

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UN SISTEMA INTEGRATIVO DE LUCIFERASA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA *IN VIVO*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

SANDRA SAIZ BALBASTRE

DIRECTORES:

MARKUS PROFT

AMPARO PASCUAL-AHUIR GINER

Curso Académico: 2013/2014

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2014

Licencia Creative Commons “Reconocimiento –no comercial- sin obra derivada”

Título: Desarrollo y aplicación de un sistema integrativo de luciferasa para la cuantificación de la expresión génica *in vivo*

Autor: Sandra Saiz Balbastre

Localidad y fecha: Valencia, Junio 2014

Tutor: Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner

Cotutor: Dr. Markus Proft

Resumen:

La levadura es un organismo unicelular que está expuesto a un entorno cambiante, con lo cual puede sufrir distintos tipos de estrés. Para poder adaptarse de manera rápida y eficaz a este entorno cambiante y hacer frente al estrés, las levaduras han desarrollado mecanismos de defensa y adaptación. Estos mecanismos incluyen la síntesis de proteínas, fluctuaciones del ciclo celular, etc., siendo esencial los cambios es los patrones de expresión génica. Además, se conoce la existencia del fenómeno de memoria transcripcional. Este fenómeno consiste en que una célula que previamente ha sido expuesta a una dosis de estrés no letal, proporciona una respuesta más rápida y eficaz cuando es sometida a un estrés posterior en un periodo corto de tiempo. En este trabajo se ha utilizado el sistema luciferasa para medir los cambios en la expresión génica *in vivo* y a tiempo real.

El objetivo de este trabajo fue la construcción de un sistema integrativo de luciferasa desestabilizada. Este sistema fue aplicado al promotor osmoinducible *GRE2* de levadura y de esta manera se consiguió estudiar la dinámica transcripcional de este gen en respuesta a estrés, comparando la construcción integrativa con una construcción plasmídica desarrollada con anterioridad. Además, se estudió también el fenómeno de memoria transcripcional en el gen *GRE2* en respuesta a estrés osmótico.

Como conclusión, el sistema integrativo de luciferasa desestabilizada permitió el estudio a nivel genómico de la dinámica transcripcional en respuesta a estrés osmótico. Por otra parte, se observó que el gen *GRE2* no presenta el fenómeno de memoria transcripcional observado en los genes *GAL*, confirmando la existencia de una “memoria negativa”. Además, se pudo confirmar que la exposición previa a estrés salino proporciona una defensa frente a una exposición a estrés oxidativo posterior.

Palabras clave:

Dinámica transcripcional, expresión génica, estrés osmótico, estrés oxidativo, sistema integrativo, luciferasa, memoria transcripcional, promotor, gen *GRE2*, *Saccharomyces cerevisiae*

Títol: Desenvolupament i aplicació d'un sistema integratiu de luciferasa per a quantificar l'expressió gènica *in vivo*

Resum:

El llevat és un organisme unicel·lular que es troba exposat a un entorn canviant, per tant pot sofrir diferents tipus d'estrés. Amb el fi d'adaptar-se d'una manera ràpida i eficaç a aquest entorn canviant i fer front a l'estrés, el llevat ha desenvolupat mecanismes de defensa i d'adaptació. Aquests mecanismes inclouen la síntesi de proteïnes, fluctuacions del cicle cel·lular, etc., sent essencials els canvis als patrons d'expressió gènica. A més, es coneix l'existència del fenomen de memòria transcripcional. Aquest fenomen consisteix en que una cèl·lula, la qual prèviament ha estat exposada a una dosi d'estrés no letal, és capaç de respondre més ràpida i eficaçment quan és sotmesa a un estrés posterior en un període curt de temps. En aquest treball ha sigut utilitzat el sistema luciferasa per a mesurar els canvis a l'expressió gènica *in vivo* i en temps real.

L'objectiu d'aquest treball fou la construcció d'un sistema integratiu de luciferasa desestabilitzada. Aquest sistema fou aplicat al promotor induït per estrés osmòtic, *GRE2*, de llevat. D'aquesta manera es va aconseguir estudiar la dinàmica transcripcional d'aquest gen en resposta a estrés, comparant aquesta construcció integrativa amb una construcció plasmídica construïda amb anterioritat. A més, es va estudiar el fenomen de memòria transcripcional en el gen *GRE2* en resposta a estrés osmòtic.

Com a conclusió, el sistema integratiu de luciferasa desestabilitzada ha permès l'estudi a nivell genòmic de la dinàmica transcripcional en resposta a estrés osmòtic. D'altra banda, s'ha observat que el gen *GRE2* no presenta el fenomen de memòria transcripcional descrit als gens *GAL*, confirmant així l'existència d'una "memòria negativa". A més, s'ha pogut confirmar que l'exposició prèvia a estrés salí proporciona una defensa en front a una exposició a estrés oxidatiu posterior.

Paraules clau:

Dinàmica transcripcional, expressió gènica, estrés osmòtic, estrés oxidatiu, sistema integratiu, luciferasa, memòria transcripcional, promotor, gen *GRE2*, *Saccharomyces cerevisiae*

Title: Development and application of an integrative luciferase reporter system for the quantification of gene expression *in vivo*

Abstract:

Yeasts are single-cell organisms which are exposed to a changing environment, so they can suffer several kinds of stress. In order to adapt in a rapid and effective way to the changing environment and cope with stress, yeasts have developed different mechanisms for defense and adaptation. These mechanisms involve protein synthesis, cell cycle fluctuations, etc., being changes in gene expression patterns essential to this purpose. In addition, transcriptional memory has been previously described. This phenomenon consists of cells which have been previously exposed to a non-lethal dose of stress that are able to respond more quickly and effectively to a second round of stress in a short period of time. In this work, a luciferase system has been used in order to measure changes in gene expression *in vivo* and in real-time.

The purpose of this work was the construction of an integrative system of destabilized luciferase. This system was applied to the yeast osmoinducible promoter *GRE2* in order to study transcriptional dynamics of this gene in response to osmostress, comparing this integrative construction to a previously developed plasmid construction of the same gene. In addition, transcriptional memory of this gene in response to osmostress was also studied.

As a conclusion, we were able to study in the chromosomal context the transcriptional dynamics in response to osmostress of the *GRE2* gene using the integrative system of destabilized luciferase. On the other hand, it was observed that the *GRE2* gene doesn't show a transcriptional memory as described for the *GAL* genes, confirming the existence of a "negative memory". In addition, we were able to confirm that a previous exposure to a non lethal dose of salt stress favours the later defensive response to oxidative stress.

Key words:

Transcriptional dynamics, gene expression, osmostress, oxidative stress, integrative system, luciferase, transcriptional memory, promoter, *GRE2* gene, *Sacharomyces cerevisiae*

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, Markus y Payo, la posibilidad que me ofrecieron de realizar este trabajo de fin de grado en su grupo de investigación, ya que sin ellos no habría sido posible. Además, por todo el apoyo recibido y la confianza que han depositado en mí a pesar de los inicios frustrantes. A las chicas del laboratorio 1.09, gracias por haberme acogido y por el buen ambiente que se respira en la bancada.

También me gustaría agradecer a mi familia, no sólo el apoyo recibido durante la duración de estos cuatro años de carrera, sino toda la educación que me han dado en estos 22 años. Gracias por saber crear un gran ambiente familiar como el que tenemos, a pesar de las adversidades, por inculcarme tan buenos valores, por dejarme ser quien soy. No me puedo olvidar de mi hermana, en la que no puedo evitar verme reflejada en su recién entrada adolescencia, sin la cual mi vida no sería igual y que sigue recordándome las virtudes de la inocencia. A todos, os quiero, aunque casi nunca lo exprese con palabras.

Por último, no podían faltar unas líneas para mis *biotecs*. Siempre recordaremos las jornadas de acogida, cómo sin conocernos a penas conseguimos crear un grupo tan bueno. Gracias a vosotros estos 4 años han sido inolvidables y sea donde sea que acabemos cada uno siempre nos tendremos los unos a los otros. Espero que sigamos disfrutando del tiempo juntos, por todo el que hemos vivido ya. En definitiva, que sigamos *Keeping in touch*.

“En el jardín de un universo cuántico, donde los senderos se bifurcan constantemente, la función de onda que maneja nuestras vidas puede ser moldeada por la voluntad y el tesón humanos”.

