

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Diversificación del sistema multi-droga en levaduras: Estudio del factor de transcripción Pdr1

ALUMNO: Àngel Fenollar Collado

TUTOR: Markus Proft

TUTORA UPV: Maria Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Curso académico: 2019-2020

VALENCIA, 18 DE MARZO DE 2020

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
• Infecciones y resistencias	3
• La familia génica PDR	5
• Elección del reportero luciferasa como aproximación experimental para el estudio de Pdr1	10
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	14
• CEPAS UTILIZADAS	14
• MEDIOS DE CULTIVO	15
• PLÁSMIDOS UTILIZADOS	16
• CLONACIÓN DEL GEN <i>PDR1</i> EN EL PLÁSMIDO pGBKT7	17
-Purificación de DNA genómico de las distintas cepas de levadura	17
-PCR para la amplificación de secuencia de <i>PDR1</i> de cada cepa	18
-Digestión de los productos de PCR y el plásmido pGBKT7	19
-Ligación de los productos de PCR y el plásmido pGBKT7	19
-Purificación, selección y secuenciación del plásmido pGBKT7-PDR1	21
• TRANSFORMACIÓN DE LA LEVADURA CON LOS PLÁSMIDOS pGBKT7-PDR1	24
• COMPROBACIÓN POR WESTERN-BLOT DE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN	26
• ESTUDIO DE LA BIOLUMINISCENCIA DE LAS DIFERENTES CEPAS TRANSFORMANTES	28
• ENSAYO DE CRECIMIENTO	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
• TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	31
• RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	32
-Análisis del comportamiento de las proteínas de fusión de Pdr1	32
-Análisis de los sistemas PDR de distintas cepas naturales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
-Análisis cuantitativo de la tolerancia a menadiona en diferentes cepas de levadura	43
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO (FIGURAS SUPLEMENTARIAS)	53

ABREVIATURAS

ABC: ATP-Binding Cassette

ATP: Adenosina Trifosfato

DBD: DNA-Binding Domain

DNA: Desoxyribonucleic Acid

dNTPs: Desoxirribonucleótidos Trifosfato

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

GFP: Green Fluorescent Protein

HCl: Ácido clorhídrico

LB: Medio de cultivo "Luria Bertani"

lucCP⁺: Luciferasa desestabilizada

NaCl: Cloruro sódico

NaOH: Hidróxido de sodio

NBD: Nucleotid-Binding Domain

OD₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDR: Pleiotropic Drug Resistance

PDRE: Pleiotropic Drug Resistance Element

PVDF: Polifloruro de Vinilideno

SD: Medio de cultivo "Synthetic Dextrose"

SDS: Dodecilsulfato sódico

TAE: Tris-acetate-EDTA

TBS: Tampón "Tris-buffered saline"

TD: Transactivating Domain

TMC: Tiempo Medio de Crecimiento

TMD: Transmembrane Domain

XBD: Xenobiotic-Binding Domain

YPD: Medio de cultivo "Yeast extract-Peptone-Dextrose"

RESUMEN

Uno de los fenómenos que más ha interesado a la medicina y a la salud pública durante los últimos años es el de la resistencia a fármacos que diferentes microorganismos patógenos han desarrollado. Inicialmente, los proyectos de investigación focalizaron su atención sobre todo en los antibióticos y las bacterias, aunque estas no son el único agente infeccioso con capacidad de generar resistencias. Los hongos infecciosos también han sufrido en este aspecto una presión selectiva de cara a desarrollar resistencias farmacológicas. Por eso, estudiar los sistemas y mecanismos genéticos y moleculares que poseen estos organismos para reaccionar y actuar contra estímulos dañinos como la presencia de sustancias tóxicas o xenobióticos en el medio puede ser tan interesante para encontrar nuevas estrategias de lucha contra la resistencia farmacológica.

Esta investigación se centra especialmente en la estrategia principal que utilizan dichos hongos para combatir los efectos perjudiciales de la presencia de sustancias xenobióticas en el medio, que es el sistema de Resistencia Pleiotrópica a Drogas (PDR). Por una parte, se diseñará un sistema para estudiar de forma más específica las características y propiedades de una de las proteínas más importantes en el proceso de generación de la respuesta PDR, que es Pdr1, en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y en la levadura patogénica *Candida glabrata*. Por otra parte, también se estudiará, por medio de otro sistema, la respuesta PDR en general de diferentes cepas naturales de levadura.

Todo este procedimiento experimental estará basado en la capacidad de respuesta a la exposición al xenobiótico menadiona, y servirá para observar y determinar la existencia de diferencias en cuanto a sensibilidad y la intensidad en la inducción de la respuesta PDR.

INTRODUCCIÓN

Infecciones y resistencias

Durante los últimos tiempos una de las principales preocupaciones de la medicina ha sido el desarrollo por parte de las bacterias patógenas de mecanismos de defensa y de resistencia que contrarrestan los efectos de los antibióticos que usamos para combatir las infecciones que provocan. Esto ha sucedido prácticamente desde el descubrimiento e inicio del uso de los antibióticos, pero se ha acentuado durante las últimas décadas, debido sobre todo al uso inadecuado y excesivo de antibióticos. En el momento que empezó a generalizarse el uso de antibióticos, se generó una presión selectiva en favor del desarrollo de resistencias a estos fármacos que, combinado con las características genéticas de las bacterias, las cuales tienen una alta capacidad mutagénica y de transferencia horizontal genética, dio lugar a una elevada tasa de generación de cepas resistentes a todo tipo de familias de antibióticos (Munita & Arias, 2016), que fueron diseminándose con rapidez por el ambiente. Los datos del impacto y prevalencia tanto a nivel humano como económico de infecciones resistentes a antibióticos revelan cómo de preocupante es el problema a nivel mundial. La resistencia a antibióticos provoca la muerte de 33000 personas al año en Europa (unas 3000 en España) y unas 700000 en todo el mundo y pérdidas de unos 1500 millones de Euros solo en la Unión Europea. Se calcula que si no se encuentra una solución eficaz a la resistencia a los antibióticos, en el año 2050 unas 10 millones de personas podrían morir al año en todo el mundo (AEMS, 2019). Por tanto, hacer frente a este problema de magnitud creciente es uno de los principales retos a los que se enfrenta la medicina moderna.

Pero es que además no se trata de una batalla de un solo flanco, ya que las bacterias no son el único tipo de microorganismo que desarrolla resistencias contra las sustancias antimicrobianas, sino que los hongos también lo hacen. Los hongos también han desarrollado a lo largo de su historia evolutiva diferentes estrategias por las que pueden sortear el efecto tóxico de diferentes sustancias xenobióticas y antimicóticas. Esto tiene una especial relevancia en los hongos microscópicos de ámbito hospitalario, los cuales están empezando a causar serias complicaciones en las infecciones que provocan, que son cada vez más frecuentes y difíciles de tratar. El aumento de la prevalencia de estas infecciones fúngicas se debe al uso cada vez más extendido de fármacos con efecto inmunosupresor en el tratamiento del cáncer y trasplantes, pero el uso de catéteres venosos centrales también aumenta el riesgo a

sufrir este tipo de infecciones (Enoch et al., 2017). En España alrededor de 8,1 millones de personas sufren cada año algún tipo de episodio infeccioso relacionado con hongos. Los casos con mayor prevalencia están relacionados con invasiones cutáneas y de las mucosas. No obstante, los episodios de candidemia también han aumentado a lo largo de la última década prácticamente duplicándose, llegando a tener una prevalencia de 8,1 afectados de cada 100000 habitantes (Rodríguez-Tudela et al., 2015).

El agente fúngico invasivo más común es la levadura de la especie *Candida*, que produce todo tipo de infecciones en diferentes órganos, y en algunos casos invasiones sistémicas muy graves como la candidemia. A lo largo de los últimos años el perfil biológico de este agente microbiano ha ido virando hacia biotipos más resistentes a las terapias farmacológicas. Se han hecho menos frecuentes las infecciones por la especie *Candida albicans* y más frecuentes las infecciones por otras especies del género *Candida* (como *Candida glabrata*, la cual utilizaremos en este estudio), que presentan una mayor resistencia intrínseca a diferentes tipos de fármacos antifúngicos como los azoles (Enoch et al., 2017). Este viraje se debe precisamente al uso generalizado de los antifúngicos de tipo azol que hacen que se genere una presión selectiva en favor de las especies de *Candida* que son intrínsecamente resistentes a esta familia de fármacos. Este viraje de especies de *Candida* del que hablamos lo podemos apreciar de forma más gráfica en la figura 1.

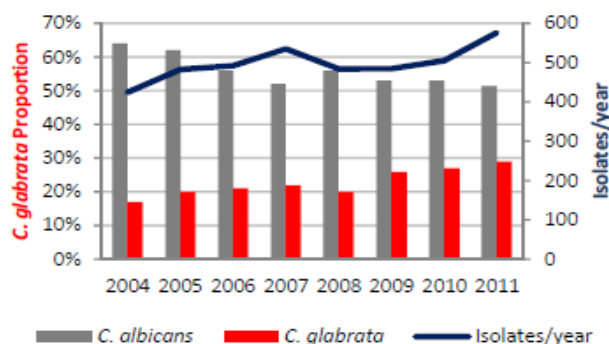


Figura 1. Evolución gráfica de los tipos de *Candida* encontrada en aislados hospitalarios en Dinamarca durante los años 2004-2011. Gráfico extraído de Arendrup, 2013.

Sin embargo, además de las resistencias naturales a antibióticos, las levaduras, al igual que las bacterias, también poseen la capacidad de desarrollar nuevas resistencias a fármacos (resistencias adquiridas). Y aunque estos mecanismos son diferentes a los de las bacterias, en muchos casos presentan claras similitudes y también una elevada eficiencia en el proceso de adquisición y transmisión de la resistencia. Los principales mecanismos moleculares de los que hablamos son: mutación del gen diana que codifica la proteína a la que se une el fármaco resultando

en una pérdida de afinidad por el fármaco, mutaciones que provocan una sobreexpresión de la proteína diana que disminuyen la eficacia del fármaco ya que el *pool* efectivo de sitios a los que unirse es mayor y por tanto el efecto marginal es menor; y por último la inducción de la expresión de genes que codifican transportadores de membrana de tipo bombas de eflujo que expulsan el fármaco al exterior de la célula (Arendrup, 2013). Este es el mecanismo que más nos interesa para este proyecto y es el que estudiaremos pormenorizadamente, sobre todo lo que se refiere a la parte encargada de la regulación transcripcional.

Además, todos estos sistemas de resistencia multidroga tienen importancia en el sentido de que son extrapolables y evolutivamente relacionados con los sistemas multidroga humanos (Holland et al., 2003). Esto tiene especial relevancia en los casos de cáncer, en los que las líneas celulares cancerígenas desarrollan mecanismos para evitar y contrarrestar los efectos de las diferentes drogas citotóxicas que se emplean en la quimioterapia (Mohammad et al., 2018). La activación de estos sistemas depende de la aparición de nuevas mutaciones en las células tumorales y el desarrollo y selección de nuevas líneas celulares con capacidad para sobrevivir en presencia de los fármacos quimioterapéuticos empleados. Estos mecanismos genéticos lo que hacen es acentuar la actividad de diferentes rutas celulares que combaten la actividad citotóxica de estos fármacos, por ejemplo, la sobreexpresión de enzimas detoxificadoras que metabolizan los fármacos o la sobreestimulación de mecanismos de autofagia (Li et al., 2017). Pero el principal mecanismo de resistencia a fármacos en células tumorales es la expresión de bombas de eflujo de la superfamilia ABC (*ATP-Binding Cassette*), las cuales son transportadores que unen específicamente las diferentes drogas citotóxicas y las expulsan al exterior celular en un proceso que requiere de la energía que aporta la hidrólisis de una o dos moléculas de ATP que también se unen específicamente al transportador (Mohammad et al., 2018).

La familia génica PDR

Todos estos mecanismos de resistencia a fármacos son interesantes porque atacan el efecto dañino de los fármacos para la célula por diferentes flancos, pero estos sistemas no siempre están activos y tienen que ser inducidos por diferentes vías y sensores moleculares que los lleve a estar plenamente operativos.

La familia PDR (Pleiotropic Drug Resistance) consiste en una familia génica presente en diferentes especies de levadura compuesta por diversas proteínas como factores

de transcripción y transportadores de membrana que colaboran conjuntamente dentro del entorno celular para luchar contra los compuestos químicos que entran en la célula y que pueden amenazar su integridad. Es por tanto el principal mecanismo molecular que utilizan las levaduras para desarrollar resistencia a diferentes tipos de fármacos antifúngicos y xenobióticos (Moye-Rowley, 2003).

La secuencia de eventos que tiene lugar para inducir esta resistencia a xenobióticos es primeramente la detección de estos fármacos por parte de una proteína sensora que se une a ellos. Esta proteína tiene al mismo tiempo la función de factor de transcripción, que actúa uniéndose a secuencias reguladoras para estimular la expresión de determinados genes. Estos genes suelen codificar transportadores que, una vez sintetizados, se acoplan a la membrana donde actúan bombeando los mismos fármacos al exterior celular.

La proteína más importante que ejerce la función sensora y reguladora de la transcripción en esta familia proteica de PDR es Pdr1. Pdr1 es un factor de transcripción que actúa formando homodímeros o heterodímeros con Pdr3, otra proteína que es una homóloga funcional de Pdr1 (Mamnun et al., 2002). Las dos proteínas pertenecen a la familia de factores de transcripción Gal4 y están constitutivamente unidas al DNA, en secuencias reguladoras muy específicas denominadas *Pleiotropic Drug Resistance Elements* (PDRE), situadas en los promotores de los genes que regulan, mediante sus motivos estructurales de dedos de zinc del dominio de unión al DNA (DBD) en la parte N-terminal de la proteína. No obstante, en situaciones normales están inactivos. Solo ante una situación en la que penetran al interior celular xenobióticos citotóxicos que pueden representar una seria amenaza a la integridad de la levadura, se activan. Lo hacen uniendo estas moléculas citotóxicas gracias al dominio *Xenobiotic-Binding Domain* (XBD). Una vez unidas, la proteína sufre un cambio conformacional en el dominio de activación de la transcripción, *Transactivating Domain* (TD), en la parte C-terminal de la proteína que provoca el reclutamiento de complejos coactivadores de la RNA polimerasa II pertenecientes al complejo proteico del *mediador* (concretamente se une directamente a la subunidad Gal11 del mediador), el cual se encarga de poner en contacto los factores de transcripción con la RNA polimerasa. Por tanto, así se produce la activación de la transcripción, que será transitoria y durará en función de la dosis y la naturaleza del xenobiótico.

Pdr1 consigue reclutar estos factores coactivadores de la transcripción gracias a una parte del dominio de transactivación que es rica en residuos de glutamina y asparaguina que facilita la interacción entre proteínas mediante la formación de enlaces de hidrógeno (Kolaczowska, 2002). Esta parte transactivadora de la proteína es al mismo tiempo una de las partes más variables en cuanto a secuencia sobre todo en lo que se refiere al número de repeticiones de residuos de asparaguina y glutamina, tanto a nivel interespecie como entre cepas de una misma especie. Por otro lado, también existen otras vías para activar a Pdr1 independientes del contacto con xenobióticos. Hay algunas chaperonas como Szz1 (Hsp70) que se unen a Pdr1 para aumentar su actividad (Paul & Moye-Rowley, 2014). Finalmente, para apagar la actividad transcripcional de esta ruta existen también otros factores, tales como Ngg1, que se unen a dominios inhibitorios en la parte interna de Pdr1 y que actúan como reguladores negativos de la ruta (Kolaczowska, 2002). Toda esta relación entre estructura y función proteica la podemos ver ilustrada y en la figura 2.

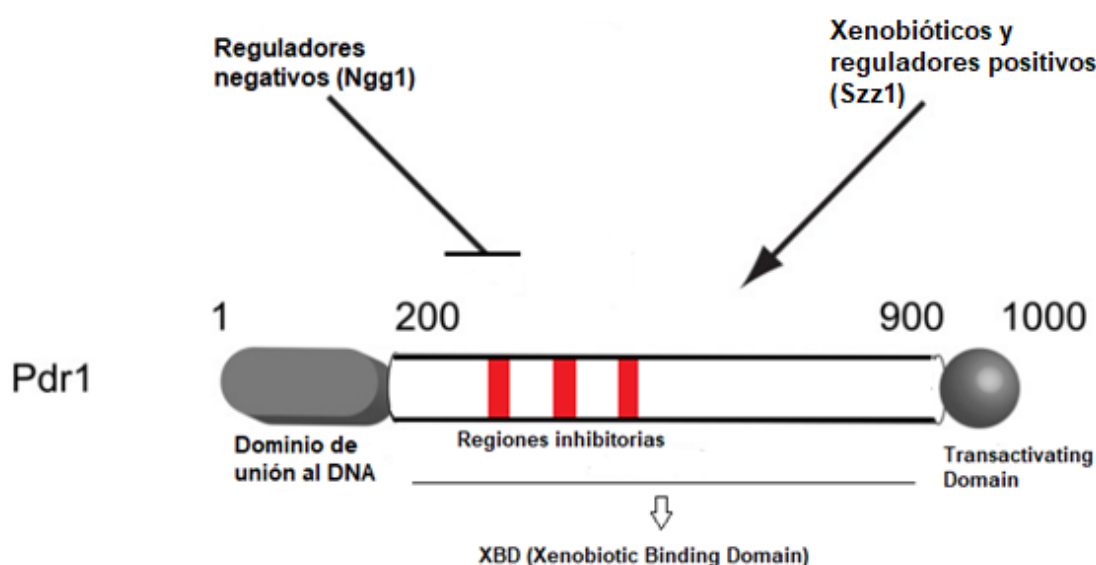


Figura 2. Estructura de la proteína Pdr1 dividida en sus diferentes dominios funcionales. Imagen seleccionada y modificada de Paul & Moye-Rowley, 2014.

Los genes que encontramos *downstream* de las secuencias reguladoras donde se une Pdr1 y que son transcritos tras la entrada de xenobióticos en la célula son muchos: *PDR5*, *PDR10*, *PDR11*, *PDR12*, *PDR15*, *YOR1*, *SNQ2*, entre otros. Estos genes constituyen fundamentalmente proteínas que se acoplan en la membrana celular de la levadura y que bombean los xenobióticos al exterior de la célula. Concretamente hablamos de bombas de la familia de transportadores ABC (Jungwirth & Kuchler, 2006). En la figura 3 podemos observar un diagrama de las relaciones de

activación/inhibición de la transcripción que se establecen cuando se activan los factores Pdr1 y Pdr3.

