaron los extractos durante 5 minutos a 4°C a velocidad máxima y se traspasaron los sobrenadantes a un nuevo eppendorf. A los 50 µl de sobrenadante recuperados, se le añadió 100 µl de acetato amónico 7,5 M para precipitar proteínas y se mantuvo durante una hora a -20°C. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 4°C a 13000 rpm durante 1 minuto y se traspasaron los sobrenadantes a un nuevo eppendorf al que se añadieron 200 µl de etanol absoluto frío para precipitar DNA y se guardaron a -20°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C a máxima velocidad, el pellet resultante se resuspendió en 10 µl de agua Milli-Q y se transformó en células de *E. coli* para la amplificación del plásmido. Posteriormente, el DNA plasmídico se extrajo de *E. coli* y se purificó con el kit comercial de Macherey-Nagel mencionado anteriormente.

Las enzimas de restricción empleadas fueron suministradas por Nzytech (Lisboa, Portugal), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) y Takara Bio (Shiga, Japón), la T4 DNA ligasa por la casa Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania) y la DNA fosfatasa por la casa Promega (Madison, WI, USA). La visualización del DNA

4. MATERIALES Y MÉTODOS

se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa a un porcentaje del 0,8% de agarosa disuelta en tampón TAE (Tris-Acético-EDTA) (0,004 M Tris Acetato pH 7,5 y 0,002 M EDTA pH 8). Tras la electroforesis, el gel de agarosa fue teñido con una solución al 10% del agente intercalante “GelRed® Nucleic Acid Gel Stain”, (Biotium, Fremont, CA, USA), durante aproximadamente 20 minutos para su posterior visualización en un transiluminador de luz ultravioleta. Para la purificación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa o de productos de PCR se utilizó el kit comercial “Gene clean Turbo Kit” (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). La secuenciación de DNA de diversas construcciones generadas en este trabajo se realizó en la Unidad de Genómica de la UCM, utilizando el secuenciador automático multicapilar ABI Prism 3730 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), y cebadores “universales”, correspondientes a vectores de clonación, o específicos según necesidad.

4.4.1. Transformación de bacterias.

La transformación de *E. coli* se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan, (1983). Para ello, se utilizaron 100 µl de células de *E. coli* competentes a las que se añaden entre 5-10 µl de cada ligación o entre 1-2 µl de DNA plasmídico a una concentración suficiente. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos seguido de un choque térmico de 2 minutos a 42°C que permite la entrada de material genético en la misma. Tras dejar la mezcla un minuto más en hielo, se añadieron a la misma 4 volúmenes de LB líquido y se incubó a 37°C en agitación durante una hora. Pasado este tiempo se plaqueó en medio sólido LB suplementado con ampicilina, incubando las placas a 37°C sin agitación durante 24 horas.

4.4.2. Transformación de levaduras.

La transformación de levaduras con plásmidos o productos de PCR se realizó siguiendo el método del acetato de litio (Ito et al., 1984). Se partió de 10 ml de cultivo en fase exponencial y las células se recogieron en esterilidad por centrifugación a 2500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 100 µl de una mezcla 1:4 de acetato de litio 1M y polietilenglicol 4000 (PEG) al 50%. A continuación, se añadieron a la mezcla 50 µg de ssDNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado por tratamiento a 100°C durante 5 minutos (Invitrogen,

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Carlsbad, CA, USA), y entre 0,1 y 0,5 μg del DNA a transformar en el menor volumen posible. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se sometió a un choque térmico a 42°C durante una hora. Finalmente, las células se plaquearon en medio SC selectivo y se incubaron a 30°C durante 48-72 horas.

4.5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS.

La sensibilidad de las cepas empleadas en este trabajo a diferentes compuestos se ensayó utilizando cultivos en fase exponencial. Las células se crecieron previamente durante toda la noche en el medio líquido correspondiente (YPD o YPS) a 24°C y en agitación, de manera que al día siguiente el valor de D.O.₆₀₀ del cultivo no superara el valor de 1-1,5.

4.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido.

Este método se utilizó para determinar la sensibilidad de *S. cerevisiae* a ZYM, CAS y BC. Se preparó una dilución del cultivo crecido en medio líquido YPD o YPS suplementado con el 2% de galactosa a una D.O.₆₀₀ de 0,009. En la primera columna de una placa estéril de 96 pocillos se añadieron 150 μL de YPD o YPS + 2% galactosa con la droga a ensayar y se hicieron 10 diluciones seriadas 1:2 en YPD o YPS + 2% galactosa en las siguientes columnas de la placa transfiriendo en cada paso 75 μL de medio a los pocillos, donde previamente se habían depositado 75 μL de medio fresco sin droga, dejando la última columna como control positivo de crecimiento sin droga. Posteriormente, se añadieron 75 μL del cultivo celular a D.O.₆₀₀=0,009 (aproximadamente 10^4 células) en todos los pocillos. Tras 48-72 horas de incubación a 30°C en estático, se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (*model 680 Microplate Reader*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), para determinar el grado de crecimiento celular en cada pocillo.

En el caso particular de la CAS, se emplearon dos diluciones seriadas 1:2 en paralelo a dos concentraciones iniciales de 200 ng/ml y 150 ng/ml de CAS para poder ampliar el rango de concentraciones ensayadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT.

4.6.1. Lisis celular y obtención del extracto proteico total.

Las células se recogieron tal y como se describe en el apartado 4.2.2. El volumen final de cultivo recogido para el análisis de proteínas ha sido de 20 ml, en tubos Falcon donde previamente se había añadido un volumen de hielo picado similar para preservar el estado de fosforilación de proteínas y evitar efectos indirectos sobre la activación de la ruta CWI.

Cada precipitado de células se resuspendió en un volumen entre 180 y 200 μ L de tampón de lisis de proteínas cuya composición es 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10% glicerol, 1% tritón X-100, 0,1% SDS, 0,1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM β -glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico. Este tampón se completa en el momento de su uso con inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free, *Protease inhibitor cocktail tablets*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) 1 mM, ambos inhibidores se utilizan a una concentración final del 10%. La suspensión celular se transfirió a tubos eppendorf y se añadieron bolitas de vidrio de 1 mm de diámetro (Retsch, Alemania) hasta la mitad del volumen final de la suspensión aproximadamente. Las células se rompieron por agitación en *Fast-Prep*[®] (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), aplicando un programa de 35 segundos a velocidad 5.5 m/s dos veces, permaneciendo en hielo entre rotura y rotura. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C para recuperar los sobrenadantes. La concentración de proteína total de los extractos se calculó midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Brea, CA, USA). A partir de cada extracto se preparó un volumen final de 50 μ L de muestra ajustando con agua desionizada, a una concentración de proteína total de 50 μ g/ μ L. A continuación, se añadieron 50 μ L de tampón de carga SDS-PAGE 2x (125 mM Tris HCl pH 6,8; 5% SDS, 25% glicerol, 0,6 g de azul de bromofenol por cada 50 ml de preparación y ditiotreitól (DTT) a una concentración final de 200 mM). Las muestras se hirvieron a 99°C durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de las proteínas. Las muestras desnaturalizadas se conservaron a -20°C, en el momento de su uso se descongelaron y se cargaron en geles de poliacrilamida.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.6.2. Electroforesis de proteínas.

Para la separación electroforética de las proteínas del extracto, se cargaron aproximadamente 13 µl de los mismos, 325 µg de proteína aproximadamente, en geles de poliacrilamida entre el 8% y 10%, en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE, cuya composición es 1,98 ml de acrilamida al 30%, 0,96 ml de bisacrilamida 2%, Tris-HCl pH=8,8 2,25 ml, 60 µl de SDS 10%, 40 µl de persulfato amónico al 10% (PSA) y 8 µl de tetrametiletilendiamina (TEMED). La electroforesis se realizó en cubetas *Mini Protean III* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), y se corrieron a un voltaje constante entre 150 y 180 V durante aproximadamente una hora. El tampón utilizado para la electroforesis tiene una composición de 196 mM de glicina, 0,1% de SDS y 50 mM de Tris-HCl pH=8,3. El marcador de pesos moleculares utilizado fue el *Protein Marker VI* (Panreac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, España).

4.6.3. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa.

Las proteínas separadas durante la electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) aplicando un voltaje constante de 110 V durante 60 minutos. Para ello se utilizaron cubetas *Mini-Trans Blot Transfer Cells* (Bio-rad, Hercules, CA, USA). El tampón utilizado para la transferencia está compuesto por 58 g/l de Tris-HCl, 29 g/l de glicina y 3,7 g/l de SDS, al que se suplementa con el 20 % de etanol de una pureza del 100%.

4.6.4. Inmunodetección.

Tras la transferencia de proteínas a la membrana, ésta se bloqueó con leche desnatada al 5% en tampón PBS (29,2 g/l de NaCl, 24,2 g/l de Tris pH 7,5), durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, preparado a la concentración adecuada en una mezcla de leche y TPBS (PBS con 0,1% de Tween 20), durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente y tras tres lavados sucesivos de aproximadamente 15 minutos con TPBS, se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios a una concentración 1:5000, diluidos en una mezcla de TPBS y leche, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Estos anticuerpos secundarios llevan incorporados una molécula que emite

4. MATERIALES Y MÉTODOS

fluorescencia al ser excitada con luz infrarroja que permite su detección. Después, las membranas se sometieron a otros tres lavados de 15 minutos con TPBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para el revelado de las membranas se utilizó el escáner para detección de imágenes por luz infrarroja Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) y la cuantificación de las bandas de interés se ha realizado utilizando el programa “*Image studio lite versión 5.2*” (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Los anticuerpos utilizados en este trabajo se resumen en la Tabla 4.3.

Anticuerpo	Características	Procedencia
Anti-G6PDH	Policlonal de conejo	Sigma - Aldrich (San Luis, MO, USA)
Anti-Mpk1 (Slr2)	Monoclonal de ratón clon E9	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti fosfo-p42/p44 MAPK (Thr ²⁰² /Thr ²⁰⁴)	Monoclonal de conejo Clon 4370	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
Anti-GFP	Monoclonal de ratón Clon JL-8	Takara Bio (Shiga, Japón)
Anti-GST	Policlonal de conejo clon Z-5	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-HA	Monoclonal de ratón clon 12CA5	Roche Diagnostics GmbH, (Mannheim, Alemania)
Anti-cMyc	Monoclonal de ratón clon 9E10	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Anti-RNA polimerasa II (subunidad Rpb1)	Monoclonal de ratón clon 8WG16	Covance (Princeton, NJ, USA)
Anti-Actina	Monoclonal de ratón clon 4	MP biomedical (Irvine, CA, USA)
Anti-DsRed (Anti-mCherry)	Policlonal de conejo	Takara Bio (Shiga, Japón)
Anti-IgG-Ratón IRDye 680LT	Policlonal de cabra	LI-COR Biosciences, (Lincoln, NE, USA)
Anti-IgG-Conejo IRDye 800CW	Policlonal de cabra	LI-COR Biosciences, (Lincoln, NE, USA)

Tabla 4.3: Relación de anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western-blot.

4.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.

La inmunoprecipitación de cromatina es la técnica utilizada para detectar la interacción *in vivo* de proteínas con el DNA. La clave de estos experimentos es utilizar formaldehído para preservar las interacciones proteína-DNA mediante enlaces covalentes entre las aminos de las bases de DNA y las de las proteínas. El formaldehído es el agente químico más utilizado para generar entrecruzamientos entre el DNA y proteínas (Solomon & Varshavsky, 1985; Mymryk et al., 1997; Toth & Biggin, 2000), por tres razones principales: (1) Penetra rápidamente en las células

4. MATERIALES Y MÉTODOS

actuando sobre interacciones nativas antes de que se produzca una respuesta fisiológica en la célula; (2) es un compuesto con un único átomo de carbono que permite generar entrecruzamientos proteína-DNA, proteína-proteína y proteína-RNA *in vivo* y (3) las uniones son reversibles, permitiendo que se lleven a cabo pasos posteriores para la obtención del DNA. De esta manera, los experimentos de ChIP permiten comparar eventos que se producen de forma simultánea en la célula en diferentes promotores y genes mediante PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos. Un esquema de esta técnica se resume en la Figura 4.1.

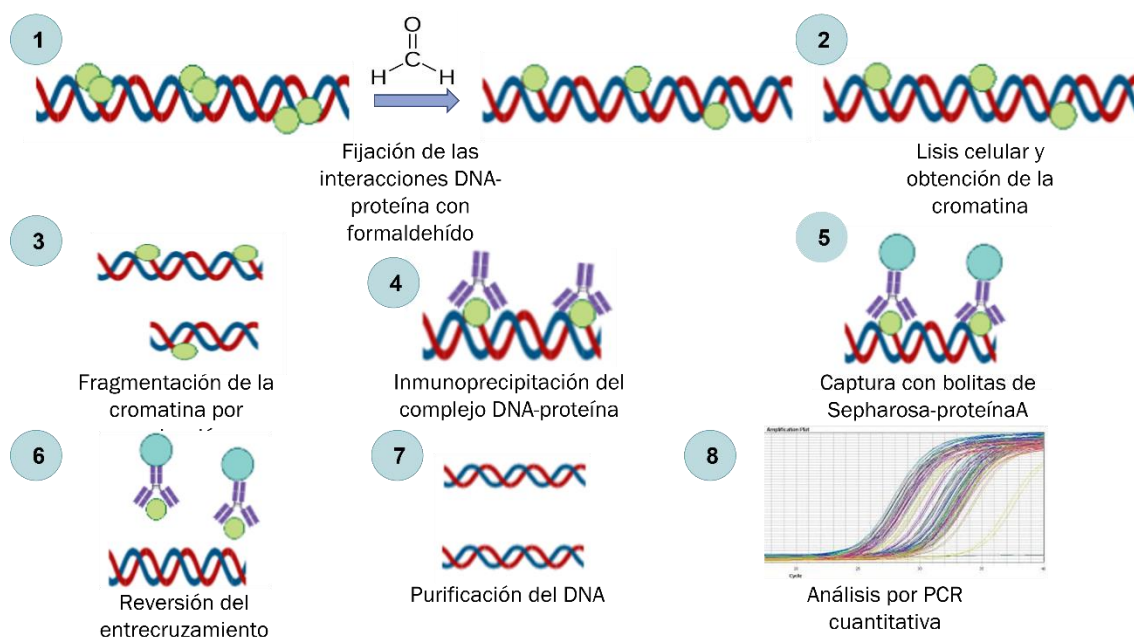


Figura 4.1: Esquema de los pasos realizados en un experimento de ChIP estándar.

4.7.1. Entrecruzamiento *in vivo* y recogida de las células.

Para la realización de estos experimentos las células se crecieron y refrescaron en medio YPD. Después del tiempo de refresco se trataron con RC a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Transcurrido el tiempo de tratamiento adecuado dependiendo de cada experimento, las células fueron tratadas con formaldehído (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA), a una concentración final del 1%, durante 15 minutos (para ver la entrada de Rlm1 y de la RNA Pol II y el desplazamiento de la histona H3) o 40 minutos (para estudiar el reclutamiento de Pat1 y Slt2) en agitación a temperatura ambiente para fijar los entrecruzamientos proteína-DNA. La reacción de entrecruzamiento se detuvo con glicina a una concentración final de 150 mM y

4. MATERIALES Y MÉTODOS

5 minutos de tratamiento en las mismas condiciones. Pasado este tiempo, el volumen necesario de cultivo, dependiendo de las condiciones del experimento, se centrifugó a 2500 rpm durante 3 minutos a 4°C y se lavó dos veces con PBS frío. El precipitado de células se congeló inmediatamente a -80°C hasta su posterior rotura.

4.7.2. Lisis celular y aislamiento de cromatina.

El precipitado de células se resuspendió en 400 µl de tampón de lisis (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% tritón X-100 y 0,1% deoxicolato sódico suplementado con 16 µl de inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free, *Protease inhibitor cocktail tablets*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y 4 µl de Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) 1 mM. La suspensión de células se transfirió a tubos eppendorf en los que previamente se habían añadido 500 µL de bolitas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro, (Retsch, Alemania) enfriados en hielo, y se rompieron por agitación en vórtex (*Vortex-Genie® 2*, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) a 4°C a máxima velocidad durante 40 minutos. Posteriormente, se obtuvo el extracto celular perforando la parte inferior del eppendorf con una aguja incandescente y centrifugando durante unos segundos a máxima velocidad para recoger el extracto en otros tubos eppendorf nuevos. La fragmentación de la cromatina se llevó a cabo por sonicación (*High Intensity Ultrasonic Processor*, modelo VC375) en 7 ciclos de 10 segundos a fuerza 4, manteniendo las muestras en hielo entre ciclo y ciclo. Tras la sonicación, al extracto se le añadió 1 ml de tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y se volvió a centrifugar 30 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Pasado este tiempo se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se centrifugó en las mismas condiciones durante 60 minutos volviendo a traspasar después el contenido a un nuevo eppendorf, consiguiendo así una cromatina completamente limpia. De esta cromatina se apartaron 25 µL y se congelaron a -80°C (fracción input IN) y otros 250 µL se incubaron con el anticuerpo correspondiente (fracción inmunoprecipitada IP).

4.7.3. Inmunoprecipitación y purificación del DNA.

La cromatina de las muestras IP fue inmunoprecipitada con la cantidad correspondiente de anticuerpo, previamente optimizada en experimentos piloto de

4. MATERIALES Y MÉTODOS

titulación, durante la noche en rotación a 4°C. La relación de anticuerpos utilizados en estos experimentos se resume en la siguiente tabla (Tabla 4.4).

Anticuerpo	Características	Procedencia
Anti-HA	Policlonal de conejo clon 9110	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-RNA polimerasa II (subunidad Rpb1)	Monoclonal de ratón clon 8WG16	BioLegend, (Dedham, MA, USA)
Anti-histona H3	Policlonal de conejo clon 1791	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-FLAG	Monoclonal de ratón clon M2	Sigma-Aldrich (San Luis, MO, USA)

Tabla 4.4: Relación de anticuerpos utilizados para ChIP en este trabajo.

Al día siguiente, cada muestra se incubó con 15 µl de *Protein A Sepharose beads* (Rockland, Limerick, PA, USA) con el objetivo de capturar la cromatina unida al anticuerpo. En el caso de utilizar el anticuerpo anti-FLAG, las muestras se incubaron con 15 µl de *Dynabeads Pan Mouse IgG* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A continuación, se realizaron lavados de 5 minutos en rotación a temperatura ambiente con: 1,5 ml de tampón de lisis, 1,5 ml de tampón de lisis con alto contenido en sales (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Tritón X-100 y 0.1% deoxicolato sódico), 1,5 ml de tampón de lavado (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,25 M LiCl, 0.5% deoxicolato sódico y 1 mM EDTA) y un último lavado con 1,5 ml de TE (10 mM Tris-HCL y 1 mM EDTA). Entre lavado y lavado se centrifugaron las muestras a 3000 rpm a temperatura ambiente y se aspiraron los sobrenadantes con bomba de vacío para dejar la resina lo más seca posible. Una vez finalizados los lavados, se añadieron a la resina 250 µl de tampón de elución (50 mM Tris pH 8, 1% SDS y 10 mM EDTA) y se incubaron a 65°C en agitación a 1400 rpm durante 10 minutos en un termoagitador *Thermomixer compact®* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Inmediatamente, las muestras se centrifugaron 2 minutos a 13000 rpm y a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante a otro tubo. Tanto las muestras IP como las muestras IN se llevaron a un volumen final de 500 µl con tampón TE y se incubaron 2 horas a 42°C en presencia de 100 µg de proteinasa K (MERCK, KGaA, Darmstadt, Alemania) y a continuación, a 65°C toda la noche para eliminar los entrecruzamientos y degradar proteínas. Al día siguiente se purificó el DNA de cada una de las muestras (tanto IP como IN) mediante dos lavados con 500 µl de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) y posterior aislamiento de la fracción acuosa mediante centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa resultante

4. MATERIALES Y MÉTODOS

se traspasó a un nuevo eppendorf y se añadieron 500 µl de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) y se volvió a separar la fase acuosa por centrifugación en las mismas condiciones. Para la precipitación del DNA se utilizaron 400 µl del IP y 100 µl del IN, a los que se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 1 µl de glicógeno proveniente de una solución comercial a 20 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Las muestras se mantuvieron durante 30 minutos a -80°C y se centrifugaron 30 minutos a 13000 rpm a 4°C. A continuación, se añadieron 300 µl de etanol frío al 70% al precipitado y se centrifugó durante 5 minutos en las mismas condiciones. El sobrenadante se aspiró con bomba de vacío para dejar el pellet secar al aire. El DNA obtenido se resuspendió en 100 µl de agua ultrapura milli-Q para las muestras IP y 500 µl para las muestras IN.

4.7.4. Cálculo de la tasa de enriquecimiento mediante PCR cuantitativa.

Para cuantificar el DNA inmunoprecipitado se empleó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Las reacciones de qPCR se hicieron por duplicado utilizando un volumen final de reacción de 10 µl, de los cuales 4 corresponden al DNA (tanto del IP como del IN), 6 µl al *2x Power SYBR Green PCR Master Mix* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). más cada oligonucleótido a una concentración final de 5 mM. La reacción de PCR cuantitativa se llevó a cabo en un instrumento *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), en las instalaciones de la Unidad de Genómica de la UCM. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 10' a 95°C seguido de 40 ciclos de 15" a 95°C y 1' a 60°C.

El nivel de enriquecimiento (F. E, *Fold Enrichment*) en regiones específicas del DNA fue calculado siguiendo el método comparativo de Ct previamente descrito (Aparicio et al., 2004), utilizando una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae* como control endógeno (CROV). El valor de Ct de la muestra IN (control) fue restado al valor Ct de la muestra IP (problema) obteniendo el valor de ΔCt para cada muestra. El valor $\Delta\Delta Ct$ se ha obtenido restando el valor ΔCt de las muestras no tratadas al valor ΔCt de las muestras tratadas. Una vez obtenido ese valor se aplicó la fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct \text{ problema} - \Delta\Delta Ct \text{ control})}$, obteniéndose el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que se va a utilizar

4. MATERIALES Y MÉTODOS

como nivel de enriquecimiento. Este método matemático fue descrito por (Livak & Schmittgen, 2001) y ha sido aplicado para cada muestra experimental y se resume en el esquema siguiente.

$$\left. \begin{array}{l} \text{Gen}^{\text{CONTROL}} \rightarrow \Delta\text{Ct}_{\text{CONTROL}} (\Delta\text{Ct}_{\text{IP}} - \Delta\text{Ct}_{\text{IN}}) \\ \text{Gen}^{\text{PROBLEMA}} \rightarrow \Delta\text{Ct}_{\text{PROBLEMA}} (\Delta\text{Ct}_{\text{IP}} - \Delta\text{Ct}_{\text{IN}}) \end{array} \right\} \text{F.E.} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct PROBLEMA} - \Delta\Delta\text{Ct CONTROL})}$$

Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de ChIP se describen en la Tabla 4.5.

Oligonucleótidos	Secuencia (5' → 3')	Posición respecto al ATG
MLP1		
MLP1 BOX1 UP	AATTTCACTGTTTCCGTTAACTGTTG	-453
MLP1 BOX1 DW	TCCTACGGTGCTTCCTGCAT	-313
MLP1 ORF1 UP	CACACAGCCTTATTTGTTCTTCAAC	+98
MLP1 ORF1 DW	TGGGTGCCCTCTTAAATGTCTT	+250
MLP1 ORF2 UP	CGACGGCTTCATTAAGGGTTATA	+555
MLP1 ORF2 DW	CCTACCAAGTAGTTCGGCCAAG	+687
MLP1 ORF3 UP	TCCTATGTAAGCCAACCTCCATCA	+1210
MLP1 ORF3 DW	TCCGTTCACTAGTTCACTATTTTCATG	+1359
MLP1-POL II UP	GCAAAAAGCCTATTTAATGTAAGTCC	-143
MLP1-POL II DW	AGGATAAAATCTTGGCCGAATG	+56
SRL3		
SRL3 BOX2-UP	ATTCACACGTTGTCTTCTTCTCAACA	-265
SRL3 BOX2-DW	TGTTCCCTTTTAGCTTTAGCCTT	-135
SRL3 POL II UP	AGGGAACAGGAGCCTAAGAATAGAG	-142
SRL3 POL II DW	GACTCTCATTACCGTTTCCAAT	+43
SRL3 ORF2 UP	CACGCACGCTAAAATCAAGA	+365
SRL3 ORF2 DW	CTAACGAGTGACAGCGCCTA	+520
PIR3		
PIR3 BOX UP	GGGGATCAAACGATTAGCAA	-301
PIR3 BOX DW	GCGCATGTTGTAATGAATGG	-160
PIR3 POL II UP	GCATGCTCTATTGATTTGTGTCTT	-126
PIR3 POL II DW	CGGAGACGACTAATGGCTTT	+31
PIR3 ORF2 UP	CCAAGTTCAGGCCACTACCT	+518
PIR3 ORF2 DW	TGGATCGTTAGCGTCTTTCA	+666
RLM1		
RLM1 BOX1 UP	GCAGCATCACCGGGTGA	-401
RLM1 BOX1 DW	TTATTGTTCAAGGAAGATCGAGCT	-270
CROV		
CROV UP	GGGAAGACCAATTTTCATGACGA	Región intergénica del cromosoma V
CROV DW	AATCTGCGTAAAAATGGCGTAAA	

Tabla 4.5: Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de ChIP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.8. ANÁLISIS TRANSCRIPTOMAL MEDIANTE MICROARRAYS DE DNA.

Para la realización de los experimentos con *microarrays* de DNA se emplearon los soportes de la marca *Affimetrix GeneChip® Yeast Genome 2.0*. (Santa Clara, CA, USA). Estos experimentos se han llevado a cabo en las instalaciones de la Unidad de Genómica de la UCM, incluyendo el marcaje de los RNAs problema, la hibridación de éstos en el soporte y el análisis básico de imágenes y resultados. A continuación, se detallan los aspectos metodológicos más relevantes del proceso.

4.8.1. Extracción de RNA.

Las células se procesaron de la manera descrita en el apartado 4.2.2. Se recogieron 5 ml de cultivo, que corresponden a una cantidad de 5×10^7 células aproximadamente. Este volumen se centrifugó a 2500 rpm durante 3 minutos a 4°C y el pellet de células resultante fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. Para la extracción de RNA, el pellet de células se resuspendió en una mezcla de buffer de lisis que contiene tiocianato de guanidina perteneciente al kit de extracción de RNA “*Nucleospin RNA*” (Macherey Nagel, Düren, Alemania), suplementado con DTT a una concentración final de 20 mM. A la mezcla anterior se le añadió el mismo volumen de bolitas de vidrio de 0,4 mm de diámetro previamente tratadas con HNO_3 durante una hora y lavadas con agua hasta neutralizar el pH. Las células se rompieron en *Fast-Prep®* (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), aplicando un programa de 20 segundos a velocidad 6 m/s dos veces, permaneciendo en hielo entre roturas. Posteriormente, se perforó la parte inferior del eppendorf con una aguja incandescente y se centrifugó a 13000 rpm a temperatura ambiente para obtener el lisado celular en un nuevo eppendorf. A partir de este paso se utilizó el kit de extracción de RNA “*Nucleospin RNA*” (Macherey Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se comprobó mediante cromatografía capilar utilizando el equipo Nano Bioanalyzer 2100B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.8.2. Síntesis, marcaje e hibridación de cDNA.

A partir de 5 µg de RNA total se sintetizó cDNA de doble cadena por retrotranscripción usando el kit “One-cycle cDNA Synthesis Kit” (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Posteriormente, este cDNA se purificó utilizando el “GeneChip Sample Cleanup Module” (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se utilizó como molde para la transcripción *in vitro* y obtener así cRNA marcado con biotina utilizando el “GeneChip IVT Labeling Kit”. Por último, se llevó a cabo la fragmentación química del cRNA marcado con biotina siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 100 nucleótidos. La concentración de RNA marcado obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro ND-1000 Nanodrop, (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

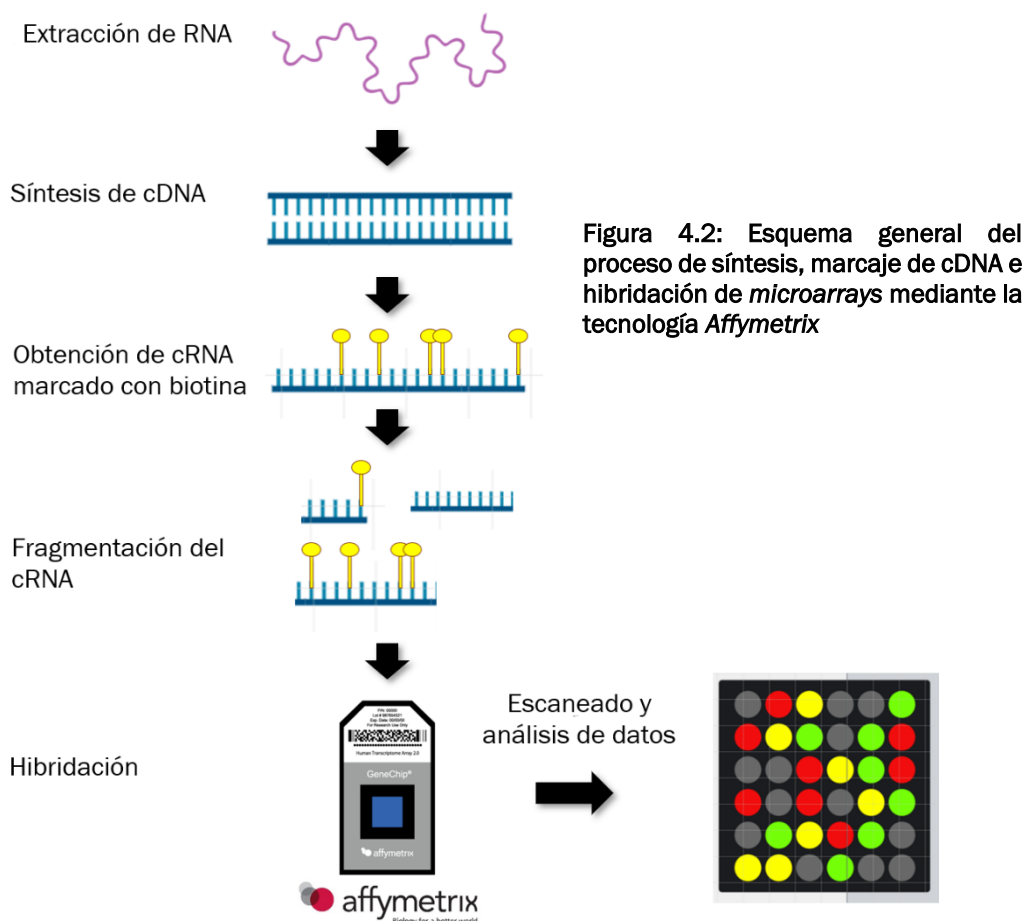
Se emplearon 15 µg del cRNA marcado en el cóctel de hibridación para cada *microarray* procediéndose a la hibridación durante 16 horas a 45°C. Una vez hibridados fueron procesados en la plataforma de fluidos “GeneChip® Fluidics Station 450”. El cRNA hibridado fue identificado mediante un conjugado estreptavidina-ficoeritrina. Las señales de fluorescencia fueron recogidas utilizando el escáner GeneChip® 3000.

4.8.3. Análisis de imágenes, procesamiento de datos y métodos estadísticos.

Los archivos generados en el escaneado de *microarrays* fueron convertidos a niveles de expresión génica utilizando el software GCRMA (Bioconductor) (Han et al., 2004). Para cada condición experimental, tres experimentos diferentes, correspondientes a tres muestras biológicas diferentes, fueron procesados y analizados. Los cambios en la expresión génica entre las condiciones experimentales de estudio fueron calculados como el *ratio* entre la media de las señales de expresión de cada gen en las muestras tratadas frente a las no tratadas. Los genes se han considerado como inducidos o reprimidos cuando su *ratio* de expresión en las condiciones analizadas fue ≥ 2 o $\leq 0,5$ respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Cyber-t, (cybert.microarray.ics.uci.edu/) (Baldi y Long, 2001). Aquellos valores con un *p-value* <0,01 se han considerado como significativos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el objetivo de determinar si la inducción en la expresión génica observada en la cepa silvestre tras el tratamiento con RC se encontraba alterada en un mutante *pat1Δ*, se utilizó la relación entre los *ratios* de expresión de cada gen, (tratadas con RC/no tratadas), de la cepa mutante frente a los de la cepa silvestre. Un valor del *ratio* [mutanteRC/mutante]/[silvestreRC/silvestre] $\leq 0,65$ se consideró como umbral para definir una reducción significativa en la inducción génica, de acuerdo con criterios previamente establecidos en nuestro grupo de investigación (García et al, 2009). Además, los genes que estaban por debajo del umbral definido anteriormente se consideraron como dependientes del mutante en condiciones basales si el valor del *ratio* [mutante/silvestre]/[silvestreRC/silvestre] era a su vez $\leq 0,65$. En todo caso, aquellos genes cuyo *ratio* de expresión fuera $< 1,65$ fueron considerados como no inducidos en las condiciones de estudio. El análisis de agrupamiento de genes según sus perfiles de expresión se realizó utilizando la aplicación MeV (Multiexperiment Viewer), versión 4.9 de TIGR. La gráfica de dispersión de los datos normalizados de expresión génica frente al correspondiente ORF fue obtenida con el programa *Spotfire* (Tibco). En la Figura 4.2 se muestra un esquema general de este proceso.



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.9. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.

Las células empleadas para los estudios de expresión génica fueron crecidas y se procesaron según lo descrito en el apartado 4.2.2, recogiendo un volumen final de cultivo de aproximadamente 3 ml. Las células se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C durante tres minutos y el pellet resultante fue congelado en nitrógeno líquido y posteriormente almacenado a una temperatura de -80°C.

El RNA de las células fue extraído y purificado mediante el kit de extracción de RNA “*Nucleospin RNA*” (Macherey Nagel, Düren, Alemania). La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit “*PrimeScript RT-PCR*” (Takara Bio, Shiga, Japón), siguiendo instrucciones del fabricante, empleándose 1 µg de RNA total. El programa de retrotranscripción consistió en 45 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C y 5 minutos a 4°C empleando el cebador oligo dT. El cDNA fue diluido en agua ultrapura miliQ a una concentración 1/100.

Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en placas multipocillo de 384 pocillos, por duplicado, con un volumen de muestra de 4 µL, 6 µL de 2xPower SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) más cada oligonucleótido a una concentración final de 5 µM. La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System®* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), en las instalaciones de la Unidad de Genómica de la UCM. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un paso de 10’ a 95°C seguido de 40 ciclos de 15” a 95°C y 1’ a 60°C.

La expresión relativa de cada gen de estudio fue normalizada relativizando los valores según la expresión del gen endógeno *ACT1* y siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ previamente descrito en (Livak & Schmittgen, 2001) y ya explicado en el apartado 4.7.4 de este trabajo. Para estos análisis, el valor ΔCt de las muestras, tanto tratadas como no tratadas, se obtiene restando los valores Ct correspondientes al gen de interés con los obtenidos para el gen *ACT1*. El valor $\Delta\Delta Ct$ se ha obtenido restando el valor ΔCt de las muestras no tratadas al valor ΔCt de las muestras tratadas y se ha aplicado la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para obtener el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que se va a utilizar como nivel de expresión. El valor relativo de expresión de cada gen tras el tratamiento se calcula considerando que el nivel de expresión del gen de interés respecto a *ACT1* en

4. MATERIALES Y MÉTODOS

ausencia de tratamiento es 1. En el esquema siguiente se resume el modelo matemático seguido para estos cálculos.

$$\left. \begin{array}{l} \text{Gen}^{\text{ENDÓGENO}} \rightarrow \Delta\text{Ct}_{\text{ENDÓGENO}} (\Delta\text{Ct}_{\text{sin tratar}} - \Delta\text{Ct}_{\text{tratadas}}) \\ \text{Gen}^{\text{PROBLEMA}} \rightarrow \Delta\text{Ct}_{\text{PROBLEMA}} (\Delta\text{Ct}_{\text{sin tratar}} - \Delta\text{Ct}_{\text{tratadas}}) \end{array} \right\} \text{F.E.} = 2^{-(\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{PROBLEMA}} - \Delta\Delta\text{Ct}_{\text{ENDÓGENO}})}$$

Los oligonucleótidos utilizados en esta técnica se resumen en la siguiente tabla (Tabla 4.6):

Oligonucleótido	Gen	Secuencia
MLP1-RP MLP1-UP	<i>MLP1</i>	TCCTTCCCTTCAAACATTGGTT TGAATTATCAAGAATGCACAAAAGC
SRL3-F SRL3-R	<i>SRL3</i>	TTCGTCCAAACATGCCAAA GACCAACGTAACGGCGAAA
PIR3-F PIR3-R	<i>PIR3</i>	TCGTTGCCAACAGACAGTTC TTCATGGCACTGAGAACCAA
ACT-F ACT-R	<i>ACT1</i>	ACGAAAGATTGAGAGCCCCA GCAGATTCCAAACCCAAAACA

Tabla 4.6: Relación de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de expresión génica por PCR cuantitativa.

4.10. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para el desarrollo de estos experimentos, se utilizaron las cepas de la colección “Yeast *GST Fusion collection and strains*”, (Dharmacon, Laffayette CO, USA). Esta colección está compuesta por células de la cepa silvestre BY4741 transformadas con un plásmido en el que se ha clonado el ORF del gen de interés fusionado en su extremo N-terminal a la secuencia codificante de la GST, que corresponde a la Glutión-S transferasa de *Schistosoma Japonicum*, bajo el control del promotor *GAL1/10*. Las cepas de la colección utilizadas en este trabajo se han transformado adicionalmente con un plásmido multicopia (pRS423) expresando el gen de *SLT2* fusionado a tres copias del epítipo HA bajo el control de su propio promotor (Tabla 4.2).

Las células se cultivaron durante toda la noche en agitación a 24°C en medio YPS, a la mañana siguiente se diluyeron las células en medio fresco YPS suplementado con galactosa al 2%, hasta una D.O.₆₀₀ de 0,2 y se incubó de nuevo el cultivo durante 4 horas para permitir la expresión de la proteína fusionada a GST. Transcurrido ese tiempo, el cultivo se separó en dos partes, a una se le añadió RC a una concentración de 30 µg/ml y la otra se dejó creciendo en las mismas condiciones. Tras dos horas

4. MATERIALES Y MÉTODOS

de tratamiento con RC, se recogieron 45 ml de medio de cultivo que se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C durante 3 minutos. El pellet resultante se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su lisis.

Las células recogidas se rompieron para la extracción de proteínas de la manera descrita en el apartado 4.6.1, utilizando un tampón de lisis sin Tritón ni SDS, quedando su composición de la siguiente manera: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% glicerol, 0,1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM β -glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico. Este tampón también se suplementa con inhibidores de proteasas que se añaden en el momento de su uso como ya se ha descrito previamente.

La concentración del extracto proteico se determinó por el método de Bradford. Las muestras se dejaron a una concentración de 450 mg/ml en un volumen final de 400 μ l de tampón de lisis para la fracción inmunoprecipitada (IP) y en un volumen final de 40 μ L para el control (IN) utilizando el 5% de la cantidad de proteína que se utilizó para el IP.

A la fracción IP se le añadieron 50 μ l de la resina *Glutathione Sepharose® 4 Fast Flow* (GE-Healthcare, Chicago, IL, USA) y se dejaron en rotación durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las muestras se centrifugaron a 4°C a una velocidad de 2500 rpm durante 2 minutos, se descartaron los sobrenadantes y se añadió 1 ml de tampón de lisis a cada muestra y se mantuvieron en rotación 5 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C y se aspiraron los sobrenadantes. Este paso se repitió 10 veces. Tras los lavados, tanto a la fracción IP como al IN se les añadieron 40 μ L de tampón de carga SDS-PAGE 2x (125 mM Tris HCL pH 6,8; 5% SDS, 25% glicerol, 0,6 g de azul de bromofenol por cada 50 ml de preparación y DTT a una concentración final de 200 mM) y se hirvieron ambas fracciones durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la fracción IP se centrifugó durante 2 minutos a 13000 rpm y a 4°C para obtener el sobrenadante mientras la fracción IN se mantuvo en hielo. Tanto la fracción IN como la IP se cargaron en geles de poliacrilamida de porcentaje 8-10% siguiendo el proceso descrito en los apartados 4.6.2 y 4.6.3. Posteriormente se realizó la inmunodetección con anticuerpos anti-HA y anti-GST (Tabla 4.3).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.11. MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA.

Los experimentos de microscopía confocal de fluorescencia se han llevado a cabo en las instalaciones del Instituto de Biología Funcional y Genómica, (IBFG), de Salamanca, centro mixto CSIC-USAL, gracias a una colaboración científica con el profesor Carlos R. Vázquez de Aldana.

Para los experimentos de visualización de PBs, se transformaron las cepas correspondientes con los plásmidos Dcp2-GFP, Pat1-GFP, Dhh1-GFP o Edc3-mCherry según el experimento de interés. Para la visualización de gránulos de mRNA se transformó la cepa de interés con los plásmidos U1A-GFP y *MLP1-U1A*, *CRG1-U1A*, *SRL3-U1A* y *PGK1-U1A* según el gen de interés (Tabla 4.2).

Las células se cultivaron en medio SC sin los aminoácidos correspondientes a cada marcador de selección durante toda la noche a 24°C y se diluyeron a la mañana siguiente a una D.O.₆₀₀ de 0,2 en medio YPD fresco incubando el cultivo durante dos horas. Posteriormente, los cultivos se separaron en dos o tres partes según el experimento: a una no se le añadió sustancia alguna (control negativo) y a la segunda se les añadió RC a 30 µg/ml o ZYM 0,8 U/ml. Pasados los tiempos de tratamiento correspondientes a cada experimento, se recogió 1 ml de cultivo que se centrifugó a 5000 rpm durante 30 segundos a temperatura ambiente. Después el medio fue decantado y el pellet de células se resuspendió en PBS e, inmediatamente, las células se visualizaron al microscopio confocal de fluorescencia.

Las imágenes de microscopía se han obtenido utilizando un microscopio Olympus IX81 (Olympus Corporation, Tokio, Japón), equipado con un sistema de microscopía confocal Yokogawa *Spinning Disk* (Roper Technologies, Sarasota, FL, USA) y una cámara *Evolve EMCCD* (Photometrics, Tucson, AZ, USA) que usa el software MetaMorph (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa de código abierto Fiji-ImageJ. Todas las imágenes fueron generadas utilizando proyecciones de 3-5 en el plano Z separadas por 0,3-0,5 µm. Para contar los PBs, se utilizaron las herramientas del programa Fiji-ImageJ “*thresholding*” y “*analyze particle*” de la manera descrita en Buchan 2010.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos llevados a cabo a lo largo de este trabajo se han realizado utilizando el método *t* de Student. Se ha considerado que las diferencias observadas en las diversas determinaciones realizadas son estadísticamente significativas cuando el *p-value* (P) obtenido ha sido menor que 0,05. Los cálculos se han realizado con el programa *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software, San Diego, California USA).

5.RESULTADOS

5.1. EL ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR EN *Saccharomyces cerevisiae* INDUCE LA FORMACIÓN DE *P-BODIES*.

Teniendo en cuenta los datos previos que relacionaban a proteínas implicadas en la formación de PBs con daños causados sobre la pared celular, nos propusimos en primer lugar dilucidar si el estrés sobre la pared inducía la formación de PBs. Para ello, se transformó la cepa silvestre BY4741 con construcciones plasmídicas que portan fusiones a GFP en el extremo C-terminal de las proteínas Dcp2 y Pat1, marcadores característicos de la formación de PBs. Las células se crecieron en ausencia o presencia de los compuestos que interfieren con la integridad de la pared celular Rojo Congo (RC) o zimoliasa (ZYM) a concentraciones subletales de 30 µg/ml y 0,8 U/ml, respectivamente, durante 1 hora de incubación en agitación a 24°C. Posteriormente, las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia confocal comprobándose que el tratamiento con los dos compuestos anteriores inducía la formación de PBs de manera significativa tanto en el porcentaje de células que presentan PBs como en el número de PBs por célula. Con el marcador Dcp2-GFP se observaron, en condiciones normales, unos 35 PBs por cada 100 células repartidos en un 24 % de las células, mientras que, en presencia de estrés, estas estructuras aumentaron a unas 200-250 por cada 100 células, detectándose Dcp2-GFP en un 75-80% de ellas (Figura 5.1A). Con el marcador Pat1 se observaron menos PBs en general que con Dcp2, pero manteniéndose unas proporciones similares (Figura 5.1A). Como era de esperar, y estudiados a título comparativo, la formación de estas estructuras también se indujo en las células que expresan Dcp2-GFP después de su exposición a otros tipos de estrés previamente relacionados con la formación de PBs como la carencia de glucosa y los estreses oxidativo (H₂O₂) y osmótico (KCl) (Teixeira et al., 2005) (Figura 5.1A).

Para confirmar que los focos puntiformes citoplasmáticos de emisión fluorescente correspondientes a Dcp2-GFP y a Pat1-GFP correspondían a PBs, se llevó a cabo el mismo experimento utilizando la cepa mutante *pat1Δ* y el doble mutante *edc3Δpat1Δ*. Estas cepas se eligieron por ser defectivas en la formación de PBs (Buchan et al., 2008). Como se observa en la Figura 5.1B, los gránulos que contienen Dcp2-GFP tras la exposición al estrés de pared, se reducen drásticamente

5. RESULTADOS

en el mutante *pat1Δ* tras la exposición a RC o ZYM, siendo prácticamente inexistentes en la cepa *edc3Δpat1Δ*.

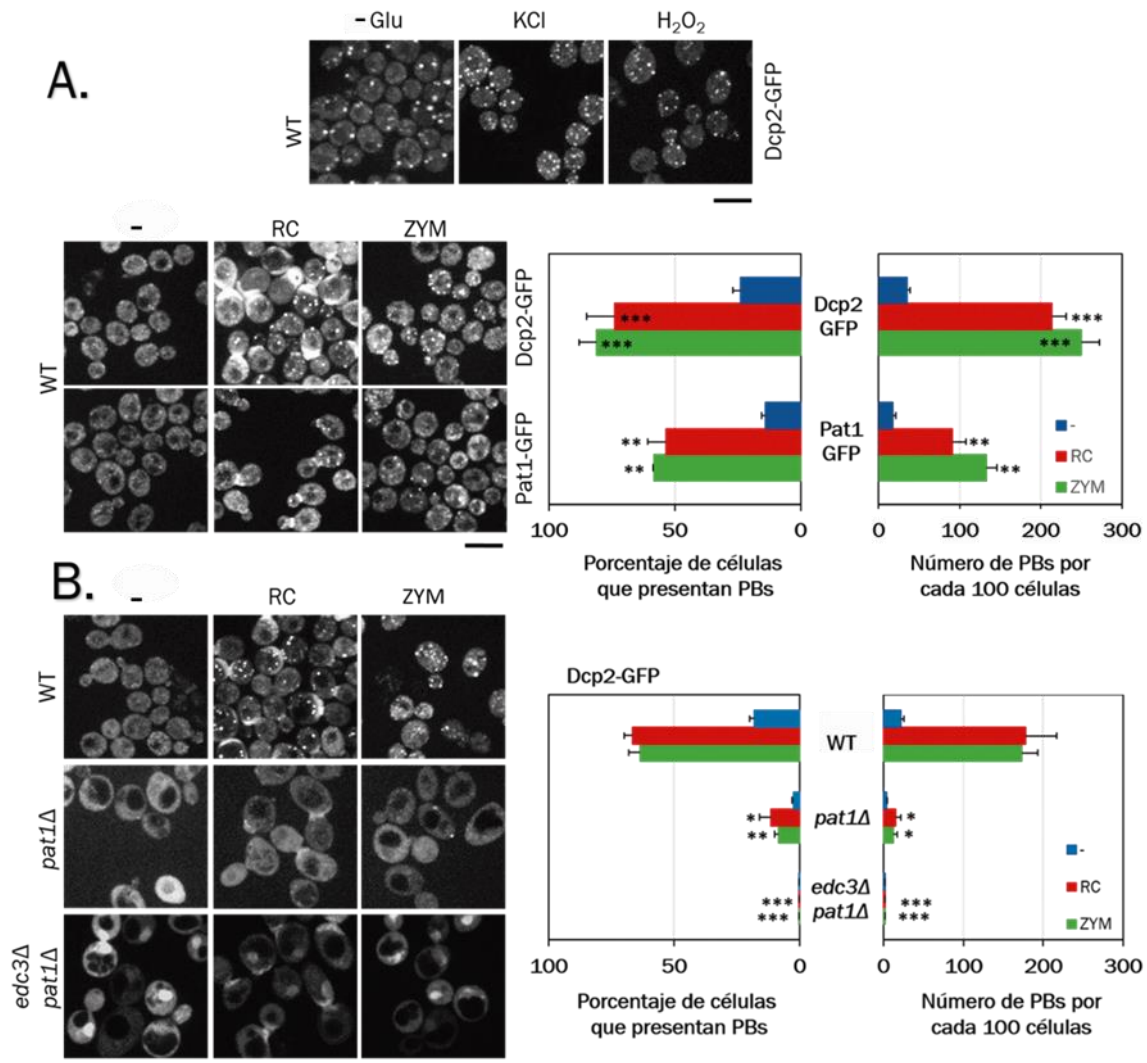


Figura 5.1: El estrés de pared induce la formación de PBs. (A) En el panel superior se muestran células de la cepa silvestre transformadas con el plásmido Dcp2-GFP sometidas a carencia de glucosa (izquierda) y tratadas con KCl 1M (centro) y H₂O₂ a una concentración de 3 mM (derecha) durante 15 minutos. En el panel inferior se muestran células tratadas durante 1h con Rojo Congo (RC) a una concentración de 30 µg/ml y zimoliasa (ZYM) a 0,8 U/ml. La fila superior corresponde a las células expresando Dcp2-GFP y la inferior a Pat1-GFP. (B) La formación de PBs se estudió usando el reportero Dcp2-GFP en la cepa silvestre, *pat1Δ* y *edc3Δpat1Δ*, tratadas con RC y ZYM en las mismas condiciones que en (A). Los histogramas, en ambos casos, muestran el porcentaje de células que presentan PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha), teniendo en cuenta las medias y desviaciones estándar de tres experimentos en los que, al menos, se han analizado 100 células en cada uno de ellos. La formación de PBs se estudió mediante microscopía confocal de fluorescencia. El estudio estadístico se realizó mediante una prueba *t* de Student comparando los valores de las células tratadas con los valores de las células sin tratar para los experimentos mostrados en (A) o los datos correspondientes a la cepa silvestre con los datos de las cepas mutantes para los experimentos analizados en (B). Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). La barra de escala corresponde a 5 µm.

Dado que la formación de otro tipo de complejos citoplasmáticos RNA-proteína, como son los gránulos de estrés (SGs), se ha asociado a diversas condiciones de estrés sobre las células, como ocurre con el choque térmico (Grouši *et al.*, 2009) o el etanol (Kato *et al.*, 2011), se decidió estudiar si el RC o la ZYM inducían la formación de estos gránulos en la cepa silvestre. De igual forma que para el estudio de PBs, en este caso, se emplearon como marcadores de la presencia y ensamblaje de SGs las proteínas implicadas en la estabilización de mRNAs, fusionadas a proteínas fluorescentes, Pab1-GFP y Pub1-mCherry (Anderson *et al.*, 1993). Para ello, se trataron las células con etanol al 15%, concentración suficiente para inducir la formación de gránulos de estrés (Kato *et al.*, 2011), además de con RC y ZYM. En la Figura 5.2, se puede observar que, tras el tratamiento con etanol, aparecen puntos de fluorescencia concentrados en el citoplasma correspondientes a las proteínas Pab1 y Pub1. Sin embargo, tras el tratamiento con RC y ZYM, aparece fluorescencia dispersa por el citoplasma y no concentrada en puntos discretos, concluyendo por tanto que el estrés de pared no induce la formación de gránulos de estrés.

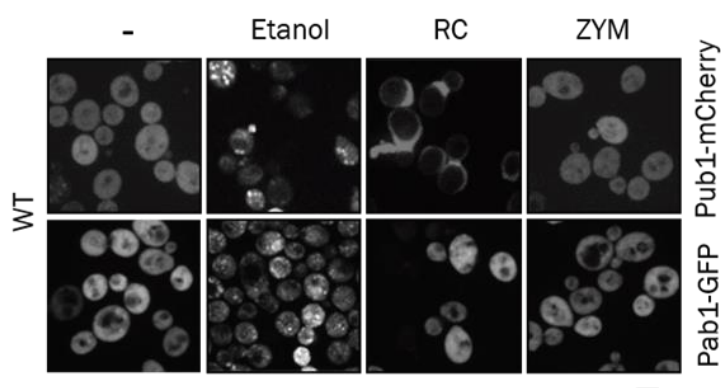


Figura 5.2: El estrés de pared no induce la formación de gránulos de estrés. Las células de la cepa silvestre BY4741, se transformaron con los plásmidos expresando Pub1-mCherry y Pab1-GFP. En la columna de la izquierda se muestran las células sin tratar, seguido de las células tratadas con etanol, RC y ZYM, respectivamente. Se ha utilizado etanol al 15% durante 30 minutos y RC (30 $\mu\text{g/ml}$) y ZYM (0,8 U/ml) durante una hora. El panel superior corresponde a las imágenes obtenidas mediante la visualización de Pub1-mCherry y el inferior a Pab1-GFP mediante microscopía confocal de fluorescencia. Barra de escala: 5 μm .

5. RESULTADOS

5.2. PERFIL TEMPORAL DE FORMACIÓN DE *P-BODIES* EN PRESENCIA DE AGENTES QUE INTERFIEREN CON LA INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR.

A diferencia de otros tipos de estrés celular que provocan respuestas adaptativas rápidas, el estrés de pared produce una respuesta de adaptación celular más tardía pero sostenida en el tiempo (Sanz et al., 2018). Por esta razón, se decidió estudiar el perfil temporal de formación de PBs, tras la exposición a RC y ZYM, durante 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos en la cepa silvestre expresando Dcp2-GFP como marcador de PBs.

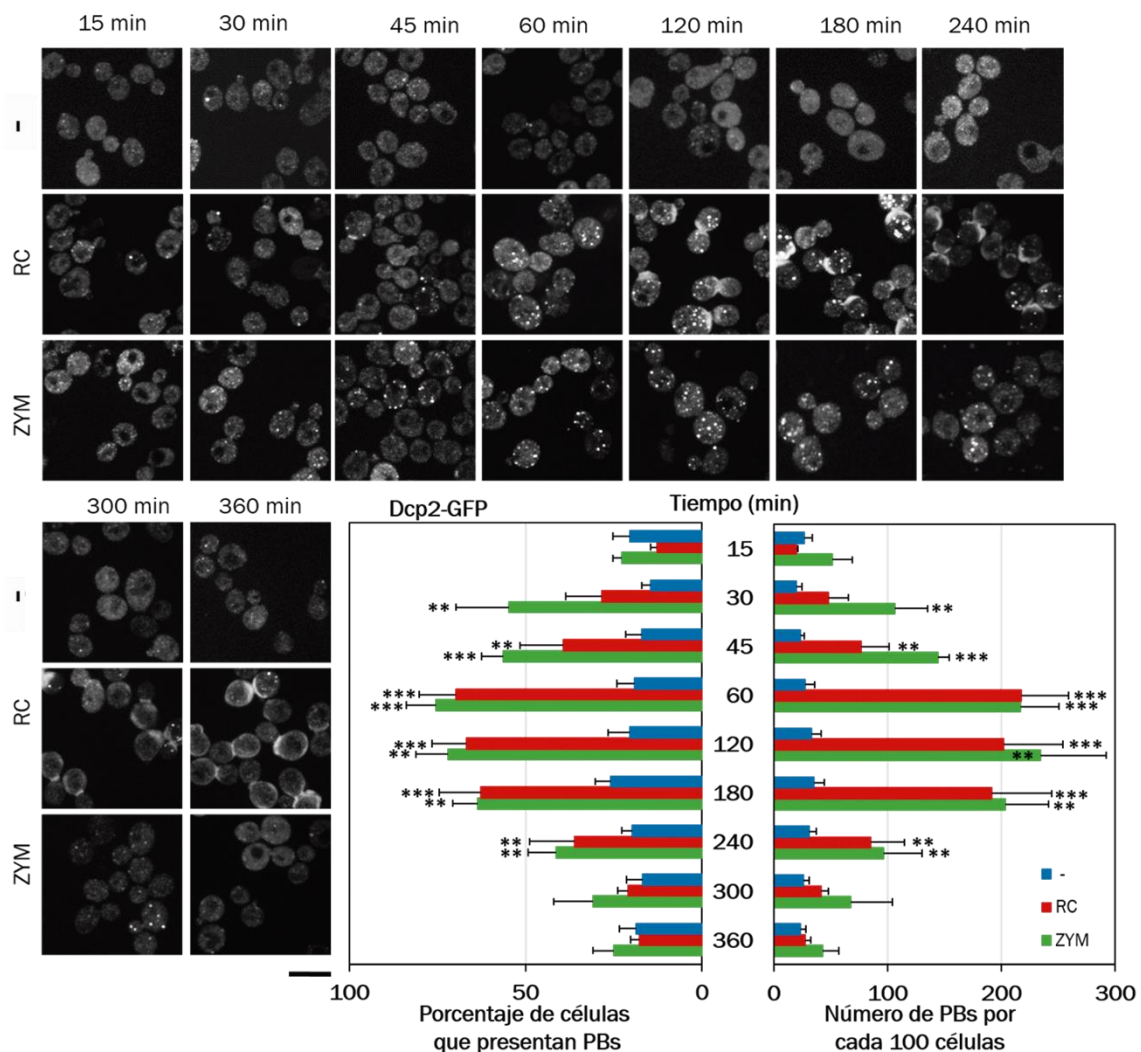


Figura 5.3: Cinética de formación de PBs tras el tratamiento con RC y ZYM. Las imágenes de microscopía muestran la formación de PBs desde los 15 minutos a los 360 min (6 horas) tras el tratamiento con RC (30 $\mu\text{g/ml}$) y ZYM (0,8 U/ml), utilizando el marcador Dcp2-GFP para su visualización por microscopía confocal de fluorescencia. Los histogramas reflejan el porcentaje de células que presentan PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha), teniendo en cuenta las medias y desviaciones estándar de tres experimentos con al menos 100 células analizadas en cada uno de ellos. El análisis estadístico se ha llevado a cabo mediante una prueba *t* de Student comparando los valores de las células tratadas con los valores de las células sin tratar a cada tiempo estudiado. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). Barra de escala: 5 μm .