Índice de contenidos

ÍNDICE

Abreviaturas.....	X
Introducción	1
1. Expresión génica en respuesta a estrés	2
2. Estrés osmótico	4
3. Memoria transcripcional.....	5
4. El sistema luciferasa	7
5. Estudio de la expresión génica en respuesta a estrés a nivel genómico mediante la utilización del sistema luciferasa.....	9
Objetivos.....	11
Materiales y métodos	13
1. Medios de Cultivo.....	14
2. Cepas	14
3. Construcción de plásmidos	15
4. Transformación de bacterias.....	17
5. Transformación de levaduras.....	18
6. Extracción de ADN genómico	19
7. Medida de la actividad luciferasa en tiempo real y en células vivas de levadura.....	20
Resultados y discusión	21
1. Obtención de la construcción integrativa de luciferasa en el promotor <i>GRE2</i>	22
2. Comprobación del funcionamiento del sistema luciferasa integrativo	23
3. Caracterización de la dinámica transcripcional de la construcción integrativa (Cepa 1) mediante inducción con estrés salino.....	25
4. Comprobación del funcionamiento del sistema en medio YPD.....	28
5. Estudio comparativo de la memoria transcripcional en condiciones de estrés osmótico entre la construcción integrativa y la construcción plasmídica	30
6. Conclusiones y perspectivas futuras	35
Conclusiones.....	36
Bibliografía	38
Anexo.....	i

Índice de ilustraciones

Ilustración 1. Esquema de la cascada de señalización que activa a la kinasa Hog1 en respuesta a estrés osmótico	5
Ilustración 2. Esquema de funcionamiento del sistema luciferasa a nivel molecular.....	8
Ilustración 3. Representación esquemática de la construcción de luciferasa que será integrada en el genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Ilustración 4. Esquema de la obtención de la construcción integrativa.....	9
Ilustración 5. Esquema de la integración de la construcción obtenida en el genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Ilustración 6. Esquema del plásmido pUG6.	16

Índice de figuras

Figura 1. Esquema del funcionamiento de la recombinasa CRE.....	23
Figura 2. Comprobación del funcionamiento de las construcciones integrativas con el promotor osmoinducible <i>GRE2</i>	24
Figura 3. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen <i>GRE2</i> en respuesta a un baremo amplio de concentraciones de NaCl.	26
Figura 4. Representación de la intensidad máxima expresada en porcentaje en función de la concentración de NaCl.	27
Figura 5. Representación de las curvas dosis-respuesta obtenidas con el sistema luciferasa al crecer las células en medio de cultivo YPD.....	29
Figura 6. Estudio comparativo de la memoria transcripcional del gen <i>GRE2</i> en condiciones de estrés osmótico.	31
Figura 7. Estudio comparativo de memoria transcripcional cruzada para H ₂ O ₂ y NaCl del gen <i>GRE2</i>	34

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas utilizadas durante este trabajo.....	14
---	----

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: Deoxirribonucleótido

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

HOG: Ruta de respuesta a alta osmolaridad (*High Osmolarity Glycerol*).

kan: kanamicina

kb: kilobase

LB: Luria Bertani (medio)

lucCP⁺: gen reportero de la luciferasa desestabilizada

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAPKK: proteína quinasa quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*)

MAPKKK: proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*)

MAP quinasa: proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

min: minuto

NAD/NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

OD: Densidad Óptica

pb: pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*.

SD: Medio Sintético Definido (*Synthetic Defined*)

TRIS: (Hidroximetil) Aminometano

WT: *wild type* (cepa silvestre)

YPD: Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (*Yeast extract-Peptone-Dextrose*)

Introducción

Introducción

Los organismos poseen mecanismos que les permiten adaptarse a fluctuaciones constantes del entorno en el que viven. Estos mecanismos, que incluyen la percepción del ambiente cambiante y la transducción de señales de estrés, resultan en la modulación de proteínas preexistentes y en la transcripción de grupos de genes cuyos productos contrarrestan las consecuencias del estrés impuesto (Garay-Arroyo and Covarrubias, 1999).

La exposición a estrés requiere respuestas adaptativas rápidas y eficientes para maximizar la supervivencia celular. Diferentes tipos de estrés han sido descritos como inductores o represores de una respuesta génica, principalmente las células se ven afectadas por el daño al ADN, el choque térmico, estrés osmótico y oxidativo, entre otros (Gasch et al, 2000). La levadura, concretamente *Sacharomyces cerevisiae*, al tratarse de un organismo unicelular eucariota constituye un modelo experimental muy apropiado en el análisis de estos tipos de estrés. Diversos estudios anteriores han proporcionado evidencias que sugieren la existencia de un sistema de respuesta general ante estrés que puede ser activado por diversos factores y tras la activación protege a las células contra las condiciones que ponen en peligro su supervivencia (Mager and Varela, 1993; Parsell and Lindquist, 1994).

Existe un grupo de genes que responden indistintamente a diversos tipos de estrés en levadura, como los mencionados anteriormente. Este grupo de genes se denomina de respuesta ambiental a estrés (ESR) y está formado por, aproximadamente, de 300 a 600 genes (Gash et al, 2000; Causton et al, 2001; Chen et al, 2003; Capaldi et al, 2008). El grado de expresión y la cinética de los ESR parece ser dependiente de la severidad del estrés, ya que las células que están expuestas a un estrés creciente normalmente muestran cambios más notables en la expresión génica. Cabe remarcar también que esta respuesta a estrés general ha sido relacionada con una “protección cruzada”, ya que la exposición a una dosis no letal de un estrés determinado puede proteger contra dosis potencialmente letales de otro tipo de estrés aparentemente no relacionado con el primero (Berry and Gasch, 2008). Muchos de los genes que se incluyen en el grupo de los ESR están relacionados con el metabolismo de carbohidratos, defensa contra especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolismo de proteínas, señalización intracelular y daño a ADN. Por el contrario, la mayoría de los genes reprimidos durante la respuesta a estrés están involucrados en la síntesis proteica y los procesos relacionados con el crecimiento celular (Gasch, 2007).

1. Expresión génica en respuesta a estrés

Las células eucariotas han desarrollado mecanismos sensitivos muy sofisticados y sistemas de transducción de señales que son capaces de desencadenar una respuesta fisiológica en respuesta a estrés. Aunque la relevancia biológica de los cambios en la expresión génica dependen del organismo y de la fuerza y el tipo de estrés, la regulación de la expresión génica es un factor esencial en la adaptación a estrés (de Nadal et al., 2011).

Introducción

Los cambios en el patrón de expresión génica son uno de los mayores componentes en la respuesta a estrés junto con cambios en el metabolismo, la progresión del ciclo celular, la homeostasis de proteínas o la organización del citoesqueleto, entre otras (Nadeau & Landry, 2010; Richter et al., 2010; Riezman, 2004; Chen & Thorner, 2007; Gehart et al., 2010; Hohmann, 2002; Hohmann et al., 2007; O'Rourke et al., 2002; Westfall et al., 2004). Este tipo de respuestas está constituido por una respuesta genérica, común a diferentes tipos de estrés, y respuestas específicas y adaptativas que dependen de un tipo determinado de estrés (Akerfel et al., 2010; Sakurai & Enoki, 2010; Martinez-Montanes et al., 2010; de Nadal & Posas, 2010; Weake & Workman, 2010). Ambas respuestas, tanto la general como la específica, actúan a diferentes escalas de tiempo, desde efectos post-traduccionales que proporcionan efectos inmediatos a la regulación de la expresión, lo cual es esencial para un proceso de adaptación a largo plazo seguido de una fase de recuperación post-estrés (Nadal et al., 2011).

Como se observa en la mayoría de respuestas adaptativas, el control de la expresión génica está altamente regulado y posee una cinética de respuesta rápida, siendo además reversible una vez cesado el estrés. Esto permite a la célula una capacidad de cambio transcripcional que tiene lugar en un periodo de tiempo de pocos minutos en la presencia de estrés y el regreso al estado basal una vez eliminado el estrés (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000; Sorensen et al., 2005; Yale & Bohnert, 2001).

Así pues, la mayor parte del cambio en los perfiles de expresión génica ocurre durante los primeros minutos de exposición al estrés. La velocidad de inducción y la duración de la respuesta son parámetros muy importantes con el fin de optimizar la supervivencia a estrés. Esta rapidez se consigue mediante cascadas de fosforilación, el cual es un mecanismo conservado entre especies y permite una transducción de señales mucho más rápida que aquellos sistemas que se basan únicamente en expresión génica (Nadal et al., 2011). Un ejemplo de este tipo de regulación y activación es la activación por la kinasa Hog1 en levadura como consecuencia de una exposición a estrés osmótico, la cual se explica más adelante.

En este trabajo nos centraremos en la respuesta de expresión génica frente a estrés osmótico en el organismo modelo de levadura. Cuando la célula es sometida a este tipo de estrés, más de 500 genes son transcritos en los primeros 10 minutos de exposición a estrés (Capaldi et al., 2008; Ni et al., 2009; Miller et al., 2011). Algunos de estos genes son, por ejemplo, *STL1*, *GRE1* o *GPD1*. Concretamente *GRE2* ocupará el estudio en los cambios de expresión génica frente a estrés osmótico en este trabajo. El gen *GRE2* de *S. cerevisiae* codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína similar a las 4-dihidroflavonol reductasas (DFR) de plantas, estas enzimas están involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios utilizadas como cofactores del NADP⁺ (Kristiansen and Rohde, 1991). En levadura, estas enzimas podrían estar involucradas en la síntesis de cofactores, lo cual sugiere su función en el mantenimiento del equilibrio entre NADP⁺/NADPH (Mewes et al., 1997).

2. Estrés osmótico

El aumento de la osmolaridad externa induce una situación de déficit de agua en la cual se reduce el crecimiento y la viabilidad de las células como consecuencia de la pérdida de gradiente osmótico a través de la membrana. Esta situación de déficit puede ser alcanzada durante diferentes condiciones ambientales adversas como congelación, estrés salino o disecación. Algunos estados de desarrollo, como la formación de esporas, implican también deshidratación.

Una de las primeras respuestas, mantenida a través de la evolución, que fue caracterizada en organismos viviendo bajo condiciones hiperosmóticas es la síntesis de osmolitos o solutos compatibles, con el fin de aumentar la concentración intracelular total de solutos, proporcionando una estabilización osmótica (Yancey et al, 1982; Nadal and Posas, 2010). En *S. cerevisiae*, el glicerol es el osmolito que se sintetiza de manera mayoritaria bajo condiciones hiperosmóticas y es el responsable de la mayor parte de la regulación osmótica en este organismo (Albertyn et al., 1994; Blomberg and Adler, 1989).

