



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológica

Tesis presentada para optar por el título de
Licenciada en Ciencias Biológicas

Rol de la proteína de unión a RNA Mip6 sobre la expresión de *TPK1* en *Saccharomyces cerevisiae*

Daniela Belén Gareis

Directora: Dra. Fiorella Galello

Lugar de trabajo:
Laboratorio de Transducción de señales:
Especificidad de la señalización y adaptación celular al estrés.
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Noviembre, 2024

Daniela Belén Gareis

Fiorella Galello

RESUMEN

Ante el desafío que representa un ambiente con condiciones fluctuantes, los organismos han debido anteponerse y adaptarse desarrollando mecanismos para mantener la homeostasis celular. El mantenimiento de la homeostasis depende de los distintos caminos de señalización que poseen las células, los cuales responden a señales extracelulares indicativas del estado del ambiente y que desencadenan distintas respuestas celulares.

En *Saccharomyces cerevisiae*, muchos de estos procesos celulares son controlados por la vía de la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (cAMP-PKA). La proteína quinasa A es una proteína tetramérica que controla la respuesta fisiológica celular luego del incremento de cAMP, frente a un estímulo ambiental particular.

La PKA de levaduras es una holoenzima conformada por un homodímero de subunidades regulatorias, codificadas por un único gen, *BCY1*; y por dos monómeros de subunidades catalíticas, las cuales pueden estar codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2*, y *TPK3*.

Frente a un determinado estímulo, la adenilato ciclasa es activada y provoca un aumento en los niveles intracelulares de cAMP. El cAMP se une entonces a las subunidades regulatorias de la PKA, causando la disociación de la holoenzima y liberando las subunidades catalíticas, las cuales son capaces de fosforilar distintos sustratos. Sin embargo, la vía de señalización de la PKA en levaduras tiene un rol pleiotrópico. Surge entonces la pregunta de cómo, frente a diferentes estímulos que provocan la inducción de un único segundo mensajero (cAMP), se produce la fosforilación de los sustratos específicos necesarios para generar una respuesta adecuada. La especificidad de la respuesta se logra a través de diferentes puntos de regulación, como por ejemplo el nivel de expresión de las subunidades catalíticas y regulatorias de la holoenzima, lo cual permite variaciones en sus abundancias relativas.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que frente al estrés térmico el promotor de *TPK1* aumenta su actividad y es regulado por los factores de transcripción *Msn2/4*, entre otros. Los niveles de mRNA de *TPK1* también aumentan en esta condición, sin embargo los niveles de proteína permanecen constantes. En las células eucariotas, el proceso de exportación nuclear del mRNA es crucial para

garantizar los niveles de expresión proteicos adecuados. El proceso de exportación está conectado con eventos río arriba y río abajo que regulan el destino del mRNA y, entre otros factores, las proteínas de unión al RNA (RBPs) están involucradas en estos pasos. Ha sido demostrado que la RBP Mip6 juega un rol importante en la exportación nuclear de los mRNAs y en los niveles de expresión de los mRNAs dependientes del factor de transcripción Msn2/4. Además se comprobó que Mip6 interactúa con distintos factores que participan en diferentes pasos de la homeostasis del mRNA.

El presente trabajo se enfoca en el rol de la proteína de unión al RNA Mip6, involucrada en la exportación de mRNAs, sobre la expresión de la subunidad catalítica Tpk1. Nuestros resultados de genes reporteros indican que en la cepa mutante *mip6Δ* no hay un aumento de la actividad del promotor *TPK1* frente al estrés térmico, como ocurre en la cepa salvaje; sin embargo, los niveles de mRNA son mayores en la cepa mutante en ambas condiciones. Los niveles de proteína Tpk1 en la mutante *mip6Δ* son menores que en la cepa salvaje en ambas condiciones. Estos resultados indican un posible rol de la proteína Mip6 en la regulación de los niveles de mRNA de *TPK1* y en la exportación del mensajero. Utilizando la técnica ChIP-qPCR observamos que Mip6 se encuentra en el promotor *TPK1* en condiciones normales de crecimiento y su reclutamiento se pierde frente al estrés térmico siguiendo un patrón de unión similar al del factor de transcripción Msn2/4. En conjunto, nuestros resultados sugieren que Mip6 modula la expresión de *TPK1* a distintos niveles.

Role of RNA binding protein Mip6 in the expression regulation of *TPK1* in *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Faced with the challenge of an environment with fluctuating conditions, organisms have overcome challenges and adapted, developing mechanisms to maintain cellular homeostasis. The maintenance of homeostasis depends on different signaling pathways that cells possess, which respond to extracellular signals that indicate the state of the environment that trigger varied cellular responses.

In *Saccharomyces cerevisiae*, many of these cellular processes are controlled by cyclic AMP dependent protein kinase A pathway. Protein kinase A is a tetrameric protein that controls the cellular physiological response after an increase in cAMP, facing a particular environmental stimulus.

Yeast PKA holoenzyme is formed by an homodimer of regulatory subunits, encoded by only one gene, *BCY1*; and by two monomers of catalytic subunits, which are encoded by *TPK1*, *TPK2* and *TPK3* genes.

When responding to a certain stimulus, adenylate cyclase is activated and provokes an increase in intracellular cyclic AMP. cAMP then binds to the regulatory subunits of PKA, causing the dissociation of the holoenzyme and liberating the catalytic subunits, which are capable of phosphorylating different substrates. However, the PKA-cAMP pathway has a pleiotropic role. This raises the question of how, reacting to different stimuli that cause the production of a single second messenger (cAMP), specific substrates are phosphorylated in an adequate response to the stimulus. Response specificity is accomplished through different regulation points, for example, the level of expression of the catalytic and regulatory subunits of the holoenzyme, which allows variations in their relative abundances.

Our group has demonstrated that, when facing thermal stress, the *TPK1* promoter increases its activity and is regulated by the transcription factor Msn2/4, among others. The *TPK1* mRNA levels also increase in these conditions, however, protein levels remain constant. In eukaryotic cells, nuclear mRNA export is crucial to guarantee adequate protein expression levels. This process is connected to upstream and downstream events that regulate mRNA fate and, among other factors, RNA binding proteins (RBPs) are involved in these steps. It has been

demonstrated that RBP Mip6 plays an important role in nuclear export and expression levels of Msn2/4 dependent mRNAs. In addition, it was proven that Mip6 interacts with different factors that participate in several steps in the homeostasis of mRNA.

The present work is focused on the role of RBP Mip6 on the expression of catalytic subunit Tpk1. Our reporter gene assay results indicate that in mutant strain *mip6Δ* there is no increase in the *TPK1* promoter activity facing thermal stress, unlike wild-type strains; however, mRNA levels are higher in the mutant strain in both conditions. Protein Tpk1 levels in mutant *mip6Δ* are lower than in the wild-type strain in both conditions. These results indicate a possible role for protein Mip6 in the regulation of *TPK1* mRNA levels, as well as export of the messenger. Using the CHIP-qPCR technique we observed that Mip6 is recruited in *TPK1* promoter in normal growing conditions, and this recruitment is lost in thermal stress, following a similar binding pattern to that of transcription factor Msn2/4. Altogether, these results suggest that Mip6 modulates *TPK1* expression at different levels.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi excelente directora, Fiore, que me abrió las puertas a la ciencia y la investigación, y con extrema paciencia me guió en todo el proceso de realizar este trabajo, empujándome a ser independiente a la hora de hacer experimentos y aconsejándome en la escritura hasta el hartazgo. Esta tesina no hubiera sido lo mismo, ni hubiera existido tal como es sin tu enorme ayuda. Ojalá en un futuro yo pueda ser $\frac{1}{3}$ de la científica que sos.

A todo QB1/4 por el excelente ambiente que generaron mientras estuve ahí. Silvia, Paula, Mari, Manu, Tincho, y especialmente Iván. Desde dar una mano con los problemas a las risas en el almuerzo y los chistes internos, todo hizo una hermosa experiencia haber trabajado ahí.

A la FCEN y la UBA. Esta casa de estudios se volvió mi hogar durante los seis años que pasé acá, cuatro transitando los pasillos, dos conectada con la compu. Dentro del pabellón (y el 0), agradezco a todos los docentes que contribuyeron a mi formación con pasión y dedicación, ante toda adversidad. Además de enseñarme a ser científica, me enseñaron a luchar. Y seguiré luchando por la universidad pública, gratuita y de calidad para todo el pueblo argentino, y por la ciencia argentina.

La universidad, además de formarme, me regaló amigos que me acompañaron hasta el final. Belu, Delfi, Emi, Fede, Iván, Orti, Luna, Manu, Maru, Martu, Nahue, Nai, Sabri, Sebas, Sofi, Valen, Pancho, Pau, y sobretodo Alfred, quien me dio la mano (y un mate) el primer día de CBC y desde entonces no me soltó. A Sofi y Nai por todos los TPs compartidos. A Iván, compa de labo y de labos. Por los almuerzos en el pasto, las juntadas de estudio en la biblio, la ayuda a la distancia; sin el apoyo de Subconjuntos, el Gin&Tonic y el Ginchester no hubiera llegado a ningún lugar.

A mis amigas que me acompañaron prácticamente toda la vida, Luana, Sofi y Dana, les debo incontables consuelos y risas hasta que me doliera la panza. No hay palabras para agradecer la compañía incondicional que me vienen dando hace once años.

A los amigos que me regaló Internet y jugar jueguitos, Nico, Fede, Santi, Ocho, Agus, Juli. Inexplicable el apoyo que me dieron estos años a pesar de los kilómetros en medio.

A mis amigas del colegio, Mili, Mica, Cati, Lu. Desde las juntadas adolescentes hasta ahora que somos adultas trabajadoras, de cerca o de lejos, con más o menos encuentros. Su amistad es algo que me nutrió como persona y me llevó a donde estoy hoy.

A Nacho porque la ciencia nos unió y nos mantuvo cercanos tantos años. A la profe Aued y a Nico, que me enseñaron, entrenaron y contuvieron en OAQ, y por darme el espacio para amar la ciencia.

Al equipo de natación de Ferro por ser mi escape y mi refugio, y permitirme despejar la cabeza cuando necesitaba un cambio de perspectiva.

A mi familia, por todo. Mamá y papá, se me quedan cortas las palabras para agradecerles todo lo que me cuidaron, quisieron y bancaron. No me alcanzaría la vida para devolverles todo lo que me dieron, todo lo que alguna vez viví es gracias a ustedes. Euge, no puedo explicarte lo que me impactó tu presencia en mi vida, lo que te admiro, lo que ansío reírme con vos los almuerzos de los domingos. Vivir con vos hizo que mi vida fuera más divertida, y aunque ya no compartimos el mismo techo, te tengo presente todo el tiempo. Todo lo que hago es para que ustedes estén orgullosos de mí.

Y a Juli, mi amor. Nos conocimos en tiempos complicados pero en el momento justo. Tus abrazos me mantuvieron cuerda todo este tiempo. Estuviste ahí para cada éxito y fracaso, cada risa y cada llanto, cada festejo y cada decepción. Te agradezco por escucharme, por aconsejarme, por acompañarme, por cocinarme, por cuidarme, por contenerme, por amarme así. Tu amor me hace mirar al frente y seguir adelante; aunque el no ya lo tenga, me hacés ir por el sí. Con vos al lado busco ser la mejor versión de mí misma; la mejor novia, la mejor estudiante, la mejor (casi) bióloga.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	7
INTRODUCCIÓN	8
1. Señalización mediada por cAMP-PKA	8
2. Especificidad de la vía cAMP-PKA	11
3. Respuesta a estrés en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
4. Regulación de la expresión de la subunidad Tpk1 en estrés térmico	14
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
Medios de cultivos para levaduras y bacterias	22
Ensayo de estrés térmico	23
Plásmidos utilizados	23
Purificación de DNA plasmídico (miniprep):	24
Transformación de levaduras con DNA plasmídico	25
Electroforesis en gel de agarosa	25
Ensayo de medición de la actividad β -galactosidasa	25
Purificación de RNA total y RT	26
Real time (qPCR)	27
Western blot	28
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	29
Ensayo de viabilidad	31
Ensayo de determinación de glucógeno	31
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
La ausencia de Mip6 modifica la expresión de TPK1	32
Mip6 se recluta al promotor de TPK1	38
Efecto de Mip6 en la viabilidad y el almacenamiento de glucógeno	40
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUCCIÓN

Las células eucariotas son unidades dinámicas y cambiantes, como también lo es el ambiente que estas habitan. Resulta, por lo tanto, imperativo a la supervivencia de los organismos eucariotas unicelulares poseer la competencia de adaptarse a las alteraciones que puedan presentarse.

Mientras que los organismos pluricelulares cuentan con tejidos y órganos especializados con roles específicos en el mantenimiento de la homeostasis interna del individuo, los organismos unicelulares, como *Saccharomyces cerevisiae*, requieren de mecanismos autónomos para adaptarse, como los distintos caminos de transducción de señales (Gasch et al., 2000). Estas vías generan una respuesta adecuada en base al estímulo que las activa, los cuales pueden ser tanto externos, signos de las fluctuaciones del ambiente; como internos, reportando el estado celular. Los caminos de señalización representan un mecanismo involucrado en múltiples procesos celulares y funciones especializadas que garantizan el correcto funcionamiento celular (Pawson and Scott, 2010). La señal desencadenante de la vía es integrada mediante una serie de modificaciones post-traduccionales y/o conformacionales a las moléculas que componen el camino, generando en consecuencia una respuesta que se manifiesta a nivel metabólico, transcripcional u organizacional, buscando mantener la homeostasis interna (Mager and De Kruijff, 1995).

1. Señalización mediada por cAMP-PKA

En *S. cerevisiae*, uno de los caminos de señalización intracelular con mayor importancia y altamente conservado en las células eucariotas, es aquel integrado por la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (cAMP-PKA) (Portela and Rossi, 2020).

La importancia de esta vía radica en el control de múltiples procesos celulares, como aquellos asociados al crecimiento fermentativo, el metabolismo de carbohidratos, la entrada a fase estacionaria y la respuesta general a estrés (Gancedo, 2001; Santangelo, 2006; Thevelein and de Winde, 1999). La participación de la PKA en procesos tan variados señala el rol pleiotrópico de la holoenzima en la célula (Galello et al., 2014).

La PKA es una enzima tetramérica, que en su forma inactiva se encuentra conformada por dos monómeros de subunidades catalíticas y un homodímero de subunidades regulatorias.

La activación de esta enzima depende de la concentración del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (cAMP) en el medio intracelular. Cuando la concentración de cAMP es baja, las subunidades catalíticas de la quinasa (C) y las subunidades regulatorias (R) se mantienen unidas. A partir de un estímulo determinado se produce la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) que cataliza la conversión de ATP en cAMP y pirofosfato, provocando un aumento en los niveles intracelulares de cAMP. A cada subunidad regulatoria se le unen dos moléculas de cAMP, dando lugar a un cambio conformacional que produce una disminución en la afinidad entre R y C. Como consecuencia, la holoenzima se disocia, liberando a las subunidades catalíticas, ahora capaces de fosforilar a sus proteínas blanco (Johnson et al., 1987; Taylor et al., 2008).

El modelo más actual del mecanismo de activación de la PKA propone que el sustrato también participa en la activación de la holoenzima (Figura 1) (Vigil et al., 2004). Para que la subunidad C reconozca a sus sustratos proteicos es imprescindible que estos presenten la secuencia consenso de reconocimiento RRXS/TY, el cual consiste de dos residuos de arginina seguidos por un aminoácido cualquiera, un residuo pequeño que precede al sitio fosfo-aceptor (una serina o treonina) y un residuo hidrofóbico voluminoso (Shabb, 2001).