Como se observa en la Figura 5.3, a los 15 minutos de tratamiento, ya se detectó un ligero aumento en el número de PBs en las células, incrementándose su número hasta alcanzar el pico máximo de formación entre los 60 y 180 minutos de tratamiento. Pasado este tiempo, los niveles de PBs descienden, llegando a alcanzar valores próximos a los de las células sin tratar a los 360 minutos.

Este perfil temporal coincide con el perfil de fosforilación/activación de la MAPK de la ruta CWI Slt2, en estas mismas condiciones de crecimiento (García et al., 2004; García et al., 2009), lo que sugiere que la ruta CWI regula la formación de PBs en las condiciones en estudio.

5.3. PARTICIPACIÓN DE RUTAS DE MAPKs EN LA FORMACIÓN DE *P-BODIES* CONSECUENCIA DEL ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.

Con el fin de investigar en detalle si la señalización a través de la ruta CWI estaba relacionada con la formación de PBs, se procedió a cuantificar su presencia en diversas cepas mutantes carentes de elementos de la ruta CWI como los sensores de la misma, Mid2 y Wsc1, componentes del módulo de MAPKs como Bck1 y Slt2 y el factor de transcripción Rlm1. Además, como se ha descrito la participación de la ruta HOG de forma cooperativa junto a la ruta CWI en el caso particular de la señalización activada por la ZYM (Bermejo et al., 2008), también se han estudiado cepas mutantes carentes de los sensores de esta ruta Hkr1 y Sho1, así como en la MAPK Hog1. Para la realización de estos experimentos, se transformaron células de la cepa silvestre BY4741 y de los mutantes mencionados anteriormente con el plásmido Dcp2-GFP y se crecieron en ausencia o presencia de RC y ZYM durante 1 hora para su posterior análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia.

5. RESULTADOS

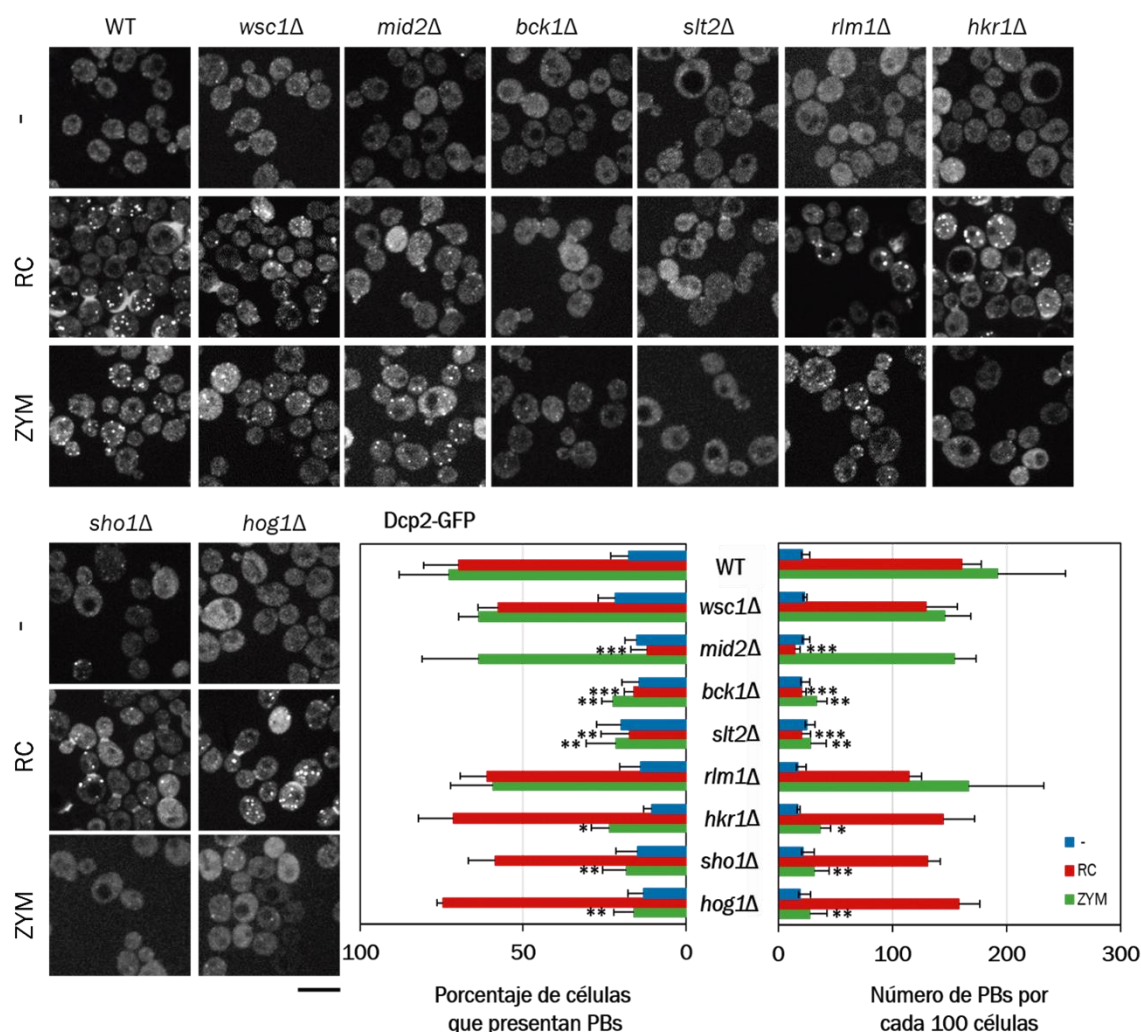


Figura 5.4: La ruta CWI controla la formación de PBs en condiciones de estrés sobre la pared celular. La cepa silvestre y los mutantes indicados expresando Dcp2-GFP, fueron tratados durante una hora con RC (30 µg/ml) y ZYM (0,8 U/ml) y visualizados mediante microscopía de fluorescencia confocal para proceder a la cuantificación de PBs. Los histogramas muestran la media y desviación estándar de tres experimentos, de al menos 100 células cada uno de ellos, del porcentaje de células que presentan PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha). El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los datos de la cepa silvestre con los obtenidos en los mutantes para cada tratamiento. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). Barra de escala: 5 µm.

Como se muestra en la Figura 5.4, en todos los casos analizados, se encontró una asociación entre el efecto sobre la activación de Slt2 de los mutantes analizados y el bloqueo específico del ensamblaje de PBs. Así, la formación de PBs mediada por RC se bloquea en los mutantes *mid2Δ*, *bck1Δ* y *slt2Δ*, mientras que en el caso de la ZYM este efecto se observa en el caso de los mutantes *bck1Δ*, *slt2Δ*, *sho1Δ*, *hkr1Δ* y *hog1Δ*, de acuerdo con el papel adicional de la ruta HOG en estas condiciones. Estos resultados apoyan la idea de la especificidad del ensamblaje de PBs dependiendo

del tipo de daño causado sobre la pared celular. De hecho, el mutante *wsc1Δ* no mostró efecto significativo frente a ambos estreses, cuando es conocido que no es un elemento importante en la activación de la ruta CWI por RC o ZYM, pero si frente al tratamiento con caspofungina (inhibidor de la actividad β 1,3 glucán-sintasa) (Bermejo et al., 2010).

Es importante destacar que, en el caso del mutante en el factor de transcripción principal de la ruta, Rlm1, la formación de estas estructuras fue similar a la de la cepa silvestre en ambos estímulos (Figura 5.4), lo que indica que la actividad transcripcional de Rlm1 no es necesaria en este proceso.

5.4. LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE Slt2 ES ESENCIAL PARA LA FORMACIÓN DE *P-BODIES*.

Una vez establecida la participación de la ruta CWI en la formación de PBs, se analizó la necesidad de la actividad catalítica (quinasa) de Slt2 en este fenómeno, teniendo en cuenta su función determinante en diversos procesos controlados por la ruta CWI, como por ejemplo la respuesta transcripcional compensatoria en situaciones de estrés sobre la pared celular (Rodríguez-Peña et al., 2010). Para ello, se analizó la formación de PBs en células de levadura expresando el alelo de Slt2, *Slt2K54R*, que presenta una mutación en el sitio de unión a ATP del centro catalítico de Slt2, lo que impide la unión de ATP y, por lo tanto, su actividad quinasa.

Al inspeccionar en el microscopio de fluorescencia la cepa *slt2Δ* transformada con un plásmido centromérico portando el alelo *Slt2K54R*, además del que contiene Dcp2-GFP, se pudo observar que la formación de PBs en presencia de RC y ZYM se encontraba completamente inhibida (Figura 5.5). El efecto se observó, no sólo tras la primera hora tras el tratamiento, sino también a tiempos más largos (4 horas). Este resultado sugiere que la actividad quinasa de Slt2 es necesaria, no sólo para el ensamblaje inicial de PBs, sino también para su mantenimiento en el tiempo (Figura 5.5).

5. RESULTADOS

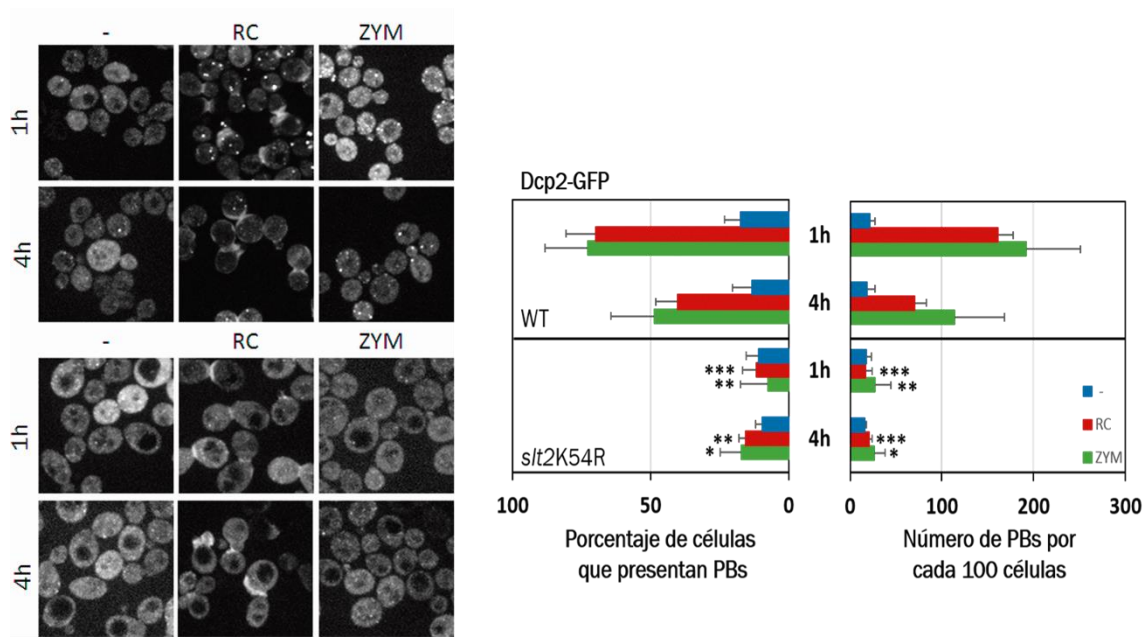


Figura 5.5: La actividad catalítica de Slt2 es esencial por la formación de PBs bajo condiciones de estrés de pared. Las cepas WT y *slt2Δ* se transformaron con el plásmido Dcp2-GFP y la cepa *slt2Δ* además con otro que porta la versión mutante de Slt2, *Slt2K54R*. Ambas cepas se trataron con RC (30 μ g/ml) o ZYM (0,8 U/ml). Las células se visualizaron por microscopía confocal de fluorescencia a la hora y a las 4 horas después del tratamiento utilizando el marcador Dcp2-GFP. Los histogramas indican el porcentaje de células que presentan PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha), teniendo en cuenta las medias y desviaciones estándar de tres experimentos con al menos 100 células analizadas en cada uno de ellos. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores de las células tratadas con las no tratadas para cada tiempo estudiado. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). Barra de escala: 5 μ m.

Para caracterizar este efecto en más detalle, hemos aprovechado la reciente construcción y caracterización funcional de una variante mutante de Slt2, denominada Slt2as (de *analogue sensitive*), cuya actividad quinasa puede ser específicamente inhibida por análogos voluminosos del ATP como el 2,3-dimetilbencil-pirazol-pirimidina o 2,3-DMB-PP1 (Alonso-Rodríguez et al., 2016). Este sistema nos permitió inhibir la actividad quinasa de Slt2-as una vez se ha activado el ensamblaje de PBs tras el tratamiento con ZYM y poder evaluar su efecto a lo largo del tiempo. Con este objetivo la cepa *slt2Δ* se transformó con dos plásmidos, uno expresando el alelo Slt2as y el otro portando el marcador de PBs Dcp2-GFP.

Como se muestra en la Figura 5.6, al tratar las células con ZYM, aumentó la formación de PBs tras una hora de tratamiento, manteniéndose a niveles semejantes tras dos y tres horas de incubación, como ya se describió en apartados anteriores. Sin embargo, tras la adición del inhibidor 2,3-DMB-PP1 una vez transcurrida una hora de tratamiento con ZYM, se redujo drásticamente el número de gránulos Dcp2-GFP

5. RESULTADOS

positivos, presentando valores similares a los de las células sin tratar. Estos datos confirman que la actividad quinasa de Slt2 no sólo es necesaria para la formación de los PBs sino que también es necesaria para el mantenimiento en el tiempo de estas estructuras.

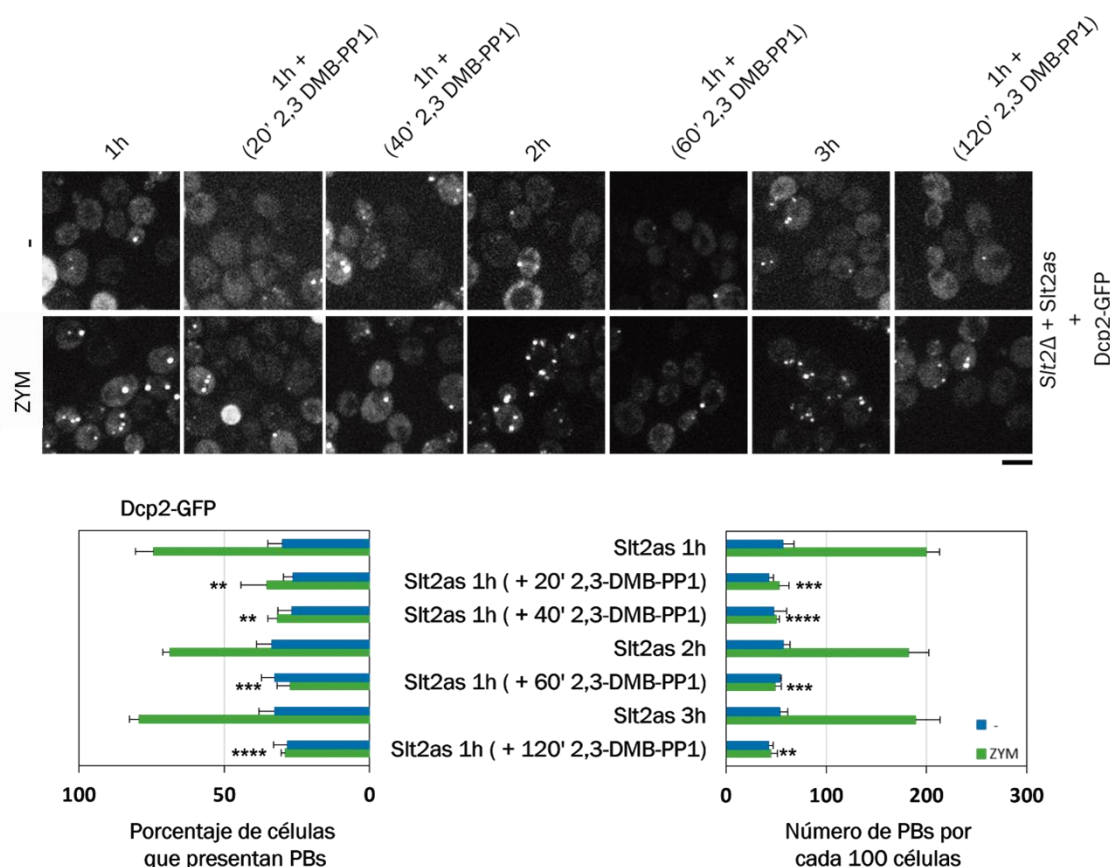


Figura 5.6: La inhibición de la actividad catalítica de Slt2 bloquea el ensamblaje de PBs a lo largo del tiempo en condiciones de estrés de pared. La cepa mutante *slt2Δ* ha sido transformada con los plásmidos Slt2as y Dcp2-GFP y se ha tratado con ZYM (0,8 U/ml). A la hora de tratamiento con ZYM, a una parte del cultivo se le añadió tanto a las células tratadas como no tratadas el inhibidor de quinasas 2,3-DMB-PP1 (40 μM), mientras que la otra parte se mantuvo creciendo sin inhibidor. Las células se visualizaron por microscopía confocal de fluorescencia para ver la formación de PBs utilizando el marcador Dcp2-GFP cada hora tras el tratamiento con ZYM y a los 20, 40, 60 y 120 minutos tras la adición del inhibidor. Los histogramas muestran la media y desviación estándar de tres experimentos con al menos 100 células cada uno de ellos. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores de las células tratadas con las no tratadas para cada tiempo estudiado. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$), ($P^{****} \leq 0,0001$). Barra de escala: 5 μm.

Como colofón al control ejercido por la MAPK Slt2 en el ensamblaje de PBs, nos propusimos investigar si este control era específico del estrés sobre la pared celular, o si también participaba en la formación de PBs descrito previamente para otros tipos de estrés como el osmótico u oxidativo (Teixeira et al., 2005). Como se indica en la Figura 5.7, la inducción en la formación de PBs tras el tratamiento con KCl 1M

5. RESULTADOS

o H_2O_2 3 mM no se vio afectada en una cepa *slt2Δ*, en comparación con el resultado obtenido con la cepa silvestre. Este resultado apoya la idea de la existencia de mecanismos específicos de estrés en la inducción de estos agregados citoplasmáticos.

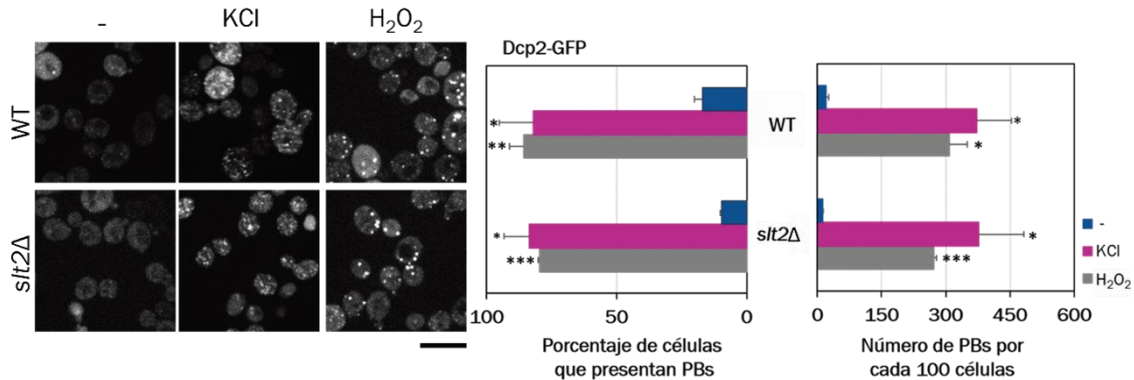


Figura 5.7: Slt2 no interviene en la formación de PBs en estrés osmótico u oxidativo. Las cepas WT y *slt2Δ* se transformaron con el plásmido Dcp2-GFP y se trataron durante 15 minutos con KCl (1 M) o H_2O_2 (3 mM). Los histogramas muestran la media y desviación estándar de 3 experimentos, con al menos 100 células cada uno de ellos, del porcentaje de células que presentan PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha). El análisis estadístico se ha realizado con una prueba *t* de Student comparando los datos correspondientes a las células tratadas con las no tratadas. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). Barra de escala: 5 μm .

5.5. LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA cAMP-PKA BLOQUEA LA FORMACIÓN DE *P-BODIES* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.

En relación a la información disponible sobre rutas de señalización implicadas en el ensamblaje de PBs en diversas condiciones de estrés celular, destaca el efecto mediado por la ruta cAMP/PKA. Esta ruta es la principal responsable de la coordinación entre el crecimiento celular y la disponibilidad de nutrientes y se ha descrito que desempeña un papel importante en la formación de PBs mediante la modulación del estado de fosforilación de Pat1, diana de la proteín-quinasa A (PKA) dependiente de cAMP. De hecho, la formación de PBs como consecuencia de una extensa variedad de condiciones de estrés, se anula en situaciones de activación de PKA a través de la fosforilación de Pat1, aunque el mecanismo molecular implicado permanece sin caracterizar (Shah et al., 2014; Romero-Santacreu et al., 2009; Ramachandran et al., 2011).

Para estudiar si la formación de PBs en condiciones de estrés de pared se veía alterada en condiciones de activación de la ruta cAMP/PKA a través de la fosforilación de Pat1, células del mutante *pat1Δ* se transformaron con el plásmido incluyendo Dcp2-GFP y con un segundo plásmido portando el alelo hiperactivo de la proteína Ras2, Ras2^{val19}, que conduce a la hiperactivación de PKA a través del incremento de los niveles de cAMP intracelular. Además, empleando estos transformantes como base, se introdujo un tercer plásmido expresando diversas variantes mutantes de Pat1 en el sitio de fosforilación por PKA, como se describe a continuación. Pat1-SS corresponde a la versión silvestre de Pat1, incluyendo las serinas de las posiciones 456 y 457, dianas de la proteín-quinasa A. Pat1-AA que expresa una versión mutada de Pat1 en la que se han reemplazado las dos serinas anteriormente mencionadas por alaninas, impidiendo la fosforilación de Pat1 por PKA. Y por último, el alelo fosfomimético Pat1-EE en el que se han reemplazado las serinas por residuos de ácido glutámico.

Tras la exposición durante una hora a RC y ZYM, se procedió a examinar las células al microscopio de fluorescencia confocal. observándose que en las células que expresan la versión silvestre de Pat1 se visualizaron alrededor de 150 PBs repartidos en torno al 70% de las células en ambos estreses. Sin embargo, en la cepa que co-expresa la versión silvestre de Pat1 junto al alelo hiperactivo Ras2^{val19}, es decir, cuando la ruta PKA se mantiene activa constitutivamente, se produjo una reducción drástica del número de PBs, llegando a visualizarse unos 20 PBs repartidos en un 10% de las células.

En el caso de las células que expresan la versión mutada de Pat1, Pat1-AA, se observaron aproximadamente 130 PBs repartidos en el 60% de las células tanto en células sin exponer a RC o ZYM como en ambas condiciones de estrés, manteniéndose estos valores al co-expresar el alelo hiperactivo de Ras2. Sin embargo, las células que expresan la versión fosfomimética de Pat1 (Pat1-EE), presentaron un descenso significativo en el ensamblaje de PBs, con aproximadamente 20 PBs distribuidos en torno al 15% de las células, independientemente de la activación de PKA. (Figura 5.8).

Estos resultados confirman que la relación entre la ruta PKA y la formación de PBs a través de la fosforilación de Pat1, ya descrita en otros tipos de estrés (Shah et al., 2014), también tiene lugar en situaciones de daño sobre la pared celular causado por los compuestos RC y ZYM.

5. RESULTADOS

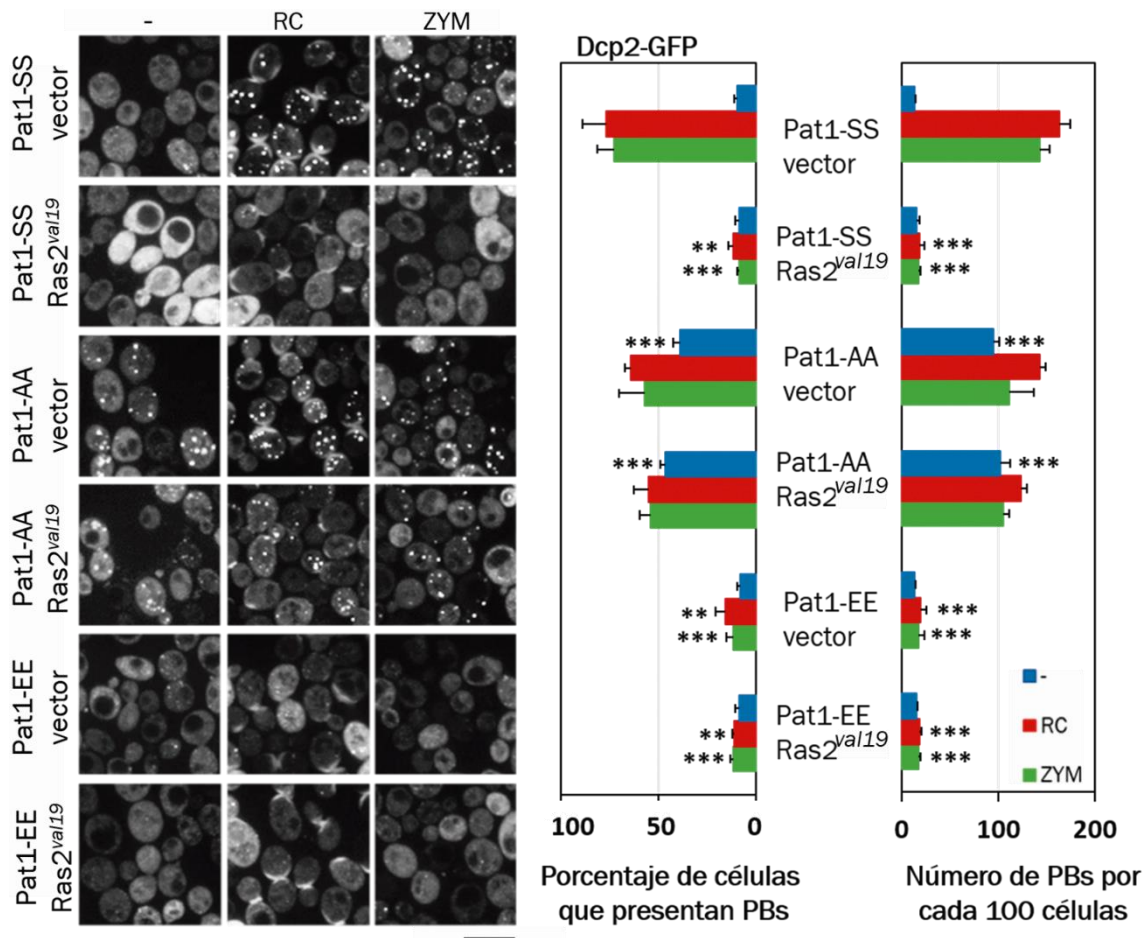


Figura 5.8: La activación de la ruta PKA inhibe la formación de PBs en condiciones de estrés de pared. El mutante *pat1Δ* se transformó con el plásmido Dcp2-GFP y con otro plásmido que porta la versión hiperactiva de Ras2 (Ras2^{val19}) o el correspondiente vector vacío en combinación con plásmidos que incluyen la versión silvestre de Pat1 (Pat1-SS), la versión no fosforilable de Pat1 (Pat1-AA) y la versión fosfomimética de Pat1 (Pat1-EE). Las células se trataron con RC (30 μg/ml) o ZYM (0,8 U/ml) durante una hora y posteriormente se visualizaron al microscopio de fluorescencia confocal. Los histogramas muestran la media y desviación estándar de tres experimentos con al menos 100 células cada uno de ellos. El análisis estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los datos de las células tratadas y no tratadas respecto a los obtenidos en las células que expresan la versión silvestre de Pat1 (Pat1-SS). Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). Barra de escala: 5 μm.

5.6. mRNAs DE GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI LOCALIZAN EN *P-BODIES* EN SITUACIONES DE ESTRÉS.

La ruta CWI controla la respuesta transcripcional asociada al mantenimiento de la viabilidad celular en condiciones en las que la integridad de la pared celular se ve comprometida. Teniendo en cuenta que los PBs son acúmulos citoplasmáticos tanto

de proteínas como de mRNA y que se ha propuesto que su principal función está relacionada con el metabolismo de ciertos mRNAs que se localizan en estas estructuras, procedimos a monitorizar el patrón de localización de mRNAs de tres genes regulados transcripcionalmente por la ruta CWI, como son *MLP1*, *CRG1* y *SRL3*. Para visualizar *in vivo* la localización subcelular de mRNA se empleó el método de la proteína U1A, el cual consiste en insertar un módulo que contiene múltiples sitios de unión para la proteína de unión a RNA humana U1A en la zona 3' UTR del gen de interés, justo después del codón de terminación (Figura 5.9).

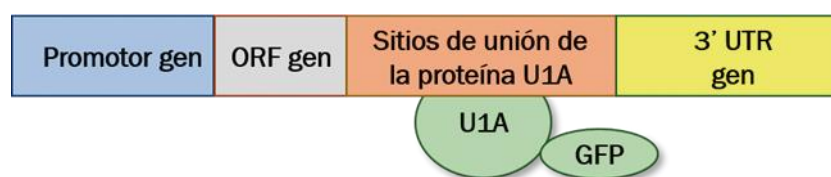


Figura 5.9: Esquema de la construcción realizada para la visualización al microscopio confocal de fluorescencia de gránulos de mRNA.

Para la realización de estos experimentos se empleó una cepa silvestre que expresa, integrada en el propio genoma, la proteína de fusión Dcp2-mCherry. Esta cepa se transformó simultáneamente con dos plásmidos, uno que incluye la construcción esquematizada en la Figura 5.9 para cada gen de interés y otro que expresa la fusión de la proteína U1A a GFP. Se eligieron los genes *MLP1*, *CRG1* y *SRL3* porque su expresión aumenta de manera significativa bajo condiciones de estrés de pared. Además, se utilizó el gen *PGK1* (fosfoglicerato quinasa) como control, al ser un gen no regulado por la ruta CWI. Las células se crecieron en ausencia o presencia de ZYM durante dos horas y a continuación se visualizaron al microscopio confocal de fluorescencia para observar la formación de PBs (señal mCherry) y de gránulos de mRNA correspondientes a cada gen (señal GFP). El motivo de utilizar ZYM para estudiar la co-localización de mRNAs fue evitar el mayor nivel de fluorescencia inespecífica observada en presencia de RC tras exposiciones prolongadas.

5. RESULTADOS

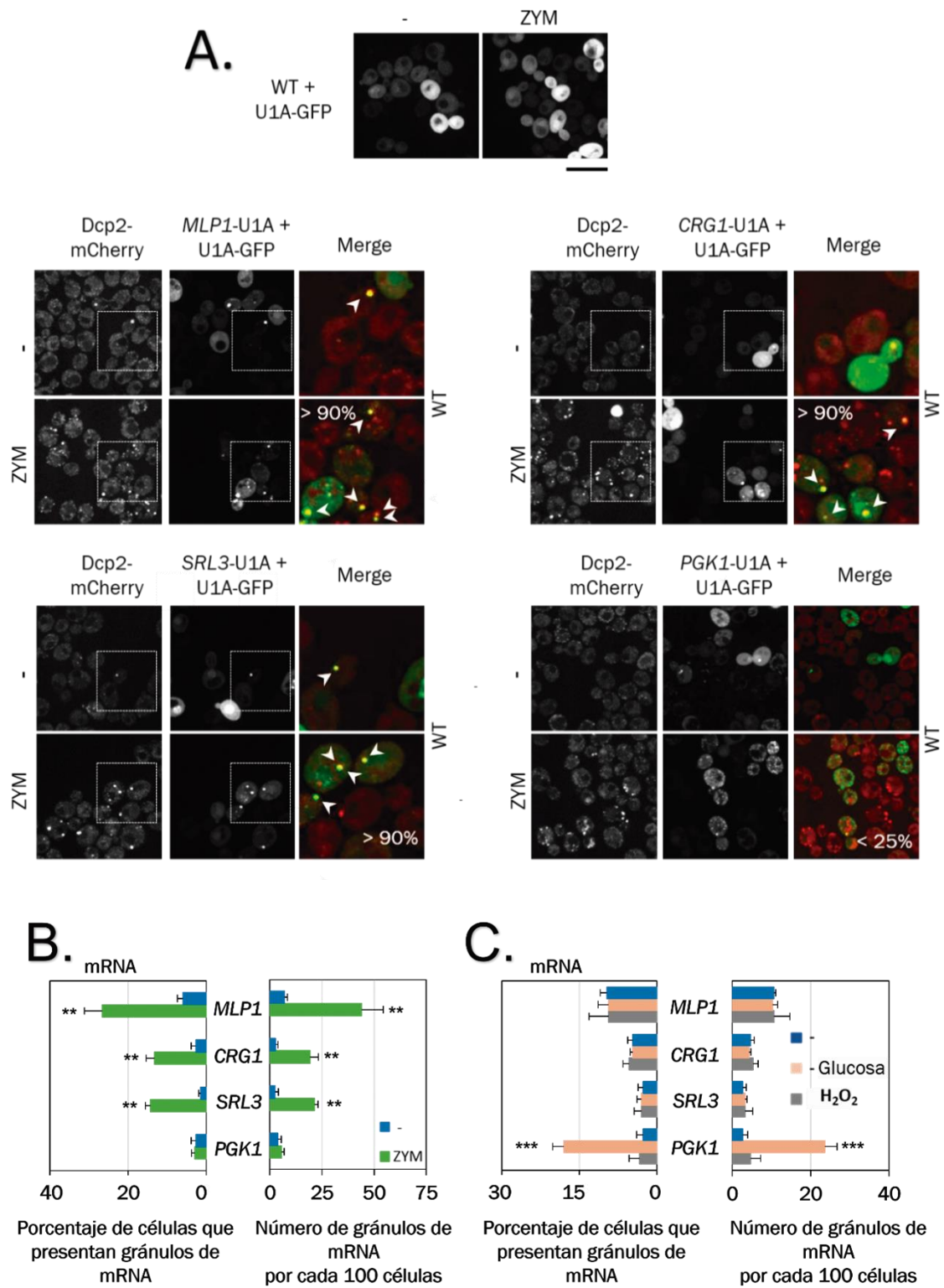


Figura 5.10: El estrés de pared induce la localización en PBs de mRNAs de genes CWI dependientes. (A) La cepa silvestre, expresando Dcp2-Cherry integrado en el genoma, se transformó con construcciones plásmidicas que expresan *MLP1/CRG1/SRL3* o *PKG1-U1A*, además de con un segundo plásmido que contiene la fusión U1A-GFP. Las células se trataron durante dos horas con ZYM (0,8 U/ml). En todos los experimentos la columna de la izquierda muestra las imágenes correspondientes a la visualización de la proteína Dcp2-mCherry, la columna central muestra la visualización del mRNA del gen correspondiente mediante la unión a la proteína U1A-GFP y la columna de la derecha muestra la superposición de ambos canales en un zoom de las imágenes anteriores. Las flechas blancas señalan algunos de los puntos en el citoplasma que corresponden a la co-localización del mRNA con PBs. En el panel superior se incluyen imágenes de células expresando únicamente la construcción U1A-GFP en presencia y ausencia de ZYM como control negativo de detección de gránulos de mRNA. (B) Cuantificación del porcentaje de células que contienen gránulos de mRNA (izquierda) y del número de gránulos de mRNA por cada 100 células en condiciones de estrés de pared (C) Cuantificación del porcentaje de células que contienen gránulos de mRNA (izquierda) y al número de gránulos por cada 100 células (derecha) en condiciones de ausencia de glucosa o H₂O₂ (3 mM) ambos durante 15 minutos. Los histogramas muestran la media y desviación estándar de tres experimentos con al menos 100 células analizadas en cada uno de ellos. El análisis estadístico se ha realizado mediante una prueba t de Student comparando los datos de las células no tratadas vs las tratadas para cada condición. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$). Barra de escala: 5 μ m

Las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostraron, tras el tratamiento con ZYM, una señal concentrada en gránulos de mRNA en el citoplasma en las células que co-expresan la construcción *MLP1-U1A*, *CRG1-U1A* y *SRL3-U1A* y la fusión U1A-GFP (Figura 5.10B), de la que más del 90% co-localizaron en PBs, detectados con la fusión Dcp2-mCherry. En condiciones basales, la fluorescencia aparece más dispersa por el citoplasma en todos los casos. Al observar el mRNA correspondiente al gen *PKG1*, la señal debida a GFP aparece por todo el citoplasma tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés, y los pocos PBs y gránulos de mRNA, (Figura 5.10B), que se observan solo co-localizaron en menos de un 25% de los casos. En la Figura 5.10A se muestran imágenes representativas de los resultados descritos. Como control, se analizaron también células expresando únicamente la fusión U1A-GFP y, como era de esperar, no mostraron ninguna concentración de la señal de GFP en respuesta a estrés (Figura 5.10A, panel superior).

Además, se estudió la localización en PBs del mRNA de los genes regulados por la ruta CWI en otras situaciones de estrés. Para ello, se sometió a las células a estrés oxidativo causado por H₂O₂ a una concentración de 3 mM, y carencia de glucosa, ambos durante 15 minutos. En el caso del estrés oxidativo, no se observó un incremento de gránulos de mRNA en el citoplasma correspondientes al mRNA de los cuatro genes analizados (Figura 5.10C). Sin embargo, el número de gránulos de mRNA correspondientes al gen *PKG1* aumentó de manera significativa en

5. RESULTADOS

condiciones de carencia de glucosa, como ha sido descrito previamente (Teixeira et al., 2005), y de estos gránulos GFP positivos, más del 90% co-localizaron con Dpc2-Cherry.

Todos estos resultados, apoyan que los PBs acumulen mRNAs específicos dependiendo del tipo de estrés.

5.7. ESTUDIO DEL PERFIL TEMPORAL DE FORMACIÓN DE GRÁNULOS DE mRNA DE *MLP1*.

Una vez establecido que situaciones de estrés sobre la pared celular inducen la formación de PBs donde se localizan mRNAs de genes regulados por la ruta CWI, nos preguntamos si el periodo de tiempo con PBs ensamblados se podría correlacionar con la presencia de mRNAs de genes CWI-dependientes. Debido a la complejidad de estos experimentos, decidimos realizarlos estudiando como modelo el gen *MLP1* que es el más característico, y que más se induce, en la respuesta transcripcional estudiada. Para ello, se monitorizó la localización del mRNA del gen *MLP1* durante cinco horas, (300 minutos), de tratamiento con ZYM, utilizando la cepa silvestre BY4741, transformada con los plásmidos *MLP1-U1A* y *U1A-GFP*.

Como se muestra la Figura 5.11, el pico máximo de formación de gránulos de mRNA en el citoplasma corresponde a las 3 horas de tratamiento, (180 minutos), coincidiendo globalmente con el perfil temporal de formación de PBs representado en la Figura 5.3.

Con el objetivo de asociar la presencia de gránulos de mRNA de *MLP1* con el ensamblaje de PBs, decidimos cuantificar la formación de gránulos de mRNA de *MLP1* tras 2 horas de tratamiento con ZYM en las cepas deficientes en PBs *pat1Δ* y *edc3Δpat1Δ*. Como se observa en la Figura 5.11B, la formación de gránulos de mRNA en estos mutantes se encuentra seriamente comprometida en condiciones de estrés de pared, tal y como ocurre con la formación de PBs en las mismas condiciones (Figura 5.1B).

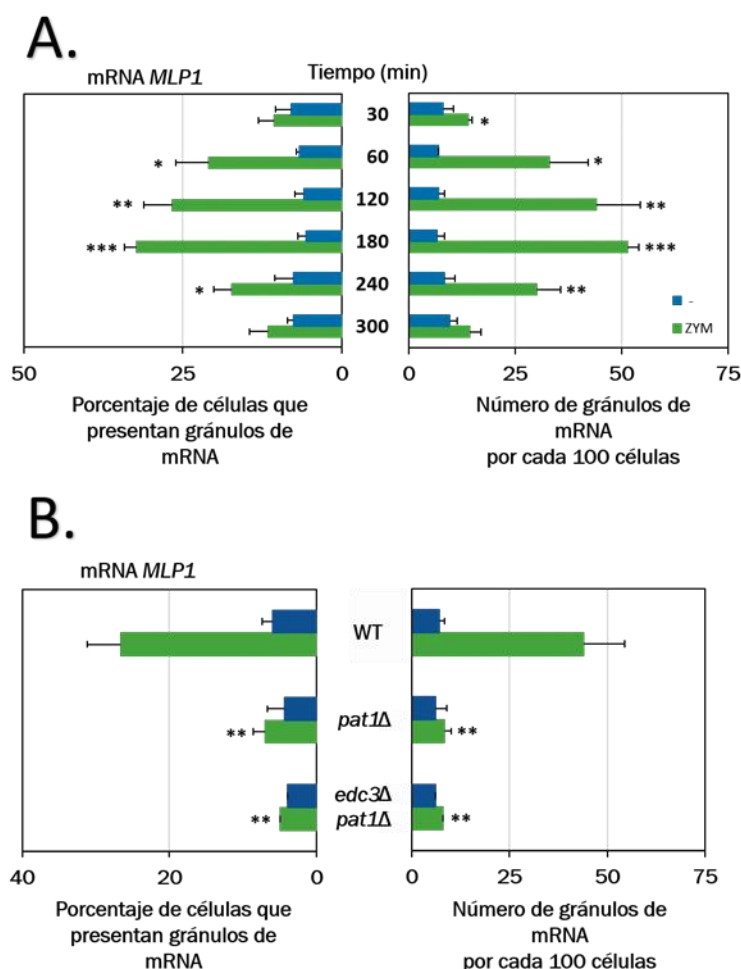


Figura 5.11: La formación de gránulos de mRNA bajo condiciones de estrés de pared está asociada con la formación de PBs: (A) Estudio temporal mediante microscopía de fluorescencia confocal de la aparición de gránulos de mRNA del gen *MLP1*. Las células, co-expresando el mRNA de *MLP1*-U1A y la proteína U1A-GFP, se trataron con ZYM (0,8 U/ml) durante 300 minutos (5 horas). **(B)** Estudio de la presencia de gránulos de mRNA de *MLP1* en las cepas *pat1Δ* y *edc3Δpat1Δ*. Las células se trataron con ZYM (0,8 U/ml) durante 2 horas. Los gráficos muestran la media y desviación estándar de tres experimentos con al menos 100 células analizadas en cada uno de ellos. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los datos de las células sin tratar con las tratadas a cada tiempo correspondiente para los experimentos mostrados en **(A)** o los datos correspondientes a la cepa silvestre frente a los mutantes indicados **(B)**. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$).

5.8. LA SOBREEXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI AUMENTA LA SENSIBILIDAD A ZIMOLIASA Y CASPOFUNGINA EN CEPAS DEFICIENTES EN *P-BODIES*.

La información disponible sobre PBs en levadura ha crecido de forma significativa en los últimos años, principalmente desde un punto de vista estructural. Sin embargo, desde un punto de vista funcional, el papel de estas estructuras en

5. RESULTADOS

situaciones de estrés es prácticamente desconocido, teniendo en cuenta que cepas mutantes, donde la presencia de PBs visibles mediante microscopia de fluorescencia se encuentra muy reducida, no muestran fenotipos graves. Aun así, en estudios previos, se ha descrito que la acumulación de mRNA de genes que se localizan en PBs es tóxica para las células de cepas mutantes defectivas en la formación de éstos (Lavut & Raveh, 2012; Loll-Krippelber & Brown, 2017).

Para comprobar si este efecto también sucedía en situaciones de estrés sobre la pared celular, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de los genes *MLP1* y *CRG1* en la cepa deficiente en el ensamblaje de PBs *edc3Δpat1Δ*. Para ello, el mutante *edc3Δpat1Δ* y la cepa silvestre BY4741 se transformaron con plásmidos incluyendo el ORF del gen de interés fusionado en el extremo N-terminal a GST bajo el control de un promotor inducible por galactosa.

Se estudió la sensibilidad de células creciendo en medio con galactosa (condiciones de sobreexpresión de los genes correspondientes o GST como control) o glucosa (condiciones de represión del promotor *GAL1/10*) a ZYM, caspofungina (CAS) y Blanco de Calcoflúor (BC), compuesto que se une a quitina, como el RC, pero con la ventaja de ser compatible con sistemas espectrofotométricos para la determinación cuantitativa del crecimiento de la levadura. Los experimentos se llevaron a cabo mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada compuesto en medio líquido y en formato de placa multipocillo.

Como muestra la Figura 5.12A, la sobreexpresión de los genes *MLP1* y *CRG1* no tiene ningún efecto sobre los niveles de sensibilidad de la cepa *edc3Δpat1Δ* a BC en comparación con el valor obtenido para la cepa silvestre. Sin embargo, en el caso de la ZYM, la sobreexpresión de *MLP1* y *CRG1* afecta negativamente al crecimiento de la cepa *edc3Δpat1Δ* en presencia este compuesto (Figura 5.12B), siendo la CMI de 62,5 U/ml, cuando en la cepa silvestre es superior a 125 U/ml. Este fenómeno ocurre también, aunque en menor medida, en presencia de CAS (Figura 5.12C), ya que la concentración mínima inhibitoria en condiciones de sobreexpresión para la cepa *edc3Δpat1Δ* es de 75 ng/ml, mientras que en células control expresando sólo GST es de 100 ng/ml.

Los ensayos realizados en medio YPD (represión del promotor *GAL1/10*) indican que la cepa deficiente en PBs no muestra incremento de sensibilidad a ninguno de los tres agentes ensayados.

5. RESULTADOS

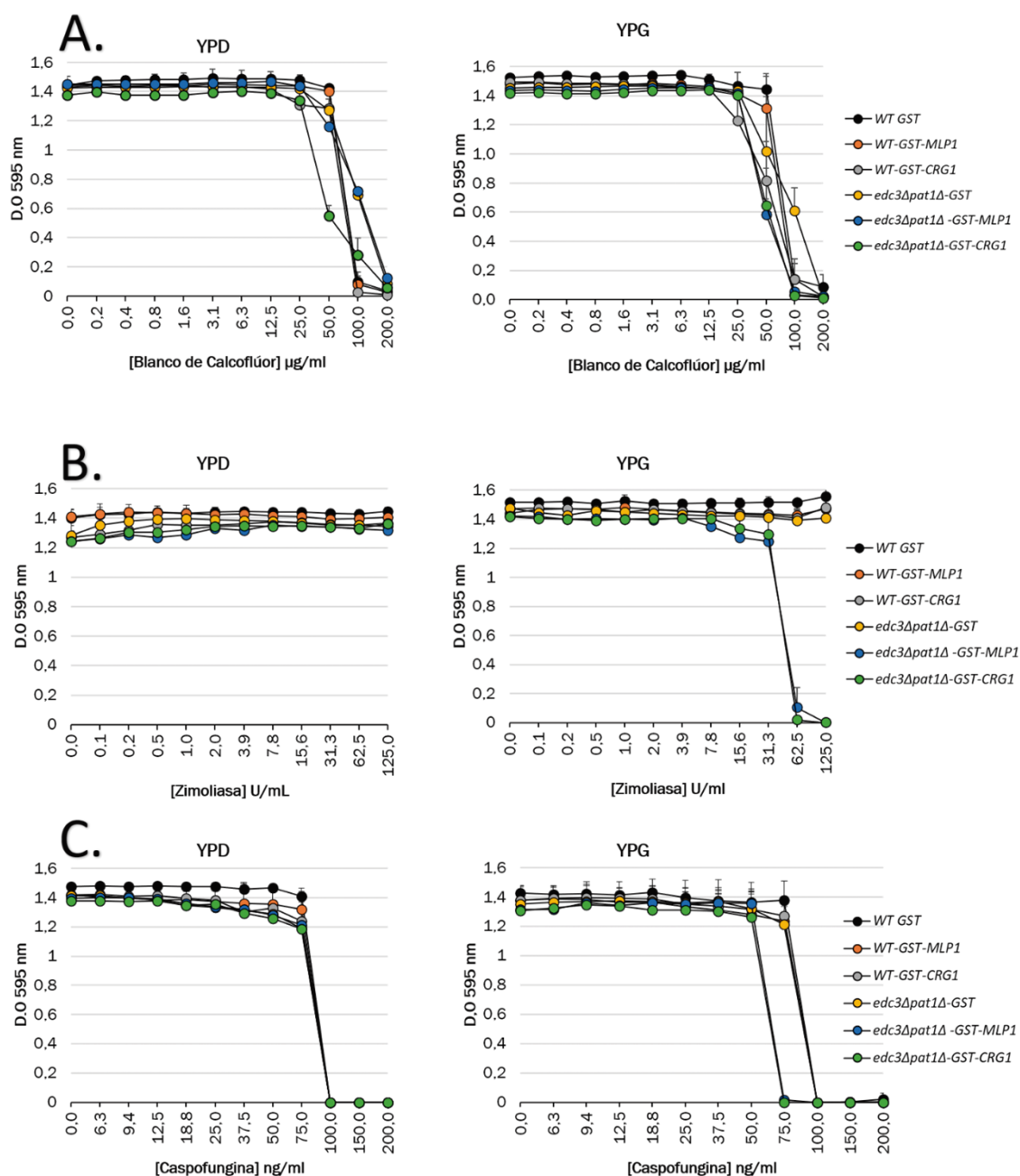
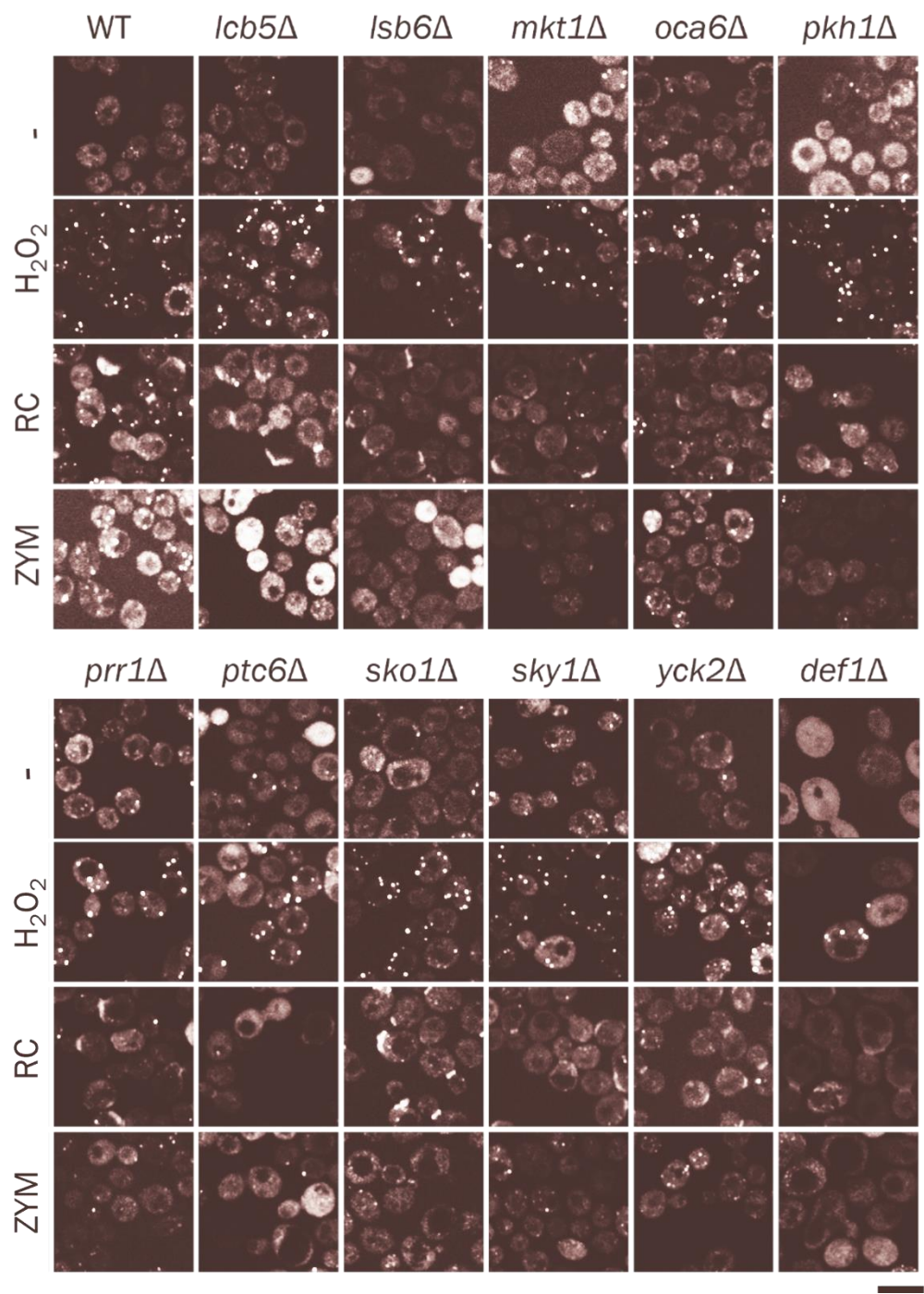


Figura 5.12: La sobreexpresión de *MLP1* y *CRG1* en condiciones de estrés de pared afecta al crecimiento de mutantes que no forman PBs. Células de la cepa silvestre BY4741 y del mutante *edc3Δpat1Δ*, transformadas con los plásmidos procedentes de la colección “Yeast GST Fusion collection” pEGH-GALp-GST, pEGH-GALp-GST-*MLP1* y pEGH-GALp-GST-*CRG1*, se utilizaron en los experimentos de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a (A) Blanco de Calcofluor (BC), (B) ZYM y (C) caspofungina (CAS) en placas multipocillo, inoculando 10000 células por pocillo aproximadamente y utilizando una batería de concentraciones decrecientes de cada compuesto entre 0 y 200 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del BC, entre 0 y 125 U/ml en el caso de la ZYM y entre 0 y 200 ng/ml para la CAS. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas y se procedió a la determinación de la D.O a 595 nm de cada pocillo en un lector de ELISA. Los gráficos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

5. RESULTADOS

5.9. RASTREO PARA LA DETECCIÓN DE CEPAS MUTANTES DE LEVADURA DEFECTIVAS EN LA FORMACIÓN DE *P-BODIES* EN SITUACIONES DE DAÑO SOBRE LA PARED CELULAR.