Todavía se desconoce el papel concreto de la expresión génica en la adaptación a estrés osmótico. Sin embargo se conoce que la adaptación a largo plazo a una osmolaridad elevada requiere transcripción génica y existe un conocido número de mutantes de maquinaria transcripcional con el objetivo de crear una célula osmosensible (Nadal et al, 2004; Zapater et al, 2007; Mas et al, 2009).

La respuesta a estrés osmótico en levadura es una de las mejor conocidas a nivel molecular (de Nadal et al, 2002; Hohmann, 2002) y son muchos los estudios realizados para caracterizar los cambios en el perfil transcripcional en respuesta a este estrés (Gasch et al, 2000; Ni et al, 2009; Posas et al, 2000). Estos cambios están coordinados por un gran número de factores de transcripción específicos, muchos de los cuales están regulados por la ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*). La MAP quinasa terminal de esta ruta de transducción de señal, Hog1, interacciona y fosforila a los factores de transcripción específicos Sko1, Hot1 y Smp1 (Alepez et al, 2003; de Nadal et al, 2003; Proft et al, 2001; Proft & Serrano, 1999; Rep et al, 1999), regulando también otros activadores como Msn1, Msn2, Msn4 y Yap4 (Martinez-Pastor et al, 1996; Nevitt et al, 2004; Rep et al, 1999; Schuller et al, 1994).

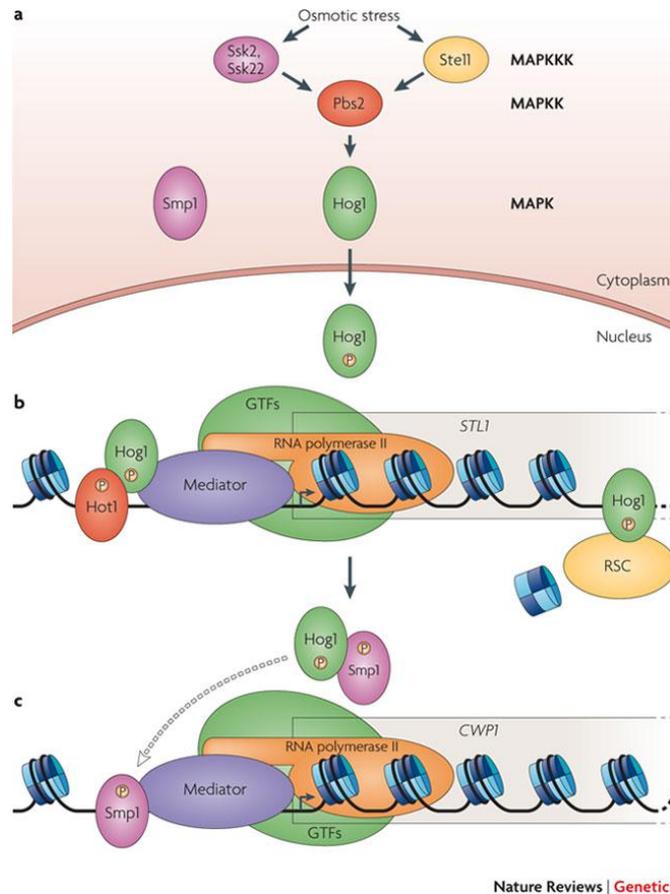


Ilustración 1. Esquema de la cascada de señalización que activa a la kinasa Hog1 en respuesta a estrés osmótico. **a.** El estrés osmótico en levadura induce una cascada de kinasas (MAPK) en la cual las MAPKKK Ssk2, Ssk22 y Ste11 convergen, fosforilan y activan a la MAPKK Pbs2. Pbs2 fosforilada activa a Hog1, que es una MAPK, la cual se transloca al núcleo para activar la expresión génica en respuesta a estrés; **b.** Hog1 es reclutada en los promotores de los genes inducibles por estrés por interacciones con el sustrato, Hot1, que es un activador transcripcional inducido por elevada osmolaridad. Hog1 funciona como un activador transcripcional interaccionando directamente con Mediator y los componentes generales de la maquinaria transcripcional; **c.** Hog1 fosforila activadores transcripcionales como Smp1, entonces éste recluta coactivadores adicionales y la maquinaria general de transcripción en los genes, para iniciar a la ARN polimerasa II dependiente de fosforilación (Vikki M. Weake & Jerry L. Workman, 2010).

Esta cascada de señalización termina con el apropiado reclutamiento de factores de transcripción, incluyendo a la ARN polimerasa II, en el promotor en cuestión, lo cual afecta a la iniciación, elongación y estabilización del ARNm (Martinez-Montanes et al., 2010; de Nadal & Posas, 2010).

3. Memoria transcripcional

En el proceso de adaptación de las células al entorno cambiante en el que viven, en el que están expuestas a diferentes tipos de estrés como los descritos anteriormente, cabe destacar el fenómeno de memoria transcripcional. Este fenómeno ha sido descrito en microorganismos tales como bacteria o levadura e incluso en organismos pluricelulares

Introducción

como insectos, plantas, mamíferos e incluso humanos (Lu et al. 1993; Davies et al. 1995; Lewis et al. 1995; Lou and Yousef 1997; Swan and Watson 1999; Chi and Arneborg 2000; Schenk et al. 2000; Durrant and Dong 2004; Kandror et al. 2004; Scholz et al. 2005; Hecker et al. 2007; Kensler et al. 2007; Matsumoto et al. 2007). La memoria transcripcional consiste en que una vez las células han sido sometidas a un determinado tipo de estrés y se produce una respuesta a nivel de expresión génica, la segunda vez que estas células son expuestas al mismo tipo de estrés o incluso otro distinto, esta respuesta es más rápida y eficaz. Se produce pues un cambio en la dinámica transcripcional.

Este fenómeno supone una ventaja, sobre todo en organismos unicelulares, ya que son más vulnerables al entorno cambiante y a los distintos estímulos que se presentan, en la supervivencia celular.

Los mecanismos moleculares asociados a la memoria transcripcional frente a estrés no están completamente definidos, sin embargo se ha observado una alteración en la expresión génica que sugiere que este fenómeno es más complejo que la activación repetitiva del mismo mecanismo de respuesta. Un ejemplo de memoria celular es la que presentan las células del organismo *Arabidopsis thaliana* en respuesta a deshidratación. Las plantas que han experimentado insuficiencia de agua muestran una capacidad mejorada para tolerar deshidratación posterior a través de cambios hacia la disminución del potencial osmótico. Un proceso inusual ocurre en este organismo protagonizado por un determinado conjunto de genes involucrados en la respuesta a estrés por deshidratación. Tras la primera exposición a estrés la respuesta de expresión génica es elevada, sin embargo, tras una segunda exposición a este estrés, la magnitud y duración de esta respuesta es menor (Liu et al, 2014).

Sorprendentemente, la memoria transcripcional parece ser independiente del tipo de estrés ambiental al que se ha sometido la célula, lo cual significa que la exposición a un estímulo cualquiera puede ser suficiente para que el organismo en cuestión adquiera una resistencia a otro tipo de estímulo posterior. Por ejemplo, la adquisición de tolerancia a H₂O₂ se observa tras diferentes pretratamientos con estrés, como el salino, pero desencadena la expresión de distintos conjuntos de genes cada vez (Kelley and Ideker, 2009; Berry et al 2011). Este resultado puede ser explicado por la función redundante de ciertos conjuntos de genes, pero también surge de la naturaleza específica de la condición de defensa a estrés para cada par de tratamientos (estrés leve previo y estrés severo posterior) (Guan et al, 2012).

Uno de los casos en los que la memoria transcripcional tiene un papel importante y ha sido ampliamente estudiado en el organismo modelo de levadura es el de los genes *GAL*, los cuales responden a disponibilidad de nutrientes, como la glucosa y la galactosa (Kundu et al, 2010; Brickner 2009). En este trabajo nos centraremos en la memoria transcripcional que se produce al someter a las células a estrés salino y la tolerancia que pueden adquirir a estrés oxidativo con H₂O₂. Las células que son expuestas a un estrés transitorio como una

dosis viable de sal desarrollan una memoria a ese tratamiento que se extiende a al menos dos niveles fisiológicos: una resistencia aumentada a H₂O₂ y una respuesta a nivel de expresión génica alterada a un estrés posterior (Guan et al, 2012).

4. El sistema luciferasa

Los avances tecnológicos en biología molecular, la espectrofotometría en placas de micropocillos y la automatización de los procesos han permitido el desarrollo de ensayos biológicamente relevantes con rendimientos robustos que pueden ser utilizados en análisis genómicos masivos y de alto rendimiento (Thorne et al, 2010).

Con el fin de estudiar la respuesta transcripcional transitoria de determinados genes a estrés, se utilizó en este trabajo el sistema luciferasa. Tradicionalmente, el nivel de transcripción se mide por métodos directos o indirectos de la cantidad estable de ARNm de un gen de interés, o por la detección de la actividad enzimática cuya expresión está controlada por el promotor de interés. Estos métodos suelen realizarse *in vitro*, siendo uno de los más comunes la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real). Sin embargo, estos métodos requieren la disrupción celular y suelen requerir elevados tiempos de preparación para estudiar la cinética de expresión génica diferencial o bajo una variedad de estímulos diferentes (Rienzo et al, 2012).

La ventaja del sistema luciferasa es la posibilidad de realizar el ensayo *in vivo* y a tiempo real. Otro método similar es la utilización de proteína GFP (*Green fluorescence protein*), que también permite la cuantificación de la actividad transcripcional instantánea sin la necesidad de la disrupción de la integridad celular (Cormack, 1998). Sin embargo, los sistemas que emplean la bioluminiscencia en lugar de la fluorescencia, como es el caso del sistema luciferasa, presentan una ventaja y es que no necesitan una excitación previa para la emisión de luz. Esto disminuye la señal de fondo, que puede interferir en la cuantificación de la transcripción, aumentando la sensibilidad del ensayo (Simeonov et al, 2008).