La reacción de fosforilación consiste en el agregado de uno o más grupos fosfato a las proteínas, lo que puede provocar cambios conformacionales que lleven a la activación o inactivación de la actividad enzimática de sus proteínas blanco. Por esto, es uno de los mecanismos fundamentales en la transmisión de información en un camino de señalización (a través de la modificación post-traducciona l de proteínas) (Galello et al., 2010).

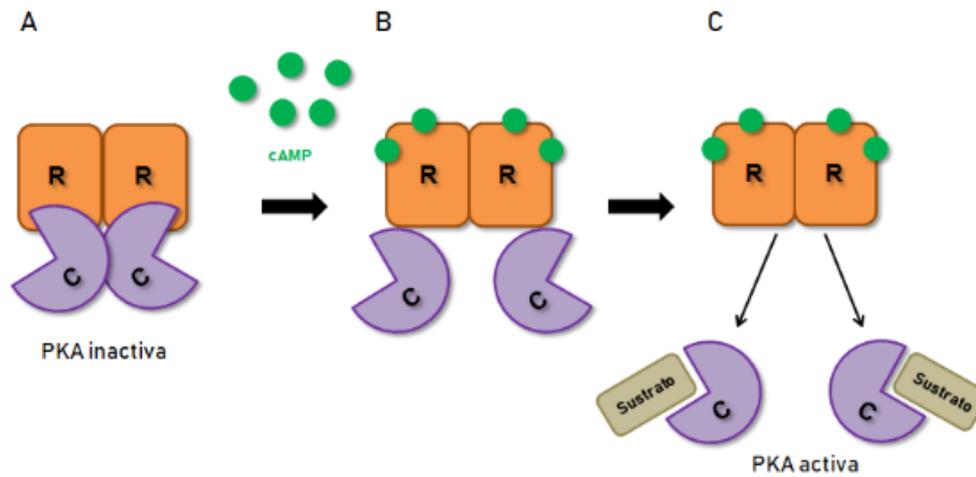


Figura 1: Mecanismo de activación de PKA por cAMP. (A) Conformación inactiva de la holoenzima a bajas concentraciones de cAMP. **(B)** Unión de dos moléculas de cAMP a cada subunidad reguladora y cambio conformacional de la holoenzima. **(C)** Unión al sustrato y liberación de las subunidades catalíticas.

En levaduras, las subunidades catalíticas están codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (Toda et al., 1987b), mientras que la subunidad reguladora está codificada por el gen *BCY1* (Johnson et al., 1987; Toda et al., 1987a). Si bien las tres isoformas de las subunidades catalíticas de levaduras son funcionalmente redundantes para la viabilidad (Mazón et al., 1993; Sonneborn et al., 2000; Toda et al., 1987b; Zoller et al., 1988), cada una de ellas presenta funciones específicas en diferentes procesos. Por ejemplo, se ha observado para Tpk2 un rol en la regulación de las modificaciones de histonas y en la autofagia (Yu et al., 2022), como también un papel en la diferenciación hacia el crecimiento pseudohifal (Pan and Heitman, 2002). Por otro lado, Tpk3 se ha asociado con la regulación del contenido enzimático mitocondrial frente a la disminución de la demanda energética celular (Chevtzoff et al., 2005), y con la regulación del factor represor de la expresión de HXK2 (Palomino et al., 2006). Con respecto a Tpk1, se ha demostrado que esta subunidad posee un rol regulatorio sobre la unión de extremos no homólogos, un mecanismo de reparación del DNA (Hooshyar et al., 2020; Jessulat et al., 2021). También se ha visto que la estabilidad durante el estrés térmico de la enzima trehalasa depende de la actividad de la subunidad catalítica Tpk1, junto con Tpk2 (Zähringer et al., 1998).

2. Especificidad de la vía cAMP-PKA

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína quinasa A afecta a una amplia variedad de blancos en la célula. Por un lado, promueve mecanismos asociados a la fermentación y la proliferación celular; por otro, impide procesos relacionados con el metabolismo respiratorio lento y la fase estacionaria de crecimiento, la acumulación de reservas de carbohidratos como glucógeno, y la tolerancia y adaptación a factores causantes de estrés. Sus múltiples funciones son ejercidas mediante la fosforilación directa de distintas proteínas, por lo que su rol pleiotrópico requiere de una regulación muy precisa. Frente a esto, surge el interrogante acerca de cómo se logra mantener la especificidad de acción de la quinasa cuando varios estímulos diferentes desencadenan la producción endógena de un mismo segundo mensajero, el cAMP.

La especificidad de la quinasa no estaría dada solamente por el reconocimiento de la secuencia consenso en los sustratos (Galello et al., 2010; Mok et al., 2010), sino también por la interrelación dinámica de varios factores, a través de distintos niveles de control. Uno de ellos es la regulación de la localización subcelular de la quinasa junto con sus sustratos en compartimentos subcelulares definidos. En mamíferos, la compartimentalización y distribución diferencial de la quinasa se logra a través de la interacción de las subunidades R con las AKAPs (Skalhegg and Tasken, 2000).

Estas moléculas poseen una triple función en la regulación de la PKA: acercar físicamente a la holoenzima con sus sustratos, localizar el complejo holoenzima-sustrato en compartimentos subcelulares específicos, así como también regular la actividad de la PKA a través de la interacción con fosfodiesterasas (PDE) (Baillie et al., 2005; Pidoux and Taskén, 2010). En levaduras se han identificado proteínas de anclaje homólogas a las AKAPs de mamíferos a las que PKA se une mediante su subunidad Bcy1, permitiendo su localización en determinados compartimentos subcelulares y su interacción con sustratos específicos (Galello et al., 2014). Sin embargo, una vez que las subunidades catalíticas se disocian de las regulatorias, las primeras pierden su unión a los complejos que formaba Bcy1 con las proteínas de anclaje, que posibilitaban su localización. Es así que la pregunta acerca de cómo la vía de señalización de PKA mantiene su especificidad, continúa sin respuesta.

Otro punto clave de regulación de la actividad de la PKA es el nivel de expresión de sus subunidades Tpk2 y Bcy1, y como consecuencia la variación en sus abundancias relativas. Nuestro grupo demostró que la expresión de las Tpk2 presenta bajos niveles durante el metabolismo fermentativo y estos niveles aumentan durante fase estacionaria o metabolismo respiratorio. Además, se determinó la localización subcelular diferencial de cada subunidad en las distintas fases de crecimiento de *S. cerevisiae*. Las isoformas Tpk2 y Tpk3, pero no Bcy1, están asociadas a cuerpos de procesamiento del mRNA o *P-bodies* (PBs) y gránulos de estrés (SGs) durante fase estacionaria, y Tpk3 se acumula en PBs durante hambreado de glucosa y estrés hiperosmótico (Barraza et al., 2017).

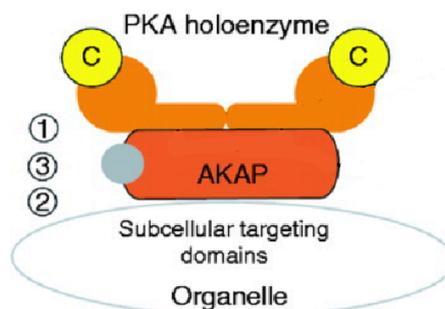


Figura 2: Representación de una AKAP unida a la PKA. (1) PKA. (2) Organelo o compartimento celular target. (3) AKAP. Adaptada de Pidoux and Taskén, 2010.

Otro importante aspecto que influye en la especificidad de la vía cAMP-PKA es la regulación transcripcional y post-transcripcional de las subunidades de la enzima. Se verificó que en fase logarítmica el nivel de expresión relativo de cada gen es diferente: el promotor *TPK1* presenta el mayor nivel de actividad, seguido por *TPK2*. Los promotores de *TPK3* y *BCY1* muestran niveles bajos de actividad, siendo menor la de *BCY1*. Los niveles de mRNA (ARN mensajero) de cada subunidad fueron concordantes con la actividad de sus promotores, excepto *BCY1*, cuyos niveles de mensajero fueron tan abundantes como los de *TPK1*. Por otro lado, se determinó que existe un mecanismo de autorregulación negativa isoforma-dependiente: los cuatro promotores exhiben diferentes grados de inducción en ausencia de actividad de la quinasa (Pautasso and Rossi, 2014). De esta forma, la regulación diferencial en la abundancia y localización de cada una de las subunidades de la PKA constituye un componente más que aporta al elevado grado de organización espacio-temporal de la vía de señalización.

3. Respuesta a estrés en *Saccharomyces cerevisiae*

Frente a condiciones desfavorables que resultan en un estrés celular, las levaduras deben poder adecuarse realizando cambios internos, los cuales pueden ocurrir en distintos niveles. Fundamentalmente, hay respuestas masivas y rápidas en la expresión génica (Gasch et al., 2000), que pueden, en consecuencia, repercutir en toda la vía biosintética que se desenvuelve río abajo.

La especificidad de las subunidades catalíticas de la PKA es importante en la respuesta celular a diferentes tipos de estrés (Creamer et al., 2022). Esto es así ya que, por ejemplo, se ha observado que la actividad de promotores inducidos en estrés térmico como *SSA3*, *UBI4*, *CTT1*, y *HSP12* son regulados negativamente por la presencia de cAMP intracelular, es decir, por activación de la PKA. Junto con esto, se ha visto que levaduras mutantes con baja actividad de la PKA son hiperresistentes al estrés térmico (Mager and De Kruijff, 1995). Esto parece indicar un rol negativo de la PKA sobre la respuesta al estrés.

La actividad de los factores que estimulan la transcripción de los genes involucrados en la respuesta al estrés ambiental o general (ESR por *environmental stress response*) es regulada por la fosforilación mediada por la PKA, como es el caso de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Boy-Marcotte et al., 1998; Garreau et al., 2000; Görner et al., 1998; Hasan et al., 2002; Smith et al., 1998). Esta respuesta general se desencadena como resultado a diferentes tipos de estrés, como por ejemplo, la falta de nutrientes, el estrés oxidativo y el estrés térmico, entre otros (Causton et al., 2001).

El ESR representa un programa de expresión génica masivo, en el cual los genes *target* no necesariamente poseen un rol en la respuesta al estrés específico *per se*, sino que pueden más bien poseer un rol protector frente a un futuro nuevo estrés (Berry and Gasch, 2008). La respuesta desencadenada por el estrés térmico en particular (HSR por Heat Shock Response) es un tipo de ESR gobernado por los factores de transcripción Hsf1 y Msn2/4.

Los genes *MSN2* y *MSN4* de *S. cerevisiae* son homólogos, y las proteínas que codifican, funcionalmente redundantes (Estruch and Carlson, 1993; Martínez-Pastor et al., 1996), por lo que en este trabajo se mencionan como Msn2/4. Son proteínas de unión al DNA que actúan como factores de transcripción, reconociendo el elemento de respuesta a estrés STRE (*stress response promoter element*)

(Martínez-Pastor et al., 1996; Schmitt and McEntee, 1996) y son parte central del ESR.

Este programa de expresión inducido por Msn2/4 tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular y positivo sobre el metabolismo de glucógeno (Smith et al., 1998). Esto es así ya que la reducción del crecimiento y el aumento del almacenamiento de nutrientes en macromoléculas como el glucógeno, resulta en una ventaja adaptativa ante un estrés ambiental.

Durante el crecimiento exponencial, uno de los principales mecanismos de inhibición de Msn2/4 se da por su localización citoplasmática, mediante la fosforilación de su dominio de localización nuclear (NLS por *nuclear localization signal*). Por el contrario, en condiciones de estrés se induce su desfosforilación y rápida re-localización al núcleo (Beck and Hall, 1999; Görner et al., 2002, 1998). La habilidad de estos factores de activar la transcripción es regulada por múltiples vías, como las de TOR y cAMP-PKA, ya que afectan la localización, las interacciones y la vida media de las proteínas (Inoki et al., 2005; Lee et al., 2013; Morano et al., 2012).

4. Regulación de la expresión de la subunidad Tpk1 en estrés térmico

A pesar de que en estudios de transcriptómica se ha registrado que los cuatro promotores de las subunidades de la PKA son regulados positivamente frente a estrés (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000), nuestro grupo ha demostrado que los promotores de *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* son regulados de manera negativa por la actividad quinasa de la PKA y que sólo el promotor de *TPK1* se activa frente a condiciones de estrés térmico o salino (Pautasso and Rossi, 2014).

En condiciones normales de crecimiento, el promotor de *TPK1* posee tres nucleosomas posicionados, lo cual contribuye a la represión del gen. Se demostró que los complejos INO80 y RSC son necesarios para el posicionamiento de los nucleosomas en estas condiciones. Frente al estrés térmico, el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF es reclutado al promotor *TPK1* y los nucleosomas son desplazados, permitiendo de este modo la activación del promotor y de los niveles de mRNA (Reca et al., 2020). Esta regulación positiva de *TPK1* en estrés térmico involucra la participación de la quinasa Rim15 y los factores de transcripción Msn2/4, Gis1 y Sok2. El factor de transcripción Msn2/4 se encuentra

pre-cargado en el promotor de *TPK1* en condiciones normales de crecimiento y esta unión se pierde en respuesta al estrés térmico (Pautasso and Rossi, 2014).

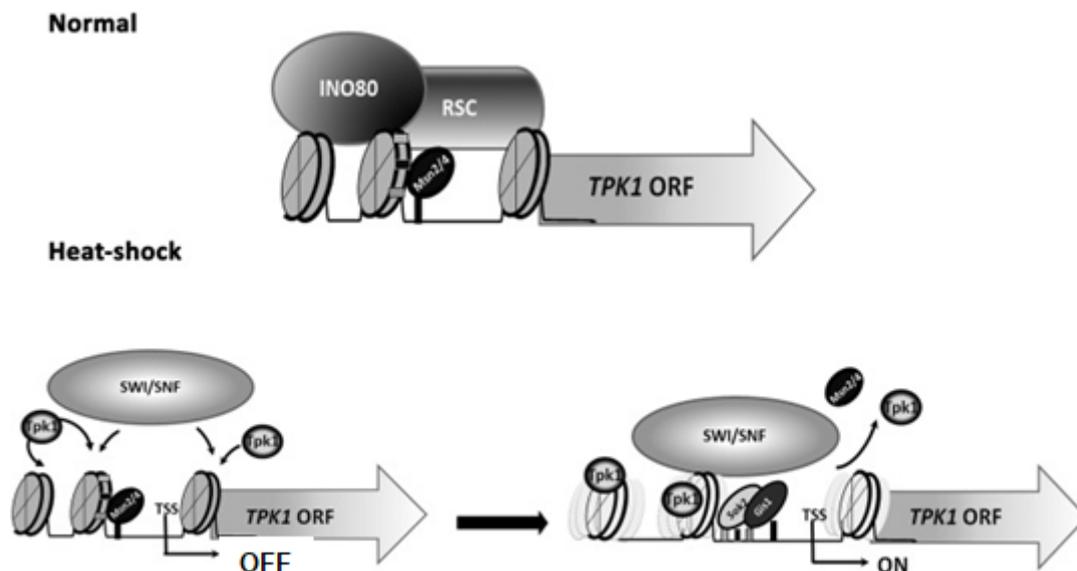


Figura 3: Representación esquemática del promotor de *TPK1* donde se observan los tres nucleosomas posicionados, y el reclutamiento del complejo remodelador SWI-SNF, y la de Msn2/4, Sok2, Gis1 y Tpk1. Adaptado de Reca et al., (2020).