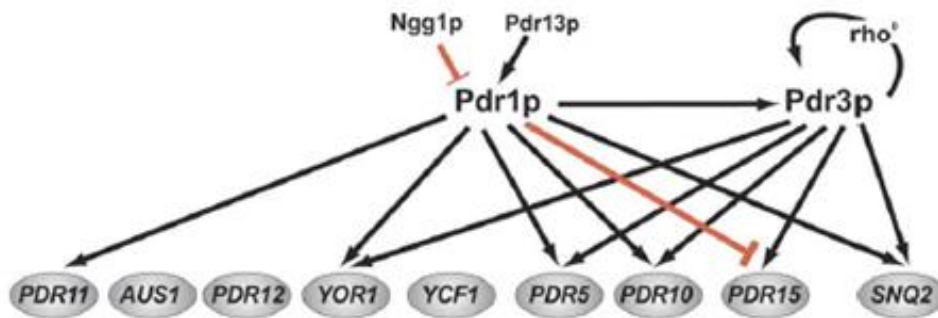


Figura 3. Diagrama que esquematiza las relaciones en *Saccharomyces cerevisiae* entre los factores de transcripción Pdr1 y Pdr3 así como entre otros factores y su función para activar/inhibir la transcripción de diferentes genes de la familia de transportadores ABC. Figura extraída y modificada de Jungwirth & Kuchler, 2006.

En la estructura modular y funcional de estas bombas ABC tenemos fundamentalmente dos dominios estructurales. Un dominio NBD (*Nucleotid-Binding Domain*) que, gracias a su motivo de unión a ATP, une este nucleótido. Al mismo tiempo, este dominio tiene actividad catalítica, por lo que hidroliza el ATP a ADP, un fenómeno que aporta la energía necesaria para conseguir impulsar al exterior celular las moléculas de xenobiótico (Rees et al., 2009). El dominio NBD está altamente conservado entre las diferentes bombas ABC de esta familia, independientemente de la especificidad de sustrato de cada bomba y comparten una serie de motivos conservados. Por ejemplo, entre las estructuras conservadas tenemos el subdominio de hoja β plegada que contiene el motivo Walker A y Walker B que son fundamentales en todos los enzimas que requieren ATP. Pero también tenemos otro subdominio conservado de α -hélice que conforman unos motivos llamados bucle C y bucle Q (Jah et al., 2003). Por otro lado, el proceso de translocación del compuesto se efectúa a través del segundo dominio de la proteína, que es el TMD (*Transmembrane Domain*) que constituye un poro a través del cual el compuesto puede atravesar la membrana lipídica. Además este dominio forma una serie de α -hélices que le permiten a la proteína acoplarse a la membrana (Pohl et al., 2005). Los residuos de aminoácido que conforman estas hélices varían entre las diferentes bombas de la familia y es lo que confiere la especificidad de sustrato a cada una de las distintas proteínas. En cuanto a lo que se refiere a la estructura típica de este dominio, está conformada por 12 segmentos transmembrana con estructura de α -hélice interconectados por 6 bucles extracelulares y 4 bucles intracelulares (Lamping et al., 2010). Como se ha

comentado, los residuos de aminoácido no presentan el nivel de conservación que manifiesta el dominio NBD para proporcionar diferentes afinidades a diferentes xenobióticos en las distintas bombas. Pero la longitud de los subdominios y muy especialmente la de los bucles intracelulares y extracelulares sí que está conservada (Cannon et al., 2009). En la figura 4 podemos observar una ilustración de la estructura de un transportador ABC.

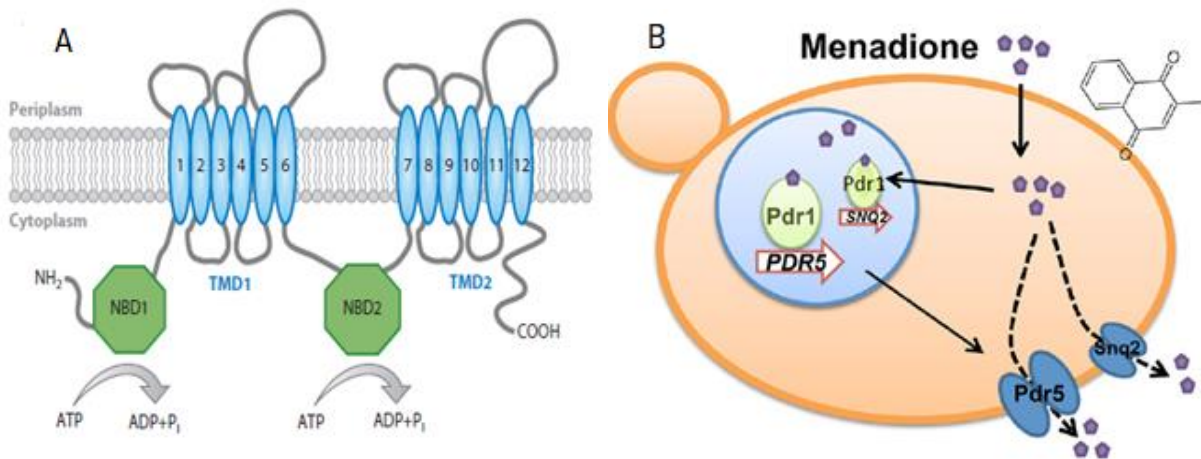


Figura 4. En el dibujo **A**, estructura y localización celular de un transportador ABC. Figura extraída de Prasad & Goffeau, 2012. En el dibujo **B**, inducción de la expresión de los transportadores ABC Pdr5 y Snq2 por parte del factor Pdr1 ante la presencia del xenobiótico menadiona. Figura extraída y modificada de Vanacloig-Pedros et al., 2019.

Hemos comentado que estas bombas ABC normalmente se sitúan a nivel de membrana celular, ya que es el mejor sitio para poder realizar su función detoxificadora, pero también se pueden localizar a otros niveles como en las mitocondrias, los peroxisomas o las vacuolas ya que a parte de la detoxificación y expulsión de xenobióticos pueden ejercer otras funciones. Algunas de las funciones que realizan en la membrana celular son transporte de esteroides y otros lípidos, translocación de fosfolípidos de membrana y transporte de iones. En la mitocondria participan en la respuesta a estrés oxidativo y la translocación de complejos de hierro y azufre. Por último, en las vacuolas y peroxisomas principalmente realizan funciones de transporte de lípidos y de detoxificación (Nelissen et al., 1997; Holland et al., 2003).

Elección del reportero luciferasa como aproximación experimental para el estudio de Pdr1

En este trabajo la propuesta experimental para investigar las características de estos mecanismos moleculares de defensa a drogas ha sido la de utilizar un gen reportero con propiedades bioluminiscentes cuya expresión se inducirá con la activación de Pdr1 ante la presencia de compuestos xenobióticos en el medio. La actividad del reportero, por tanto, estará ligada en todo momento al nivel de activación de Pdr1. La técnica más detallada será discutida a continuación pero es necesario hablar primero del reportero escogido, que es la luciferasa desestabilizada, y de su idoneidad para este tipo de estudio.

El reportero de uso más extendido en expresión génica *in vivo* durante los últimos años es el de las proteínas fluorescentes (especialmente GFP). Permite estudiar la expresión génica y observar la actividad transcripcional de las células sin afectar a su integridad (Cormack, 1998). Sin embargo, para este estudio consideramos que el uso de dicho reportero no es óptimo y nos decantamos por el uso de la luciferasa desestabilizada.

Para los tipos de ensayos y experimentos que se pretende practicar, lo que se necesita es un reportero que se pueda usar durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo, con independencia de una fuente de estimulación externa y que tenga una vida media corta para que su nivel de actividad tenga la capacidad de cambiar con rapidez en función del ritmo al que se esté sintetizando en cada momento, es decir, que sea un reportero altamente sensible.

El problema con la GFP es que para medir su actividad fluorescente, la proteína tiene que ser previamente excitada con luz ultravioleta, pero esta excitación no puede perdurar durante mucho tiempo, ya que la fluorescencia acaba por extinguirse en un momento dado (Mateus & Avery, 2010). Por eso, para realizar experimentos en los que se miden actividades proteicas y las variaciones de estas actividades en el tiempo (cinéticas), el uso de la proteína GFP está contraindicado, ya que las mediciones realizadas en estos ensayos se practican durante un periodo de tiempo demasiado prolongado que implicaría la extinción de la actividad fluorescente de la GFP.

El otro aspecto a considerar es que cuando lo que se quiere es medir la cinética de una actividad proteica que es muy transitoria como es el caso de la de Pdr1, nos interesa utilizar un reportero que tenga una vida media corta para que su actividad no

se prolongue excesivamente en el tiempo, de modo que dicha actividad tenga la capacidad de variar en todo momento en consonancia con el nivel de activación de Pdr1, y así obtener unos resultados fidedignos y exactos, que no queden alterados por la prolongación excesiva de la actividad del reportero (Mateus & Avery, 2010). Es decir, hace falta un sistema que sea sensible y que reaccione rápidamente ante los cambios de actividad que queremos detectar en Pdr1. En este sentido, la proteína GFP también presenta la problemática de que es demasiado estable y su vida media demasiado prolongada. Además, GFP necesita un tiempo considerable para su maduración, lo que complica todavía más su aplicación a activaciones transitorias y rápidas.

Por todas estas razones, el uso del gen de la luciferasa desestabilizada como reportero es lo más adecuado, ya que se trata de una proteína que no requiere de una fuente externa de excitación, sino que emite bioluminiscencia espontáneamente (con la única condición de la presencia del sustrato luciferina). Además, la vida media de la luciferasa que utilizaremos en nuestros experimentos es mucho más corta que la de GFP, puesto que utilizaremos la variante desestabilizada de la luciferasa (lucCP⁺), y será por tanto mucho más sensible a los cambios de actividad de Pdr1, los cuales podremos medir a tiempo real (Miraglia et al., 2011).

OBJETIVOS

El foco central de este estudio trata de investigar la naturaleza de uno de los elementos moleculares que participa en este fenómeno de adquisición de resistencia a drogas, el elemento que podríamos calificar como interruptor que inicia el proceso: la proteína Pdr1.

La intención es la de comparar la variabilidad de la actividad, sensibilidad e inducibilidad de la proteína Pdr1 en diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y en *Candida glabrata* ante la exposición a diferentes concentraciones del xenobiótico menadiona.

Para hacerlo, la estrategia que usaremos será emplear una técnica variante del doble híbrido que consiste en el uso de un sistema de vector binario. Esto significa que transformaremos la cepa de experimentación con dos plásmidos. En uno de ellos clonaremos la parte de la secuencia génica de Pdr1 que codifica el XBD y el TD de

cada una de las cepas que testaremos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida glabrata*. La clonación se realizará en una parte del plásmido en la que encontramos la secuencia que codifica el DBD de Gal4 (Gal4_{DBD}), de modo que como resultado final tendríamos una proteína de fusión Pdr1 en la que hemos sustituido su dominio de unión al DNA natural por el dominio de unión al DNA de Gal4. Por otro lado, el otro plásmido contendrá la secuencia de unión de Gal4_{DBD} (GAL1_{UAS}) e inmediatamente *downstream* la secuencia del gen reportero de la luciferasa, de modo que cuando la proteína de fusión Pdr1 se active ante la entrada en la célula de menadiona se activará la expresión de la proteína luciferasa (lucCP⁺), cuya actividad será cuantificable mediante la detección de su bioluminiscencia con un luminómetro.

Es necesario señalar que la elección de la técnica del vector binario no ha sido arbitraria y ha respondido a criterios muy concretos. La respuesta de resistencia pleiotrópica a drogas es una respuesta compleja en la que intervienen varios factores diferentes con funciones redundantes y que actúan todos como sensores de xenobióticos (por ejemplo, como hemos mencionado en la introducción, a parte del Pdr1 también encontramos el Pdr3). No obstante para este estudio solo nos interesa investigar las funciones y características de Pdr1, de modo que para evitar interferencias entre los distintos factores implicados, se utiliza este sistema de vector binario en el que únicamente la proteína de fusión Pdr1-Gal4_{DBD} codificada en uno de los vectores se une a la secuencia reguladora del gen reportero GAL1_{UAS} del otro vector, y es, en consecuencia, el único factor responsable de la estimulación de la síntesis de luciferasa y aumento de la bioluminiscencia.

El experimento explicado se centra en analizar la actividad y función de Pdr1, pero es necesario también un análisis con una visión más holística de la respuesta pleiotrópica a drogas. Para ello se realizará paralelamente un experimento en el que diferentes cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae* de distinta procedencia geográfica serán transformadas con dos plásmidos por separado que poseen el mismo reportero de la luciferasa regulado en un caso por el promotor de *SNQ2* y en el otro por una secuencia reguladora de tipo PDRE. De este modo, en este experimento no solo se analiza la actividad de potenciación de la transcripción de Pdr1, sino que se analiza la actividad conjunta de todos los elementos y factores de transcripción que puedan unirse a secuencias reguladoras de la respuesta PDR y que por tanto colaboran en la elaboración de dicha respuesta. De esta forma podremos observar si esta respuesta ha evolucionado lo suficiente en diferentes cepas para poder observar diferencias y, al

mismo tiempo, compararemos estos resultados con los obtenidos previamente acerca de la actividad de la proteína Pdr1.

Además, para hacer más completo el análisis, los parámetros de sensibilidad e inducibilidad calculados a partir de los datos de bioluminiscencia emitida relativos a la proteína Pdr1 y la respuesta PDR de cada cepa se compararán con la capacidad que tienen dichas cepas de crecer en presencia de menadiona. Es decir, se incubarán en menadiona las diferentes cepas testadas anteriormente y se analizarán los datos de crecimiento de cada una de las cepas, comparándose con los datos relativos a la emisión de bioluminiscencia obtenidos previamente.

Toda esta estrategia de investigación persigue el objetivo de profundizar y conocer mejor los mecanismos moleculares que utilizan las levaduras, con capacidad y potencial de provocar enfermedades, para luchar y generar resistencia contra los fármacos que empleamos para tratar las infecciones que provocan. Además, este estudio nos permitirá averiguar qué cepas son las que presentan una mayor o menor capacidad para contrarrestar los efectos tóxicos de los xenobióticos que puedan encontrar en el ambiente, focalizando especialmente nuestra atención en la actividad de la proteína Pdr1.

Por tanto, sintetizando de forma más concreta los objetivos, tenemos los siguientes puntos:

- Crear una herramienta para estudiar la activación por xenobióticos de los factores de transcripción Pdr1 de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y de la levadura patógena *Candida glabrata*.
- Comparar la respuesta dependiente de dosis de las diferentes versiones de Pdr1 de las distintas cepas y la resistencia a xenobióticos para el caso de menadiona.
- Determinar la diversificación de la respuesta PDR en cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS UTILIZADAS

-Bacterias

Se utilizó la cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 α en el proceso de clonación plasmídica del gen *PDR1* y también para el aislamiento y propagación de los plásmidos. Dicha cepa tiene el siguiente genotipo:

F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1

-Levaduras

Se utilizaron diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de *Candida glabrata*, que aparecen recogidas en la siguiente tabla:

Nombre	Genotipo	Procedencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	<i>MATa; ura3-52; his3-1; leu2-3,112; trp1-289</i>	Euroscarf
S.c. BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0</i>	Euroscarf
S.c. Sigma 1278B	<i>MAT Δ; wild type</i>	Colección cepas laboratorio M. Proft
S.c. RM11-1A Vineyard strain	<i>MATa; leu2 Δ 0; ura3 Δ 0; HO::KanMX</i>	Colección cepas laboratorio M. Proft
<i>Candida glabrata</i> wild type strain ATCC2001 (CBS138)	Wild type	Colección cepas laboratorio M. Proft
S.c. DBVPG6044 West African	<i>ura3::G418; ho::HGB; his3::clonat</i>	Dr. J.Y. Leu (Academia Sinica, Taipei, Taiwan)
S.c. Y12 Sake	<i>ura3::G418; ho::HGB; his3::clonat</i>	Dr. J.Y. Leu (Academia Sinica, Taipei, Taiwan)
S.c. YJM981 wine/European	<i>ura3::G418; ho::HGB; his3::clonat</i>	Dr. J.Y. Leu (Academia Sinica, Taipei, Taiwan)
S.c. W303 -1A gal4	<i>MATa; ade2-1; ura3-1; his3-11; trp1-1; leu2-3,112; gal4::KAN MX; pAG413-UAS_{GAL1}-lucCP⁺ (CEN, HIS3)</i>	Vanacloig-Pedros et al. 2019 JBC 294:12933

MEDIOS DE CULTIVO

-Bacterias

▪ **Medio LB (Luria Bertani):** Se disuelve en agua MiliQ triptona 1%, extracto de levadura 0'5% y NaCl 1%. La disolución se autoclava a 121°C durante 20 minutos.

Para preparar el mismo medio pero sólido, se añade a la mezcla, antes de autoclavar, agar bacteriológico 2%. Después de autoclavar, se deposita el medio antes de que solidifique en placas Petri en esterilidad. Unos 20 mL por placa.

-Levaduras

▪ **Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose):** Se disuelve en agua MiliQ extracto de levadura 1%, peptona 2% y glucosa 2% (dextrosa). En caso de preparar YPD sólido se añade también un 2% de agar bacteriológico. La disolución se autoclava a 121°C durante 20 minutos.

▪ **Medio SD (Synthetic Dextrose):** Se disuelve en agua MiliQ glucosa 2%(dextrosa) y un 0,67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y con sulfato de amonio. En caso de preparar SD sólido también se añade un 2% de agar bacteriológico. La disolución se autoclava a 121°C durante 20 minutos. A continuación, el medio se suplementa en condiciones de esterilidad con los aminoácidos requeridos en cada caso, según sea la auxotrofia de la cepa que queremos hacer crecer, a partir de un stock 100X con uracilo (2,5 g/L), leucina (10 g/L), metionina (10 g/L), adenina (2,5 g/L) y/o triptófano (5 g/L). Por último, se ajusta el pH del medio con ácido succínico 0,5M a pH 5,5 o a pH 3.

PLÁSMIDOS UTILIZADOS

En la siguiente tabla se recogen los plásmidos que se utilizaron en los diferentes experimentos:

Nombre	Características	Procedencia
pGBKT7	ADH1p, Gal4 _{DBD} , myc, Kan ^R , TRP1, 2micron	Clontech
pAG413-CYC1 Δ - UAS _{GAL1} -lucCP ⁺	CEN, HIS3, CYC1p Δ, UAS _{GAL1} -551/-336, lucCP ⁺ , Amp ^R	Vanacloig-Pedros et al., 2019, J. Biol. Chem. 294:12933-46
pAG413-SNQ2p-lucCP ⁺	CEN, HIS3, SNQ2p, lucCP ⁺ , Amp ^R	Colección plásmidos, laboratorio M. Proft
pAG413-CYC1Δ-3xPDRE-lucCP ⁺	CEN, HIS3, CYC1pΔ, 3xPDRE, lucCP ⁺ , Amp ^R	Vanacloig-Pedros et al., 2019, J. Biol. Chem. 294:12933-46

El plásmido pGBKT7 sería el que utilizaríamos para clonar la secuencia del gen *PDR1* a excepción del DBD, que sería sustituido por el que ya tiene el propio plásmido (GAL4_{DBD}), necesario para crear la proteína de fusión. En este diseño experimental en el que creamos un sistema de vector binario sería necesario un segundo plásmido que transportara el gen reportero bajo el control de la secuencia reguladora de unión de GAL4_{DBD}. Este plásmido es el pAG413-Gal1_{UAS}-lucCP⁺.