Partiendo de la base de que la formación de los PBs en condiciones de estrés sobre la pared celular depende de la actividad catalítica de Slt2, nos planteamos diseñar un rastreo fenotípico con el objetivo de poder identificar elementos implicados en el ensamblaje de estas estructuras que pudieran constituir dianas directas o indirectas de Slt2. Debido a la dificultad técnica para llevar a cabo la observación de PBs mediante microscopía en los 5000 mutantes carentes en cada uno de los genes no esenciales presentes en la levadura, decidimos establecer un rastreo dirigido a mutantes en genes previamente relacionados con interacción física o genética con Slt2, en sustratos ya conocidos de la MAPK Slt2 y en genes potencialmente relacionados con señalización celular como los codificantes para quinasas y fosfatasa, según la base de datos “*Saccharomyces Genome Database*” (SGD). Finalmente, se analizaron 259 mutantes disponibles en la colección de mutantes de *Euroscarf*. Con este objetivo, se transformó cada cepa mutante, así como la cepa silvestre BY4741, con el plásmido Dcp2-GFP para su posterior visualización al microscopio confocal de fluorescencia después del tratamiento durante una hora con ZYM. En una segunda fase, en los mutantes inicialmente seleccionados, se evaluó el efecto del tratamiento con RC o H₂O₂ (estrés oxidativo). Finalmente, de todos los mutantes analizados, descartando los previamente relacionados con la activación de la ruta CWI, se identificó un grupo de 11 en los que la formación de PBs está afectada, en comparación con la cepa silvestre, tanto tras su exposición a RC como ZYM, pero no con el tratamiento con H₂O₂ (Figura 5.13). Los mutantes identificados, así como la función biológica de la proteína correspondiente se resumen en la Tabla 5.1.



5. RESULTADOS

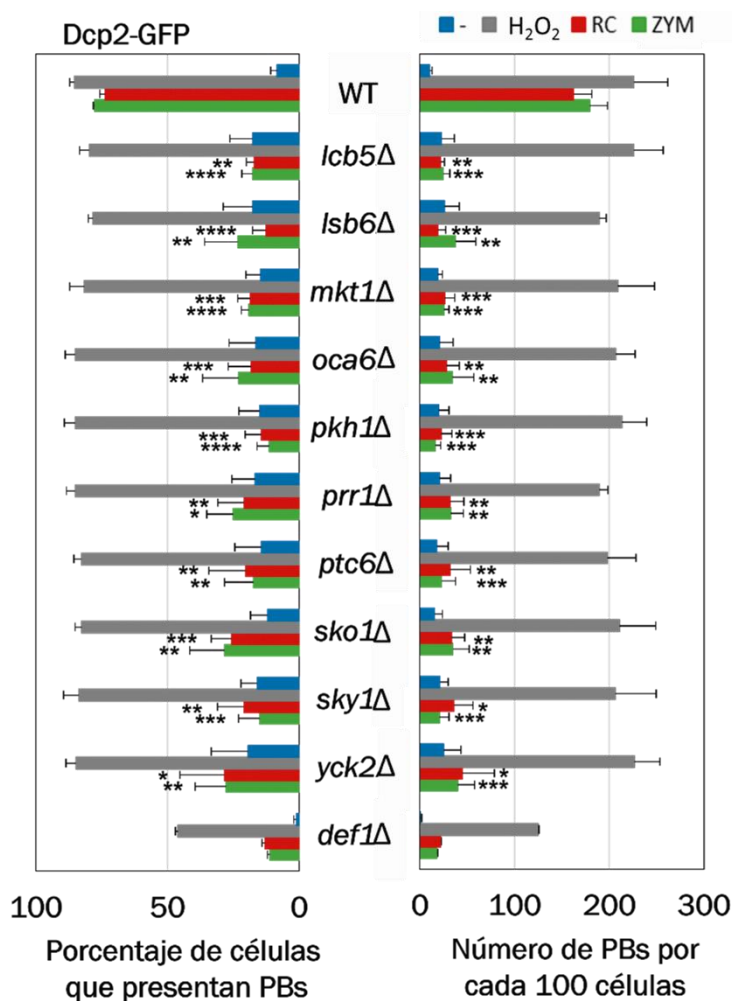


Figura 5.13: Visualización de Dcp2-GFP mediante microscopía confocal de fluorescencia en los mutantes que no forman PBs en condiciones de estrés de pared. La cepa silvestre y las mutantes se trataron durante una hora con RC (30 µg/ml) y ZYM (0,8 U/ml) o H₂O₂ (3 mM) durante 15 minutos. Se utilizó el plásmido expresando Dcp2-GFP para la visualización por microscopía de fluorescencia de PBs. Los histogramas muestran la media y desviación estándar del porcentaje de células que presentan PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha) correspondiente a tres experimentos independientes excepto para el mutante *def1Δ* que sólo se realizó una vez. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student, comparando con los valores de la cepa silvestre para cada tratamiento. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$), ($P^{****} \leq 0,0001$). Barra de escala: 5 µm

Mutante	Función Biológica
<i>lcb5Δ</i>	Quinasa relacionada con el metabolismo de esfingolípidos.
<i>lsb6Δ</i>	Fosfatidil-inositol quinasa. Participa en la polimerización de actina.
<i>mkt1Δ</i>	Proteína similar a nucleasas que forma complejos con Pbp1 y media la regulación post-transcripcional de HO. Se localiza en PBs bajo condiciones de estrés por etanol.
<i>oca6Δ</i>	Posible protein-tirosin fosfatasa. Su función biológica es desconocida actualmente.
<i>pkh1Δ</i>	Quinasa implicada en el metabolismo de esfingolípidos y endocitosis.
<i>prp1Δ</i>	Quinasa. Inhibe la señalización por feromonas a nivel de Ste11.
<i>ptc6Δ</i>	Fosfatasa implicada en mitofagia.
<i>sko1Δ</i>	Factor de transcripción implicado a respuesta a estrés oxidativo y osmótico.
<i>sky1Δ</i>	Quinasa que participa en la regulación de proteínas implicadas en el metabolismo de mRNA.
<i>yck2Δ</i>	Quinasa implicada en la morfogénesis y ensamblaje de septinas y endocitosis.
<i>def1Δ</i>	Factor de degradación de la RNA polimerasa II que facilita la ubiquitinación y la proteólisis de la RNA polimerasa II en el complejo de elongación

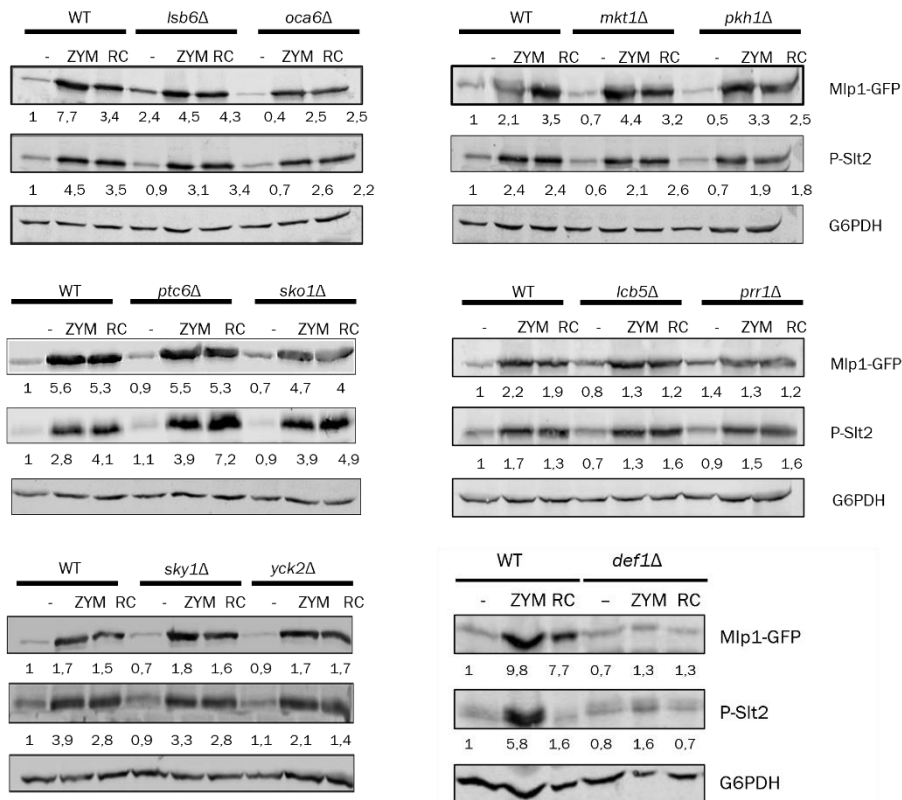
Tabla 5.1: Relación de mutantes en los que la formación de PBs está afectada debido al tratamiento con RC y ZYM. La información relativa a su función fue obtenida de las bases de datos *Saccharomyces genome database* (SGD) y UniProt.

Con el objetivo de descartar que el bloqueo en la formación de PBs se debiera a una afectación de la señalización a través de la ruta CWI, se estudió la activación de dicha ruta analizando la fosforilación de la MAPK Slt2 mediante Western-blot, utilizando anticuerpos que reconocen la forma fosforilada de la MAPK. Para ello, se cultivaron células de cada mutante junto con la cepa silvestre, siendo expuestas o no a RC o ZYM durante dos horas. A continuación, se obtuvieron extractos proteicos totales de cada cepa y condición y fueron analizados mediante Western-blot.

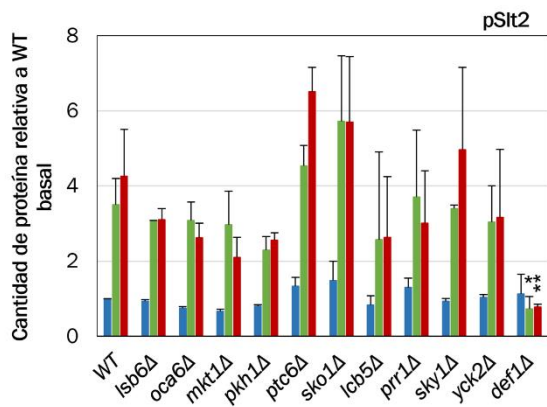
Los resultados mostrados en la Figura 5.14 indican que todos los mutantes analizados, excepto la cepa *def1Δ* (esto hizo que descartáramos a Def1 en los estudios posteriores), exhiben unos niveles de fosfo-Slt2 (P-Slt2), tras el tratamiento con RC o ZYM, próximos a los detectados en la cepa silvestre. Este resultado indica que el bloqueo observado en la formación de PBs en la gran mayoría de los mutantes seleccionados, no se debe a problemas de señalización a través de la ruta CWI, al menos de elementos por encima de Slt2.

5. RESULTADOS

A.



B.



C.

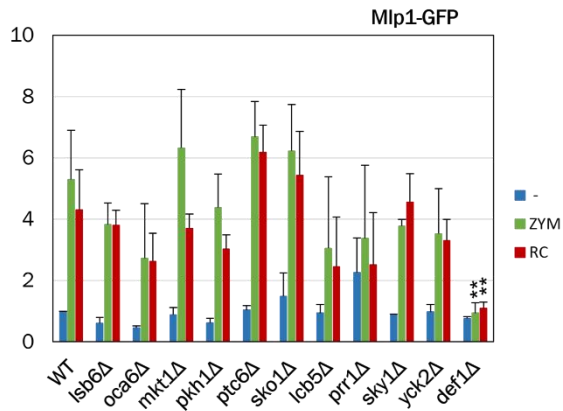


Figura 5.14: Estudio de la activación de la ruta CWI en el grupo de mutantes que no forman PBs en presencia de RC y ZYM. Se muestran Western-blots representativos de extractos proteicos totales correspondientes a células de cada mutante indicado y la cepa silvestre (WT), transformadas con el plásmido expresando la construcción Mlp1-GFP, tratadas durante dos horas con RC (30 µg/ml) o ZYM (0,8 U/ml). Para la detección de fosfo-Slt2 (P-Slt2), se utilizó un anticuerpo anti-fosfo-p42/p44 MAPK (Thr202/Thr204). La proteína de fusión Mlp1-GFP se detectó mediante un anticuerpo anti-GFP. Como control de carga, se empleó la proteína Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Los valores que aparecen debajo de las imágenes de Western-blot corresponden a la cantidad relativa de cada proteína estudiada de cada mutante con respecto a la cepa silvestre sin tratar. Este valor fue calculado a partir de la cuantificación densitométrica de la banda de cada proteína con respecto a la banda de G6PDH para cada mutante, utilizando la cepa silvestre como referencia (*ratio1*). El gráfico muestra la media y desviación estándar de al menos tres experimentos de fosfo-Slt2 (**B**) y Mlp1-GFP (**C**). El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa silvestre en cada condición con los respectivos valores para cada cepa mutante. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$)

Para demostrar que la ausencia de señal de Dcp2-GFP no era debida a una disminución severa de los niveles de Dcp2-GFP en los mutantes finalmente seleccionados, se procedió a determinar mediante Western-blot, empleando extractos proteicos totales, los niveles de la proteína de fusión utilizando anticuerpos anti-GFP. Como se muestra en la Figura 5.15, en todos los casos, los niveles de Dcp2-GFP tanto en presencia como en ausencia de estrés fueron similares a los obtenidos en la cepa silvestre.

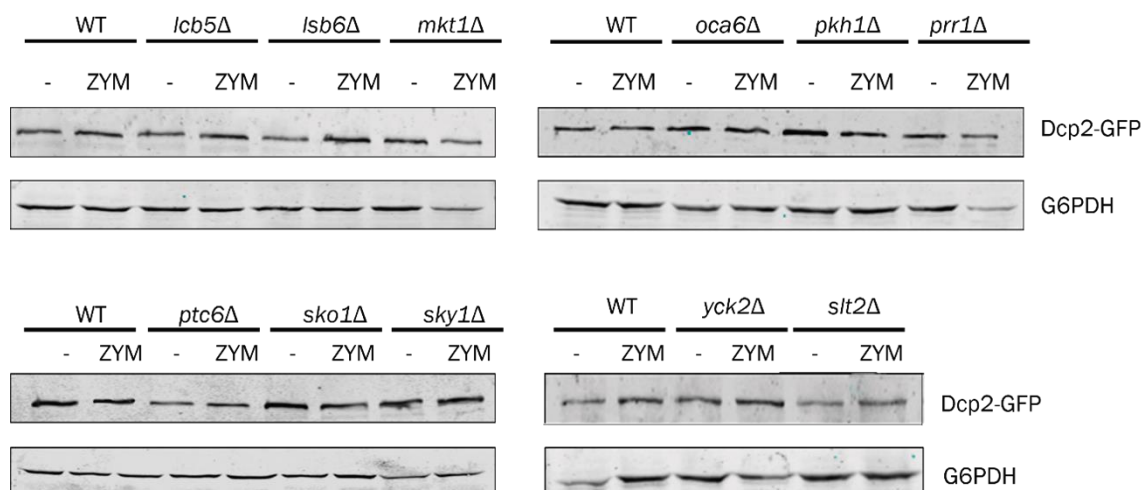


Figura 5.15: La cantidad de Dcp2-GFP no se encuentra comprometida en mutantes que no ensamblan PBs en presencia de RC y ZYM. Western-blots representativos de extractos proteicos totales de células de la cepa silvestre (WT), *slt2Δ* y los mutantes defectivos en la formación de PBs, transformadas con el plásmido Dcp2-GFP. Las células se trataron durante dos horas con ZYM (0,8 U/ml). La proteína Dcp2-GFP se ha detectado utilizando un anticuerpo anti-GFP. Como control de carga se ha empleado la proteína Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y detectada con un anticuerpo anti-G6PDH.

Con el fin de confirmar el efecto sobre el ensamblaje de PBs en los 10 mutantes identificados utilizando Dcp2-GFP como marcador de PBs, procedimos a estudiar un

5. RESULTADOS

segundo marcador de PBs, la proteína Dhh1-GFP, fusionada a GFP. Después del análisis mediante microscopía confocal de fluorescencia, se pudo observar que, en todas las cepas mutantes analizadas, el número de inclusiones citoplasmáticas correspondientes a Dhh1-GFP se encontraron severamente afectadas tanto tras el tratamiento con RC como con ZYM, descartando por tanto posibles efectos marcador-específicos (Figura 5.16).

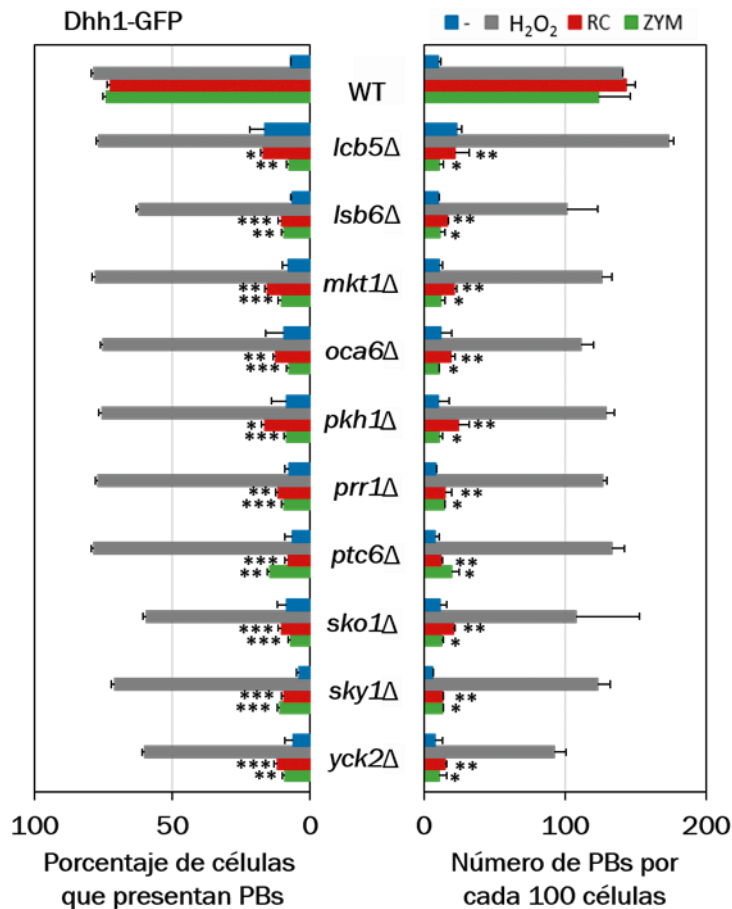
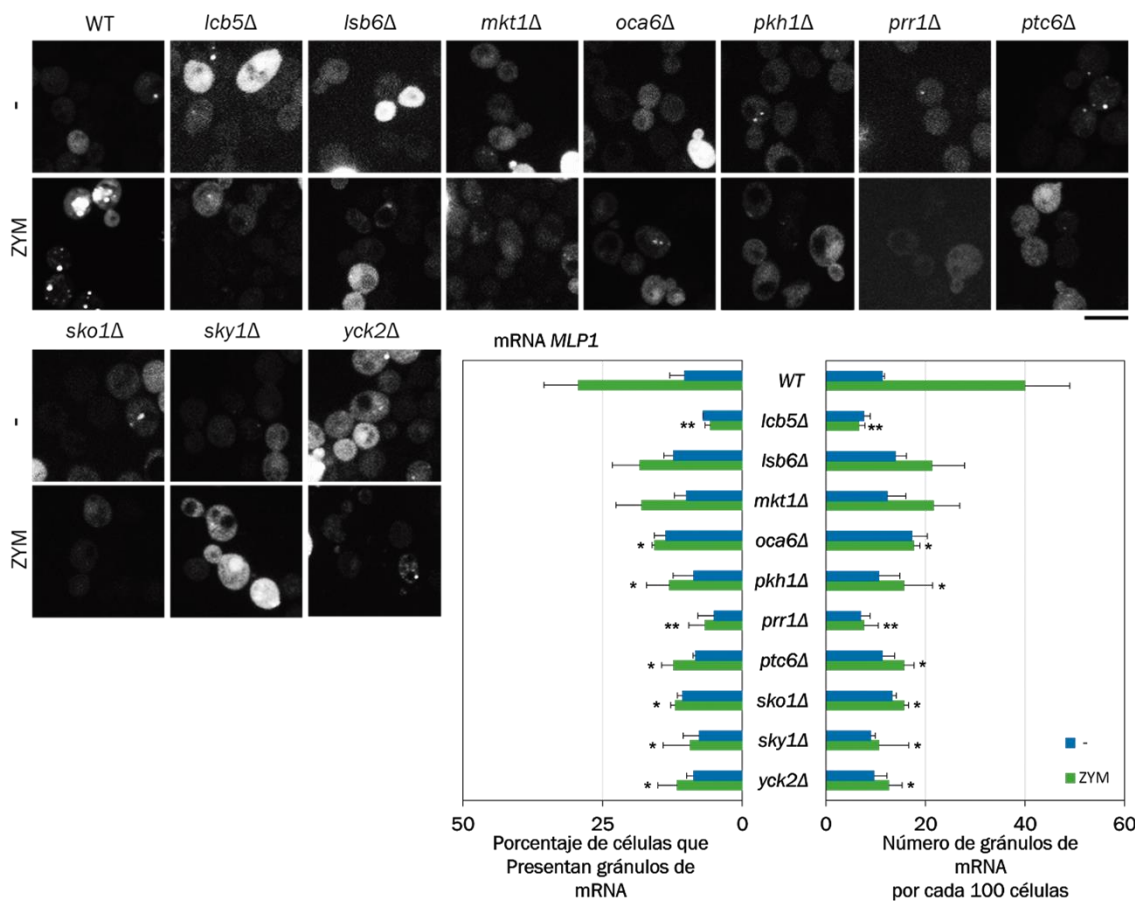


Figura 5.16: Cuantificación de gránulos citoplasmáticos correspondientes a Dhh1-GFP en los mutantes identificados en el rastreo. La cepa silvestre y los mutantes indicados se transformaron con un plásmido expresando Dhh1-GFP y tratados como se detalla en la Figura 5.13. Los gráficos indican el porcentaje de células que contienen PBs (izquierda) y número de PBs por cada 100 células (derecha), representando la media y desviación estándar de tres experimentos con al menos 100 células cada uno. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba t de Student comparando los valores obtenidos en la cepa silvestre frente a los mutantes para cada tratamiento. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P^* \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$).

5.10. LOS MUTANTES DEFICIENTES EN LA FORMACION DE PBs MUESTRAN ALTERADOS LOS NIVELES DE GRÁNULOS DE mRNA DE *MLP1*.

A partir de los resultados anteriores, el siguiente paso fue analizar si los mRNA de genes regulados por la ruta CWI se acumulan en gránulos en estas cepas mutantes, como se observó previamente en la cepa silvestre (Figura 5.10). Para ello, se utilizó el método de la proteína U1A-GFP para visualizar el mRNA del gen *MLP1*, como se ha descrito anteriormente, tras tratar a las células con ZYM durante 2 horas. Estos mutantes, además, se transformaron con un plásmido expresando Edc3-mCherry para poder estudiar si los gránulos de mRNA co-localizaban en los PBs que pudieran visualizarse.



5. RESULTADOS

Figura 5.17: Cuantificación de gránulos de mRNA de *MLP1* en los mutantes que no forman PBs. La cepa silvestre y los mutantes indicados se transformaron con los plásmidos expresando *MLP1*-U1A y U1A-GFP para la visualización mediante microscopía de fluorescencia confocal de gránulos de mRNA y tratados con ZYM (0,8 U/ml) durante dos horas. Los histogramas muestran el porcentaje de células que contienen gránulos de mRNA (izquierda) y número de gránulos de mRNA por cada 100 células (derecha) y se han construido a partir de la media y desviación estándar de tres experimentos independientes, analizando al menos 100 células en cada uno de ellos. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa silvestre frente a los mutantes. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$), ($P^{**} \leq 0,01$), ($P^{***} \leq 0,001$).

Como resultado, en 8 de los 10 mutantes estudiados se observó, tras el tratamiento con ZYM, un descenso significativo tanto del porcentaje de células con gránulos de *MLP1*-GFP (aproximadamente un 15% respecto al 30% observado en la cepa silvestre) como en el número de gránulos por cada 100 células, donde en los mutantes en general no se observan más de 20, respecto a los 40 detectados en la cepa silvestre. En el caso particular de los mutantes *lsb6Δ* y *mkt1Δ*, no obteniéndose una disminución estadísticamente significativa en el número de gránulos de *MLP1*, también se manifiesta la tendencia a una disminución en relación con los valores obtenidos en la cepa silvestre en condiciones de estrés. Este efecto no se debe a problemas de expresión de *Mlp1*, puesto que en estos mutantes los niveles de *Mlp1*-GFP analizados mediante Western-blot fueron parecidos a los de la cepa silvestre, incrementándose sensiblemente en presencia de ZYM o RC como consecuencia de la activación de la ruta CWI (Figura 5.14).

5.11. ESTUDIO DE POSIBLES INTERACCIONES ENTRE *Slt2* Y PROTEINAS IMPLICADAS EN LA FORMACION DE *P-BODIES*.

La dependencia de la actividad quinasa de *Slt2* para la formación de PBs en respuesta a estrés de pared permitía hipotetizar sobre la posible interacción entre *Slt2* y componentes estructurales de PBs, así como con alguna de las proteínas esenciales para la formación de PBs en condiciones de estrés sobre la pared celular identificadas en el presente trabajo (Tabla 5.1).

Para comprobar esta posibilidad, se desarrollaron experimentos de *pull-down*, empleando la cepa silvestre co-transformada con dos plásmidos: uno que incluye la proteína de interés, relacionada con la formación de PBs, fusionada en su extremo N-terminal al epítipo GST (procedentes de la colección *Yeast-GST Fusion* de Dharmacon y expresadas bajo el control del promotor *GAL1/10*), y otro, un plásmido

multicopia expresando la fusión Slt2-HA bajo el control de su propio promotor. Como control negativo, se empleó la cepa silvestre co-transformada con un plásmido expresando únicamente *GAL1/10*-GST y el plásmido expresando Slt2-HA.

Las cepas transformadas se crecieron en presencia de galactosa durante 4 horas, para permitir la expresión de la proteína de interés, y, a continuación, fueron tratadas con o sin RC (30 μ g/ml) durante dos horas adicionales. La fracción inmunoprecipitada, (IP), se obtuvo a partir de 450 mg del extracto proteico total incubado con la resina de glutatión sefarosa, durante 16-18 horas. La fracción IP se cargó en un gel de poliacrilamida, junto con una fracción de extracto total no tratado con la resina utilizado como control de carga (IN). Posteriormente mediante Western-blot, empleando anticuerpos anti-GST y anti-HA, se determinó la existencia o no de potenciales interacciones. Para el estudio de componentes estructurales previamente caracterizados como integrantes de PBs, seleccionamos las proteínas GST-Dhh1, GST-Dcp1, GST-Dcp2 y GST-Pat1.

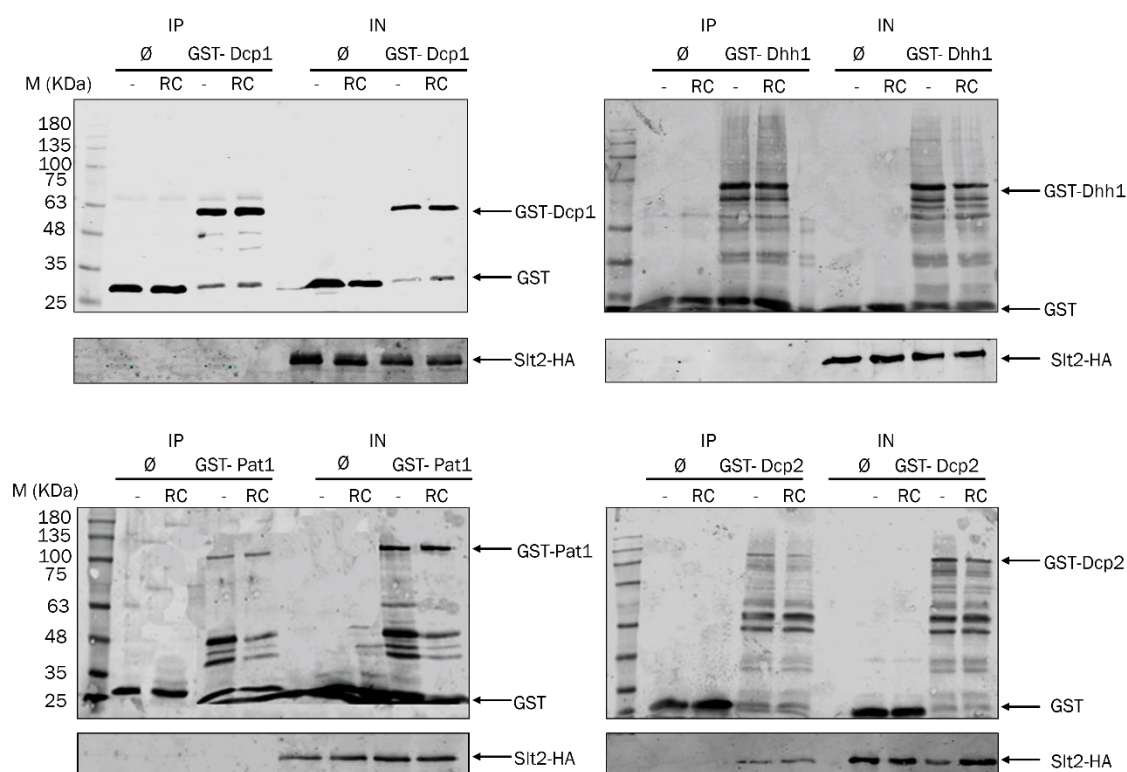


Figura 5.18: Estudio de interacciones entre componentes estructurales de PBs y la MAPK Slt2. Las células de las cepas GST-Dhh1, GST-Dcp1, GST-Dcp2 y GST-Pat1 co-expresando Slt2-HA y crecidas en presencia de galactosa, se trataron o no durante dos horas con RC (30 μ g/ml) y posteriormente, a partir de extractos proteicos totales, se analizó la interacción entre las proteína fusionadas a GST y Slt2 mediante *pull down* y Western-blot utilizando anticuerpos anti-HA (panel inferior) y anti-GST (panel superior). La fracción sin precipitar (Input, IN), corresponde al 5% de la cantidad total de proteína utilizada en la muestra IP. En cada experimento se procesa en paralelo como control negativo la cepa silvestre expresando sólo GST y Slt2-HA (Ø).

5. RESULTADOS

Como se observa en la Figura 5.18, en el caso de Dhh1, Dcp1 y Pat1 no se observó interacción con Slt2, al no detectarse banda correspondiente a Slt2 en la fracción IP. Sin embargo, la proteína Dcp2 si interacciona con Slt2. Esta interacción se observa tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés (presencia de RC).

En el caso de las proteínas necesarias para en ensamblaje de PBs identificadas anteriormente, los ensayos de *pull-down* con Slt2-HA sólo se realizaron con Sky1, Mkt1, Lsb6, Lcb5, Ptc6 y Prr1, debido a que en la colección de cepas empleada para llevar a cabo estos experimentos no se encuentran disponibles el resto de las proteínas identificadas (Tabla 5.1).

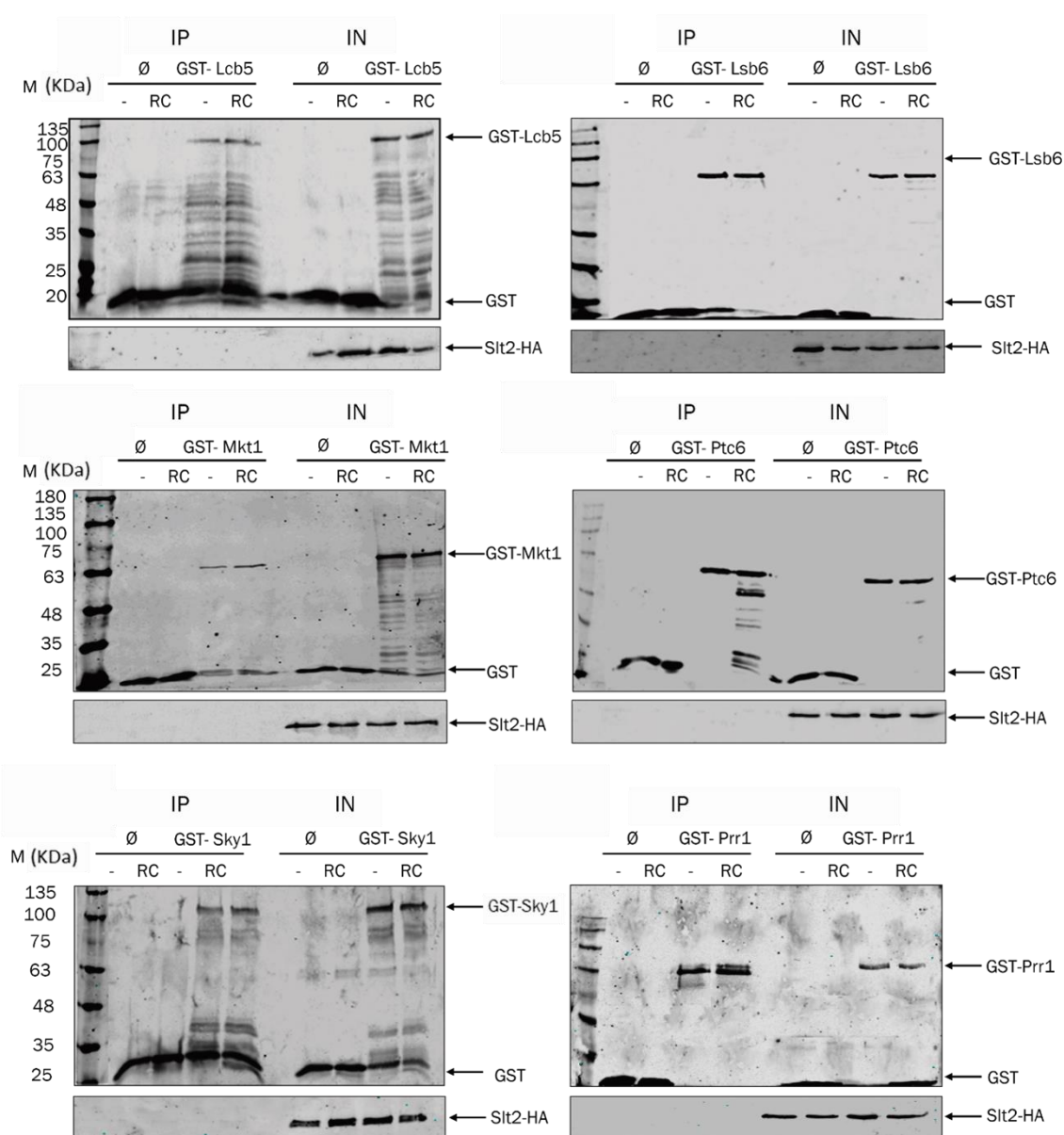


Figura 5.19: Las proteínas identificadas a partir de los mutantes que no forman P-bodies en estrés de pared no interaccionan con Slt2. Las células de las cepas GST-Lcb5, GST-Lsb6, GST-Mkt1, GST-Ptc6, GST-Sky1 y GST-Prr1 co-transformadas con el plásmido expresando Slt2-HA, se trataron o no durante dos horas con RC (30 µg/ml) y posteriormente a partir de extractos proteicos totales se ha analizó la interacción entre Slt2 y las proteínas en estudio mediante Western-blot utilizando anticuerpos anti-HA (Panel inferior) y anti-GST (panel superior). La fracción sin precipitar (input, IN), corresponde al 5% de la cantidad total de proteína utilizada en la muestra IP. En cada experimento se procesa en paralelo como control negativo la cepa silvestre expresando sólo GST y Slt2-HA (Ø)

Como se muestra en la Figura 5.19, no se detectó interacción física de Slt2 con ninguna de las proteínas ensayadas en las condiciones estudiadas.

5.12. PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DE PBs EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI.

Como se ha descrito en la sección de antecedentes, los mutantes *dhh1Δ*, *lsm1Δ* y *pat1Δ*, carentes de proteínas relacionadas con el ensamblaje de PBs, fueron previamente identificados en nuestro laboratorio en un rastreo a gran escala dirigido a la identificación de mutantes defectivos en la activación transcripcional del gen reportero *MLP1* en presencia de ZYM. A partir de esos datos preliminares, nos propusimos avanzar en la caracterización de este fenómeno y poder asociarlo a la formación de PBs o a la degradación de mRNA. En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión, mediante PCR cuantitativa (qPCR), del gen *MLP1*, así como de otros genes típicos de la respuesta adaptativa a estrés sobre la pared celular, *SRL3* y *PIR3*, tras el tratamiento de las cepas WT, *dhh1Δ*, *lsm1Δ* y *pat1Δ* durante 2 horas con RC (30 µg/ml) o ZYM (0,8 U/ml). Adicionalmente, en estos experimentos se incluyeron los mutantes *edc3Δ* y *xrn1Δ*, ya que, aunque no fueron identificados en el rastreo transcripcional antes mencionado, la proteína Edc3 es un componente estructural de PBs y Xrn1 es la exonucleasa principal perteneciente a la maquinaria de degradación del mRNA.

5. RESULTADOS

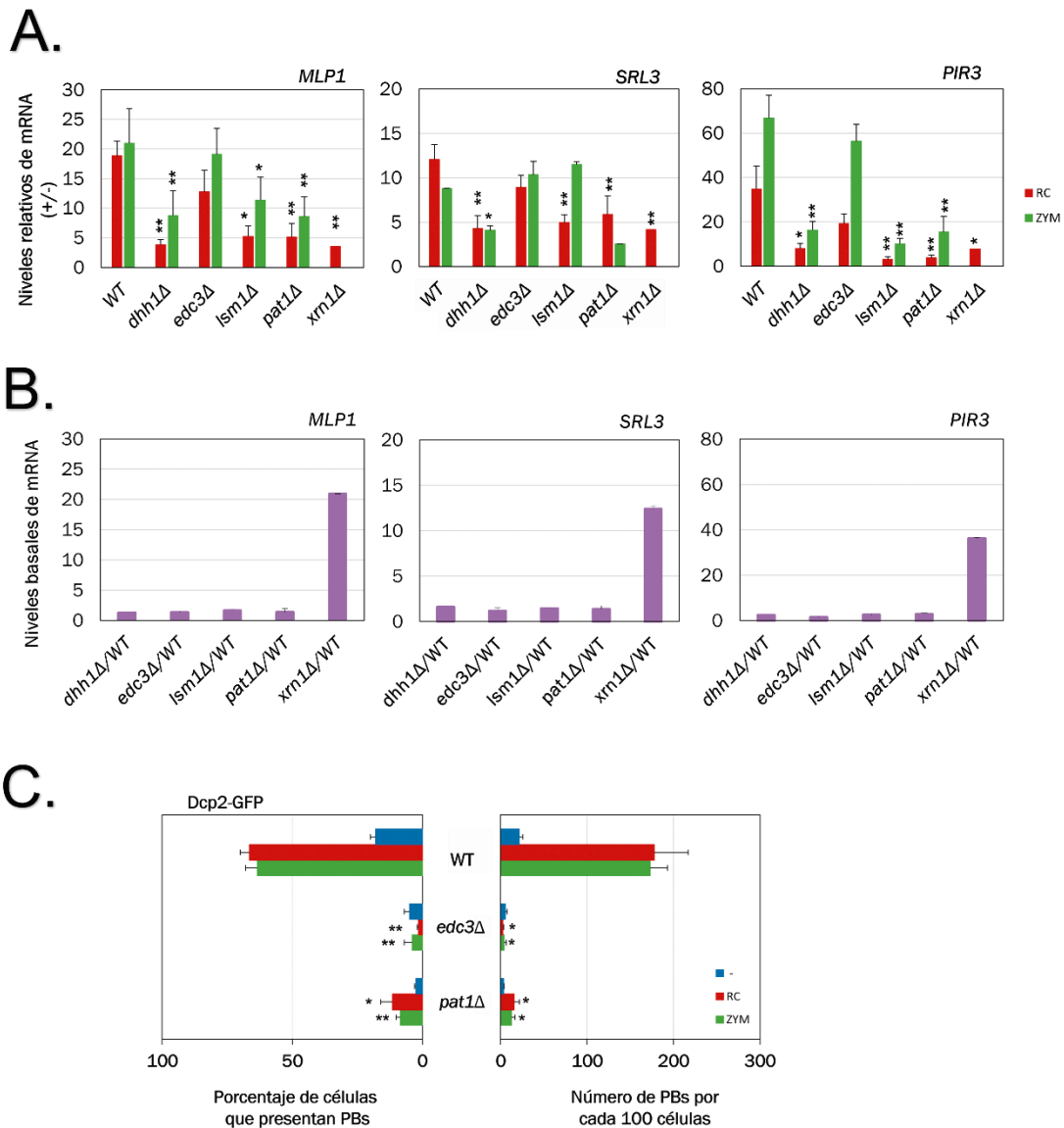


Figura 5.20: Las proteínas Dhh1, Lsm1, Pat1 y Xrn1 son necesarias para la inducción transcripcional de genes regulados por la ruta CWI. (A) Los niveles de expresión de los genes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3* se analizaron mediante qPCR en la cepa silvestre y en los mutantes indicados tras el tratamiento durante 2 horas con RC (30 $\mu\text{g/ml}$) o ZYM (0,8 U/ml). Los niveles relativos de expresión se calcularon comparando los niveles de mRNA de cada gen de las muestras tratadas frente a las no tratadas para cada cepa. (B) En el panel inferior se muestran los datos correspondientes a los niveles de mRNA basales de cada gen en los mutantes indicados. Estos niveles fueron calculados comparando los niveles de mRNA de cada gen en los mutantes seleccionados tras el crecimiento durante 2 horas en condiciones normales con los niveles de mRNA de cada gen en la cepa silvestre en las mismas condiciones. Para ambas cuantificaciones se ha utilizado el gen *ACT1* como control endógeno. Los datos presentados corresponden al menos a tres experimentos independientes (C) En el gráfico se muestra el porcentaje de células que contienen PBs (izquierda) y el número de PBs por cada 100 células (derecha) en la cepa silvestre y en los mutantes *edc3Δ* y *pat1Δ* expresando la fusión Dcp2-GFP. El gráfico muestra la media y desviación estándar de tres experimentos con al menos 100 células cada uno de ellos. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores de la cepa WT con los diferentes mutantes para cada tratamiento en los experimentos de (A) y (C). Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$).

Como se muestra en la Figura 5.20A, los niveles de mRNA de *MLP1* están afectados tras el tratamiento con ZYM en los tres mutantes *dhh1Δ*, *lsm1Δ* y *pat1Δ*, confirmando los resultados del rastreo. El mismo efecto se observa con RC, sugiriendo así que la reducción en los niveles de mRNA de *MLP1* en estos mutantes no es específico del efecto de la ZYM sobre la pared celular.

Un efecto similar se observó para los genes *SRL3* y *PIR3*, con la particularidad de que en la cepa *lsm1Δ*, la expresión de *SRL3* solo se vio afectada en el tratamiento con RC. Es importante destacar que la inducción transcripcional de los tres genes es similar tanto en la cepa silvestre como en el mutante *edc3Δ* tras el tratamiento tanto con RC como con ZYM, corroborando los resultados del rastreo. La afectación en los niveles de expresión de *MLP1* y *SRL3* en las cepas *dhh1Δ*, *lsm1Δ* y *pat1Δ* fue aproximadamente un 50%, mientras que en el caso del gen *PIR3* el efecto fue mucho más severo (Figura 5.20A). En cuanto al mutante *xrn1Δ*, solo se estudió el efecto del tratamiento con RC, en este mutante se observó una reducción drástica de la expresión de los genes analizados, similar a la observada en los otros mutantes analizados.

Varios estudios han descrito la participación de Xrn1, junto con Lsm1, Pat1 y Dhh1, en la transcripción en condiciones basales (Haimovich et al., 2013; Fischer et al., 2020). Por este motivo, se cuantificaron los niveles de mRNA de *MLP1*, *SRL3* y *PIR3* en los cinco mutantes seleccionados en condiciones de ausencia de estrés. Como se observa en la Figura 5.20B, los niveles basales de mRNA de los tres genes se encuentran significativamente elevados en la cepa *xrn1Δ*, lo que sugiere la participación de Xrn1 en la regulación basal de estos genes, dificultando el estudio de su contribución a la regulación de los mismos en condiciones de estrés de pared, por este motivo, *xrn1Δ* fue descartado de futuros experimentos.

En conjunto, estos datos confirman la participación de los genes *DHH1*, *LSM1* y *PAT1* en la respuesta transcripcional de la célula frente al estrés de pared. Además, en un mutante *edc3Δ*, al igual que en un mutante *pat1Δ*, la formación de PBs está muy disminuida con respecto a la cepa silvestre en condiciones de estrés (Figura 5.20C). Al ser Edc3 un componente fundamental de los PBs (Decker et al., 2007), nuestros resultados sugieren que la disminución de los niveles de mRNA en los mutantes estudiados no se debe a un defecto general en el ensamblaje de PBs, por lo que las proteínas Pat1, Lsm1 y Dhh1 deben tener otra función en relación a la expresión génica en las condiciones de estudio.

5. RESULTADOS

5.13. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LOS GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI EN CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR EN AUSENCIA DE *PAT1*.

A partir de los resultados anteriores, se decidió profundizar en la implicación de Pat1 en la respuesta transcripcional mediada por la ruta CWI, teniendo en cuenta que Lsm1 forma parte de un complejo de 7 proteínas y que el mutante *lsm1Δ* ensambla PBs de forma constitutiva (Teixeira & Parker, 2007), mientras que Dhh1 ha sido localizada en determinadas condiciones en gránulos de estrés (Swisher & Parker, 2010), haciendo el estudio de ambas proteínas más complicado. La proteína Pat1 es una proteína de unión a RNA que posee importantes funciones en la degradación y traducción del mRNA y que forma parte del núcleo conservado de elementos integrantes de PBs, como ya se detallado en la introducción de este trabajo.

Con el objetivo de descartar que el efecto observado sobre la expresión génica del mutante *pat1Δ* se debiera a algún tipo de alteración del patrón temporal de inducción de la expresión, se procedió a estudiar la cinética de expresión de los genes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3* en condiciones de estrés sobre la pared, analizándose los niveles de mRNA en las cepas silvestre y *pat1Δ*, a diferentes tiempos de tratamiento (hasta 6 horas) con RC. Como se muestra en la Figura 5.21A-B, el incremento en los niveles de mRNA en los genes *MLP1* y *SRL3* sigue un patrón similar en ambas cepas, aunque los niveles de mRNA en la cepa *pat1Δ* son mucho menores que en la cepa silvestre. El aumento de los niveles de mRNA de estos genes comienza antes de los 30 minutos de tratamiento alcanzando el pico máximo en torno a los 120 minutos en ambas cepas. Pasado este tiempo los niveles de mRNA descienden de manera progresiva.

En el caso del gen *PIR3*, como se observó anteriormente a las 2 horas de tratamiento, los niveles de mRNA en la cepa *pat1Δ* están considerablemente reducidos respecto a los niveles que presenta la cepa silvestre a lo largo de todo el estudio (Figura 21.C), alcanzando en este caso el pico máximo de niveles de mRNA a los 240 minutos, algo retrasado en el tiempo en comparación con los genes *MLP1* y *SRL3*, cuyo máximo se encuentra a los 120 minutos en ambos casos.

5. RESULTADOS

A partir de los resultados mostrados en la Figura 5.21, se puede concluir que la ausencia de *PAT1* afecta significativamente a los niveles de expresión de genes CWI-dependientes a lo largo de todo el tiempo de exposición a RC.

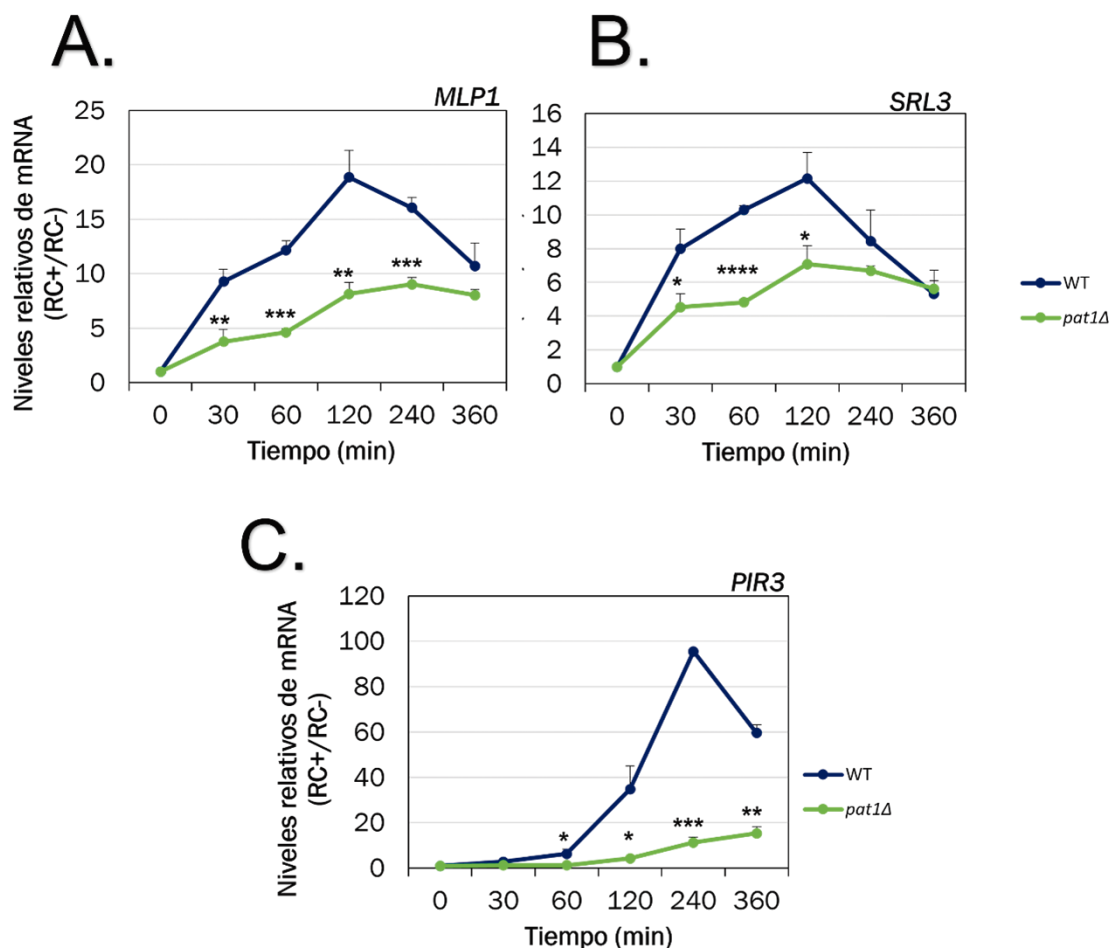


Figura 5.21: La delección de *PAT1* reduce la expresión de genes regulados por la ruta CWI en presencia de RC. La cantidad de mRNA se determinó mediante qPCR utilizando el gen *ACT1* como control interno. Las células de la cepa silvestre y *pat1Δ* se trataron con RC (30 μ g/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de expresión se calcularon comparando los niveles de mRNA de las células tratadas frente a las no tratadas relativizadas respecto al tiempo 0 (valor 1). Los gráficos correspondientes a los genes *MLP1* (A), *SRL3* (B) y *PIR3* (C) se construyeron a partir de la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores de la cepa silvestre frente a los de la cepa mutante en cada tiempo ensayado. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$), (**** $P \leq 0,0001$).

5.14. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN GLOBAL DE EXPRESIÓN GÉNICA DEL MUTANTE *pat1Δ*.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se decidió estudiar el papel del gen *PAT1* en la respuesta transcripcional a nivel global en condiciones de estrés de

5. RESULTADOS

pared. Para ello, se ha analizado el patrón de expresión de la cepa silvestre BY4741 y del mutante *pat1Δ*, en condiciones basales y de estrés de pared, tratando ambas cepas con RC (30 µg/ml) durante 2 horas. Los perfiles transcripcionales se han estudiado utilizando *microarrays* de DNA de la plataforma *Affymetrix* en los que están impresos todos los genes de *Saccharomyces cerevisiae* (ver *Materiales y Métodos*).

5.14.1. Análisis del perfil global de expresión génica del mutante *pat1Δ* en condiciones basales.

Aunque el objetivo principal de estos experimentos era la caracterización de la posible función de *PAT1* en la expresión de los genes que se inducen a través de la ruta CWI, se analizó también el perfil de expresión global de la cepa silvestre y el mutante *pat1Δ* en ausencia de estrés para conocer que genes están afectados basalmente por la ausencia de Pat1, teniendo en cuenta su papel en procesos de degradación de mRNAs. El análisis de los *ratios* de expresión *pat1Δ*/WT mostró la inducción ($ratio\ pat1Δ/WT \geq 2$) de 87 genes en el mutante respecto a los valores obtenidos en la cepa silvestre (Anexo 1, Tabla 1.1S), lo que indica que la cantidad de mRNA de estos genes es menor en presencia de Pat1 en condiciones normales de crecimiento. Dado que Pat1 interviene en la degradación del mRNA estos datos son esperables. Curiosamente, 37 genes muestran una disminución en los niveles de expresión ($ratio\ pat1Δ/WT \leq 0,5$) por lo que estarían regulados positivamente por Pat1 en condiciones basales (Anexo 1, Tabla 1.2S). Dentro del grupo de mRNAs inducidos en el mutante *pat1Δ*, destacan los relacionados con el metabolismo de carbohidratos, el transporte y la respuesta a estrés. En cuanto a los mRNAs afectados negativamente en ausencia de *PAT1*, se encuentran genes relacionados con diversas funciones celulares destacando el metabolismo de fosfato y diversos transportadores y genes de función desconocida. Los genes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3* no mostraron afectación basal, confirmando los resultados obtenidos por qPCR previamente (Figura 5.20B).

Durante la realización de este trabajo, se publicó un estudio donde se analiza el perfil transcripcional del mutante *pat1Δ* mediante secuenciación de RNA (*RNA-seq*) en condiciones basales (He et al., 2018). En este trabajo, se indica que, de los aproximadamente 6000 genes de la levadura *S. cerevisiae*, 1625 de ellos se encontraban desregulados con respecto a la cepa silvestre, 940 de ellos inducen su

expresión en el mutante y 685 mostraron niveles reducidos de mRNA, comparándolos con la cepa silvestre. De los 87 genes con incremento de mRNA en nuestro estudio, 66 (74%) están presentes en el estudio de He y colaboradores, mientras que de los 37 genes que se reprimen en nuestro estudio, 14 de ellos son comunes (37%). El grado de similitud observado puede deberse a que la plataforma de análisis a gran escala utilizada en los dos estudios es diferente y que la metodología *RNA-seq* tiene mayor sensibilidad que los *microarrays*. También se ha de tener en cuenta que el fondo genético de la levadura utilizada es diferente, ya que en nuestro estudio se emplea la cepa BY4741 y en el estudio de He y colaboradores emplean el fondo genético W303.

5.14.2. Análisis de la respuesta transcripcional a Rojo Congo.

El análisis de los datos de expresión obtenidos mediante *microarrays*, comparando los niveles de mRNA de la cepa silvestre tratada durante 2 horas con RC (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) frente a la misma cepa sin tratar, reveló que el tratamiento con RC induce una respuesta transcripcional de 87 genes ($\text{ratio WT-RC}/\text{WT} \geq 2$) (Anexo 2, Tabla 1S) y la represión de 5 genes ($\text{ratio WT-RC} \leq 0,5$) (Anexo 2, Tabla 2.1S). Estos datos en cuanto al número y tipo de genes afectados concuerdan con los trabajos publicados anteriormente en nuestro grupo (García et al., 2004; Sanz et al., 2012). Sin embargo, en el caso del mutante *pat1Δ*, tal como se indica en la gráfica de dispersión incluida en la Figura 5.22, globalmente los niveles de expresión diferencial en presencia de RC son de menor magnitud.

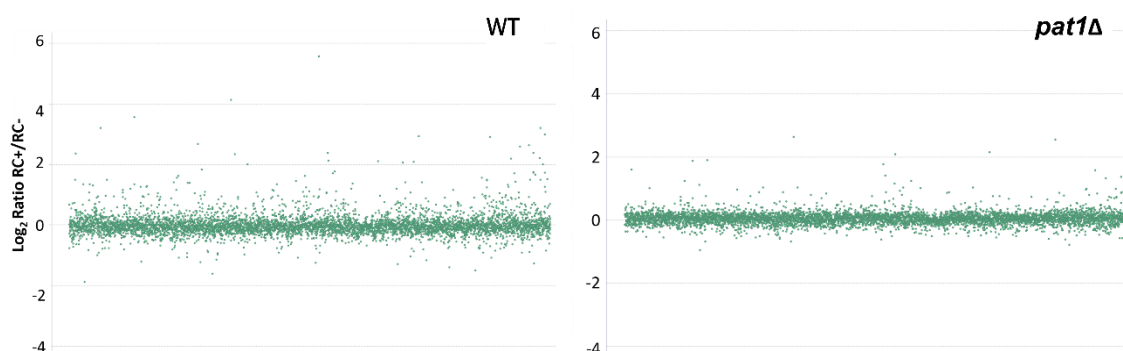


Figura 5.22: Gráfica de dispersión de los ratios normalizados de expresión génica (RC +/ RC -) en las cepas WT y *pat1Δ*. La gráfica se ha construido representando el $\log_2$ del *ratio* de expresión génica (tratamiento/no tratamiento) frente a los ORFs correspondientes (puntos). La nube de puntos se ha realizado con el programa informático *Spotfire*.