También hemos demostrado que el reclutamiento de SWI/SNF depende de Msn2/4 (Reca et al., 2020). El modelo propuesto se representa en la Figura 3.

Existen evidencias que indican que la vida media del mRNA de *TPK1* aumenta durante el estrés térmico y que existe una marcada disminución en la síntesis proteica durante condiciones de estrés (Pizzinga and Ashe, 2014). El mRNA de *TPK1* es arrestado en *foci* citoplasmáticos (que no son ni gránulos de estrés ni *P-bodies*, ya que los gránulos conteniendo este mensajero son resistentes a cicloheximida (Cañonero et al., 2022). La separación física entre los mensajeros y la maquinaria traduccional en el citoplasma explica la reducción en la síntesis proteica, el arresto del mRNA de *TPK1*, y el aumento de su vida media.

En contexto con los procesos post-transcripcionales, la exportación de los mRNAs del núcleo al citoplasma es un paso extremadamente importante en el metabolismo de los genes, ya que en células eucariotas la transcripción ocurre en el núcleo, pero la maquinaria traduccional se encuentra en el citoplasma de la célula (Niño et al., 2013). Esta separación espacial permite una fina regulación, debido a que la exportación no ocurre por difusión pasiva, sino que es mediada por factores

de exportación que se aseguran que el mRNA transportado sea maduro para evitar síntesis de proteínas deletéreas (Niño et al., 2013).

El interior del núcleo celular se encuentra separado físicamente del citoplasma por la envoltura nuclear, y el transporte de ribonucleoproteínas (mRNPs por *messenger ribonucleoprotein*) a través de esta barrera es un mecanismo fundamental, altamente regulado por las nucleoporinas del complejo del poro nuclear (NPC por *nuclear pore complex*) (Niño et al., 2013). El NPC es un gran complejo proteico integrado por proteínas denominadas nucleoporinas y ensamblado en la envoltura nuclear. La estructura formada es un cilindro con un canal central que permite la difusión pasiva de iones y macromoléculas de hasta 40kDA. En *S. cerevisiae*, las moléculas grandes que no pueden atravesar el poro por difusión pasiva, como los mRNPs, son transportadas de manera activa a través del canal con la ayuda del factor de exportación de mRNA Mex67-Mtr2 (Niño et al., 2013; Santos-Rosa et al., 1998; Segref et al., 1997). Éste receptor heterodimérico se comporta como un componente móvil del NPC, y lleva a cabo su función dentro del canal central del mismo, donde se une a su cargo y facilita su transporte a través del poro (Derrer et al., 2019). La unión del complejo al cargo que transporta ocurre de manera co-transcripcional (Dieppois et al., 2006) y es mediada por proteínas adaptadoras, como Gbp2, Hrb1, Nab2 e Yra1 (Stewart, 2010).

Las proteínas adaptadoras son proteínas accesorias, usualmente proteínas de unión al RNA (RBPs por *RNA binding proteins*) que, junto con el mRNA, conforman la ribonucleoproteína (mRNP por *messenger ribonucleoprotein*), la cual es transportada por Mex67-Mtr2. Estas proteínas cumplen el rol de modular el metabolismo, maduración y la exportación del mRNA al que se asocian (Lei et al., 2001; Martín-Expósito et al., 2019). Por ejemplo, Yra1 es una proteína adaptadora esencial para la exportación de los mRNAs, ya que se une de manera co-transcripcional y recluta a Mex67-Mtr2 para su exportación (Stewart, 2010). Se observó que Yra1 no es indispensable en organismos como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, sino que Yra1 simplemente potencia la interacción entre Nab2, otra proteína adaptadora esencial para la exportación de mRNAs (Iglesias et al., 2010). Por otro lado, Gbp2 y Hrb1 son proteínas que se unen a los pre-mRNAs y al spliceosoma, supervisando el proceso de splicing; luego, sobre los mRNAs correctamente procesados, promueven el reclutamiento del complejo Mex67-Mtr2 (Hackmann et al., 2014).

Una vez el mRNP ha atravesado el NPC, Mex67-Mtr2 se disocia del cargo, de modo de evitar el reingreso de la partícula al núcleo (Stewart, 2010). Sin embargo, Mex67 no cumple función sólo como factor de exportación, sino que además participa en el control de calidad de los mRNPs que exporta. Las proteínas adaptadoras supervisan la calidad del RNA al cual se unen, y sólo permiten que mRNAs que han pasado este control interactúen con Mex67, de modo que el complejo de exportación tiene también un rol como guardián en la calidad de mensajeros (Hackmann et al., 2014; Zander et al., 2016) (Figura 4).

No obstante, en respuesta a estrés, Mex67 y las proteínas adaptadoras se disocian de los mensajeros no involucrados en esta respuesta. De manera excepcional, Mex67 interactúa con los mRNA de respuesta a estrés sin necesidad de proteínas adaptadoras; en consecuencia, no atravesarán un control de calidad. Este mecanismo garantiza la rápida expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés, a expensas de potenciales errores ignorados por la falta de control. Se ha demostrado que en respuesta a estrés, Mex67 rápidamente se une a transcritos de genes gobernados por el factor de transcripción Hsf1. Este factor de transcripción tiene la capacidad de reclutar otras moléculas importantes para la transcripción, por lo que se cree que recluta de manera directa a Mex67 a la maquinaria transcripcional para su posterior cargado sobre los transcritos nacientes.

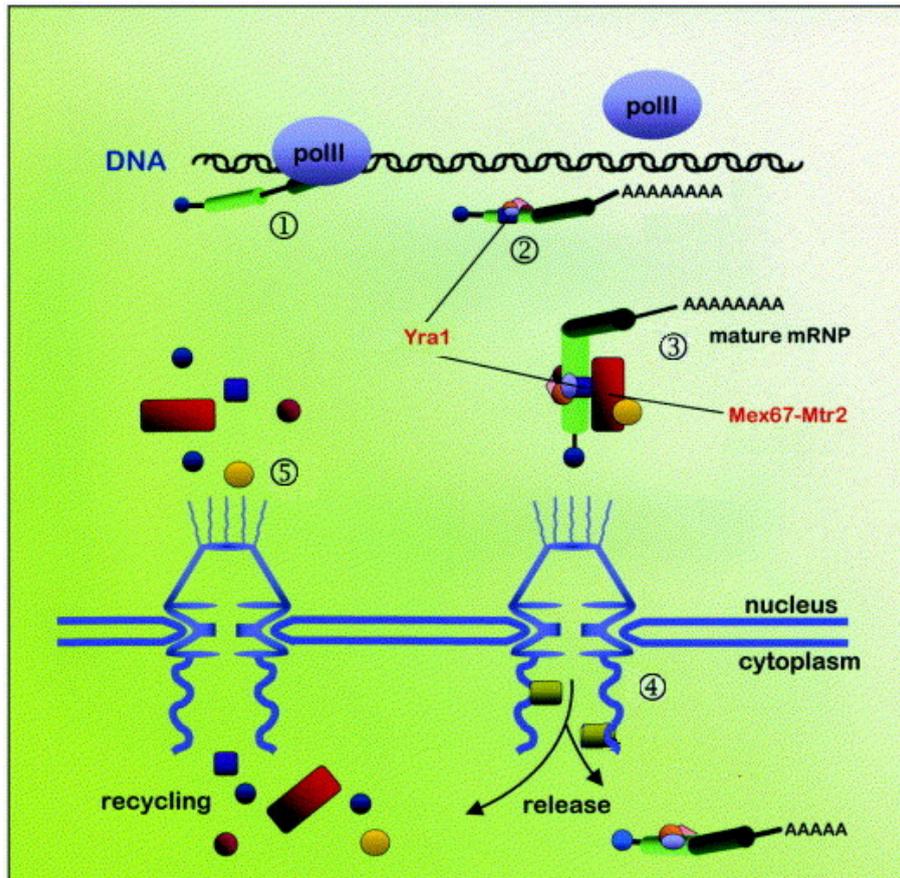


Figura 4: Modelo de exportación del mRNA. (1) Los transcritos nacientes rápidamente se asocian con factores de procesamiento que favorecen el capping del extremo 5', el splicing, y el clivaje y poliadenilación del extremo 3', resultando en un complejo mRNP maduro. (2) Yra1 se une al mRNP. (3) Se recluta el receptor de exportación Mex67-Mtr2 a través de Yra1, y (4) el mRNP es dirigido al NPC. (5) Una vez liberado el mRNA al citoplasma, los componentes de la mRNP son reciclados y vuelven al núcleo. Adaptado de (Zenklusen and Stutz, 2001).

Como se mencionó, las RBPs comúnmente forman parte de la mRNPs. Estas moléculas son centrales en el metabolismo de los mensajeros, ya que pueden interferir en procesos tales como la traducción, degradación, estabilidad, edición o localización subcelular de los mRNAs (Re et al., 2014). Por ejemplo, Np13 es una RBP que modula la exportación de mRNA (Lee et al., 1996), y Rna15 es una subunidad del complejo CF1A que compone el factor de clivaje y poliadenilación CF1 (Gross and Moore, 2001). Ambas proteínas se cargan en el mRNA de manera co-transcripcional y compiten por sitios de unión del RNA nascente, lo que previene el reconocimiento de sitios críticos de poliadenilación por parte de Rna15 (Perales and Bentley, 2009).

Una de las de las proteínas de unión al RNA descrita recientemente que compone el mRNP del mRNA es Mip6 (*Mex67 interacting protein 6*), la cual participa en la exportación a través de su interacción con Mex67, pero que también interactúa física o funcionalmente con muchos otros factores involucrados en el metabolismo de los mRNAs, como Rrp6, Xrn1, Sgf73, Sus1 y Rpb1 (Martín-Expósito et al., 2019). Rrp6 es una subunidad del Exosoma Nuclear, cuya función es degradar transcritos inestables y no maduros. Sgf73 y Sus1 son proteínas que conforman el módulo DUB (desubiquitinante) del complejo SAGA, cuya función radica en estimular la formación del complejo de preiniciación sobre el promotor de los genes al inicio de la transcripción y realizar modificaciones en las histonas de la cromatina que favorezcan la transcripción (Bonnet et al., 2014).

Xrn1 es una 5'-3' exorribonucleasa citoplasmática encargada de degradar mRNAs que han perdido su CAP, y es clave para la tasa de recambio de RNA (Jones et al., 2012). Por último, Rpb1 es la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II, la transcriptasa principal en la síntesis de precursores de mRNA.

La interacción de Mip6 con el factor de exportación Mex67 es una interacción física directa entre el dominio UBA (*Ubiquitin-associated domain*) de Mex67 y el RRM4 (*RNA recognition motif*) de Mip6 (Figura 5). La interacción con Mex67 es importante para que Mip6 pueda transportarse entre el núcleo y el citoplasma en un fenómeno llamado *shuttling* (Martín-Expósito et al., 2019).



Figura 5: Esquema de la secuencia de aminoácidos de Mip6 y la localización de sus sitios de unión al RNA (RRM: *RNA recognition motif*). Se destaca el motivo RRM4, que interacciona con el dominio UBA de Mex67. Adaptado de Martín-Expósito et al., 2019.

Durante la esporulación, un proceso que en *S. cerevisiae* es desencadenado por condiciones de hambre, Mip6 es necesario para la expresión estable de mRNAs que se transcriben al inicio de la meiosis, pero que son traducidos al final de la meiosis II, teniendo un papel en la regulación al momento de su traducción y localización del mensajero (Jin et al., 2017). También, se registra para Mip6 un rol específico en el control metabólico de la respuesta a estrés térmico, observando que una mutante *mip6Δ* aumenta los niveles de expresión de genes involucrados en el

camino metabólico de la trehalosa en la condición de estrés, lo que lleva a una acumulación del azúcar inducida por el estrés térmico (Nuño-Cabanes et al., 2020).

Por otro lado, en condiciones normales de crecimiento, Mip6 posee función en la atenuación de la expresión de genes regulados por Msn2/4 (factor de transcripción clave en la ESR), mientras que frente a condiciones estresantes se acumula en gránulos de estrés (Martín-Expósito et al., 2019). Para que Mip6 pueda ejercer su rol en la disminución de la expresión de genes dependientes de Msn2/4 en condiciones normales de crecimiento, es necesaria la interacción con Mex67. Esto podría estar relacionado con el papel de Mex67 en el control de calidad de los mRNA exportados. Además, análisis de metagenómica muestran un enriquecimiento en el reclutamiento de Mip6 en el extremo 3' de los mensajeros, un perfil de unión a transcritos similar al de factores proteicos que se unen de manera co-transcripcional al mRNA (Martín-Expósito et al., 2019) como es el caso de Mex67. Finalmente, el papel atenuante de Mip6 también podría relacionarse con la interacción de la RBP con Rrp6, Xrn1, Sgf73, Sus1 y Rpb1, ya que son proteínas con funciones ya sea en la regulación de la transcripción o en la degradación de los mensajeros.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Durante el estrés térmico ocurre una regulación coordinada de la abundancia de los mRNAs, la traducción, la localización y las tasas de *turnover*. Por lo tanto, la regulación de la transcripción y la traducción contribuyen al cambio en la expresión en los genes de respuesta al estrés. En la regulación post-transcripcional, la exportación, la localización específica y la compartimentalización del mRNA en el citoplasma juegan un rol importante.

Hipótesis: La proteína Mip6 se une al mRNA de *TPK1* y contribuye a la regulación de su expresión durante el estrés térmico. Esta regulación puede ser ejercida a distintos niveles

1. A nivel transcripcional, por interacción con el factor de transcripción Msn2.
2. A través de la exportación del mRNA de *TPK1*.

Estos mecanismos contribuyen a la regulación de la expresión de las subunidades de PKA frente al estrés térmico. En base a lo planteado, se detallan a continuación los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1.1. Estudio del rol de Mip6 sobre los niveles de transcripción y niveles proteicos de *TPK1*.

Objetivo 1.2. Unión de Mip6 al promotor de *TPK1*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En la Tabla 1 a continuación se detallan las cepas de levaduras utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

Cepa	Genotipo
BY4741 (WT)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<i>mip6Δ</i>	(BY4741) <i>MIP6::KanMX4</i>
<i>MIP6-TAP</i>	(BY4741) <i>MIP6-TAP::HIS3</i>
BY4741 <i>TPK1-lacZ</i>	(BY4741) + <i>pTPK1-lacZ (YEp357)</i>
<i>mip6Δ TPK1-lacZ</i>	(BY4741) <i>MIP6::KanMX4 + pTPK1-lacZ</i>
BY4741 <i>TPK2-lacZ</i>	(BY4741) + <i>pTPK2-lacZ (YEp357)</i>
<i>mip6Δ TPK2-lacZ</i>	(BY4741) <i>MIP6::KanMX4 + pTPK2-lacZ</i>

Tabla 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el trabajo.

Medios de cultivos para levaduras y bacterias

Las cepas de *S. cerevisiae* fueron crecidas en medio mínimo completo (MMC) conteniendo 0,67% de base nitrogenada con aminoácidos y 2% de glucosa, pH 6,5. El medio rico contiene 1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% glucosa (YPD). El medio mínimo sintético (SD) contiene 0,67% de base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 2% glucosa más los aminoácidos necesarios para completar los requerimientos auxotróficos y mantener la selección de los plásmidos. El medio sólido contiene ágar 2%.

