

RESUMEN

En la presente tesis se han estudiado los distintos mecanismos de toxicidad de las micotoxinas citrinina y ocratoxina A y la respuesta adaptativa a xenobióticos en el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, concretamente la regulación de los transportadores multidrogas del sistema PDR y sus factores de transcripción.

La respuesta a xenobióticos permite a las células eucariotas adaptarse y sobrevivir a la exposición de gran variedad de compuestos exógenos, como toxinas o fármacos. En esta respuesta participan distintos tipos de proteínas, principalmente transportadores de membrana y factores de transcripción. Para estudiar esta respuesta adaptativa sometimos las células de levadura a distintos tratamientos con las micotoxinas citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA), y los oxidantes menadiona (MEN), y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Las micotoxinas citrinina y ocratoxina A son metabolitos secundarios producidos por varios hongos filamentosos, principalmente de las familias *Aspergillus* y *Penicillium*, que contaminan alimentos básicos como maíz, trigo y arroz, y que son tóxicas para el ser humano. Aquí, estudiamos los mecanismos de toxicidad de ambas toxinas a través de experimentos de expresión génica con reporteros luciferasa, ensayos transcriptómicos, y ensayos fenotípicos con mutantes de pérdida de función para determinadas proteínas involucradas en la defensa antioxidante y de transporte multidroga. Los resultados muestran diferencia de los mecanismos de toxicidad entre ambas micotoxinas. CIT induce la expresión de numerosos genes involucrados en el transporte de drogas y la respuesta a estrés oxidativo, mientras que OTA activa, principalmente, la expresión de genes implicados en el desarrollo, como meiosis o esporulación, y en menor medida, genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo y al transporte multidroga.

En levadura, los transportadores multidroga de la membrana plasmática que eliminan compuestos tóxicos de la célula forman parte del denominado sistema PDR (*pleiotropic drug resistance*). Este sistema está compuesto por proteínas conservadas de bacterias a humanos, entre ellos, transportadores multidroga, pero también otro tipo de proteínas como factores de transcripción que se encargan de regular su expresión. En ocasiones, estos transportadores se encuentran sobreexpresados, lo que da lugar a un fenómeno conocido como resistencia pleiotrópica a drogas (PDR) o resistencia a múltiples drogas (MDR). Este proceso de resistencia es de gran importancia en diversos tratamientos médicos, como quimioterapia en cáncer, o antifúngicos, ya que disminuyen su eficiencia. Aquí, hemos estudiado el funcionamiento del sistema PDR en levadura de varios transportadores multidroga (Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1) y factores de transcripción (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5) mediante cuantificación de expresión luciferasa en promotores o sitios de reconocimiento concretos. Además, desarrollamos un sistema binario de plásmidos que nos permitiera estudiar las distintas sensibilidades de estos factores de transcripción a los xenobióticos de forma individualizada.

Los resultados muestran que, de entre los transportadores multidroga estudiados, Pdr5 y Snq2 son los principales en la respuesta de adaptación frente a CIT, OTA y MEN, mientras que Pdr15 parece actuar como un transportador secundario. Además, la regulación de estos tres transportadores ante la exposición de citrinina está dirigida por el factor de transcripción Pdr1, porque el mutante de delección $\Delta pdr1$ no muestra actividad ante esta toxina. *SNQ2* es el único de los cuatro transportadores que se induce al tratar las células con H_2O_2 . Pdr1 no sólo aparece como el principal factor de transcripción con CIT, sino que participa en la respuesta de todas las moléculas estudiadas, en mayor o menor medida. Este regulador activa la transcripción de genes en respuesta a CIT y OTA a través de los sitios específicos PDRE, al contrario que Pdr8 e Yrm1, que parecen actuar como reguladores negativos en respuesta a CIT a través de estos mismos elementos. Por último, empleamos un sistema binario de plásmidos que nos permite definir las distintas sensibilidades y especificidad a drogas por parte de los factores de transcripción de forma individual. Pdr1 es capaz de reconocer e inducir la activación de la expresión génica en todos los tratamientos, aunque muy levemente con H_2O_2 . Yrr1 presenta inducción de la expresión génica ante CIT y, especialmente, OTA, indicando su capacidad de discriminación entre estas moléculas. Además, la activación se produce a través de elementos distintos a PDRE. Por último, Stb5 reconoce e induce la expresión génica en el tratamiento con H_2O_2 en mayor nivel que Pdr1. Los resultados muestran un importante nivel de regulación del sistema PDR, con Pdr1 como factor de transcripción principal, pero con la cooperación de otros reguladores más específicos.