5. RESULTADOS

Al comparar los datos procedentes de la cepa silvestre con los del mutante *pat1Δ*, de los 87 genes inducidos en la cepa silvestre, 65 genes (75% de la respuesta), vieron disminuidos sus niveles de mRNA en la cepa *pat1Δ*, aunque 9 de ellos estaban inducidos en condiciones basales en el mutante *pat1Δ* en ausencia de RC dificultando la interpretación de su dependencia de Pat1. (Figura 5.23, Anexo 3, Tabla 3.1S). Para determinar a qué categoría con respecto a la regulación por Pat1 pertenecía cada gen, se estableció un punto de corte $\frac{pat1\Delta RC/pat1\Delta}{WT RC/WT} \leq 0,65$, correspondiente a un 65% como mínimo de disminución en los niveles de expresión de cada gen (ver *Materiales y métodos*). En resumen, se puede agrupar la respuesta a RC en una cepa silvestre en tres grupos de genes respecto a la dependencia de *PAT1*. (Figura 5.23, Anexo 3, Tabla 3.1S).

- Grupo 1: 56 genes cuyo incremento en cantidad de mRNA en presencia de RC es dependiente de Pat1, entre ellos *MLP1*, *SRL3* y *PIR3*.
- Grupo 2: 22 genes cuyo incremento en la cantidad de mRNA en presencia de RC es independiente de Pat1. Estos genes, a pesar de no considerarlos dependientes de Pat1 mediante nuestro criterio de clasificación, muestran globalmente una tendencia a presentar niveles de mRNA menores que los obtenidos en la cepa silvestre (*ratio* promedio de 2,9 en WT RC/WT frente a 2,4 en *pat1Δ* RC/*pat1Δ*), en coincidencia con lo descrito anteriormente.
- Grupo 3: 9 genes cuyos niveles de expresión aumentan en ausencia de Pat1 en condiciones basales de crecimiento.

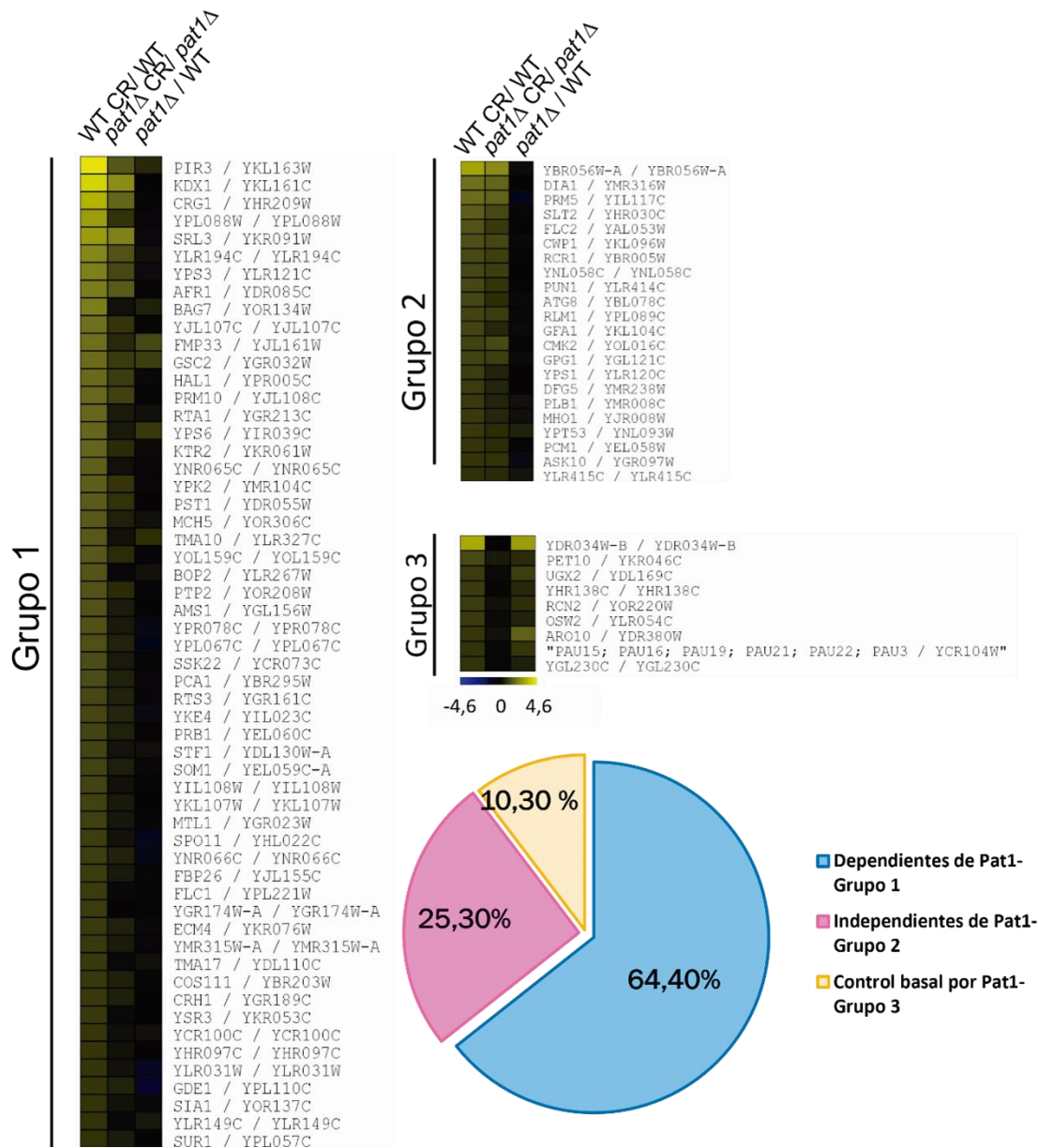


Figura 5.23: Efecto de la ausencia de Pat1 sobre los niveles de expresión génica en presencia y ausencia de RC. Se muestran los *ratios* de expresión comparando la respuesta transcripcional a RC en las cepas WT (primera columna), *pat1Δ* (segunda columna) y el *ratio* de expresion de *pat1Δ* vs WT sin tratamiento en la tercera columna. La representación gráfica se realizó con el programa MeV 4.9 (Multi Experiment Viewer). Para este análisis se tuvieron en cuenta solo los genes inducidos en la cepa WT por RC y se han clasificado respecto a la dependencia de Pat1 para su activación basal o mediada por RC. El grado de saturación del color representa el valor del $\log_2$ del *ratio* de expresion como se indica en la escala. Los tonos mas cercanos al amarillo corresponden a mayor nivel de transcrito. El gráfico de sectores muestra el porcentaje de genes dependientes (azul), independientes (rosa) o controlados de manera basal por Pat1 (amarillo).

En la Tabla 5.2 se muestra una relación de la distribución funcional en los genes incluidos en cada grupo. Como era de esperar, destaca la presencia de genes relacionados con biogénesis y organización de la pared celular, respuesta a estrés y de función desconocida. Todos estos datos indican que Pat1 es necesario para el

5. RESULTADOS

establecimiento óptimo de la respuesta transcripcional de la levadura tras la exposición a RC. De hecho, se puede observar como un número significativo de los 56 genes *Pat1*-dependientes, también lo son de otros elementos implicados en la regulación de la respuesta transcripcional a RC, como de *Swi3* (complejo remodelador de cromatina SWI/SNF), *Gcn5* (complejo acetilador de histonas SAGA) o del factor de transcripción de la ruta CWI *Rlm1*, incluyendo 43, 32 y 49 genes, respectivamente (Anexo 4, Tabla 4.1S).

Grupo Funcional	Respuesta a RC en la cepa WT	Dependencia de <i>PAT1</i>		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Desconocido	17	11	3	3
Biogénesis y organización de la pared	25	13	9	2
Respuesta a estrés	14	7	4	1
Transporte	8	8	2	0
Esporulación	3	3	0	0
Metabolismo de lípidos	6	6	1	0
Metabolismo de carbohidratos	2	2	0	0
Modificación de proteínas	2	2	0	0
Regulación del ciclo celular	1	0	1	0
Morfogénesis	1	1	0	0
Crecimiento invasivo	2	0	2	0
Biogénesis y organización de orgánulos	3	2	0	1
Metabolismo de aminoácidos	1	0	0	1
Mitosis	1	1	0	0
Respiración	1	0	0	1
Total	87	56	22	9

Tabla 5.2: Agrupación funcional de los genes inducidos tras el tratamiento con RC en la cepa silvestre dentro de los grupos definidos según el tipo de dependencia de *Pat1*. Las agrupaciones se realizaron utilizando la información de la base de datos SGD (*Saccharomyces* genome database)

5.15. LA AUSENCIA DE *PAT1* NO AFECTA A LA FOSFORILACIÓN DE LA MAPK *Slt2*.

Con el objetivo de descartar la posibilidad de que el efecto sobre la activación transcripcional que observamos en los ensayos de expresión estuviera relacionado con alteraciones en la activación de la ruta CWI, se analizó el estado de fosforilación de la MAPK *Slt2*, como indicador del nivel de activación de la ruta, en el mutante *pat1Δ* en presencia y ausencia de RC. Como se observa en la Figura 5.24, los niveles de fosfo-*Slt2* fueron semejantes a los de la cepa silvestre, lo que indica que, en

principio, el efecto sobre los niveles de expresión en el mutante *pat1Δ* no se debe a un defecto de la activación de MAPK.

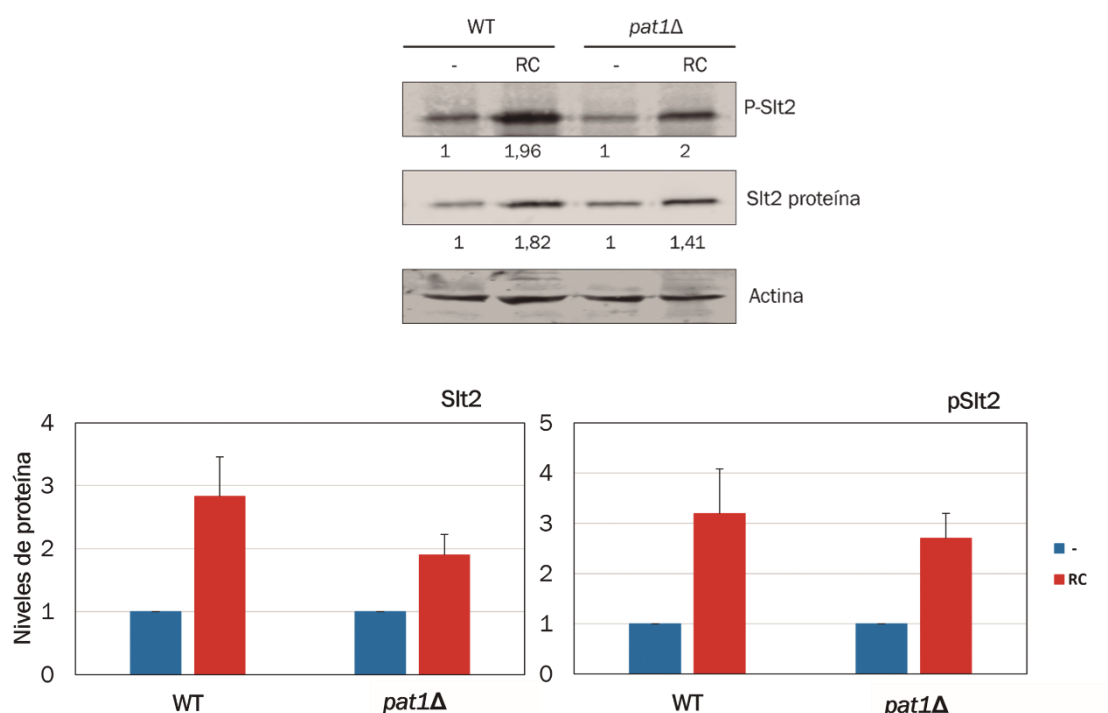


Figura 5.24: La fosforilación de Slt2 en condiciones de estrés no está afectada en un mutante *pat1Δ*. Western-blot representativo de extractos proteicos totales de células de la cepa silvestre (WT) y el mutante *pat1Δ*. Las células se trataron durante dos horas con RC (30 μ g/ml). Para la detección de fosfo-Slt2, (P-Slt2), se ha utilizado un anticuerpo anti-fosfo-p42/p44 MAPK (Thr202/Thr204) y para la detección de la proteína Slt2 un anticuerpo anti-Mpk1. Como control de carga se ha empleado la proteína Actina y para su detección se ha empleado un anticuerpo anti-Actina. Los valores que aparecen debajo de las imágenes de Western-blot corresponden a la cantidad relativa de cada proteína estudiada en presencia de RC con respecto a los valores que se obtienen de la misma en condiciones basales. Este valor fue calculado a partir de la cuantificación densitométrica de la banda de cada proteína normalizada con respecto a la banda de Actina, utilizando el valor obtenido de la muestra no tratada de cada cepa como referencia (valor 1). En el panel inferior se muestran los gráficos obtenidos a partir de la media y desviación estándar de al menos tres experimentos de la cuantificación de la proteína Slt2 (izquierda) y la variante fosforilada (derecha). El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa silvestre en cada condición con los respectivos valores para la cepa *pat1Δ*. No se observan cambios estadísticamente significativos.

5.16. LA UNIÓN Y LA PROGRESIÓN DE LA RNA POLIMERASA II EN LOS GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI DEPENDE DE Pat1.

A la vista de los resultados anteriores, decidimos estudiar si la unión de la RNA Polimerasa II, (RNA Pol II), a los genes CWI-dependientes se encontraba afectada en

5. RESULTADOS

ausencia de Pat1, al igual que ocurre con los niveles de expresión. Para ello, se aislaron cromatinas procedentes de la cepa silvestre y del mutante *pat1Δ* a diferentes tiempos del tratamiento con RC. La inmunoprecipitación de la cromatina se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-Rpb1 de la RNA Pol II y se analizó el DNA obtenido mediante qPCR, amplificando las regiones deseadas de la región promotora y ORF. Para conocer en detalle la unión de la RNA Pol II al gen *MLP1*, se analizó la región promotora (POLII) situada entre las posiciones -143 y +56, tomando como referencia el primer nucleótido (+1) del marco abierto de lectura (ATG). En cuanto a la región codificante, se realizó un barrido abarcando las regiones ORF1, situada en las posiciones +98/+250, ORF2 correspondiente a la zona comprendida entre los nucleótidos +555/+687 y la zona terminal del ORF, (ORF3), en las posiciones +1210/+1359 que incluye el codón de terminación (TAA), situado en la posición 1302. En la Figura 5.25A se muestra un esquema del gen y de las regiones analizadas.

Los resultados de estos experimentos indican que el reclutamiento de la RNA Pol II en la zona promotora de *MLP1* es máximo tras dos horas de tratamiento con RC, (Figura 5.25B), en concordancia con sus niveles de mRNA (Figura 5.21). En el mutante *pat1Δ*, el reclutamiento se encuentra parcialmente reducido con respecto a la cepa silvestre durante los tiempos estudiados aunque siguiendo un patrón temporal similar al observado en la cepa silvestre.

En cuanto a la unión de la RNA Pol II a la región codificante de *MLP1*, en la cepa silvestre los valores máximos de ocupación se alcanzan en el intervalo de tiempo que transcurre entre los 120 y 240 minutos de tratamiento, (2 y 4 horas respectivamente), con RC en las regiones estudiadas, mientras que en el mutante los niveles de entrada de la RNA Pol II están de nuevo parcialmente afectados, incluso de manera más acusada que en la zona promotora (Figura 5.25B), en concordancia con los datos de expresión temporal presentados anteriormente (Figura 5.21).

Dentro de la zona codificante de *MLP1*, el reclutamiento de la Pol II a las zonas ORF2 y ORF3 es el que se encuentra más afectado en la cepa mutante *pat1Δ* con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere que Pat1 pueda participar también en la progresión de la RNA Pol II a lo largo de la zona codificante de los genes inducidos en condiciones de estrés (RC).

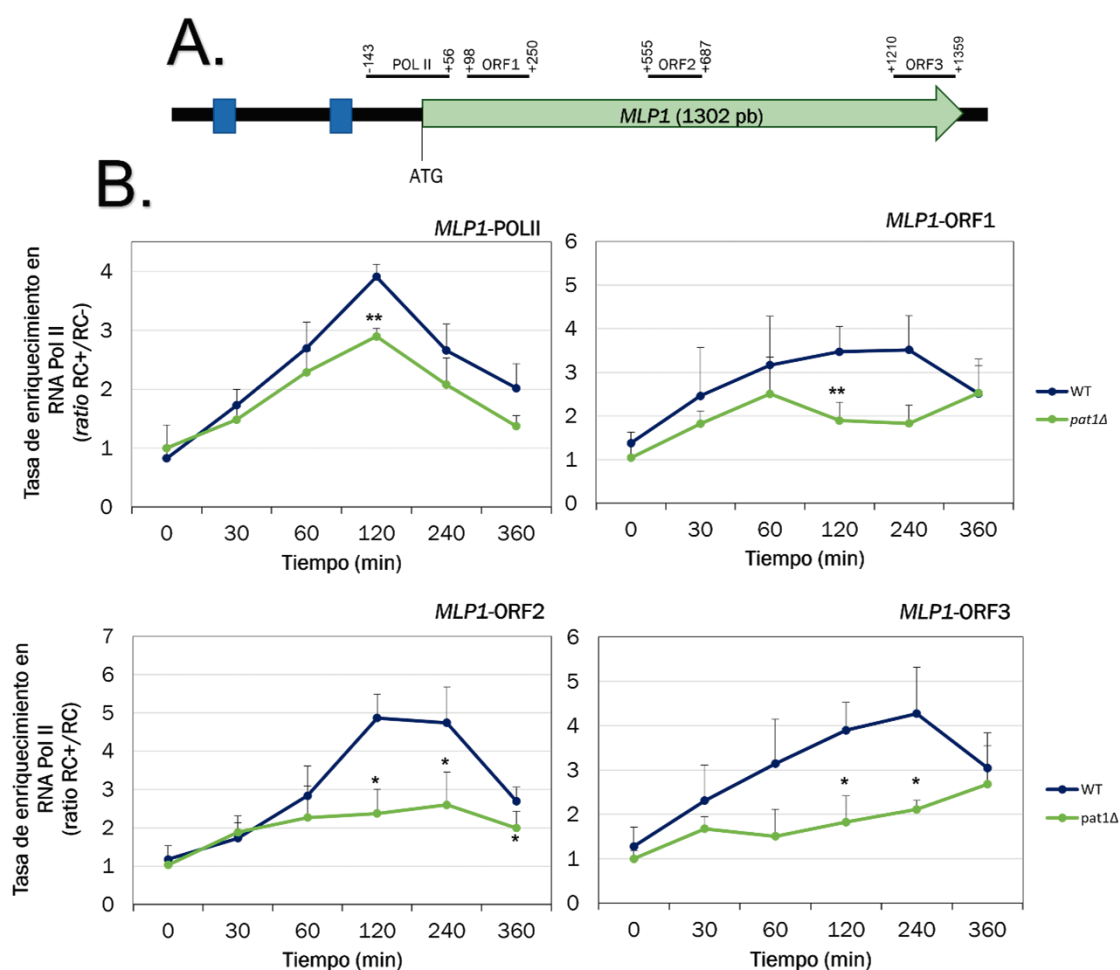


Figura 5.25: La unión de la RNA Pol II al gen *MLP1* se encuentra parcialmente afectada en la cepa *pat1Δ* en condiciones de estrés de pared. (A) Esquema del gen *MLP1* dónde se marcan las zonas de unión de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de ChIP y las potenciales regiones de unión del factor de transcripción Rlm1 en el promotor (rectángulos azules). **(B)** La unión de la RNA Pol II se analizó mediante ChIP en la cepa silvestre y en el mutante *pat1Δ* a diferentes tiempos durante las 6 horas siguientes al tratamiento con RC (30 μg/ml). La entrada de RNA Pol II se analizó en las regiones POLII, ORF1, ORF2 y ORF3. En todos los casos, se ha utilizado una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae* como control endógeno. Los gráficos se han construido a partir de la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa WT con los obtenidos en el mutante *pat1Δ*. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (*P≤0,05), (**P≤0,01), (***)P≤0,001).

Con el objetivo de demostrar que el efecto descrito de la ausencia de Pat1 sobre la entrada de la RNA Pol II en la zona promotora y codificante de *MLP1* era un fenómeno extensible a otros genes CWI-dependientes, procedimos a estudiar la entrada de la RNA Pol II en los promotores y regiones codificantes de los genes *SRL3* y *PIR3*. Para ello se utilizaron cromatinas aisladas de células de la cepa silvestre y del mutante *pat1Δ* correspondientes a cultivos tratados o no durante 2 horas con RC a 24°C. Como en el caso de *MLP1*, se amplificaron por qPCR regiones en el promotor

5. RESULTADOS

de estos genes correspondientes al sitio de inicio de la transcripción denominadas SRL3POLII y PIR3POLII, localizadas entre las posiciones -142 y +43 (*SRL3*) y los nucleótidos -126 y +31 (*PIR3*), y las zonas codificantes denominadas SRL3ORF2, localizada entre las posiciones +365 y +520 del gen *SRL3* y PIR3ORF2, situada entre los nucleótidos +518/+666 del gen *PIR3*.

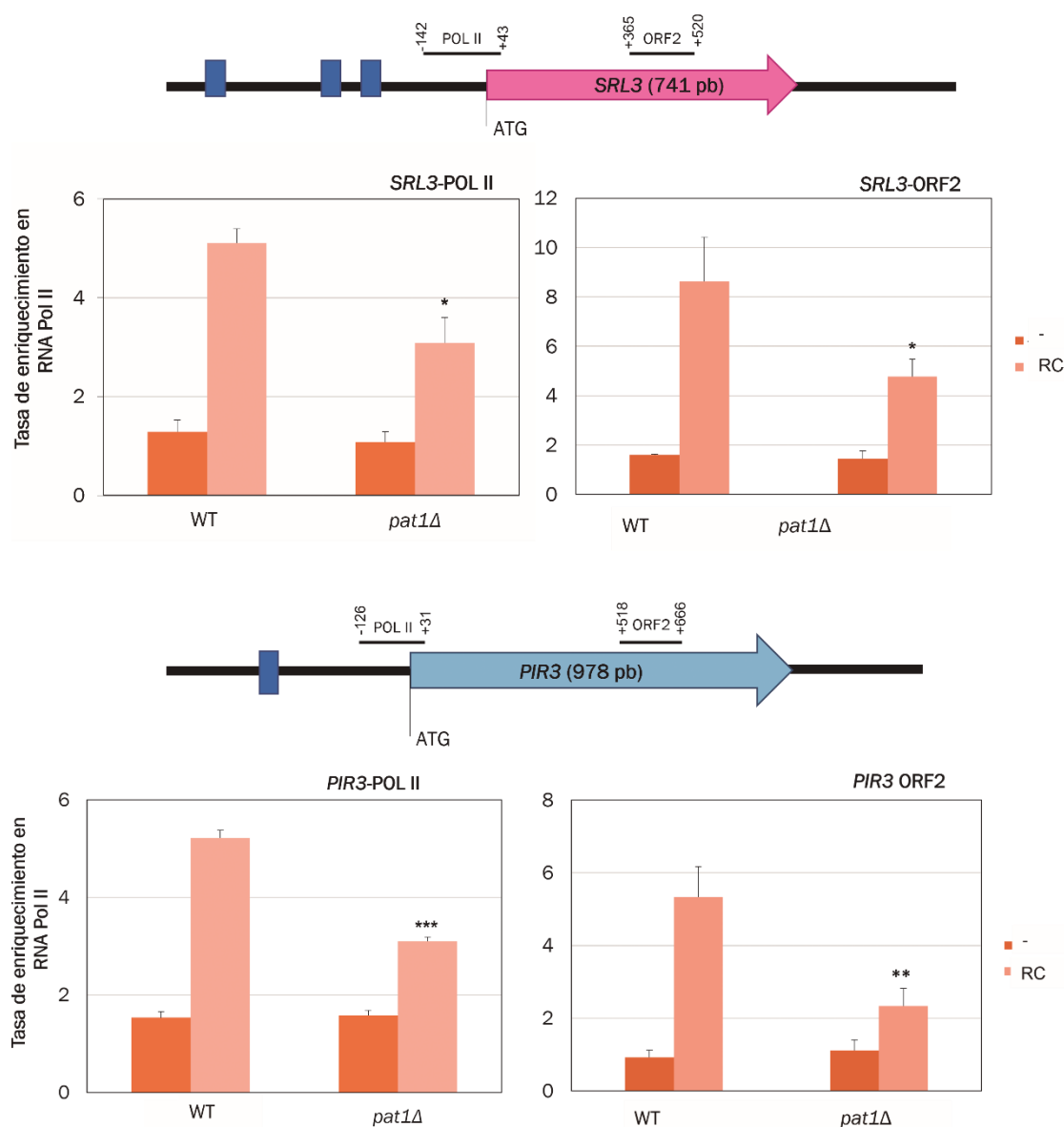


Figura 5.26: La entrada de la RNA Pol II a la zona promotora y codificante de los genes *SRL3* y *PIR3* depende parcialmente de *Pat1*. En el panel superior se muestra una representación esquemática del gen *SRL3* donde se muestran las zonas de unión de los oligonucleótidos utilizados y las potenciales zonas de unión del factor de transcripción Rlm1 (rectángulos azules) y el gráfico de cuantificación de la unión de la RNA Pol II a la zona promotora (izquierda) y ORF2 (derecha) del mismo. En el panel inferior se muestra el esquema del gen *PIR3* con las correspondientes zonas de unión de los oligonucleótidos utilizados y las regiones de unión de Rlm1 (rectángulos azules) y los gráficos correspondientes a la cuantificación de la unión de RNA Pol II a la zona promotora del gen (izquierda) y ORF2 (derecha). El estudio de la unión de la RNA Pol II a ambos genes se ha analizado mediante ChIP en la cepa silvestre y el mutante *pat1Δ* a las 2 horas tras el tratamiento con RC (30 μg/ml). En todos los casos, se ha utilizado una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae* como control endógeno. Los gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en RNA Pol II de las células tratadas y sin tratar y representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa WT con los obtenidos en el mutante *pat1Δ*. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$)

Como se muestra en la Figura 5.26, la unión de la RNA Pol II a la zona promotora y codificante de estos dos genes está afectada en el mutante con respecto a la cepa silvestre en condiciones de activación de la ruta, de manera similar a lo observado en el gen *MLP1*, mientras que en condiciones basales los niveles de ocupación son prácticamente idénticos en ambas cepas y en todas las regiones estudiadas. Estos resultados sugieren que *Pat1* juega un papel en la respuesta transcripcional adaptativa frente a situaciones de estrés sobre la pared celular.

5.17. LA ENTRADA DE Rlm1 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES REGULADOS POR LA RUTA CWI EN CONDICIONES DE ESTRÉS DE PARED DEPENDE DE *Pat1*.

El factor de transcripción Rlm1 controla prácticamente en su totalidad la respuesta transcripcional mediada por la ruta CWI y por esta razón procedimos a evaluar si la ausencia de *Pat1* afectaba o no a los niveles de Rlm1. Para ello, analizamos las cepas silvestre y *pat1Δ* expresando fusiones *RLM1*-3xHA, integradas en el genoma en el locus propio de *RLM1*. Ambas cepas se crecieron en ausencia y presencia de RC durante 2 horas y se evaluó la cantidad de Rlm1 mediante Western-blot utilizando anticuerpos anti-HA. Como se observa en la Figura 5.27, los niveles de Rlm1 no se encuentran afectados en el mutante *pat1Δ* tanto en condiciones basales como de tratamiento. En ambas cepas, en presencia de RC se observa un ligero cambio en el patrón de movilidad electroforética de Rlm1 en las muestras

5. RESULTADOS

tratadas, asociado al efecto de la fosforilación de Rlm1 por Slt2 en estas condiciones, previamente descrito (Marín et al., 2009).

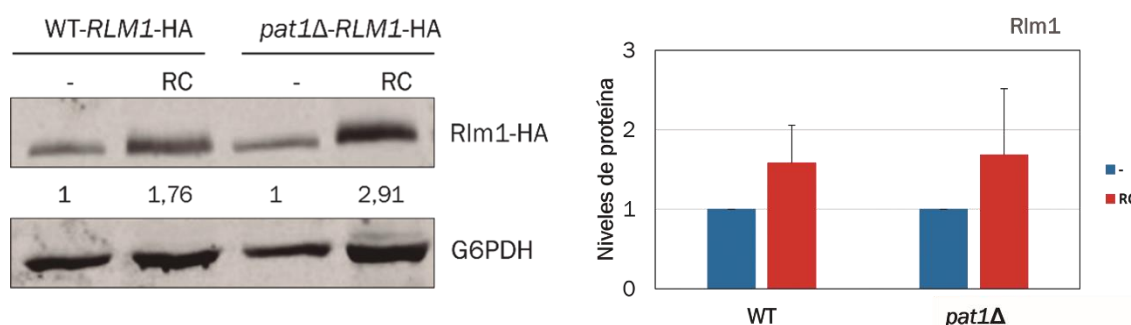


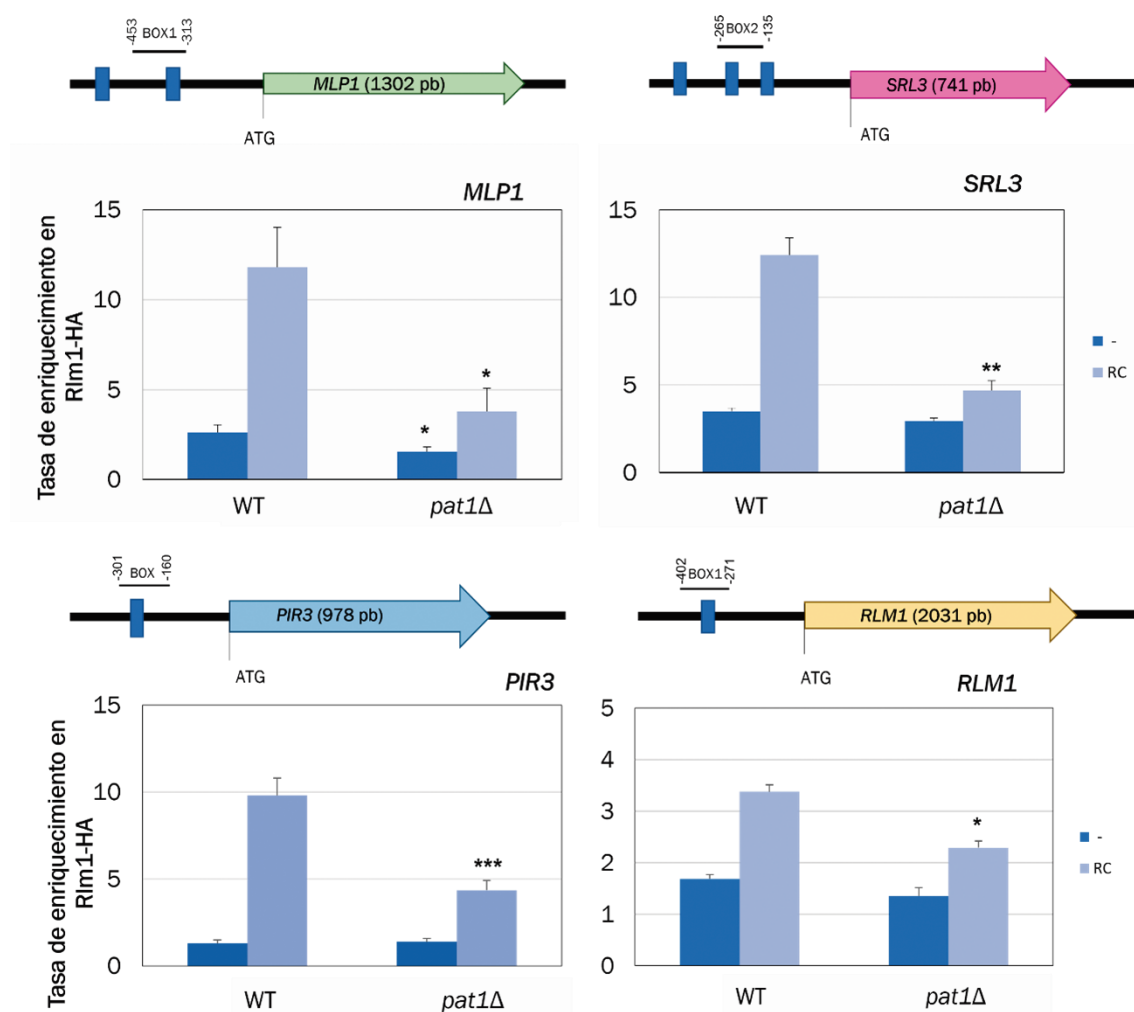
Figura 5.27: La ausencia de Pat1 no afecta a la cantidad de Rlm1. Western-blot representativo de extractos proteicos totales de células de la cepa silvestre (WT) y el mutante *pat1Δ*, ambas expresando *RLM1*-HA. Las células se trataron durante dos horas con RC (30 μg/ml). Para la detección de Rlm1-HA se utilizó un anticuerpo anti-HA. Como control de carga se empleó la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y para su detección se ha empleado un anticuerpo anti-G6PDH. Los valores que aparecen debajo de las imágenes de Western-blot corresponden a la cantidad relativa de Rlm1 en condiciones de estrés con respecto a los valores que se obtienen en condiciones basales. Este valor fue calculado a partir de la cuantificación densitométrica de la banda de cada proteína normalizada con respecto a la banda de G6PDH, utilizando el valor de la muestra sin tratar para cada cepa como referencia (valor 1). El gráfico muestra la media y desviación estándar de al menos tres experimentos de la cuantificación de la proteína Rlm1. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa silvestre en cada condición con los respectivos valores para la cepa mutante. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

Una vez comprobado que la cantidad de Rlm1 no estaba alterada en ausencia de *PAT1* se estudió, mediante ensayos de ChIP, el reclutamiento de Rlm1 a los promotores de los genes dependientes de la ruta CWI empleando las cepas WT-*RLM1*-HA y *pat1Δ*-*RLM1*-HA. Para ello, se aisló la cromatina de estas cepas tratadas o no con RC durante 2 horas y se llevó a cabo la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA. El DNA obtenido se analizó mediante qPCR en las zonas promotoras de los genes *MLP1*, *SRL3*, *PIR3* y el propio *RLM1*, cuya expresión en condiciones de estrés está regulada por el propio Rlm1 en un proceso de retroalimentación positiva (García et al., 2016). Concretamente, las regiones analizadas fueron aquellas que contenían los sitios consenso de unión para el factor de transcripción Rlm1: *MLP1*BOX1 (-453/-313), *SRL3*BOX2 (-265/-135), *PIR3*-BOX (-301/-160) y *RLM1*BOX (-402/-271). Como se observa en la Figura 5.28, la unión de Rlm1 al promotor de los genes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3* tras la exposición de las células a RC se encuentra comprometida en el mutante *pat1Δ*, observándose unas reducciones cercanas a un 75% respecto al valor obtenido en la cepa silvestre.

5. RESULTADOS

Además, para el gen *MLP1*, la entrada de Rlm1 en su promotor está también afectada en condiciones basales.

Es importante destacar que, en el mutante *pat1Δ*, la unión de Rlm1 a su propio promotor disminuye también con respecto a la cepa WT, pero en mucha menor medida (aproximadamente el 30%), que en los genes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3*. El análisis del perfil global de transcripción del mutante *pat1Δ* mostró que los niveles de mRNA de Rlm1 no estaban afectados en dicho mutante en relación con la cepa silvestre, por tanto, los resultados obtenidos permiten interpretar que el efecto observado de Pat1 sobre la entrada de Rlm1 en su propio promotor no parece afectar a los niveles de la proteína Rlm1, (Figura 5.27) y por lo tanto, la afectación en la inducción transcripcional frente a RC no se debería a la presencia de unos niveles insuficientes de Rlm1 en ausencia de *PAT1*.



5. RESULTADOS

Figura 5.28: Efecto de la ausencia de Pat1 en la entrada de Rlm1 a los promotores de genes CWI-dependientes. La asociación de Rlm1-HA fue analizada en las regiones MLP1BOX1, SRL3BOX2, PIR3BOX y RLM1BOX1, correspondientes a las potenciales zonas de unión de Rlm1 (rectángulos azules), mediante experimentos de ChIP a las 2 horas de tratamiento con RC (30 µg/ml) en la cepa silvestre (WT) y en el mutante *pat1Δ*. Los resultados obtenidos de entrada de Rlm1-HA se normalizaron con respecto a una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae*. Los gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en Rlm1-HA incluyendo la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en la cepa mutante frente a los valores de la cepa silvestre. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (** $P \leq 0,001$)

5.18. Pat1 ES NECESARIA PARA EL DESPLAZAMIENTO DE HISTONAS EN LOS PROMOTORES DE LOS GENES REGULADOS EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI.

Hasta el momento, los resultados presentados indican que Pat1 es necesaria para un óptimo inicio de la transcripción en cuanto a que influye tanto en la entrada de la RNA Pol II como del factor de transcripción Rlm1 en las regiones promotoras de genes inducidos por RC. Estos resultados son coherentes con el hecho de que los niveles de mRNA de estos genes se encuentren afectados en un mutante *pat1Δ*.

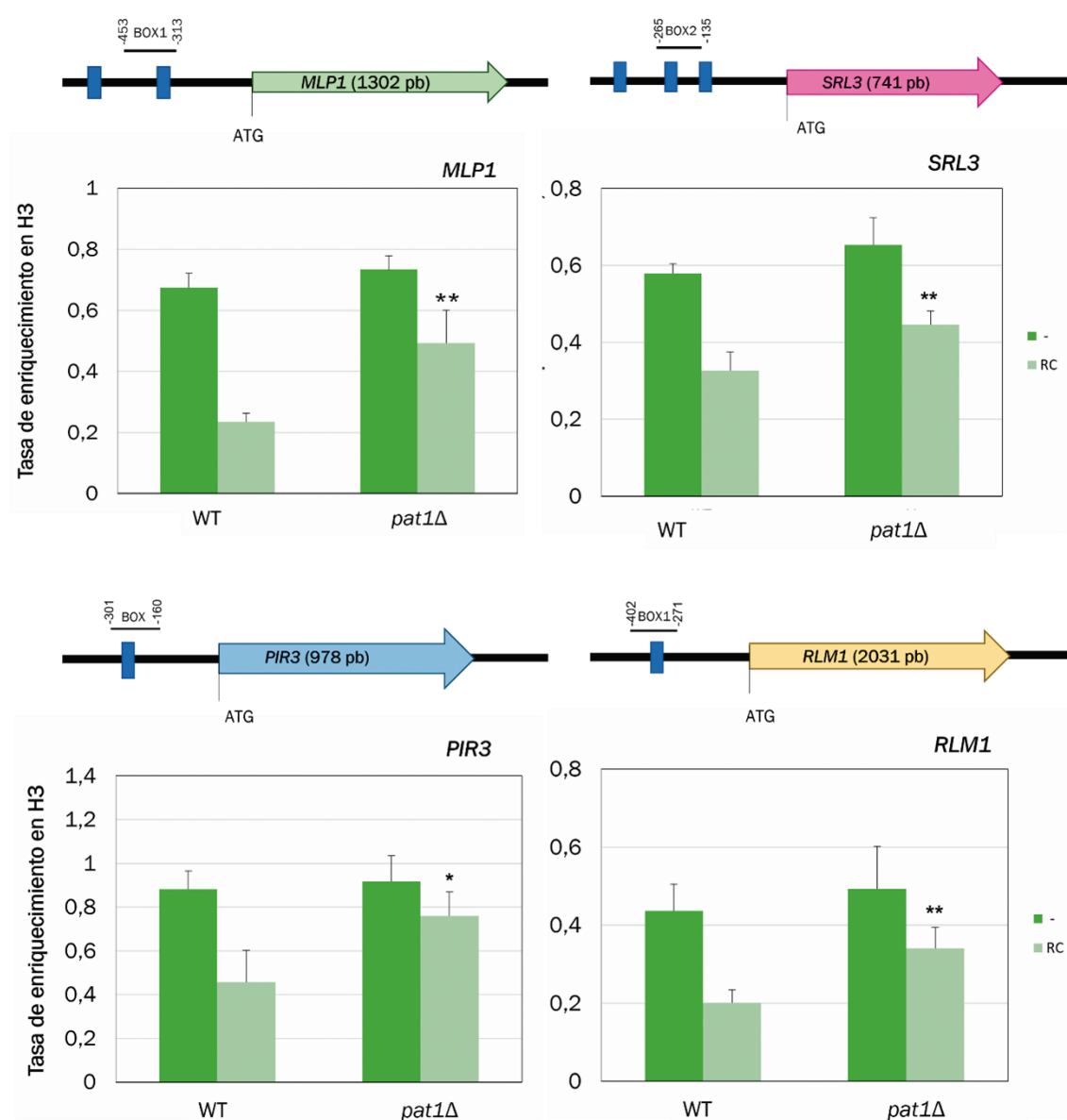
Un aspecto de gran relevancia en el inicio de la transcripción es la remodelación de la cromatina llevada a cabo por los complejos SWI/SNF y SAGA (Lin et al., 2020), que conducen al desplazamiento de los nucleosomas en la región promotora facilitando el acceso de la maquinaria transcripcional. Este proceso de remodelado se puede poner de manifiesto cuantificando los niveles de la histona H3 presentes en las regiones promotoras mediante experimentos de ChIP. Para estudiar si la ausencia de Pat1 pudiera afectar a la remodelación de la cromatina en condiciones de activación de la ruta CWI, se estudió el desplazamiento de la histona H3 mediante ChIP.

En estos experimentos, tras dos horas de tratamiento con RC, se aisló la cromatina de la cepa silvestre y la del mutante *pat1Δ*, y se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-H3, que reconoce la zona C-terminal de la histona H3. Posteriormente, se amplificó mediante qPCR las regiones de los promotores de los genes *MLP1*, *SRL3*, *PIR3* y *RLM1* que contienen las cajas de unión de Rlm1 (BOX), ya mencionadas anteriormente, para determinar el enriquecimiento en histona H3 en las mismas.

5. RESULTADOS

Como se observa en la Figura 5.29, mientras en la cepa WT se produce un desplazamiento de la histona H3 de magnitud significativa en los genes regulados por la ruta CWI, en la cepa *pat1Δ* no se produce un desplazamiento tan acusado. Por lo tanto, Pat1 es necesario parcialmente para la salida de las histonas que se produce en los promotores de los genes inducidos por la ruta CWI de manera estrés-dependiente.

Todos estos resultados sugieren que Pat1 es necesaria para la adecuada formación del complejo de pre-iniciación (PIC), y para la remodelación de la cromatina que permiten la transcripción de los genes dependientes de la ruta CWI cuando la integridad de la pared celular de la levadura se encuentra comprometida.



5. RESULTADOS

Figura 5.29. Desplazamiento de la histona H3 en el promotor de los genes regulados por la ruta CWI. Las células de la cepa silvestre (WT) y del mutante *pat1Δ* se han tratado durante 2 horas con RC (30 μg/ml). La unión de la histona H3 a los promotores ha sido analizada mediante ChIP. La zona promotora de interés se ha amplificado mediante qPCR en las regiones MLP1BOX1, SRL3BOX2, PIR3BOX y RLM1BOX1. Los gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en histona H3 y se han obtenido a partir de la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los datos de la cepa WT con los del mutante *pat1Δ* para cada gen analizado. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$)

5.19. Pat1 SE RECLUTA A LA REGIÓN CODIFICANTE DE LOS GENES *MLP1* Y *PIR3* EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI.

En base a los resultados anteriores y a trabajos previos en los que se ha descrito la entrada de Pat1 en los promotores de diversos genes de expresión constitutiva como *TEF4* y *PMA1* (Haimovich et al., 2013), nos planteamos estudiar si Pat1 era reclutada a los genes inducidos en condiciones de estrés de pared. Para comprobarlo, inicialmente se analizó si Pat1 se unía a la región promotora de los genes *MLP1* y *PIR3*, en presencia y ausencia de RC, mediante experimentos de ChIP.

Para ello, se cultivaron células de una cepa silvestre que porta una fusión del gen *PAT1* al epítipo FLAG, WT-*PAT1*-FLAG, sin y con RC durante dos horas. Posteriormente, se aisló la cromatina y fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-FLAG. El DNA purificado resultante fue analizado por qPCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes a las zonas MLP1BOX1 y PIR3BOX donde se une Rlm1. Estos experimentos no mostraron diferencias en el enriquecimiento en Pat1 en presencia de RC con respecto a las condiciones basales en ninguno de los dos promotores analizados (Figura 5.30).

Basándonos en el hecho de que la entrada de la RNA Pol II en la zona promotora de los genes estudiados está afectada en el mutante *pat1Δ*, procedimos a determinar, mediante ensayos de ChIP, el grado de ocupación por parte de Pat1-FLAG en la zona donde se detecta la entrada de la RNA Pol II en los genes *MLP1* y *PIR3* (MLP1POLII y PIR3POLII). En este caso, tampoco se encontró un enriquecimiento significativo en Pat1 en condiciones de tratamiento con RC respecto a los valores obtenidos en condiciones basales (Figura 5.30 A-B).

Por tanto, se puede concluir que Pat1, en nuestras condiciones de ensayo y con nuestro diseño experimental, no es detectado en las regiones promotoras de los

5. RESULTADOS

genes regulados por la ruta CWI en este estudio, aunque sí parece intervenir en la formación del PIC de estos genes, como ya hemos descrito previamente.

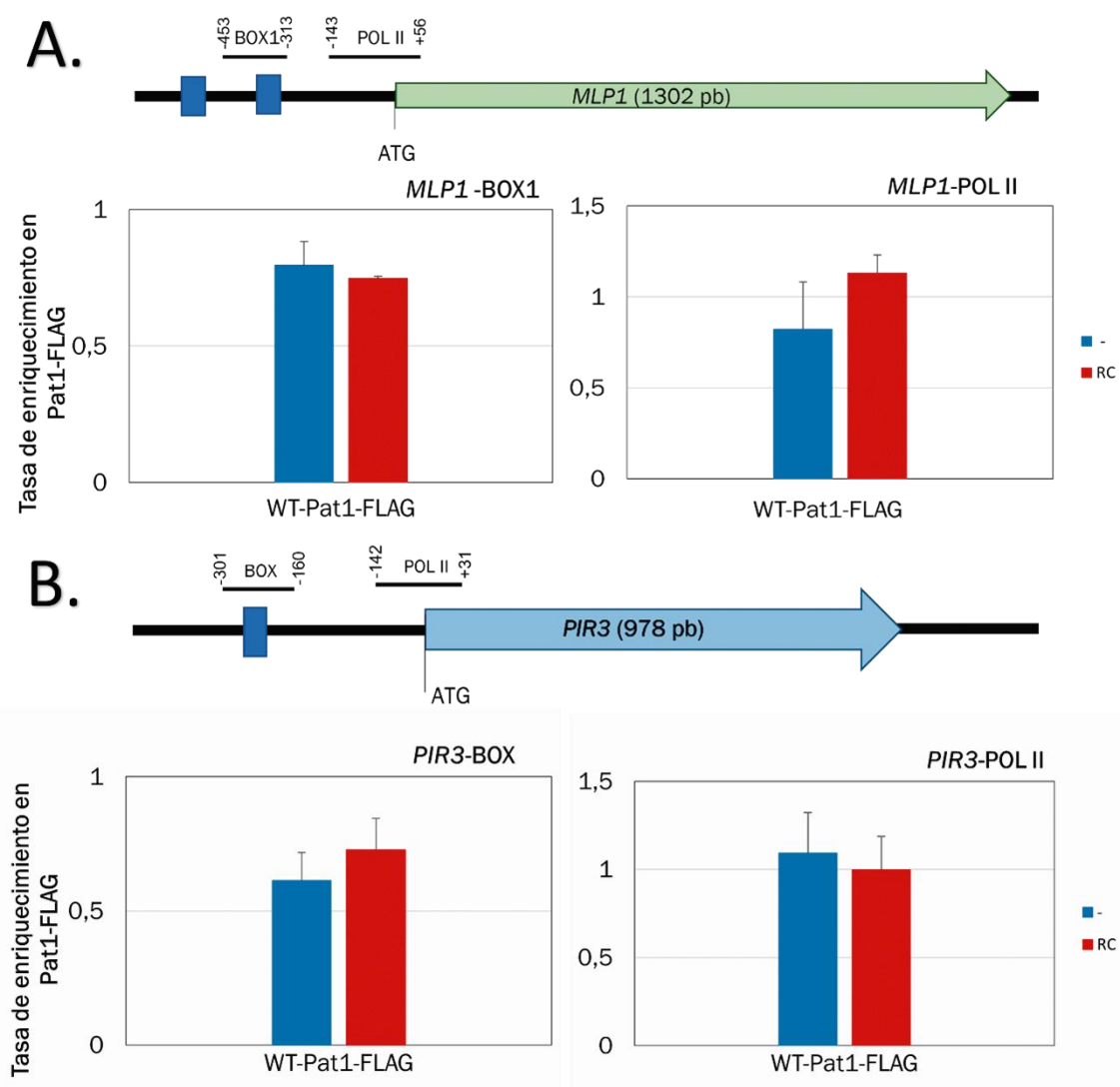


Figura 5.30: Pat1 no se recluta a los promotores de los genes regulados por la ruta CWI en condiciones de estrés. La asociación de Pat1-FLAG fue analizada en las regiones MLP1BOX1 y MLP1POLII (A) y en las regiones PIR3BOX y PIR3POLII del gen *PIR3* (B), mediante experimentos de ChIP a las 2 horas de tratamiento con RC (30 μ g/ml). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae*. Los gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en Pat1-FLAG y se han construido con la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en las células tratadas frente a las no tratadas no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas.

Para completar el estudio de la unión de Pat1 a distintas regiones de genes regulados por la ruta CWI, el análisis de la entrada de Pat1 se extendió a la zona codificante (ORF) de los genes *MLP1* y *PIR3* utilizando oligonucleótidos que amplifican la región ORF1 del gen *MLP1*, cercana al ATG, la zona ORF2, en la zona

5. RESULTADOS

media de la región codificante, y ORF3 en la zona terminal. Para el gen *PIR3* también se analizó la región denominada ORF2 en la zona intermedia del mismo.

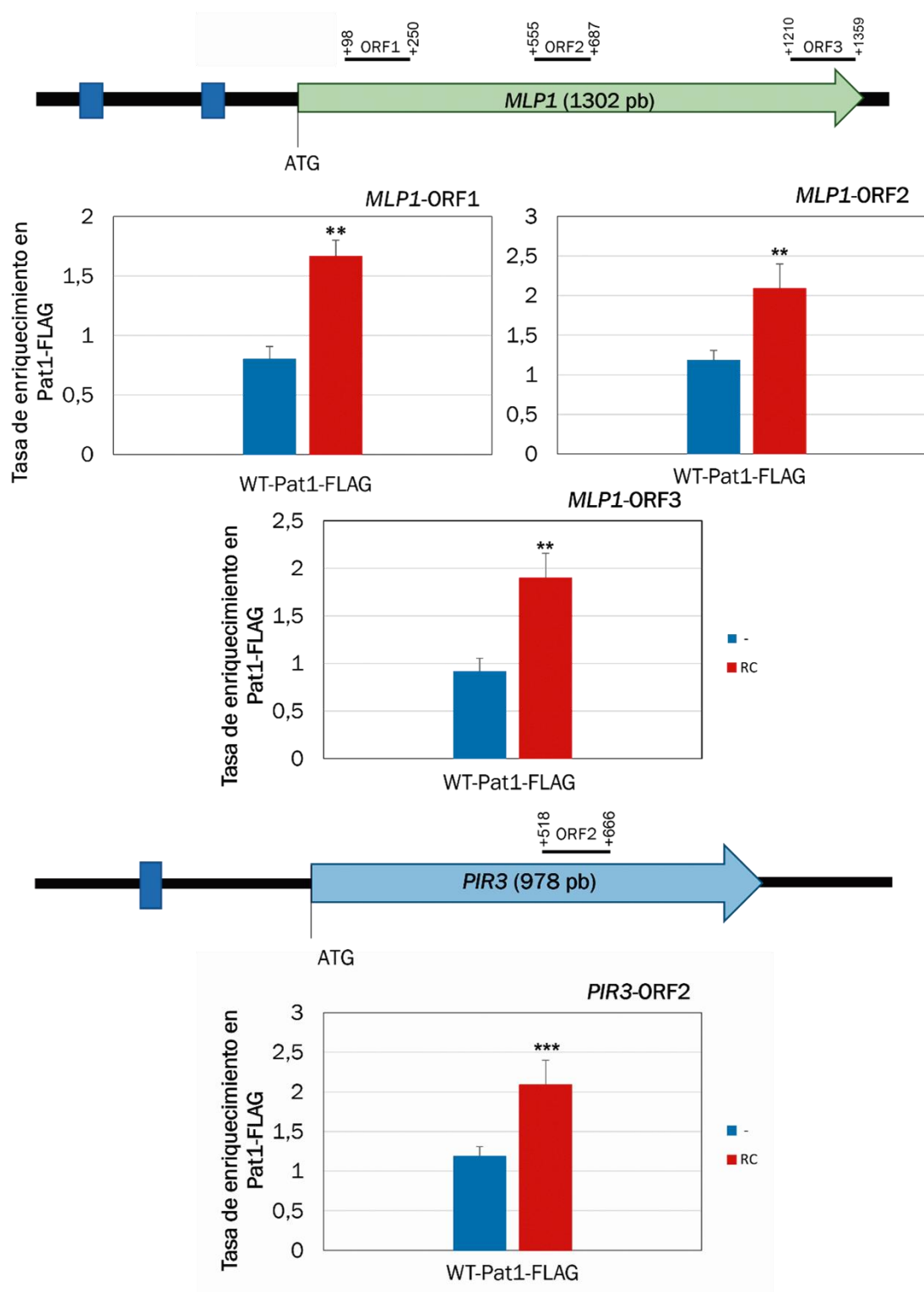


Figura 5.31: La proteína Pat1 es reclutada a la región codificante de los genes *MLP1* y *PIR3*. La asociación de Pat1-FLAG fue analizada en las regiones MLP1ORF1, MLP1ORF2, MLP1ORF3 y PIR3ORF2 mediante experimentos de ChIP a las 2 horas de tratamiento con RC (30 µg/ml). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae*. Los gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en Pat1-FLAG y se han obtenido a partir de la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en las células sin tratar frente a las tratadas. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$)

Como se observa en la Figura 5.31, el tratamiento con RC conduce a una entrada moderada pero significativa de Pat1 a las regiones codificantes correspondientes de *MLP1* y *PIR3*. Estos resultados indican la presencia de Pat1 en los ORFs durante la fase de elongación de la transcripción de los genes CWI-dependientes en condiciones de estrés de pared.

5.20. CINÉTICA DE UNIÓN DE Pat1 A LA ZONA CODIFICANTE DE LOS GENES *MLP1* Y *PIR3* EN CONDICIONES DE ESTRÉS.

Una vez demostrado que la unión de Pat1 a la zona codificante de *MLP1* y *PIR3* es una consecuencia del tratamiento con RC, decidimos analizar el perfil de esa unión a lo largo del tiempo. Para ello, se empleó la cepa WT-PAT1-FLAG crecida en presencia o ausencia de RC durante 240 minutos, (6 horas), recogiendo muestras a lo largo del tiempo de tratamiento. Posteriormente, se aislaron las cromatinas procedentes de esas células y se amplificaron, mediante qPCR, las zonas denominadas MLP1ORF2 y PIR3ORF2, ya esquematizadas en la Figura 5.31, situadas en la zona codificante intermedia de cada gen, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 5.32, la tasa de enriquecimiento en Pat1 para el gen *MLP1* en condiciones basales se mantiene constante a lo largo del tiempo. En cambio, tras el tratamiento con RC, se observa una entrada máxima de Pat1 a los 120 minutos, (2 horas) que desciende tras los 240 minutos (4 horas), alcanzando valores próximos a las condiciones basales a las 6 horas de tratamiento.