Los cultivos de *Escherichia coli* conteniendo los plásmidos de interés fueron crecidos en medio LB-Ampicilina, compuesto por 1% bactopectona, 0,5% extracto de levaduras, 0,5% NaCl y 100 µg/ml Ampicilina.

Ensayo de estrés térmico

Para los experimentos de estrés térmico, las células fueron crecidas en el medio adecuado a 25°C hasta una $OD_{600}=1$, y luego el cultivo se separó en dos partes. Una parte del cultivo se mantuvo a 25°C (Control) y la otra mitad se incubó a 37°C por 30 minutos (Estrés térmico).

Plásmidos utilizados

Para la medición de la actividad de los promotores de *TPK1* y *TPK2* se empleó un plásmido derivado del YEp357. Este plásmido contiene la región 5' UTR y nucleótidos de la región codificante del gen de interés (posición -800 a +10 con respecto al codón ATG de inicio de la traducción, y -593 a +298 con respecto al TSS) río arriba del gen reportero lacZ. La Figura 6 muestra un esquema del plásmido YEp357 empleado.

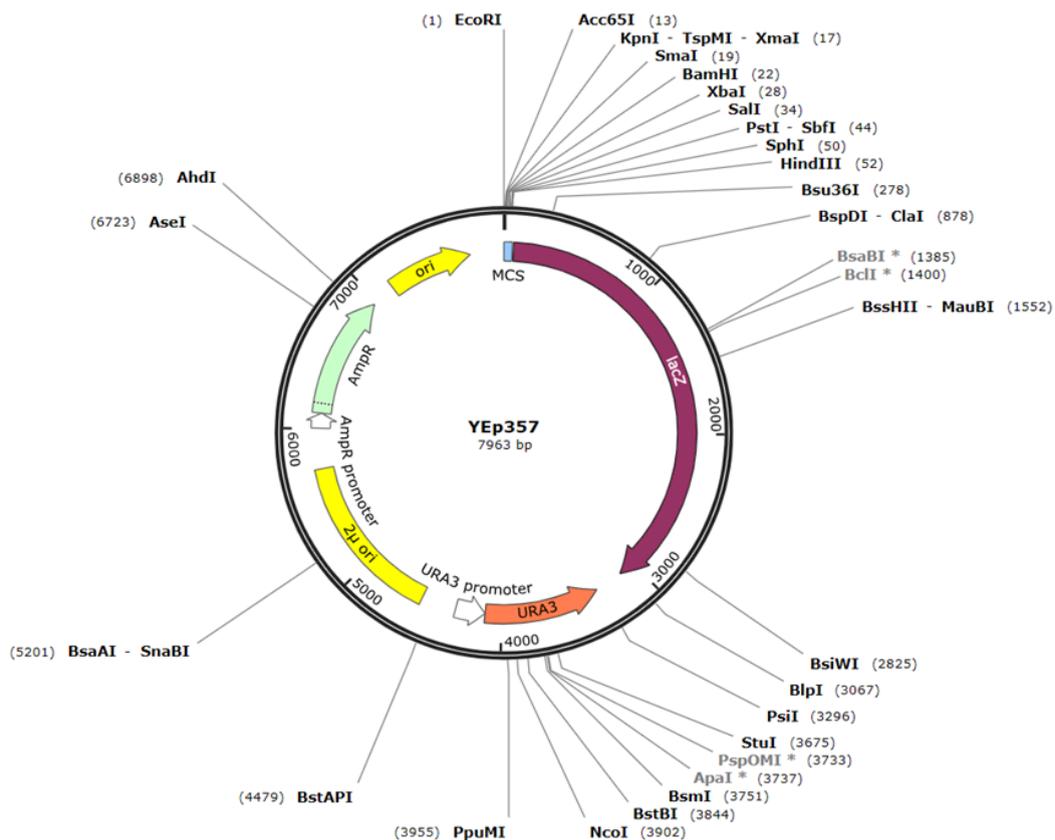


Figura 6: Mapa del plásmido YEp357.

Purificación de DNA plasmídico (miniprep):

Las células de *E. coli* transformadas fueron crecidas ON (*over night*) a 37°C en medio LB-Ampicilina. Las células se recuperaron por centrifugación y el pellet fue resuspendido en Solución 1 (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con RNAasa 0,02 µg/ml (Biodynamics). Luego se agregó 1 volumen de Solución 2 (NaOH 0,2 N, SDS 1%), se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos. Se agregó 1 volumen de acetato de potasio 3 M pH 5,2 y se mezcló por inversión. Se centrifugó y se extrajo el sobrenadante con un volumen de fenol:cloroformo pH 8. Se recuperó la fase acuosa, la cual se precipitó con el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de potasio 3 M pH 5,2 y se incubó a -20°C. Se centrifugó y el precipitado obtenido se resuspendió en H₂O destilada y se conservó a -20 °C. Se verificó la integridad de los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa y tinción con BrEt.

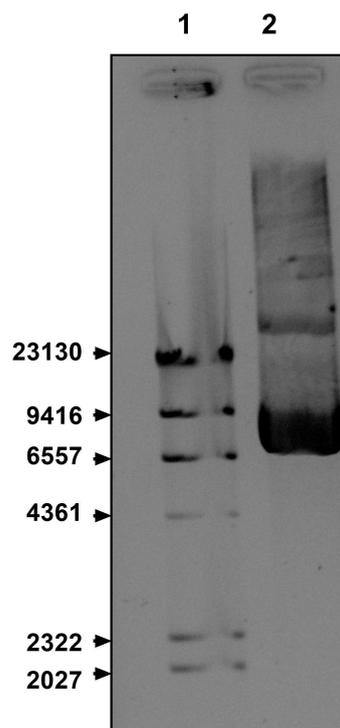


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa 1% de la preparación de DNA plasmídico. Calle 1: Marcador de peso molecular λ Hind III en pb. Calle 2: preparación del plásmido YEP357-TPK1lacZ.

Transformación de levaduras con DNA plasmídico

Las cepas de *S. cerevisiae* fueron transformadas según el método de acetato de litio (Ito et al., 1983). Brevemente, se dejó crecer un precultivo ON a 30°C con agitación en medio YPD. A partir de éste, se inoculó un cultivo que se dejó crecer 3 horas a 30°C con agitación. Las células fueron luego cosechadas por centrifugación. Luego, fueron lavadas con H₂O estéril y resuspendidas en TE/AcLi 0,1M esterilizado. Después de 30 minutos de incubación a 30°C con agitación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas nuevamente en TE/AcLi 0,1M. A 50 µl de la resuspensión celular se agregaron 50 µg de ssDNA desnaturalizado, y 1 µg de DNA plasmídico, y se dejó incubar por 30 minutos a 30°C. Luego, se agregó TE/AcLi 0,1 M/ PEG 40% y se incubó nuevamente a 30°C durante una hora. El shock térmico se realizó a 42°C durante 15 minutos, y finalizado ese tiempo, las células fueron lavadas con buffer TE 1X y sembradas en medio mínimo selectivo.

Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de DNA plasmídico y RNA fueron sembradas y corridas en geles de agarosa 1%, en buffer TAE 1X (TrisHCl 400 mM pH=7,6, ácido acético 20mM, EDTA 1 mM pH=8). La electroforesis se realizó a 100 V. La tinción fue realizada con bromuro de etidio 1 µg/ml en buffer TAE 1X, y las bandas fueron visualizadas con luz ultravioleta.

Ensayo de medición de la actividad β-galactosidasa

La determinación de actividad β-galactosidasa fue realizada según el método de Miller (Miller, 1972). Las células fueron crecidas en medio selectivo sin uracilo hasta una OD₆₀₀=1. El volumen del cultivo se separó en partes iguales para el ensayo de estrés térmico.

Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en buffer Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM). Se tomó una pequeña alícuota de esa resuspensión, y se realizó una dilución 1/10 para determinación de la A600nm. Para realizar el ensayo se tomaron 400 µl de la resuspensión, que fueron llevados a 1 ml con buffer Z. Luego, se agregó cloroformo y SDS 0,1% para permeabilizar las células. La reacción se inició con el agregado de 200 µl de orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) 0,4 mg/ml, incubando a

30°C, momento desde el cual se tomó el tiempo de reacción. La misma se detuvo agregando 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M al determinar la aparición de producto (evidenciado por un color amarillo pálido). Luego de centrifugar, se midió en el sobrenadante a A420nm (correspondiente al producto de la reacción) y a A550nm (correspondiente a debris celular). La actividad β-galactosidasa se calculó en unidades Miller según:

$$\text{Unidad Miller} = \frac{(A420 - 1.75 \times A550) \times 1000}{A600 \times \text{Dil} \times \text{Vol ensayado (ml)} \times \text{tiempo (min)}}$$

A600 = A_{600nm} = Absorbancia de las suspensiones celulares (λ=600nm)

A420 = A_{420nm} = Absorbancia de la reacción o-nitrofenol (λ=420nm)

A550 = A_{550nm} = Absorbancia para corregir los resultados por debris celulares (λ=550nm)

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Purificación de RNA total y RT

Las muestras fueron centrifugadas, y resuspendidas en 400 μL de buffer TES (TrisHCl 10 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, SDS 0,5%). Se agitó y agregó 1 volumen de fenol ácido (pH≈4), y luego la mezcla fue incubada a 65°C durante 1 hora con agitación cada 5 minutos. Luego, se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó. Se realizaron dos extracciones fenólicas adicionales. Los ácidos nucleicos fueron precipitados por el agregado de 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de volumen de acetato de potasio 3 M pH 5,2 e incubados a -20°C por 10 minutos. Luego de centrifugar nuevamente, el precipitado fue lavado con etanol 70% y resuspendido en agua destilada DEPC. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 8). Posteriormente, se trataron las muestras con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para eliminar el DNA genómico presente en la muestra, siguiendo las indicaciones del fabricante.

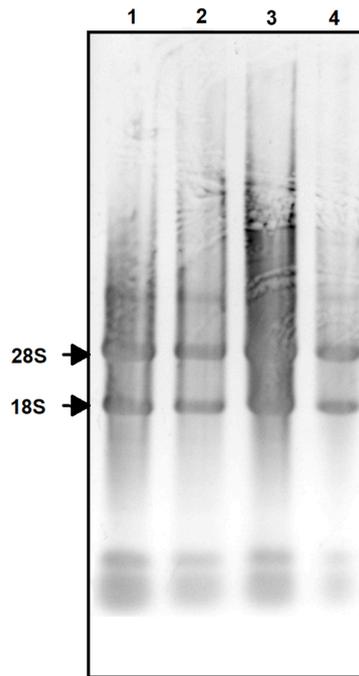


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa 1% de la purificación de RNA. Calle 1-4: Muestras de RNA purificado. Calle 1: Ceba BY4741, condición control. Calle 2: Ceba BY4741, condición de estrés. Calle 3: Ceba *mip6Δ*, condición control. Calle 4: Ceba *mip6Δ*, condición de estrés. Se señalan en la imagen las bandas correspondientes al rRNA 28S y 18S.

Para la síntesis de cDNA por retrotranscripción se tomaron ~7,5 µg de RNA purificado y se realizó la reacción utilizando la enzima EasyScript® Reverse Transcriptase, siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de cDNA simple cadena fueron amplificados por *real time* PCR (qPCR), utilizando 4 µl de cDNA como templado.

Real time (qPCR)

La qPCR se realizó con Taq DNA Polymerase y los productos se visualizaron con SYBR Green (Life Technologies). Los *primers* empleados se muestran en la Tabla 2. Los niveles relativos de mensajero de *TPK1* o *TPK2* fueron normalizados a los niveles endógenos del mRNA de *POL1* (gen de *POL1*). Para la qPCR se utilizó el sistema *Quant Studio™ Design & Analysis Software v1. 5. 2. - Applied Biosystems StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific)*.

Programa empleado:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95,0 °C	1 min
Ciclos (35)	95,0 °C	30 s
	55,0 °C	30 s
	72,0 °C	1 min
Extensión final	72,0 °C	1 min
Melt Curve Stage	95,0 °C	15 s
	54,0 °C	30 s
	95,0 °C	15 s

Tabla 2: Protocolo de qPCR utilizada para la amplificación de los productos de cDNA.

Primers utilizados:

Primer	Secuencia	Tamaño de amplicón
<i>TPK1 fw +571</i>	5' GCAGCGGAAGTTTGTTTAGC 3'	121 bases
<i>TPK1 rv +692</i>	5' GGCAAACCCGAAATCTGTTA 3'	
<i>TPK2 fw +369</i>	5' GCTTGTGGAGCATCCGTTTC 3'	173 bases
<i>TPK2 rv +542</i>	5' AATGCCAGTATGACTTCCGCAG 3'	
<i>POL1 fw +1797</i>	5' CTGCACTGGCAAACAGAAA 3'	179 bases
<i>POL1 rv +1976</i>	5' TCTTAAACGACGGCCAATAGA 3	

Tabla 3: Primers empleados en la amplificación por qPCR de los mRNAs de *TPK1*, *TPK2* y *POL1*.

Western blot

Los pellets celulares fueron resuspendidos en buffer extracto (Tris-HCl 5 mM pH 7,5, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, β -mercaptoetanol 10mM) con inhibidor de proteasas. Se lisaron las células por ruptura con *glass beads* y vortex a 4°C. El lisado se centrifugó a 13000 xg 10 min a 4°C.

Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron teñidas con una solución de Rojo Ponceau para evidenciar la presencia de proteínas totales. Las membranas fueron lavadas y bloqueadas con 5% de leche descremada y 0,05% de Tween 20 en buffer TBS 1X (TrisHCl 50 mM pH=7,6, NaCl 150 mM).

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-Tpk1 (Santa Cruz Biotechnology) o anti-Bcy1.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los experimentos de Inmunoprecipitación de la cromatina se realizaron según Kuras & Struhl (Kuras and Struhl, 1999), con algunas modificaciones. Las células etiquetadas con el epítopo TAP (*MIP6-TAP*) fueron crecidas en medio MMC a 25°C hasta una $OD_{600} = 1$. Luego, la mitad del cultivo fue sometido al ensayo de estrés térmico y ambas muestras fueron tratadas con formaldehído a concentración final 1% durante 20 minutos a temperatura ambiente, con agitación. Se agregó glicina a concentración final 125 mM y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron centrifugadas, lavadas 2 veces con TBS 1X frío, y luego resuspendidas en buffer de lisis FA (HEPES/KOH 50 mM pH=7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0,1%, SDS 0,1%, PMSF 2 mM). Se agregó el mismo volumen de *glass beads* y se rompieron las células en vórtex durante 40 minutos a 4°C. El lisado fue separado de las bolitas de vidrio y se centrifugó para obtener la cromatina. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en buffer de lisis FA.