Por otra parte, muchas respuestas transcripcionales son transitorias, por lo que el análisis enzimático requiere el uso de versiones desestabilizadas de estas proteínas. En el caso de GFP, estas versiones presentan una vida media más duradera que la de la luciferasa (Mateus and Avery, 2000).

La bioluminiscencia es un sistema de detección ampliamente utilizado en investigación e industria, consistiendo en un 21% de los ensayos realizados. Los ensayos que utilizan luminiscencia como sistema de detección se basan en enzimas luciferasa, las cuales catalizan la oxidación de sustratos específicos conocidos como luciferinas para formar oxiluciferina, mediante la utilización de ATP y con la consecuente emisión de un fotón (Thorne et al, 2010). La luz emitida por la oxidación de este sustrato de luciferina es una medida inmediata y muy sensible de su actividad enzimática sin la necesidad de excitación externa (Rienzo et al, 2012).

Introducción

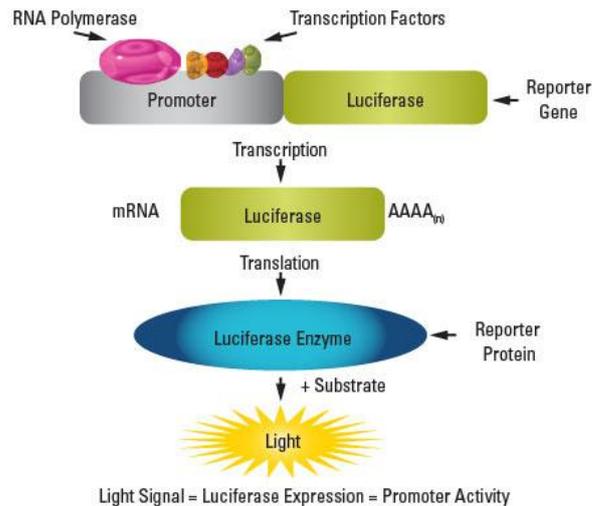


Ilustración 2. Esquema de funcionamiento del sistema luciferasa a nivel molecular. Cuando la célula es sometida a estrés se recluta ARN polimerasa II y factores de transcripción que activan el promotor inducible. Por tanto, el gen de luciferasa se transcribe dando lugar a ARN mensajero que se traduce en enzima luciferasa. Este enzima es necesaria para catalizar la reacción que convierte el sustrato (luciferina) en oxiluciferina con la consecuente emisión de un fotón (ThermoScientific, Luciferase Reporters).

Esta reacción catalizada por el enzima luciferasa, concretamente de luciérnaga, es un sistema muy versátil que ha sido adaptado al análisis de expresión génica en estudios de mamíferos, insectos, plantas y hongos filamentosos (Miraglia et al, 2011).

Para el análisis de la respuesta transcripcional resulta interesante el análisis de los promotores de los genes de interés, ya que se conoce que la interacción dinámica de muchos factores de transcripción específicos con los respectivos promotores es la responsable de los complejos programas transcripcionales que lleva a cabo la célula en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental (Gasch, 2007; Harbison et al, 2004). Por este motivo, en este trabajo se utilizará un sistema de luciferasa desestabilizada consistiendo en la integración del gen LucCP+ en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* fusionado al promotor de interés, que en este caso es *GRE2*.

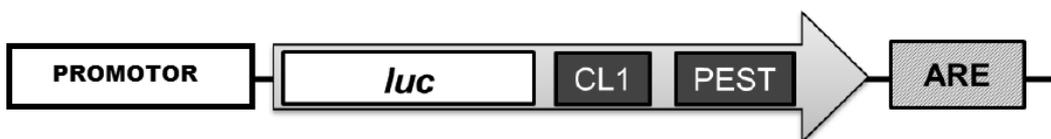


Ilustración 3. Representación esquemática de la construcción de luciferasa que será integrada en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. El primer elemento es el promotor de levadura que interesa estudiar, al que se fusiona la construcción. El promotor va seguido de la región codificante del gen de la luciferasa desestabilizada, incluyendo las secuencias de degradación CL1 y PEST procedentes de levadura y ratón respectivamente. Finalmente se incluye la secuencia ARE de desestabilización del ARNm que tiene como finalidad evitar la acumulación del transcrito.

La desestabilización se debe a la secuencia PEST y CL1 de degradación de la proteína y la secuencia ARE de degradación del ARNm, que hacen que la luciferasa tenga una vida media de 20-30 minutos (Deng L et al, 2006). El diseño del sistema garantiza que solo

Introducción

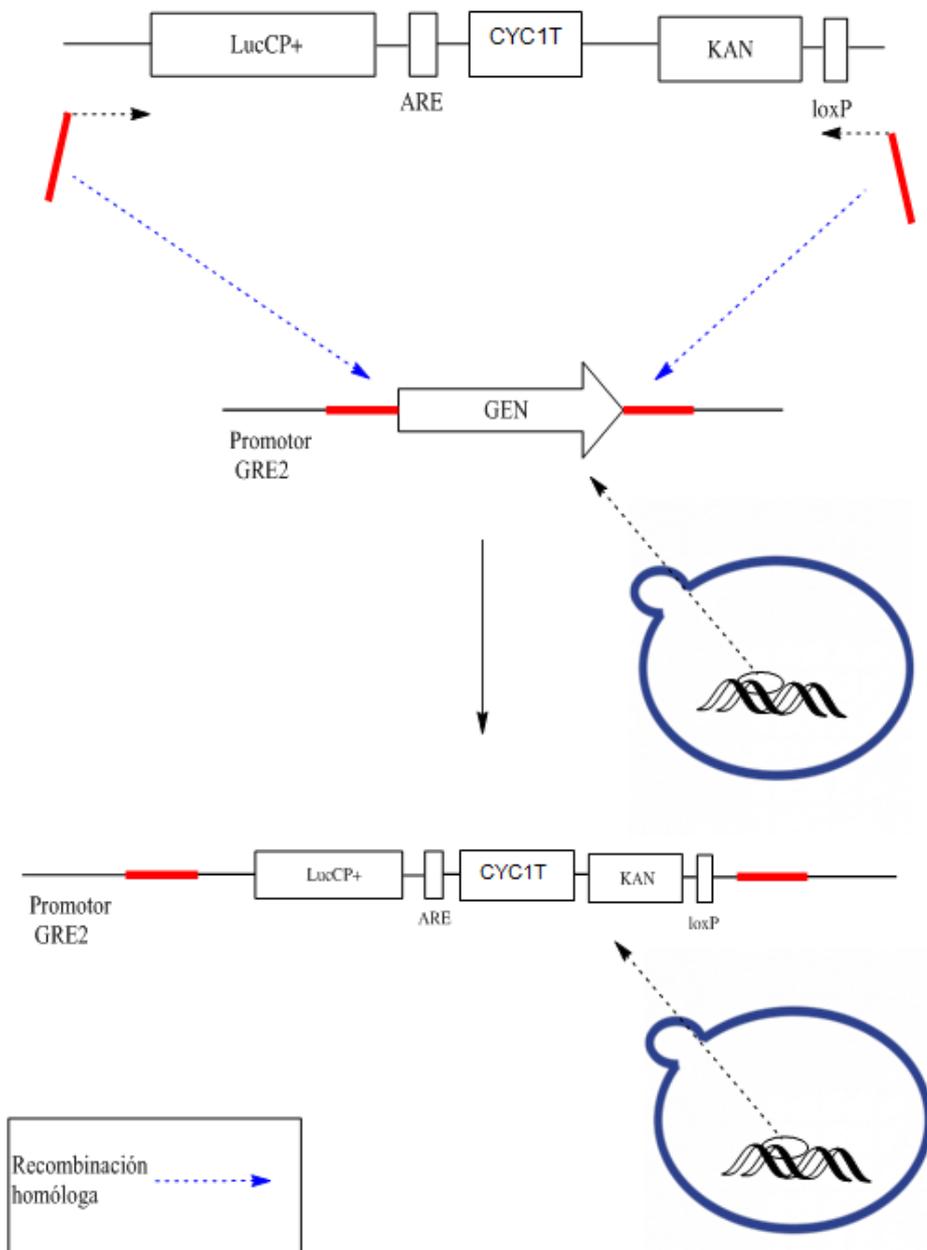


Ilustración 5. Esquema de la integración de la construcción obtenida en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Mediante una reacción de la polimerasa en cadena se incluyen regiones complementarias al genoma de levadura en la construcción del gen de luciferasa para permitir que las células realicen la recombinación homóloga y se obtenga finalmente la construcción del gen de luciferasa desestabilizada fusionada al promotor de interés, en este caso *GRE2*, integrada en el genoma.

Objetivos

Objetivos

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Desarrollo y construcción de plásmidos que permitan la inserción en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* el gen de luciferasa desestabilizada, LucCP+, fusionado a un promotor de interés.
- Comprobación de la funcionalidad del sistema desarrollado con el promotor *GRE2* de respuesta a estrés osmótico y oxidativo.
- Comparación de la dinámica transcripcional del reportero GRE2-lucCP+ integrado en el genoma de levadura con la construcción plasmídica del mismo promotor, estudiando la respuesta a estrés osmótico y el fenómeno de memoria transcripcional.