En el caso del gen *PIR3*, la entrada máxima de Pat1 se observa entre las 2 y las 4 horas de tratamiento, disminuyendo ligeramente en el último tiempo analizado. Ambos perfiles temporales son similares a la cinética de expresión de ambos genes mostrada en la Figura 5.21, lo que sugiere, de nuevo, la participación de Pat1 en la elongación de los mRNAs de genes inducidos en condiciones de estrés de pared.

5. RESULTADOS

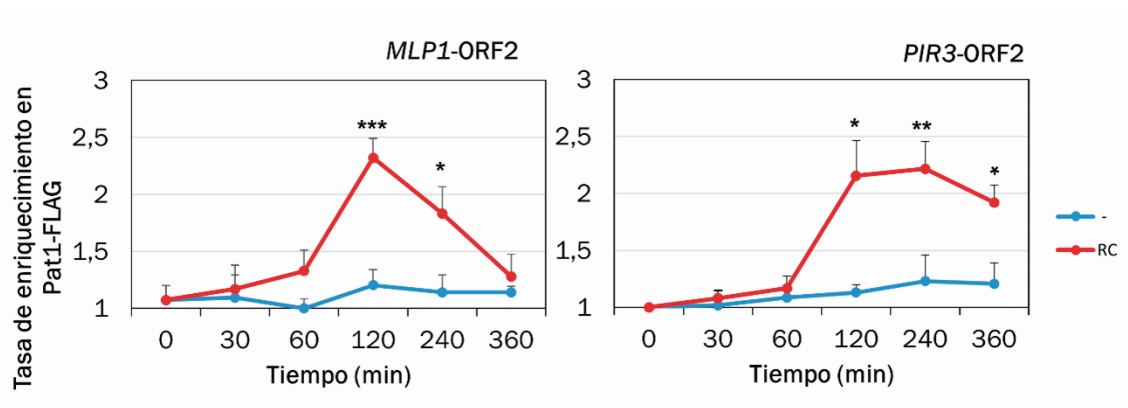


Figura 5.32: Cinética de unión de Pat1 a la zona codificante de los genes *MLP1* y *PIR3*. La asociación de Pat1-FLAG fue analizada en las regiones MLP1ORF2 (izquierda), y PIR3ORF2 (derecha) mediante experimentos de ChIP a lo largo de diferentes tiempos de tratamiento con RC (30 μ g/ml) hasta las 6 horas. Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a una región intergénica del cromosoma V de *S.cerevisiae*. Los gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en Pat1 y se han construido con la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos en las células sin tratar frente a las tratadas en cada tiempo. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$).

5.21. LA UNIÓN DE Pat1 A LA REGIÓN CODIFICANTE DE *MLP1* Y *PIR3* DEPENDE DE Slt2.

A continuación, decidimos estudiar si la unión de Pat1 a las regiones codificantes de genes regulados por la ruta CWI dependía de la MAPK Slt2. Con este objetivo se realizaron experimentos de ChIP empleando la cepa WT-PAT1-FLAG y la cepa mutante carente de *SLT2*, *slt2Δ*-PAT1-FLAG. Las células de ambas cepas fueron tratadas o no con RC durante 2 horas y la cromatina procedente de ellas se aisló y se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-FLAG. El DNA obtenido se analizó mediante qPCR para determinar la entrada de Pat1 en la zona codificante (ORF2) de los genes *MLP1* y *PIR3*. Como se muestra en la Figura 5.33, en ausencia de tratamiento con RC, no se observan diferencias en la tasa de enriquecimiento en Pat1 en ambas cepas, mientras que la unión de Pat1 al ORF de ambos genes en condiciones de activación, es totalmente dependiente de Slt2.

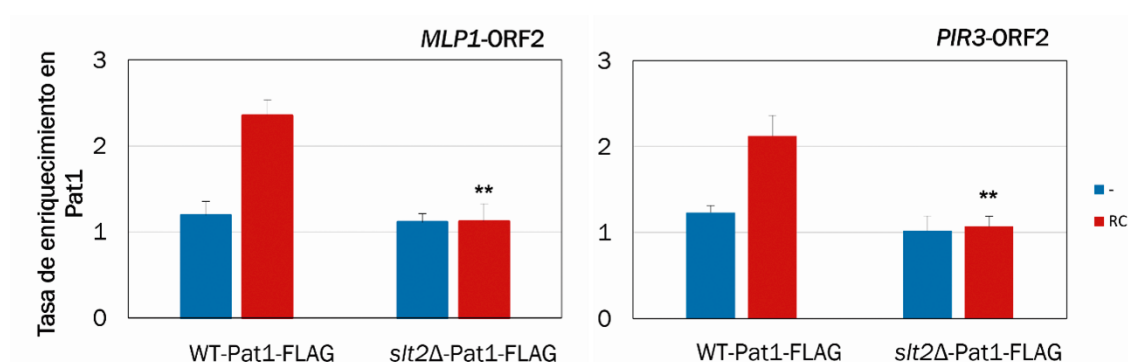


Figura 5.33: La unión de Pat1 a las regiones codificantes de *MLP1* y *PIR3* tras la exposición a RC depende de *Slt2*. La asociación de Pat1-FLAG al DNA fue analizada en las regiones MLP1ORF2 (izquierda) y PIR3ORF2 (derecha) en los genes indicados mediante experimentos de ChIP utilizando las cepas WT-PAT1-FLAG y *slt2Δ*-PAT1-FLAG tras 2 horas de tratamiento con RC (30 µg/ml). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae*. Ambos gráficos muestran la tasa de enriquecimiento en Pat1-FLAG y se han obtenido a partir de la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos la cepa silvestre frente a la cepa mutante. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$), (***) $P \leq 0,001$).

5.22. Slt2 SE ASOCIA A LA ZONA CODIFICANTE DE LOS GENES *MLP1* Y *PIR3* DE MANERA Pat1 DEPENDIENTE.

Previamente, nuestro grupo de investigación describió que Slt2, además de activar al factor de transcripción Rlm1 en condiciones de estrés, también se asocia a las regiones promotoras y codificantes de estos genes, revelando con ello un papel en los procesos de formación del PIC y de la elongación de mRNAs (Sanz et al., 2018).

Con estos antecedentes y a la vista de que la entrada de Pat1 a los ORFs de los genes inducidos a través de la ruta de integridad es dependiente de Slt2, decidimos estudiar si el reclutamiento de Slt2 al ORF de *MLP1* y *PIR3* dependía de Pat1. Para ello, células de las cepas WT-SLT2-HA y *pat1Δ*-SLT2-HA se trataron o no durante 2 horas con RC. Posteriormente, se aislaron las cromatinas de estas células y se llevaron a cabo experimentos de ChIP utilizando un anticuerpo anti-HA. La zona amplificada por qPCR en este caso fue MLP1ORF2 (Figura 5.25A). En la Figura 5.34 se observa que Slt2 se recluta al ORF de *MLP1* de la cepa silvestre tras el tratamiento con RC con respecto a la misma cepa sin tratamiento, como ya estaba descrito previamente (Sanz et al., 2018). Por contra, en la cepa *pat1Δ*-SLT2-HA, la entrada de Slt2 en condiciones de estrés es muy similar a la ocurre en condiciones basales, lo

5. RESULTADOS

que sugiere que la unión de Slt2 al ORF de los genes inducidos en estas condiciones es dependiente de Pat1.

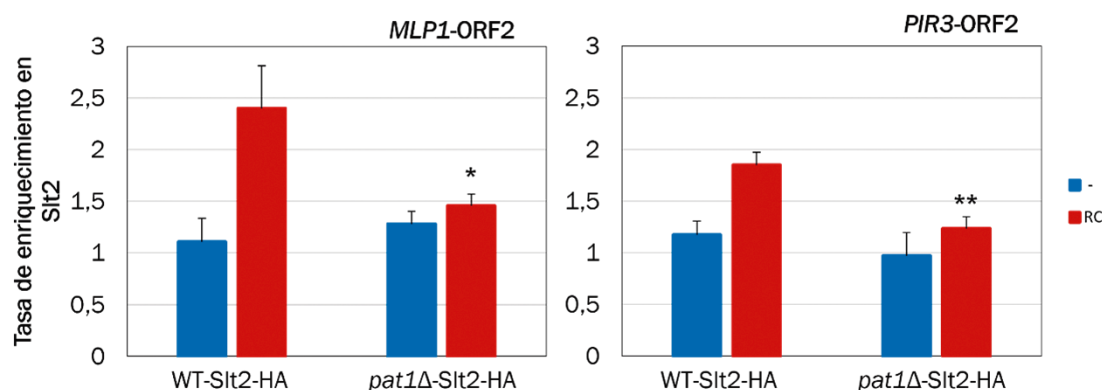


Figura 5.34: La unión de Slt2 al ORF de *MLP1* y *PIR3* depende de Pat1 en condiciones de estrés de pared. La asociación de Slt2-HA fue analizada en la región MLP1ORF2 mediante experimentos de ChIP en las cepas WT-SLT2-HA y *pat1Δ*-SLT2-HA tras 2 horas de tratamiento con RC (30 μ g/ml). Los resultados obtenidos se normalizaron con respecto a una región intergénica del cromosoma V de *S. cerevisiae*. El gráfico muestra la tasa de enriquecimiento en Slt2 y representa la media y desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. El estudio estadístico se ha realizado mediante una prueba *t* de Student comparando los valores obtenidos la cepa silvestre frente a la cepa mutante. Solo se indican las diferencias estadísticamente significativas (* $P \leq 0,05$), (** $P \leq 0,01$).

5.23. LA PROTEÍNA Pat1 NO INTERACCIONA CON LA RNA POLIMERASA II NI CON Rlm1 EN CONDICIONES DE ESTRÉS DE PARED.

Teniendo en cuenta que en una cepa *pat1Δ* se encuentran afectadas la entrada de la RNA Pol II, del factor de transcripción Rlm1 y de la MAPK Slt2 en los genes CWI-dependientes analizados, procedimos a determinar la posible interacción de Pat1 con estas proteínas reguladoras de la transcripción que pudieran asociar directamente a Pat1 con el reclutamiento de estos elementos en condiciones de estrés. En el apartado 5.11 de la sección de Resultados (Figura 5.11) se indicó que en nuestras condiciones de estudio no observamos interacción física entre Pat1 y Slt2. Para analizar la posible interacción con Rlm1 y la RNA Pol II, se realizaron experimentos de *pull-down* utilizando la cepa silvestre WT-RLM1-Myc, que expresa una fusión de Rlm1 al epítipo Myc desde su propio locus genómico, transformada

5. RESULTADOS

con un plásmido que porta el gen *PAT1* bajo control del promotor *GAL1/10* y fusionado a GST en su extremo N-terminal. Como control negativo, se empleó la cepa *WT-RLM1-Myc* transformada con un plásmido expresando únicamente GST. Las células se trataron como se indicó en el apartado 5.11. Como se observa en el Western-blot de la Figura 5.35, empleando anticuerpos anti-RNA Pol II y anti-Myc en ningún caso se detectó en la muestra precipitada ni Rlm1 ni la RNA Pol II independientemente de la presencia o no de RC.

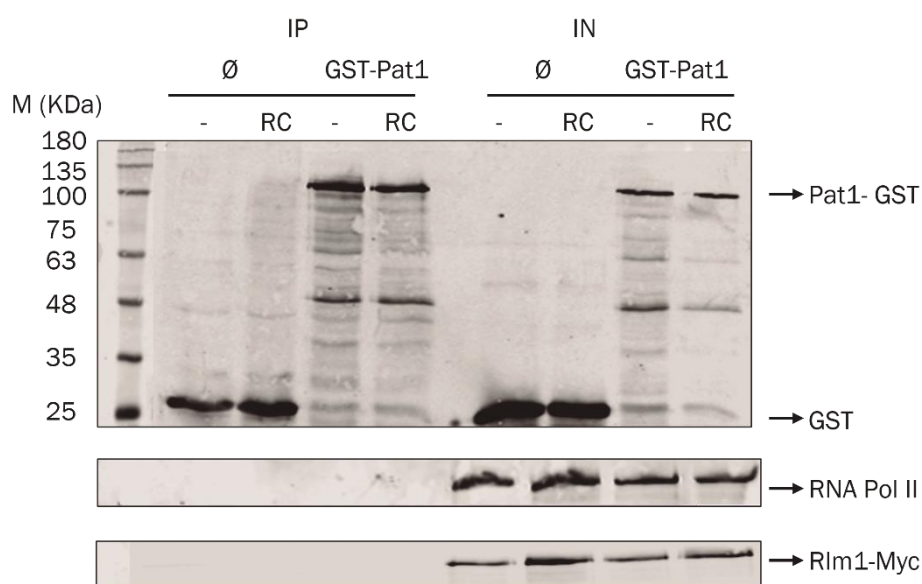


Figura 5.35: Estudio de la interacción entre la RNA Pol II y Rlm1 con Pat1. Las células de la cepa *WT-RLM1-Myc* transformadas con el plásmido GST-Pat1 se crecieron en presencia de galactosa y se trataron, o no, durante 2 horas con RC (30 µg/ml). A partir de extractos proteicos totales se analizó la interacción de Pat1 mediante *pull down* y Western-blot utilizando anticuerpos anti-RNA pol II (panel central), anti-myc (panel inferior) y anti-GST (panel superior). La fracción sin precipitar (input, IN), corresponde al 5% de la cantidad total de proteína. Como control negativo, se procesa en paralelo la cepa *WT-RLM1-Myc* expresando solo GST (Ø).

6.DISCUSIÓN

6.1. EL ESTRÉS DE PARED INDUCE EL ENSAMBLAJE DE *P-BODIES* EN *S. cerevisiae*.

Las levaduras, a menudo están expuestas a fluctuaciones en el medio que las rodea, como por ejemplo la deficiencia de nutrientes, cambios en la temperatura, diferencias en la presión osmótica o la presencia de compuestos químicos que ponen en peligro su integridad celular. Por ello, las células han desarrollado una gran variedad de mecanismos que permiten su supervivencia y adaptación a las nuevas condiciones. Uno de los más importantes y estudiados es la reprogramación de la expresión génica. En este contexto, la regulación post-transcripcional del mRNA es un punto clave para el control de dicha expresión en todos los organismos eucariotas, desde los más simples como los hongos y levaduras, hasta los más evolucionados.

Tras la transcripción o síntesis del pre-mRNA, que se lleva a cabo en el núcleo por parte de la RNA polimerasa II y sus factores accesorios, esta molécula puede sufrir múltiples modificaciones químicas diferentes entre las que se encuentran metilaciones de sus bases nitrogenadas o la formación de pseudouridina a partir de la isomerización de la uridina (Machnicka et al., 2013). Sin embargo, las principales modificaciones post-transcripcionales que sufren los pre-mRNAs son la adición de la cola de poliA (Tudek et al., 2018) y el *capping*, en el extremo 3' y 5' de la molécula respectivamente, y que van a dar lugar al mRNA maduro listo para su transporte al citoplasma de la célula (Ramanathan et al., 2016).

En este proceso, la localización específica en el citoplasma de los mRNA maduros es un proceso determinante para el destino de los mismos (Pizzinga & Ashe, 2014). Una parte de los mRNA maduros forman parte de ribonucleoproteínas citoplasmáticas (RNPs). En este contexto, existen una gran variedad de RNPs que se componen de RNAs de diversa naturaleza unidos a proteínas que, cuando aumenta su concentración, se condensan y se vuelven agregados insolubles citoplasmáticos. Las RNPs mejor caracterizadas, como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo, son los *P-bodies* (PBs) y los gránulos de estrés (SGs).

Desde el descubrimiento de los PBs en levadura en el año 2003, (Sheth & Parker, 2003), se postularon inicialmente como compartimentos donde el mRNA puede ser degradado, debido principalmente a que entre sus constituyentes se han encontrado componentes de la maquinaria de degradación del mRNA. Pero se ha demostrado que los PBs no son necesarios para esta función, ya que se ha observado

6. DISCUSIÓN

degradación de mRNA en cepas de levadura deficientes en el ensamblaje de PBs, como el doble mutante *edc3Δ/sm4Δ* (Huch & Nissan, 2017). Un modelo alternativo, aunque no necesariamente excluyente, postula que los PBs podrían actuar como sitios donde se almacenan transitoriamente mRNAs, que se encuentran reprimidos traduccionalmente, junto con componentes de la maquinaria de degradación inactivos y que la degradación ocurre principalmente en el citoplasma (Franks & Lykke-Andersen, 2008; Parker & Sheth, 2007). De hecho, en condiciones de escasez de glucosa, se ha descrito que los PBs pueden ser centros de degradación o de almacenamiento dependiendo del mRNA (Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, la función de los PBs, a día de hoy, sigue siendo en gran parte desconocida, debido principalmente a la dificultad técnica que presenta visualizar la degradación de mRNA *in vivo* en estructuras compartimentalizadas dentro de la célula (Thompson *et al.*, 2010; Hyman *et al.*, 2014), así como la dificultad experimental de aislar y purificar PBs.

El hecho de que se hayan visualizado PBs en todos los organismos eucariotas, hace de la levadura *S. cerevisiae* un modelo eucariota ideal para el estudio de procesos celulares que derivan en la formación de los mismos, pudiendo extrapolar los resultados obtenidos a organismos más evolucionados, en los que la formación de PBs se ha asociado a importantes problemas de salud como cáncer, procesos neurodegenerativos, autoinmunes y también se han encontrado evidencias de que algunos virus, sobre todos virus RNA, son capaces de reclutar componentes de PBs para su propia replicación viral (Anderson *et al.*, 2015; Savas *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Riggs *et al.*, 2020).

El ensamblaje de PBs se incrementa principalmente cuando la célula se enfrenta a diversos tipos de estrés como son la ausencia de glucosa, estrés osmótico, radiación UV, fase estacionaria de crecimiento (Teixeira *et al.*, 2005), agentes genotóxicos como la hidroxurea o el metilmetasulfonato (MMS) que dañan el DNA durante la replicación (Tkach *et al.*, 2013), etanol (Izawa *et al.*, 2007), niveles altos de Ca^{2+} (Kilchert *et al.*, 2010) y ácidos como el ácido láctico, HCl o H_2SO_4 (Iwaki & Izawa, 2012). Todos estos datos sugieren, junto con su conservación a lo largo de la escala evolutiva, que su ensamblaje es importante para la célula en estas condiciones adversas.

Dado que nuestro grupo de investigación está interesado en estudiar la regulación transcripcional y post-transcripcional consecuencia del estrés de pared,

la primera parte del presente trabajo se ha centrado en la caracterización de la formación de PBs en condiciones que comprometen la integridad celular de *S. cerevisiae*.

Gracias a las fusiones de elementos de PBs como Dcp2 y Pat1 a proteínas fluorescentes, en este caso GFP y mCherry, hemos demostrado que el estrés de pared mediado por RC o ZYM induce la formación de PBs, tal y como ocurre en otros tipos de estrés descritos anteriormente. Los estudios realizados sobre la formación de PBs en múltiples tipos de estrés sugieren que su formación es consecuencia de defectos en el inicio de traducción en la célula pero no en otras etapas posteriores, ya que mutantes defectivos en factores de inicio de la traducción, como aquéllos expresando un alelo termosensible de una de las subunidades del factor de inicio de la traducción eIF3, incrementan de manera considerable la formación de PBs, mientras que tras el tratamiento con agentes que bloquean la fase de elongación, como el antibiótico cicloheximida, inducen su desensamblaje (Teixeira et al., 2005). En otros tipos de estrés que también afectan a la síntesis proteica general de la célula, como el etanol, que impide el transporte entre núcleo y citoplasma de mRNAs poli-adenilados o la hidrox urea, que incrementa la cantidad de mRNAs no traducidos, también se ha observado la formación de PBs (Kato et al., 2011; Tkach et al., 2013). No obstante, la causa de la formación de PBs en las células eucariotas tras la respuesta a distintos tipos de estrés no está totalmente definida y podría ser consecuencia de múltiples factores. El hecho de que la formación de estas estructuras citoplasmáticas se de en condiciones de estrés de muy diversa naturaleza pone de manifiesto la existencia de múltiples rutas celulares que podrían estar participando en su formación.

Sin embargo, situaciones de estrés sobre la pared celular no inducen la formación de SGs, como se ha demostrado en este trabajo utilizando como marcadores proteínas localizadas en SGs fusionadas a GFP (Pab1) y a mCherry (Pub1), que no mostraron acumulación en gránulos citoplasmáticos en presencia de RC y ZYM. Este fenómeno no es exclusivo del estrés de pared, pues hasta la fecha se han descrito, al menos, tres tipos de estreses diferentes que inducen la formación de PBs y no de SGs como son la acumulación de Ca^{2+} en el medio intracelular por defectos en la vía secretora (Kilchert et al., 2010), el tratamiento con ácido láctico (Iwaki & Izawa, 2012) y el estrés osmótico (Huch & Nissan, 2017a).

6. DISCUSIÓN

6.2. EL INCREMENTO EN LA FORMACIÓN DE *P-BODIES* EN *S. cerevisiae* DEPENDE DE LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LA RUTA DE MAPKs DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI).

En las células, las respuestas que se producen frente a un estímulo determinado dependen principalmente de la naturaleza del estímulo, su duración y su intensidad. Así, la célula posee diversas rutas de señalización diseñadas, no solo para detectar la presencia y naturaleza del estímulo, sino también para transmitir información sobre su intensidad y duración para adaptar la respuesta por parte de la célula a esa situación (Behar & Hoffmann, 2010).

Mediante la realización de experimentos de cinética temporal, se observó que el pico de visualización de estas estructuras se encontraba entre la primera y la tercera hora del tratamiento con RC y ZYM. Estos tiempos son similares al perfil temporal de fosforilación de Slt2, la MAPK de la ruta CWI en respuesta a estrés de pared (Bermejo et al., 2008). Esta correlación temporal también se ha descrito en el caso de situaciones de estrés en las que se produce una respuesta rápida, como en el caso de la ausencia de glucosa (Bregues et al., 2005), estrés osmótico y radiación ultravioleta (Teixeira et al., 2005), o estrés oxidativo (Shah et al., 2013), donde aparecen PBs a los 10 minutos de exposición a estas condiciones.

La asociación directa entre la formación de PBs en presencia de RC y ZYM y la señalización a través de la ruta CWI se ha puesto de manifiesto en este trabajo al estudiar su ensamblaje en mutantes que carecen de elementos importantes para la activación de la ruta CWI en ambas circunstancias (Ketela et al., 1999; García et al., 2004; Bermejo et al., 2008; García et al., 2009). Mientras que la perturbación en la pared celular causada por el RC es transmitida principalmente a través del sensor Mid2, el daño producido por la ZYM lo hace a través del sensor Sho1, que pertenece a la ruta HOG y, en consonancia con este hecho, la formación de PBs se encuentra seriamente afectada en cepas mutantes en ambos elementos. La ausencia de la MAPKK Bck1 y de la MAPK Slt2 también bloquea la formación de PBs en ambos tratamientos. Por otro lado, la ausencia de Rlm1, que controla la expresión de la mayoría de los genes inducidos en respuesta a estrés de pared tras su fosforilación por parte de Slt2 (Jung et al., 2002; Sanz et al., 2018), no parece intervenir en el ensamblaje de estas estructuras. Este dato sugiere que la respuesta transcripcional vía Rlm1 no es necesaria para la formación de PBs, poniendo en evidencia la

existencia de otros sustratos de Slt2 que están involucrados en el proceso y que, hasta la fecha, son desconocidos.

De hecho, hemos observado que la actividad quinasa de Slt2 es esencial en la formación de PBs utilizando la versión catalíticamente inactiva de Slt2, *Slt2K54R* (Kim et al., 2008). Además, en una versión de Slt2, *Slt2-as*, que se inhibe específicamente por análogos voluminosos de ATP (Alonso-Rodríguez et al., 2016), los PBs inicialmente formados en condiciones de estrés se desensamblan y no son visibles al microscopio de fluorescencia.

La relación de la formación de PBs con las rutas de MAPKs de *S. cerevisiae* también se ha estudiado en la ruta HOG, encargada de la respuesta celular al estrés osmótico (Romero-Santacreu et al., 2009). La formación de PBs, tras la exposición de la célula a estrés hiperosmótico, comienza a los pocos minutos del inicio del estrés y se mantiene en el tiempo hasta que la célula se ha adaptado a las nuevas condiciones (90 minutos aproximadamente, ya que la adaptación al estrés osmótico es más rápida que al estrés de pared), de manera similar a lo que se ha observado en este trabajo tras la exposición de la célula a RC y ZYM. La principal diferencia entre ambas situaciones es la participación de la MAPK de la ruta en la formación de PBs. En el caso del estrés osmótico, no es necesaria la función de la MAPK de la ruta, *Hog1*, ya que en mutantes *hog1Δ* se induce la formación de PBs de manera similar a la cepa silvestre. Cabe precisar en la cepa *hog1Δ* se producen cambios en la cinética de ensamblaje/desensamblaje de los PBs formados tras la exposición a estrés osmótico, observándose cierto retraso en la aparición de los mismos, si bien se siguen visualizando a tiempos más largos que en la cepa silvestre (Romero-Santacreu et al., 2009).

Posibles dianas de Slt2 relacionadas con la formación de PBs podrían corresponder a elementos fundamentales constituyentes de estas estructuras. De hecho, se ha observado que Dcp2, proteína implicada en el *decapping* de mRNA, se fosforila bajo determinadas condiciones de estrés como la ausencia de glucosa o el estrés osmótico. Además, la fosforilación en el residuo Ser137 de Dcp2 es llevada a cabo por Ste20, proteína quinasa de la ruta HOG, también implicada en filamentación y apareamiento. Aunque esta fosforilación no afecta al *decapping*, si tiene influencia en la acumulación de Dcp2 en PBs (Yoon et al., 2010).

Sin embargo, a partir de los experimentos de *pull-down* llevados a cabo en este trabajo, no se ha observado interacción entre Slt2 y Dcp1, Dhh1 o Pat1, ni en

6. DISCUSIÓN

ausencia ni en presencia de RC, mientras que en el caso de Dcp2 si se detecta interacción con Slt2 tanto en presencia como en ausencia de este compuesto. Esta interacción es la primera vez que se describe, tanto en condiciones basales como en presencia de RC. Según la información disponible en la base de datos SGD (*Saccharomyces genome database*) y la herramienta bioinformática NetPhos 3.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/), la proteína Dcp2 posee 4 sitios susceptibles de fosforilación por MAPKs. Tres de estas posiciones son las serinas 439, 598 y 751 en las que se ha observado fosforilación mediante estudios masivos de fosfoproteómica (el más reciente es el trabajo de Lanz et al., 2021), y de los que se desconoce actualmente la quinasa responsable de su fosforilación. Otro sitio susceptible de fosforilación por MAPKs se localiza en la treonina 390, en el que no se ha observado fosforilación previa. Con esta información, y a la vista de la interacción física entre Dcp2 y la MAPK Slt2, serán necesarios estudios adicionales empleando versiones catalíticamente inactivas de Slt2 y estudios fosfoproteómicos de Dcp2 para poder establecer la relevancia de la interacción descrita y su relación con la formación de PBs.

El hecho de que Slt2 presente una proteína homóloga en humanos, Erk5, regulada por distintos mitógenos e involucrada en diferentes procesos fisiológicos como proliferación, diferenciación y supervivencia y otros patológicos como tumorigénesis (Stecca & Roviola, 2019), hace posible hipotetizar el posible papel de Erk5 en la formación de estos agregados citoplasmáticos en humanos, ya que, como se ha comentado anteriormente, los PBs se han relacionado con algunas enfermedades, aunque actualmente no se conoce su función fisiológica

6.3. LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA cAMP/PKA BLOQUEA LA FORMACIÓN DE *P-BODIES* EN ESTRÉS DE PARED.

Aunque se dispone de escasa información sobre las vías de señalización celular que están implicadas en el proceso de ensamblaje de PBs, la ruta cAMP/PKA ha sido relacionada con este proceso, al menos, a través de la fosforilación de la proteína Pat1 en dos residuos de serina (Ser456 y Ser457) (Ramachandran et al., 2011).

En *S. cerevisiae*, PKA se organiza como un tetrámero compuesto por dos subunidades reguladoras, codificadas por un único gen, *BCY1*, y dos subunidades

catalíticas que se encuentran codificadas por tres genes diferentes, *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. En presencia de glucosa en el medio, aumenta la actividad de la enzima adenilato ciclasa que induce la formación de cAMP. Este compuesto se une a la subunidad reguladora liberando a las subunidades catalíticas que fosforilan a diversos sustratos, activándolos, si son proteínas relacionadas con el aprovechamiento de la glucosa, o inhibiéndolos, si son responsables de la regulación de genes que intervienen en la respuesta a condiciones de carencia de nutrientes, como los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (revisado en Portela & Rossi, 2020). En presencia de glucosa, Pat1 es fosforilado por PKA pero cuando la disponibilidad de nutrientes es baja, por ejemplo, durante la fase estacionaria, PKA se encuentra inactiva en el citoplasma celular y la fosforilación de Pat1 no se produce, induciéndose la formación de PBs. En este contexto, es destacable que las subunidades Tpk2 y Tpk3 hayan sido localizadas en PBs en condiciones de limitación de glucosa (Tudisca et al., 2010).

A diferencia de las otras dos isoformas, Tpk2 posee en su extremo N-terminal una región rica en glutamina denominada PrLD (*prion-like domain*), que es independiente de su actividad quinasa y que es la responsable de la reducción en la formación de PBs en fase estacionaria que se observa en el mutante *tpk2QΔ*, que presenta la delección del dominio PrLD (Barraza et al., 2021). El hecho de que esta secuencia esté presente en varios componentes estructurales de PBs como Dhh1 o Edc3 y se haya descrito que podría ser necesaria para el ensamblaje de estas estructuras (Reijns et al., 2008), indica un posible papel del dominio PrLD de Tpk2 en la formación de PBs en estas condiciones (Barraza et al., 2021).

Aunque se ha propuesto que Pat1 puede ser fosforilado en los residuos Ser456 Ser457 por cualquiera de las 3 subunidades catalíticas de PKA (Shah et al., 2013); debido a la presencia del dominio PrLD en Tpk2 se ha estudiado más a fondo la relación entre Pat1, Tpk2 y la formación de PBs. De esta forma, se ha observado que el efecto mediado por el dominio PrLD de Tpk2 en la formación de PBs no tiene lugar a través de los residuos Ser456 y Ser457 de Pat1 (Barraza et al., 2021).

Nuestro grupo de investigación ha descrito que el antifúngico caspofungina induce la ruta CWI e inhibe la ruta cAMP/PKA vía Ras2 (García et al., 2017). Ambas situaciones inducen la formación de PBs bien a través de Slt2, después de la activación de la ruta CWI o gracias a la desfosforilación de Pat1, como consecuencia de la inhibición de la ruta cAMP/PKA. De hecho, en el laboratorio hemos observado

6. DISCUSIÓN

que la caspofungina también induce el ensamblaje de PBs. En este trabajo, hemos estudiado la relación entre la formación de PBs en estrés de pared y la ruta PKA a través de la fosforilación de Pat1 utilizando distintas versiones (silvestre, no fosforilable y fosfomimética) de la proteína en combinación con un alelo hiperactivo de la proteína Ras2 (Ras2^{val19}) de forma que la ruta PKA esté constitutivamente activada. El resultado obtenido en cuanto al efecto sobre el ensamblaje de PBs por tratamiento con RC y ZYM ha sido similar al descrito para otros tipos de estrés (Shah et al., 2013), es decir, el ensamblaje de PBs, en estas condiciones, se encuentra regulado por PKA a través de la fosforilación de los residuos Ser456 y Ser457 de Pat1. De hecho, la versión fosfomimética de Pat1 (E456, E457) conduce a un bloqueo en su formación independientemente de la presencia de estrés, tal y como se ha observado con la activación ectópica de PKA (Figura 6.1).

A la vista de estos resultados, es posible postular la existencia de dos posibles mecanismos en relación con el control ejercido por la ruta PKA en la formación de PBs consecuencia de múltiples tipos de estrés no relacionados entre sí (Figura 6.1).

El primer mecanismo propuesto sería aquel en el que estrés de pared inhibe la actividad de la ruta PKA como ocurre, por ejemplo, en ausencia de glucosa o durante la exposición a 1 M de KCl. Debido a esta inactivación de la ruta PKA, Pat1 no se fosforila y se induce la formación de PBs (Shah et al., 2013).

El segundo mecanismo propuesto, sería aquel en el que el estrés por sí mismo, no afecta a la activación de PKA, pero sí podría actuar sobre el estado de fosforilación de Pat1. De esta manera, podrían activarse fosfatasa, como consecuencia de la inducción de la ruta CWI, que actúen sobre Pat1, defosforilándolo, y conduciendo con ello al aumento en la formación de PBs, independientemente de la activación de la ruta PKA (Figura 6.1).

En el caso de los compuestos utilizados en este trabajo, RC y ZYM, la primera opción es improbable, puesto que en estudios previos del grupo en el que se analizaron los perfiles transcripcionales, mediante *microarrays* de DNA, de células tratadas con estos agentes, no se detectó una respuesta transcripcional asociada a la modulación de PKA (García et al., 2004; García et al., 2009). Por lo tanto, la implicación de PKA en la formación de PBs en condiciones de estrés de pared por RC y ZYM sería compatible con el segundo mecanismo propuesto. De hecho, el tratamiento con RC induce la expresión de varias fosfatasa como Ysr3, Ptp2, Fbp26, Msg5, Pfk26 o Rts3 (García et al., 2004; Sanz et al., 2012), aunque ninguna de ellas

ha sido identificada en el rastreo llevado a cabo para la identificación de elementos necesarios para la formación de PBs en situaciones de estrés sobre la pared celular. En todo caso, este dato no excluye la posibilidad de una actuación redundante por más de una fosfatasa. Sin embargo, si se han identificado en el mencionado rastreo cepas mutantes en las fosfatasas Pto6 y Oca6. Trabajo futuro será necesario para estudiar la participación de fosfatasas específicas en la inducción en la formación de PBs vía Slt2.

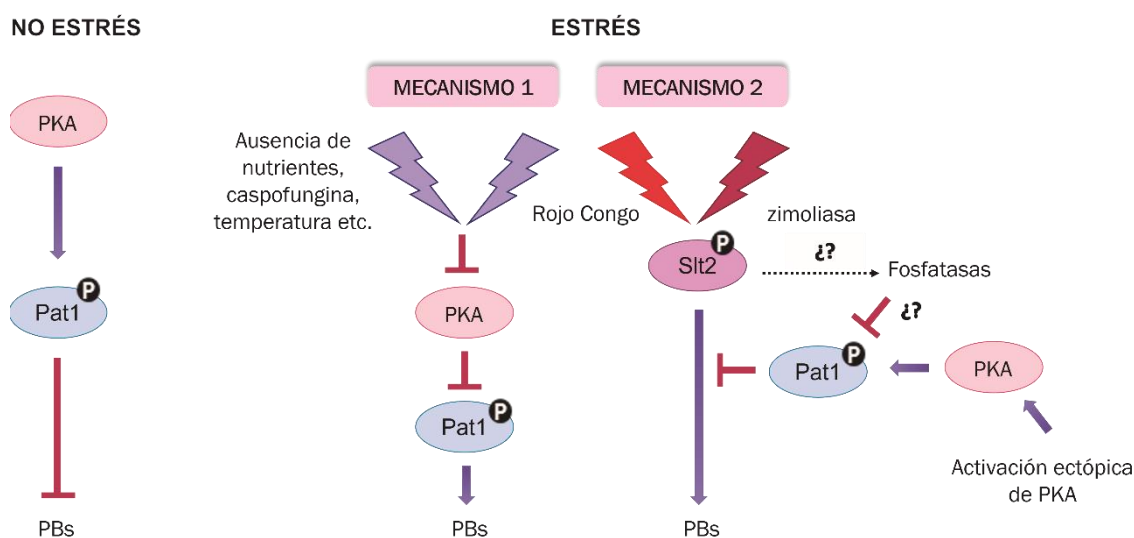


Figura 6.1: Esquema de los dos mecanismos propuestos para explicar el control de la ruta PKA en la formación de PBs en condiciones de estrés de pared

6.4. mRNAs CWI-DEPENDIENTES LOCALIZAN EN *P-BODIES*.

Un aspecto de especial interés en la actualidad es determinar tanto las proteínas como los mRNAs residentes en los PBs en distintas condiciones para poder entender mejor su función biológica. El uso de técnicas proteómicas a gran escala ha permitido la identificación de proteínas que se encuentran en estos orgánulos en ausencia de glucosa en *S. cerevisiae* (Kershaw et al., 2021). En cuanto al mRNA presente en PBs está menos definido, debido principalmente a las complicaciones técnicas que entraña el estudio de una molécula de naturaleza lábil como el RNA. Sin embargo, se han realizado estudios empleando técnicas de análisis a gran escala. Por ejemplo, se ha estudiado el transcriptoma de PBs mediante *RNA-seq* en células de mamífero en condiciones basales y empleando arsenito sódico para producir estrés oxidativo

6. DISCUSIÓN

(Matheny et al., 2019). La comparación de los resultados obtenidos en ambas situaciones ha permitido identificar diferencias entre el conjunto de mRNAs que se localizan en PBs y en citosol, indicando que, mientras que en condiciones basales no se observan diferencias significativas, en condiciones de estrés en citosol predominan mRNAs que codifican para enzimas metabólicas y en PBs mRNAs largos ricos en adenina-uracilo (AU). Por otra parte, en levadura, se ha obtenido el transcriptoma de PBs en distintos tipos de estrés (ausencia de glucosa, osmótico y presencia de Ca^{2+}) mediante purificación de PBs y secuenciación masiva de los mRNAs presentes en estas estructuras mediante *RNA-seq*, encontrando que, mientras el 65% de los mRNAs detectados en PBs son comunes a los tres tipos de estrés estudiados y codifican para moléculas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y generación de energía en su mayor parte, el 35% es específico del tipo de estrés (Wang et al., 2018)

En este trabajo, hemos estudiado la localización espacio temporal del mRNA de tres genes regulados por la ruta CWI en condiciones de estrés de pared: *MLP1*, *CRG1* y *SRL3* utilizando el método de la proteína U1A (Figura 5.9 de la sección de *Resultados*) y observando mediante microscopía confocal de fluorescencia su localización *in vivo*. El hecho de que los tres mRNAs CWI-dependientes se localicen en PBs cuando la célula es tratada con ZYM, y por lo tanto cuando la ruta CWI está activa, y no con otros elementos inductores de estrés también ensayados como H_2O_2 o carencia de glucosa, apoya la teoría de que existen poblaciones de mRNAs específicos del tipo de estrés, que se localizan en PBs.

Como se ha postulado para diferentes tipos de estrés, la formación de PBs podría ser una ventaja en la adaptación transcripcional de la célula frente a estas condiciones, incluyendo las que afectan a la integridad de la pared celular. Además, no es descartable que la localización de mRNAs específicos de estrés en estas estructuras podría ser un requerimiento de la célula para optimizar la homeostasis del nivel global de mRNAs de la célula. Desde un punto de vista funcional, en algún caso se ha podido relacionar la formación de PBs con supervivencia de la célula en determinadas condiciones de estrés, como es el caso del daño en DNA, donde la localización en PBs de determinados mRNAs es esencial para la respuesta adaptativa oportuna (Loll-Krippleber & Brown, 2017; Huch & Nissan, 2017). Sin embargo, a partir de nuestros resultados, la incapacidad de ensamblar PBs en la levadura no resulta en alteraciones significativas del crecimiento en presencia de

compuestos que alteran la pared celular, como en general se observa en las distintas condiciones estudiadas hasta la fecha. No obstante, otros autores han descrito que la sobreexpresión de determinados mRNAs localizados en PBs conduce a alteraciones fenotípicas en cepas deficientes en el ensamblaje de estos gránulos, como es el caso del daño en DNA (Lavut & Raveh, 2012; Loll-Krippleber & Brown, 2017). Este efecto ha sido observado también en nuestro caso al sobreexpresar los genes *MLP1* y *CRG1* en presencia de ZYM y CAS, pero no de Blanco de Calcoflúor (BC). Estos resultados podrían explicarse por el mecanismo de acción de la ZYM y la CAS, diferente respecto al BC o RC (recordamos que estos interfieren sobre la quitina), pues ambos compuestos actúan sobre el β ,1-3 glucano, aunque a diferente nivel, ya que la ZYM tiene actividad principalmente β -glucanasa y la CAS inhibe la β -1,3-glucán sintasa. Para refutar esta teoría, sería de interés ensayar la sobreexpresión de *MLP1* y *CRG1* en la cepa *edc3 Δ pat1 Δ* (defectiva en ensamblaje de PBs) en presencia de otros agentes que interfieran con la síntesis o remodelación del β -1,3 glucano, como por ejemplo el ácido poácico (García et al., 2021).

6.5. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DE *S. cerevisiae* QUE NO FORMAN *P-BODIES* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.

De forma complementaria al estudio dirigido de interacciones entre Slt2 y proteínas constituyentes de PBs, se ha realizado un rastreo a gran escala para la identificación de mutantes que portan la delección individual de cada gen descrito en la levadura de la colección de *Euroscarf* defectivos en la formación de PBs consecuencia del tratamiento con RC y ZYM. Se analizó un subgrupo de 256 mutantes seleccionados bajo la premisa de que las proteínas de las que carecían fueran quinasas, fosfatasas o elementos en los que estuviera descrita una relación con Slt2 según la literatura disponible y la información contenida en la base de datos SGD (*Saccharomyces genome database*). Teóricamente, esta aproximación facilitaría la identificación de potenciales dianas de Slt2 implicadas en el ensamblaje de PBs, así como otros elementos necesarios para su ensamblaje de forma Slt2-independiente. De esta manera, se han identificado 11 mutantes incapaces de formar PBs tras el tratamiento con RC o ZYM, pero sí en presencia de H₂O₂.

6. DISCUSIÓN

A día de hoy, solo tres de las proteínas codificadas por estos mutantes han mostrado relación con la formación de PBs: Mkt1, nucleasa implicada en la regulación post-transcripcional de HO, localiza en PBs en condiciones de estrés por etanol y juega un papel importante en la adaptación de la levadura al etanol (Lewis et al., 2014); Pkh1, quinasa implicada en el metabolismo de esfingolípidos y endocitosis, que participa en el ensamblaje de PBs cuando la disponibilidad de glucosa en el medio es baja (Luo et al., 2011), y Lcb5, que media la fosforilación de esfingolípidos induciendo la formación de PBs en varios tipos de estrés como daño en el DNA, radiación UV y estrés térmico (Cowart et al., 2010). El hecho de que de las 11 proteínas identificadas en este rastreo como necesarias para el ensamblaje de PBs en condiciones de estrés de pared, 6 de ellas sean quinasas (Lcb5, Lsb6, Pkh1, Prr1, Sky1 e Yck2) sugiere que esta función biológica puede ser de las más importantes para la formación de estas estructuras. Las 5 proteínas restantes tienen funciones diversas como tirosin-proteín fosfatasa (Oca6) y serín/treonín fosfatasa (Ptc6), nucleasas (Mkt1), factor de transcripción de la ruta HOG (Sko1) y un factor de degradación de la RNA Pol II (Def1).

Solamente en el caso del mutante *def1Δ*, la fosforilación de Slt2 está disminuida en comparación con la cepa silvestre, lo que explicaría su efecto sobre la formación de PBs. Además, las seis proteínas (Lcb5, Lsb6, Mkt1, Ptc6, Prr1 y Sky1) ensayadas en experimentos de *pull-down*, no han mostrado interacción con Slt2. A partir de este resultado, se puede hipotetizar que estas proteínas, si estuvieran relacionadas en cuanto a la formación de PBs con la ruta CWI, esta relación debería situarse por debajo de Slt2 o bien participar a través de mecanismos alternativos.

Este resultado, sin embargo no descarta que Slt2 pudiera estar actuando sobre alguna de estas proteínas a través de otros elementos intermedios o que la interacción sea transitoria y no detectable siguiendo nuestro diseño experimental, aunque todas ellas presentan en su secuencia de aminoácidos sitios potenciales de fosforilación por MAPK (motivos SP (serina-prolina) o TP (treonina-prolina)). Obviamente, no es descartable que efectivamente Slt2 no esté implicado en la asociación de las proteínas identificadas con la inducción de la formación de PBs. Otra vía de estudio futuro para esclarecer la relación de estas proteínas con PBs, será investigar si son constituyentes de los mismos analizando la posible co-localización de estos elementos en PBs mediante su fusión a proteínas fluorescentes.

6.6. Pat1: UN NUEVO ELEMENTO IMPLICADO EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE LA LEVADURA FRENTE A SITUACIONES DE ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR.

El mantenimiento de unos niveles de mRNA apropiados es un aspecto fundamental en la regulación de la expresión génica. Por ello, los niveles de mRNA en la célula están determinados por el equilibrio entre su síntesis y su degradación. Aunque tradicionalmente se han estudiado como dos procesos independientes, debido principalmente a la distinta localización subcelular en la que tienen lugar ambos procesos, estudios más recientes han puesto de manifiesto la interdependencia entre ambos procesos (revisado en Braun & Young, 2014). Por ejemplo, las proteínas Dcp1, Dcp2, Lsm1, Xrn1 y Pat1, elementos que participan en la degradación citoplasmática del mRNA en dirección 5' → 3', son capaces de traslocarse al núcleo de la célula y asociarse a promotores de distintos genes regulando así su transcripción (Haimovich et al., 2013), aparte de su función principal en degradación de mRNA (Parker, 2012).

Hace una década, se estableció el concepto de “sintegradasas” (*synthegradases* en inglés), como aquellos factores de degradación (DF, *Decay Factor* en inglés) que pueden tener un papel dual en la célula, promoviendo o reprimiendo tanto la síntesis de mRNA como su degradación según las necesidades particulares de la célula en cada momento (Bregman et al., 2011). Dentro de este grupo, se encuentra el factor de transcripción Rap1, relacionado con la transcripción de alrededor del 5% de los genes de la levadura y que fue el primero en el que se encontró una función dual en transcripción y degradación (Bregman et al., 2011), o la exonucleasa Xrn1 (Medina et al., 2014). Aunque la conexión entre ambos procesos no está totalmente esclarecida a nivel molecular, se han hecho estudios en levadura con algunos DFs, especialmente Xrn1, en distintas condiciones, que han permitido postular modelos de la relación existente entre ambos procesos (Haimovich et al., 2013; Sun et al., 2013; Braun et al., 2014; Medina et al., 2014). Además, recientemente se ha descrito que Xrn1 actúa también como regulador traduccional de la síntesis de proteínas de membrana (Blasco-Moreno et al., 2019).

El principal *crosstalk* entre transcripción y degradación de mRNA es mediado a través de Xrn1, donde además de su función en degradación de mRNAs también se

6. DISCUSIÓN

asocia a la cromatina para activar la transcripción (Haimovich et al., 2013; Medina et al., 2014; García-Martínez et al., 2021).

Basándonos en estos estudios y en datos previos de nuestro grupo de trabajo, los cuales relacionaban a Pat1 con defectos en la transcripción del gen CWI-dependiente *MLP1* en condiciones de estrés de pared (ver *Antecedentes*), en este trabajo se ha estudiado la participación de esta proteína en la inducción transcripcional que se observa en estas condiciones. Pat1 es una proteína de unión a RNA que tiene numerosas funciones biológicas, aunque su función más estudiada es la de actuar como elemento activador del *decapping* de mRNA en el proceso de degradación del mismo. En este trabajo, hemos demostrado que Pat1 también participa en la regulación transcripcional de genes CWI-dependientes, utilizando como modelo a genes prototípicos de la respuesta transcripcional mediada por daños sobre la pared celular como *MLP1*, *SRL3* y *PIR3*. Además, tal y como podemos observar en la Figura 5.22 de la sección de *Resultados*, en la que se muestra la gráfica de dispersión realizada a partir de los *ratios* de expresión génica global obtenidos en experimentos de *microarrays*, los niveles de expresión globales en la cepa *pat1Δ* tras la exposición de las células a RC, son de menor magnitud que los observados en una cepa silvestre. Este efecto también se ha observado en la cepa *xrn1Δ* tanto en condiciones normales de crecimiento (Haimovich et al., 2013; Medina et al., 2014) como en estrés osmótico (García-Martínez et al., 2021). Por lo tanto, Pat1 también podría incluirse en la categoría de “sintegradasa”.

La combinación de los análisis de expresión génica y experimentos de ChIP nos ha permitido, sobre la base de resultados anteriores del grupo, proponer un modelo que integre la participación de Pat1 en la secuencia de eventos que tienen lugar durante la formación del complejo de pre-inicio de la transcripción (PIC) y la elongación en condiciones de estrés sobre la pared celular en *S. cerevisiae* (Figura 6.2), como se detalla a continuación.

1: Salida de la histona H3 de los promotores:

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, para la formación del PIC es esencial la función de los complejos remodeladores de cromatina SWI/SNF y SAGA (Lin et al., 2020), que permiten la desorganización de la misma y el desplazamiento de nucleosomas y con ello facilitar la entrada de la maquinaria transcripcional. Este reordenamiento de la cromatina lo hemos monitorizado a partir

de la presencia de la histona H3 en el promotor de los genes CWI-dependientes estudiados tras el tratamiento con RC. En condiciones normales de crecimiento, se observa una bajada de la presencia de la histona H3 en las regiones promotoras de genes transcripcionalmente activos, asociado al remodelado de la cromatina. Sin embargo, en un mutante *pat1Δ*, esta bajada es de menor magnitud que la que se observa en la cepa silvestre, indicando que la proteína Pat1 es necesaria parcialmente para la salida de la histona H3 de los promotores de los genes CWI-dependientes estudiados en condiciones de estrés de pared.

2: Participación de Pat1 en la entrada de Rlm1 y Slt2:

Apoyando la idea de que Pat1 tiene un papel en el ensamblaje del PIC, la asociación de Rlm1 y Slt2 a los promotores de los genes estudiados tras la exposición a RC, es de nuevo parcialmente dependiente de Pat1. Sorprendentemente, no hemos detectado la presencia de Pat1 en las distintas zonas promotoras estudiadas, como los sitios consenso de unión de Rlm1 y regiones próximas al codón de iniciación de los genes analizados mediante experimentos de ChIP, no solo utilizando una versión fusionada a FLAG, que sin embargo, y como se detalla más adelante, ha permitido determinar la presencia de Pat1 en regiones codificantes, sino también a HA o TAP. En cualquier caso, no podemos descartar que Pat1 se una a regiones promotoras de los genes en estudio, postulando las siguientes posibles explicaciones a que los experimentos de ChIP realizados hayan sido infructuosos:

(a) Umbral de detección: si la cantidad de proteína unida al DNA no alcanza el nivel mínimo para su detección en las condiciones experimentales ensayadas, es posible que no detectemos su presencia mediante qPCR.

(b) Que las interacciones que se producen entre el DNA y Pat1 sean muy lábiles o transitorias, y que, a pesar de los intentos realizados para mejorar este punto modificando las concentraciones y tiempo de tratamiento de formaldehído para fijar las interacciones DNA-proteína, no se hayan conseguido optimizar o no se hayan producido en los tiempos de tratamiento con RC ensayados.

(c) El papel de Pat1 en la formación del PIC es indirecto. Esta es la hipótesis más posible, puesto que no hemos encontrado interacción de Pat1 con ninguno de los elementos clave en la formación del PIC en nuestras condiciones de estudio como

6. DISCUSIÓN

Rlm1, Slt2 y la RNA Pol II en genes CWI-dependientes (Sanz et al., 2016; Sanz et al., 2018).

Se ha descrito el papel de otros DFs en la formación del PIC. Por ejemplo, se ha identificado la asociación de Xrn1, Dcp2, Lsm1 y Dhh1 con promotores de los genes constitutivos, *TEF4* y *PMA1*, en condiciones normales de crecimiento (Haimovich et al., 2013) y de Xrn1 en estrés osmótico, provocado por una concentración de 0,6 M de KCl, a genes inducidos a través de la ruta HOG como *SLT1* y *GRE3* (García-Martínez et al., 2021). La unión de estos factores a la zona promotora se produce aproximadamente 30 nucleótidos antes del sitio de inicio de la transcripción, que es el lugar en el que se ensambla la maquinaria de inicio de la transcripción (Kornberg, 2001), lo que apoya la participación de los DFs en la formación del PIC. Los datos obtenidos con Pat1 en este trabajo sugieren un papel similar, aunque no se haya podido detectar la unión de Pat1 a estas regiones. Además, se ha postulado que estos DFs participen en forma de complejo, siendo Xrn1 necesario para la importación de otros DFs al núcleo (Haimovich et al., 2013).

3: Unión y progresión de la RNA Pol II en ausencia de PAT1:

La reprogramación de la expresión génica bajo condiciones de estrés de pared implica la unión, lenta y sostenida en el tiempo, de la RNA Pol II a los promotores de los genes CWI-dependientes necesarios para la adaptación de la célula a las nuevas condiciones ambientales (Figura 6.2). En este contexto, la RNA Pol II se posiciona en los promotores, en la zona cercana al ATG, para iniciar la transcripción de los mismos. En el caso de la respuesta transcripcional regulada por la ruta CWI, la RNA Pol II es reclutada a las regiones promotoras de forma dependiente de Rlm1, Slt2, SWI/SNF (Sanz et al., 2012; Sanz et al., 2018) y parcialmente del complejo SAGA (Sanz et al., 2016). Además, se ha propuesto que Slt2 recluta a la RNA Pol II en las fases iniciales de la transcripción y que a continuación el complejo Slt2-RNA Pol II progresa a la región codificante durante la elongación, siendo esta última fase, Rlm1-independiente (Sanz et al., 2018) (Figura 6.2). En este trabajo hemos observado que el reclutamiento de la RNA Polimerasa II está afectada en la cepa *pat1Δ* con respecto a la cepa silvestre en los tres genes estudiados, tanto en promotor como en región codificante. Es destacable el hecho de que las diferencias más acusadas en la unión de la RNA Pol II, con respecto a la cepa silvestre, se encuentran en las zonas codificantes de los tres genes estudiados (*MLP1*, *SRL3* y *PIR3*). Estos resultados

6. DISCUSIÓN

sugieren que la participación de Pat1 en la transcripción no es exclusiva de las fases iniciales para la formación del PIC, sino que también podría jugar un papel en la fase de elongación.