Las muestras se sonicaron para obtener fragmentos de DNA con un tamaño promedio de ~500 pb (Branson Sonifier, 3 ciclos de 10 segundos con amplitud 20%) y se clarificaron por centrifugación. El sobrenadante se colocó en un tubo conteniendo la resina IgG-Sepharose 6 Fast Flow (GE HealthCare), previamente bloqueada con PBS + BSA 5 mg/ml, y se incubó ON a 4°C con rotación permanente. En este punto, antes de incubar con la resina, se tomó la muestra Input (DNA total). Se realizaron lavados de la resina: 4 veces con buffer de lisis FA, 4 veces con buffer de lisis FA/NaCl 500 mM, 4 veces con buffer de lavado (TrisHCl 10 mM pH=8, LiCl 0,25 mM, EDTA 1 mM, Nonidet P40 0.5%, deoxicolato de sodio 0,5%) y 1 vez con buffer TE 1X. Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas por adición de buffer de elución (TrisHCl 50 mM pH=8, EDTA 10 mM, SDS 1%) e incubadas con proteinasa K (0,25 mg/ml) durante 1 hora a 37°C. Luego, las muestras fueron incubadas ON a 65°C para revertir el *crosslinking* y recuperar los fragmentos de DNA. El DNA inmunoprecipitado (IP) y el DNA total (INPUT) fueron purificados por extracción con fenol:cloroformo.

Para la amplificación de los fragmentos de DNA se utilizaron *primers* que amplifican regiones del promotor de *TPK1* y SYBR Green para la detección del DNA. El DNA inmunoprecipitado (IP) fue normalizado al DNA total (input) y se calculó la relación señal:ruido, en comparación con una cepa no etiquetada con el epítipo TAP. Para calcular el cambio en las veces de unión al promotor se utilizó la siguiente fórmula:

$$2^{-((Ct_{IP\ TAP} - Ct_{INPUT\ TAP}) - (Ct_{IP\ No\ TAP} - Ct_{INPUT\ No\ TAP}))}$$

Ct=Cycle threshold

El programa de PCR realizado fue el siguiente:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95,0 °C	1 min
Ciclos (35)	95,0 °C	1 min
	53,0 °C	30 s
	72,0 °C	30 s
Extensión final	72,0 °C	1 min
Melt Curve Stage	95,0 °C	15 s
	54,0 °C	30 s
	95,0 °C	15 s

Tabla 4: Protocolo de qPCR utilizado para el ensayo de ChIP.

Primer	Secuencia	Posición respecto al TSS de <i>TPK1</i>
<i>TPK1</i> C fw	5' GTCTCCGTTAATCCTAGTCTG 3'	-405/-194
<i>TPK1</i> C rv	5' AAAGTCGTTAGGACACTGGC 3'	
<i>TPK1</i> I3 fw	5' CAAGAACCCTCCGCTGGA 3'	-318/-135
<i>TPK1</i> I3 rv	5' GATCATCATGATTACGTAGAA 3'	

Tabla 5: *Primers* utilizados en la amplificación por qPCR en el ensayo de ChIP.

Ensayo de viabilidad

Para el ensayo de viabilidad las cepas BY4741 y *mip6Δ* fueron crecidas en MMC a 25°C hasta OD₆₀₀ = 0,8-1. Luego se realizaron diluciones seriadas al décimo y se sembraron 5 µl de cada dilución en placas de MMC. Las placas se incubaron a 30°C por 2 a 3 días. Luego, se registró el crecimiento en la placa.

Ensayo de determinación de glucógeno

Para el ensayo de determinación de glucógeno, las cepas BY4741 y *mip6Δ* fueron crecidas en MMC hasta una $OD_{600}=0,8-1$ a 25°C. Las células se centrifugaron a 5000 rpm 5 min, se resuspendieron en 500 μ l de agua y se incubaron con distintas concentraciones de Lugol durante 3 min: TC, $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$. Las células se centrifugaron nuevamente y fueron resuspendidas en 20 μ l de agua para finalmente sembrar gotas de 10 μ l en placa.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba ANOVA de dos factores y prueba de Tukey post-hoc, considerando un $\alpha = 0.05$ para el análisis de significancia estadística. Los supuestos de normalidad se cumplieron en todos los casos, lo que se comprobó utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó el software Graphpad Prism ver. 8.1 para el análisis estadístico y la construcción de los gráficos.

RESULTADOS

La ausencia de Mip6 modifica la expresión de *TPK1*

Se encuentra establecido que los niveles de mRNA de *TPK1* aumentan en estrés térmico en una cepa salvaje, y que esta respuesta es mediada por el factor de transcripción Msn2/4 (Cañonero et al., 2022; Pautasso and Rossi, 2014). Ya que también se ha observado que Mip6 atenúa la expresión de genes dependientes de Msn2/4 en condiciones normales de crecimiento (Martín-Expósito et al., 2019), buscamos evaluar si los niveles endógenos del mRNA de *TPK1* podrían verse afectados por la ausencia de Mip6. Para esto, utilizamos una cepa mutante de delección simple *mip6Δ*, en condiciones de estrés térmico o control.

La cepa salvaje BY4741 y la cepa mutante *mip6Δ* fueron sometidas al ensayo de estrés térmico, y los niveles de mRNA de *TPK1* fueron determinados por RT-qPCR. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 9.

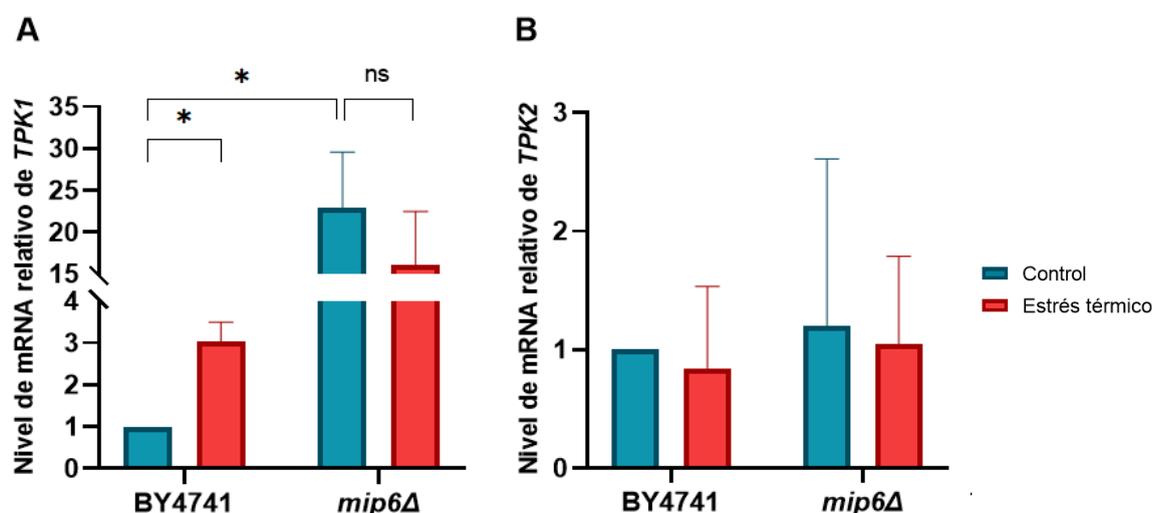


Figura 9: La ausencia de Mip6 genera un incremento sobre los niveles de mRNA de *TPK1*. Los niveles de mRNA (A) de *TPK1* y (B) de *TPK2* fueron medidos en células BY4741 y *mip6Δ* por RT-qPCR. Las células fueron crecidas en MMC a 25°C hasta una $OD_{600}=1$ y posteriormente sometidas al ensayo de estrés térmico. Los niveles de mRNA de *TPK1* y *TPK2* fueron normalizados a los valores de mRNA de *POL1*. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de réplicas ($n=3$ para el mRNA de *TPK1*, $n=2$ para el mRNA de *TPK2*) provenientes de experimentos independientes, relativizados al valor obtenido para la cepa salvaje BY4741 en condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas. ANOVA de dos factores, test de Tukey post-hoc. ns: no significativo. * $p < 0,05$.

Los resultados de la Figura 9, panel A muestran que los niveles de mRNA de *TPK1* aumentan en estrés térmico en la cepa salvaje, un resultado esperado. En el caso de la cepa mutante *mip6Δ* los niveles de mRNA de *TPK1* aumentan de forma significativa de manera independiente a la condición de estrés o control. En el caso de los niveles de mRNA de *TPK2* (Figura 9, panel B), debido al número de réplicas alcanzado (n=2) no puede afirmarse que existan o no diferencias significativas entre cepas y condiciones, pero la tendencia observada indicaría que la ausencia de Mip6 no modificaría los niveles de mensajero de *TPK2*.

Por otro lado, como se menciona en la introducción, Mip6 es una RBP que interactúa física y funcionalmente con el factor de exportación Mex67, y se une preferencialmente al mRNA de transcritos regulados por Msn2/4 en respuesta a estrés, como lo es el mRNA de *TPK1* (Martín-Expósito et al., 2019). Además, Mip6 interactúa física y funcionalmente con proteínas involucradas en el metabolismo del mRNA, como Xrn1, una exorribonucleasa citoplasmática (Martín-Expósito et al., 2019). En base a estos antecedentes, Mip6 podría ser importante en la exportación de los mensajeros, o asociarse con los transcritos para llevarlos a degradación; es decir, Mip6 podría regular pasos en el metabolismo post-transcripcional de *TPK1*. Como primera aproximación para abordar estas hipótesis, se decidió evaluar los niveles proteicos de Tpk1 en condición control y en estrés térmico en la cepa *mip6Δ*.

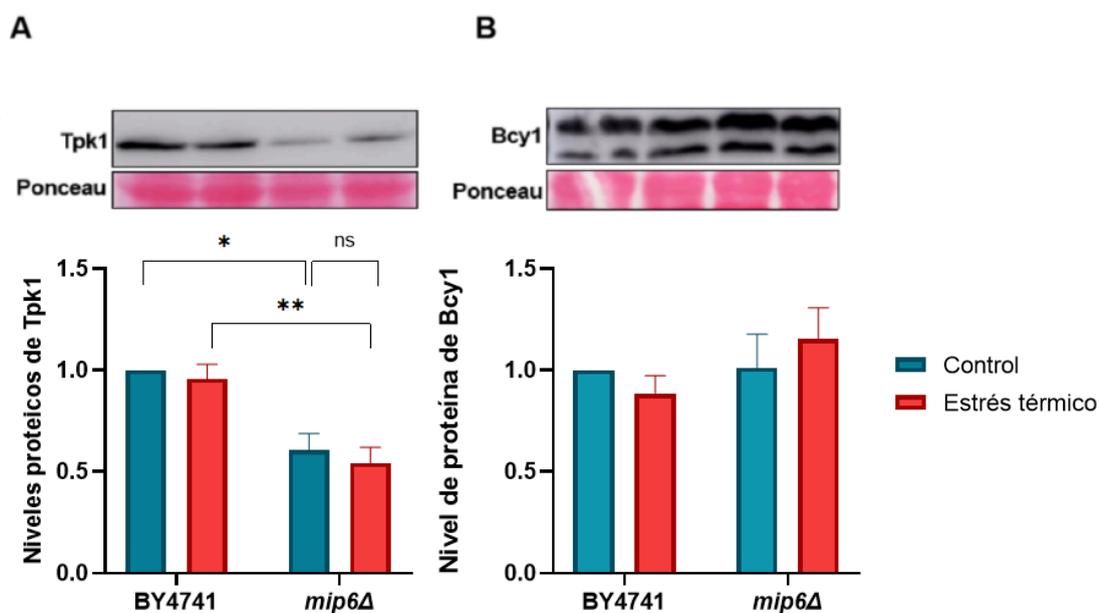


Figura 10: La ausencia de Mip6 disminuye los niveles proteicos de Tpk1. Los niveles de proteína (A) de Tpk1 y (B) de Bcy1 fueron determinados mediante la técnica de *Western*

Blot en las cepas BY4741 y *mip6Δ*. Las células fueron crecidas en MMC a 25°C hasta $OD_{600}=1$ y posteriormente sometidas a ensayo de estrés térmico; luego, se prepararon extractos crudos. La presencia de Tpk1 o Bcy1 en los extractos proteicos fue determinada utilizando el anticuerpo anti-Tpk1 o anticuerpo anti-Bcy1. Los niveles de proteína Tpk1 y Bcy1 (A, panel superior y B, panel superior) fueron obtenidos a través del análisis de las imágenes en *ImageJ* y normalizados a los valores de proteína total observados por tinción de la membrana de nitrocelulosa con Rojo Ponceau (A y B, panel inferior). Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de réplicas (n=3 para los niveles de proteína de Tpk1, n=2 para los niveles de proteína de Bcy1) provenientes de experimentos independientes, relativizados al valor obtenido para la cepa salvaje BY4741 en condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas. ANOVA de dos factores, test de Tukey post-hoc. ns: no significativo. *p < 0,05. **p < 0,001.

La Figura 10, panel A muestra que los niveles de proteína Tpk1 en ausencia de Mip6 disminuyen, nuevamente de forma independiente a la condición ensayada. Para determinar si la regulación de Mip6 es específica para la subunidad Tpk1, se evaluaron los niveles proteicos de la subunidad regulatoria Bcy1 en las mismas cepas y condiciones. La Figura 10, panel B sugiere que Mip6 no tendría un rol sobre la expresión de esta subunidad ya que no hay variaciones en los niveles de proteína de Bcy1. Sin embargo, no se puede afirmar esto, ya que no se cuenta con réplicas biológicas suficientes.

A simple vista, la tendencia en los niveles de mensajero y en los niveles proteicos parecerían ser opuestas y por lo tanto, contradictorias, ya que a pesar de que aumentan los niveles de mRNA de *TPK1* en ausencia de Mip6, el nivel de proteína Tpk1 disminuye. Una posible explicación es que la totalidad del mRNA no es traducido. Para evidenciar esto, se calculó la relación entre el nivel de proteína y el nivel de mRNA del gen *TPK1*.

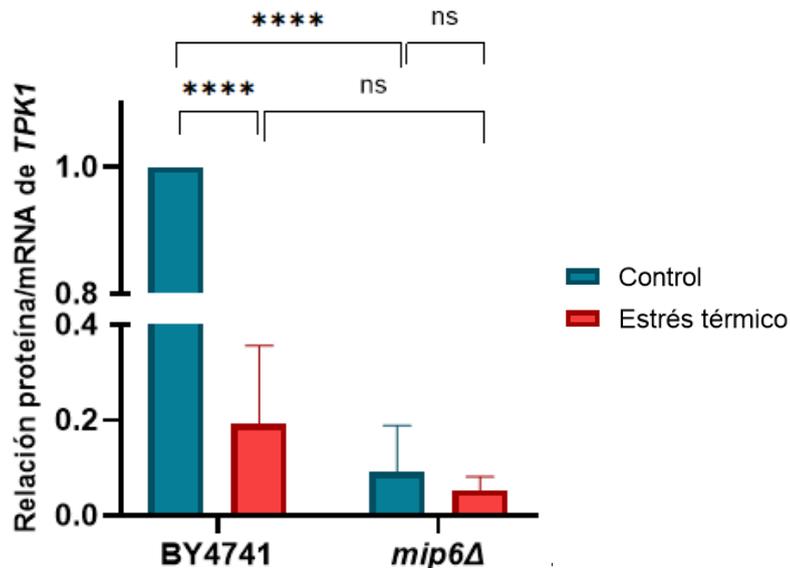


Figura 11: La relación proteína/mRNA del gen *TPK1* disminuye en ausencia de Mip6. Se calculó, para las cepas BY4741 y *mip6Δ* sometidas o no al ensayo de estrés térmico, el cociente entre los niveles endógenos de mRNA de TPK1 y los niveles de proteína de Tpk1 en cada réplica biológica. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de réplicas ($n=3$) provenientes de experimentos independientes, relativizados al valor obtenido para la cepa salvaje BY4741 en condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas. ANOVA de dos factores, test de Tukey post-hoc. ns: no significativo. **** $p < 0,0001$.