Materiales y métodos

1. Medios de Cultivo

El medio de cultivo que se utilizó para el crecimiento de bacteria fue el LB:

- El medio LB se preparó disolviendo en agua miliQ un 1% de triptona, un 0.5% de extracto de levadura y un 1% de NaCl. Para preparar medio LB sólido se añadió un 2% de agar. Esta disolución se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. En todo caso, el medio LB sólido, se preparó con ampicilina al 1% después de esterilizar.

En el crecimiento de levadura se utilizaron dos tipos de medio de cultivo, YPD y SD:

- El medio YPD (Yeastextract-Peptone-Dextrose) se preparó disolviendo en agua milliQ un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa. Para preparar medio YPD sólido también se añadió un 2% de agar. Esta disolución se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- El medio SD (SyntheticDextrose) se preparó disolviendo en agua milliQ un 0,67% de Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos y con sulfato de amonio y como fuente de carbono se añadió un 2% de glucosa. Para preparar medio SD sólido también se añadió un 2% de agar. Esta disolución se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Además, según los requerimientos de la cepa, es decir, la auxotrofia que el plásmido insertado suplementaria, el medio se suplementó con uracilo, leucina, metionina e histidina desde disoluciones al 100x (2,5g/L, 10g/L, 10g/L y 10g/L, respectivamente). Después, el pH del medio se ajustó con ácido succínico 50mM a pH 5,5 (pH ajustado con Tris).

2. Cepas

En la siguiente tabla se muestran las cepas utilizadas a lo largo de este trabajo, tanto de *Escherichia coli* como de *Sacharomyces cerevisiae*.

Tabla 1. Cepas utilizadas durante este trabajo

Cepa	Descripción
BY4741	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> , cepa silvestre (Genotipo: MAT α ; his3 Δ O; leu2 Δ O; met15 Δ O; ura3 Δ O)
DH5alpha	<i>Escherichia coli</i>
<i>E.c. DH5alpha with pUG6-lucCP+-CYC1t-KAN</i>	Inserción del gen <i>lucCP+</i> + terminador <i>CYC1</i> en el vector <i>pUG6</i> (<i>Bgl</i> II), confirmado por secuenciación Construcción 1 (clon 1-8)
<i>E.c. DH5alpha with pUG6-lucCP+-loxPKANloxP (+ARE)</i>	Inserción del gen <i>lucCP+</i> + secuencia <i>ARE</i> en el vector <i>pUG6</i> (<i>Sall</i>) Construcción 2 (clon 2-5)

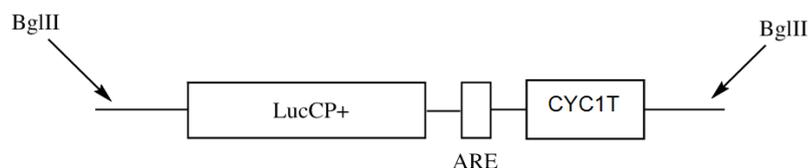
<i>E.c. DH5alpha with pUG6-lucCP+-loxPKANloxP (+ARE)</i>	<i>Inserción del gen lucCP+ + secuencia ARE en el vector pUG6 (Sall) Construcción 2 (clon 2-9)</i>
<i>E.c. DH5alpha with pUG6-lucCP+-loxPKANloxP (-ARE)</i>	<i>Inserción del gen lucCP+ - secuencia ARE en el vector pUG6 (Sall) Construcción 3 (clon 3-9)</i>
<i>S.c. BY4741 with pGRE2-lucCP+-CYC1T::KanMX</i>	<i>GRE2-lucCP+ integrativo, construcción 1 (clon 1)</i>
<i>S.c. BY4741 with pGRE2-lucCP+ CYC1T::KanMX</i>	<i>GRE2-lucCP+ integrativo, construcción 1 (clon 2)</i>
<i>S.c. BY4741 with pGRE2-lucCP+::loxPKanMXloxP</i>	<i>GRE2-lucCP+ integrativo, construcción 2</i>

3. Construcción de plásmidos

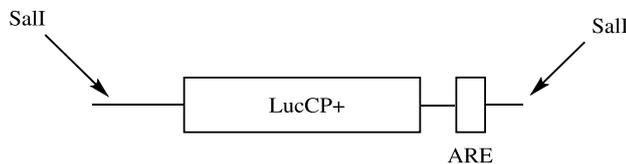
Los plásmidos utilizados con el fin de obtener las construcciones deseadas fueron pUG6 y pAG413-GAL1-lucCP+. El plásmido pUG6 fue elegido como vector de clonación ya que contiene un gen de resistencia a ampicilina, el cual fue utilizado para la selección de bacterias transformadas, así como un gen de resistencia a geneticina G418 que fue utilizado para la selección de levaduras transformadas. Además, el plásmido pUG6 contiene un *multicloning site* con multitud de sitios de restricción, interesándonos en este trabajo Sall y BglII.

Se realizaron tres tipos de construcciones:

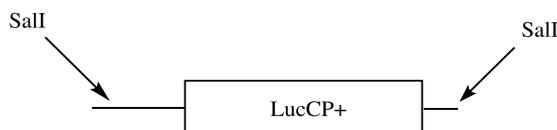
- 1) Fusión del vector pUG6 con el gen lucCP+ con el terminador artificial CYC1 (Construcción 1).



- 2) Fusión del vector pUG6 con el gen lucCP+ incluyendo la secuencia de degradación de ARN mensajero ARE (Construcción 2).



- 3) Fusión del vector pUG6 con el gen lucCP+ sin la secuencia de degradación de ARN mensajero ARE (Construcción 3).



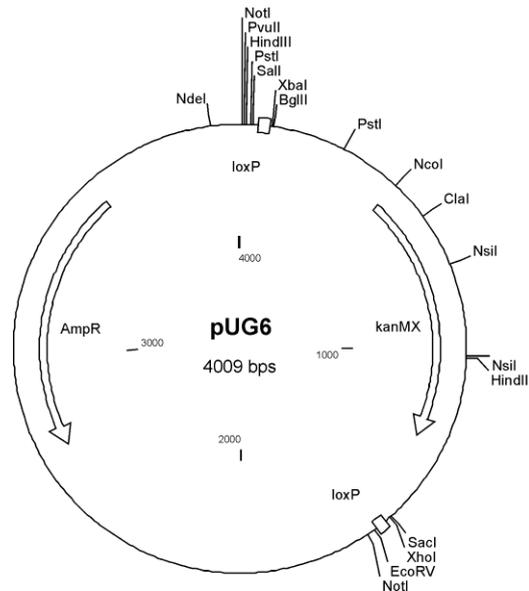


Ilustración 6. Esquema del plásmido pUG6. El plásmido pUG6 fue utilizado como vector en la clonación de los distintos fragmentos. En la obtención de la construcción 1 se utilizó el sitio de restricción de BglII, mientras que en la obtención de las construcciones 2 y 3 se utilizó el sitio de restricción de Sall. El plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina para la selección de bacterias transformantes y también posee un gen de resistencia a geneticina G418 que servirá para seleccionar las levaduras transformantes que hayan incorporado la construcción en el genoma.

Con el fin de clonar el fragmento de ADN deseado para cada construcción se realizaron diversas reacciones de la polimerasa en cadena (PCR), concretamente 3. En total se utilizaron cinco oligonucleótidos en parejas de la siguiente manera:

- Construcción 1: LucCPnewBglII + LucCPBglII
- Construcción 2: LucCPnewSall + LucCPSall+ARE
- Construcción 3: LucCPnewSall + LucCPSall-ARE

Los cebadores utilizados en la construcción 1 incluyen un sitio de corte del enzima BglII *upstream* del gen LucCP+ y también *downstream* del terminador CYC1. Los cebadores utilizados en las construcciones 2 y 3 incluyen un sitio de corte del enzima de restricción Sall *upstream* del gen LucCP+ y, en el caso de la construcción 2, otro sitio idéntico *downstream* del gen incluyendo la secuencia ARE, mientras que en el caso de la construcción 3 el cebador LucCPSall-ARE no amplifica la secuencia ARE (Anexo I).

Se realizaron 3 reacciones de 100 µl cada una, se añadió 1 µl de cada uno de los cebadores a 100pmol/µl, 10µl de dNTPs a 2mM, 10 µ de tampón (*buffer*) de PCR comercial (Truemark), 10 µl de MgCl₂, 1 µl de Taq polimerasa a 1U/µl (Truemark) y 66 µl de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, alineamiento durante 30 segundos a 53°C y extensión de la ADN polimerasa durante 2 minutos y 30 segundos a 72°C) y un paso final de elongación de 10 minutos a 72°C durante 10 minutos.

Materiales y métodos

Para comprobar la correcta amplificación de los distintos fragmentos se corrió un gel de agarosa 1% observándose el tamaño correcto de cada fragmento, correspondiendo a alrededor 2,4 Kb al fragmento 1, y alrededor de 2 Kb a los fragmentos 2 y 3 (siendo el fragmento 3 alrededor de 10 pb menor al 2).

Una vez comprobados los fragmentos de PCR se purificó el producto mediante el kit *QIAquick PCR Purification kit* (QIAGEN).

El siguiente paso fue la digestión tanto de los fragmentos de PCR como del vector de clonación. El fragmento 1 y el vector fueron digeridos utilizando BglIII, mientras que los fragmentos 2 y 3 y el vector pUG6 fueron digeridos utilizando Sall. Las digestiones se realizaron por duplicado, utilizando una reacción de cada para la comprobación del correcto funcionamiento de la digestión. Para evitar la religación de los extremos digeridos, ya que solo se utilizó un enzima de restricción, los vectores utilizados en la clonación fueron tratados con fosfatasa alcalina (no lo fueron aquéllos utilizados en comprobación). Las reacciones fueron incubadas durante 8 horas a 37°C. Posteriormente fueron comprobados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% los fragmentos, asegurando que poseían el tamaño correcto.