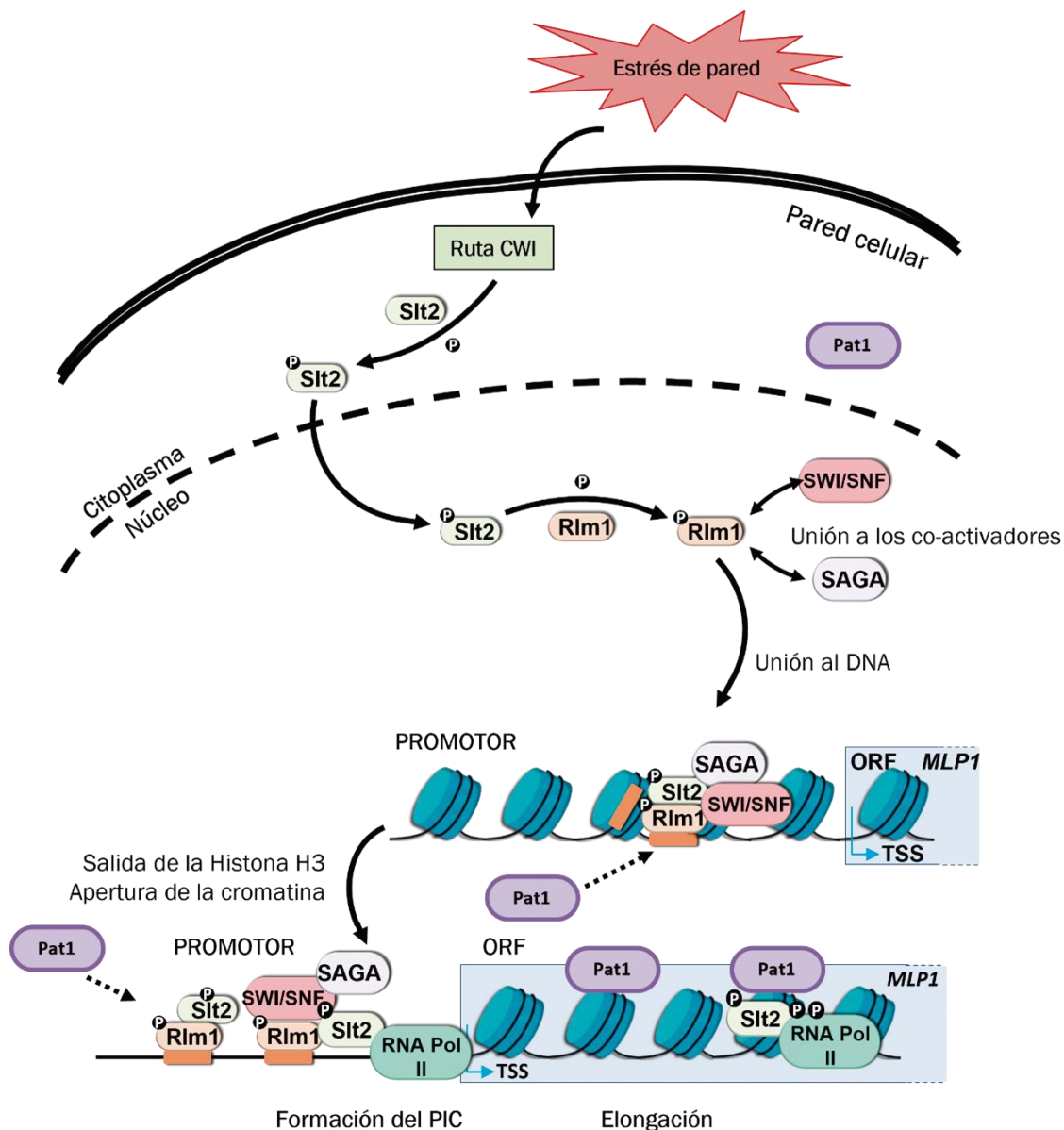


Figura 6.2. Esquema global de la regulación transcripcional de los genes dependientes de la ruta CWI en condiciones de estrés de pared. En condiciones de estrés de pared, la RNA Pol II es reclutada a las regiones promotoras de los genes CWI dependientes con la participación de Rlm1, Slt2, y de los complejos SWI/SNF y SAGA para la formación del PIC, con la colaboración, directa o indirecta de Pat1. Además, la MAPK Slt2 progresa, junto a la RNA Pol II, por la región codificante de estos genes durante la elongación de la transcripción de forma Pat1-dependiente. (TSS, sitio de inicio de la transcripción, *Transcription Start Site*)

Desde un punto de vista molecular, el efecto de Pat1 en elongación en condiciones de estrés, parece ser diferente al mediado por la MAPK Slt2, ya que

6. DISCUSIÓN

Pat1 no parece interaccionar físicamente ni con Slt2 ni con la RNA Pol II en estas condiciones experimentales. Sin embargo, la unión de Pat1 a regiones codificantes de los genes *MLP1* y *PIR3* depende de la presencia de la MAPK Slt2. De manera similar a lo que sucede con Pat1 en situaciones de daño en pared, en condiciones de estrés osmótico también se ha encontrado la asociación de Xrn1 a los promotores de genes fuertemente inducidos por la ruta HOG.

Mientras el inicio de la transcripción es una etapa bien estudiada, el conocimiento actual de la elongación es más limitado. Durante mucho tiempo, el reclutamiento de todos los componentes necesarios para formar el PIC se consideró como el paso principal para la regulación de la transcripción. Actualmente, se conoce que la fase de elongación del transcrito nascente es una etapa altamente regulada que requiere la acción concertada de varias proteínas, denominados factores de elongación, que pueden unirse entre sí para formar complejos (Conaway & Conaway, 1997). La fase de elongación, además, está coordinada con el procesamiento de los pre-mRNA (Saldi et al., 2016) y con otros procesos nucleares, como la modificación de histonas y la remodelación de la cromatina, la reparación del DNA, la recombinación y la replicación (Selth et al., 2010; Chen et al., 2018).

En eucariotas superiores, justo tras la salida de la RNA Polimerasa II del promotor, ésta sufre una pausa que permite el ensamblaje de los factores de elongación y los encargados de las modificaciones post-transcripcionales del RNA, como la guanililtransferasa, encargada del *capping* o las poliA polimerasas. En levadura esta pausa es muy poco frecuente, pero sí que existen evidencias de la acumulación de la RNA Pol II antes del TSS (Churchman & Weissman, 2011; Sheridan et al., 2019) que podría corresponder con un punto de regulación de la transcripción en la que el extremo carboxilo terminal de la RNA Pol II es fosforilado por la quinasa Kin28 para continuar con el proceso de elongación (Rodríguez-Molina et al., 2016), aunque no está del todo esclarecido que este fenómeno de acumulación de la RNA Pol II se corresponda fisiológicamente con la pausa que se observa en eucariotas superiores.

Otra de las situaciones que afectan a la elongación es el fenómeno conocido como *backtracking*, que implica que la RNA Pol II retroceda en el promotor y el transcrito nascente se disocie del centro catalítico antes de tiempo. Los motivos que pueden producir esta parada son varias, entre las que se encuentran la incorporación de nucleótidos erróneos, la presencia de nucleosomas, factores unidos a DNA o *loops* que hacen que la RNA Pol II no pueda avanzar (Gómez-Herreros

et al., 2012). Para salvar esta condición anómala, la RNA Pol II necesita la ayuda de proteínas, denominadas factores de elongación, como TFIIS, el complejo Ccr4-Not (Zatreanu et al., 2019) y los factores Spt4-Spt5 que forman el complejo DSIF (Schulz et al., 2016; Crickard et al., 2017). En levaduras, el *backtracking* parece ser importante para regular la expresión génica (Gómez-Herreros et al., 2012). En esta línea, varios trabajos han demostrado que Xrn1 juega un papel importante en el mantenimiento de un complejo RNA Pol II funcional a lo largo del proceso de elongación transcripcional (Begley et al., 2019; Fischer et al., 2020; Begley et al., 2021; García-Martínez et al., 2021), incluyendo situaciones de estrés como el estrés osmótico (García-Martínez et al., 2021).

En condiciones de estrés osmótico, en la cepa *xrn1Δ*, se observa mayor acumulación de RNA Pol II inactiva (en estado de *backtracking*) en genes que se inducen bajo estas condiciones (*STL1* y *GRE3*) (García-Martínez et al., 2021). Además, también existe acumulación del factor TFIIS, lo que sugiere que Xrn1 tiene un papel importante en la regulación de la elongación ayudando a la RNA Pol II a superar este estado. En nuestro caso, no hemos encontrado acumulación de la RNA Pol II en los genes transcripcionalmente dependientes de la ruta CWI en condiciones de estrés por RC en la cepa *pat1Δ*; de hecho, los niveles de unión de RNA Pol II son menores en la cepa mutante que en la silvestre. Este resultado indica que, a diferencia de lo que ocurre con Xrn1, Pat1 no está implicado en el proceso de *backtracking*.

Anteriormente, se ha mencionado que la RNA Pol II, en su tránsito a lo largo de la zona codificante del gen, necesita la ayuda de factores de elongación que a menudo se asocian en forma de complejos; uno de ellos es el complejo PAF, que se encuentra en todos los organismos eucariotas y está formado por cinco subunidades, entre las que destaca la proteína Paf1, y cuya función en humanos está relacionada con progresión y ciclo celular (Van Oss et al., 2017). Paf1 interacciona físicamente con complejos reguladores de cromatina como el complejo FACT y con el factor de elongación Spt5 que ayuda a la RNA Pol II a salir del *backtracking* (Squazzo et al., 2002). Además, otros estudios han descrito que Paf1, a través de su interacción con Slt2, participa en la expresión de genes Swi4/Swi6-dependientes, como *FKS2*, a través de un mecanismo no catalítico de Slt2 (Kim & Levin, 2011). Otra familia de complejos proteicos que acompañan a la RNA Pol II es el complejo THO. Este complejo es un heterotetrámero que conecta la maduración del mRNA con la

6. DISCUSIÓN

exportación del transcrito naciente al citoplasma a través de interacciones con moléculas que forman parte del complejo del poro nuclear (NPC, *Nuclear Pore Complex*, en inglés) como Yra1 (Valpuesta, 2012).

Estudios anteriores de nuestro grupo han puesto de manifiesto que la transcripción de genes Rlm1-dependientes no depende de Paf1, pero sí de Rlr1 (componente del complejo THO), Ccr4 o Spt4 (Sanz et al., 2018). Además, se conoce desde hace tiempo la interacción de Pat1 con Yra1 (Krogan et al., 2006; Kashyap et al., 2005). Dado que Pat1 se posiciona en la zona codificante de los genes CWI-dependientes *MLP1* y *PIR3* en condiciones de activación de CWI y que esta unión al DNA depende de Slt2, se han de hacer estudios adicionales para esclarecer la posible relación de Pat1 con estos complejos en condiciones de estrés de pared, así como poder analizar el efecto en elongación desacoplándolo de la participación de Pat1 en el ensamblaje del PIC.

Los datos obtenidos en este trabajo, que establecen que una proteína fundamentalmente asociada a degradación de mRNA participa además en estadíos iniciales de la transcripción y elongación, refuerzan y confirman el papel dual en síntesis y degradación de mRNAs de este tipo de proteínas en situaciones de estrés, donde efectivamente es necesario optimizar los niveles de mRNAs específicos requeridos en determinadas circunstancias.

7.CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo son:

1. La exposición de la levadura a Rojo Congo y zimoliasa, compuestos que interfieren con la integridad de la pared celular, inducen la formación de *P-bodies*, pero no la de gránulos de estrés, siguiendo un patrón temporal similar al de la activación de la ruta CWI.
2. La formación de *P-bodies* debida a la acción de ambos compuestos depende de la señalización a través de la ruta de integridad celular (CWI) y en particular de la actividad catalítica de la MAPK Slt2, aunque no del factor de transcripción Rlm1.
3. La activación de la ruta cAMP-PKA bloquea la formación de *P-bodies* en condiciones de estrés de pared producido por Rojo Congo y zimoliasa, a través de la fosforilación de Pat1.
4. Gránulos correspondientes a los mRNAs de *MLP1*, *CRG1* y *SRL3*, genes regulados a través de la ruta CWI, co-localizan en *P-bodies* como consecuencia del tratamiento con Rojo Congo y zimoliasa. Además, la sobreexpresión de los genes *MLP1* y *CRG1*, aumenta la sensibilidad de la célula a zimoliasa y caspofungina en cepas en las que la formación de *P-bodies* está comprometida.
5. Mediante el escrutinio de una colección de mutantes se ha determinado que las proteínas Lcb5, Lsb6, Mkt1, Oca6, Pkh1, Prr1, Ptc6, Sko1, Sky1, Yck2 y Def1 son necesarias para la formación de *P-bodies* y gránulos de mRNA en condiciones de estrés de pared.
6. La proteína Dcp2, componente estructural de *P-bodies*, interacciona con Slt2 tanto en condiciones de estrés de pared como en condiciones basales.

7. CONCLUSIONES

7. Las proteínas presentes en *P-bodies*, Dhh1, Lsm1 y Pat1, funcionalmente relacionadas con la degradación de mRNA, son necesarias para la correcta inducción de los niveles de expresión de los genes CWI-dependientes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3*.

8. Mediante *microarrays* de DNA se ha comprobado que una cepa carente de *PAT1*, presenta una amplia afectación de la respuesta transcripcional Slt2-dependiente inducida por el tratamiento con RC.

9. La señalización a través de la ruta CWI y los niveles del factor de transcripción Rlm1 no parecen estar afectados por la ausencia de Pat1.

10. La formación del complejo de pre-iniciación en los promotores de los genes *MLP1*, *SRL3* y *PIR3*, así como el reclutamiento de Slt2 y la progresión de la RNA Polimerasa II a través de sus regiones codificantes, dependen de manera parcial de la presencia de Pat1.

11. Pat1 se asocia de forma Slt2-dependiente a la región codificante de los genes *MLP1* y *PIR3* en condiciones de activación, siguiendo un perfil temporal de unión similar al de expresión de dichos genes. Además, el reclutamiento de la MAPK Slt2 a las regiones codificantes de *MLP1* y *PIR3* depende de Pat1.

8.BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A. K., Rogers, P. D., Baerson, S. R., Jacob, M. R., Barker, K. S., Cleary, J. D., Walker, L. A., Nagle, D. G., & Clark, A. M. (2003). Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 34998–35015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306291200>
- Aimanianda, V., Simenel, C., Garnaud, C., Clavaud, C., Tada, R., Barbin, L., Mouyna, I., Heddergott, C., Popolo, L., Ohya, Y., Delepierre, M., & Latgea, J. P. (2017). The dual activity responsible for the elongation and branching of β -(1,3)-glucan in the fungal cell wall. *mBio*, 8(3), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00619-17>
- Alic, N., Higgins, V. J., Pichova, A., Breitenbach, M., & Dawes, I. W. (2003). Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41849–41855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307760200>
- Alonso-Rodríguez, E., Fernández-Piñar, P., Sacristán-Reviriego, A., Molina, M., & Martín, H. (2016). An analog-sensitive version of the protein kinase Slt2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 5461–5472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683680>
- Anderson, J. T., Paddy, M. R., & Swanson, M. S. (1993). Pub1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(10), 6102–6113. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.10.6102-6113.1993>
- Anderson, P., & Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences* 33 (3), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.12.003>
- Anderson, P., Kedersha, N., & Ivanov, P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1849(7), 861–870. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.009>
- Andrei, M. A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., & Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 11(5), 717–727. <https://doi.org/10.1261/rna.2340405>
- Andrews, B. J., & Herskowitz, I. (1989). Identification of a DNA Binding Factor Involved in Cell-Cycle Control of the Yeast HO Gene. *Cell* 57(1), 21-29.
- Aparicio, O., Geisberg, J. V., & Struhl, K. (2004). Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Current protocols in cell biology*, Chapter 17, . <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1707s23>
- Arias, P., Díez-Muñiz, S., García, R., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J. (2011). Genome-wide survey of yeast mutations leading to activation of the yeast cell integrity MAPK pathway: Novel insights into diverse MAPK outcomes. *BMC Genomics*, 12(390). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-390>
- Arribere, J. A., Doudna, J. A., & Gilbert, W. V. (2011). Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P-bodies. *Molecular Cell*, 44(5), 745–758. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.019>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo, J., Bermejo, C., García, R., & Rodríguez-Peña, J. M. (2009). Genomics in the detection of damage in microbial systems: Cell wall stress in yeast. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15, (1), 44–46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02676.x>
- Arroyo, J., Farkaš, V., Sanz, A. B., & Cabib, E. (2016). ‘Strengthening the fungal cell wall through chitin–glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cellular Microbiology*, 18(9), 1239–1250. <https://doi.org/10.1111/cmi.12615>
- Arroyo, J., Hutzler, J., Bermejo, C., Ragni, E., García-Cantalejo, J., Botías, P., Piberger, H., Schott, A., Sanz, A. B., & Strahl, S. (2011). Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1529–1546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07537.x>
- Aulas, A., Caron, G., Gkogkas, C. G., Mohamed, N. V., Destroismaisons, L., Sonenberg, N., Leclerc, N., Alex Parker, J., & Velde, C. Vande. (2015). G3BP1 promotes stress-induced RNA granule interactions to preserve polyadenylated mRNA. *Journal of Cell Biology*, 209(1), 73–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408092>
- Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, S.A. and Struhl, K. (1993). *A Review of: “Current Protocols in Molecular Biology*
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., & Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 26(14), 2579–2595. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-03-0136>
- Babour, A., Bicknell, A. A., Tourtellotte, J., & Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell*, 142(2), 256–269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.006>
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., & Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6515–6528. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.19.6515-6528.2001>
- Balagopal, V., & Parker, R. (2009). Polysomes, P-bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. In *Current Opinion in Cell Biology* 21(3), 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.005>
- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology* 18(5). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Barbee, S. A., Estes, P. S., Cziko, A. M., Hillebrand, J., Luedeman, R. A., Coller, J. M., Johnson, N., Howlett, I. C., Geng, C., Ueda, R., Brand, A. H., Newbury, S. F., Wilhelm, J. E., Levine, R. B., Nakamura, A., Parker, R., & Ramaswami, M. (2006). Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P-bodies. *Neuron*, 52(6), 997–1009. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.028>
- Bardwell L, T. J. (1996). A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends In Biochemical Science*, 21(10), 373–374.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Barraza, C. E., Solari, C. A., Rinaldi, J., Ojeda, L., Rossi, S., Ashe, M. P., & Portela, P. (2021). A prion-like domain of Tpk2 catalytic subunit of protein kinase A modulates P-body formation in response to stress in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(1), 118884. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118884>
- Bashkirov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. A., Buerstedde, J. M., & Heyer, W. D. (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *Journal of Cell Biology*, 136(4), 761–773. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.4.761>
- Begley, V., Corzo, D., Jordán-Pla, A., Cuevas-Bermúdez, A., Miguel-Jiménez, L. de, Pérez-Aguado, D., Machuca-Ostos, M., Navarro, F., Chávez, M. J., Pérez-Ortín, J. E., & Chávez, S. (2019). The mRNA degradation factor Xrn1 regulates transcription elongation in parallel to Ccr4. *Nucleic Acids Research*, 47(18), 9524–9541. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz660>
- Begley, V., Jordán-Pla, A., Peñate, X., Garrido-Godino, A. I., Challal, D., Cuevas-Bermúdez, A., Mitjavila, A., Barucco, M., Gutiérrez, G., Singh, A., Alepuz, P., Navarro, F., Libri, D., Pérez-Ortín, J. E., & Chávez, S. (2021). Xrn1 influence on gene transcription results from the combination of general effects on elongating RNA pol II and gene-specific chromatin configuration. *RNA Biology*, 18(9), 1310–1323. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1845504>
- Behar, M., & Hoffmann, A. (2010). Understanding the temporal codes of intra-cellular signals. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(6), 684–693. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.09.007>
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4-NOT deadenylase and DCP1-DCP2 decapping complexes. *Genes & Development*, 20(14), 1885–1898. <https://doi.org/10.1101/gad.1424106>
- Bermejo, C., García, R., Straede, A., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C., Heinisch, J. J., & Arroyo, J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of Wsc1 and Mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 14(6), 679–688. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0060>
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Rodríguez de la Concepción, M. L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., & Arroyo, J. (2008). The sequential activation of the Yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular Biology of the Cell*, 19(3), 1113–1124. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0742>
- Blasco-Moreno, B., de Campos-Mata, L., Böttcher, R., García-Martínez, J., Jungfleisch, J., Nedialkova, D. D., Chattopadhyay, S., Gas, M. E., Oliva, B., Pérez-Ortín, J. E., Leidel, S. A., Choder, M., & Díez, J. (2019). The exonuclease Xrn1 activates transcription and translation of mRNAs encoding membrane proteins. *Nature Communications*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09199-6>
- Boeck, R., Tarun, S., Rieger, M., Deardorff, J. A., Müller-Auer, S., & Sachs, A. B. (1996). The yeast pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 432–438. <http://www.jbc.org/10.1074/jbc.271.1.432>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., Tompa, P., & Fuxreiter, M. (2018). Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 420–435. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.004>
- Bohush, A., Niewiadomska, G., & Filipek, A. (2018). Role of mitogen activated protein kinase signaling in Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 2973. <https://doi.org/10.3390/ijms19102973>
- Bonnerot, C., Boeck, R., & Lapeyre, B. (2000). The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact *in vivo*, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Molecular and Cellular Biology*, 20(16), 5939–5946. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.16.5939-5946.2000>
- Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Klis, F. M. (2004). Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 21(5), 413–427. <https://doi.org/10.1002/yea.1109>
- Botstein, D., Chervitz, S. A., & Cherry, J. M. (1997). Yeast as a model organism. *Science*, 277(5330), 1259–1260. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1259>
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., & Séraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO Journal*, 19(7), 1661–1671. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1661>
- Brangwynne, C. P., Eckmann, C. R., Courson, D. S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., & Hyman, A. A. (2009). Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*, 324(5935), 1729–1732. <https://doi.org/10.1126/science.1172046>
- Braun, K. A., & Young, E. T. (2014). Coupling mRNA synthesis and decay. *Molecular and Cellular Biology*, 34(22), 4078–4087. <https://doi.org/10.1128/mcb.00535-14>
- Braun, K. A., Vaga, S., Dombek, K. M., Fang, F., Palmisano, S., Aebersold, R., & Young, E. T. (2014). Phosphoproteomic analysis identifies proteins involved in transcription-coupled mRNA decay as targets of Snf1 signaling. *Science Signaling*, 7(333), ra64. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005000>
- Breeden, L., & Nasmyth, K. (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: cis-and trans-acting regulators. *Cell* 48(3), 389–397.
- Bregman, A., Avraham-Kelbert, M., Barkai, O., Duek, L., Guterman, A., & Choder, M. (2011). Promoter elements regulate cytoplasmic mRNA decay. *Cell*, 147(7), 1473–1483. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.005>
- Bregues, M., Teixeira, D., & Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, 310(5747), 486–489. <https://doi.org/10.1126/science.1115791>
- Buchan, J. (2014). mRNP granules assembly, function, and connections with disease. *RNA Biology* 11(8), 1019–1030. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972208>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Buchan, J. R., Muhlrads, D., & Parker, R. (2008). P-bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 183(3), 441–455. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807043>
- Buchan, J., Nissan, T., & Parker, R. (2010). Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* 470, 619-640
- Cabib, E. (2009). Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both $\beta(1-6)$ - And $\beta(1-3)$ glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryotic cell*, 8(11), 1626–1636. <https://doi.org/10.1128/EC.00228-09>
- Cabib, E., & Durán, A. (2005). Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9170–9179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414005200>
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J. (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to $\beta(1-6)$ glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Microbiology*, 63(3), 921–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05565.x>
- Cabib, E., Bowers, B., & Roberts, R. L. (1983). Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(11), 3318–3321. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.11.3318>
- Cabib, E., Drgonová, J., & Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annual review of biochemistry* 67, 307-333. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.307>
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B., & Varma, A. (2001). the yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 19679–19682. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000031200>
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 50–83. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00031-10>
- Charenton, C., Gaudon-Plesse, C., Fourati, Z., Taverniti, V., Back, R., Kolesnikova, O., Séraphin, B., & Graille, M. (2017). A unique surface on Pat1 C-terminal domain directly interacts with Dcp2 decapping enzyme and Xrn1 5'–3' mRNA exonuclease in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45), E9493–E9501. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711680114>
- Chen, B., Zhang, Z., Sun, X., Kuang, Y., Mao, X., Wang, X., Yan, Z., Li, B., Xu, Y., Yu, M., Fu, J., Mu, J., Zhou, Z., Li, Q., Jin, L., He, L., Sang, Q., & Wang, L. (2017). Biallelic mutations in *PATL2* cause female infertility characterized by oocyte maturation arrest. *American Journal of Human Genetics*, 101(4), 609–615. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.018>
- Chen, F. X., Smith, E. R., & Shilatifard, A. (2018). Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature reviews molecular cell biology*, 19(7), 464–478. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0010-5>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Chen, R. E., & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1773(8), 1311–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>
- Chen, Y., Feldman, D. E., Deng, C., Brown, J. A., De Giacomo, A. F., Gaw, A. F., Shi, G., Le, Q. T., Brown, J. M., & Koong, A. C. (2005). Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cancer research*, 3(12), 669-677. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0181>
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T. H., & Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.006>
- Christou-Kent, M., Kherraf, Z., Amiri-Yekta, A., Le Blévec, E., Karaouzène, T., Conne, B., Escoffier, J., Assou, S., Guttin, A., Lambert, E., Martinez, G., Boguenet, M., Fourati Ben Mustapha, S., Cedrin Durnerin, I., Halouani, L., Marrakchi, O., Makni, M., Latrous, H., Kharouf, M., ... Arnoult, C. (2018). *PATL 2* is a key actor of oocyte maturation whose invalidation causes infertility in women and mice. *EMBO Molecular Medicine*, 10(5). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708515>
- Churchman, L. S., & Weissman, J. S. (2011). Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature*, 469(7330), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature09652>
- Cipolat Mis, M. S., Brajkovic, S., Frattini, E., Di Fonzo, A., & Corti, S. (2016). Autophagy in motor neuron disease: Key pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 72, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.01.012>
- Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D., & Crouzet, M. (2005). The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(8), 1375–1386. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1375-1386.2005>
- Collister, M., Didmon, M. P., Macisaac, F., Stark, M. J., Macdonald, N. Q., & Keyse, S.M. (2002). *YIL113W* encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Letters*, 527(1-3), 186-192. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03220-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03220-9)
- Conaway, J. W., & Conaway, R. C. (1997). Promoter escape by RNA polymerase II : formation of escape-competent transcriptional intermediate is a prerequisite for exit of polymerase from the promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28175–28178. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28175>
- Cortés, J. C. G., Curto, M. Á., Carvalho, V. S. D., Pérez, P., & Ribas, J. C. (2019). The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107352. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.008>
- Cougot, N., Babajko, S., & Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *Journal of Cell Biology*, 165(1), 31–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309008>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Cowart, L. A., Gandy, J. L., Tholanikunnel, B., & Hannun, Y. A. (2010). Sphingolipids mediate formation of mRNA processing bodies during the heat-stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 431(1), 31–38. <https://doi.org/10.1042/BJ20100307>
- Crickard, J. B., Lee, J., Lee, T. H., & Reese, J. C. (2017). The elongation factor Spt4/5 regulates RNA polymerase II transcription through the nucleosome. *Nucleic Acids Research*, 45(11), 6362–6374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx220>
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., & Gustin, M. C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast hypotonic shock activates the Pkc1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 30157–30161. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.30157>
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., & Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, 146 (9), 2121–2132. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2121>
- Decker, C. J., & Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a012286. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012286>
- Decker, C. J., Teixeira, D., & Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 179(3), 437–449. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704147>
- Delley, P. A., & Hall, M. N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of *RHO1*. *Journal of Cell Biology*, 147(1), 163–174. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.163>
- Dodou, E., & Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology* 17 (4), 1848–1859. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.4.1848>
- Dranginis, A. M., Rauceo, J. M., Coronado, J. E., & Lipke, P. N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 282–294. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00037-06>
- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J. J., & Dufrêne, Y. F. (2009). The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nature Chemical Biology*, 5(11), 857–862. <https://doi.org/10.1038/nchembio.220>
- Elhasi, T., & Blomberg, A. (2019). Integrins in disguise - mechanosensors in *Saccharomyces cerevisiae* as functional integrin analogues. *Microbial Cell*, 6(8), 335–355. <https://doi.org/10.15698/mic2019.08.686>
- El-Naggar, A. M., & Sorensen, P. H. (2018). Translational control of aberrant stress responses as a hallmark of cancer. *Journal of Pathology*, 244(5), 650–666. <https://doi.org/10.1002/path.5030>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Errede, B., Cade, R. M., Yashar, B. M., Kamada, Y., Levin, D. E., Irie, K., & Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Molecular Reproduction and Development*, 42(4), 477–485. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420416>
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., & Izaurralde, E. (2007). P-bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrm2080>
- Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., & Lykke-Andersen, J. (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Molecular Cell*, 20(6), 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.031>
- Fischer, J., Song, Y. S., Yosef, N., Iulio, J. di, Stirling Churchman, L., & Choder, M. (2020). The yeast exoribonuclease Xrn1 and associated factors modulate RNA polymerase II processivity in 5' and 3' gene regions. *Journal of Biological Chemistry*, 295(33), 11435–11454. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.013426>
- Flández, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martín, H., & Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast Cell Integrity Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11027–11034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306412200>
- Fourati, Z., Kolesnikova, O., Back, R., Keller, J., Charenton, C., Taverniti, V., Plesse, C. G., Lazar, N., Durand, D., Van Tilbeurgh, H., Séraphin, B., & Graille, M. (2014). The C-terminal domain from *S. cerevisiae* Pat1 displays two conserved regions involved in decapping factor recruitment. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096828>
- Franks, T. M., & Lykke-Andersen, J. (2008). The control of mRNA decapping and P-Body formation. *Molecular Cell*, 32(5), 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.001>
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics* 81, 33–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6>
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J. M., Francois, J., Nombela, C., & Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15183–15195. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312954200>
- García, R., Bravo, E., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J. (2017). A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06001-9>
- García, R., Itto-Nakama, K., Rodríguez-Peña, J. M., Chen, X., Sanz, A. B., de Lorenzo, A., Pavón-Vergés, M., Kubo, K., Ohnuki, S., Nombela, C., Popolo, L., Ohya, Y., & Arroyo, J. (2021). Poacic acid, a β -1,3-glucan-binding antifungal agent, inhibits cell-wall remodeling and activates transcriptional responses regulated by the cell-wall integrity and high-osmolarity glycerol pathways in yeast. *FASEB Journal*, 35(9), 1–18. <https://doi.org/10.1096/fj.202100278r>

8. BIBLIOGRAFÍA

- García, R., Pulido, V., Orellana-Muñoz, S., Nombela, C., Vázquez de Aldana, C. R., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J. (2019). Signalling through the yeast MAPK Cell Wall Integrity pathway controls P-body assembly upon cell wall stress. *Scientific Reports*, 9(1), 3186. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40112-9>
- García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Nombela, C., & Arroyo, J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10901–10911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808693200>
- García, R., Sanz, A. B., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C., & Arroyo, J. (2016). Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *Journal of Cell Science*, 129(8), 1649–1660. <https://doi.org/10.1242/jcs.180190>
- García-Martínez, J., Pérez-Martínez, M. E., Pérez-Ortín, J. E., & Alepuz, P. (2021). Recruitment of Xrn1 to stress-induced genes allows efficient transcription by controlling RNA polymerase II backtracking. *RNA Biology*, 18(10), 1458–1474. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1857521>
- Garre, E., Pelechano, V., Sánchez del Pino, M., Alepuz, P., & Sunnerhagen, P. (2018). The Lsm1-7/Pat1 complex binds to stress-activated mRNAs and modulates the response to hyperosmotic shock. *PLoS Genetics*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007563>
- Gentzsch, M., & Tanner, W. (1996). The *PMT* gene family: Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO Journal*, 15(21), 5752–5759.
- Gewartowski, K., Cuéllar, J., Dziembowski, A., & Valpuesta, J. M. (2012). The yeast THO complex forms a 5-subunit assembly that directly interacts with active chromatin. *Bioarchitecture*, 2(4), 134–137. <https://doi.org/10.4161/bioa.21181>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(October), 546–567.
- Goldstrohm, A. C., & Wickens, M. (2008). Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 337–344. <https://doi.org/10.1038/nrm2370>
- Gómez-Herreros, F., De Miguel-Jiménez, L., Millán-Zambrano, G., Peñate, X., Delgado-Ramos, L., Muñoz-Centeno, M. C., & Chávez, S. (2012). One step back before moving forward: regulation of transcription elongation by arrest and backtracking. *FEBS Letters*, 586(18), 2820–2825. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.07.030>
- González-Rubio, G., Fernández-Acero, T., Martín, H., & Molina, M. (2019). Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in fungal signaling: conservation, function, and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>

8. BIBLIOGRAFÍA

- González-Rubio, G., Sellers-Moya, Á., Martín, H., & Molina, M. (2021). Differential role of threonine and tyrosine phosphorylation in the activation and activity of the yeast MAPK Slt2. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms22031110>
- Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>
- Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2016). Mutant *KRAS* enhances tumor cell fitness by upregulating stress granules. *Cell*, 167(7), 1803–1813. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.035>
- Gray, J. V., Ogas, J. P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D. E., Herskowitz, I., Francisco, S., & Hopkins, J. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *The EMBO Journal* 16(6), 4924–4937. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4924>
- Grouši, T., Ivanov, P., Frýdlová, I., Vašicová, P., Janda, F., Vojtová, J., Malínská, K., Malcová, I., Nováková, L., Janošková, D., Valášek, L., & Hašek, J. (2009). Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science*, 122(12), 2078–2088. <https://doi.org/10.1242/jcs.045104>
- Guzikowski, A. R., Chen, Y. S., & Zid, B. M. (2019). Stress-induced mRNP granules: form and function of processing bodies and stress granules. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(3), e1524. <https://doi.org/10.1002/wrna.1524>
- Haas, G., Braun, J. E., Igreja, C., Tritschler, F., Nishihara, T., & Izaurralde, E. (2010). HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. *Journal of Cell Biology*, 189(2), 289–302. <https://doi.org/10.1083/jcb.200910141>
- Hahn, S., & Young, E. T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189(3), 705–736. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127019>
- Hailey, D. W., Davis, T. N., & Muller, E. G. (2002). Fluorescence resonance energy transfer using color variants of green fluorescent protein. *Methods in Enzymology*, 351, 34–49. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)51840-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)51840-1)
- Haimovich, G., Medina, D. A., Causse, S. Z., Garber, M., Millán-Zambrano, G., Barkai, O., Chávez, S., Pérez-Ortín, J. E., Darzacq, X., & Choder, M. (2013). Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*, 153(5), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.012>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hanson, P. K. (2018). *Saccharomyces cerevisiae*: A unicellular model genetic organism of enduring importance. *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*, 16(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cpet.21>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Hantsche, M., & Cramer, P. (2016). Structural basis of transcription: ten years after the nobel prize. *Angewandte Chemie - International Edition*, 55(52), 15972-15981. <https://doi.org/10.1002/anie.201608066>
- Hassan, AH., Neely, KE., Vignali, M., Reese, J.C., & Workman, J.L. (2001). Promoter targeting of chromatin-modifying complexes. *Frontiers in Bioscience*, 6(3), 1054-1064. <https://doi.org/10.2741/hassan>
- Hatakeyama, R., Kono, K., & Yoshida, S. (2017). Ypk1/Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodelling after membrane stresses. *Journal of Cell Science*, 130(6), 1169-1178. <https://doi.org/10.1242/jcs.198382>
- Hatfield, L., Beelman, C. A., Stevens, A., & Parker, R. (1996). Mutations in trans-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5830-5838. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.10.5830>
- He, F., & Jacobson, A. (2015). Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. *RNA*, 21(9), 1633-1647. <https://doi.org/10.1261/rna.052449.115>
- He, F., Celik, A., Wu, C., & Jacobson, A. (2018). General decapping activators target different subsets of inefficiently translated mRNAs. *eLife*, 7, e34409. <https://doi.org/10.7554/eLife.34409>
- Heinisch, J. J., & Rodicio, R. (2018). Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiology*, 42(1), 22-39. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux051>
- Heinisch, J. J., Dupres, V., Alsteens, D., & Dufrene, Y. F. (2010). Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nature Protocols*, 5(4), 670-677. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.19>
- Hendler, A., Medina, E. M., Buchler, N. E., de Bruin, R. A. M., & Aharoni, A. (2018). The evolution of a G1/S transcriptional network in yeasts. *Current Genetics*, 64(1), 81-86. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0726-3>
- Huang, L., Tong, X., Wang, F., Luo, L., Jin, R., Fu, Y., Zhou, G., Li, D., Song, G., Liu, Y., & Zhu, F. (2018). Novel mutations in *PATL2* cause female infertility with oocyte germinal vesicle arrest. *Human Reproduction*, 33(6), 1183-1190. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey100>
- Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Yi, Z., Morlot, J. B., Munier, A., Fradet, M., Daunesse, M., Bertrand, E., Pierron, G., Mozziconacci, J., Kress, M., & Weil, D. (2017). P-Body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons. *Molecular Cell*, 68(1), 144-157.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.003>
- Huch, S., & Nissan, T. (2017). An mRNA decapping mutant deficient in P-body assembly limits mRNA stabilization in response to osmotic stress. *Scientific Reports*, 7(2), 1-13. <https://doi.org/10.1038/srep44395>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Huch, S., Müller, M., Muppavarapu, M., Gommlich, J., Balagopal, V., & Nissan, T. (2016). The decapping activator Edc3 and the Q/N-rich domain of Lsm4 function together to enhance mRNA stability and alter mRNA decay pathway dependence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biology Open*, 5(10), 1388–1399. <https://doi.org/10.1242/bio.020487>
- Hughes, M. F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00084-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00084-x)
- Hunter T, P. G. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(1), 18–22. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(96\)10068-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(96)10068-2)
- Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M., & Strahl, S. (2008). Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Molecular Microbiology*, 68(6), 1438–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06243.x>
- Hyman, A. A., Weber, C. A., & Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>
- Igual, J. C., Johnson, A. L., & Johnston, L. H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *The EMBO Journal*, 15(18), 5001–5013.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Lührmann, R., & Achsel, T. (2002). The human Lsm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, 8(12), 1489–1501
- Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., & Oshima, Y. (1993). *MKK1* and *MKK2*, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Molecular and Cellular Biology*, 13(5), 3076–3083. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.3076-3083.1993>
- Ito, H., Murata, K., & Kimura, A. (1984). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163–168.
- Iwaki, A., & Izawa, S. (2012). Acidic stress induces the formation of P-bodies, but not stress granules, with mild attenuation of bulk translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 446(2), 225–233. <https://doi.org/10.1042/BJ20120583>
- Iyer, V.R., Horak, C.E., Scafe, C.S., Botstein, D., Snyder, M., & Brown, P.O. (2001). Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*, 409(6819), 533–538.
- Izawa, S., Kita, T., Ikeda, K., Miki, T., & Inoue, Y. (2007). Formation of cytoplasmic P-bodies in sake yeast during Japanese sake brewing and wine making. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(11), 2800–2807. <https://doi.org/10.1271/bbb.70417>
- Jain, S., & Parker, R. (2013). The discovery and analysis of P-Bodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 768, pp. 23–43

8. BIBLIOGRAFÍA

- Januszyk, K., & Lima, C.D. (2014). The eukaryotic RNA exosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 24, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.011>
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., & Heinisch, J. J. (2011). How do I begin?. Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *European Journal of Cell Biology*, 90(9), 740–744. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.006>
- Jiao, X., Xiang, S., Oh, C., Martin, C.E., Tong, L., & Kiledjian, M. (2010). Identification of a quality control mechanism for mRNA 5'-end capping. *Nature*, 467(7315), 608–611. <https://doi.org/10.1038/nature09338>
- Jiménez-Sánchez, M., Cid, V. J., & Molina, M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Sit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(43), 31174–31185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706270200>
- Johnson, M. E., Grassetti, A. V., Taroni, J. N., Lyons, S. M., Schweppe, D., Gordon, J. K., Spiera, R. F., Lafyatis, R., Anderson, P. J., Gerber, S. A., & Whitfield, M. L. (2016). Stress granules and RNA processing bodies are novel autoantibody targets in systemic sclerosis. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0914-4>
- Jung, U. S., & Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast Cell Wall Integrity signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 34(5), 1049–1057. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01667.x>
- Jung, U. S., Sobering, A. K., Romeo, M. J., & Levin, D. E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Molecular Microbiology*, 46(3), 781–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03198.x>
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., & Levin, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes & Development*, 9(13), 1559–1571. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1559>
- Kamath, R. S., Fraser, A. G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapink, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D. P., Zipperlen, P., & Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421(6920), 231–237. <https://doi.org/10.1038/nature01278>
- Kapteyn, J. C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M., & Klis, F. M. (1999). The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β 1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Microbiology*, 31(6), 1835–1844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01320.x>
- Kashyap, A. K., Schieltz, D., Yates, J., & Kellogg, D. R. (2005). Biochemical and genetic characterization of Yra1p in budding yeast. *Yeast*, 22(1), 43–56. <https://doi.org/10.1002/yea.1185>
- Kato, K., Yamamoto, Y., & Izawa, S. (2011). Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28(5), 339–347. <https://doi.org/10.1002/yea.1842>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2013). Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase?. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(10), 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.07.004>
- Kershaw, C. J., Nelson, M. G., Lui, J., Bates, C. P., Jennings, M. D., Hubbard, S. J., Ashe, M. P., & Grant, C. M. (2021). Integrated multi-omics reveals common properties underlying stress granule and P-body formation. *RNA Biology*, 1–19. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1976986>
- Ketela, T., Green, R., & Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Journal of Bacteriology*, 181(11), 3330–3340. <https://doi.org/10.1128/JB.181.11.3330-3340.1999>
- Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S. F., Joshua, R., & Chase, C. (2017). The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules. *Molecular Cell*, 68(4), 808–820. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.015>
- Kilchert, C., Weidner, J., Prescianotto-Baschong, C., & Spang, A. (2010). Defects in the secretory pathway and high Ca²⁺ induce multiple P-bodies. *Molecular Biology of the Cell*, 21(15), 2624–2638. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-02-0099>
- Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(4), 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>
- Kim, K. Y., & Levin, D. E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast*, 27(8), 541–548. <https://doi.org/10.1002/yea.1782>
- Kim, K. Y., & Levin, D. E. (2011). Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell*, 144(5), 745–756. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.01.034>
- Kim, K.Y., Truman, A. W., & Levin, D. E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Molecular and Cellular Biology*, 28(8), 2579–2589. <https://doi.org/10.1128/mcb.01795-07>
- Kliss, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Kock, C., Dufrêne, Y. F., & Heinisch, J. J. (2015). Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3), 806–811. <https://doi.org/10.1128/AEM.03273-14>
- Kolesnikova, O., Back, R., Graille, M., & Séraphin, B. (2013). Identification of the Rps28 binding motif from yeast Edc3 involved in the autoregulatory feedback loop controlling *RPS28B* mRNA decay. *Nucleic Acids Research*, 41(20), 9514–9523. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt607>
- Kornberg, R. D. (2001). The eukaryotic gene transcription machinery. *Biological Chemistry*, 382(8), 1103–1107. <https://doi.org/doi:10.1515/BC.2001.140>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Kozubowski, L., Aboobakar, E. F., Cardenas, M. E., & Heitman, J. (2011). Calcineurin colocalizes with P-bodies and stress granules during thermal stress in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 10(11), 1396–1402. <https://doi.org/10.1128/EC.05087-11>
- Krause, S. A., Cundell, M. J., Poon, P. P., McGhie, J., Johnston, G. C., Price, C., & Gray, J. V. (2012). Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *Journal of Cell Science*, 125(11), 2721–2731. <https://doi.org/10.1242/jcs.100685>
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., Punna, T., Peregrín-Alvarez, J. M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M. D., Paccanaro, A., Bray, J. E., Sheung, A., ... Greenblatt, J. F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 440(7084), 637–643. <https://doi.org/10.1038/nature04670>
- Kshirsagar, M., & Parker, R. (2004). Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 166(2), 729–739. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.2.729>
- Kulkarni, M., Ozgur, S., & Stoecklin, G. (2010). On track with P-bodies. *Biochemical Society Transactions*, 38(1), 242–251. <https://doi.org/10.1042/BST0380242>
- Kumar, R., & Kumar, P. (2019). Yeast-based vaccines: new perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Research*, 19(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz007>
- Kwon, Y., Chiang, J., Tran, G., Giaever, G., Nislow, C., Hahn, B. S., Kwak, Y. S., & Koo, J. C. (2016). Signaling pathways coordinating the alkaline pH response confer resistance to the hevein-type plant antimicrobial peptide Pn-AMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta*, 244(6), 1229–1240. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2579-2>
- Łabno, A., Tomecki, R., & Dziembowski, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways - enzymes and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(12), 3125–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D., & François, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(22), 20345–20357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211604200>
- Lanz, M. C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E. J., Faça, V. M., Vega, S., Joiner, A. M. N., Fromme, J. C., Yu, H., & Smolka, M. B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Reports*, 22(2). <https://doi.org/10.15252/embr.202051121>
- Lasserre, J. P., Dautant, A., Aiyar, R. S., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D., Rytka, J., Blondel, M., Skoczen, N., Reynier, P., Pitayu, L., Rötig, A., Delahodde, A., Steinmetz, L. M., Dujardin, G., Procaccio, V., & Rago, J. P. Di. (2015). Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 8(6), 509–522. <https://doi.org/10.1242/dmm.020438>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Lavut, A., & Raveh, D. (2012). Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genetics*, 8(2), e1002527. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002527>
- Lee, J., Liu, L., & Levin, D. E. (2019). Stressing out or stressing in: intracellular pathways for SAPK activation. *Current Genetics*, 65(2), 417–421. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0898-5>
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R. H., Davis, R. W., Hughes, T. R., & Nislow, C. (2007). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nature Genetics*, 39(10), 1235–1244. <https://doi.org/10.1038/ng2117>
- Levin, D.E., Bowers, B., Chen, C.Y., Kamada, Y., & Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C-MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular & Molecular Biology Research*, 40(3), 229–239.
- Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 262–291. <https://doi.org/10.1128/membr.69.2.262-291.2005>
- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the Cell Wall Integrity signaling pathway. *Genetics*, 189(4), 1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Lewis, J. A., Broman, A. T., Will, J., & Gasch, A. P. (2014). Genetic architecture of ethanol-responsive transcriptome variation in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Genetics*, 198(1), 369–382. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.167429>
- Li, S., Zhang, P., Freibaum, B. D., Kim, N. C., Kolaitis, R. M., Molliex, A., Kanagaraj, A. P., Yabe, I., Tanino, M., Tanaka, S., Sasaki, H., Ross, E. D., Taylor, J. P., & Kim, H. J. (2016). Genetic interaction of *hnRNPA2B1* and *DNAJB6* in a *Drosophila* model of multisystem proteinopathy. *Human Molecular Genetics*, 25(5), 936–950. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv627>
- Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., & Gitler, A. D. (2013). Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *Journal of Cell Biology*, 201(3), 361–372. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302044>
- Lin, A., Du, Y., & Xiao, W. (2020). Yeast chromatin remodeling complexes and their roles in transcription. *Current Genetics*, 66(4), 657–670. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01072-0>
- Lin, Y., Protter, D. S. W., Rosen, M. K., & Parker, R. (2015). Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Molecular Cell*, 60(2), 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.018>
- Liu, L., Weiss, E., Panas, M. D., Götter, B., Sellberg, S., Thaa, B., & McInerney, G. M. (2019). RNA processing bodies are disassembled during old world alphavirus infection. *Journal of General Virology*, 100(10), 1375–1389. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001310>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Lobel, J. H., & Gross, J. D. (2020). Pdc2/Pat1 increases the range of decay factors and RNA bound by the Lsm1-7 complex. *RNA*, 26(10), 1380–1388. <https://doi.org/10.1261/rna.075812.120>
- Loll-Kripplleber, R., & Brown, G. W. (2017). P-body proteins regulate transcriptional rewiring to promote DNA replication stress resistance. *Nature Communications*, 8(1). 558. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00632-2>
- Lommel, M., Bagnat, M., & Strahl, S. (2004). Aberrant processing of the WSC Family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), 46–57. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.1.46-57.2004>
- Longtine, M.S., McKenzie, A. III., Demarini, D. J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., & Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(10), 953–961.
- Lorentzen, E., Dziembowski, A., Lindner, D., Seraphin, B., & Conti, E. (2007). RNA channelling by the archaeal exosome. *EMBO Reports*, 8(5), 470–476. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400945>
- Low, H. B., & Zhang, Y. (2016). Regulatory roles of MAPK phosphatases in cancer. *Immune Network*, 16(2), 85–98. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.2.85>
- Luo, G., Costanzo, M., Boone, C., & Dickson, R. C. (2011). Nutrients and the Pkh1/2 and Pkc1 protein kinases control mRNA decay and P-body assembly in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), 8759–8770. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196030>
- Luo, Y., Na, Z., & Slavoff, S. A. (2018). P-bodies: composition, properties, and functions. *Biochemistry*, 57(17), 2424–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>
- Machnicka, M. A., Milanowska, K., Oglou, O. O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K. M., Helm, M., Bujnicki, J. M., & Grosjean, H. (2013). MODOMICS: a database of RNA modification pathways - 2013 update. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D262–D267. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1007>
- Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B., & Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*, 275(5307), 1781–1784. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1781>
- Maddirevula, S., Coskun, S., Alhassan, S., Elnour, A., Alsaif, H. S., Ibrahim, N., Abdulwahab, F., Arold, S. T., & Alkuraya, F. S. (2017). Female infertility caused by mutations in the oocyte-specific translational repressor *PATL2*. *American Journal of Human Genetics*, 101(4), 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.009>
- Mahboubi, H., & Stochaj, U. (2017). Cytoplasmic stress granules: dynamic modulators of cell signaling and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(4), 884–895. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.022>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Marín, M. J., Flández, M., Bermejo, C., Arroyo, J., Martín, H., & Molina, M. (2009). Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(3), 345–359. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0415-5>
- Marnef, A., & Standart, N. (2010). Pat1 proteins: a life in translation, translation repression and mRNA decay. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1602–1607. <https://doi.org/10.1042/BST0381602>
- Marnef, A., Weil, D., & Standart, N. (2012). RNA-related nuclear functions of human Pat1b, the P-body mRNA decay factor. *Molecular Biology of the Cell*, 23(1), 213–224. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-05-0415>
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., & Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Molecular Microbiology*, 58(1), 6–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04822.x>
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., & Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 1511–1519. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1511>
- Matheny, T., Rao, B. S., & Parker, R. (2019). Transcriptome-wide comparison of stress granules and P-bodies reveals that translation plays a major role in RNA partitioning. *Molecular and Cellular Biology*, 39(24). <https://doi.org/10.1128/mcb.00313-19>
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J. I., & Ota, I. M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11). <https://doi.org/10.1128/MCB.19.11.7651>
- Mazáň, M., Blanco, N., Kováčová, K., Firáková, Z., Řehulka, P., Farkaš, V., & Arroyo, J. (2013). A novel fluorescence assay and catalytic properties of Crh1 and Crh2 yeast cell wall transglycosylases. *Biochemical Journal*, 455(3), 307–318. <https://doi.org/10.1042/BJ20130354>
- Mazur, P., & Baginsky, W. (1996). In vitro activity of 1,3-β-D-glucan synthase requires the gtp-binding protein Rho1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14604–14609. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.14604>
- McCormick, C., & Khapersky, D. A. (2017). Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nature Reviews Immunology*, 17(10), 647–660. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.63>
- Medina, D. A., Jordán-Pla, A., Millán-Zambrano, G., Chávez, S., Choder, M., & Pérez-Ortín, J. E. (2014). Cytoplasmic 5'-3' exonuclease Xrn1p is also a genome-wide transcription factor in yeast. *Frontiers in Genetics*, 5(1), 1–10.
- Mitchell, S. F., Jain, S., She, M., & Parker, R. (2013). Global analysis of yeast mRNPs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(1), 127–133. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2468>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Mizuno, T., Nakamura, M., & Irie, K. (2018). Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 8(1), 13078. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31413-6>
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartlandt, R. P., & Latgé, J. P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 14882–14889. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.14882>
- Mugridge, J. S., Collier, J., & Gross, J. D. (2018). Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'–3' mRNA decay. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(12), 1077–1085. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0164-z>
- Mymryk, J.S., Fryer, C.J., Jung, L.A., & Archer, T.K. (1997). Analysis of chromatin structure in vivo. *Methods*, 12(1), 105–114. <https://doi.org/10.1006/meth.1997.0452>
- Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., & Parker, R. (2010). Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Molecular Cell*, 39(5), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.025>
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., & Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 14(23), 5931–5938.
- Nostramo, R., Xing, S., Zhang, B., & Herman, P. K. (2019). Insights into the role of P-bodies and stress granules in protein quality control. *Genetics*, 213(1), 251–265. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302376>
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* 192(3), 775–818. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144485>
- Orphanides, G., & Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell*, 108(4), 439–451.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., & Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 15(9), 2196–2207.
- Papa, S., Choy, P. M., & Bubici, C. (2019). The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene*, 38(13), 2223–2240. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0582-8>
- Paravieini, G., & Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Molecular & General Genetics*, 251(6), 682–691. <https://doi.org/10.1007/BF02174117>
- Parker, R. (2012). RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 191(3), 671–702. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.137265>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P-bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
- Perez, P., & Rincón, S. A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochemical Journal*, 426(3), 243–253. <https://doi.org/10.1042/BJ20091823>
- Philip, B., & Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 Are Cell Surface Sensors for Cell Wall Integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 271–280. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.271-280.2001>
- Pilkington, G. R., & Parker, R. (2008). Pat1 contains distinct functional domains that promote P-body assembly and activation of decapping. *Molecular and Cellular Biology*, 28(4), 1298–1312. <https://doi.org/10.1128/mcb.00936-07>
- Piotrowski, J. S., Okada, H., Lu, F., Li, S. C., Hinchman, L., Ranjan, A., Smith, D. L., Higbee, A. J., Ulbrich, A., Coon, J. J., Deshpande, R., Bukhman, Y. V., McIlwain, S., Ong, I. M., Myers, C. L., Boonec, C., Landicka, R., Ralpa, J., Kabbaged, M., & Ohayab, Y. (2015). Plant-derived antifungal agent poacic acid targets β -1,3-glucan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(12), E1490–E1497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410400112>
- Pizzinga, M., & Ashe, M. P. (2014). Yeast mRNA localization: protein asymmetry, organelle localization and response to stress. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 1256–1260. <https://doi.org/10.1042/BST20140086>
- Popolo, L., Gualtieri, T., & Ragni, E. (2001). The yeast cell-wall salvage pathway. *Medical Mycology*, 39(1), 111–121
- Porrua, O., & Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 190–202. <https://doi.org/10.1038/nrm3943>
- Portela, P., & Rossi, S. (2020). cAMP-PKA signal transduction specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 66(6), 1093–1099. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01107-6>
- Pradhan, S. J., Nesler, K. R., Rosen, S. F., Kato, Y., Nakamura, A., Ramaswami, M., & Barbee, S. A. (2012). The conserved P-body component HPat/Pat1 negatively regulates synaptic terminal growth at the larval *Drosophila* neuromuscular junction. *Journal of Cell Science*, 125(24), 6105–6116. <https://doi.org/10.1242/jcs.113043>
- Proft, M., & Struhl, K. (2004). MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, 118(3), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.016>
- Pugh, B. F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255(1), 1–14.
- Qi, M., & Elion, E. A. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 118(16), 3569–3572. <https://doi.org/10.1242/jcs.02470>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ramachandran, V., Shah, K. H., & Herman, P. K. (2011). The cAMP-dependent protein kinase signaling pathway is a key regulator of P-body foci formation. *Molecular Cell*, 43(6), 973–981. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.032>
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S. H. (2016). mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Ramaswami, M., Taylor, J.P., & Parker, R. (2013). Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*, 154(4), 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.038>. Rando, O. J., & Winston, F. (2012). Chromatin and transcription in yeast. *Genetics*, 190(2), 351–387. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.132266>
- Rao, B. S., & Parker, R. (2017). Numerous interactions act redundantly to assemble a tunable size of P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45), E9569–E9578. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712396114>
- Reijns, M. A. M., Alexander, R. D., Spiller, M. P., & Beggs, J. D. (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *Journal of Cell Science*, 121(15), 2463–2472. <https://doi.org/10.1242/jcs.024976>
- Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., & Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Sit2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryotic Cell*, 2(6), 1200–1210. <https://doi.org/10.1128/EC.2.6.1200-1210.2003>
- Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., & Anderson, P. (2020). Mammalian stress granules and P-bodies at a glance. *Journal of Cell Science*, 133(16), 1–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.242487>
- Rodicio, R., & Heinisch, J. J. (2010). Together we are strong—cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast*, 27(8), 531–540. <https://doi.org/10.1002/yea.1785>
- Rodríguez-Molina, J. B., Tseng, S. C., Simonett, S. P., Taunton, J., & Ansari, A. Z. (2016). Engineered covalent inactivation of TFIIF-kinase reveals an elongation checkpoint and results in widespread mRNA stabilization. *Molecular Cell*, 63(3), 433–444. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.036>
- Rodríguez-Peña, J. M., Cid, V. J., Arroyo, J., & Nombela, C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 20(9), 3245–3255. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.3245-3255.2000>
- Rodríguez-Peña, J. M., Díez-Muñiz, S., Bermejo, C., Nombela, C., & Arroyo, J. (2013). Activation of the yeast Cell Wall Integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Letters*, 587(22), 3675–3680. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.030>
- Rodríguez-Peña, J. M., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., & Arroyo, J. (2008). A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents. *Journal of Biotechnology*, 133(3), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.10.00>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Rodríguez-Peña, J. M., García, R., Nombela, C., & Arroyo, J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast*, 27(8), 495–502. <https://doi.org/10.1002/yea.1792>
- Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J. E., & Alepuz, P. (2009). Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 15(6), 1110–1120. <https://doi.org/10.1261/rna.1435709>
- Sachdev, R., Hondele, M., Linsenmeier, M., Vallotton, P., Mugler, C. F., Arosio, P., & Weis, K. (2019). Pat1 promotes processing body assembly by enhancing the phase separation of the DEAD-box ATPase Dhh1 and RNA. *eLife*, 8 e41415. <https://doi.org/10.7554/eLife.41415>
- Saito, H. (2010). Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 13(6), 677–683. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.001>
- Saldi, T., Cortazar, M. A., Sheridan, R. M., & Bentley, D. L. (2016). Coupling of RNA polymerase II transcription elongation with pre-mRNA splicing. *Journal of Molecular Biology*, 428(12), 2623–2635. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.017>
- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., & Arroyo, J. (2018). The CWI pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *Journal of Fungi*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/jof4010001>
- Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Díez-Muñoz, S., Nombela, C., Peterson, C. L., & Arroyo, J. (2012). Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 23(14), 2805–2817. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-04-0278>
- Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C., & Arroyo, J. (2016). Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Slt2. *Nucleic Acids Research*, 44(15), 7159–7172. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw324>
- Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C., & Arroyo, J. (2018). Slt2 MAPK association with chromatin is required for transcriptional activation of Rlm1 dependent genes upon cell wall stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(11), 1029–1039. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.005>
- Savas, J. N., Makusky, A., Ottosen, S., Baillat, D., Then, F., Krainc, D., Shiekhata, R., Markey, S. P., & Tanese, N. (2008). Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P-bodies microRNA polyglutamine RNA interference post-transcriptional gene silencing neuronal RNA granule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(31), 10820–10825. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800658105>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Schmitz, H.P., Lorberg, A., & Heinisch, J.J. (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Molecular Microbiology*, 44(3), 829–840. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02925.x>
- Schulz, S., Gietl, A., Smollett, K., Tinnefeld, P., Werner, F., & Grohmann, D. (2016). Correction: TFE and Spt4/5 open and close the RNA polymerase clamp during the transcription cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), E2871. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606016113>
- Scrimale, T., Didone, L., De Mesy Bentley, K. L., Krysan, D. J., & Brodsky, J. L. (2009). The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 20(1), 164–175. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0809>
- Selitre, C. P. (2001). Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2883–2894. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2883-2894.2001>
- Selth, L. A., Sigurdsson, S., & Sveistrup, J. Q. (2010). Transcript elongation by RNA polymerase II. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 271–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425>
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A., & Ariño, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39785–39795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604497200>
- Shah, K. H., Nostramo, R., Zhang, B., Varia, S. N., Klett, B. M., & Herman, P. K. (2014). Protein kinases are associated with multiple, distinct cytoplasmic granules in quiescent yeast cells. *Genetics*, 198(4), 1495–1512. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.172031>
- Shah, K. H., Zhang, B., Ramachandran, V., & Herman, P. K. (2013). Processing body and stress granule assembly occur by independent and differentially regulated pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 193(1), 109–123. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146993>
- Sharif, H., Ozgur, S., Sharma, K., Basquin, C., Urlaub, H., & Conti, E. (2013). Structural analysis of the yeast Dhh1-Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions. *Nucleic Acids Research*, 41(17), 8377–8390. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt600>
- Sharma, N. (2016). Regulation of RNA polymerase II-mediated transcriptional elongation: implications in human disease. *IUBMB Life*, 68(9), 709–716. <https://doi.org/10.1002/iub.1538>
- Sheridan, R. M., Fong, N., D'Alessandro, A., & Bentley, D. L. (2019). Widespread backtracking by RNA Pol II is a major effector of gene activation, 5' pause release, termination, and transcription elongation rate. *Molecular Cell*, 73(1), 107–118.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.031>
- Sheth, U., & Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620), 805–808. <https://doi.org/10.1126/science.1082320>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2(4), 348–352
- Smits, G. J., Van Den Ende, H., & Klis, F. M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*, 147(4), 781–794. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-4-781>
- Solomon, M. J., & Varshavsky, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for *in vivo* chromatin structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(19), 6470–6474. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6470>
- Squazzo, S. L., Costa, P. J., Lindstrom, D. L., Kumer, K. E., Simic, R., Jennings, J. L., Link, A. J., Arndt, K. M., & Hartzog, G. A. (2002). The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors *in vivo*. *EMBO Journal*, 21(7), 1764–1774. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1764>
- Squirrel, J. M., Eggers, Z. T., Luedke, N., Saari, B., Grimson, A., Lyons, G. E., Anderson, P., & White, J. G. (2006). Car-1, a protein that localizes with the mRNA decapping component Dcap-1, is required for cytokinesis and ER organization in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Molecular Biology of the Cell*, 17(1), 336–344. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-09-0874>
- Standart, N., & Weil, D. (2018). P-Bodies: cytosolic droplets for coordinated mRNA storage. *Trends in Genetics*, 34(8), 612–626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.005>
- Stecca, B., & Roviola, E. (2019). Impact of ERK5 on the hallmarks of cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms20061426>
- Stoecklin, G., Mayo, T., & Anderson, P. (2006). ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Reports*, 7(1), 72–77. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400572>
- Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Development*, 12(5), 599–606. <https://doi.org/10.1101/gad.12.5.599>
- Sun, M., Schwalb, B., Pirkl, N., Maier, K. C., Schenk, A., Failmezger, H., Tresch, A., & Cramer, P. (2013). Global analysis of eukaryotic mRNA degradation reveals Xrn1-dependent buffering of transcript levels. *Molecular Cell*, 52(1), 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.010>
- Sun, W., Quan, C., Huang, Y., Ji, W., Yu, L., Li, X., Zhang, Y., Zheng, Z., Zou, H., Li, Q., Xu, P., Feng, Y., Li, L., Zhang, Y., Cui, Y., Jia, X., Meng, X., Zhang, C., Jin, Y., ... Fu, S. (2015). Constitutive Erk1/2 activation contributes to production of double minute chromosomes in tumour cells. *Journal of Pathology*, 235(1), 14–24. <https://doi.org/10.1002/path.4439>
- Svoboda, A. (1981). Polyethylene glycol induced membrane fusion in yeast protoplasts. *Acta Histochemica Supplementband*, 23, 211–217.
- Swisher, K. D., & Parker, R. (2010). Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one*, 5(4), e10006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010006>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Taba, M., Muroff, I., Lydall, D., Tebb, G., & Nasmyth, K. (1991). Changes in a SWI4,6-DNA-binding complex occur at the time of *HO* gene activation in yeast. *Genes & Development*, 5(11), 2000–2013. <https://doi.org/10.1101/gad.5.11.2000>
- Tada, R., Latge, J.-P., & Aimanianda, V. (2013). Undressing the fungal cell wall/cell membrane - the antifungal drug targets. *Current Pharmaceutical Design*, 19(20), 3738–3747. <https://doi.org/10.2174/1381612811319200012>
- Tanoue, T., & Nishida, E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacology & Therapeutics*, 93(2–3), 193–202.
- Teixeira, D., & Parker, R. (2007). Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(6), 2274–2287. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-03-0199>
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., Brengues, M., & Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*, 11(4), 371–382. <https://doi.org/10.1261/rna.7258505>
- Tharun, S. (2009). Lsm1-7-Pat1 complex: a link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? In *RNA Biology* 6(3), 228–232. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8282>
- Thomas, M. G., Loschi, M., Desbats, M. A., & Boccaccio, G. L. (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cellular Signalling*, 23(2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.011>
- Thompson, M. A., Casolari, J. M., Badieirostami, M., Brown, P. O., & Moernera, W. E. (2010). Three-dimensional tracking of single mRNA particles in *Saccharomyces cerevisiae* using a double-helix point spread function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 17864–17871. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012868107>
- Tkach, J. M., Yimit, A., Lee, A. Y., Riffle, M., Costanzo, M., Jaschob, D., Hendry, J. A., Ou, J., Moffat, J., Boone, C., Davis, T. N., Nislow, C., & Brown, G. W. (2013). Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nature Cell Biology*, 14(9), 966–976. <https://doi.org/10.1038/ncb2549>
- Torres, L., Martin, H., García-Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M., & Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Molecular Microbiology*, 5(11), 2845–2854. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01993.x>
- Toth, J., & Biggin, M. D. (2000). The specificity of protein-DNA crosslinking by formaldehyde: *in vitro* and in *Drosophila* embryos. *Nucleic Acids Research*, 28(2), e4. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.e4>
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinion in Cell Biology*, 8(2), 205–215.
- Tudek, A., Lloret-Llinares, M., & Heick Jensen, T. (2018). The multitasking polyA tail: Nuclear RNA maturation, degradation and export. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 373(1762). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0169>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Tudisca, V., Recouvreux, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., & Portela, P. (2010). Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *European Journal of Cell Biology*, 89(4), 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.08.005>
- Udom, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., & Auesukaree, C. (2019). Coordination of the Cell Wall Integrity and Highosmolarity Glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(15), e00551. <https://doi.org/10.1128/AEM.00551-19>
- Van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., & Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO Journal*, 21(24), 6915–6924. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf678>
- Van Drogen, F., & Peter, M. (2002). MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity. *Current Biology*, 12(2) R53–R55.
- Van Oss, S. B., Cucinotta, C. E., & Arndt, K. M. (2017). Emerging insights into the roles of the Paf1 complex in gene regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(10), 788–798. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.08.003>
- Verduyck, M., Vignaud, H., Bynens, T., Van den Brande, J., Franssens, V., Cullin, C., & Winderickx, J. (2016). Yeast as a Model for Alzheimer's Disease: Latest Studies and Advanced Strategies. *Methods in Molecular Biology*, 1303, 197–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2627-5_11
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., & Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13804–13809. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13804>
- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., & De La Torre-Ruiz, M. A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9149–9159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411062200>
- Vindry, C., Marnef, A., Broomhead, H., Twyffels, L., Ozgur, S., Stoecklin, G., Llorian, M., Smith, C. W., Mata, J., Weil, D., & Standart, N. (2017). Dual RNA Processing Roles of Pat1b via Cytoplasmic Lsm1-7 and Nuclear Lsm2-8 Complexes. *Cell Reports*, 20(5), 1187–1200. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.091>
- Vindry, C., Weil, D., & Standart, N. (2019). Pat1 RNA-binding proteins: multitasking shuttling proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(6), e1557. <https://doi.org/10.1002/wrna.1557>
- Wahle, E., & Winkler, G. S. (2013). RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6–7), 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.01.003>
- Wang, C., Schmich, F., Srivatsa, S., Weidner, J., Beerenwinkel, N., & Spang, A. (2018). Correction: Context-dependent deposition and regulation of mRNAs in P-bodies *eLife*, 7, e41300. <https://doi.org/10.7554/eLife.41300>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Wang, C.-Y., Wang, Y.-T., Hsiao, W.-Y., & Wang, S.-W. (2017). Involvement of fission yeast Pdc2 in RNA degradation and P-body function. *RNA*, 23(4), 493–503. <https://doi.org/10.1261/rna.059766.116>
- Wang, X., Watt, P. M., Louis, E. J., Borts, R. H., & Hickson, I. D. (1996). Pat1: a topoisomerase II-associated protein required for faithful chromosome transmission in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 24(23), 4791–4797. <https://doi.org/10.1093/nar/24.23.4791>
- Watanabe, Y., Irie, K., & Matsumoto, K. (1995). Yeast *RLM1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5740–5749. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.10.5740>
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., & Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2615–2623. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2615>
- Weber, S. C., & Brangwynne, C. P. (2012). Getting RNA and protein in phase. *Cell*, 149(6), 1188–1191. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.022>
- Werner, F., & Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 85–98. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2507>
- Wilbertz, J. H., Voigt, F., Horvathova, I., Roth, G., Zhan, Y., & Chao, J. A. (2019). Single-molecule imaging of mRNA localization and regulation during the integrated stress response. *Molecular Cell*, 73(5), 946–958.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.006>
- Wolf, J., & Passmore, L. A. (2014). mRNA deadenylation by Pan2-Pan3. *Biochemical Society Transactions*, 42(1), 184–187. <https://doi.org/10.1042/BST20130211>
- Wu, D., Muhlrade, D., Bowler, M. W., Jiang, S., Liu, Z., Parker, R., & Song, H. (2014). Lsm2 and Lsm3 bridge the interaction of the Lsm1-7 complex with Pat1 for decapping activation. *Cell Research*, 24(2), 233–246. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.152>
- Xing, W., Muhlrade, D., Parker, R., & Rosen, M. K. (2020). A quantitative inventory of yeast P-body proteins reveals principles of compositional specificity. *eLife*, 9, e56525. <https://doi.org/10.7554/eLife.56525>
- Yang, W. H., Jiang, H. Y., Gulick, T., Bloch, K. D., & Bloch, D. B. (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA*, 12(4), 547–554. <https://doi.org/10.1261/rna.2302706>
- Yoon, J. H., Choi, E. J., & Parker, R. (2010). Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 189(5), 813–827. <https://doi.org/10.1083/jcb.200912019>