La Figura 11 muestra una baja relación proteína/mRNA para la cepa salvaje en condición de estrés. Esto es esperable, ya que en estrés térmico ocurre la formación de gránulos de estrés que secuestran mRNAs y partes de la maquinaria traduccional, impidiendo así la traducción. La cepa mutante también registró una disminución en la eficiencia traduccional de *TPK1* en ambas condiciones; esto indicaría que en ausencia de Mip6 no todo el mRNA de *TPK1* es traducido, aún en ausencia de estrés térmico.

Ya que Mip6 interactúa con múltiples moléculas involucradas en el metabolismo y maduración de los mRNA, existen varios posibles mecanismos que explican los resultados observados. En primer lugar, el aumento de los niveles de mRNA podría deberse a un aumento en la transcripción misma del gen, a través de una regulación negativa por parte de Mip6 sobre Rpb1 (Martín-Expósito et al., 2019), una subunidad de la RNA Polimerasa II.

Por otro lado, como ya hemos mencionado, Mip6 interactúa también con Mex67, y esta interacción es necesaria para que Mip6 lleve a cabo la atenuación de la expresión de los genes dependientes de Msn2/4 en condición control. En base a

esto, el rol atenuante de Mip6 podría relacionarse con la exportación de los mRNA: ante la ausencia de Mip6, el mensajero podría no ser exportado correctamente y esto generar una acumulación del transcripto en el núcleo, lo cual provocaría una disminución en la eficiencia de traducción ya que la maquinaria traduccional citoplasmática no podría encontrarse con el sustrato.

También, Mip6 se asocia con Rrp6 y Xrn1, dos moléculas involucradas con la degradación del mRNA. Rrp6 es un componente del exosoma nuclear, mientras que Xrn1 es una proteína con actividad exonucleasa que se encuentra en el citoplasma. La ausencia de Mip6 podría explicar el aumento en los niveles de mensajero a través de un menor nivel de degradación del mensajero de *TPK1*, ya que la RBP tendría la función de acercar físicamente el mRNA al componente del exosoma o a la exonucleasa en condiciones normales.

El aumento en la actividad del promotor de *TPK1* en estrés térmico es dependiente de Mip6:

En base a los resultados obtenidos, se decidió evaluar si Mip6 interviene en la regulación de la actividad del promotor *TPK1*. Como se menciona en la Introducción, nuestro grupo ha demostrado que frente al estrés térmico la actividad del promotor de *TPK1* aumenta, y que este incremento es mediado por el factor de transcripción Msn2/4 (Pautasso and Rossi, 2014). Además, se sabe que Mip6 ayuda a mantener niveles bajos de mRNAs cuya expresión aumenta en estrés térmico gracias al factor de transcripción Msn2/4 (Martín-Expósito et al., 2019). Por lo tanto, nos preguntamos si Mip6 actúa a nivel de la activación del promotor de *TPK1*.

Para esto se transformó la cepa *mip6* Δ con el plásmido reportero *pTPK1-lacZ* descrito en materiales y métodos. Se realizó el *screening* de dos colonias transformantes por ensayo de actividad β -galactosidasa. En la Figura 12 se observa que el Clon 1 presenta actividad reportera en ambas condiciones, mientras que en el Clon 2 sólo hubo actividad en estrés. Por lo tanto, se decidió seguir trabajando sólo con el clon 1.

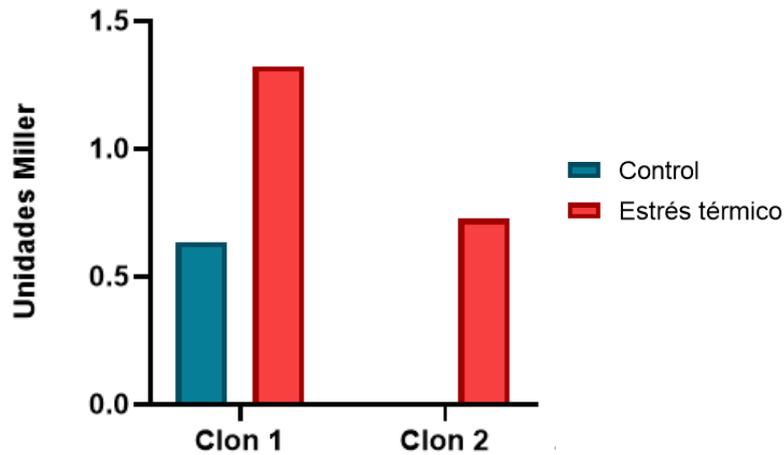


Figura 12: Se midió la actividad β -galactosidasa de dos clones de células *mip6* Δ transformadas con el plásmido *pTPK1-lacZ*. Las células fueron crecidas en medio mínimo depletado de uracilo a 25°C y sometidas al ensayo de estrés térmico. El resultado de actividad β -galactosidasa se expresa en Unidades Miller.

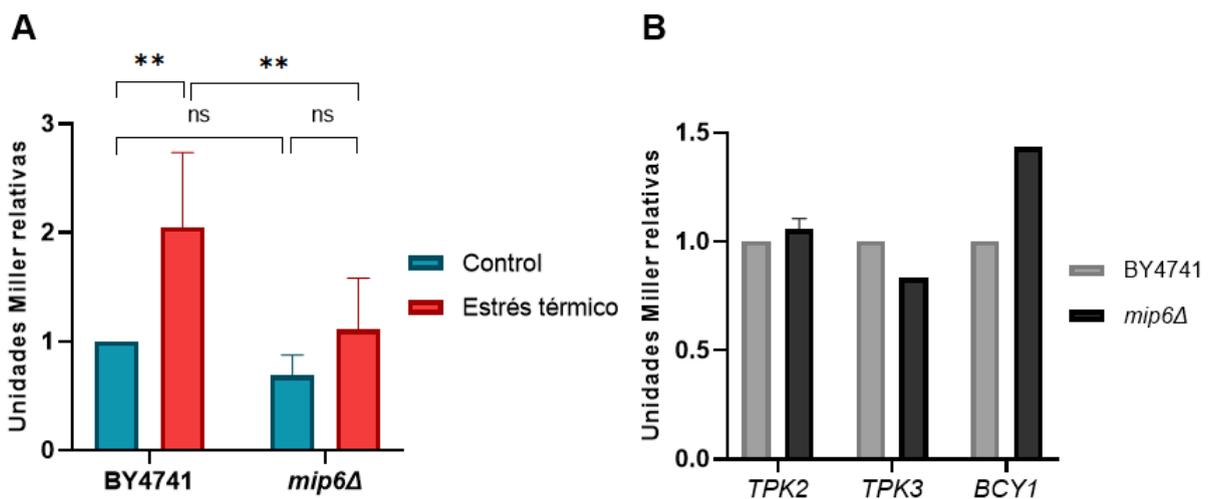


Figura 13: La ausencia de Mip6 disminuye la actividad del promotor de *TPK1* en estrés térmico. Se midió la actividad β -galactosidasa en células BY4741 y *mip6* Δ transformadas con el plásmido (A) *pTPK1-lacZ* y (B) *pTPK2-lacZ*, *pTPK3-lacZ* y *pBCY1-lacZ*. Las células fueron crecidas en medio mínimo depletado de uracilo a 25°C y sometidas al ensayo de estrés térmico. Los resultados de actividad β -galactosidasa se expresan en Unidades de Miller como el promedio \pm SD de réplicas (n=3 *TPK1*, n=2 *TPK2*, n=1 *TPK3* y *BCY1*) provenientes de experimentos independientes, relativizados al valor obtenido para la cepa salvaje BY4741 en condición control. Los asteriscos indican diferencias significativas. (A) ANOVA de dos factores, test de Tukey post-hoc. (B) No se realizó test estadístico por falta de réplicas biológicas. ns: no significativo. **p < 0,01.

El ensayo de genes reporteros (Figura 13, panel A) muestra que la ausencia de Mip6 impide el incremento de la actividad del promotor de *TPK1* en respuesta al estrés térmico, como sucede en la cepa *wild-type*. Esto resulta contradictorio con los resultados mencionados anteriormente donde observamos que la ausencia de Mip6 genera un incremento en los niveles del mRNA de *TPK1*.

El efecto positivo que Mip6 presenta sobre la actividad del promotor sugiere una función de Mip6 en la regulación de la transcripción de *TPK1* en estrés térmico. Esto podría estar posiblemente relacionado con la asociación entre Mip6 y Msn2/4, o con su interacción con Rpb1. Sin embargo, la relación entre Mip6 y Rpb1 no explicaría el aumento en los niveles de mRNA observado en la mutante *mip6Δ*.

En la Figura 13, panel B se grafica el efecto de Mip6 sobre la actividad de los promotores *TPK2*, *TPK3* y *BCY1* en condición control, y en los tres casos la tendencia de los datos indicaría que la ausencia de Mip6 no altera la actividad de estos promotores. Sin embargo, no se cuenta con suficientes réplicas biológicas para realizar un test estadístico.

Mip6 se recluta al promotor de *TPK1*

Como Mip6 mostró tener un rol en la activación del promotor de *TPK1* (Figura 13, panel A), decidimos estudiar si la RBP es reclutada a dicho promotor.

Como Mip6 contribuye a mantener controlados los niveles de mRNA de genes de respuesta a estrés regulados por Msn2/4, hipotetizamos que Mip6 podría ser reclutada al promotor de *TPK1* a través de su interacción con este factor de transcripción. Para abordar este objetivo, realizamos un ensayo de ChIP-qPCR delimitando la región del promotor evaluada a aquella que posee dominios STRE, a los cuales se une Msn2/4.

Para esto, se utilizaron dos pares de primers, los cuales amplifican regiones diferentes del promotor. La región específica de amplificación de cada par de *primers* se detalla en la Figura 14; el par de *primers* C incluye ambos sitios STRE registrados para el promotor de *TPK1*, mientras que el par de *primers* I3 sólo incluye el dominio STRE D.

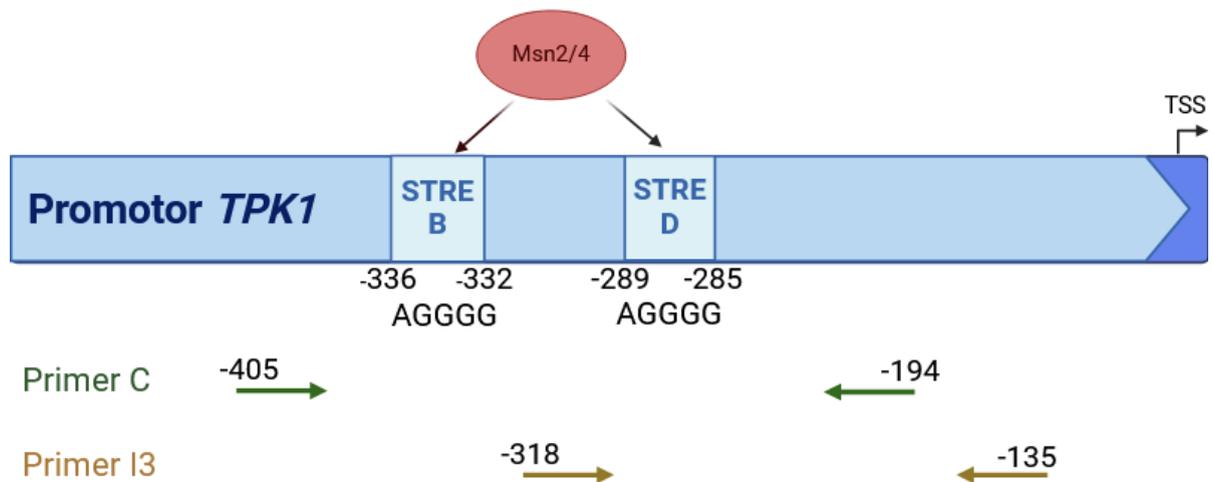


Figura 14: Esquematación de la región de unión del factor Msn2/4 al promotor de *TPK1* y la región de amplificación de los primers utilizados. Las flechas verdes corresponden al par Primers C, que amplifica la región comprendida entre las posiciones -405 y el -194 con respecto al TSS del gen *TPK1*; las flechas amarillo oscuro corresponden al par Primers I3, que amplifican la región entre -318 y -135. Adaptado de Pautasso (2014).

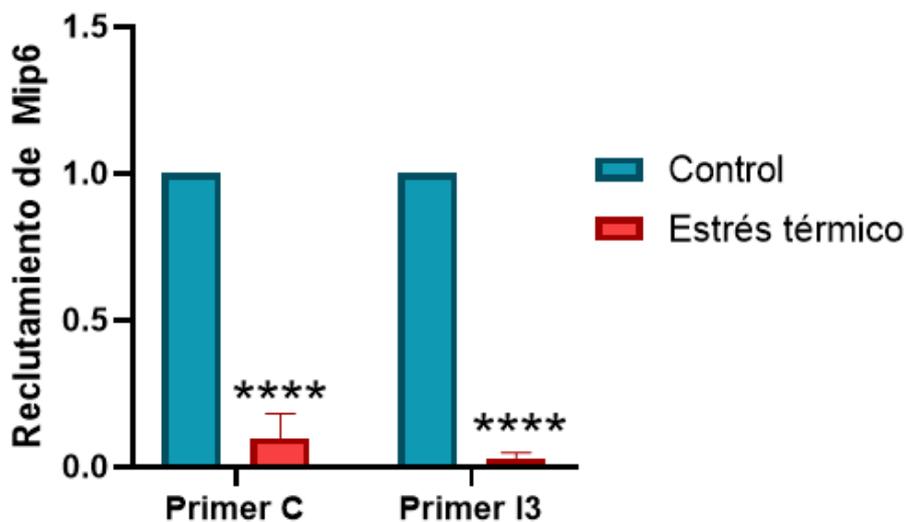


Figura 15: Reclutamiento de Mip6 al promotor *TPK1*. Las células de la cepa *MIP6-TAP* fueron crecidas en MMC a 25°C y sometidas a ensayo de estrés térmico. La abundancia de la proteína sobre el promotor fue analizada utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina y qPCR. Se utilizaron dos pares de primers, par C y par I3, los cuales amplifican zonas diferentes del promotor. La abundancia de Mip6 fue normalizada al DNA total (input); la cepa BY4741 fue utilizada como control inespecífico. Los resultados se expresan como el promedio \pm SD de tres experimentos independientes, relativizados a la condición control. ANOVA de dos factores, test de Tukey post-hoc. ****p < 0,0001.

El gráfico mostrado en la Figura 15 permite observar un reclutamiento diferencial de la proteína Mip6 entre las distintas condiciones de temperatura. En la condición control, Mip6 se encuentra enriquecida en la región del promotor *TPK1*, pero este reclutamiento disminuye en consecuencia a la exposición al estrés térmico. Hasta el momento, no se han identificado dominios de unión al DNA para la proteína Mip6, por lo que proponemos que Mip6 podría interactuar con el promotor de *TPK1* a través de algún factor de transcripción, como por ejemplo Msn2/4. Además, el patrón de reclutamiento observado para Mip6 coincide con el observado para el factor de transcripción Msn2/4: Msn2/4 se encuentra en el promotor de *TPK1* en condiciones normales de crecimiento y esta unión se pierde frente a estrés térmico (Pautasso and Rossi, 2014).

Efecto de Mip6 en la viabilidad y el almacenamiento de glucógeno

Se evaluó cómo la ausencia de la proteína Mip6 altera la viabilidad celular de *Saccharomyces cerevisiae*, así como también cómo afecta el almacenamiento de glucógeno, ya que la actividad PKA es determinante para estos fenotipos.