Por otro lado, para realizar paralelamente el estudio acerca de las respuestas PDR con cepas naturales de levadura, necesitamos otros dos plásmidos que tengan en este caso secuencias de unión para el Pdr1 *wild type* (las secuencias PDRE y SNQ2p) y que controlen la expresión del reportero luciferasa. Hablamos de los plásmidos pAG413-3xPDRE-lucCP⁺ (HIS) y pAG413-SNQ2p-lucCP⁺ (HIS) que se utilizarán para transformar por separado diferentes cepas naturales de levadura.

Los diferentes plásmidos que hemos mencionado que se utilizan para realizar transformaciones se encuentran almacenados inicialmente en *E. coli* Dh5α, a partir de la cual se realizan cultivos líquidos de 3mL LB para propagarlos y a continuación se extraen y purifican usando el kit de purificación de DNA plasmídico NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel). Se comprueba la eficiencia de la purificación midiendo la concentración de los extractos mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c.

CLONACIÓN DEL GEN *PDR1* EN EL PLÁSMIDO pGBKT7

-Purificación de DNA genómico de las distintas cepas de levadura

Se preparan cultivos líquidos de 3 mL de YPD que crecen *overnight* de las diferentes cepas de levaduras de las que queremos obtener la secuencia de su *PDR1* para posteriormente clonarla en el plásmido. Dichas cepas son las siguientes:

- CEN.PK2-1C
- BY4741
- Sigma 1278B
- RM11-1A
- *Candida glabrata* WT (C.g.)

Una vez tenemos los cultivos crecidos de estas cepas realizaremos una purificación de su DNA genómico. Para ello, habremos preparado previamente tres tampones: el *lysis buffer* (0,2M NaOH, 1% SDS), *protoplast buffer PP* (100mM Tris/HCl, pH 7, 100mM EDTA, 10µM β-mercaptoetanol, 0,2 mg/ml zimoliasa) y *TE-buffer* (10mM Tris/HCl, pH 7,5, 1mM EDTA). Seguiremos los siguientes pasos:

- Centrifugar las células de cada cultivo (30 segundos en una minicentrífuga). Decantar el sobrenadante, resuspender el pellet con 5 mL de agua para lavar y volver a centrifugar. Decantar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet con 200µL de *protoplast buffer PP*.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Añadir 200µL de *lysis buffer* y mezclar.
- Incubar a 65°C durante 20 minutos.
- Añadir 200 µL de acetato de potasio 5M pH 5,5 y mezclar
- Centrifugar a máxima potencia durante 3 minutos en una minicentrífuga.
- Transferir sobrenadante en un nuevo tubo *ependorf* y añadir 600 µL de isopropanol y mezclar para que precipite el DNA genómico.

- Centrifugar a máxima potencia durante 1 minuto.
- Decantar el sobrenadante y añadir 500 µL de etanol 70% para lavar el pellet.
- Decantar el sobrenadante y secar el pellet a 45° en un termobloque con la tapa del tubo abierta para que se volatilice todo el alcohol.
- Finalmente, resuspender el pellet en 50 µL de *TE buffer* y medir concentración en el NanoDrop™ 2000c.

-PCR para la amplificación de la secuencia de *PDR1* de cada cepa

Teniendo ya muestras purificadas y altamente concentradas de DNA genómico de cada cepa de levadura que queremos estudiar, el siguiente paso es obtener el fragmento de la secuencia de *PDR1* que queremos clonar. Para ello debemos realizar una amplificación de dicho fragmento mediante una PCR. La mezcla que habrá dentro de cada tubo de reacción contendrá los siguientes componentes en las siguientes cantidades que se prepararán en frío:

Tampón PCR 10x	5 µL
dNTPs 2mM (10x)	5 µL
Primer 1 (100µM)	1 µL
Primer 2 (100µM)	1 µL
DNA genómico	1 µL
Polimerasa Taq	0.5 µL
Agua MiliQ	36.5 µL
Volumen total	50 µL

Los tubos de reacción se colocan en el termociclador y se efectúa la PCR con el siguiente programa:

- **1 ciclo:** 5 min 95°C.
- **35 ciclos:** 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 53°C; 4 minutos a 72°C.
- **1 ciclo:** 7 minutos a 72°C, después mantener 4°C.

-Digestión de los productos de PCR y el plásmido pGBKT7

Una vez finalizada la PCR, se prepara un gel de agarosa para electroforesis (agarosa 1% en tampón TAE 1x) para comprobar que la electroforesis se ha realizado satisfactoriamente. Se cargan en el gel todas las mezclas de reacción de la PCR (una décima parte del volumen de la mezcla) y se dejan correr a 100V durante 45 minutos. Finalizado este tiempo, se observa el gel en un transiluminador y se busca la presencia de bandas de un peso aproximado de 3 Kb (foto del gel en figuras suplementarias 1). A continuación, el producto de PCR contenido en el resto de las amplificaciones será purificado usando el kit de purificación NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up.

El siguiente paso será digerir los productos de PCR y el plásmido pGBKT7, por lo que se prepara la siguiente mezcla de reacción de digestión en frío para cada producto de PCR y el plásmido:

Material genético (producto de PCR o plásmido)	5 µL
Tampón Tango 10x	2 µL
Enzima de restricción NcoI (10 ua/µL)	0'1 µL
Enzima de restricción Bam HI (10 ua/µL)	0'1 µL
Agua MilliQ	12'8 µL
Volumen total de cada reacción de digestión	20 µL

Se dejan las mezclas de reacción incubando en un termobloque a 37°C *overnight*.

-Ligación de los productos de PCR y el plásmido pGBKT7

A continuación se preparan geles de agarosa de las mismas características que los usados anteriormente y se carga el volumen entero de cada una de las reacciones de digestión en el gel. Se deja correr el gel de electroforesis a 100V durante 45 minutos. Acabado el tiempo se observa el gel en un transiluminador y se observan las bandas, las cuales se recortan en una cuchilla y se retiran depositándolas en un tubo *ependorf*.

En el caso de las digestiones de los productos de PCR solo habrá una banda, en cambio en la digestión del plásmido pGBKT7 habrá dos bandas: la del plásmido, de peso mayor, y la del inserto que llevaba el plásmido, de peso menor, y que hemos eliminado en el proceso de digestión. Por tanto para los plásmidos recortaremos la banda de peso mayor (foto del gel en figuras suplementarias 2). El último paso previo a la ligación es el de realizar una purificación de los productos genéticos digeridos mediante el mismo kit de purificación en gel utilizado previamente: NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up. Por último, mediremos la concentración de las muestras purificadas con el NanoDrop™ 2000c.

Se procede ya a preparar en frío la mezcla de reacción para la ligación según las instrucciones del “Rapid DNA Ligation Kit” de Thermo Fisher. Cada mezcla de ligación contendrá los siguientes componentes:

- Plásmido digerido
- Producto de PCR digerido
- *Ligation Buffer 5x*
- Ligasa T4
- Agua MiliQ

El volumen total de cada reacción de ligación debe ser de 20 μ L y los volúmenes de los componentes anteriores variarán en función de la concentración que se haya obtenido de plásmido digerido y producto de PCR digerido, teniendo en cuenta que debe de haber en la mezcla 3 veces más de producto de PCR o inserto que de plásmido. Las cantidades, en cambio, de Ligation Buffer y Ligasa T4 son fijas (4 μ L y 1 μ L, respectivamente). El resto del volumen de reacción se completa con agua MiliQ. También hay que realizar un control negativo en el que a la mezcla de ligación le falte el producto de PCR para controlar la cantidad de vector que ha quedado digerido parcialmente y que por tanto se puede religar.

Las mezclas de ligación se dejan incubando en un termobloque a 22°C durante 20 minutos. A continuación, se procede a transformar células de *E. coli* competentes. Estas células competentes son comerciales, DH5 α (Invitrogen®), y tenemos unas alícuotas preparadas para la transformación por choque térmico. Se mezcla 5 μ L de cada mezcla de reacción de ligación con una alícuota de 50 μ L de células competentes. Se dejan 15 minutos en hielo y a continuación se pasan a un termobloque donde se dejan incubando durante 1 minuto a 42°C (choque térmico).

Después se dejan 5 minutos más en hielo y paso seguido le añadimos a la alícuota 1 mL de LB y las dejamos incubando 1 hora a 37°C en un termobloque. Para acabar, plaquearemos las células en placas petri de LB_{KAN}, ya que el plásmido pGBKT7 con el que hemos transformado posee un gen marcador de selección de resistencia a kanamicina.

-Purificación, selección y secuenciación del plásmido pGBKT7-PDR1

Se dejan crecer las bacterias transformantes sobre la placa durante 1 día a 37°C. A continuación se recogen las colonias transformantes de la placa con una asa y se hacen crecer en cultivos líquidos de LB (3 mL) + Kan durante un día. Sobre este cultivo líquido se hace una purificación del plásmido mediante un protocolo de purificación consistente en una minipreparación de DNA plasmídico.

- El primer paso consiste en bajar las células mediante una centrifugación en una minicentrífuga (14000 rpm, 2 minutos).
- Resuspender el pellet con 100 µL *TE buffer* (el mismo que se utilizó en el protocolo de purificación de DNA genómico de levadura).
- Añadir 200 µL del *lysis buffer* (0'2M NaOH, 1% SDS. Este tampón se tiene que preparar en el momento de usarlo) y mezclar bien.
- Añadir 150 µL de acetato de potasio 3M pH 4'8, mezclar y poner en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar durante 10 minutos, 14000 rpm.
- Transferir sobrenadante a un nuevo tubo *ependorf*.
- Añadir 1 mL de etanol 96% y mezclar bien para hacer precipitar el DNA.
- Centrifugar 10 minutos, 14000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y lavar una vez con 0'5 mL de etanol 70%, centrifugar otra vez durante 3 minutos.
- Decantar el etanol y hacer secar el DNA volatizando los restos de etanol dejando el tubo en un termobloque a 45°C con la tapa abierta durante unos minutos.
- Resuspender con *TE buffer* y medir concentración con el NanoDrop™ 2000c.

Con las muestras de plásmido purificado que obtenemos realizamos una digestión de comprobación, como la que se ha realizado anteriormente pero utilizando menor

cantidad material genético dado que solo queremos comprobar si la digestión se ha efectuado correctamente. Esta es la razón por la que utilizamos un protocolo de purificación casero en este caso y no el del kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel), ya que la obtención del plásmido en este caso solo es para hacer la comprobación por digestión. Después de la digestión sabremos qué colonias han sido transformadas por nuestro plásmido, y ya podremos realizar una purificación más fina con el kit para enviar el plásmido a secuenciar. Corremos las mezclas de la reacción de digestión en el gel en las mismas condiciones de las electroforesis realizadas previamente y observamos el gel en un transiluminador en busca de dos bandas por cada mezcla de digestión: la del plásmido y la del inserto que hemos clonado.

El gel de la figura 5 es una muestra de lo que se obtuvo. Este gel nos proporciona la información necesaria para realizar una primera selección de aquellas colonias transformantes que pueden haber introducido un plásmido funcional que haya incorporado de forma efectiva nuestra construcción de *PDR1*.

De modo que seleccionamos aquellas colonias que muestran un resultado positivo en el gel y las hacemos crecer en cultivos líquidos de LB 3 ml durante una noche a 37°C para el día siguiente realizar una purificación de su plásmido, esta vez ya de una manera más fina y eficiente usando el kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel) y midiendo la concentración de DNA con el NanoDrop™ 2000c.

Se prepara el plásmido para enviar a secuenciar. Se hacen las diluciones pertinentes para que la muestra de plásmido que se envíe tenga una concentración de entre 100 y 200 ng/μL. Se ponen 10 μL del plásmido en un tubo *ependorf* junto con una dilución a 3.3 μM del primer PDR1-Seq-polyN (ACCAATCAATGCTCAGCAGC) y se envían al servicio de secuenciación del IBV.

La secuenciación se realiza para chequear si se han producido errores en el proceso de amplificación por PCR de los insertos de *PDR1* y si se han introducido mutaciones que alteren la secuencia del gen *PDR1* que hay en el plásmido pudiendo interferir en la funcionalidad de la proteína de fusión resultante.

El análisis de la secuenciación se realiza utilizando la base de datos que proporciona *yeastgenome.org*, alineando nuestra secuencia con la de la base de datos, comprobando que es idéntica y que no tiene alteraciones de ningún tipo.

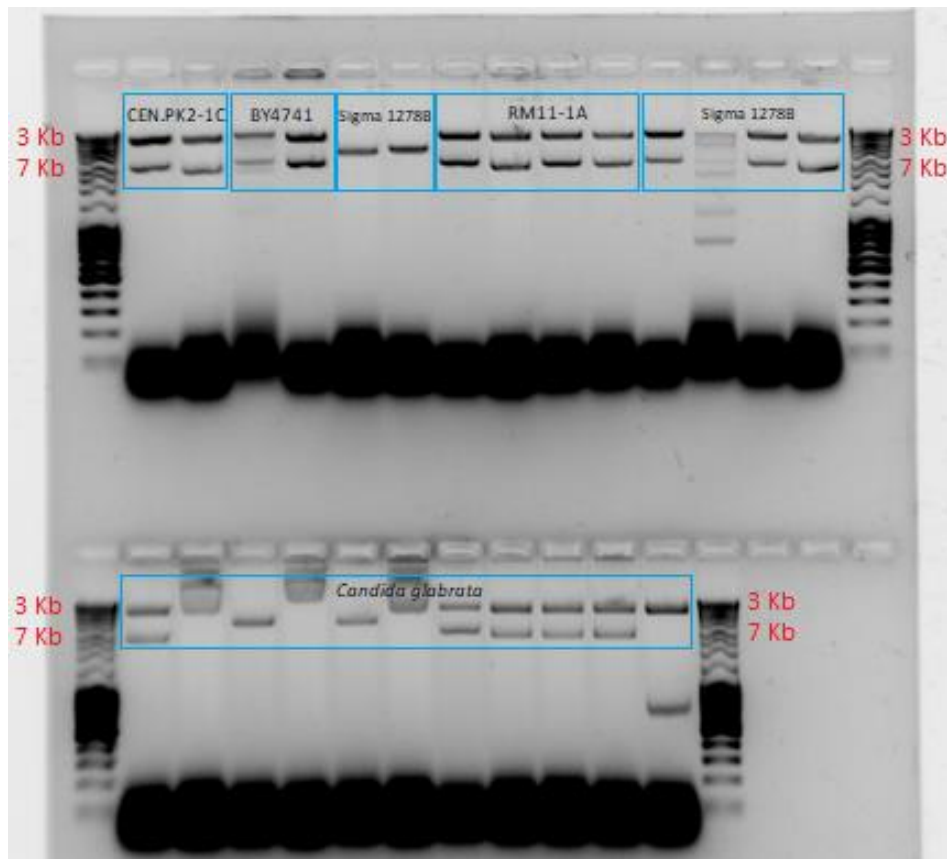


Figura 5. Digestión de los plásmidos pGBKT7-PDR1 con NcoI-BamHI. Se han cargado en el gel muestras con la reacción de digestión del plásmido pGBKT7-PDR1, un plásmido al que se le ha incorporado la secuencia de *PDR1* de diferentes cepas de levadura en su Multicloning Site. Estas secuencias de *PDR1* son insertos que tras ser digeridos se separan del plásmido formando dos bandas de distinto peso. En algunos casos observamos que se han formado efectivamente dos bandas, indicándonos que la ligación ha ocurrido con éxito: una banda de 3 kb correspondiente al inserto y una banda de 7 kb correspondiente al plásmido. En otros casos, cuando la ligación no se ha efectuado de forma satisfactoria, vemos que solo hay una banda, o que hay dos, pero que la banda del inserto tiene un peso diferente al esperado.

TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA CON LOS PLÁSMIDOS pGBKT7-PDR1

Con los diferentes plásmidos pGBKT7-PDR1 purificados y secuenciados se transforma la cepa de levadura W303-1A gal4 GAL1-lucCP⁺, la cual ya tiene en su interior el plásmido pAG413-CYC1Δ-UAS_{GAL1}-lucCP⁺, que es el otro plásmido necesario para hacer la medición con el luminómetro ya que es el que lleva el gen reportero de la luciferasa.

El protocolo de transformación que efectuaremos es el siguiente:

- Se preparan cultivos de 50 mL de YPD de la cepa a transformar (W303) que crecerán *overnight* a 37 °C.
- Se centrifuga todo el volumen del cultivo con una ultracentrífuga a 3000g durante 5 minutos.
- Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet con 30 mL de agua estéril.
- Se vuelve a centrifugar (5 minutos, 3000g).
- De nuevo, se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet con 30 mL de agua estéril.
- Se vuelve a centrifugar (5 minutos, 3000g).
- Se decanta el sobrenadante y se resuspende con 1 mL de agua MiliQ estéril.
- Se transfiere la suspensión celular a un tubo *ependorf* y se centrifuga en una minicentrífuga a 13000g durante 30 segundos. Se descarta el sobrenadante.
- Se resuspenden las células con un 1 mL de agua Mili Q estéril y se pipetea 100 µL de la suspensión celular a nuevos tubos. Un tubo por cada transformación que se desee hacer. En este caso queremos hacer 5 transformaciones con 5 plásmidos diferentes. Pero habrá que incluir 5 tubos extra para hacer los controles negativos. Centrifugamos una vez más a 13000g durante 30 segundos y se retira cuidadosamente el sobrenadante.
- Añadimos a cada tubo el mix de transformación que contiene los siguientes componentes y resuspendemos bien las células con un vórtex. Cuando preparemos el mix de transformación de los controles negativos, no añadiremos el plásmido a la mezcla.

Componentes del mix de transformación	Volumen por reacción (µL)
PEG 3350 (50% (w/v))	240
Acetato de litio 1M	36
DNA "carrier" de esperma de salmón (2 mg/mL)	50
Plásmido (volumen que variará según la concentración de plásmido que tengamos) y agua hasta completar el volumen final	34
Volumen final	360

- Incubamos los tubos de transformación a 42°C durante 40 minutos en un termobloque para hacer el choque térmico.
- Sacamos los tubos del termobloque y los centrifugamos (13000g, 30 segundos). Retiramos el sobrenadante.
- Resuspendemos el pellet con 1 mL de agua MiliQ estéril para lavar las células y centrifugamos una última vez (13000g, 30 segundos).
- Plaqueamos las células en placas con medio selectivo, es decir, medio SD suplementado con los correspondientes aminoácidos según las auxotrofías de la cepa. En concreto la cepa W303 tiene las siguientes auxotrofías: *Δhis*, *Δtrp*, *Δade*, *Δleu*, *Δura*. Los plásmidos con los que W303 ha sido transformada tienen los marcadores de selección de His y Trp por lo que la placa SD estará suplementada con Ade, Leu y Ura.
- Colocamos las placas a incubar a 30°C durante 3 o 4 días.
- Contamos y seleccionamos las colonias transformantes.