8. BIBLIOGRAFÍA

- Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D. R., Bashkurov, M., Chen, G. I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S. W. M., Angers, S., Morris, Q., Fabian, M., Côté, J. F., & Gingras, A. C. (2018). High-Density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies. *Molecular Cell*, 69(3), 517-532.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.020>
- Zatreanu, D., Han, Z., Mitter, R., Tumini, E., Williams, H., Gregersen, L., Dirac-Svejstrup, A. B., Roma, S., Stewart, A., Aguilera, A., & Svejstrup, J. Q. (2019). Elongation factor TFIIS prevents transcription stress and R-Loop accumulation to maintain genome stability. *Molecular Cell*, 76(1), 57-69.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.037>
- Zhang, B., & Herman, P. K. (2020). It is all about the process(ing): P-body granules and the regulation of signal transduction. *Current Genetics*, 66(1), 73-77. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01016-3>
- Zhao, J., Hyman, L., & Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 405-445. <https://doi.org/10.1128/mmb.63.2.405-445.1999>
- Zid, B. M., & O'Shea, E. K. (2014). Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature*, 514(7520), 117-121. <https://doi.org/10.1038/nature13578>
- Zolotukhin, P., Lebedeva, U., Kuzminova, O., Korinfskaya, S., Chmykhalo, V.K., Makarenko, M., Tamberg, O.O., Tokarengo, M.R., Khrenkova, V.V., & Aleksandrova, A.A (2013). Ribonucleoprotein compartments of the eukaryotic cell. *Valeology*, 4(11), 1-11.

9. ANEXOS

TABLA 1.1S: Genes inducidos basalmente en ausencia de *PAT1*.

Se incluyen los genes cuyo *ratio* de expresión *pat1Δ*/WT es ≥ 2 . La función biológica fue asignada según la información disponible en la base de datos SGD.

	ORF	GEN	<i>pat1Δ</i> /WT	Función
1	YFL014W	<i>HSP12</i>	10,8	Chaperona
2	YDR034W-B		7,7	Desconocida
3	YLR142W	<i>PUT1</i>	6,6	Prolina oxidasa
4	YBR072W	<i>HSP26</i>	4,0	Chaperona
5	YPR160W	<i>GPH1</i>	4,0	Glicógeno fosforilasa
6	YHR087W	<i>RTC3</i>	3,9	Desconocida
7	YMR107W	<i>SPG4</i>	3,9	Supervivencia en la fase estacionaria
8	YEL039C	<i>CYC7</i>	3,8	Citocromo c2
9	YLR307W	<i>CDA1</i>	3,8	Quitina deacetilasa
10	YDL222C	<i>FMP45</i>	3,7	Implicada en el metabolismo de esfingolípidos
11	YGR248W	<i>SOL4</i>	3,7	Actividad 6-fosfogluconolactonasa
12	YGR110W	<i>CLD1</i>	3,5	Cardiolipín fosfolipasa
13	YER053C-A		3,5	Desconocida
14	YDR380W	<i>ARO10</i>	3,5	Fenil piruvato decarboxilasa
15	YLR281C		3,4	Desconocida
16	YLR312C	<i>ATG39</i>	3,3	Receptor de autofagia
17	YOL052C-A	<i>DDR2</i>	3,3	Respuesta a múltiples estreses
18	YGR088W	<i>CTT1</i>	3,2	Catalasa
19	YOR384W	<i>FRE5</i>	3,1	Ferri reductasa
20	YMR175W	<i>SIP18</i>	3,0	Hidrofilina de unión a fosfolípidos
21	YIL073C	<i>SPO22</i>	2,9	Sinapsis cromosómica
22	YKL026C	<i>GPX1</i>	2,8	Glutación peroxidasa
23	YKL178C	<i>STE3</i>	2,7	Receptor de feromonas
24	YBL029C-A		2,7	Desconocida
25	YOR065W	<i>CYT1</i>	2,7	Citocromo c1
26	YJL161W	<i>FMP33</i>	2,6	Desconocida
27	YMR322C	<i>HSP32; HSP33; SNO4</i>	2,6	Posible chaperona
28	YER067W	<i>RGI1</i>	2,6	Metabolismo respiratorio
29	YAL067C	<i>SEO1</i>	2,6	Permeasa
30	YNR034W-A		2,6	Desconocido
31	YEL011W	<i>GLC3</i>	2,6	Implicada en la acumulación de glicógeno
32	YPL230W	<i>USV1</i>	2,6	Factor de transcripción respuesta a estrés salino
33	YGR138C	<i>TPO2</i>	2,6	Transportador de poliaminas
34	YIL121W	<i>QDR2</i>	2,6	Confiere multiresistencia a drogas
35	YDR070C	<i>FMP16</i>	2,5	Desconocida
36	YFR015C	<i>GSY1</i>	2,5	Glicógeno sintasa
37	YBR147W	<i>RTC2</i>	2,5	Regulador de la transcripción
38	YPL223C	<i>GRE1</i>	2,5	Hidrofilina
39	YER150W	<i>SPI1</i>	2,44	GPI-CWP
40	YIL099W	<i>SGA1</i>	2,4	Glucamilasa implicada en la formación de la ascoespora
41	YOR289W		2,4	Desconocida
42	YBR117C	<i>TKL2</i>	2,4	Perteneciente a la ruta de las pentosas fosfato

ANEXO 1

43	YEL070W	<i>DSF1;YNR073C</i>	2,4	Manitol deshidrogenasa
44	YMR105C	<i>PGM2</i>	2,4	Fosfoglucomutasa. Metabolismo de hexosas
45	YFR017C	<i>IGD1</i>	2,4	Inhibición de la desramificación del glucógeno
46	YEL073C		2,3	Desconocida
47	YBR230W-A		2,3	Desconocida
48	YGR043C	<i>NQM1</i>	2,3	Desconocida
49	YHR022C-A		2,3	Desconocida
50	YKL151C		2,3	Desconocida
51	YDL169C	<i>UGX2</i>	2,3	Desconocida
52	YOL084W	<i>PHM7</i>	2,3	Desconocida
53	YGR032W	<i>GSC2</i>	2,3	B-1,3 glucán sintasa
54	YMR169C	<i>ALD3</i>	2,3	Aldehído deshidrogenasa
55	YER079W		2,3	Desconocida
56	YDR058C	<i>TGL2</i>	2,2	Triacilglicerol lipasa
57	YHR137W	<i>ARO9</i>	2,2	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos
58	YCL073C	<i>GEX1; GEX2</i>	2,2	Antiportador protón-glutación
59	YHR124W	<i>NDT80</i>	2,2	Factor de transcripción específico de meiosis
60	YDL181W	<i>INH1</i>	2,2	Inhibidor de la ATP-sintasa
61	YDL024C	<i>DIA3</i>	2,2	Desconocida
62	YDL204W	<i>RTN2</i>	2,2	Organización del retículo endoplasmático
63	YDR529C	<i>QCR7</i>	2,2	Citocromo-c reductasa
64	YIR039C	<i>YPS6</i>	2,2	Aspartil proteasa
65	YCR003W	<i>MRPL32</i>	2,1	Componente del ribosoma
66	YFL030W	<i>AGX1</i>	2,1	Alanina-glioxilato aminotransferasa
67	YCR104W	<i>PAU15;PAU16</i>	2,1	Implicada en la fermentación alcohólica
68	YDR342C	<i>HXT6; HXT7</i>	2,1	Transportador de glucosa
69	YBR019C	<i>GAL10</i>	2,1	Glucosa epimerasa
70	YNL133C	<i>FYV6</i>	2,1	Desconocida
71	YJL218W		2,1	Acetiltransferasa
72	YML128C	<i>MSC1</i>	2,1	Desconocida
73	YGR225W	<i>AMA1</i>	2,1	Ensamblaje de la pared de la espora
74	YPR094W	<i>RDS3</i>	2,1	Componente de snoRNP
75	YOR382W	<i>FIT2</i>	2,1	Retención de hierro por la pared celular
76	YMR250W	<i>GAD1</i>	2,1	Glutamato decarboxilasa
77	YLR004C	<i>THI73</i>	2,1	Permeasa
78	YKR092C	<i>SRP40</i>	2,1	Ensamblaje de los peroxisomas
79	YLR204W	<i>QRI5</i>	2,1	Proteína de la membrana interna de la mitocondria
80	YJR073C	<i>OPI3</i>	2,0	Síntesis de fosfatidilcolina
81	YOR178C	<i>GAC1</i>	2,0	Serín-treonín fosfatasa
82	YKL093W	<i>MBR1</i>	2,0	Función mitocondrial y respuesta a estrés
83	YCR020C	<i>PET18</i>	2,0	Desconocida
84	YOR383C	<i>FIT3</i>	2,0	Implicada en la retención de hierro
85	YNL194C		2,0	Implicada en esporulación
86	YMR174C	<i>PAI3</i>	2,0	Proteinasa citoplasmática
87	YHR033W		2,0	Desconocida

TABLA 1.2S: Genes reprimidos basalmente en ausencia de *PAT1*.

Se incluyen los genes cuyo *ratio* de expresión *pat1Δ*/WT es $\leq 0,5$. La función biológica fue asignada según la información disponible en la base de datos SGD.

	ORF	GEN	<i>pat1Δ</i> /WT	Función
1	YCR077C	<i>PAT1</i>	0,0	Activador del <i>decapping</i>
2	YBR093C	<i>PHO5</i>	0,1	Actividad fosfatasa
3	YBL101W-A		0,1	Retrotransposón
4	YHR094C	<i>HXT1</i>	0,2	Transportador de glucosa
5	YBL005W-A		0,2	Retrotransposón
6	YBR296C	<i>PHO89</i>	0,2	Transportador de fosfato
7	YDL039C	<i>PRM7</i>	0,3	Proteína regulada por feromonas
8	YDR281C	<i>PHM6</i>	0,3	Desconocida
9	YAR009C		0,3	Actividad DNA polimerasa
10	YCL064C	<i>CHA1</i>	0,3	Deaminasa
11	YDR261W-B		0,3	Retrotransposón
12	YBL101W-B		0,3	Retrotransposón
13	YJR047C	<i>ANB1</i>	0,4	Implicada en traducción
14	YAR071W	<i>PHO11; PHO12</i>	0,4	Actividad fosfatasa
15	YCL021W-A		0,4	Desconocida
16	YDR481C	<i>PHO8</i>	0,4	Actividad fosfatasa
17	YDR261C-D		0,4	Retrotransposón
18	YAR073W	<i>IMD2</i>	0,4	Desconocida
19	YJR153W	<i>PGU1</i>	0,4	Actividad poligalacturonasa
20	YGR035C		0,4	Desconocida
21	YOR192C-C		0,5	Desconocida
22	YPR194C	<i>OPT2</i>	0,5	Transportador de oligopéptidos
23	YER011W	<i>TIR1</i>	0,5	Manoproteína
24	YMR189W	<i>GCV2</i>	0,5	Subunidad del complejo mitocondrial glicina decarboxilasa
25	YER044C-A	<i>MEI4</i>	0,5	Proteína implicada en meiosis
26	YPR156C	<i>TPO3</i>	0,5	Transportador de poliaminas
27	YHR214C-E		0,5	Desconocida
28	YHR216W	<i>IMD2</i>	0,5	Inosina monofosfato dehidrogenasa
29	YLR108C		0,5	Desconocida
30	YBR150C	<i>TBS1</i>	0,5	Desconocida
31	YIL159W	<i>BNR1</i>	0,5	Formina
32	YMR173W	<i>DDR48</i>	0,5	Respuesta a daño en el DNA
33	YIL009W	<i>FAA3</i>	0,5	Sintetasa de ácidos grasos de cadena larga
34	YNL087W	<i>TCB2</i>	0,5	Proteína de retículo endoplasmático
35	YGL188C-A		0,50	Desconocida
36	YFR040W	<i>SAP155</i>	0,50	Proteína asociada a la fosfatasa Sit4
37	YCR005C	<i>CIT2</i>	0,50	Citrato sintasa

ANEXO 2

TABLA 2.1S: Genes inducidos en la cepa WT (BY4741) por RC (30 µg/ml) durante 2 horas.

Se incluyen aquellos genes cuyo *ratio* (+/- tratamiento) es ≥ 2 .

Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD

	ORF	GEN	WT RC / WT	Función
1	YKL163W	<i>PIR3</i>	23,9	Manoproteína PIR
2	YKL161C	<i>KDX1</i>	16,5	Serín treonín proteín quinasa
3	YHR209W	<i>CRG1</i>	10,9	Actividad metiltransferasa
4	YDR034W-B		9,3	Desconocida
5	YBR056W-A		8,5	Metabolismo del manganeso
6	YPL088W		7,7	Posible aril alcohol deshidrogenasa
7	YKR091W	<i>SRL3</i>	7,6	Represor del inicio de la transcripción
8	YLR194C		5,7	GPI-CWP
9	YLR121C	<i>YPS3</i>	5,3	GPI-CWP
10	YDR085C	<i>AFR1</i>	4,9	Morfogénesis celular en el proceso de <i>mating</i>
11	YOR134W	<i>BAG7</i>	4,9	Proteína activadora de GTPasas (GAP). Activa a Rho1
12	YJL107C		4,3	Desconocida
13	YMR316W	<i>DIA1</i>	4,2	Desconocida
14	YJL161W	<i>FMP33</i>	4,2	Desconocida
15	YIL117C	<i>PRM5</i>	4,1	Proteína regulada por feromonas
16	YGR032W	<i>GSC2</i>	4,0	B-1,3 glucán sintasa
17	YPR005C	<i>HAL1</i>	3,9	Implicada en la homeostasis de iones
18	YJL108C	<i>PRM10</i>	3,8	Proteína regulada por feromonas
19	YGR213C	<i>RTA1</i>	3,8	Resistencia a aminocolesterol
20	YIR039C	<i>YPS6</i>	3,7	Aspartil proteasa
21	YKR061W	<i>KTR2</i>	3,7	Biosíntesis de manoproteínas
22	YNR065C		3,5	Desconocida
23	YMR104C	<i>YPK2</i>	3,4	Serín-treonín proteín quinasa
24	YHR030C	<i>SLT2</i>	3,4	MAPK de la ruta de integridad celular
25	YDR055W	<i>PST1</i>	3,2	GPI-CWP
26	YOR306C	<i>MCH5</i>	3,2	Transporte de riboflavina
27	YLR327C	<i>TMA10</i>	3,1	Desconocida
28	YOL159C		3,1	Desconocida
29	YLR267W	<i>BOP2</i>	3,0	Desconocida
30	YOR208W	<i>PTP2</i>	2,9	Triosín fosfatasa
31	YAL053W	<i>FLC2</i>	2,9	Mantenimiento de la pared celular
32	YGL156W	<i>AMS1</i>	2,9	Degradación de oligosacáridos libres
33	YPR078C		2,9	Desconocida
34	YKL096W	<i>CWP1</i>	2,8	GPI-CWP
35	YPL067C		2,7	Desconocida
36	YCR073C	<i>SSK22</i>	2,7	Serín-treonín proteín quinasa

37	YBR295W	<i>PCA1</i>	2,7	ATPasa transportadora de cobre tipo P
38	YKR046C	<i>PET10</i>	2,6	Formación y estabilidad de gotas lipídicas
39	YBR005W	<i>RCR1</i>	2,6	Deposición de quitina de la pared celular
40	YNL058C		2,6	Desconocida
41	YLR414C	<i>PUN1</i>	2,6	Interviene en la integridad de la pared celular
42	YGR161C	<i>RTS3</i>	2,6	Componente del complejo fosfatasa tipo 2A
43	YBL078C	<i>ATG8</i>	2,6	Componente del autofagosoma
44	YIL023C	<i>YKE4</i>	2,5	Transportador de Zinc
45	YEL060C	<i>PRB1</i>	2,5	Proteinasa de la vacuola. Degradación de proteínas
46	YPL089C	<i>RLM1</i>	2,5	Factor de transcripción de la ruta de integridad
47	YDL130W-A	<i>STF1</i>	2,5	Regulación de la F1FO-ATP sintasa mitocondrial
48	YEL059C-A	<i>SOM1</i>	2,5	Maduración de proteínas del espacio intermembrana
49	YKL104C	<i>GFA1</i>	2,5	Biosíntesis de quitina
50	YOL016C	<i>CMK2</i>	2,4	Quinasa dependiente de calcio
51	YGL121C	<i>GPG1</i>	2,4	Regulación del crecimiento pseudohifal
52	YIL108W		2,4	Desconocida
53	YKL107W		2,4	Aldehído reductasa dependiente de NADH
54	YGR023W	<i>MTL1</i>	2,4	Posible metaloendopeptidasa
55	YLR120C	<i>YPS1</i>	2,3	Aspartil proteasa con anclaje GPI
56	YHL022C	<i>SP011</i>	2,3	Actividad endodeoxirribonucleasa
57	YNR066C		2,3	Desconocida
58	YJL155C	<i>FBP26</i>	2,3	Fructosa-2,6-bifosfatasa.
59	YDL169C	<i>UGX2</i>	2,3	Desconocida
60	YHR138C		2,2	Desconocida
61	YPL221W	<i>FLC1</i>	2,2	Biogénesis de la pared celular
62	YGR174W-A		2,2	Desconocida
63	YMR238W	<i>DFG5</i>	2,2	Necesaria para la polaridad y elongación celular
64	YOR220W	<i>RCN2</i>	2,2	Desconocida
65	YKR076W	<i>ECM4</i>	2,2	Organización de la pared celular
66	YLR054C	<i>OSW2</i>	2,2	Posible papel en la biogénesis de la pared de la espora
67	YMR008C	<i>PLB1</i>	2,2	Fosfolipasa B
68	YMR315W-A		2,2	Desconocida
69	YJR008W	<i>MHO1</i>	2,2	Desconocida
70	YDL110C	<i>TMA17</i>	2,2	Subunidad reguladora y de la ácido-graso sintasa
71	YBR203W	<i>COS111</i>	2,2	Resistencia a ciclopiroxina
72	YGR189C	<i>CRH1</i>	2,2	Transglicosidasa
73	YNL093W	<i>YPT53</i>	2,2	Endocitosis y transporte de proteínas a la vacuola
74	YKR053C	<i>YSR3</i>	2,1	Metabolismo de esfingolípidos

ANEXO 2

75	YCR100C		2,1	Proteína implicada en la clasificación de proteínas
76	YDR380W	<i>ARO10</i>	2,1	Fenilpiruvato decarboxilasa
77	YEL058W	<i>PCM1</i>	2,1	N-acetilglucosamina-fosfato mutasa
78	YHR097C		2,1	Endocitosis mediada por clatrina
79	YLR031W		2,1	Desconocida
80	YPL110C	<i>GDE1</i>	2,1	Glicerolfosfolina fosfodiesterasa
81	YGR097W	<i>ASK10</i>	2,1	Componente de la RNA polimerasa II
82	YOR137C	<i>SIA1</i>	2,0	Activación de Pma1 por glucosa
83	YCR104W	<i>PAU15;PAU16;</i>	2,0	Implicada en la fermentación alcohólica
84	YLR149C		2,0	Sustrato del complejo GID (<i>Glucose-induced degradation deficient</i>)
85	YGL230C		2,0	Desconocida
86	YLR415C		2,0	Desconocida
87	YPL057C	<i>SUR1</i>	2,0	Biosíntesis de esfingolípidos

TABLA 2.2S: Genes reprimidos en la cepa WT (BY4741) por RC (30 µg/ml) durante 2 horas. Se incluyen aquellos genes cuyo *ratio* (+/- tratamiento) es $\leq 0,5$.

Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD.

	ORF	GEN	WT RC/ WT	Función
1	YKL103C	<i>APE1</i>	0,4	Aminopeptidasa vacuolar
2	YMR006C	<i>PLB2</i>	0,4	Fosfolipasa B
3	YPR156C	<i>TPO3</i>	0,4	Transportador de poliaminas
4	YJL212C	<i>OPT1</i>	0,5	Transportador de protones
5	YGR271C-A	<i>EFG1</i>	0,5	Implicado en la biogénesis del ribosoma

TABLA 3.1S: Agrupación de los genes inducidos por RC (30 µg/ml, 2 h) en la cepa silvestre (BY4741) respecto a su dependencia de *PAT1*.

Se incluyen los ORFs cuya activación por RC en la cepa WT es ≥ 2 , y se clasifican como:

- Grupo 1: genes cuya activación transcripcional depende de *PAT1*.
- Grupo 2: genes cuya inducción es independiente de *PAT1* durante el tratamiento por RC.
- Grupo 3: genes regulados basalmente por *PAT1*.

Estos grupos se han establecido en base al análisis de datos descrito en *Materiales y Métodos* y en *Resultados* de este trabajo.

Grupo 1: Genes cuya activación transcripcional depende de *Pat1*

	ORF	GEN	WT RC/ WT	<i>pat1</i> Δ RC/ <i>pat1</i> Δ	<i>pat1</i> Δ / WT	Función
1	YKL163W	<i>PIR3</i>	23,9	3,1	1,8	Manoproteína PIR
2	YKL161C	<i>KDX1</i>	16,5	6,3	1,0	Serín treonín proteín quinasa
3	YHR209W	<i>CRG1</i>	10,9	3,7	1,1	Actividad metiltransferasa
4	YPL088W		9,3	2,0	0,9	Posible aril alcohol deshidrogenasa
5	YKR091W	<i>SRL3</i>	8,5	5,3	0,8	Represor del inicio de la transcripción
6	YLR194C		7,7	2,9	1,3	GPI-CWP
7	YLR121C	<i>YPS3</i>	7,6	2,6	0,8	GPI-CWP
8	YDR085C	<i>AFR1</i>	5,7	3,2	1,1	Morfogénesis celular en el proceso de <i>mating</i>
9	YOR134W	<i>BAG7</i>	5,3	1,3	1,6	Proteína activadora de GTPasas (GAP). Activa a Rho1
10	YJL107C		4,9	2,1	1,0	Desconocida
11	YJL161W	<i>FMP33</i>	4,9	1,8	2,6	Desconocida
12	YGR032W	<i>GSC2</i>	4,3	2,2	2,3	B-1,3 glucán sintasa
13	YPR005C	<i>HAL1</i>	4,2	2,3	1,2	Implicada en la homeostasis de iones
14	YJL108C	<i>PRM10</i>	4,2	2,4	0,9	Proteína regulada por feromonas
15	YGR213C	<i>RTA1</i>	4,1	1,5	1,3	Resistencia a aminocolesterol
16	YIR039C	<i>YPS6</i>	4,0	1,5	2,2	Aspartil proteasa
17	YKR061W	<i>KTR2</i>	3,9	1,9	1,2	Biosíntesis de manoproteínas
18	YNR065C		3,8	1,3	0,9	Desconocida
19	YMR104C	<i>YPK2</i>	3,8	2,1	1,1	Serín-treonín proteín quinasa
20	YDR055W	<i>PST1</i>	3,7	1,9	1,0	GPI-CWP
21	YOR306C	<i>MCH5</i>	3,7	1,6	1,3	Transporte de riboflavina
22	YLR327C	<i>TMA10</i>	3,5	1,3	1,9	Desconocida
23	YOL159C		3,4	1,9	0,9	Desconocida
24	YLR267W	<i>BOP2</i>	3,4	1,1	1,3	Desconocida
25	YOR208W	<i>PTP2</i>	3,2	1,9	0,9	Triosín fosfatasa
26	YGL156W	<i>AMS1</i>	3,2	1,5	1,0	Degradación de oligosacáridos libres

ANEXO 3

27	YPR078C		3,1	1,5	0,7	Desconocida
28	YPL067C		3,1	1,7	0,7	Desconocida
29	YCR073C	<i>SSK22</i>	3,0	1,5	1,1	Serín-treonín proteín quinasa
30	YBR295W	<i>PCA1</i>	2,9	1,6	0,9	ATPasa transportadora de cobre
31	YGR161C	<i>RTS3</i>	2,9	1,7	0,9	Componente del complejo fosfatasa
32	YIL023C	<i>YKE4</i>	2,9	1,7	0,7	Transportador de Zinc
33	YEL060C	<i>PRB1</i>	2,9	1,6	1,0	Proteinasa de la vacuola. Degradación de proteínas
34	YDL130W-A	<i>STF1</i>	2,8	1,4	1,3	Regulación de la F1FO-ATP sintasa mitocondrial
35	YEL059C-A	<i>SOM1</i>	2,7	1,6	1,2	Maduración de proteínas del espacio intermembrana
36	YIL108W		2,7	1,3	1,1	Desconocida
37	YKL107W		2,7	1,5	1,0	Aldehído reductasa dependiente de NADH
38	YGR023W	<i>MTL1</i>	2,6	1,4	0,9	Posible metaloendopeptidasa
39	YHL022C	<i>SPO11</i>	2,6	1,4	0,6	Actividad endodeoxirribonucleasa
40	YNR066C		2,6	1,6	0,7	Desconocida
41	YJL155C	<i>FBP26</i>	2,6	1,5	1,1	Fructosa-2,6-bifosfatasa.
42	YPL221W	<i>FLC1</i>	2,6	1,2	1,1	Biogénesis de la pared celular
43	YGR174W-A		2,6	1,0	1,1	Desconocida
44	YKR076W	<i>ECM4</i>	2,5	1,6	1,2	Organización de la pared celular
45	YMR315W-A		2,5	1,5	0,9	Desconocida
46	YDL110C	<i>TMA17</i>	2,5	1,2	1,3	Subunidad reguladora y de la ácido-graso sintasa
47	YBR203W	<i>COS111</i>	2,5	1,6	1,1	Resistencia a ciclopiroxina
48	YGR189C	<i>CRH1</i>	2,5	1,6	1,0	Transglucosidasa
49	YKR053C	<i>YSR3</i>	2,5	1,2	1,0	Metabolismo de esfingolípidos
50	YCR100C		2,4	1,3	1,3	Proteína implicada en la clasificación de proteínas
51	YHR097C		2,4	1,4	1,0	Proteína implicada en la endocitosis mediada por clatrina
52	YLR031W		2,4	1,3	0,6	Desconocida
53	YOR137C	<i>SIA1</i>	2,4	1,4	1,2	Implicada en la activación de Pma1 por glucosa
54	YLR149C		2,4	1,1	1,4	Sustrato del complejo GID (<i>Glucose-induced degradation deficient</i>)
55	YPL110C	<i>GDE1</i>	2,3	1,7	0,5	Glicerofosfolina fosfodiesterasa
56	YPL057C	<i>SUR1</i>	2,3	1,5	0,9	Biosíntesis de esfingolípidos

Grupo 2: Genes cuya activación transcripcional es independiente de Pat1

	ORF	GEN	WT RC/ WT	<i>pat1Δ</i> RC/ <i>pat1Δ</i>	<i>pat1Δ</i> / WT	Función
1	YBR056W-A		8,5	6,0	1,3	Regulación de manganeso
2	YMR316W	<i>DIA1</i>	4,2	3,7	1,0	Desconocida
3	YIL117C	<i>PRM5</i>	4,1	3,6	0,7	Proteína regulada por feromonas
4	YHR030C	<i>SLT2</i>	3,4	2,6	0,9	MAPK de la ruta de integridad
5	YAL053W	<i>FLC2</i>	2,9	2,2	0,9	Mantenimiento de la pared
6	YKL096W	<i>CWP1</i>	2,8	2,5	0,8	GPI-CWP
7	YBR005W	<i>RCR1</i>	2,6	2,4	1,0	Deposición de quitina en la pared
8	YNL058C		2,6	2,3	1,0	Desconocida
9	YLR414C	<i>PUN1</i>	2,6	2,1	1,0	Interviene en la integridad de la pared
10	YBL078C	<i>ATG8</i>	2,6	1,2	1,2	Componente del autofagosoma
11	YPL089C	<i>RLM1</i>	2,5	2,3	0,9	Factor de transcripción de la ruta de integridad
12	YKL104C	<i>GFA1</i>	2,5	1,8	0,8	Biosíntesis de quitina
13	YOL016C	<i>CMK2</i>	2,4	2,6	1,1	Quinasa dependiente de calcio
14	YGL121C	<i>GPG1</i>	2,4	2,3	1,2	Regulación del crecimiento pseudohifal
15	YLR120C	<i>YPS1</i>	2,3	1,7	1,0	Aspartil proteasa
16	YMR238W	<i>DFG5</i>	2,2	1,7	1,0	Necesaria para la polaridad y elongación celular
17	YMR008C	<i>PLB1</i>	2,2	1,7	1,3	Fosfolipasa B
18	YJR008W	<i>MHO1</i>	2,2	1,7	1,3	Desconocida
19	YNL093W	<i>YPT53</i>	2,2	1,9	1,7	Endocitosis y transporte de proteínas a la vacuola
20	YEL058W	<i>PCM1</i>	2,1	1,9	1,0	N-acetilglucosamina-fosfato mutasa
21	YGR097W	<i>ASK10</i>	2,1	2,0	0,7	Componente de la RNA polimerasa II
22	YLR415C		2,0	1,8	1,4	Desconocida

Grupo 3: Genes regulados basalmente por Pat1

	ORF	GEN	WT RC/ WT	<i>pat1Δ</i> RC/ <i>pat1Δ</i>	<i>pat1Δ</i> / WT	Función
1	YDR034W-B		9,3	1,0	7,7	Desconocida
2	YKR046C	<i>PET10</i>	2,7	1,5	1,9	Formación y estabilidad de gotas lipídicas
3	YDL169C	<i>UGX2</i>	2,3	1,2	2,3	Desconocida
4	YHR138C		2,2	1,1	1,8	Desconocida
5	YOR220W	<i>RCN2</i>	2,2	1,3	1,9	Desconocida

ANEXO 3

6	YLR054C	OSW2	2,2	1,2	1,7	Posible papel en la biogénesis de la pared de la espora
7	YDR380W	ARO10	2,1	1,3	3,5	Fenilpiruvato decarboxilasa
8	YCR104W	PAU15; PAU16;	2,0	1,2	2,1	Implicada en la fermentación alcohólica
9	YGL230C		2,0	0,9	1,6	Desconocida

TABLA 4.1S: Comparativa de la respuesta transcripcional a RC Pat1-dependiente respecto a la observada en los mutantes *swi3Δ*, *gcn5Δ* y *rlm1Δ*.

Se incluyen los genes clasificados como dependientes de Pat1, (Anexo 3, Grupo 1), y las columnas *swi3ΔRC/swi3Δ*, *gcn5ΔRC/gcn5Δ* y *rlm1ΔRC/rlm1Δ*, se indica si la expresión del gen correspondiente se encuentra inducido (o) o si su inducción transcripcional se encuentra afectada en el mutante correspondiente respecto a los valores de la cepa silvestre (●). Los genes de los que no se dispone de dato y aquellos cuya expresión basal se encuentra afectada en el mutante correspondiente aparecen marcados como (-) y (◇), respectivamente.

La comparativa se ha realizado a partir de datos de *microarrays* de los mutantes *pat1Δ*, *swi3Δ*, *gcn5Δ* y *rlm1Δ* tratados con RC (30 µg/ml) durante los tiempos de 2, 3 y 4 horas respectivamente.

	GEN	ORF	<i>swi3Δ</i> RC/ <i>swi3Δ</i>	<i>gcn5Δ</i> RC/ <i>gcn5Δ</i>	<i>rlm1Δ</i> RC/ <i>rlm1Δ</i>	Función
1	YKL163W	<i>PIR3</i>	●	●	●	Manoproteína PIR
2	YKL161C	<i>KDX1</i>	●	●	●	Serín treonín proteín quinasa
3	YHR209W	<i>CRG1</i>	●	●	●	Actividad metiltransferasa
4	YPL088W		●	●	●	Posible aril alcohol deshidrogenasa
5	YKR091W	<i>SRL3</i>	●	○	●	Represor del inicio de la transcripción
6	YLR194C		●	○	●	GPI-CWP
7	YLR121C	<i>YPS3</i>	●	○	●	GPI-CWP
8	YDR085C	<i>AFR1</i>	●	○	●	Morfogénesis celular en el proceso de <i>mating</i>
9	YOR134W	<i>BAG7</i>	●	●	●	Proteína activadora de GTPasas (GAP). Activa a Rho1
10	YJL107C		●	○	●	Desconocida
11	YJL161W	<i>FMP33</i>	●	●	●	Desconocida
12	YGR032W	<i>GSC2</i>	●	●	●	β-1,3 glucán sintasa
13	YPR005C	<i>HAL1</i>	●	●	●	Implicada en la homeostasis de iones
14	YJL108C	<i>PRM10</i>	●	●	●	Proteína regulada por feromonas
15	YGR213C	<i>RTA1</i>	●	●	●	Resistencia a aminocolesterol
16	YIR039C	<i>YPS6</i>	●	●	●	Aspartil proteasa
17	YKR061W	<i>KTR2</i>	●	●	●	Biosíntesis de manoproteínas
18	YNR065C		●	●	●	Desconocida
19	YMR104C	<i>YPK2</i>	●	●	●	Serín-treonín proteín quinasa
20	YDR055W	<i>PST1</i>	○	○	●	GPI-CWP
21	YOR306C	<i>MCH5</i>	●	●	●	Transporte de riboflavina
22	YLR327C	<i>TMA10</i>	◇	○	●	Desconocida
23	YOL159C		●	○	●	Desconocida
24	YLR267W	<i>BOP2</i>	●	●	●	Desconocida
25	YOR208W	<i>PTP2</i>	●	○	●	Triosín fosfatasa
26	YGL156W	<i>AMS1</i>	●	○	●	Degradación de oligosacáridos libres
27	YPR078C		●	●	○	Desconocida
28	YPL067C		●	○	●	Desconocida
29	YCR073C	<i>SSK22</i>	◇	○	●	Serín-treonín proteín quinasa
30	YBR295W	<i>PCA1</i>	●	●	●	ATPasa transportadora de cobre
31	YGR161C	<i>RTS3</i>	◇	●	●	Componente del complejo fosfatasa
32	YIL023C	<i>YKE4</i>	●	●	●	Transportador de Zinc

ANEXO 4

33	YEL060C	<i>PRB1</i>	◊	●	○	Proteinasa de la vacuola. Degradación de proteínas
34	YDL130W-A	<i>STF1</i>	●	-	●	Regulación de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial
35	YEL059C-A	<i>SOM1</i>	-	●	-	Maduración de proteínas del espacio intermembrana
36	YIL108W		●	●	●	Desconocida
37	YKL107W		●	○	●	Aldehído reductasa dependiente de NADH
38	YGR023W	<i>MTL1</i>	◊	-	●	Posible metaloendopeptidasa
39	YHL022C	<i>SPO11</i>	●	●	●	Actividad endonucleasa
40	YNR066C		●	-	●	Desconocida
41	YJL155C	<i>FBP26</i>	●	●	●	Fructosa-2,6-bisfosfatasa.
42	YPL221W	<i>FLC1</i>	●	●	●	Biogénesis de la pared celular
43	YGR174W-A		●	●	●	Desconocida
44	YKR076W	<i>ECM4</i>	-	-	-	Organización de la pared celular
45	YMR315W-A		●	●	○	Desconocida
46	YDL110C	<i>TMA17</i>	-	-	-	Subunidad reguladora y de la ácido-graso sintasa
47	YBR203W	<i>COS111</i>	◊	-	●	Resistencia a ciclopiroxina
48	YGR189C	<i>CRH1</i>	◊	○	●	Transglucosidasa
49	YKR053C	<i>YSR3</i>	●	●	○	Metabolismo de esfingolípidos
50	YCR100C		●	●	●	Proteína implicada en la clasificación de proteínas
51	YHR097C		●	●	●	Proteína implicada en la endocitosis mediada por clatrina
52	YLR031W		○	●	●	Desconocida
53	YOR137C	<i>SIA1</i>	●	-	●	Implicada en la activación de Pma1 por glucosa
54	YLR149C		◊	-	●	Sustrato del complejo GID (<i>Glucose-induced degradation deficient</i>)
55	YPL110C	<i>GDE1</i>	●	○	●	Glicerofosfolina fosfodiesterasa
56	YPL057C	<i>SUR1</i>	●	-	●	Biosíntesis de esfingolípidos

SCIENTIFIC REPORTS

Corrected: Author Correction

OPEN

Signalling through the yeast MAPK Cell Wall Integrity pathway controls P-body assembly upon cell wall stress

Raúl García¹, Verónica Pulido¹, Sara Orellana-Muñoz², César Nombela¹, Carlos R. Vázquez de Aldana¹, José M. Rodríguez-Peña¹ & Javier Arroyo¹

Post-transcriptional control of mRNA is a key event in the regulation of gene expression. From yeast to human cells, P-bodies are cytoplasmic RNA-protein aggregates that play an essential role in this process, particularly under stress conditions. In this work, we show that in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall stress induces the formation of these structures. This effect is dependent on multiple elements in the Cell Wall Integrity (CWI) MAPK signalling pathway, a signal transduction cascade responsible for the maintenance of cell integrity under adverse environmental conditions. Remarkably, P-body assembly requires the catalytic activity of the MAPK of the pathway, Slt2/Mpk1. In accordance with the control exerted by this signalling pathway, the timing of P-body formation is similar to that of the activation of the CWI pathway. Noticeably, mRNAs whose expression is regulated by this pathway localize in P-bodies after the cell is exposed to stress following a temporal pattern coincident with CWI pathway activation. Moreover, when these mRNAs are overexpressed in a mutant background unable to form visible P-bodies, the cells show hypersensitivity to agents that interfere with cell wall integrity, supporting that they play a role in the mRNA lifecycle under stress conditions.

In eukaryotic cells, post-transcriptional control of mRNA is an important mechanism for the regulation of gene expression. In this process, the specific localization and compartmentalization of mRNAs within the cytoplasm plays a key role¹. The model yeast *Saccharomyces cerevisiae* has become an ideal system for studying these conserved cellular processes. In this context, a variety of cytoplasmic ribonucleoprotein (RNP) aggregates have been identified, the best characterized of which are processing bodies (P-bodies) and stress granules (SGs)^{2–6}. It has been proposed that P-bodies contain translationally repressed mRNAs in combination with proteins involved in mRNA degradation, including subunits of the deadenylase CCR4/POP2/NOT complex, the decapping enzyme (Dcp1/Dcp2), the decapping activator Edc3 and the Lsm1-7 complex, the translation repressors and decapping activators Scd6, Dhh1 and Pat1, and the 5'-3' exonuclease Xrn1 (for further details see⁷). Regarding the functions of P-bodies, these structures show an inverse relationship with translation, since trapping mRNA in polysomes due to the inhibition of translation elongation leads to the dissociation of P-bodies, in contrast to the stimulation of the assembly observed when the translation initiation is blocked⁸. These observations suggest that these foci participate in mRNA decay. However, yeast cells defective in P-body formation are not defective in basal control of translation repression and mRNA decay⁹. Moreover, recent data support a model in which P-bodies act as storage granules containing translationally repressed mRNAs and inactive decapping enzymes, while mRNA decay would take place throughout the cytoplasm¹⁰.

These cytoplasmic aggregates are highly dynamic, since in yeast cells grown in conditions of glucose starvation and subsequent refeeding, at least some mRNAs can leave P-bodies to reenter translation, being postulated as sites for transient mRNA storage^{11,12}. In contrast, the SGs in yeast are considered aggregates of untranslating mRNAs in conjunction with certain translation initiation factors and other RNA binding proteins such as Pab1, Pub1 or

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, IRYCIS, Madrid, 28040, Spain. ²Instituto de Biología Funcional y Genómica, IBFG-CSIC. Universidad de Salamanca, Salamanca, 37007, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.R.-P. (email: josemanu@ucm.es)

Pbp1^{4,5}. This explains why SGs are typically associated to stress conditions, which often involve a transient inhibition of translation initiation. Noticeably, in yeast, these granules are formed in a stress-dependent fashion^{4,5,13,14}. In sum, several observations support the so-called mRNA cycle where cytoplasmic mRNAs cycle between polysomes, P-bodies and SGs^{6,7}. This dynamic behaviour is favoured by the properties of liquid droplets exhibited by these structures¹⁵. P-body assembly is strongly induced in response to several stress conditions, such as glucose deprivation, osmotic, oxidative and DNA replication stress, heat or exposure to UV light, ethanol or NaN₃^{8,16,17}. This suggests that P-body aggregates would play a role under environmental stress conditions. Under hyperosmotic stress conditions, formation of P-bodies was substantially reduced in the short-term in yeast mutant strains lacking the mitogen-activated protein kinase (MAPK) of the High Osmolarity Glycerol MAPK pathway (HOG), Hog1^{8,18}. Additionally, the Protein Kinase A (PKA) pathway, a key effector of glucose signalling in yeast, plays a general role in the regulation of P-body formation. In fact, constitutive PKA signalling inhibits P-body formation under a variety of stress conditions, and PKA activity inhibition is sufficient to induce P-body formation in non-stressed cells^{17,19}. However, apart from these examples, the participation of signalling pathways associated to stress responses in the process of P-body assembly is largely uncharacterized.

The conservation of P-bodies from yeast to mammals suggests that they play important roles in the metabolism of eukaryotic mRNAs, especially under stress conditions. Remarkably, SGs and P-Bodies are closely associated with a variety of diseases, including neurodegenerative disorders²⁰ and cancer²¹. Thus, information obtained from model organisms, such as yeast, is very useful when conducting mechanistic and functional analyses of the behaviour of these RNPs granules in higher organisms.

The Cell Wall Integrity (CWI) pathway is one of the MAPK pathways in yeast, being the main route responsible for maintaining cell wall homeostasis²². This pathway is very well conserved in the fungal kingdom²³. When cell wall integrity is compromised, several cell membrane proteins (Mid2, Wsc1-3, and Mtl1) act as sensors of the damage and interact with the Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) Rom2, activating the small GTPase Rho1, which in turn activates the yeast protein kinase C (Pkc1). Pkc1 triggers the activity of a conserved MAPK module by phosphorylating the MAPKKK Bck1, which stimulates the redundant pair of MAPKKs Mkk1 and Mkk2, which finally phosphorylate and activate the MAPK Slt2/Mpk1. Ultimately, Slt2 induces damage-specific transcriptional responses mainly through the Rlm1 transcription factor^{22,24} in collaboration with the SWI/SNF and SAGA chromatin remodelling complexes^{25,26}. Additionally, Slt2 has been involved in other Rlm1-independent functions as in the regulation of genes during G1/S transition of the mitotic cell cycle²⁷, the regulation of the silencing function that couples cell growth and lifespan²⁸ or the control of proteasoma abundance upon various stresses²⁹.

Genome-wide transcriptional analysis of yeast mutant strains deleted in different elements of CWI have allowed the identification of differences in the regulatory mechanisms required for sensing the different stresses (for a review see³⁰). For example, Congo red-mediated damage is sensed through the Mid2 sensor, whereas in the case of the enzymatic cocktail known as zymolyase damage is sensed through Hkr1, the sensor of the Sho1 branch of the high-osmolarity glycerol (HOG) pathway, and the effect of caspofungin, an inhibitor of β -1,3-glucan synthase, is sensed through Wsc1.

The CWI pathway is the key pathway for the regulation of the adaptive response that is elicited by the fungal cell under conditions that damage the cell wall, mainly inducing a transcriptional program to counterbalance cell wall stress situations³⁰. However, little is known about the post-transcriptional regulatory events associated with this response.

In this work, we have demonstrated that when the yeast cell wall integrity is compromised, the formation of P-bodies is intensively promoted. Moreover, the assembly of these structures depends on signalling through the CWI pathway and, ultimately, on the kinase activity of the MAPK of this route. In addition, prototypic mRNAs whose expression is regulated by this route upon cell wall stress have been colocalized with P-bodies. In fact, the temporal pattern of formation of these structures, as well as the appearance of mRNA granules, mimics the activation of the CWI pathway under cell wall damage conditions. Additionally, we have shown that overexpression of some CWI-dependent mRNAs is toxic to P-body defective cells. Together, our results provide the first evidence that the response to cell wall damage not only activates a specific transcriptional program, but also regulates post-transcriptionally the cell wall-related mRNAs fate.