La glucosa, el estímulo principal en la activación de la holoenzima, al ser incorporada en la célula tiene dos caminos posibles: puede utilizarse en reacciones metabólicas que favorezcan el crecimiento celular o ser almacenada en moléculas complejas, como el glucógeno.

La PKA inhibe enzimas regulatorias de la gluconeogénesis y favorece la utilización de la glucosa para la obtención de energía, ya que estimula la actividad de enzimas regulatorias de la glucólisis (Thevelein and de Winde, 1999). Es por esto que mayor actividad de la vía cAMP-PKA resulta en menor almacenamiento de glucógeno.

Por otro lado, la actividad de la PKA promueve la progresión de la fase G1, por lo tanto, favorece el avance del ciclo celular (Baroni et al., 1992; Dechant and Peter, 2008). Además, una baja actividad de la quinasa se asocia con la falta de síntesis de ciclinas necesarias para el progreso del ciclo (Thevelein and de Winde, 1999).

Para evaluar la acumulación de glucógeno en la célula se realizó el ensayo descrito en Materiales y Métodos. En este experimento, un color más intenso y oscuro significa una mayor acumulación de glucógeno, a partir de lo cual se infiere que hay menor actividad de la PKA. Para el ensayo de viabilidad celular se

realizaron diluciones seriadas al décimo de la cepa *mip6Δ* y la cepa salvaje BY4741 y se sembraron 10 µl en una placa de MMC, y se incubó 72 horas a 30°C.

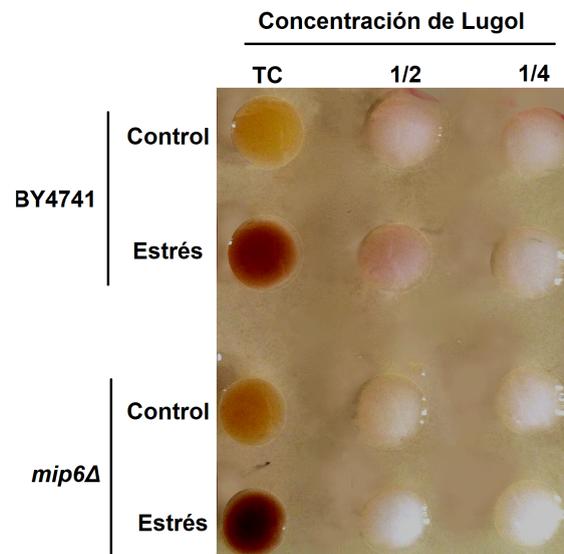


Figura 16: Ensayo de almacenamiento de glucógeno representativo en las cepas BY4741 y *mip6Δ*. TC (Tal Cual), 1/2 y 1/4 representan las diluciones del Lugol con el cual se tiñeron las células.

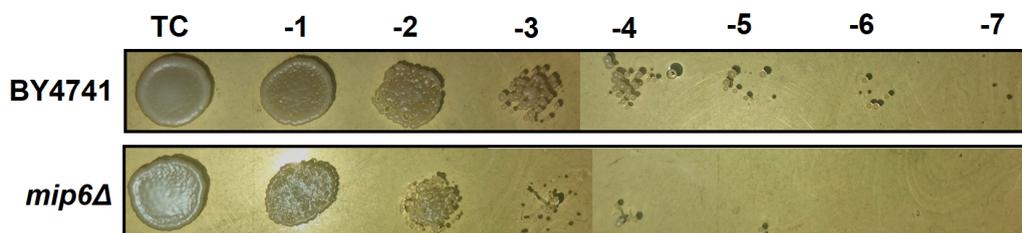


Figura 17: Ensayo de viabilidad representativo en las cepas BY4741 (*wild-type*) y la cepa mutante *mip6Δ*. Los números representan el exponente de la dilución (en base 10), TC representa la muestra no diluída (Tal Cual).

En la Figura 16 se observa un mayor almacenamiento de glucógeno en la cepa *mip6Δ*, tanto en condición control como frente al estrés térmico, con respecto a la cepa BY4741. En línea con esto, en la Figura 17 se observa que la viabilidad de la cepa mutante, *mip6Δ* es menor que la de la cepa *wild-type*. Por lo tanto, la cepa *mip6Δ* presenta menor actividad de la PKA.

Estos resultados son esperados, ya que la actividad de la PKA promueve el avance del ciclo celular (Baroni et al., 1992; Dechant and Peter, 2008) y la utilización de la glucosa. Por lo tanto, ante la reducción en la actividad de la PKA, habrá menor

cantidad de divisiones celulares, lo que ocurre en detrimento al crecimiento de la colonia, así como también el azúcar será acumulado en moléculas complejas como el glucógeno.

Previamente observamos que los niveles proteicos de Tpk1 disminuyen ante la ausencia de Mip6 (Figura 10, panel A), por lo que podría esperarse una menor actividad de la PKA, y en consecuencia, menor viabilidad y mayor almacenamiento de glucógeno. Sin embargo, Tpk1 es una de las tres subunidades de la enzima, y aunque los niveles de la holoenzima sean menores, el nivel de la actividad quinasa podría no reducirse.

De hecho, el almacenamiento de glucógeno en la cepa *mip6Δ* aumenta en estrés térmico con respecto al control, pero los niveles proteicos de Tpk1 no varían entre estas condiciones. Entonces, en este caso la disminución de la actividad de la PKA evidenciada en el aumento del almacenamiento del glucógeno no se debe a variaciones en los niveles proteicos de Tpk1.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo ha tenido como objetivo principal profundizar sobre los distintos aspectos involucrados en la regulación de la especificidad de la vía cAMP-PKA en *Saccharomyces cerevisiae*. Particularmente, nos enfocamos en estudiar el efecto de la RBP Mip6 sobre la expresión de *TPK1* a varios niveles durante el estrés térmico.

Hemos demostrado que la ausencia de Mip6 generó un marcado incremento en los niveles de mRNA de *TPK1* (Figura 9, panel A), y este efecto ocurre en concordancia con el rol descrito para Mip6 en la atenuación en la expresión de genes regulados por Msn2/4 en condiciones de no estrés (Martín-Expósito et al., 2019). Sin embargo, con respecto a la actividad del promotor de *TPK1*, la falta de la RBP impidió la activación del promotor frente a estrés térmico (Figura 13, panel A). Esto señala la necesidad de Mip6 en la respuesta a estrés de *TPK1*. El efecto observado sobre la actividad del promotor podría deberse a una posible interacción entre Mip6 y Msn2/4. Una posible explicación es que Mip6 sea necesaria para el reclutamiento de Msn2/4 al promotor de *TPK1*. Sin embargo, la interacción física entre estas dos proteínas aún no ha sido demostrada.

Un mecanismo posible que justifica la falta de incremento de la actividad del promotor en estrés térmico podría relacionarse con la interacción física que se describe para Mip6 con Sgf3 y Sus1, proteínas que conforman el módulo DUB del complejo SAGA, el cual estimula la formación del complejo de preiniciación sobre el promotor de los genes al inicio de la transcripción y realiza modificaciones en las histonas de la cromatina que favorecen la transcripción (Martín-Expósito et al., 2019). Si Mip6 tiene un efecto positivo sobre la actividad de estas proteínas mencionadas, cuya actividad estimula la transcripción, explicaría la disminución en la actividad del promotor de *TPK1*. Pero las hipótesis propuestas no justifican el aumento de los niveles de mensajero frente a la ausencia de Mip6, y el rol descrito para Mip6 es en la atenuación de la expresión de genes dependientes de Msn2/4 fuera de estrés, no en el aumento de la expresión en estrés térmico.

La discrepancia entre la actividad del promotor de *TPK1* y sus niveles de mRNA en la cepa mutante nos lleva a pensar que Mip6 podría estar actuando en múltiples niveles regulatorios, como a nivel transcripcional y también a nivel de metabolismo del mensajero. Existe evidencia que indica que la vida del mRNA está

altamente regulada por proteínas que controlan su almacenamiento y degradación, incluyendo factores de transcripción o moduladores (Bregman et al., 2011; Haimovich et al., 2013; Medina et al., 2014). Los pasos sobre los cuales Mip6 podría tener rol sobre la regulación son la exportación, por su interacción con Mex67, y la degradación del mensajero, por su interacción con Xrn1 y Rrp6.

Al ser una RBP, Mip6 podría interactuar con el mRNA de *TPK1* y por su interacción con las exonucleasas, acercar el mensajero al complejo de degradación. Entonces, la ausencia de Mip6 disminuiría la degradación del mRNA y por ende aumentaría los niveles del mismo. Por otro lado, Mex67 es necesario en la regulación de la expresión de genes dependientes de Msn2/4 por Mip6 (Martín-Expósito et al., 2019). Esta interacción podría ser necesaria para la exportación de los mensajeros, lo que provocaría una acumulación del mRNA en el núcleo y explicaría el incremento en los niveles de mRNA en la cepa *mip6Δ*: el mRNA de *TPK1* al acumularse en el núcleo no podría ser degradado por exonucleasas citoplasmáticas, y al ser un mensajero maduro, tampoco sería degradado por el exosoma nuclear, ya que este degrada principalmente mensajero cuya transcripción fue incorrecta. En base a los resultados de la Figura 9, panel A, no es posible determinar si el aumento en los niveles endógenos de mRNA de *TPK1* se deben a una disminución en la degradación o en un aumento en su vida media; sí es posible establecer que el aumento en el nivel de mRNA en la cepa mutante no se debe a un aumento en la transcripción del gen, ya que la Figura 13, panel A muestra que la actividad del promotor no en aumenta en ausencia de Mip6.

Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que en una cepa *xrn1Δ*, los niveles de mRNA de *TPK1* aumentan significativamente, mientras que los niveles de proteína disminuyen; al mismo tiempo, la ausencia de Xrn1 impide el incremento de la actividad del promotor de *TPK1*, y se registra reclutamiento de la exonucleasa al promotor de *TPK1* en estrés térmico (Resultados no publicados, Ortolá-Martínez). Esta evidencia nos inclina a pensar que el efecto observado en la cepa mutante *mip6Δ* se deba a su interacción funcional con Xrn1. En primer lugar, como se describió anteriormente, la ausencia de la RBP provocaría la falta de interacción entre el mensajero y la exonucleasa, disminuyendo la degradación del mRNA y en consecuencia generando el aumento de sus niveles en la cepa mutante. Por otro lado, existe evidencia que Xrn1 se asocia a la cromatina para activar la transcripción durante el estrés (García-Martínez et al., 2021), y si Mip6 fuera necesaria para esa

interacción, esto justificaría los resultados obtenidos en el ensayo de gen reportero, y que este haya sido el mismo para las cepas *mip6Δ* y *xrn1Δ*. Por el momento, no se ha registrado interacción física entre Mip6 y Xrn1. No obstante, esta última hipótesis no justifica la disminución en los niveles proteicos de Tpk1 (Figura 10, panel A) y la disminución en la eficiencia de traducción de Tpk1 (Figura 11) en ausencia de Mip6. Estos resultados sí serían explicados por la interacción de Mip6 con Mex67, descrita anteriormente. Sin embargo, como la cepa *xrn1Δ* presenta también una disminución en los niveles proteicos de Tpk1, idéntico al observado en *mip6Δ*, podría haber más de un mecanismo involucrado.

Con respecto a la cepa salvaje, se sabe que en estrés térmico hay represión traduccional global en la mayoría de los eucariotas cuando se someten a estrés térmico (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000), por lo que la disminución en la relación proteína/mRNA de *TPK1* en la cepa salvaje en estrés térmico se explica por esto. Además, el mensajero de *TPK1* se localiza en *foci* particulares durante estrés térmico, lo que impide su traducción (Cañonero et al., 2022).

Habiendo demostrado que Mip6 participa en la regulación transcripcional de *TPK1*, evaluamos el reclutamiento de Mip6 en presencia y ausencia de estrés térmico. En condiciones normales de crecimiento la RBP se encuentra reclutada en el promotor de *TPK1* (Figura 15), pero este reclutamiento disminuye pronunciadamente en estrés térmico, contrario a lo que ocurre con Xrn1 (Resultados no publicados, Ortolá-Martínez); por lo tanto, la idea mencionada previamente vinculando Mip6 al reclutamiento de Xrn1 al promotor de *TPK1*, y este activando su transcripción, quedaría descartada. Como se menciona en la sección de resultados, Mip6 no posee dominios de unión al DNA, por lo que planteamos que la proteína Msn2/4 podría interactuar tanto con el promotor de *TPK1* como con la proteína Mip6. Esta idea es apoyada por el hecho que Msn2/4 presenta el mismo patrón de reclutamiento que Mip6 al promotor de *TPK1* (Pautasso and Rossi, 2014), y que la zona evaluada del promotor de *TPK1* posee elementos STRE, a los cuales se une Msn2/4. Esta evidencia se contrapone a la idea de que Mip6 posee un efecto positivo sobre Sgf3 o Sus1, ya que esta función se daría en estrés térmico, situación en la cual la RBP no se encuentra reclutada en el promotor. Habiendo descartado esto, proponemos que Mip6 permite la respuesta a estrés mediada por Msn2/4 interactuando con este, y por lo tanto, los efectos observados en la actividad del

promotor en la cepa mutante (Figura 13, panel A) se deben a la falta de interacción entre Mip6 y Msn2/4. Esta hipótesis se podría validar realizando un ensayo de co-inmunoprecipitación entre estas dos proteínas para evaluar su interacción física, como también evaluar el efecto de la ausencia de Mip6 sobre otros genes de respuesta a estrés regulados por elementos STRE y el factor Msn2/4.

Finalmente, en lo que respecta a los fenotipos, se observó que la cepa *mip6Δ* muestra menor viabilidad celular y mayor acumulación de glucógeno que la cepa BY4741, lo que ocurre en concordancia con la acumulación de otra reserva de azúcar, la trehalosa, inducida por el estrés térmico en la cepa *mip6Δ* (Nuño-Cabanes et al., 2020). Esto significa que la ausencia de Mip6 genera una disminución en la actividad de la PKA. La baja actividad de la holoenzima podría asociarse con la disminución en los niveles proteicos de Tpk1 hasta cierto punto, ya que la PKA posee también otras dos subunidades catalíticas, Tpk2 y Tpk3, cuyos niveles proteicos no fueron evaluados. Además, la variación en los niveles de proteína no posee una relación directa con la actividad de las mismas, por lo que la baja actividad de la PKA observada en ausencia de Mip6 podría deberse a otras razones. Como Mip6 se asocia con mRNAs de genes regulados por Msn2/4, y este es un importante modulador de la respuesta a estrés a través de los elementos STRE, la ausencia de la RBP estudiada en este trabajo podría tener un papel en la ESR gatillada por estrés térmico. Esto le daría a Mip6 una gran función regulando el programa de expresión desencadenado por Msn2/4.

Nuestros resultados han demostrado que la ausencia de Mip6 impide el aumento en la actividad del promotor de *TPK1* frente al estrés térmico, pero aumenta los niveles del mRNA y disminuye los niveles proteicos. Proponemos entonces que Mip6 podría modular la regulación tanto transcripcional como post-transcripcional del gen *TPK1*, afectando así la especificidad del camino cAMP-PKA. Creemos que esta subunidad de la PKA es regulada por esta RBP a través de su interacción con Msn2/4, ya que presenta un patrón de reclutamiento similar al promotor de *TPK1*, por su interacción física con Mex67, y por su interacción funcional con Xrn1. El efecto observado sobre la actividad de la PKA a través de los ensayos de fenotipo, por otro lado, puede deberse a que la regulación llevada a cabo por Mip6 sobre *TPK1* ocurra también en otros genes dependientes de Msn2/4, involucrados en la respuesta a estrés. Esto podría alterar la actividad de

la PKA de manera indirecta; por ejemplo, regulando la expresión de un inhibidor de la holoenzima.