Por otro lado, se realizará el mismo protocolo de transformación con otras cepas naturales de levadura (YJM981, Y12, BY4741 y DBVPG6044) con los otros dos plásmidos por separado: pAG413-SNQ2p-lucCP⁺ y pAG413-CYC1Δ-3xPDRE-lucCP⁺, es decir, plásmidos con el mismo reportero de luciferasa, pero bajo el control de secuencias regulatorias donde se unen los diferentes factores de la respuesta PDR, con el objetivo de testar y analizar la diversidad en la generación de respuestas PDR en las diferentes cepas de levadura naturales.

COMPROBACIÓN POR WESTERN-BLOT DE LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Antes de realizar todos los experimentos pertinentes estudiando las propiedades de las proteínas de fusión que hemos creado y la bioluminiscencia de los transformantes generados, hemos de comprobar primero si estas proteínas de fusión se mantienen estables dentro de la célula y no se degradan una vez son sintetizadas. Para ello debemos realizar una extracción y purificación proteica de las células transformantes y detectar por Western-Blot nuestra proteína de interés.

Para la obtención de los extractos celulares, previamente hay que preparar los siguientes tampones:

Tampón de extracción	<i>Laemmli buffer 5x</i>
50mM Tris/HCl pH 7'5	0'3M Tris/HCl pH 6'8
150mM NaCl	7'5% SDS
15mM EDTA	0'1% DTE
0'1% Triton X-100	10 mM EDTA
2mM DTE	30% Sacarosa
1mM PMSF	0,25 mg/mL Azul de bromofenol

Proceder a realizar el protocolo de extracción:

- Preparar cultivos líquidos de 50 mL SD suplementado con los aminoácidos necesarios que crecen *overnight* a 30°C.
- Centrifugar los cultivos en una ultracentrífuga (3000 rpm, 3 min).
- Lavar el pellet con 30 mL de agua. Resuspender y volver a centrifugar.
- Lavar el pellet con 10 mL de tampón de extracción frío. Resuspender y volver a centrifugar.
- Resuspender el pellet con 500 µL de tampón de extracción frío mezclado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche).
- Transferir las muestras a un nuevo tubo *ependorf* y añadir una cantidad equivalente en volumen de *glass beads*.
- Romper las células vortexeando a máxima potencia durante 5 rondas de 1 minuto intercaladas por descansos de 2 minutos en los que las muestras reposan en hielo.

- Centrifugar las muestras durante 5 minutos, 10000 rpm en una minicentrífuga.
- Transferir el sobrenadante (lisado) a un nuevo tubo *ependorf* en hielo.
- Medir concentraciones de los extractos mediante una recta patrón elaborada con BSA usando reactivo de Bradford.
- Igualar concentraciones de los extractos a 10 mg/mL preparando diluciones usando tampón de extracción frío como diluyente.
- Mezclar los extractos con *Laemmli buffer* 5x.

Electroforesis y Western-Blot:

- Preparamos un gel de electroforesis de poliacrilamida SDS (PAGE) para correr los extractos proteicos. Para obtener una resolución óptima y detectar nuestra proteína (100 kDa) el gel deberá tener una concentración de 10% de poliacrilamida, con los siguientes componentes:

Resolving gel, 10% poliacrilamida	Volumen de cada componente
2x Resolving buffer	4'5mL
Acrilamida-bis 38:2	2'25mL
Agua	2'25mL
APDS	60μL
TEMED	3μL

Stacking gel, 3% poliacrilamida	Volumen de cada componente
2x Resolving buffer	1,8mL
Acrilamida-bis 38:2	0,3mL
Agua	1,5mL
APDS	30μL
TEMED	3μL

2x Resolving buffer	0'75M Tris/HCl pH 8'8 0'2% SDS
2x Stacking buffer	0'25M Tris/HCl pH 6'8 0'2% SDS

- Cargar las muestras en el gel y dejarlas correr durante 2 horas a 100V. Además de los extractos proteicos de nuestros transformantes, se ha obtenido el extracto de dos transformantes adicionales de la colección del laboratorio que funcionarán como controles positivos, ya que también llevan Pdr1 etiquetada con el mismo epítipo que la nuestra. Son ejemplares de W303 transformados con pGBKT-Pdr1 (Pdr1 de BY4741).
- Transferir las proteínas del gel a una membrana de PVDF. Se deja a un voltaje de 15V *overnight*.

- Incubación de la membrana en TBS 1x (TBS 10x: 1,5M NaCl y 0,2M Tris/HCl pH 7,6) + 0,1% Tween 20 + 2% de leche en polvo durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas.
- Incubación de la membrana con el anticuerpo primario anti-myc (nuestra proteína de fusión tiene una etiqueta myc) durante 1 hora. Diluir el anticuerpo primario en 5mL de TBS 1x + 0,1% Tween 20 + 2% de leche en polvo. Dilución 1:5000 α -myc mouse monoclonal 9E10 (Fisher Scientific®).
- Realizar 3 lavados de 5 minutos de la membrana en TBS 1x + 0,1% Tween 20 + 2% de leche en polvo.
- Incubar la membrana con el anticuerpo secundario anti-mouse (el anticuerpo primario es de ratón) que tiene unida la enzima peroxidasa HRP. Diluir el anticuerpo secundario en 5 mL de TBS 1x + 0,1% Tween 20. Dilución 1:10000 α -mouse HRP conjugated (Invitrogen®).
- Realizar 3 lavados de 5 minutos de la membrana en TBS 1x + 0,1% Tween 20.
- Detectar nuestra proteína de interés usando el kit ECL (ThermoFisher®).

Con ello obtenemos imágenes de nuestra membrana (figuras suplementarias 3) con las bandas correspondientes a nuestra proteína de fusión a la altura esperada según el marcador (100 kDa).

ESTUDIO DE LA BIOLUMINISCENCIA DE LAS DIFERENTES CEPAS TRANSFORMANTES

Una vez ya tenemos la cepa W303 transformada con diferentes plásmidos que codifican proteínas de fusión con las distintas versiones de *PDR1* de diferentes cepas de levadura, hay que realizar el ensayo de detección de bioluminiscencia con el luminómetro, con el que registraremos la actividad del reportero luciferasa. La detección de la bioluminiscencia también se realizará con las diferentes cepas naturales de levadura transformadas con los plásmidos que llevan el reportero bajo el control de las secuencias PDRE y SNQp. Para todo esto, se seguirán los siguientes pasos:

- Hacer crecer los precultivos hasta la saturación a 30°C *overnight* de los diferentes transformantes a testar en 3 mL de medio SD pH 5,5 suplementado con los correspondientes aminoácidos según la auxotrofia de la cepa.

- Inocular con los precultivos una serie de medios de cultivo de 4 mL de SD pH 3 (esta vez el pH es más ácido para favorecer la captación del sustrato de la luciferasa, luciferina, por parte de las células de levadura). Se inoculan en el cultivo diferentes cantidades de precultivo (1 μ L, 2 μ L, 5 μ L y 10 μ L). Se incuban los cultivos overnight a 30°C hasta que tengan una OD₆₀₀ entre 1'5 y 2'5. Cuando la OD₆₀₀ está por debajo de 1'5, la cantidad de células de levadura para el experimento es insuficiente, en cambio cuando está por encima de 2'5 la eficiencia en la captación de luciferina por parte de las células cae.
- Se seleccionan los cultivos de la serie preparada que tengan un OD apropiada y se añade al cultivo luciferina a partir de un stock a 10 mM para un volumen final de luciferina en el cultivo de 0,5 mM. Se incuban los cultivos durante 1 hora en agitación a 30°C para favorecer la entrada de luciferina en las células.
- Se prepara una placa de 96 pocillos sin tapa (Costar[®] Assay Plate 96 well). El xenobiótico a emplear será menadiona. A partir de un stock de 20 mM de menadiona se preparan tubos con diferentes concentraciones de menadiona diluyéndola con medio SD. En cada pocillo se pone un volumen de 15 μ L de la dilución pertinente de menadiona y 135 μ L de las células tratadas con luciferina con una pipeta multicanal para obtener una serie de concentraciones finales crecientes de menadiona en los pocillos de 0 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 75 μ M, 100 μ M, 125 μ M, 150 μ M y 200 μ M. Para cada tratamiento con una concentración diferente de menadiona duplicaremos los pocillos. La siguiente figura esquematiza la distribución de los pocillos en relación a los tratamientos con diferentes concentraciones de menadiona.

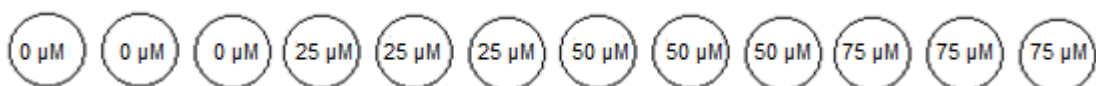


- Se coloca la placa en el luminómetro (Promega Glomax[®] Multidetecion System) y se inicia el programa de medición, que medirá la bioluminiscencia en cada pocillo cada 3 minutos durante 3 horas.

ENSAYO DE CRECIMIENTO

Para este ensayo se utilizarán tanto las cepas naturales de levadura como las cepas originales a partir de las cuales se obtuvo cada proteína de fusión de Pdr1. Se utilizarán los ejemplares originales, sin ningún tipo de transformación plasmídica, ya que no queremos detectar bioluminiscencia sino la manera en la que evoluciona su crecimiento bajo distintas concentraciones de menadiona, midiendo la absorbancia del medio en el que crecen mediante un lector de microplacas. Los pasos a seguir serán los siguientes:

- Crecer cultivos de las cepas a testar hasta la saturación en 3 mL de medio YPD a 30°C *overnight*.
- Medir la OD₆₀₀ y con nuevo medio YPD hacer la dilución pertinente para tener como resultado un nuevo cultivo a una OD de 0'1 en un volumen final de 4 mL de YPD.
- Mientras tanto, preparamos en tubos *ependorf* diferentes concentraciones de menadiona (0 mM, 0'5mM, 1mM y 1'5 mM) diluyéndola con DMSO a partir de un stock a 20mM. En una placa de 96 pocillos (VWR® Tissue Culture Plates 96 well) depositamos por triplicado 13µL de cada una de las diluciones de menadiona preparadas en los tubos. A continuación añadimos el nuevo cultivo celular, 247µL de células en cada pocillo, para que la menadiona quede diluida a unas concentraciones finales de 0 µM, 25 µM, 50 µM y 75µM. La representación esquemática sería la siguiente:



- Se coloca la placa en el lector de microplacas (Tecan microplate reader Spark®) y se inicia el programa de medición, que medirá la absorbancia (OD₆₀₀) en cada pocillo cada media hora durante 2 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos que aportan el luminómetro y el lector de microplacas en los ensayos de bioluminiscencia y crecimiento respectivos son previamente tratados, analizados y computados para obtener los resultados de donde podemos inferir conclusiones.

En las pruebas realizadas con el luminómetro, el programa que se utiliza realiza una lectura de la bioluminiscencia en cada pocillo cada 3 minutos durante 3 horas. Pasado el tiempo se recogen los datos en Excel y se realizan una serie de representaciones e interpretaciones gráficas. La primera de ellas, es la variación de la bioluminiscencia media normalizada respecto al tiempo y respecto a la concentración de menadiona. Cada valor de bioluminiscencia es una media del duplicado que tenemos para cada concentración de menadiona. A continuación, a partir de los datos de intensidad de la bioluminiscencia hacemos el cálculo de la inducción, que consiste en dividir el valor más alto de intensidad lumínica que se alcanza en el momento de mayor actividad de Pdr1 para una concentración concreta de menadiona entre el valor más bajo de intensidad lumínica y por tanto de actividad de Pdr1 que presenta la muestra al principio de la incubación para esa misma concentración, cuando todavía no se ha inducido la expresión y síntesis de luciferasa. Así obtenemos un valor numérico que nos indica de forma más ilustrativa sobre qué orden de magnitud se ha incrementado la actividad de Pdr1 durante la exposición a diferentes concentraciones de menadiona. Representamos gráficamente este valor en función de las distintas concentraciones de menadiona empleadas.

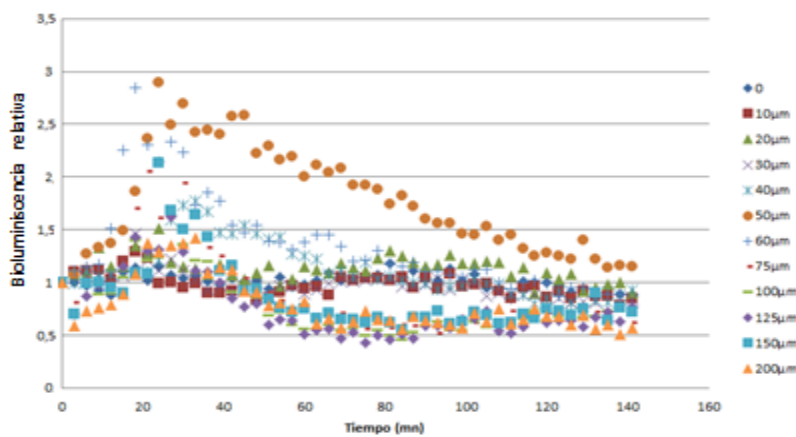
Por otro lado, en el ensayo de crecimiento, el programa que utilizamos con el lector de microplacas mide la OD_{600} en los pocillos cada media hora durante 2 días. Acabado el tiempo, se recogen igualmente los datos en Excel y se realizan las pertinentes representaciones gráficas. La primera representación es la variación de la OD_{600} media en función del tiempo y de la concentración de menadiona. Cada valor de OD_{600} es una media del triplicado que tenemos para cada concentración de menadiona. A continuación, a partir de estos datos se calcula un nuevo parámetro: el tiempo medio de crecimiento, que consiste en el tiempo que tarda el cultivo del pocillo en llegar a la mitad del proceso de crecimiento de la fase exponencial. Evidentemente, cuanto más bajo sea el tiempo medio de crecimiento significará que mejor y más rápido crece el cultivo, por lo que esperamos que los cultivos que crecen con menadiona en el

medio tengan un tiempo medio de crecimiento más alto. Calcularemos, por tanto, el tiempo medio de crecimiento para cada concentración de menadiona. Para finalizar, a partir del tiempo medio de crecimiento calculamos un último valor: la eficiencia de crecimiento. Este valor se calcula dividiendo el tiempo medio de crecimiento de los cultivos de levadura de una cepa dada cuando crecen sin menadiona entre cada uno de los tiempos medios de crecimiento de los cultivos de esa misma cepa que crecen a diferentes concentraciones de menadiona, por lo que obtendremos un porcentaje para cada concentración de menadiona que representará la eficiencia de crecimiento. Finalmente representaremos gráficamente estos valores de eficiencia de crecimiento en función de la concentración de menadiona. Como el tiempo medio de crecimiento en los pocillos que tienen menadiona es presumiblemente más alto, la eficiencia de crecimiento será más baja, e irá bajando conforme aumente la concentración de menadiona en el medio.

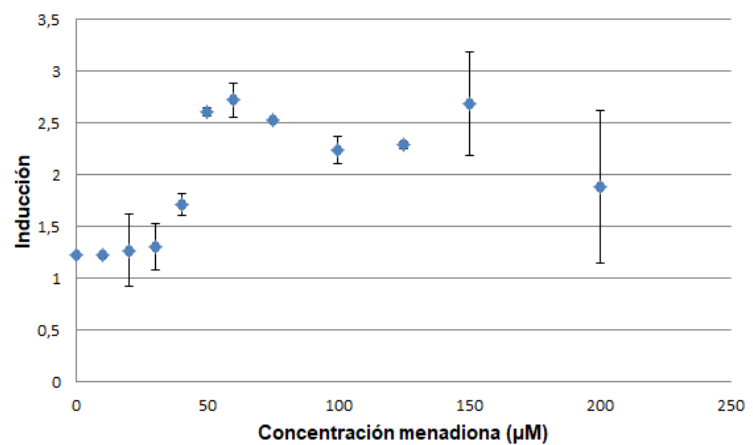
RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

-Análisis del comportamiento de las proteínas de fusión de Pdr1

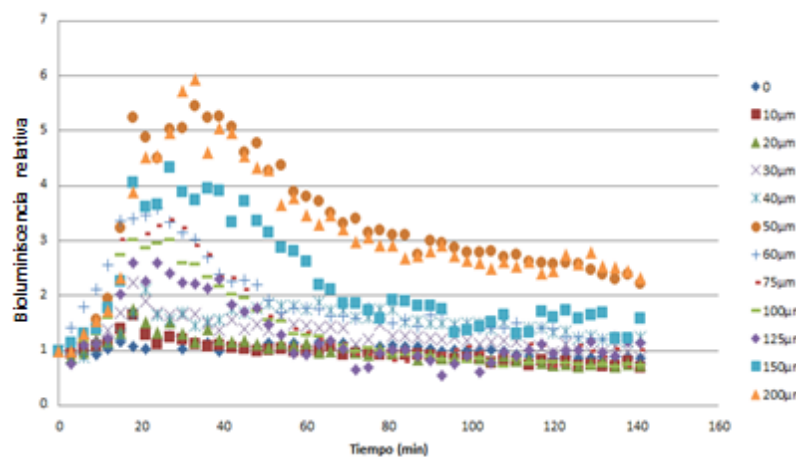
Evolución de la bioluminiscencia CEN.PK2-1C