Results and Discussion

Cell wall stress induces P-body formation. In order to investigate whether cell wall stress induces P-body foci formation, we primarily used GFP-tagged versions of two well-established reporters of P-body assembly: Dcp2 and Pat1. Wild-type cells were transformed individually with plasmids bearing these reporters and grown for one hour in the presence or absence of two compounds that interfere with cell wall integrity through different mechanisms of action. We used Congo red (CR), a dye that binds to chitin, and zymolyase (ZY), an enzymatic cocktail containing predominant β -1,3-glucanase activity, since the transcriptional responses elicited by exposure to these compounds have been extensively characterized in yeast^{31–33}. The microscopic observation of Dcp2-GFP and Pat1-GFP expressing cells showed that cell wall stress strongly induced the assembly of P-bodies, both in terms of the number of cells in which P-bodies were observed and the number of foci per cell (Fig. 1a). As expected, this effect was also observed in cells expressing Dcp2-GFP after their exposition to other stress conditions (glucose starvation and presence of KCl or H₂O₂) previously associated to P-body formation (Fig. 1a upper panel). To further confirm the association between cell wall stress and P-body formation, the same experiments were performed using the *pat1* Δ mutant and the *edc3* Δ *pat1* Δ double mutant, previously described as defective in P-body formation^{5,19}. As shown in Fig. 1b, Dcp2-GFP-containing granules after cell wall stress were drastically reduced in the *pat1* Δ strain and completely absent in the *edc3* Δ *pat1* Δ mutant. It is important to note that in the microscopy images showing CR treated cells (Figs 1–5), many cells show some fluorescence signal at the mother-bud neck. This signal exhibits a localization pattern different to that corresponding to P-bodies and it



Figure 1. Formation of P-bodies is induced by cell wall stress. (a) Wild-type (WT) cells transformed with plasmids expressing a GFP-tagged version of Dcp2 or Pat1 growing in YPD were exposed to 30 μ g/ml Congo red (CR) or 0.8 U/ml zymolyase (ZY) for one hour (lower panel) or 1 M KCl, 3 mM H₂O₂ and absence of glucose for 15 min (upper panel). P-body formation was then assessed using fluorescence microscopy. (b) P-body formation was studied using the Dcp2-GFP reporter in WT, *pat1* Δ and *edc3* Δ *pat1* Δ cells grown as indicated above. (c) Stress granule formation was not influenced by cell wall stress. WT cells expressing either Pub1-mCherry or Pab1-GFP were treated with CR and ZY as described in a, and with 15% ethanol for 30 minutes before being observed by fluorescence microscopy. The microscopy data are presented in the left panels and the quantitation of the results in the right panels. Non-treated cells are also included in each experiment as a control (–). The histograms show the number of P-bodies per 100 cells and the percentage of cells containing P-bodies. The data reflect the average and SD values obtained from three independent experiments (n > 100 cells). Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's *t* test by comparing with no treatment conditions (a) or with the corresponding CR or ZY data from the wild-type strain (b) (**P* ≤ 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001). Scale bar, 5 μ m.

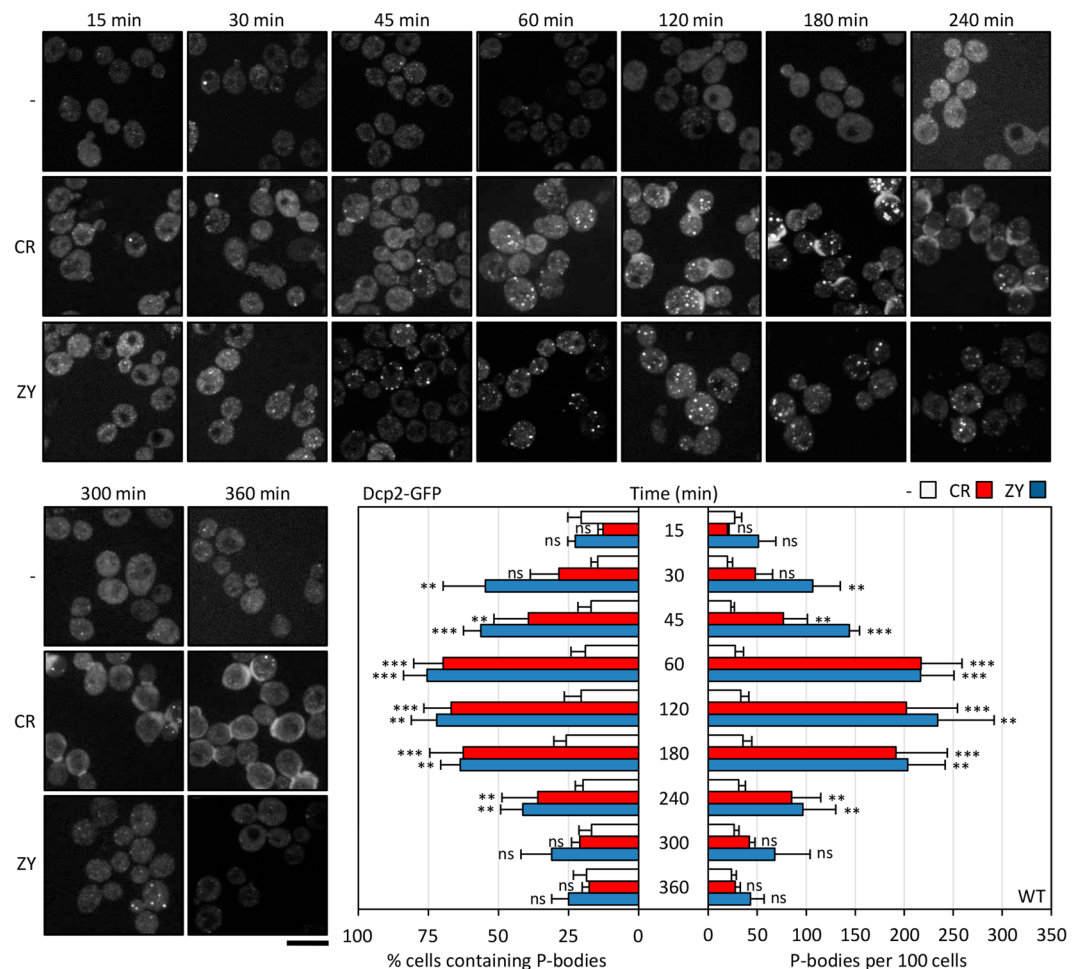


Figure 2. Time course of P-bodies formation in wild-type cells after cell wall stress. Wild-type (WT) cells expressing Dcp2-GFP as a P-body marker were treated with 30 µg/ml CR or 0.8 U/ml ZY and, in addition to the untreated control, were visualized by fluorescence microscopy at the times indicated. Scale bar, 5 µm. The histograms show the number of P-bodies per 100 cells and the percentage of cells containing P-bodies. The data reflect the average and SD values obtained from three independent experiments ($n > 100$ cells). Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's t test by comparing with no treatment conditions for each time (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; ns, not significant).

is a consequence of the CR fluorescence³⁴. Although CR emission is detected in the red channel, after prolonged incubation of the cells with CR, such as the conditions used in this work, a strong accumulation of the dye occurs at the surface regions with higher chitin content (CR binds to this cell wall polymer), like the septum between the mother and daughter cells. This signal is weakly detected in the green channel used to visualize GFP.

Since the assembly of SGs (another type on RNP granule) has been associated with particular stress conditions, we investigated whether SGs were formed under cell wall stress conditions. To achieve this, we monitored the intracellular localization of two components of SGs fused to fluorescent proteins, Pub1-mCherry and Pab1-GFP. Contrary to the P-body experiment, we only detected a diffuse fluorescence signal distributed throughout the cytoplasm, which never concentrated in discrete foci (Fig. 1c). However, the same cells grown in the presence of 15% ethanol for 30 minutes efficiently formed SGs, as previously reported¹⁷(Fig. 1c).

In contrast to many other environmental stresses that activate rapid cellular responses, cell wall stress triggers in yeast a more delayed adaptive response after exposure. Thus, we monitored P-body formation at different times during a time-course experiment (15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes) after CR or ZY treatment in wild-type cells expressing Dcp2-GFP. As shown in Fig. 2, the P-body formation profile was very similar in response to both cell wall damaging agents. After 15–30 minutes of treatment, Dcp2-GFP-containing foci started to increase in comparison with non-treated cells, reaching a peak after one to three hours of exposure. After this period, the percentage of cells showing detectable P-bodies, as well as the total number of foci, diminished progressively to values comparable to those observed in unstressed cells (Fig. 2). Notably, the timing of P-body formation was similar to the global profile of Slt2 phosphorylation, the MAPK of the CWI pathway, in response to cell wall stress, previously described^{31,35}. It is important to remark that our results support the existence of a very fine temporal regulation of the formation of P-bodies through different signalling pathways, depending on each type of stress and the specific cellular requirements under these conditions. In fact, the absence of glucose

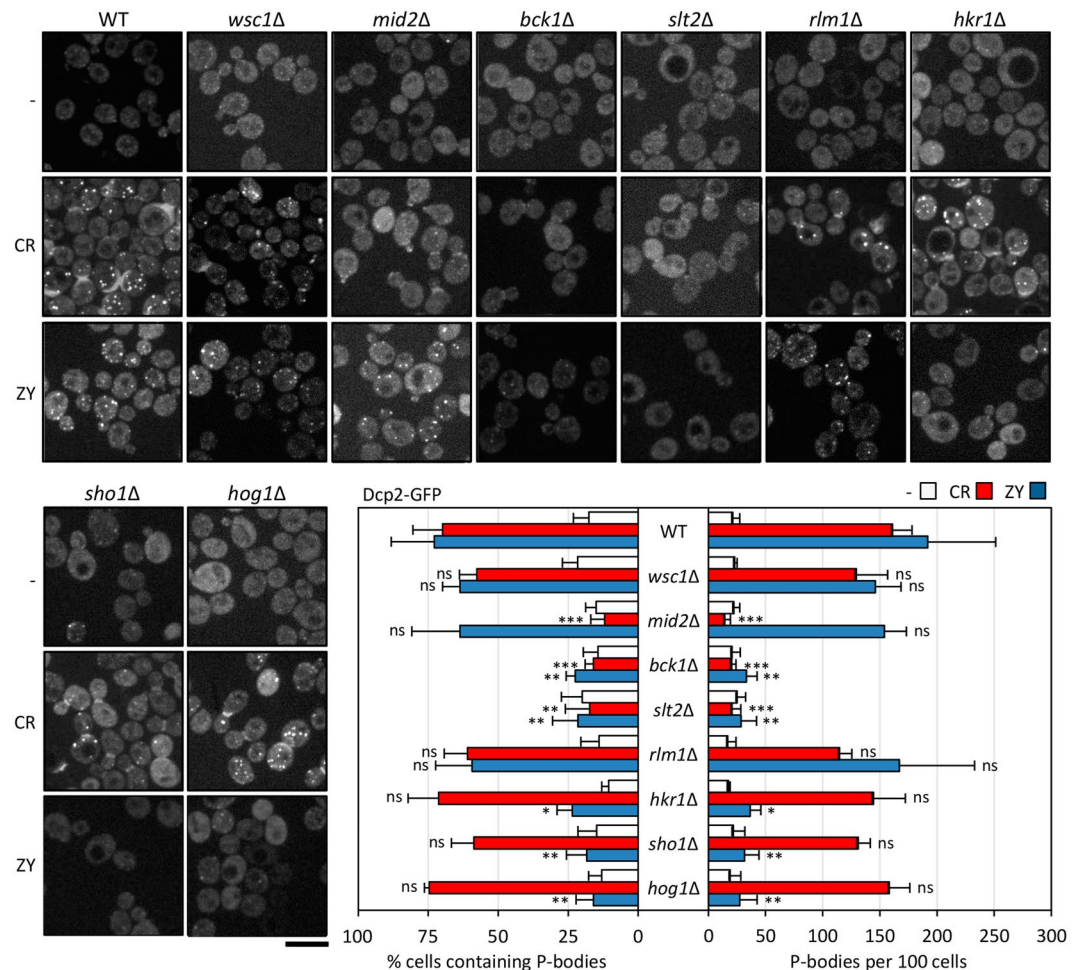


Figure 3. The CWI pathway controls P-body formation under cell wall stress. The wild-type strain (WT) and the indicated mutant strains transformed with the plasmid expressing Dcp2-GFP growing exponentially were treated with CR or ZY for one hour, as described in Fig. 1, and Dcp2-GFP containing granules were visualized by fluorescence microscopy. Quantitation of P-bodies from three independent experiments is included in the graph as described in Fig. 1. Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's *t* test by comparing with the corresponding CR or ZY data from the wild-type strain (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; ns, not significant). Scale bar, 5 μ m.

causes the assembly of these structures in 10 min¹¹, and similar values have been described for osmotic and UV⁸ or oxidative¹⁷ stress, in contrast to the slower response described here for cell wall damage.

Taking these results together, we conclude that cell wall stress induces *bona fide* P-body assembly following a temporary profile that mimics that of the activation of the CWI pathway.

P-body assembly under cell wall stress is dependent on the activation of the CWI pathway. To characterize the participation of the CWI pathway in P-body assembly, we monitored Dcp2-GFP localization in the absence or presence of CR for one hour, in several mutant strains lacking key elements of this signalling pathway, namely the sensors Wsc1 and Mid2, the MAPKKK Bck1, the MAPK Slt2 and the transcription factor Rlm1. As shown in Fig. 3, the increase in visible P-body formation was completely blocked in mutants lacking *MID2* or the *SLT2* and *BCK1* elements of the CWI pathway MAPK module, where activation of Slt2 is blocked. These results highlight the importance of the activation of the CWI pathway in the formation of P-bodies under cell wall stress conditions. In fact, in strains lacking elements not required for CR-induced Slt2 activation (phosphorylation), such as the *WSC1* sensor, the formation of these structures was unaffected. Interestingly, as deduced from the correct formation of P-bodies in an *rlm1Δ* strain, the transcription factor Rlm1 that controls the expression of the majority of the genes induced in response to stress³⁰ is not involved in this process. To further analyse the participation of the CWI pathway in P-body formation, we performed the same experiments using an alternative stimulus, growing the yeast cells in the presence of zymolyase. Under these stress conditions, Slt2 activation requires the participation of the Sho1 branch of the HOG MAPK pathway, in particular the transmembrane protein Sho1 and the Hkr1 sensor, but not the Mid2 or Wsc1 sensors of the CWI^{35,36}. In these experiments, we evaluated the effect on P-body formation of yeast mutants deleted in these elements during zymolyase exposure. As

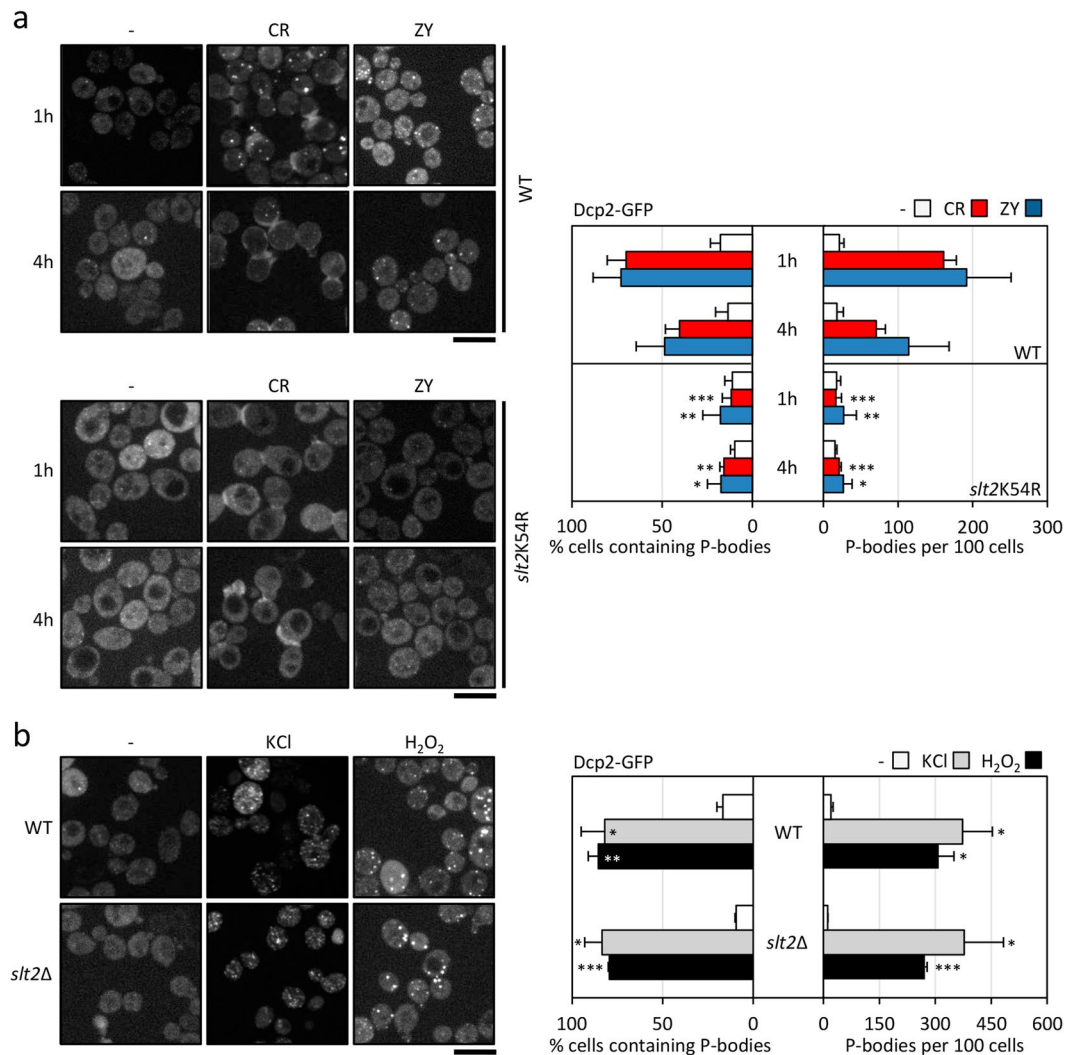


Figure 4. The activity of the MAPK Slt2 is essential for the increase in P-bodies under cell wall stress conditions. **(a)** Wild-type (WT) strain was transformed with the Dcp2-GFP plasmid. The *slt2K54R* strain corresponds to the *slt2Δ* mutant co-transformed with the Dcp2-GFP plasmid and a second plasmid expressing the kinase-death *slt2K54R* variant. Both strains were grown in the presence of 30 μ g/ml CR or 0.8 U/ml ZY for one and four hours, and Dcp2-GFP foci were visualized by fluorescence microscopy. **(b)** P-bodies were visualized of in the WT and *slt2Δ* strains expressing Dcp2-GFP after growing in a medium containing 1 M KCl or 3 mM H_2O_2 for 15 min. The accompanying histograms reflect the quantitation of the microscopy data as described in Fig. 1. Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's *t* test by comparing with the corresponding CR or ZY data from the wild-type strain **(a)** or no treatment conditions **(b)** (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$). Scale bar, 5 μ m.

shown in Fig. 3, the absence of Sho1, Hkr1 or Hog1, in addition to the absence of Bck1 or Slt2, prevented P-body formation, whereas Mid2, Wsc1 or Rlm1 did not play a prominent role. Conversely, in strains lacking Hkr1, Sho1 or Hog1, P-body assembly efficiency after CR treatment was similar to that observed in the wild-type strain.

As further proof of the essentiality of Slt2 activity in P-body generation, we took advantage of the K54R mutant form of the MAPK Slt2, consisting of a mutation within the ATP-binding site, which blocks the catalytic activity of the protein³⁷. This allele, borne on a centromeric plasmid, was unable to restore Dcp2-GFP foci formation in the *slt2Δ* strain, either in the presence of CR or ZY for one hour (Fig. 4a). This effect was also observed even after longer treatment times (up to four hours), supporting the notion that Slt2 activity is necessary not only for the initial assembly of these structures, but also for their maintenance over time (Fig. 4a). To test whether Slt2 is specifically involved in P-body formation after cell wall stress, we monitored Dcp2-GFP localization during hyperosmotic (1 M KCl) and oxidative stress (3 mM H_2O_2), two types of stress previously associated with these structures¹⁷. The number of cells bearing Dcp2-GFP granules, as well as the percentage of cells presenting them, was not altered in the *slt2Δ* mutant when compared to the values obtained in the wild-type strain (Fig. 4b). These results support the argument that Slt2 plays a cell wall damage-specific role in this process.

In sum, these results emphasize that both Slt2 activation due to the sensing of specific cell wall injuries, and the corresponding kinase activity of the phosphorylated Slt2 are essential for P-body assembly after cell wall stress.

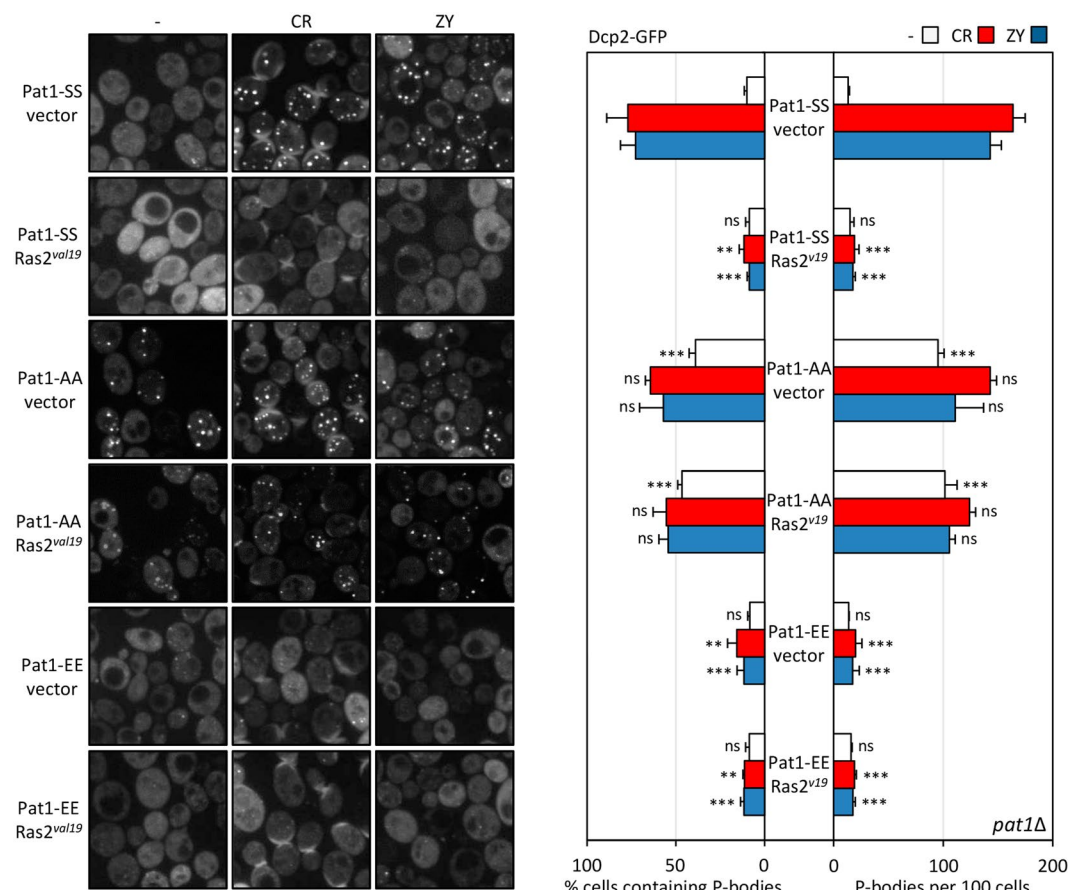


Figure 5. The presence of elevated PKA signaling activity inhibits P-body induction in response to cell wall stress. *pat1Δ* cells expressing the Dcp2-GFP protein and transformed with a plasmid that included the constitutively active Ras2^{val19} or the empty vector (vector) in combination with plasmids including the wild-type Pat1 (Pat1-SS), the non-phosphorylatable variant Pat1-AA or the phosphomimetic Pat1-EE variant were transferred to a medium containing 30 μg/ml CR or 0.8 U/ml ZY for one hour to induce P-body formation. Then, Dcp2-GFP foci were examined by fluorescence microscopy. Representative images are shown for both the control and treatment conditions. The quantitation of the microscopy data, from three independent experiments (n > 100 cells), is shown in the graphs. Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's *t* test by comparing with the no treatment conditions, CR or ZY data from the *pat1Δ* strain expressing the Pat1-SS version (**P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01, ****P* ≤ 0.001; ns, not significant). Scale bar, 5 μm.

This regulatory mechanism is identical to that exerted by Slt2 on the adaptive transcriptional response triggered under these conditions. Remarkably, the transcriptional response regulated by Rlm1 is not critical for this phenomenon, indicating that alternative substrate/s of Slt2 are involved. In this context, our laboratory is currently focusing its efforts on identifying the target/s on which the MAPK Slt2 acts to control the formation of these mRNA-protein aggregates, considering that post-translational modifications of P-body proteins, e.g. phosphorylation events, have been proposed to modulate P-body formation¹⁰. Moreover, the fact that in human cells is also present a MAPK ortholog of the yeast Slt2, ERK5³⁸, which is regulated by diverse mitogens and stresses, makes it possible to hypothesise a participation of the ERK5 pathway in the formation of these assemblies in human cells.

P-body formation induced by cell wall damage is blocked by constitutive PKA signalling. Although little is known about the signalling pathways that mediate P-body assembly, previous studies^{17,19} have demonstrated that the cAMP-dependent protein kinase (PKA), responsible for coordinating cell growth with nutrient availability, impacts on this process, at least through the modulation of the phosphorylation status of Pat1, which is one of its targets. In fact, P-body formation as a consequence of a variety of stress conditions is abrogated in the presence of constitutive PKA signalling¹⁷. Regarding cell wall stress, we found that the number of P-bodies per cell observed in a yeast strain bearing the wild-type version of Pat1 (Pat1-SS) under CR or ZY treatment was significantly diminished in the presence of elevated PKA activity expressing a dominant active allele of the small GTP-binding protein Ras2 (Ras2^{val19}), which positively regulates PKA activity (Fig. 5).

Moreover, we tested whether Pat1 phosphorylation mediated by Ras2-PKA activation was required for the observed P-body inhibition. To achieve this, Pat1-AA or Pat1-EE variants were expressed in the *pat1Δ* strain expressing Dcp2-GFP and bearing Ras2^{val19} or the corresponding empty vector. The Pat1-AA protein has alanine

residues replacing the two serines that are phosphorylated by PKA, Ser-456 and Ser-457¹⁹, thus consisting of a non-phosphorylatable version, while in the Pat1-EE protein, the presence of a glutamic acid can functionally substitute a phosphorylated serine, and thus this variant mimics the PKA phosphorylated form of Pat1. We found that the yeast strain expressing Pat1-AA formed P-bodies constitutively (Fig. 5), in agreement with the previous observation that the inactivation of PKA signalling is sufficient for P-body formation in the absence of stress¹⁹. Moreover, the co-expression of Ras2^{val19} was not able to block P-body formation neither in the absence nor in the presence of stress (Fig. 5). Contrary, the recruitment of Dcp2 to cytoplasmic foci in the presence of CR or ZY was diminished in cells containing the Pat1-EE variant (Fig. 5), which agrees with the effect observed above in wild-type cells (Pat1-SS) carrying the Ras2^{val19} allele. These results indicate that, as previously reported for other stress conditions¹⁷, in the case of cell wall stress, PKA inhibits P-body foci formation through Pat1 phosphorylation. From all the available data it is possible to postulate two possible mechanisms in relation to the global control exerted by PKA on the formation of P-bodies induced by multiple unrelated stresses. One where the stress itself results in an inhibition of the PKA activity, as in conditions of absence of glucose, therefore inducing the assembly of P-bodies, and a second one, where a given stress type does not affect PKA activity, although the ectopic activation of PKA interferes with P-body assembly upon that condition. Concerning the cell wall stress caused by CR or ZY, the first option is unlikely because in large-scale transcriptional studies carried out with these agents no transcriptional effects typically associated to the modulation of the PKA activity were detected^{31,32}.

CWI-regulated mRNAs are localized to P-bodies under cell wall stress conditions. It is well known that the CWI pathway mediates the transcriptional response necessary for maintaining cellular viability under situations where cell wall integrity is jeopardized³⁰. Since we had demonstrated the relation between the activation of the CWI pathway and the formation of P-bodies, we next investigated whether the mRNAs of genes regulated by this pathway localized to P-bodies under cell wall stress conditions. To achieve this, we visualized *in vivo* the localization of *MLP1/KDX1*, *CRG1* and *SRL3* mRNAs using the U1A-based tagged RNA system³⁹. These mRNAs were selected because their expression levels are significantly increased under cell wall stress in a CWI-dependent manner^{31,32}. To monitor the cellular distribution of these mRNAs, the wild-type strain expressing a genomically mCherry-tagged Dcp2 was transformed with two plasmids. One plasmid contained the promoter and ORF of the transcript of interest followed by a module including multiple binding sites for the U1A human protein, inserted after the translation termination codon. Simultaneously, the U1A-GFP fusion protein was expressed from a second plasmid. The three mRNAs under study were distributed diffusely throughout the cytoplasm during growth in the absence of stress (Fig. 6a). However, after two hours of zymolyase treatment, strains co-expressing the *MLP1*, *CRG1* or *SRL3* mRNA containing U1A-binding sites and the U1A-GFP fusion protein showed a clear concentration of the GFP signal in cytoplasmic foci, which colocalized in more than a 90% with Dcp2-mCherry containing assemblies (Fig. 6a,b). Moreover, there are Dcp2-containing foci in which mRNA fluorescent signal is not detected. This could be due to the presence of mRNA amounts below the detection level and/or the existence of different subpopulations of P-bodies bearing specific mRNAs or even lacking them. As expected, control strains expressing the U1A-GFP without the target mRNA did not show any concentration of the GFP signal in response to the presence of stress (Fig. 6a). Interestingly, when we visualized the mRNA of the *PGK1* gene, encoding the glycolytic enzyme phosphoglycerate kinase, which is not regulated by the CWI pathway, the number of mRNA granules was not increased in the presence of ZY and these granules were only modestly detected in visible P-bodies (Fig. 6a,b). This supports the notion that specific mRNAs induced during cell wall stress are accumulated in P-bodies. This finding is reinforced by the fact that when cells were treated with other unrelated stresses, such as the oxidative stress caused by hydrogen peroxide or glucose deprivation, no induction of *MLP1*, *CRG1* or *SRL3* mRNA granules was observed (Fig. 6c). However, as described⁸, the number of granules containing *PGK1* mRNA was augmented specifically under conditions of glucose deprivation (Fig. 6c), colocalising with P-bodies.

To further investigate the kinetics of mRNA localization in P-bodies, we monitored the localization of *MLP1* mRNA in a time-course experiment during five hours of zymolyase treatment. As shown in Fig. 7a, *MLP1*-tagged RNA recruitment was slightly delayed in comparison to P-body assembly (Fig. 2), reaching a peak after three hours of treatment. Interestingly, the formation of *MLP1* mRNA-containing granules was severely affected in strains deficient in P-body assembly, such as *pat1Δ* or *edc3Δ pat1Δ* (Fig. 7b).

These results suggest that P-body assembly should be advantageous for cellular fitness under cell wall stress conditions. One possibility is that the localization of specific mRNAs in these structures could be required to optimize the global mRNA lifecycle, perhaps in concert with translational regulation.

In this regard, previous research has found that deregulation of gene expression of specific genes whose transcripts localized to P-bodies is deleterious for cell growth of P-body mutant strains^{40,41}. To investigate this in our stress conditions, we evaluated the effect of the overexpression of versions of *MLP1* and *CRG1* fused to GST on the cellular growth of the wild-type strain and a P-body deficient mutant (*edc3Δ pat1Δ*) in the absence or presence of cell wall stress. In experiments to determine minimum inhibitory concentrations using a microdilution method, we observed that expression of both genes from the *GAL* promoter in the *edc3Δ pat1Δ* background was highly toxic in the presence of zymolyase (Fig. 8a). Moreover, this effect was also observed, although to a lesser degree, when caspofungin was used, which inhibits β-1,3-glucan synthesis (Fig. 8b). Remarkably, expression of GST did not have any effect on the levels of growth of either strain, showing a behaviour similar to that observed when experiments were carried out in the YPD medium (absence of overexpression). An additional observation from these experiments was that the *edc3Δ pat1Δ* strain was able to withstand the presence of zymolyase or caspofungin at the same level of the wild-type strain (see graphs corresponding to growth in glucose-containing medium in Fig. 8). This phenomenon could be explained by a recent observation, using the nanoparticle tracking technology⁴², that in the absence of different proteins constituent of visible P-bodies by fluorescence

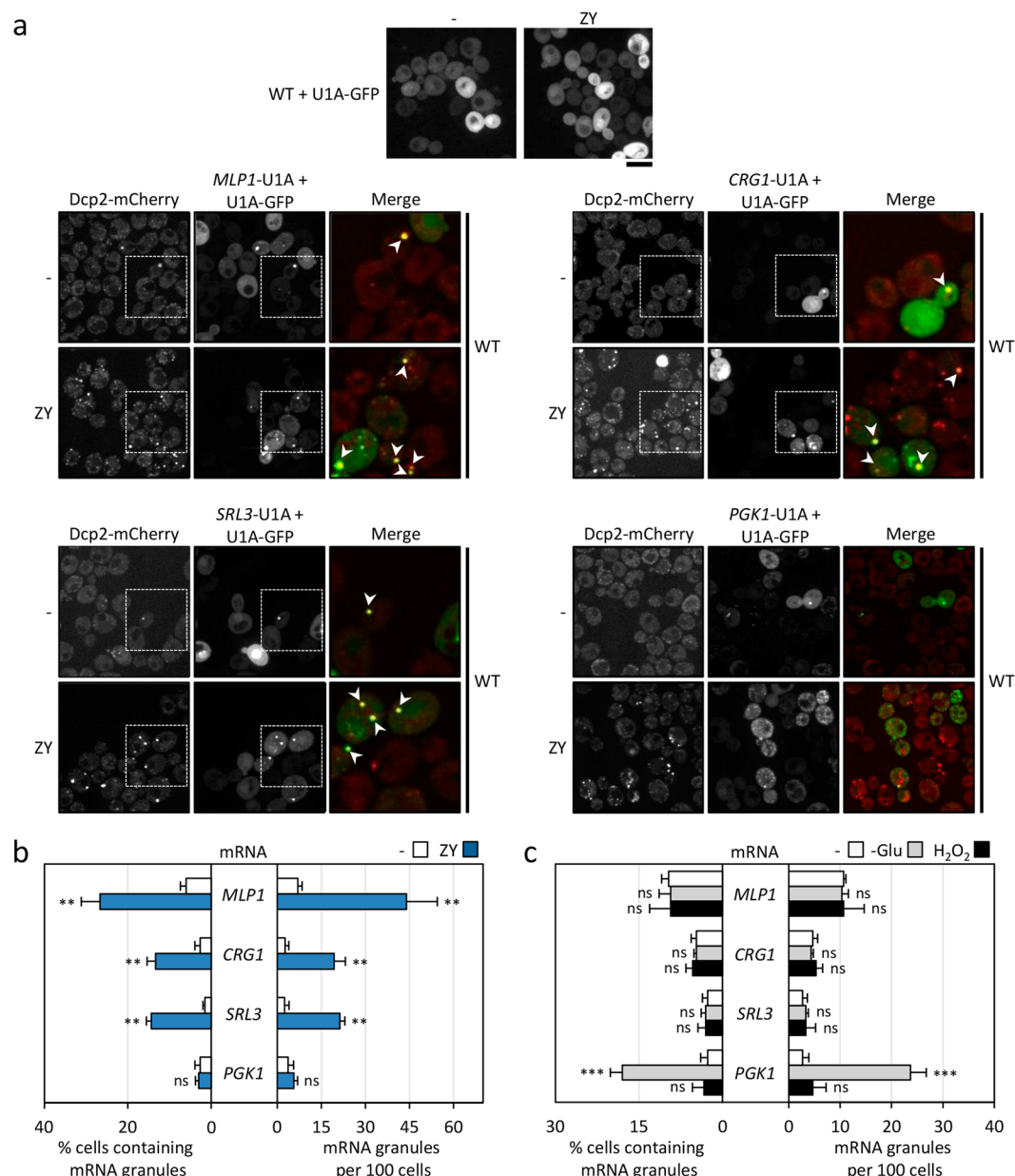


Figure 6. Cell wall stress induces localization of CWI-responsive mRNAs to P-bodies. **(a)** Confocal microscopy images of wild-type (WT) cells containing Dcp2-mCherry, coexpressing *MLP1*/*CRG1*/*SRL3* or *PGK1*-U1A mRNA and U1A-GFP protein to allow analysis of mRNA localization growing in the absence or presence of 0.8 U/ml ZY for two hours, are represented. Control cells expressing only U1A-GFP protein in the absence of target mRNA are shown (upper panel). The colored overlay images show a 4.4 times enlargement of the image sections included in the squares and depict examples where the mRNAs colocalize with P-bodies (white arrowheads). **(b)** The graphs display the quantitation of the mRNA granules shown in **(a)** from three independent experiments ($n > 100$ cells). **(c)** Quantification of mRNA granules (GFP foci) in strains described in **(a)**, treated with 3 mM H₂O₂ or starved for glucose for 15 min, is shown in the graphs. Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's *t* test by comparing with no treatment conditions (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; ns, not significant).

microscopy, other types of protein-protein and/or protein-RNA interactions are established allowing the assembly of non-visible P-body like particles that could functionally replace them.

Taken together, results from this work support the notion that the CWI pathway is responsible for the fine tuning of the formation of PBs in situations where the cell wall integrity is compromised, in coordination with expression regulation of mRNAs dependent on this signalling pathway that are located in these structures. Ongoing efforts in our laboratory aim to decipher what is the contribution of P-body formation to the cellular physiology upon cell wall stress conditions. Finally, we expect that the information provided by this work can be useful to characterise P-body formation under cell wall stress in other pathogenic fungi of clinical interest.

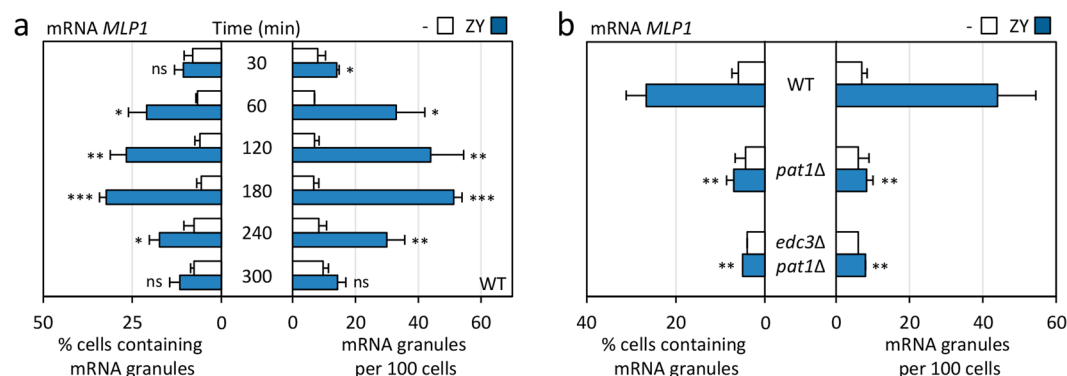


Figure 7. The induction of mRNA granules under cell wall stress conditions is associated with P-body formation. **(a)** Time course analysis of the appearance of *MLP1*-U1A mRNA granules in wild-type (WT) cells coexpressing *MLP1*-U1A mRNA and U1A-GFP protein after ZY exposure (0.8 U/ml) at the indicated times are shown in the graphs. The data reflect the average of mRNA granules counts from three independent experiments analysed by fluorescence microscopy. **(b)** Following the strategy described above, the presence of *MLP1*-U1A mRNA granules resulting from cell wall stress (two hours of ZY treatment) was quantified in WT and yeast strains defective in P-body formation (*pat1Δ* and *edc3Δ pat1Δ*). Statistical significance was determined using a two-tailed, unpaired, Student's *t* test by comparing with no treatment conditions for each time (a) or ZY data from the wild-type strain (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$; ns, not significant).

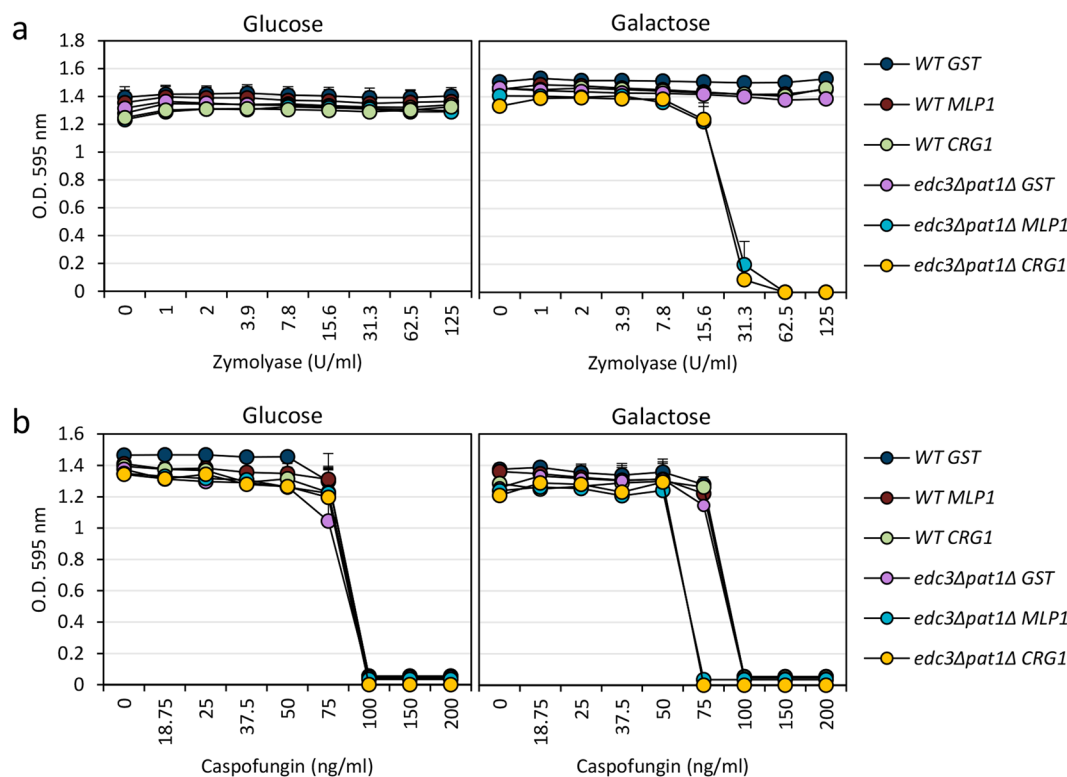


Figure 8. A high level of expression of CWI-related genes affects the viability of mutants unable to form P-bodies. Sensitivity assays to zymolyase (a) or caspofungin (b) of the wild-type (WT) and *edc3Δ pat1Δ* strains containing the *GAL1/10pr-GST*, *GAL1/10pr-GST-MLP1* or *GAL1/10pr-GST-CRG1* plasmids were performed and measured in media containing galactose (YPSG, induction of gene expression from *GAL* promoter) or glucose (YPD, repression of gene expression) as described in *Methods*. The graphs depict the average and SD values obtained from three independent experiments.

Methods

Yeast strains and plasmids. Experiments were performed with the *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) and mutant derivatives provided by Euroscarf (Frankfurt, Germany). The yeast strains from this collection used in this work were: *wsc1Δ*, *mid2Δ*, *bck1Δ*, *slt2Δ*, *rlm1Δ*, *hkr1Δ*, *sho1Δ*, *hog1Δ* and *pat1Δ*. To generate the *edc3Δ pat1Δ* double mutant strain, the *EDC3* gene was replaced by the

HIS3MX6 module in the *pat1* Δ strain using the SFH PCR-based method, as previously described⁴³. The tagged strain *DCP2-mCherry::HIS3* was obtained using the one-step polymerase chain reaction (PCR)-mediated technique for gene modification⁴⁴. Moreover, mCherry was amplified using PCR from a variant of the pBS34 plasmid (provided by Eric Muller, [Addgene plasmid #83796])⁴⁵, in which the *KanR* selection marker has been replaced by the *HIS3MX6*. The resulting fragment was integrated by homologous recombination into the *DCP2* locus in the wild-type BY4741 background. Correct integration was confirmed using a PCR-based strategy.

Plasmids expressing the protein fusions Dcp2-GFP (pRP1315), Pat1-GFP (pRP1501), Pub1-mCherry (pRP1661), Pab1-GFP (pRP1362), Pgi1-U1A (pRP1354) and U1A-GFP (pRP1194) under the control of the native promoters, all of which bearing *URA3* as a selection marker except U1A-GFP (*LEU2* marker), were kindly provided by Dr. Roy Parker (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, CO, USA)⁴⁶. Plasmids including the Pat1 variants Pat1-SS (wild-type protein including Ser-456 and Ser-457 phosphorylated by PKA), Pat1-EE (Pat1 variant where both of the aforementioned serines are replaced by a glutamic acid) and Pat1-AA (with both serines replaced by alanine), cloned in the pRS413 vector, were provided by Paul K. Herman (Department of Molecular Genetics, The Ohio State University, Columbus, OH, USA)¹⁹. Plasmid pTS120 expressing a constitutively active Ras2 (*RAS2^{val19}* allele) was provided by Dr. Michael N. Hall (Division of Biochemistry, Biozentrum, University of Basel, Switzerland)⁴⁷. Plasmid pRS315-*slt2K54R* (p2193)³⁷, was provided by David E. Levin (Department of Molecular and Cell Biology, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA). To construct Mlp1-U1A, Crg1-U1A and Srl3-U1A plasmids, the *PGK1* Promoter-ORF and 3'UTR regions from the pRP1354 plasmid were replaced with those of *MLP1*, *CRG1* and *SRL3* present in the *XhoI/BamHI* and *SpeI/NotI* fragments, respectively, obtained by PCR from genomic DNA using primers containing the indicated restriction sites. The fragment sizes of the promoter-ORF regions were 2280 bp, 1854 bp and 1287 bp for *MLP1*, *CRG1* and *SRL3*, respectively. In the case of the 3'UTRs regions, the fragment sizes were 345 bp, 375 bp and 351 bp, respectively.

Plasmids expressing fusions of *MLP1* and *CRG1* to GST, in addition to the plasmid control expressing only GST, under the control of the *GAL1/10* promoter, were obtained from the collection of Yeast GST-tagged ORFs (Dharmacon/Open Biosystems, Lafayette, CO, USA).

Growth conditions. Routinely, yeast cells were grown overnight at 24 °C in liquid SD medium (0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulphate, 2% glucose, supplemented with the required amino acids) for strains transformed with plasmids or YPD (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) to an optical density of 0.8–1 at 600 nm. Next, the culture was refreshed in YPD to an optical density of 0.1 at 600 nm, grown for 2.5 hours, and then divided into two parts. One part, the non-treated culture, continued growing under the same conditions, while the other one was supplemented when required with sublethal concentration of Congo red (30 µg/ml; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), zymolyase from *Arthrobacter luteus* (0.8 U/ml; MP Biomedicals, CA, USA), KCl (1 M; PanReac AppliChem, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain) or H₂O₂ (3 mM; PanReac AppliChem, Castellar del Vallès, Barcelona, Spain). Finally, cells were collected at the indicated times for each assay as described below. In the case of phenotypic analyses, yeast cells were grown overnight at 24 °C in liquid YPS medium (1% yeast extract, 2% peptone and 0.5% sucrose) to an optical density of 0.8–1 at 600 nm. Next, the culture was refreshed in YPS to an optical density of 0.1 at 600 nm, grown for 2.5 hours and then divided into two parts. One part continued growing under the same conditions (non-expressing conditions), while the other was supplemented with galactose (2% final concentration, YPSG medium) and both were incubated again for two hours. The caspofungin used in sensitivity tests was kindly provided by Merck Sharp and Dohme [MSD] Research Laboratories (Kenilworth, NJ, USA).

Microscopy. Exponentially growing yeast cells were quickly collected by centrifugation at 5,000 rpm for 30 seconds. Then, the culture medium was decanted, and cell pellets were resuspended in the volume of medium that remained and immediately observed under a confocal fluorescence microscope. Images were taken using a motorized Olympus IX81 microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a Yokogawa Spinning Disk confocal system (Roper Technologies, Sarasota, FL, USA), and an EMCCD Evolve camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA) using MetaMorph software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Images were analysed using the Fiji-ImageJ software⁴⁸. All images were generated from maximum-intensity projections of 3–5 Z-sections spaced at 0.3–0.5 µm. To count P-body foci, Fiji-ImageJ “thresholding” and “analyze particle” functions were used, as described by Buchan *et al.*⁴⁶. P-body foci counting was performed on a minimum of 100 cells from at least three independent experiments.

Phenotypic analyses. To determine the sensitivity of yeast strains to zymolyase and caspofungin, a microdilution method was carried out. These assays were done in 96-well microtiter plates, with serial dilutions of zymolyase 20 T (from 125 to 1 U/ml) or caspofungin (from 200 to 18.75 ng/ml) prepared in a final volume of 150 µl of YPD (for cells grown in YPS) or YPSG medium (for cells grown in the same medium). Each well was inoculated with $\sim 10^4$ cells from an exponentially growing culture. Plates were incubated for 72 hours at 30 °C, and cell growth was determined by measuring absorbance at 595 nm on an ELISA microplate reader.

References

- Pizzinga, M. & Ashe, M. P. Yeast mRNA localization: protein asymmetry, organelle localization and response to stress. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1256–1260, <https://doi.org/10.1042/BST20140086> (2014).
- Sheth, U. & Parker, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805–808, <https://doi.org/10.1126/science.1082320> (2003).
- Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 430–436, <https://doi.org/10.1038/nrm2694> (2009).

4. Hoyle, N. P., Castelli, L. M., Campbell, S. G., Holmes, L. E. & Ashe, M. P. Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J. Cell Biol.* **179**, 65–74, <https://doi.org/10.1083/jcb.200707010> (2007).
5. Buchan, J. R., Muhlrad, D. & Parker, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **183**, 441–455, <https://doi.org/10.1083/jcb.200807043> (2008).
6. Balagopal, V. & Parker, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 403–408, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.005> (2009).
7. Jain, S. & Parker, R. The discovery and analysis of P Bodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* **768**, 23–43, https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5107-5_3 (2013).
8. Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., Brengues, M. & Parker, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)* **11**, 371–382, <https://doi.org/10.1261/rna.7258505> (2005).
9. Decker, C. J., Teixeira, D. & Parker, R. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **179**, 437–449, <https://doi.org/10.1083/jcb.200704147> (2007).
10. Luo, Y., Na, Z. & Slavoff, S. A. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry* **57**, 2424–2431, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162> (2018).
11. Brengues, M., Teixeira, D. & Parker, R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**, 486–489, <https://doi.org/10.1126/science.1115791> (2005).
12. Arribere, J. A., Doudna, J. A. & Gilbert, W. V. Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P bodies. *Mol. Cell* **44**, 745–758, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.019> (2011).
13. Grousl, T. et al. Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **122**, 2078–2088, <https://doi.org/10.1242/jcs.045104> (2009).
14. Kato, K., Yamamoto, Y. & Izawa, S. Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28**, 339–347, <https://doi.org/10.1002/yea.1842> (2011).
15. Kroschwald, S. et al. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *eLife* **4**, e06807, <https://doi.org/10.7554/eLife.06807> (2015).
16. Tkach, J. M. et al. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat. Cell Biol.* **14**, 966–976, <https://doi.org/10.1038/ncb2549> (2012).
17. Shah, K. H., Zhang, B., Ramachandran, V. & Herman, P. K. Processing body and stress granule assembly occur by independent and differentially regulated pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**, 109–123, <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146993> (2013).
18. Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Perez-Ortin, J. E. & Alepuz, P. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y.)* **15**, 1110–1120, <https://doi.org/10.1261/rna.1435709> (2009).
19. Ramachandran, V., Shah, K. H. & Herman, P. K. The cAMP-dependent protein kinase signaling pathway is a key regulator of P body foci formation. *Mol. Cell* **43**, 973–981, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.032> (2011).
20. Buchan, J. R. mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA biology* **11**, 1019–1030, <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972208> (2014).
21. Anderson, P., Kedersha, N. & Ivanov, P. Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1849**, 861–870, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.11.009> (2015).
22. Levin, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175, <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264> (2011).
23. Dichtl, K., Samantaray, S. & Wagnere, J. Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell. Microbiol.* **18**, 1228–1238, <https://doi.org/10.1111/cmi.12612> (2016).
24. García, R., Sanz, A. B., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C. & Arroyo, J. Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *J. Cell Sci.* **129**, 1649–1660, <https://doi.org/10.1242/jcs.180190> (2016).
25. Sanz, A. B. et al. Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2805–2817, <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-04-0278> (2012).
26. Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Nombela, C. & Arroyo, J. Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Slt2. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7159–7172, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw324> (2016).
27. Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M. & Andrews, B. Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6515–6528 (2001).
28. Ray, A. et al. Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat. Genet.* **33**, 522–526, <https://doi.org/10.1038/ng1132> (2003).
29. Rousseau, A. & Bertolotti, A. An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* **536**, 184–189, <https://doi.org/10.1038/nature18943> (2016).
30. Sanz, A. B., García, R., Rodríguez-Peña, J. M. & Arroyo, J. The CWI Pathway: Regulation of the Transcriptional Adaptive Response to Cell Wall Stress in Yeast. *Journal of fungi* **4**, 1, <https://doi.org/10.3390/jof4010001> (2018).
31. García, R. et al. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 15183–15195, <https://doi.org/10.1074/jbc.M312954200> (2004).
32. García, R., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 10901–10911, <https://doi.org/10.1074/jbc.M808693200> (2009).
33. Bermejo, C. et al. Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of wsc1 and mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**, 679–688, <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0060> (2010).
34. Slifkin, M. & Cumbie, R. Congo red as a fluorochrome for the rapid detection of fungi. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 827–830 (1988).
35. Bermejo, C. et al. The sequential activation of the yeast HOG and Slt2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1113–1124, <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0742> (2008).
36. Rodríguez-Peña, J. M., Díez-Muñiz, S., Bermejo, C., Nombela, C. & Arroyo, J. Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett.* **587**, 3675–3680, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.030> (2013).
37. Kim, K. Y., Truman, A. W. & Levin, D. E. Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol. Cell Biol.* **28**, 2579–2589, <https://doi.org/10.1128/MCB.01795-07> (2008).
38. Truman, A. W. et al. Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot. Cell* **5**, 1914–1924, <https://doi.org/10.1128/EC.00263-06> (2006).
39. Brodsky, A. S. & Silver, P. A. Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *RNA (New York, N.Y.)* **6**, 1737–1749 (2000).
40. Lavut, A. & Raveh, D. Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS Genet.* **8**, e1002527, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002527> (2012).

41. Loll-Krippelbein, R. & Brown, G. W. P-body proteins regulate transcriptional rewiring to promote DNA replication stress resistance. *Nature communications* **8**, 558, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00632-2> (2017).
42. Rao, B. S. & Parker, R. Numerous interactions act redundantly to assemble a tunable size of P bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, E9569–E9578, <https://doi.org/10.1073/pnas.1712396114> (2017).
43. Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. & Philippsen, P. Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1065–1075, 10.1002/(SICI)1097-0061(19970915)13:11<1065::AID-YEA159>3.0.CO;2-K (1997).
44. Longtine, M. S. *et al.* Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961, 10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U (1998).
45. Hailey, D. W., Davis, T. N. & Muller, E. G. Fluorescence resonance energy transfer using color variants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* **351**, 34–49, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)51840-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)51840-1) (2002).
46. Buchan, J. R., Nissan, T. & Parker, R. Analyzing P-Bodies and Stress Granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **470**, 619–640, [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(10\)70025-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(10)70025-2) (2010).
47. Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D. E. & Hall, M. N. Activation of the RAS/Cyclic AMP Pathway Suppresses a TOR Deficiency in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 338–351, <https://doi.org/10.1128/mcb.24.1.338-351.2004> (2003).
48. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019> (2012).

Acknowledgements

We want to thank Roy Parker, Michael N. Hall, Paul K. Herman and David E. Levin for the plasmids provided. Merck Sharp and Dohme (MSD) Research Laboratories is acknowledged for kindly supplying the caspofungin used in this work. All members of our research group (UCM-920640: Yeast Functional Genomics) at the Department of Microbiology and Parasitology (UCM) are also acknowledged for their support. This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, Spain [grants BIO2013-48136-P and BIO2016-79289-P to J.A. and BIO2015-70195-C2-1-R to C.R.V.A.], Comunidad de Madrid (CM) and Fondos Estructurales (FSE and FEDER), Spain [Grant B2017/BMD3691-InGEMICS-CM to J.A] and the Special Chair on Fermented Beverages and Health (C.N.). V.P. was the recipient of a research contract (Ayudante de Investigación) from Comunidad de Madrid and S.O.-M. was supported by a pre-doctoral fellowship (FPI program) from the Spanish Government.

Author Contributions

J.M.R.-P. and J.A. conceived the study. J.M.R.-P., J.A., C.N. and R.G. designed the experiments and analysed the data. R.G., V.P., S.O.-M. and C.R.V.A. performed the experiments. J.M.R.-P., J.A. and R.G. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