En conclusión, nuestros resultados sobre la regulación transcripcional y post-transcripcional del gen *TPK1* en condiciones normales y de estrés térmico contribuyen a la comprensión de la sucesión de pasos que regulan la expresión de la quinasa, y que participan en el mantenimiento de la especificidad de la vía de señalización cAMP-PKA de *Saccharomyces cerevisiae*.

PERSPECTIVAS

Con el fin de continuar con la elucidación del mecanismo por el cual Mip6 regula transcripcional y post-transcripcionalmente la expresión del gen *TPK1*, en primer lugar, plantearíamos evaluar la participación de la RBP en la exportación y localización en gránulos del mRNA de *TPK1*, ya que se encuentra descrito que este se acumula en *foci* citoplasmáticos durante estrés térmico (Cañonero et al., 2022), y que Mip6 se acumula en gránulos de estrés durante estrés térmico (Martín-Expósito et al., 2019). Por microscopía de fluorescencia confocal podría analizarse la localización subcelular de los mensajeros de *TPK1* en las células salvajes y mutantes en condiciones control y frente al estrés térmico, y evaluar la co-localización con Mip6.

Por otro lado, también quisiéramos estudiar la interacción física entre Mip6 y Msn2/4, realizando un ensayo de co-inmunoprecipitación. En línea con esto, buscaríamos evaluar si el reclutamiento de Mip6 sobre el promotor de *TPK1* es dependiente de Msn2/4, para lo cual podría repetirse el ensayo de ChIP-qPCR de Mip6 sobre el promotor de *TPK1* en una cepa doble mutante *msn2Δmsn4Δ*. También, se podría repetir los mismos experimentos realizados en este trabajo, pero evaluando distintos genes de respuesta a estrés regulados por Msn2/4. Podría evaluarse también la interacción física entre Xrn1 y Mip6 mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baillie, G.S., Scott, J.D., Houslay, M.D., 2005. Compartmentalisation of phosphodiesterases and protein kinase A: opposites attract. *FEBS Lett.* 579, 3264–3270. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.089>

Baroni, M.D., Monti, P., Marconi, G., Alberghina, L., 1992. cAMP-mediated increase in the critical cell size required for the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell Res.* 201, 299–306. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90277-f](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90277-f)

Barraza, C.E., Solari, C.A., Marcovich, I., Kershaw, C., Galello, F., Rossi, S., Ashe, M.P., Portela, P., 2017. The role of PKA in the translational response to heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 12, e0185416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185416>

Beck, T., Hall, M.N., 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689–692. <https://doi.org/10.1038/45287>

Berry, D.B., Gasch, A.P., 2008. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 4580–4587. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-07-0680>

Bonnet, J., Wang, C.-Y., Baptista, T., Vincent, S.D., Hsiao, W.-C., Stierle, M., Kao, C.-F., Tora, L., Devys, D., 2014. The SAGA coactivator complex acts on the whole transcribed genome and is required for RNA polymerase II transcription. *Genes Dev.* 28, 1999–2012. <https://doi.org/10.1101/gad.250225.114>

Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., Jacquet, M., 1998. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 1044–1052. <https://doi.org/10.1128/JB.180.5.1044-1052.1998>

Bregman, A., Avraham-Kelbert, M., Barkai, O., Duek, L., Guterman, A., Choder, M., 2011. Promoter elements regulate cytoplasmic mRNA decay. *Cell* 147, 1473–1483. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.005>

Cañonero, L., Pautasso, C., Galello, F., Sigaut, L., Pietrasanta, L., Arroyo, J., Bermúdez-Moretti, M., Portela, P., Rossi, S., 2022. Heat stress regulates the expression of TPK1 gene at transcriptional and post-transcriptional levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1869, 119209. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119209>

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., Young, R.A., 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 12, 323–337. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.323>

Chevtzoff, C., Vallortigara, J., Avéret, N., Rigoulet, M., Devin, A., 2005. The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 117–125.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.10.001>

Creamer, D.R., Hubbard, S.J., Ashe, M.P., Grant, C.M., 2022. Yeast Protein Kinase A Isoforms: A Means of Encoding Specificity in the Response to Diverse Stress Conditions? *Biomolecules* 12, 958. <https://doi.org/10.3390/biom12070958>

Dechant, R., Peter, M., 2008. Nutrient signals driving cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 678–687. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.09.009>

Derrer, C.P., Mancini, R., Vallotton, P., Huet, S., Weis, K., Dultz, E., 2019. The RNA export factor Mex67 functions as a mobile nucleoporin. *J. Cell Biol.* 218, 3967–3976. <https://doi.org/10.1083/jcb.201909028>

Dieppois, G., Iglesias, N., Stutz, F., 2006. Cotranscriptional recruitment to the mRNA export receptor Mex67p contributes to nuclear pore anchoring of activated genes. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7858–7870. <https://doi.org/10.1128/MCB.00870-06>

Estruch, F., Carlson, M., 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3872–3881. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.7.3872-3881.1993>

Galello, F., Moreno, S., Rossi, S., 2014. Interacting proteins of protein kinase A regulatory subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteomics* 109, 261–275. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.008>

Galello, F., Portela, P., Moreno, S., Rossi, S., 2010. Characterization of substrates that have a differential effect on *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase A holoenzyme activation. *J. Biol. Chem.* 285, 29770–29779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.120378>

Gancedo, J.M., 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 107–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x>

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 Biol.* 18, 1458–1474. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1857521>

Garreau, H., Hasan, R.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Read. Engl.* 146 (Pt 9), 2113–2120. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2113>

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., Brown, P.O., 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>

Görner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., Schüller, C., 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12, 586–597.

<https://doi.org/10.1101/gad.12.4.586>

Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H., Schüller, C., 2002. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.* 21, 135–144. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.1.135>

Gross, S., Moore, C., 2001. Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of *Saccharomyces cerevisiae* cleavage factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6080–6085. <https://doi.org/10.1073/pnas.101046598>

Hackmann, A., Wu, H., Schneider, U.-M., Meyer, K., Jung, K., Krebber, H., 2014. Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. *Nat. Commun.* 5, 3123. <https://doi.org/10.1038/ncomms4123>

Haimovich, G., Choder, M., Singer, R.H., Trcek, T., 2013. The fate of the messenger is pre-determined: a new model for regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.01.004>

Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A.-D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., Toledano, M.B., 2002. The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol. Microbiol.* 45, 233–241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03011.x>

Hooshyar, M., Jessulat, M., Burnside, D., Kluew, A., Babu, M., Golshani, A., 2020. Deletion of yeast TPK1 reduces the efficiency of non-homologous end joining DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 533, 899–904. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.083>

Iglesias, N., Tutucci, E., Gwizdek, C., Vinciguerra, P., Von Dach, E., Corbett, A.H., Dargemont, C., Stutz, F., 2010. Ubiquitin-mediated mRNP dynamics and surveillance prior to budding yeast mRNA export. *Genes Dev.* 24, 1927–1938. <https://doi.org/10.1101/gad.583310>

Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., Guan, K.-L., 2005. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 69, 79–100. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.79-100.2005>

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A., 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.163-168.1983>

Jessulat, M., Amin, S., Hooshyar, M., Maly, R., Moutaoufik, M.T., Zilocchi, M., Istace, Z., Phanse, S., Aoki, H., Omid, K., Burnside, D., Samanfar, B., Aly, K.A., Golshani, A., Babu, M., 2021. The conserved Tpk1 regulates non-homologous end joining double-strand break repair by phosphorylation of Nej1, a homolog of the human XLF. *Nucleic Acids Res.* 49, 8145–8160. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab585>

Jin, L., Zhang, K., Sternglanz, R., Neiman, A.M., 2017. Predicted RNA Binding Proteins Pes4 and Mip6 Regulate mRNA Levels, Translation, and Localization during Sporulation in Budding Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 37, e00408-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.00408-16>

Johnson, K.E., Cameron, S., Toda, T., Wigler, M., Zoller, M.J., 1987. Expression in

Escherichia coli of BCY1, the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 262, 8636–8642.

Jones, C.I., Zabolotskaya, M.V., Newbury, S.F., 2012. The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 455–468. <https://doi.org/10.1002/wrna.1109>

Kuras, L., Struhl, K., 1999. Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399, 609–613. <https://doi.org/10.1038/21239>

Lee, M.S., Henry, M., Silver, P.A., 1996. A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev.* 10, 1233–1246. <https://doi.org/10.1101/gad.10.10.1233>

Lee, P., Kim, M.S., Paik, S.-M., Choi, S.-H., Cho, B.-R., Hahn, J.-S., 2013. Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 587, 3648–3655. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.004>

Lei, E.P., Krebber, H., Silver, P.A., 2001. Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev.* 15, 1771–1782. <https://doi.org/10.1101/gad.892401>

Mager, W.H., De Kruijff, A.J., 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* 59, 506–531. <https://doi.org/10.1128/mr.59.3.506-531.1995>

Martín-Expósito, M., Gas, M.-E., Mohamad, N., Nuño-Cabanes, C., Tejada-Colón, A., Pascual-García, P., de la Fuente, L., Chaves-Arquero, B., Merran, J., Corden, J., Conesa, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bravo, J., Rodríguez-Navarro, S., 2019. Mip6 binds directly to the Mex67 UBA domain to maintain low levels of Msn2/4 stress-dependent mRNAs. *EMBO Rep.* 20, e47964. <https://doi.org/10.15252/embr.201947964>

Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., Estruch, F., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227–2235.

Mazón, M.J., Behrens, M.M., Morgado, E., Portillo, F., 1993. Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the TPK3 gene. *Eur. J. Biochem.* 213, 501–506. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17787.x>

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. *Front. Genet.* 5, 1. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00001>

Miller, J.H., 1972. Assay of β -galactosidase. *Exp. Mol. Genet.*

Mok, J., Kim, P.M., Lam, H.Y.K., Piccirillo, S., Zhou, X., Jeschke, G.R., Sheridan, D.L., Parker, S.A., Desai, V., Jwa, M., Cameroni, E., Niu, H., Good, M., Remenyi, A., Ma, J.-L.N.,

Sheu, Y.-J., Sassi, H.E., Sopko, R., Chan, C.S.M., De Virgilio, C., Hollingsworth, N.M., Lim, W.A., Stern, D.F., Stillman, B., Andrews, B.J., Gerstein, M.B., Snyder, M., Turk, B.E., 2010. Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. *Sci. Signal.* 3, ra12. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000482>

Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S., 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>

Niño, C.A., Hérissant, L., Babour, A., Dargemont, C., 2013. mRNA nuclear export in yeast. *Chem. Rev.* 113, 8523–8545. <https://doi.org/10.1021/cr400002g>

Nuño-Cabanes, C., Ugidos, M., Tarazona, S., Martín-Expósito, M., Ferrer, A., Rodríguez-Navarro, S., Conesa, A., 2020. A multi-omics dataset of heat-shock response in the yeast RNA binding protein Mip6. *Sci. Data* 7, 69. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0412-z>

Palomino, A., Herrero, P., Moreno, F., 2006. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Res.* 34, 1427–1438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl028>

Pan, X., Heitman, J., 2002. Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3981–3993. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.12.3981-3993.2002>

Pautasso, C., Rossi, S., 2014. Transcriptional regulation of the protein kinase A subunits in *Saccharomyces cerevisiae*: autoregulatory role of the kinase A activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.005>

Pawson, C.T., Scott, J.D., 2010. Signal integration through blending, bolstering and bifurcating of intracellular information. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 653–658. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1843>

Perales, R., Bentley, D., 2009. “Cotranscriptionality”: the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol. Cell* 36, 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.018>

Pidoux, G., Taskén, K., 2010. Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 271–284. <https://doi.org/10.1677/JME-10-0010>

Pizzinga, M., Ashe, M.P., 2014. Yeast mRNA localization: protein asymmetry, organelle localization and response to stress. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1256–1260. <https://doi.org/10.1042/BST20140086>

Portela, P., Rossi, S., 2020. cAMP-PKA signal transduction specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 66, 1093–1099. <https://doi.org/10.1007/s00294-020-01107-6>

Re, A., Joshi, T., Kulberkyte, E., Morris, Q., Workman, C.T., 2014. RNA-protein interactions: an overview. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1097, 491–521.

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-709-9_23

Reca, S., Galello, F., Ojeda, L., Pautasso, C., Cañonero, L., Moreno, S., Portela, P., Rossi, S., 2020. Chromatin remodeling and transcription of the TPK1 subunit of PKA during stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1863, 194599. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2020.194599>

Santangelo, G.M., 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 70, 253–282. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006>

Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Panté, N., Hurt, E., 1998. Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6826–6838. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6826>

Schmitt, A.P., McEntee, K., 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5777–5782. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5777>

Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, R., Hurt, E., 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J.* 16, 3256–3271. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.11.3256>

Shabb, J.B., 2001. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* 101, 2381–2411. <https://doi.org/10.1021/cr000236l>

Skalhegg, B.S., Tasken, K., 2000. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 5, D678-693. <https://doi.org/10.2741/skalhegg>

Smith, A., Ward, M.P., Garrett, S., 1998. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17, 3556–3564. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3556>

Sonneborn, A., Bockmühl, D.P., Gerads, M., Kurpanek, K., Sanglard, D., Ernst, J.F., 2000. Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 35, 386–396. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01705.x>

Stewart, M., 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 35, 609–617. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.001>

Taylor, S.S., Kim, C., Cheng, C.Y., Brown, S.H.J., Wu, J., Kannan, N., 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.10.002>

Thevelein, J.M., de Winde, J.H., 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904–918. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x>

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G., Wigler, M., 1987a. Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371–1377. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.4.1371-1377.1987>

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Wigler, M., 1987b. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277–287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90223-6)

Vigil, D., Blumenthal, D.K., Brown, S., Taylor, S.S., Trehwella, J., 2004. Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry* 43, 5629–5636. <https://doi.org/10.1021/bi0499157>

Yu, Q., Gong, X., Tong, Y., Wang, M., Duan, K., Zhang, X., Ge, F., Yu, X., Li, S., 2022. Phosphorylation of Jhd2 by the Ras-cAMP-PKA(Tpk2) pathway regulates histone modifications and autophagy. *Nat. Commun.* 13, 5675. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33423-5>

Zähringer, H., Holzer, H., Nwaka, S., 1998. Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. *Eur. J. Biochem.* 255, 544–551. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2550544.x>

Zander, G., Hackmann, A., Bender, L., Becker, D., Lingner, T., Salinas, G., Krebber, H., 2016. mRNA quality control is bypassed for immediate export of stress-responsive transcripts. *Nature* 540, 593–596. <https://doi.org/10.1038/nature20572>

Zenklusen, D., Stutz, F., 2001. Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett.* 498, 150–156. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02482-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02482-6)

Zoller, M.J., Kuret, J., Cameron, S., Levin, L., Johnson, K.E., 1988. Purification and characterization of C1, the catalytic subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase encoded by TPK1. *J. Biol. Chem.* 263, 9142–9148.



Daniela Belén Gareis



Fiorella Galello