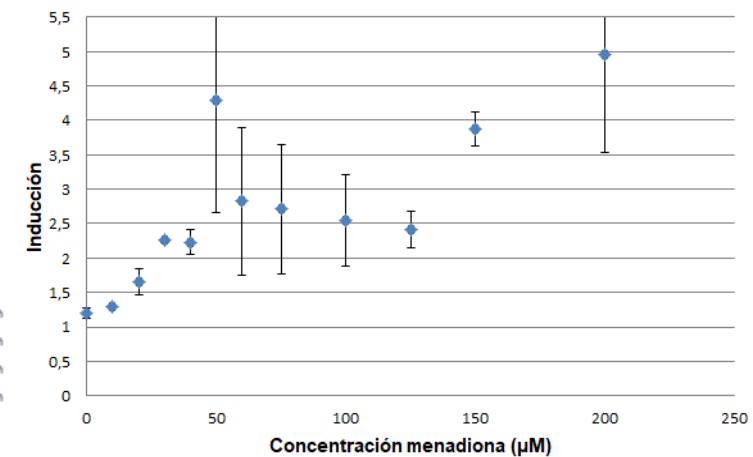
Inducción CEN.PK2-1C



Evolución de la bioluminiscencia BY4741



Inducción BY4741



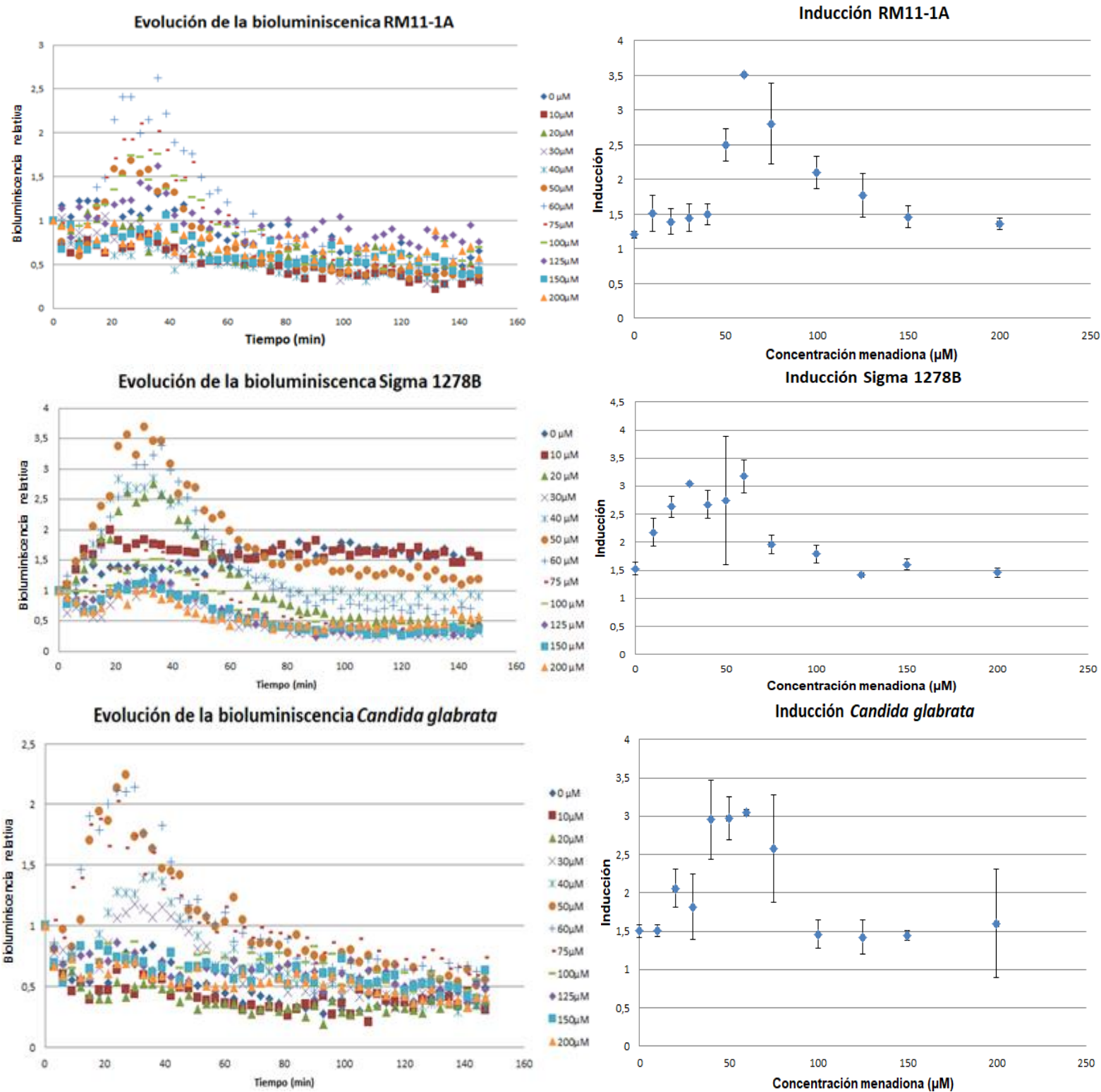


Figura 6. Activación dosis dependiente de diferentes versiones de Pdr1 en respuesta a menadiona. Los gráficos de la izquierda corresponden a representaciones de las variaciones de la bioluminiscencia relativa (no son valores absolutos, se han normalizado a 1 para el tiempo 0) en función del tiempo y de la concentración de menadiona de la cepa W303 transformada con el plásmido pGBKT7 con las diferentes versiones de Pdr1 de distintas cepas de levadura. El eje X corresponde al tiempo en minutos desde que los cultivos entran en contacto con la menadiona y el eje Y es la bioluminiscencia relativa. Los gráficos de

la derecha representan la variación del nivel de actividad o de inducción de respuesta que genera Pdr1 en función de la concentración de menadiona presente en el medio, calculada a partir de los gráficos de la izquierda, dividiendo el valor máximo de bioluminiscencia que se alcanza en el momento de mayor actividad entre el valor mínimo de bioluminiscencia en el momento de mínima actividad al principio de la incubación en cada concentración de menadiona. Se ha realizado el mismo experimento 2 veces, por lo que tenemos dos gráficos de evolución de bioluminiscencia para cada cepa (pero solo se muestra uno de ellos en la figura) y dos valores de inducción para cada cepa y concentración de menadiona, por lo que los valores de los gráficos de inducción son en realidad la media de los dos valores de inducción obtenidos. Las barras de error en los gráficos de inducción equivalen a una desviación estándar, calculada a partir de los dos valores de inducción que tenemos para cada concentración de menadiona.

En la figura 6 podemos observar una relación de gráficos que nos permitirán estudiar las diferencias entre los Pdr1 de diferentes cepas de levadura (CENP.PK2-1C, BY4741, RM11-1A, Sigma 1278B y *Candida glabrata*) en cuanto a la sensibilidad y la capacidad de inducción ante la presencia de menadiona en el medio a concentraciones crecientes. El diseño experimental, que podemos ver esquematizado en la figura 7, ha consistido en fusionar la secuencia que codifica el XBD y TD del Pdr1 de las distintas cepas de levadura con la secuencia de Gal4_{DBD} contenida en el plásmido pGBKT7. Con este plásmido se ha transformado la cepa de levadura W303-1A gal4 GAL1-lucCP⁺ que ya lleva un plásmido en su interior (pAG413-CYC1Δ-UAS_{GAL1}-lucCP⁺), el cual contiene el reportero de la luciferasa desestabilizada bajo el control de la secuencia reguladora y de unión de Gal4_{DBD} (UAS_{GAL1}). De modo que la proteína de fusión de Pdr1-Gal4 se unirá por defecto a la secuencia UAS_{GAL1}, y ante estímulos que la activen como la presencia del xenobiótico menadiona en el medio inducirá la activación de la transcripción de la luciferasa y por tanto la emisión de bioluminiscencia. Según el nivel de bioluminiscencia emitida a concentraciones distintas de menadiona, podremos estudiar las características que diferencian los Pdr1 de las distintas cepas en cuanto a sensibilidad y capacidad de inducción de la respuesta PDR.

Además es interesante mencionar que una de las razones por las que se clona el dominio TD es porque es la parte de la proteína que mayor variabilidad presenta entre cepas, y es la por tanto, la parte que mejor puede generar diferencias entre las respuestas a menadiona de las distintas cepas. Como se ve en la figura 7, esta parte de la proteína es rica en residuos de asparaguina, pero estos cambian en cantidad y en posición según la cepa que estemos observando. En general, la parte C-terminal de la proteína Pdr1 (que es la parte donde encontramos el TD) es la parte que acumula mayor variabilidad.

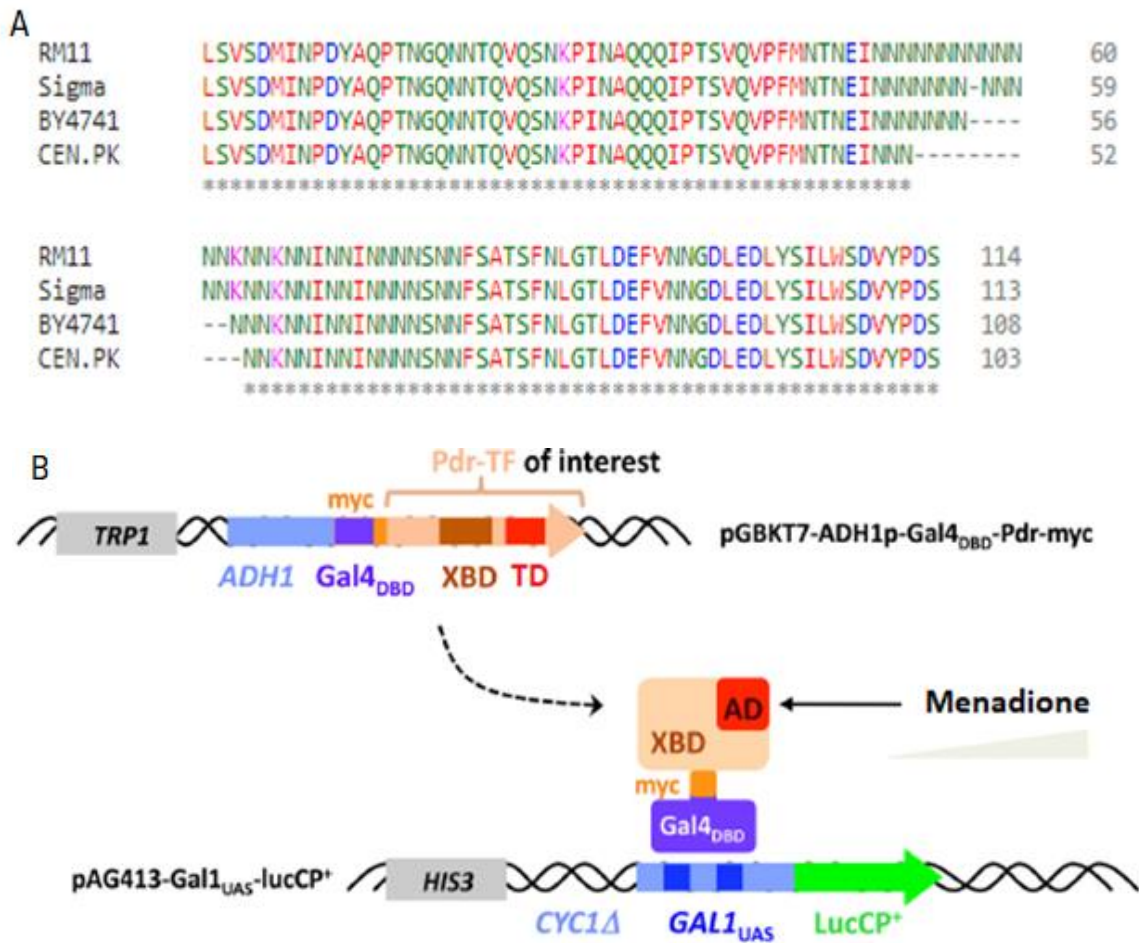


Figura 7. En el dibujo **A** podemos observar una tabla comparativa de las secuencias de aminoácidos de las partes C-terminal (donde encontramos los dominios TD) de los Pdr1 de las distintas cepas estudiadas (menos *Candida glabrata* que presenta un TD demasiado variable sin región de poliasparaguinas). La comparativa se realiza mediante un *Multiple Sequence Alignment* usando el software de Clustal Omega. Se alinean las distintas secuencias; un asterisco debajo de los alineamientos cuando hay coincidencia aminoacídica en todas las secuencias; ausencia de asterisco cuando no hay coincidencia. Los símbolos de los aminoácidos aparecen coloreados según su naturaleza química: rojo (pequeños e hidrofóbicos), azul (ácidos), rosa (básicos) y verdes (polares).

En el dibujo **B** podemos observar un esquema de las construcciones genéticas realizadas en las que se fusiona una parte de la secuencia codificante de los Pdr1 de diferentes cepas de levadura con el Gal4_{DBD} y la relación que establece la proteína de fusión resultante con el plásmido que contiene el reportero luciferasa, uniéndose a la secuencia GAL1_{UAS} e induciendo la transcripción del gen reportero ante la presencia de menadiona en el medio. Figura extraída y modificada de Vanacloig-Pedros et al., 2019.

Si pasamos a analizar los gráficos de la figura 6 lo primero que podemos observar dentro de este grupo de análisis es que algunos Pdr1 reaccionan de manera similar a la presencia de menadiona en el medio, como CEN.PK2-1C, BY4741 y RM11-1A. Estas versiones de Pdr1 presentan una sensibilidad similar a este xenobiótico, que mantiene latente la actividad de la luciferasa a concentraciones inferiores de 50 μM,

pero que a partir de esta concentración se dispara la actividad de la luciferasa, es decir, la menadiona induce significativamente la actividad de Pdr1 a partir de una concentración de 50 μM en el medio. Sin embargo, no observamos este comportamiento de Pdr1 en Sigma 1278B y *Candida glabrata*, donde la inducción de la actividad de Pdr1 se dispara ya desde el principio, a concentraciones más bajas de 50 μM . Esto podría sugerir que en el caso de Sigma 1278B y *Candida glabrata*, sus respectivos Pdr1 unen la menadiona con mayor afinidad que en el resto porque inducen la actividad de Pdr1 ya a concentraciones muy bajas de menadiona, lo que indica que el Pdr1 de estas levaduras presenta una sensibilidad comparativamente mayor a este sustrato.

Por otro lado, por lo que respecta al valor de la inducción máxima de la actividad de Pdr1, obtenemos resultados muy variables según el tipo de Pdr1 estudiado, pero en general rondan una magnitud de en torno a 3 o 3'5 respecto al valor basal, con la excepción de BY4741, que llega a generar una inducción de 5 veces el valor basal.

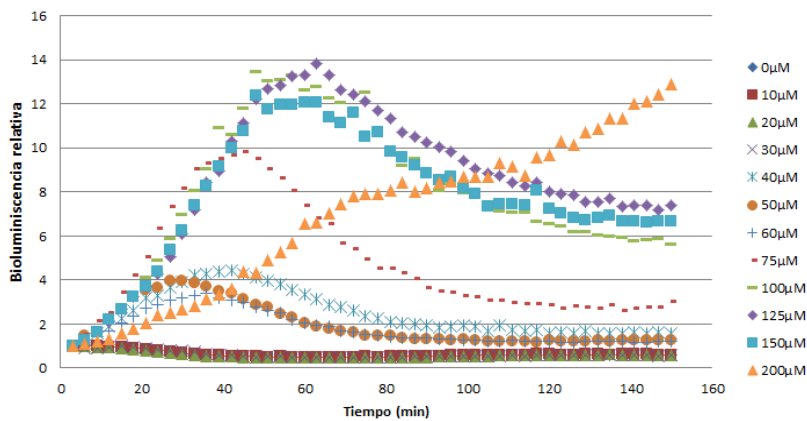
El último aspecto a comentar de la gráfica de la inducción es acerca de la extinción de la actividad de Pdr1, y a qué concentraciones se produce dicha extinción, es decir, a partir de qué concentraciones de menadiona se sobresatura Pdr1 y empieza a bajar su actividad. Esta extinción parece que se empieza a producir a partir de una concentración de menadiona de en torno a 75 μM . A esta concentración, la actividad de Pdr1 empieza a bajar, pero no baja todavía a los mismos valores basales iniciales. Esta bajada definitiva a valores basales se experimenta por lo general en torno a concentraciones de 100 y 150 μM de menadiona. En este aspecto, todos los factores Pdr1 presentan un comportamiento similar, excepto CENP.PK2-1C y BY4741, los cuales manifiestan una bajada de actividad hasta 125 μM de menadiona pero que a partir de 150 μM experimentan un segundo pico de actividad.

El último aspecto gráfico a analizar son las gráficas de la evolución de la bioluminiscencia. Lo más interesante de estas gráficas es que nos permite introducir otro parámetro más dentro de nuestro análisis: el tiempo. Concretamente nos permiten averiguar cuánto tiempo necesita la levadura incubarse con el xenobiótico para que Pdr1 empiece a impulsar la síntesis y actividad de los genes que regula, en este caso el reportero luciferasa. Respecto a este aspecto, podemos observar comportamientos bastante homogéneos en todos los casos de estudio. En todos los casos se dispara la actividad de la luciferasa a partir de los 30-40 minutos de incubación con menadiona,

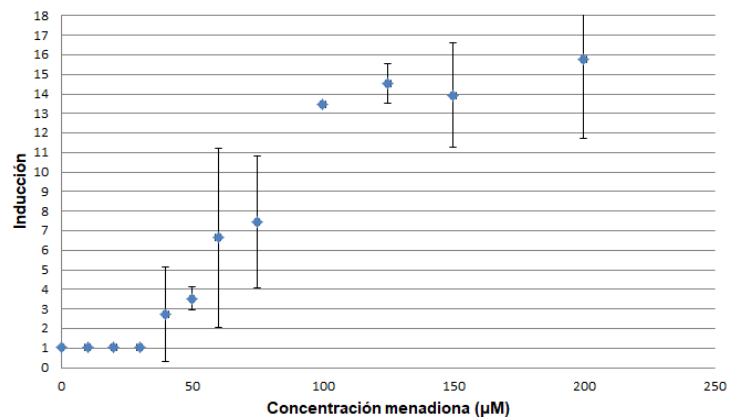
lo que sugiere que este es el tiempo que requiere Pdr1 para actuar y estimular la síntesis de los genes que regula. El único caso que parece actuar un poco más rápido es el de *Candida glabrata*, que parece que logra ya estimular la actividad de la luciferasa a partir de los 20 minutos. Otro aspecto a comentar es que parece que en todos los casos la inducción de la actividad empieza a extinguirse a partir de los 50-60 minutos de incubación. A partir de ese tiempo, la actividad de la luciferasa empieza a disminuir hasta disiparse completamente. Esto indica que la respuesta de Pdr1 a la exposición de xenobióticos presenta una naturaleza transitoria, estimulando la expresión de ciertos genes durante una ventana de tiempo muy concreta y estrecha. Esto es porque los genes cuya expresión estimula (transportadores ABC fundamentalmente) presentan una función muy concreta y especializada, y actúan de forma transitoria ante coyunturas y amenazas muy específicas, como es la exposición a xenobióticos.