Los fragmentos digeridos, así como los vectores, fueron purificados utilizando el kit *QIAquick* (QIAGEN). Posteriormente se midió la concentración tanto de los vectores como de los insertos utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo), siendo los resultados los siguientes:

- Inserto 1: 8,6 ng/μl
- Inserto 2: 13,0 ng/μl
- Inserto 3: 9,1 ng/μl
- Vector pUG6 BglIII: 15,6 ng/μl
- Vector pUG6 Sall 2: 17,9 ng/μl
- Vector pUG6 Sall 3: 19,9 ng/μl

El último paso en la obtención de las construcciones plasmídicas fue la ligación de los fragmentos de PCR al vector pUG6. Para ello se utilizó el kit de ligación rápida *Quick LigationTM Kit* (BioLabs Inc.). Se combinaron 3 μl de vector con 7 μl de inserto, añadiendo 10 μl de tampón (comercial BioLabs) y 1 μl de enzima T4 ADN ligasa. La reacción se incubó a 25°C durante 5 minutos.

4. Transformación de bacterias

Los plásmidos obtenidos fueron utilizados para transformar células de bacteria *E. coli* DH5α competentes. Este paso se realizó con el fin de amplificar los plásmidos de interés. Las células utilizadas en la transformación habían sido hechas competentes previamente y almacenadas a -80°C. Se añadieron 10 μl de plásmido purificado a 100 μl de células de *E. coli* competentes, posteriormente fueron introducidas en hielo en el cual se mantuvieron

durante 30 minutos. La transformación se realizó mediante shock térmico a 42 °C durante 45 segundos e inmediatamente después fueron introducidas en hielo durante 2 minutos. A continuación se añadió 1 ml de LB a cada tubo y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugó, eliminó gran parte del sobrenadante y con el restante se resuspendieron las células y se sembraron en placa LB con ampicilina. Las placas se dejaron incubar *overnight* a 37 °C.

De cada placa se seleccionaron 8 colonias aisladas que fueron inoculadas en precultivos líquidos de los cuales se realizaron minipreps utilizando el kit NucleoSpin® Plasmid (MACHERY NAGEL). Una vez aislados los plásmidos se midió su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop y una alícuota de los mismos fue digerida para su comprobación mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Los plásmidos correspondientes a la construcción 1 fueron digeridos utilizando el enzima de restricción BglII, mientras que aquéllos correspondientes a las construcciones 2 y 3 fueron digeridos utilizando el enzima Sall. En el gel, los plásmidos que correspondían al vector con el inserto incorporado se distinguían por la presencia de 2 bandas (una banda de ~4 Kb correspondiente al vector pUG6 y otra banda de alrededor de 2 Kb correspondiente al inserto). Los clones positivos en el gel fueron comprobados por secuenciación para asegurar que el inserto se encontrara en la orientación correcta dentro del vector.

5. Transformación de levaduras

Con el fin de conseguir una integración de la construcción de interés en el genoma de la levadura se linearizaron los plásmidos para facilitar la recombinación homóloga que ocurre de manera espontánea en la célula al reconocer secuencias homólogas. La técnica utilizada para este fin fue una PCR, utilizando oligonucleótidos que incorporaban las secuencias correspondientes al promotor a estudiar: GRE2 (GRE2-luc-KAN1 y GRE2-luc-KAN2). Se realizaron 3 tipos de reacciones, una por cada construcción. En cada reacción se utilizó 1 µl de plásmido, previamente diluido a 10 ng/µl; 5 µl de dNTPs a 2 nM, 1 µl de cada uno de los cebadores a 100pmol/µl, 10 µl de tampón comercial (HI-FI 5x), 0.5 µl de Taq polimerasa HI-FI y por último 31.5 µl de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, alineamiento durante 30 segundos a 53°C y extensión de la ADN polimerasa durante 5 minutos a 68 °C) y un paso final de elongación de 7 minutos a 68°C durante. Se realizaron 4 reacciones de 50 µl cada una por cada construcción (1, 2 y 3), con un total de 12 reacciones.

Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquick purification kit (QIAGEN). Una alícuota de cada reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% para comprobar el tamaño de cada fragmento. Se midió la concentración de cada fragmento en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo) y se obtuvieron las siguientes concentraciones:

- Construcción 1: 726,9 ng/µl
- Construcción 2: 665,8 ng/µl

- Construcción 3: 674,9 ng/μl

El método de transformación de levaduras utilizado es el método del acetato de litio (Gietz et al., 1995), descrito a continuación.

Se creció un cultivo líquido de levadura BY4741 en 50 ml de YPD hasta una densidad óptica de 0,7-1,2 a 600 nm, en el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Plus y se centrifugaron las células en un tubo Falcon de 50 ml (3 min, 3000rpm). Se lavaron con agua estéril y con LiTE 1x estéril (0.1M acetato de litio en 1xTE (10mM Tris/HCl pH 7.6; 1mM EDTA)), y el *pellet* se resuspendió en 500 μl de LiTE 1x. Se incubó las células durante 15 minutos a 30° C para hacerlas competentes y, a continuación, se añadieron 500 ng de ADN (producto de PCR) a 60 μl de células competentes, y se añadió 300 μl de LiTE/40% PEG4000 (9 volúmenes de PEG4000 45% y 1 volumen de LiTE 10x), y se mezcló bien con el vórtex. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 30° C, y después durante 20 minutos a 42° C, para permitir la entrada del ADN en la célula. A continuación se añadió 1 ml de YPD a cada tubo y se incubó durante 3 horas a 28 °C para permitir la inserción en el genoma de levadura de los fragmentos mediante recombinación homóloga. Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto, se lavó con agua estéril y se resuspendió el pellet en el líquido remanente. Las células se sembraron en placas con medio YPD con ampicilina. Las colonias de levadura transformadas aparecieron 2-3 días después de la incubación de las placas a 28° C.

6. Extracción de ADN genómico

Para comprobar la correcta inserción de los diferentes insertos en el genoma de *Sacharomyces cerevisiae* se realizó una extracción de ADN genómico de diversas colonias de cada construcción. Para la extracción de ADN genómico se empleó un protocolo de aislamiento rápido del ADN genómico. En primer lugar se creció un cultivo de levadura en 3 ml de medio YPD líquido hasta saturación en agitación a 28°C durante al menos 12 horas. Las células se precipitaron por centrifugación (10000 rpm, 1 min) en un microtubo eppendorf de 1,5 ml, y el *pellet* se lavó con agua MiliQ, se resuspendió en 200 μl de tampón PP (100mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM EDTA, 10μl/ml β-mercaptoetanol, 0,2mg/ml zymolyasa) y se incubó a 37°C durante 1h para obtener los protoplastos de las células. A continuación se añadió 200 μl de tampón de lisis (0,2M NaOH, 1% SDS), mezclando por inversión, y se incubó a 65°C durante 20 minutos. Tras la lisis celular, se añadió 200 μl de acetato potásico 5M pH 5,5 y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad (13000 rpm) y se pasó el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf a los que se añadió 600 μl de isopropanol para precipitar el ADN cromosómico, y se centrifugó de nuevo (1 min, 13000rpm). Por último, se lavó el *pellet* con etanol (70%), se secó bien y se resuspendió en 50 μl de tampón 1xTE.

A partir del ADN genómico extraído se realizó una amplificación mediante PCR con una posterior comprobación en gel de agarosa. Se utilizó un cebador complementario a una región del gen de resistencia a Kanamicina (reverso), en el caso de *GRE2* se utilizó como

cebador directo una región complementaria del mismo promotor. Se realizaron reacciones de 50 μ l cada una, se añadió 1 μ l de cada uno de los cebadores a 100pmol/ μ l, 5 μ l de dNTPs a 2mM, 5 μ l de tampón (*buffer*) de PCR comercial (Trustart), 5 μ l de MgCl₂, 1 μ l de Taq polimerasa a 1U/ μ L (Trustart) y 31 μ l de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización de 3 minutos a 95°C; 40 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 1 minuto a 95°C, alineamiento durante 1 minuto a 50°C y extensión de la ADN polimerasa durante 2 minutos a 72°C) y un paso final de elongación durante 10 minutos a 72°C.

7. Medida de la actividad luciferasa en tiempo real y en células vivas de levadura

En primer lugar las cepas de levadura a estudiar en cada experimento, correspondientes a las construcciones 1, 2 y 3 con el gen lucCP+ fusionado al promotor *GRE2*, fueron crecidas hasta una OD ~ 2. El procedimiento habitual consistió en incubar 3 ml de los cultivos añadiendo 50 μ l de luciferina (10mM) por cada 1 ml de cultivo durante 90 min a 28°C en agitación, y se cargaron, en una placa de 96 pocillos, 120 μ l o 150 μ l de cultivo por pocillo.

A continuación, se puso la placa en el luminómetro *GLOMAX 96 microplate* (Promega) y se cargaron los pocillos con un rango de concentraciones, entre 0 (sin estrés) y 1M de NaCl en el caso del análisis de expresión de *GRE2* con respuesta a estrés salino.. La emisión de luz se registró de forma continua (cada 2 minutos aproximadamente). Cada concentración de estrés y cepa cargada en la placa se hizo por triplicado. En el caso de *GRE2* se utilizó como control una cepa de levadura que contenía el mismo promotor *GRE2* fusionado al gen LucCP+ en un plásmido, procedente de la colección del laboratorio.