-Análisis de los sistemas PDR de distintas cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae*

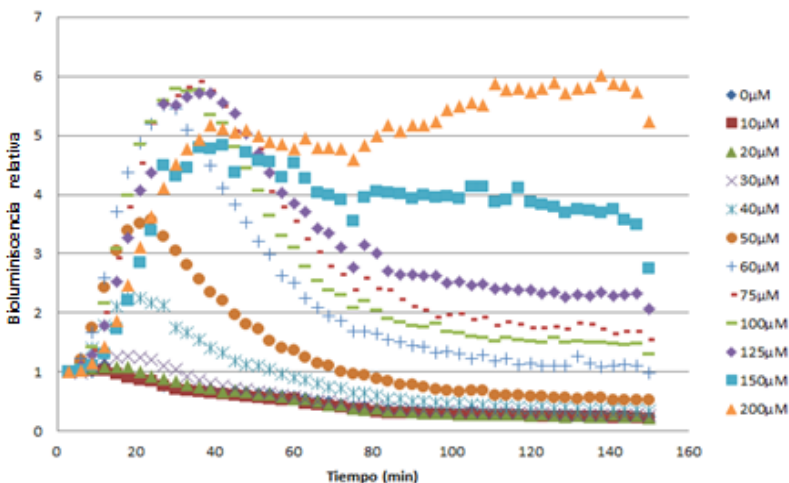
Evolución de la bioluminiscencia Y12-pAG413-SNQ2



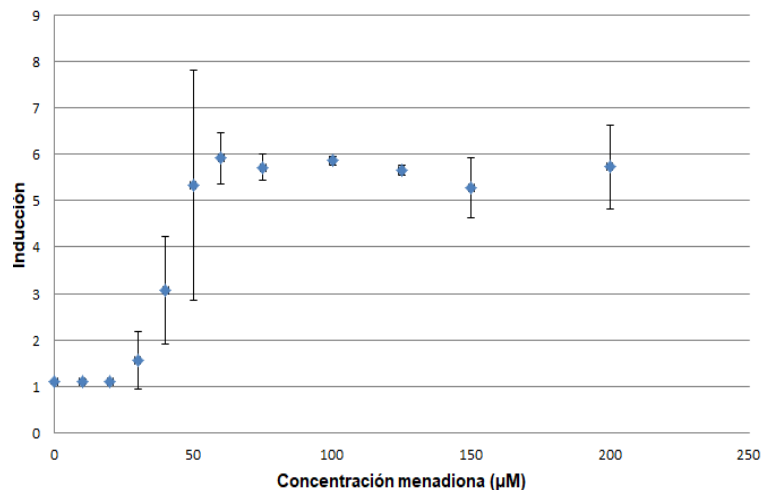
Inducción Y12-pAG413-SNQ2



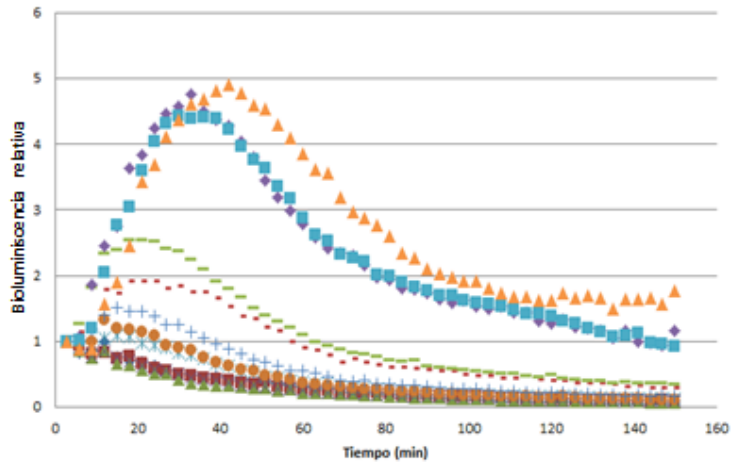
Evolución de la bioluminiscencia DBVPG6044-pAG413-SNQ2



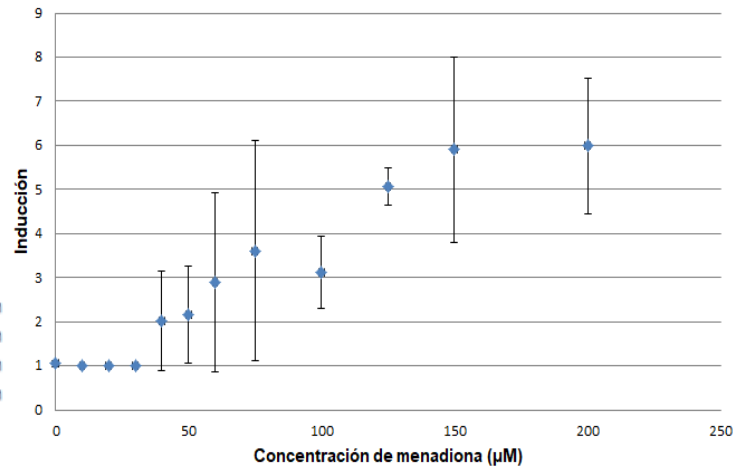
Inducción DBVPG6044-pAG413-SNQ2



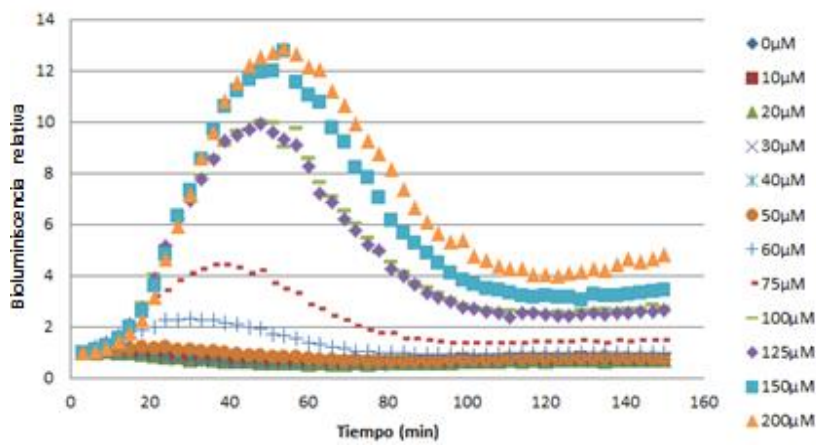
Evolución de la bioluminiscencia YJM981-pAG413-SNQ2



Inducción YJM981-pAG413-SNQ2



Evolución de la bioluminiscencia BY4741-pAG413-SNQ2



Inducción BY4741-pAG413-SNQ2

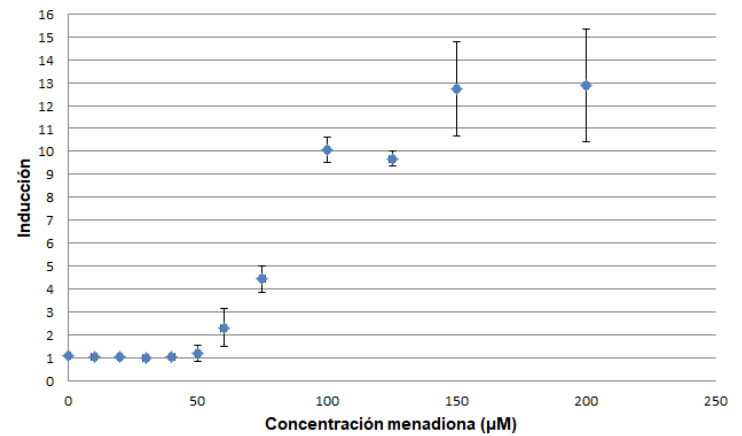


Figura 8. Activación dosis dependiente de la respuesta PDR de diferentes cepas naturales de levadura a menadiona con el reportero SNQ2-lucCP⁺. Los gráficos de la izquierda corresponden a representaciones de las variaciones de la bioluminiscencia relativa en función del tiempo y de la concentración de menadiona de distintas cepas naturales de levadura transformadas con el mismo plásmido pAG413-SNQ2p-lucCP⁺. Los gráficos de la derecha representan la variación del nivel de actividad o inducción de la respuesta PDR en función de la concentración de menadiona presente en el medio. El tratamiento de los datos y los parámetros analizados gráficamente es el mismo que el de la figura 6. También se ha realizado el experimento por duplicado, por lo que se ha realizado el mismo tratamiento estadístico.

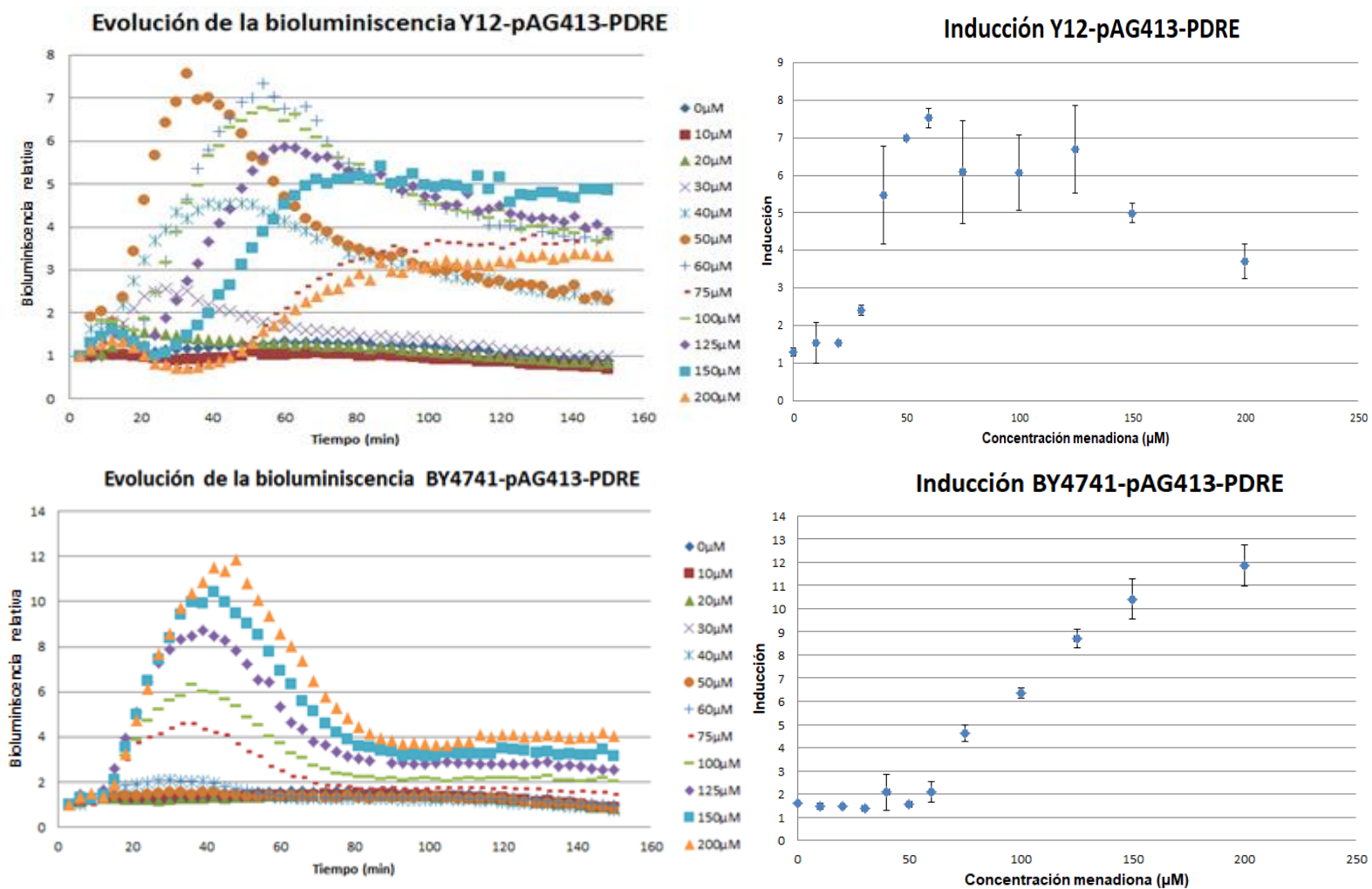


Figura 9. Activación dosis dependiente de la respuesta PDR de diferentes cepas naturales de levadura a menadiona con el reportero 3xPDRE-lucCP⁺. Los gráficos de la izquierda corresponden a representaciones de las variaciones de la bioluminiscencia relativa en función del tiempo y de la concentración de menadiona de distintas cepas naturales de levadura transformadas con el mismo plásmido pAG413-3xPDRE-lucCP⁺. Los gráficos de la derecha representan la variación del nivel de actividad o inducción de la respuesta PDR en función de la concentración de menadiona presente en el medio. Hay un número de cepas transformadas menor que en el caso del plásmido pAG413-SNQ2p porque no se lograron transformar las cepas YJM981 y DBVPG6044. El tratamiento de los datos y los parámetros analizados gráficamente es el mismo que el de las figuras 6 y 8. También se ha realizado el experimento por duplicado, por lo que se ha realizado el mismo tratamiento estadístico.

En esta parte del estudio se compararán las propiedades de los sistemas PDR en general de diferentes cepas de levadura naturales. El aspecto diferencial respecto al análisis anterior es que en este caso, transformaremos distintas cepas de levadura con plásmidos que contienen el reportero luciferasa bajo el control de secuencias reguladoras de unión de diferentes factores activadores de la respuesta PDR: secuencias como son el promotor del gen *SNQ2* en el plásmido pAG413-SNQ2p-lucCP⁺ (Figura 8) y la secuencia reguladora PDRE en el plásmido pAG413-3xPDRE-

lucCP⁺ (Figura 9). En este caso los factores activadores son los propios naturales de la levadura codificados en su genoma, es decir, no tienen ningún tipo de modificación genética y su dominio de unión al DNA está intacto. Con ello, también queremos chequear si la sustitución del dominio DBD que hemos hecho en el apartado anterior afecta de alguna manera a la actividad de la proteína. En general, lo que se pretende obtener en este experimento es una visión más holística de las propiedades del conjunto de factores que generan la respuesta PDR y no tan centrado en las propiedades de los dominios proteicos de un factor en concreto (Pdr1).

Lo primero que podemos observar cuando hacemos una visión general de las gráficas de inducción de las figuras 8 y 9 es que algunas cepas rondan inducciones de la luciferasa de una magnitud de entre 5 y 7, mientras que otras cepas logran disparar la inducción hasta valores de entre 12 y 16. Pero lo que todas tienen en común es que en general en todos los casos se induce la actividad de la luciferasa de forma más eficiente que en el experimento anterior donde Pdr1 es una proteína de fusión. Esto probablemente se explica precisamente porque al sustituir uno de los dominios naturales de la proteína Pdr1 por otro extraño (aunque no sea un dominio fundamental para la función específica de Pdr1, que es detectar xenobióticos), esto afecta marginalmente a la función de la proteína disminuyendo ligeramente su actividad y su capacidad de inducir la transcripción. Otra explicación posible es que la proteína Pdr1 natural se une más eficientemente a sus secuencias de unión que la proteína de fusión, es decir, que el DBD natural de Pdr1 se une con mayor afinidad a sus secuencias de unión naturales (PDRE y el promotor de *SNQ2*) induciendo mucho más los genes que regula *downstream* que Gal4 uniéndose a su secuencia de unión UAS_{GAL1}. Pero la explicación más plausible a este fenómeno es que la respuesta PDR en general es activada por varios factores con funciones redundantes, que pueden unirse a la misma secuencia reguladora y que cuando actúan conjuntamente crean un efecto de sinergia y pueden potenciar la respuesta mucho más que actuando individualmente, que es lo que ocurre en el experimento de la proteína de fusión.

Otras características comunes que diferencian las cepas en conjunto de las proteínas de fusión es que presentan un pico de inducción mucho más extendido en el tiempo. De hecho, este pico no desciende en ningún momento a pesar de que aumente la concentración de menadiona. Cuando la actividad empieza a ascender hasta llegar a la inducción máxima, se alcanza entonces una fase *plateau* en la que se mantiene el nivel de inducción constante, sin subir ni bajar, a pesar de variar la concentración de

xenobiótico (con la excepción de Y12-pAG413-3xPDRE, que sí que experimenta una bajada en los niveles de inducción a concentraciones altas de menadiona).

Si nos adentramos ya analizar de forma más específica las características de las cepas transformadas con el plásmido pAG413-SNQ2p en la figura 8, lo primero que destaca es el alto nivel de inducción que se alcanza con las cepas Y12 y BY4741 en los que se supera una inducción por encima de una magnitud de 10 (de 16 y 13 respectivamente), mientras que en las cepas YJM981 y DBVPG6044 la inducción ronda un valor de en torno a 6. Esto a priori podría indicar que los factores de la respuesta PDR de las cepas Y12 y BY4741 se unen con mayor eficacia a sus secuencias reguladoras o que inducen la expresión de los genes que regulan más intensamente, gracias a que recluta a los factores coactivadores de la transcripción más eficientemente.

Respecto a la sensibilidad con las que las distintas cepas reaccionan a la menadiona hay que mencionar que una de ellas, DBVPG6044, a partir de una concentración concreta de menadiona (en torno a 30 μM) dispara abruptamente la actividad de la luciferasa alcanzando rápidamente a concentraciones bajas de menadiona la inducción máxima, indicando una alta afinidad y sensibilidad de sus factores PDR por el sustrato menadiona. La cepa BY4741, en cambio, va aumentando los niveles de inducción de una forma más paulatina (a partir de concentraciones superiores a 50 μM) y alcanza los niveles de inducción máxima a concentraciones más altas de menadiona, lo que indica una menor afinidad y sensibilidad de sus factores PDR por el sustrato menadiona. Las cepas Y12 e YJM981, por su parte, muestran un nivel de sensibilidad intermedio, porque disparan la actividad de la respuesta PDR a concentraciones de menadiona más bajas que BY4741, pero lo hacen de una forma más progresiva que DBVPG6044.

Si pasamos a analizar ahora los gráficos de las cepas transformadas con el plásmido pAG413-3xPDRE en la figura 9, lo que observamos es que los datos corroboran los resultados que hemos extraído de la figura 8: Y12 presenta una mayor sensibilidad a menadiona que BY4741. De hecho, en este caso presenta una sensibilidad similar a la de la cepa DBVPG6044-pAG413-SNQ2p. Por lo que respecta a la capacidad de inducción de respuesta, BY4741 mantiene un alto nivel de inducibilidad como en el caso anterior con el plásmido pAG413-SNQ2p, mientras que Y12 sí que experimenta una notable bajada en la capacidad inducción de respuesta. La explicación puede

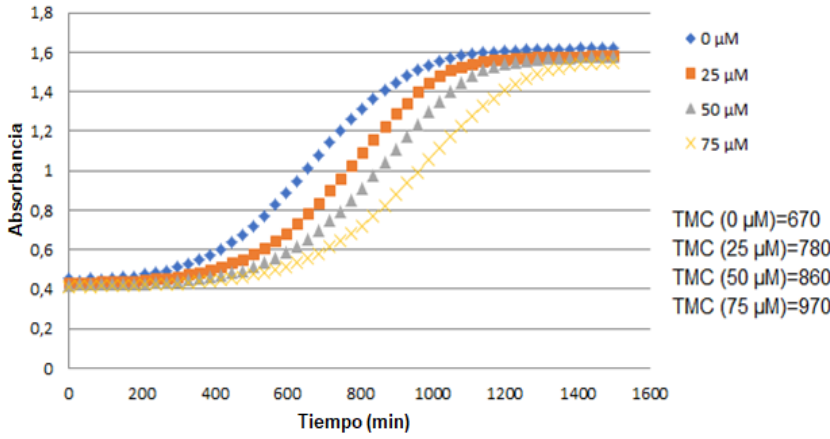
deberse a que los factores de transcripción de Y12 se unen con mayor afinidad a la secuencia del promotor de SNQ2 que a la secuencia regulatoria PDRE.

Para finalizar, si analizamos conjuntamente las gráficas de evolución de la bioluminiscencia de las figuras 8 y 9 observamos un comportamiento muy similar en todas. En todas las cepas podemos observar que en cada concentración de menadiona hay un tiempo de incubación en la que la actividad de la luciferasa se mantiene apagada, ya que durante este tiempo es cuando se está induciendo su transcripción y síntesis proteica, y llegado al minuto 20 de incubación se empieza a disparar e inducir la actividad de la luciferasa. Un aumento de la actividad que se prolonga hasta los 40-60 minutos, a partir de los cuales empieza a bajar. Todos presentan tiempos de incubación bastante homogéneos a excepción de Y12 (especialmente Y12-pAG413-3xPDRE) que parece variar sus tiempos de incubación según la concentración de menadiona que haya en el medio. Curiosamente, observamos que a concentraciones más altas, necesita periodos de incubación más prolongados para estimular la actividad de la luciferasa.

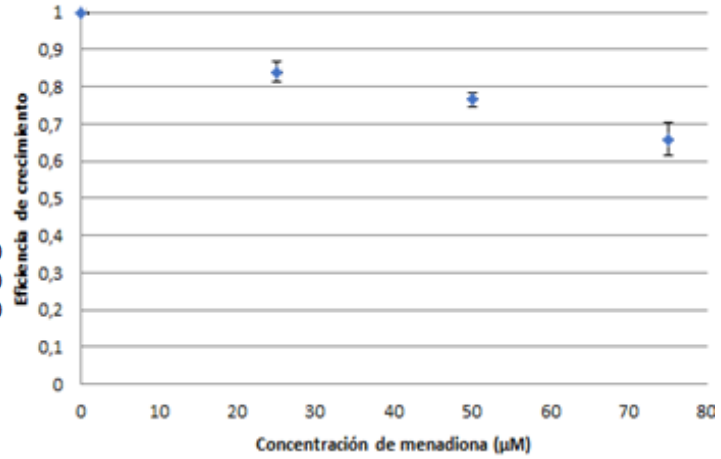
Por último, antes de pasar al siguiente apartado, es necesario señalar que no se pudieron efectuar todas las transformaciones que habían programadas para cada cepa. Para cada cepa habían programadas dos transformaciones independientes con dos plásmidos diferentes (pAG413-3xPDRE y pAG413-SNQ2p). En dos cepas se pudieron completar las dos transformaciones (Y12 y BY4741) pero en las otras dos solo se pudo efectuar una de las dos transformaciones (DBVPG6044 con pAG413-SNQ2p y YJM981 con pAG413-SNQ2p).

-Análisis cuantitativo de la tolerancia a menadiona en diferentes cepas de levadura

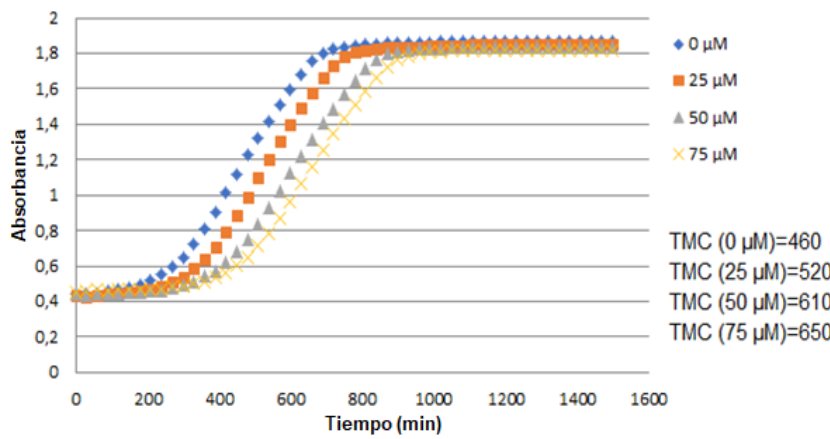
Curva de crecimiento CEN.PK2-1C



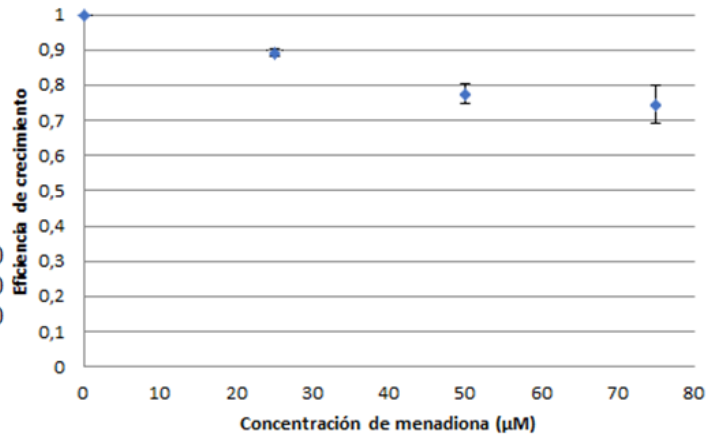
Eficiencia de crecimiento CEN.PK2-1C



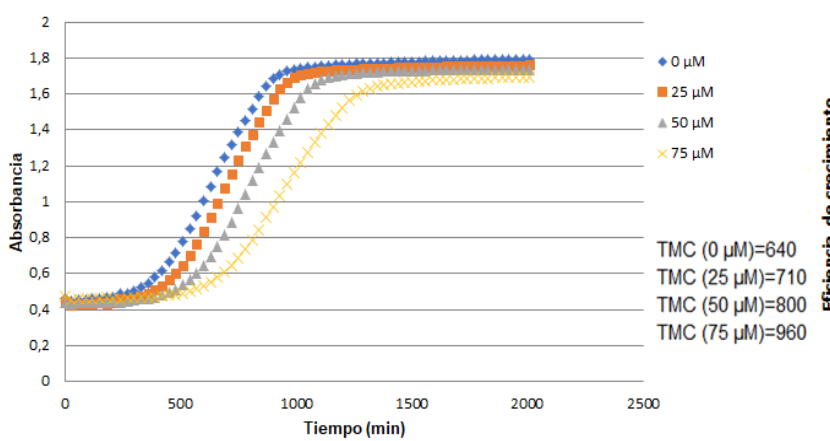
Curva de crecimiento BY4741



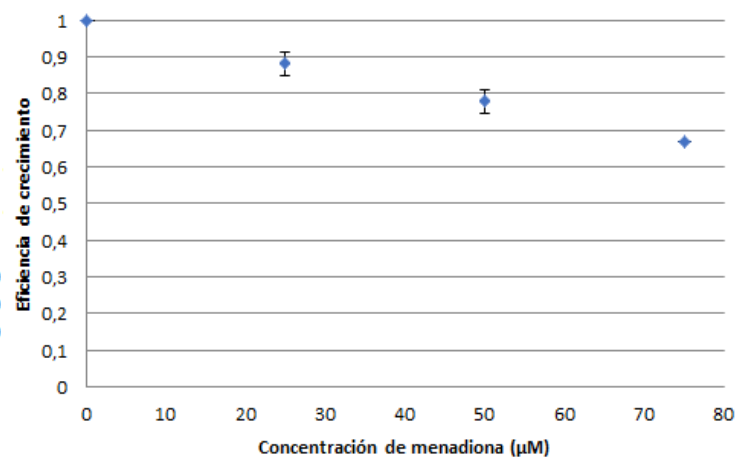
Eficiencia de crecimiento de BY4741



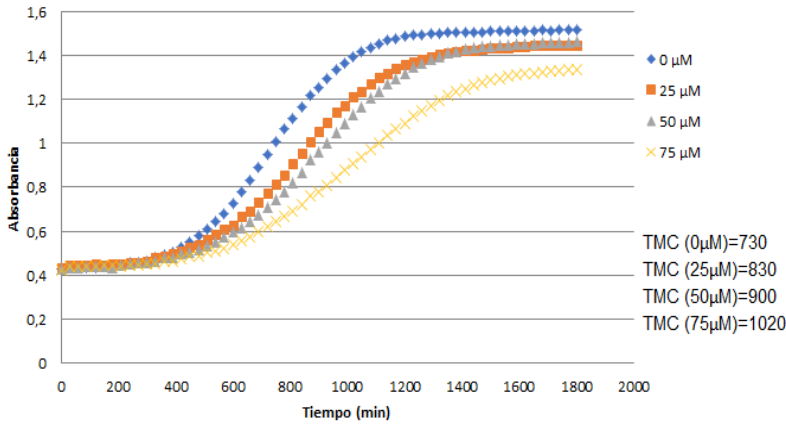
Curva de crecimiento RM11-1A



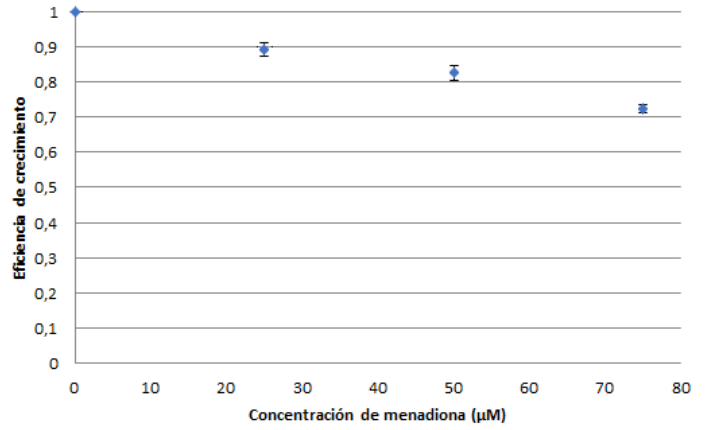
Eficiencia de crecimiento RM11-1A



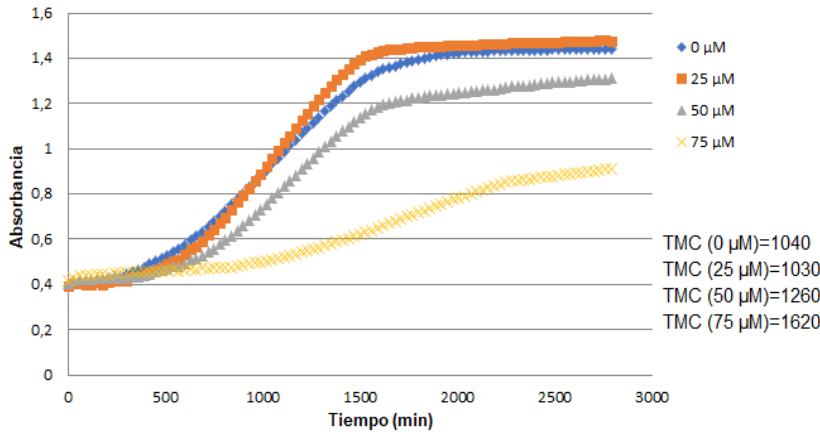
Curva de crecimiento Sigma 1278B



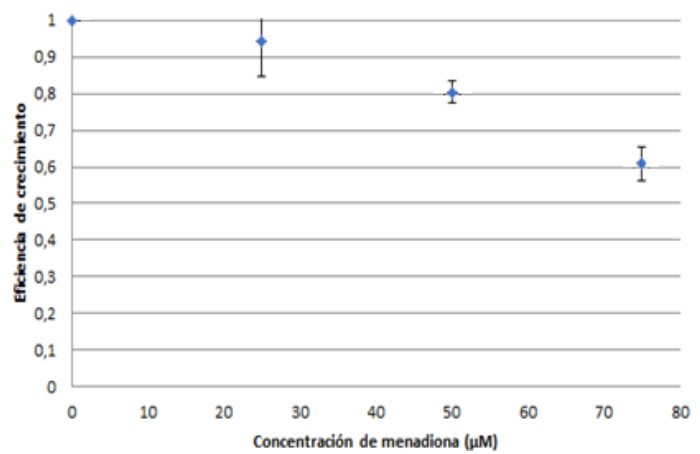
Eficiencia de crecimiento Sigma 1278B



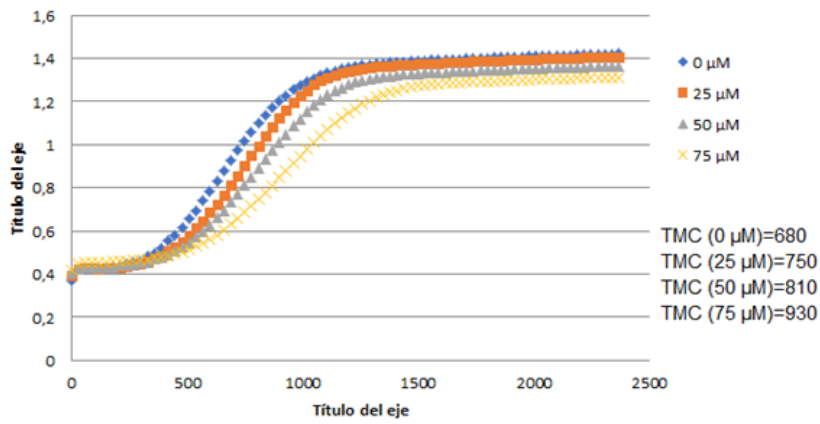
Curva de crecimiento *Candida glabrata*



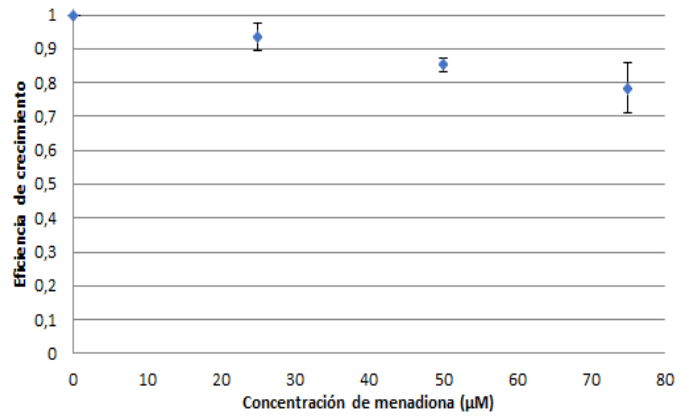
Eficiencia de crecimiento *Candida glabrata*



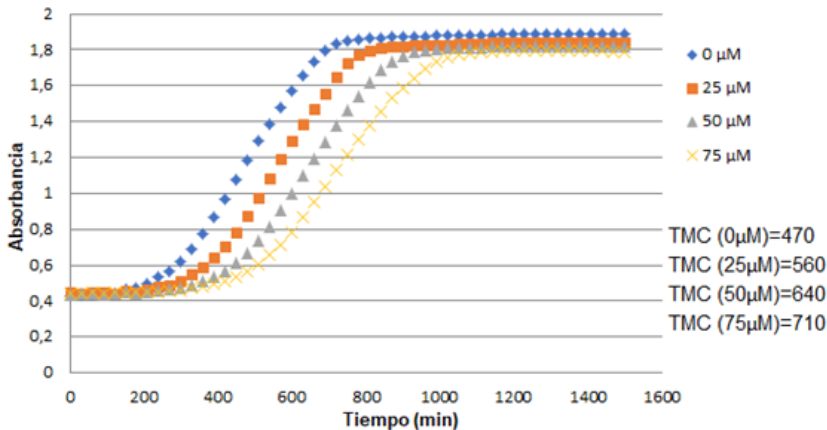
Curva de crecimiento Y12



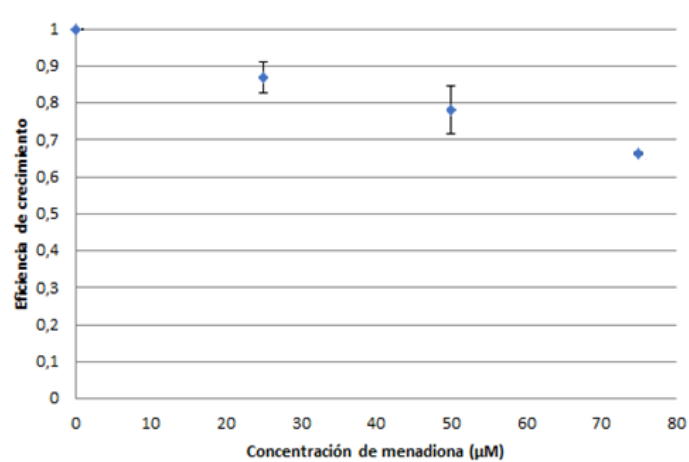
Eficiencia de crecimiento Y12



Curva de crecimiento YJM981



Eficiencia de crecimiento YJM981



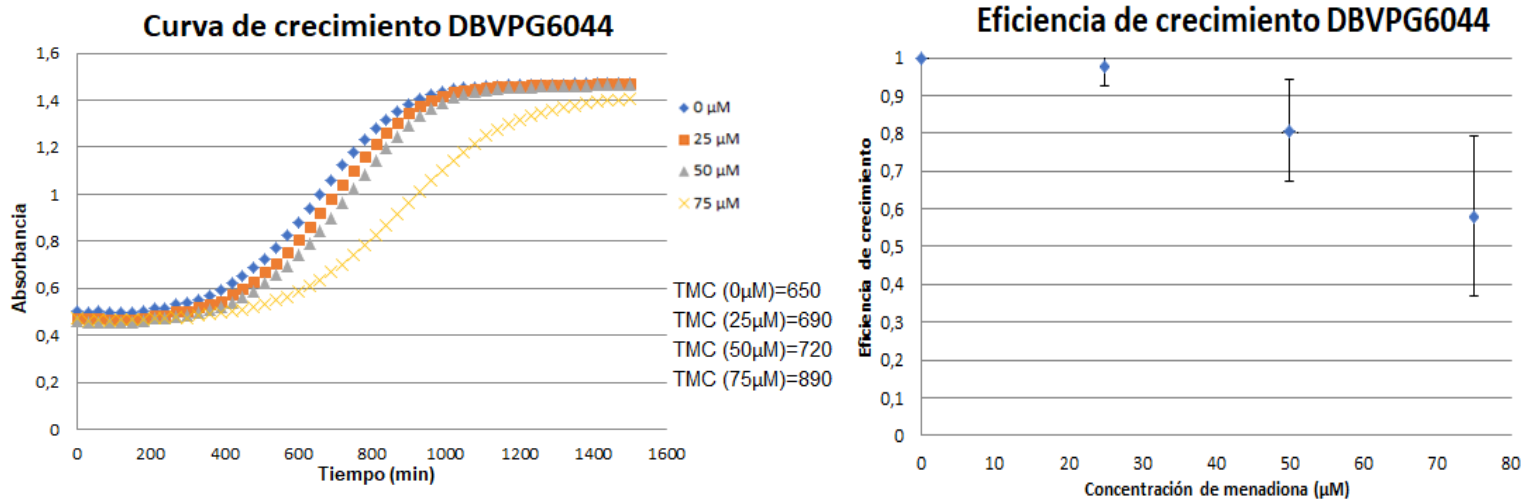


Figura 10. Crecimiento de diferentes cepas de levadura a concentraciones crecientes de menadiona. Los gráficos de la izquierda representan la curva de crecimiento que experimentan las diferentes cepas a concentraciones diferentes de menadiona. En el eje X se representa el tiempo en minutos y en el eje Y se representa la absorbancia (OD600). Se repitió el experimento, por lo que se obtuvieron 2 curvas de crecimiento para cada cepa de levadura (aunque en las figuras solo aparezca representada una de ellas). En la esquina inferior derecha de las curvas de crecimiento aparecen los Tiempos Medios de Crecimiento (TMC) de esa curva de crecimiento para cada concentración de menadiona. A partir de los TMC de las curvas de crecimiento, se calculan las eficiencias de crecimiento para cada concentración y se hace una media de los duplicados de las eficiencias de crecimiento de cada cepa y se representan gráficamente (gráficos de la derecha). Las barras de error equivalen a una desviación estándar, la cual se calcula de los dos valores de eficiencia de crecimiento que tenemos para cada concentración de menadiona en cada cepa.