Para el análisis de los resultados se empleó el programa Microsoft Excel. Se realizaron promedios de los triplicados, se representaron los valores de intensidad de luz en función del tiempo así como los valores máximos de intensidad de luz en función de la concentración de estrés, calculando y representando la desviación típica de cada punto máximo. Así se pudo analizar las variaciones en la respuesta a estrés, principalmente salino, de la cepa con la mutación pertinente integrada en el genoma con la cepa mutante que contenía la mutación en un plásmido.

Resultados y discusión

1. Obtención de la construcción integrativa de luciferasa en el promotor *GRE2*

Tradicionalmente se ha utilizado el sistema luciferasa con el fin de estudiar los cambios en la expresión génica en construcciones plasmídicas. Este sistema es muy versátil y permite el estudio de un gran número de promotores ya que presenta una gran facilidad de obtención. Sin embargo, resulta interesante estudiar estos cambios en respuesta a estrés a nivel cromosómico, *in vivo* y a tiempo real, ya que el entorno en el que se encuentra el gen es esencial en la regulación de su expresión, así como la estructura de estos promotores en el cromosoma de levadura. Para ello se consiguió una construcción integrativa del gen de luciferasa desestabilizada que se fusionó al promotor *GRE2*, un promotor inducible por estrés como ya se ha mencionado anteriormente.

El procedimiento llevado a cabo en la obtención de las construcciones fue la amplificación del gen LucCP+, el cual fue clonado en el vector pUG6 mediante enzimas de restricción. La construcción obtenida fue transformada en la bacteria *E. coli* y amplificada, seleccionando las colonias transformadas y comprobando los plásmidos obtenidos mediante digestión, electroforesis en gel de agarosa 1% y finalmente secuenciación. Una vez obtenidas las construcciones correctas, se amplificaron mediante PCR y se transformaron en levaduras los fragmentos lineales. La linearización de las construcciones permitió su inserción en el genoma mediante recombinación homóloga, la cual ocurre de manera espontánea en *S. cerevisiae*. Previamente, durante la linearización, se añadieron mediante la utilización de cebadores apropiados (ver anexo) secuencias homólogas a las de la región de levadura en la que se deseaba insertar el fragmento. En este caso correspondían a las regiones del gen *GRE2*, 5' después del promotor y 3' después del terminador, en el caso de la construcción 1. Las colonias de levadura transformadas fueron seleccionadas y comprobadas mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa 1%. Se comprobó la incorporación del gen de resistencia a Kanamicina en el genoma utilizando cebadores específicos del promotor *GRE2* (directo) y del gen de luciferasa (reverso), obteniendo un fragmento de alrededor de 450 pb en el caso en el que la inserción fue correcta.

Como ya se ha mencionado anteriormente (Materiales y métodos, *Construcción de plásmidos*), se obtuvieron 3 tipos de construcciones. En la construcción 1 se incluyó un terminador artificial, CYC1, mientras que en la construcción 2 se pretende preservar el terminador original de levadura del gen en cuestión. La finalidad de la construcción 2 es, en experimentos posteriores, acercar el terminador a la secuencia del gen LucCP+ mediante la acción de la recombinasa CRE, ya que la construcción añade dos sitios loxP.

Resultados y discusión

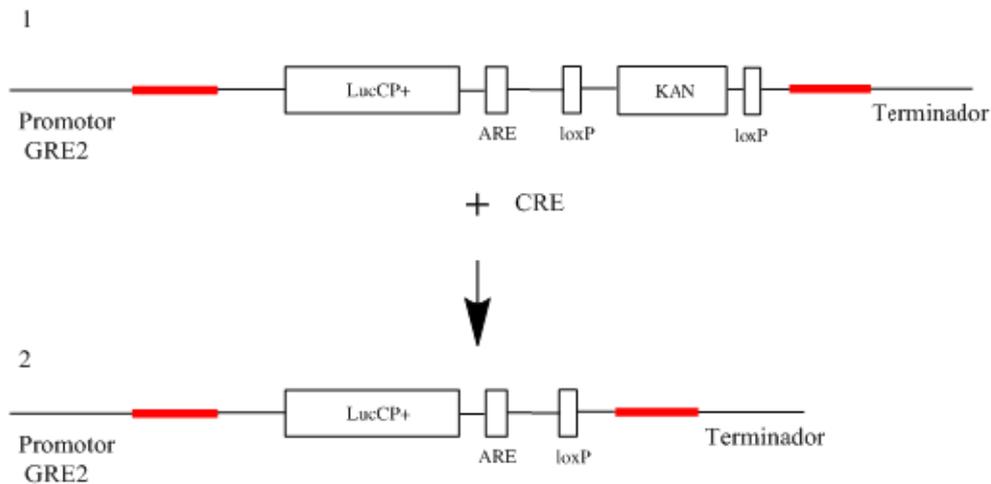


Figura 1. Esquema del funcionamiento de la recombinasa CRE. 1 corresponde a la inserción que se integra en el genoma con la transformación del fragmento lineal en levadura, que lleva el gen de resistencia a Kanamicina que servirá para seleccionar las cepas que han incorporado el fragmento a su genoma. 2 corresponde con la inserción resultante tras transformar las cepas conseguidas anteriormente con la recombinasa CRE, acercando el terminador natural de levadura al gen LucCP+.

Esta construcción puede constituir un gran avance en el estudio de la función de la relación entre promotores y terminadores en la regulación de la expresión génica en respuesta a distintos tipos de estrés.

2. Comprobación del funcionamiento del sistema luciferasa integrativo

Con el fin de comprobar el correcto funcionamiento de las cepas obtenidas con la integración cromosómica se llevaron a cabo distintos ensayos con las mismas, midiendo la bioluminiscencia emitida y cuantificando así los cambios en la expresión génica.

Este primer ensayo consistió en una inducción simple del gen *GRE2* con un baremo estrecho de distintas concentraciones de NaCl. En primer lugar, se crecieron las distintas cepas en medio SD completo (Cepa 1, construcción 1; cepa 2, construcción 2 y una cepa con la construcción pGRE2-lucCP+ incorporada en un plásmido) hasta una OD de entre 1,7 y 2,6 (600 nm). Las células fueron incubadas durante 90 minutos a 28 °C con el sustrato luciferina a una concentración de 0,5 mM, de una disolución de stock a 50 mM en DMSO (Rienzo et al., 2012). Inmediatamente después se añaden 150 µl de células de ese mismo precultivo a los pocillos correspondientes de una placa blanca de 96 pocillos (GloMax). Las medidas de cada concentración de NaCl se realizaron por triplicado.

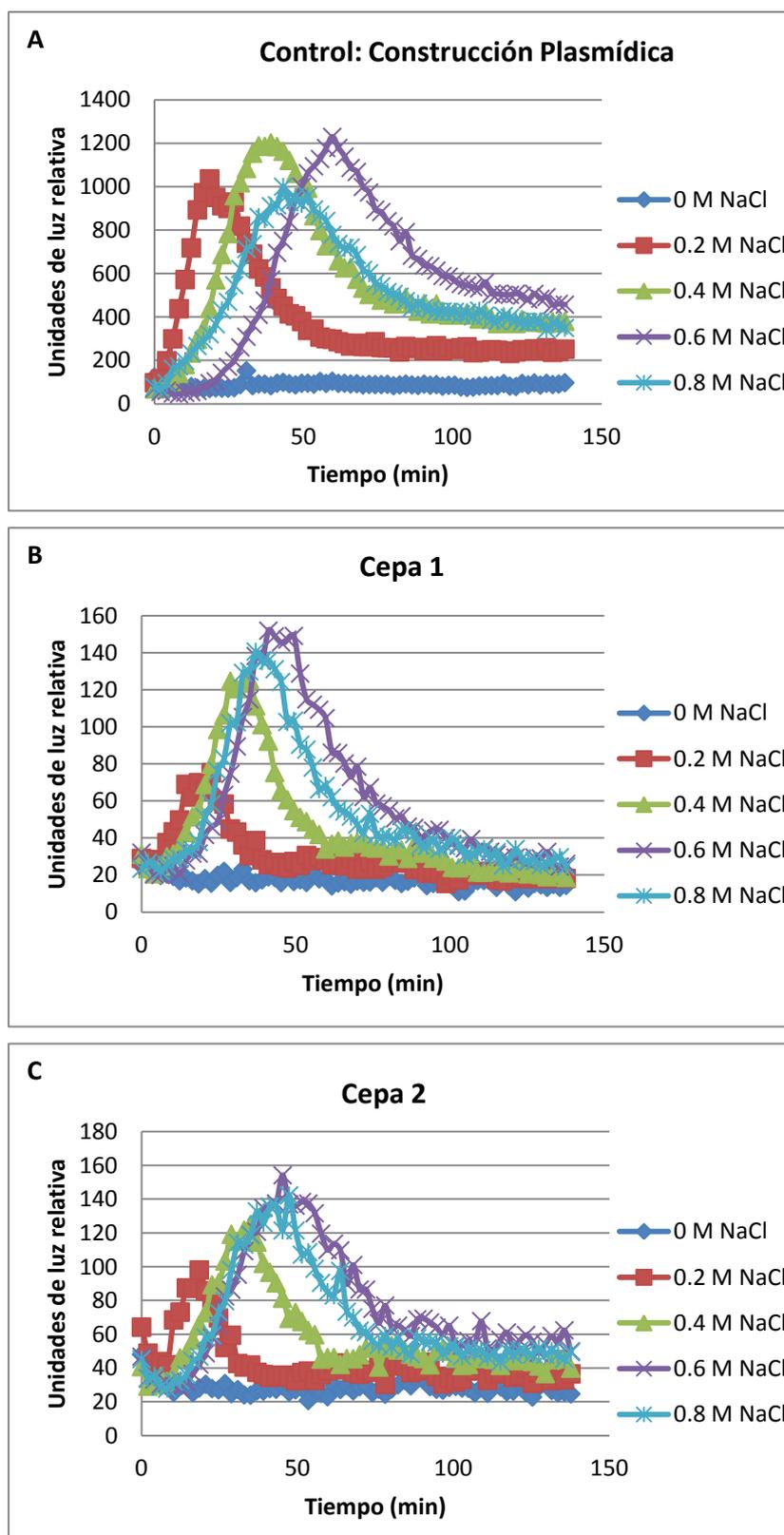


Figura 2. Comprobación del funcionamiento de las construcciones integrativas con el promotor osmoinducible *GRE2*. Las gráficas son el resultado de la representación de las unidades de luz relativas en función del tiempo. **A** corresponde a la cepa que contiene la construcción plasmídica; **B** corresponde a la cepa que contiene la construcción 1 integrada en el genoma de levadura y **C** corresponde a la cepa que contiene la construcción 2 integrada en el genoma de levadura. Los datos fueron relativizados en función de la OD alcanzada en cada cepa. La desviación típica de los triplicados no superó el 15%.