Analizar cómo se comportan las diferentes cepas de estudio en periodo de crecimiento nos ayuda a entender el análisis que hemos realizado anteriormente de las características de sus Pdr1 y sus respuestas PDR, y cómo estas se traducen en una mayor o menor eficacia a la hora de crecer en presencia de xenobióticos (menadiona en este caso) en el ambiente.

El protocolo experimental ha consistido en preparar cultivos de las diferentes cepas de levadura con 4 concentraciones diferentes de menadiona (0μM, 25μM, 50μM, 75μM) y registrar la absorbancia (OD₆₀₀) para representar la evolución del crecimiento a cada concentración de menadiona. A continuación, a partir de los TMC extraídos de los gráficos se han calculado las eficiencias de crecimiento y también se han representado gráficamente.

Lo primero que llama la atención al ver las curvas de crecimiento es que la especie *Candida glabrata* tiene tiempos de crecimiento más prolongados que el resto de cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esto lo observamos también en sus TMC, que presentan valores más altos. No obstante, lo más interesante en este experimento es

observar las eficiencias de crecimiento de las diferentes cepas y ver cómo éstas decrecen a medida que aumenta la concentración de menadiona para luego relacionarlas con los resultados obtenidos del estudio de Pdr1 y de las respuestas PDR de cada cepa. Lo primero que podemos observar en la figura 10 es que aquellas cepas que en los estudios donde medíamos la bioluminiscencia mostraban una afinidad y una sensibilidad mayor ante concentraciones pequeñas de menadiona, manifiestan en este ensayo una eficiencia de crecimiento mayor que el resto de cepas cuando la menadiona está a concentraciones bajas en el medio. Esto se debe presumiblemente a que las células ya han logrado activar la respuesta PDR a pesar de la baja concentración de menadiona, manteniendo una buena eficiencia de crecimiento. Este hecho lo podemos observar en cepas como Sigma1278B, *Candida glabrata*, Y12 o DBVPG6044, que a concentraciones bajas de menadiona (25µM y 50µM) todavía logran mantener una eficiencia de crecimiento igual o superior al 80%, mientras que en las otras cepas, las cuales han mostrado previamente una menor sensibilidad a menadiona, esta eficiencia de crecimiento desciende por debajo del 80%.

Hay, además, otra variable de los estudios de bioluminiscencia previos que merece la pena interrelacionar con los datos de crecimiento, que es la de la inducción máxima. Hemos visto previamente, que según la cepa estudiada, la respuesta PDR ocurre con una mayor o menor intensidad. Normalmente esta inducción máxima se logra en todos los casos a concentraciones lo suficientemente grandes de menadiona (por encima de 50µM), por lo que los datos de crecimiento que obtenemos en la concentración de 75µM menadiona pueden ser bastante informativos en este aspecto. En el estudio bioluminiscente de las respuestas PDR observamos que las cepas que presentaban una inducción máxima mayor eran Y12 y BY4741. En los datos de crecimiento podemos observar que estas cepas, a concentraciones grandes de menadiona (75µM) mantienen una eficiencia de crecimiento bastante elevada en comparación con el resto de cepas, cosa que puede significar que han inducido la respuesta PDR de una forma más eficiente e intensa que el resto de cepas, ya que logran mantener una eficiencia de crecimiento cercana al 80%, mientras que el resto de cepas manifiestan una eficiencia que solemos encontrar por debajo del 70%.

Por tanto, podemos decir que, en conjunto, tanto los resultados referidos a la sensibilidad a menadiona como los referidos a la inducción máxima alcanzada, recopilados en los ensayos previos de bioluminiscencia sobre las diversas proteínas

de fusión Pdr1 y las respuestas PDR de las diferentes cepas naturales de levadura, se pueden correlacionar y corroborar con los resultados que hemos obtenido en los ensayos de crecimiento.

CONCLUSIONES

Este trabajo se ha querido centrar en investigar la diversidad y las propiedades de los mecanismos moleculares que utilizan las levaduras de forma natural ante amenazas de tipo químico que representa la presencia de algunos xenobióticos en el medio en el que viven, para generar resistencia y evitar sus potenciales efectos dañinos y citotóxicos. Esta propuesta de investigación puede ser especialmente interesante por su valor en la actualidad, sobre todo a nivel clínico, dado que vivimos la era en la que los microorganismos infecciosos más han avanzado en términos de generación de resistencia a los fármacos antimicrobianos.

El primer punto de nuestros objetivos era el de crear una herramienta para estudiar la activación por xenobióticos de los factores de transcripción Pdr1 de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y de la levadura patógena *Candida albicans*. Como se ha podido demostrar el sistema del reportero luciferasa que hemos creado ofrece resultados interesantes para analizar actividades proteicas de carácter transitorio e inducible, así como para analizar la cinética de estas actividades. Por otro lado, el sistema del vector binario que usamos, ligado a este reportero, basado en la construcción de proteínas de fusión que usan dominios de unión al DNA conocidos (en este caso el sistema Gal4_{DBD}-GAL1_{UAS}) sirve para estudiar el efecto o impacto que tienen los dominios XBD o TD de la proteína Pdr1 de forma más específica en la función general de la proteína. Y el usar la misma construcción o modificación genética en los Pdr1 de todas las cepas testadas es una forma de igualar molecularmente todos los Pdr1 para aislar de forma más efectiva el estudio de estos dominios de la proteína.

Por otro lado, este estudio de Pdr1 de diferentes cepas de levadura también se ha planteado en este trabajo desde la óptica de conservar la naturaleza molecular de la proteína, usando cepas naturales de levadura y transformándolas con plásmidos que llevan el reportero luciferasa bajo el control de secuencias reguladoras de unión de factores de transcripción de la respuesta PDR. Esta aproximación experimental se ha realizado para observar si hay alguna diferencia o discordancia con la anterior

propuesta de las proteínas de fusión, o si por el contrario se complementan y aportan información útil en los dos casos. Además, este estudio nos permitirá también averiguar si existen diferencias entre las distintas cepas naturales a la hora de desplegar una respuesta de tipo PDR ante una amenaza química como la de un xenobiótico.

Al realizar estos experimentos, lo que se ha observado en cuanto al comportamiento de los Pdr1 de las distintas cepas de levadura es que existe una cierta similitud en todos, tanto en sensibilidad al xenobiótico usado en el estudio, menadiona, como en cuanto al nivel de inducción de la respuesta pleiotrópica a drogas que generan, aunque sí que se pueden observar ciertas diferencias. Lo primero que se puede desgranar es que las proteínas de fusión de la cepa Sigma 1278B y de la especie *Candida glabrata* presentan una sensibilidad comparativamente mayor a menadiona respecto al resto de cepas. Por otro lado, la proteína de fusión de la cepa BY4741 es la que logra inducir con mayor intensidad la respuesta de resistencia pleiotrópica a drogas. En el análisis cuantitativo de la tolerancia a menadiona encontramos resultados que corroboran los ensayos de bioluminiscencia, confirmando por un lado la alta sensibilidad de Sigma 1278B y *Candida glabrata* a menadiona, con altas eficiencias de crecimiento a concentraciones bajas del xenobiótico (25µM, 50µM), y el alto nivel de inducción de respuesta de BY4741 con altas eficiencias de crecimiento a concentraciones altas de menadiona (75µM).

Por otro lado, en cuanto a la diversificación de la respuesta PDR en cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae*, el primer aspecto que podemos señalar es que el nivel de inducción que observamos en estas cepas es generalmente de mayor magnitud que la que ofrecen las proteínas de fusión. En concreto las cepas que disparan una inducción mayor son la cepa Y12 y la BY4741, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el experimento de las proteínas de fusión en lo que respecta a BY4741, en la cual observábamos una inducción de respuesta especialmente alta. Por lo que se refiere a la sensibilidad a la menadiona de las cepas estudiadas, las que muestran una mayor capacidad de respuesta ya a concentraciones bajas son Y12 y DBVPG6044. El análisis cuantitativo de la tolerancia a menadiona también confirma en este caso los resultados de bioluminiscencia obtenidos. Las cepas con mayor sensibilidad a menadiona (Y12 y DBVPG6044) crecen mejor a concentraciones bajas de menadiona, y las cepas con mayor potencial de inducción de respuesta (Y12 y BY4741) crecen mejor a concentraciones altas del xenobiótico.

Por tanto si recogemos las conclusiones derivadas de los objetivos del trabajo de forma más resumida, tenemos que:

- Se ha creado con éxito una herramienta genética para estudiar la respuesta a xenobióticos de diferentes variantes de Pdr1 de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura patogénica *Candida albicans*.
- Con estas herramientas se ha comparado la respuesta dosis dependiente de las diferentes versiones de Pdr1 a menadiona determinando y comparando parámetros funcionales de la proteína como la sensibilidad o el nivel de inducción de respuesta.
- También se ha estudiado, determinado y comparado la diversificación de la respuesta PDR entre diferentes cepas naturales de *Saccharomyces cerevisiae*, también en términos de sensibilidad y nivel de inducción de respuesta.

La conclusión final que podemos extraer del estudio es que el sistema de resistencia pleiotrópica a drogas de las levaduras es muy variable y diverso, no solo a nivel interespecie, sino a nivel intraespecie. Dentro de la especie de *Saccharomyces cerevisiae* hemos podido ver cómo una de las proteínas clave de este proceso, Pdr1, en diferentes cepas presentaba diferentes características, propiedades y capacidades. Esto concuerda con el hecho de que es una proteína con una gran variabilidad de secuencia en su región transactivadora según la cepa o especie estudiada. Esto aumentaría el potencial variabilidad y divergencia entre diferentes cepas y especies y explicaría las diferencias encontradas en las respuestas PDR de organismos tan cercanos evolutivamente. El significado de este fenómeno es que según el agente infeccioso que encontremos a nivel clínico, el abordaje terapéutico puede ser distinto, incluso a nivel de una misma especie, el biotipo y el fondo genético del agente infeccioso son de gran importancia para la elección de un tratamiento farmacológico u otro. En definitiva, hemos podido observar cómo Pdr1 y la respuesta PDR tiene una relevancia diferencial en el proceso de adquisición de resistencia a los ataques farmacológicos, lo cual convierte a este factor y esta ruta celular en una potencial diana terapéutica para el futuro desarrollo de nuevos fármacos que traten de combatir el desarrollo de resistencias farmacológicas en hongos.

BIBLIOGRAFÍA

- AEMS. Plan nacional de resistencia a los antibióticos 2019-2021.

- Arendrup MC. Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* 2013;60(11):B4698.

- Cannon RD & Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22:291–321.

- Cormack B. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1:406–410.

- Enoch DA, Yang H, Aliyu SH & Micallef C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol.* 2017;1508:17-65.

- Holland I, Cole SP, Kuchler K & Higgins C. (2003) ABC Proteins From Bacteria to Man, Academic Press–Elsevier Science.

- Jha S, Karnani N, Dhar SK, Mukhopadhyay K, Shukla S, Saini P, Mukhopadhyay G & Prasad R. Purification and characterization of N-terminal nucleotide binding domain of an ABC drug transporter of *Candida albicans*: uncommon cysteine 193 of Walker A is critical for ATP hydrolysis. *Biochemistry.* 2003;42:10822–32.

- Kolaczowska A, Kolaczowski M, Delahodde A & Goffeau A. Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics.* 2002;267(1):96–106.

- Lamping E, Baret PV, Holmes AR, Monk BC, Goffeau A & Cannon RD. Fungal PDR transporters: phylogeny, topology, motifs and function. *Fungal Genet. Biol.* 2010;47:127–42.

- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM & Chen ZS. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer.* 2017;36(1):52.

- Mamnun YM, Pandjaitan R, Mahé Y, Delahodde A & Kuchler K. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. *Molecular Microbiology*. 2002;46(5):1429–40.
- Mateus C & Avery SV. Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry. *Yeast*. 2000;16:1313–1323.
- Miraglia L, King F & Damoiseaux R. Seeing the light: luminescent reporter gene assays. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2011;14:648–657.
- Mohammad IS, He W & Yin L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. *Biomed Pharmacother*. 2018;100:335-348.
- Moye-Rowley WS. Transcriptional control of multidrug resistance in the yeast *Saccharomyces*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2003;73:251-79.
- Munita JM & Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 2016;4(2).
- Nelissen B, De Wachter R & Goffeau A. Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev*. 1997;21:113–134.
- Paul S & Moye-Rowley WS. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front Physiol*. 2014;5:143.
- Pohl A, Devaux PF & Herrmann A. "Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport". *Biochim. Biophys. Acta*. 2005;1733(1):29–52.
- Prasad R & Goffeau A. Yeast ATP-Binding Cassette Transporters Conferring Multidrug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol*. 2012;66:39-63.
- Rees DC, Johnson E & Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009;10(3):218–27.

-Rodríguez-Tudela JL, Alastruey-Izquierdo A, Gago S, Cuenca-Estrella M, León C, Miro JM, Nuñez Boluda A, Ruiz Camps I, Sole A & Denning DW. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(2):183-9.

-Vanacloig-Pedros E, Lozano-Pérez C, Alarcón B, Pascual-Ahuir A & Proft M. Live-cell assays reveal selectivity and sensitivity of the multidrug response in budding yeast. *J Biol Chem.* 2019;294(35):12933-12946.

ANEXO (FIGURAS SUPLEMENTARIAS)



Figura suplementaria 1. Foto del gel de los productos de PCR que corresponden a las amplificaciones de la secuencia *PDR1* de diferentes cepas de levadura. Las amplificaciones se realizaron por duplicado y tienen un peso de 3Kb.

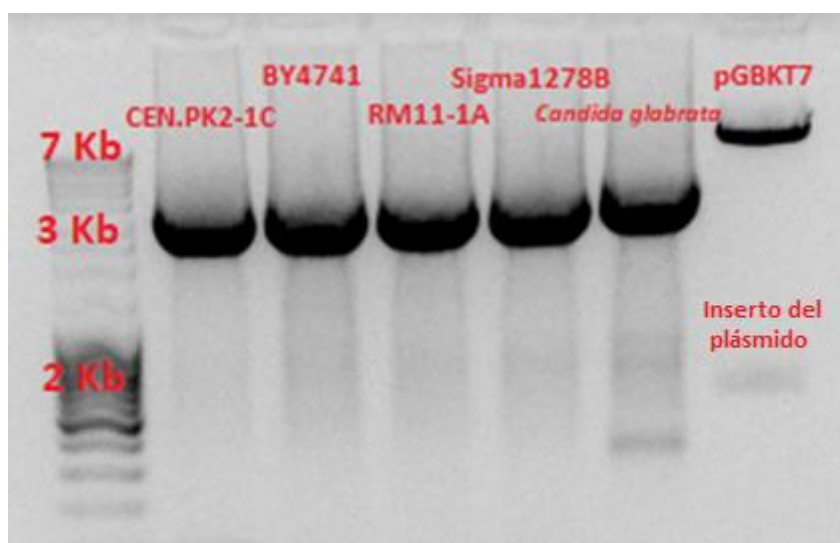


Figura suplementaria 2. Foto del gel de los productos de PCR digeridos de los *PDR1* de las diferentes cepas. Todos los productos conservan su tamaño original de 3Kb. En el último pocillo encontramos el plásmido pGBKT7 digerido. Se forman dos bandas: la del plásmido de 7Kb y también observamos una banda tenue de 2Kb que corresponde al fragmento de DNA que tenía insertado en origen antes de hacer la digestión.

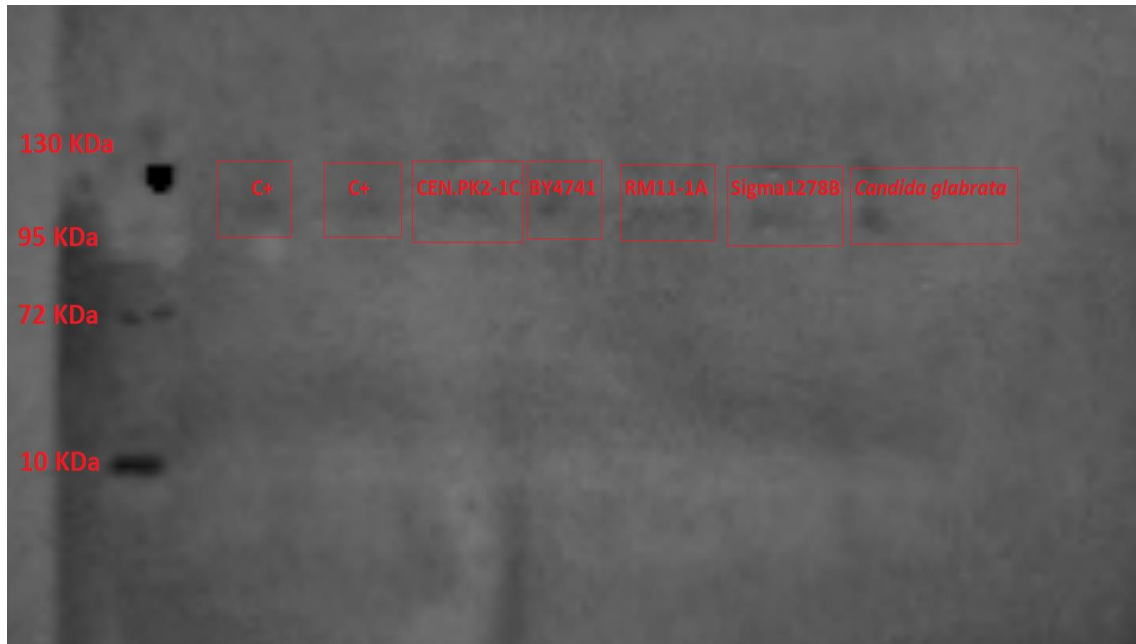


Figura suplementaria 3. Foto de la membrana del Western-Blot. Se cargaron 7 muestras: los extractos proteicos de 2 controles positivos y los extractos de nuestros transformantes de interés. Se aprecian señales muy tenues a una altura de 100 KDa que es aproximadamente el peso de las proteínas de fusión.