Como se puede observar, la construcción integrativa funciona correctamente ya que se observa un patrón de expresión similar al de la construcción en el plásmido, obtenida y comprobada en trabajos anteriores. A concentraciones mayores de NaCl la inducción del gen se ve retrasada en el tiempo, lo cual puede ser observado de manera notable en la construcción plasmídica y de una manera más ligera en ambas construcciones integrativas. En cuanto a las diferencias, cabe destacar la menor intensidad de luz que alcanza la construcción integrativa, siendo del orden de 100, mientras que la construcción plasmídica alcanza unidades de luz relativa del orden de 1000. Sin embargo, el *fold induction* entre la construcción plasmídica y la integrativa es parecido. Además, es notable una pequeña diferencia en cuanto a la dinámica de la respuesta transcripcional, ya que a una concentración de 0,2 M de NaCl observamos una mayor saturación en la construcción plasmídica que en la construcción integrativa. Es decir, el cambio en la expresión génica desde 0,2 M a 0,4 M es mayor en la construcción integrativa que en la construcción plasmídica. Este resultado será discutido más detalladamente en el siguiente apartado utilizando un baremo más amplio de concentraciones de NaCl para la inducción de *GRE2*.

3. Caracterización de la dinámica transcripcional de la construcción integrativa (Cepa 1) mediante inducción con estrés salino

En estas líneas se describen los resultados obtenidos al someter a la Cepa 1, que contiene la construcción 1 con el terminador artificial integrada en su genoma, a un baremo de concentraciones de NaCl amplio, con el fin de caracterizar su dinámica transcripcional más detalladamente en respuesta a ese estrés.

De la misma manera que en el caso anterior, se realizó una inducción simple, con un solo choque salino, siguiendo el protocolo de Rienzo et al., 2012. Se realizó también una comparación entre la construcción plasmídica y la integrativa y las medidas se realizaron por triplicado. Las células alcanzaron una densidad óptica de 1,8 y 1,9 (600nm) correspondientes a la construcción integrativa y al plásmido respectivamente.

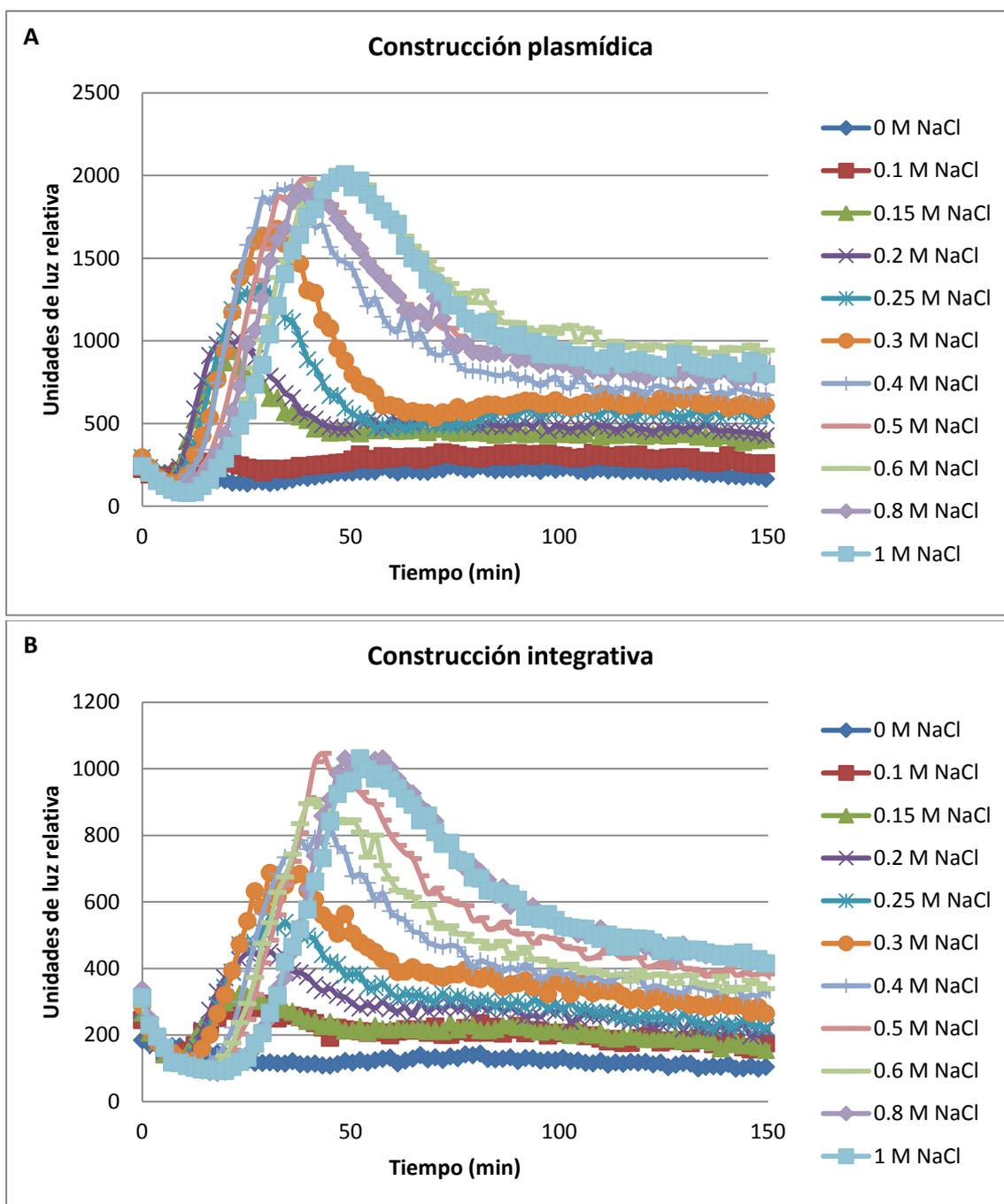


Figura 3. Caracterización de la dinámica transcripcional del gen *GRE2* en respuesta a un baremo amplio de concentraciones de NaCl. A y B corresponden a las curvas dosis-respuesta obtenidas al inducir el promotor *GRE2* tanto en la construcción plasmídica (A) como en la integración cromosómica (B) con un baremo de concentraciones de NaCl de 0 a 1 M. La construcción integrativa que se muestra en esta figura corresponde a la construcción 1 (Materiales y métodos, *Construcción de plásmidos*). La desviación típica de los triplicados no superó el 15%.

Del mismo modo que en el caso anterior, se observa un comportamiento similar en la dinámica transcripcional de *GRE2* en la construcción plasmídica y en la integrativa, exceptuando algunas diferencias.

En primer lugar, es fácilmente observable que la emisión de luz de la cepa que contiene la construcción plasmídica alcanza unos niveles superiores a la construcción integrativa, aún siendo ambas del orden de 1000. También es notable que la construcción plasmídica alcanza la saturación a unos niveles de concentración de NaCl menores que la cepa integrativa. Es decir, si se observa la diferencia entre los niveles transcripcionales obtenidos entre 0,3 y 0,5 M, encontramos que en la construcción plasmídica a partir de 0,4 M se alcanza la saturación y los niveles de expresión no cambian notablemente. Sin embargo, en el caso de la construcción integrativa, observamos una subida más progresiva de los valores máximos, siendo la respuesta más dinámica. Estos resultados serán discutidos más adelante con el cálculo de la EC_{50} y la comparación de los máximos en función de la concentración de NaCl.

Por otra parte, igual que en el caso anterior, se observa un retraso en la aparición de las curvas dosis-respuesta con el aumento de la concentración. Este retraso es común a todas las cepas y se debe a que las células deben realizar un mayor esfuerzo para activar la maquinaria transcripcional cuando son sometidas a condiciones elevadas de estrés. Como se ha mencionado anteriormente, durante la respuesta a estrés una serie de genes se ven reprimidos, los cuales están relacionados con la síntesis proteica y el crecimiento celular (revisado en Gasch 2007).

3.1 Comparación de la dinámica transcripcional de las construcciones plasmídica e integrativa en función de la concentración de NaCl y cálculo de la EC_{50}

Con el fin de detallar la dinámica transcripcional de ambas cepas y determinar sus diferencias y similitudes se procedió al estudio de la intensidad máxima alcanzada con la inducción de cada concentración de NaCl.

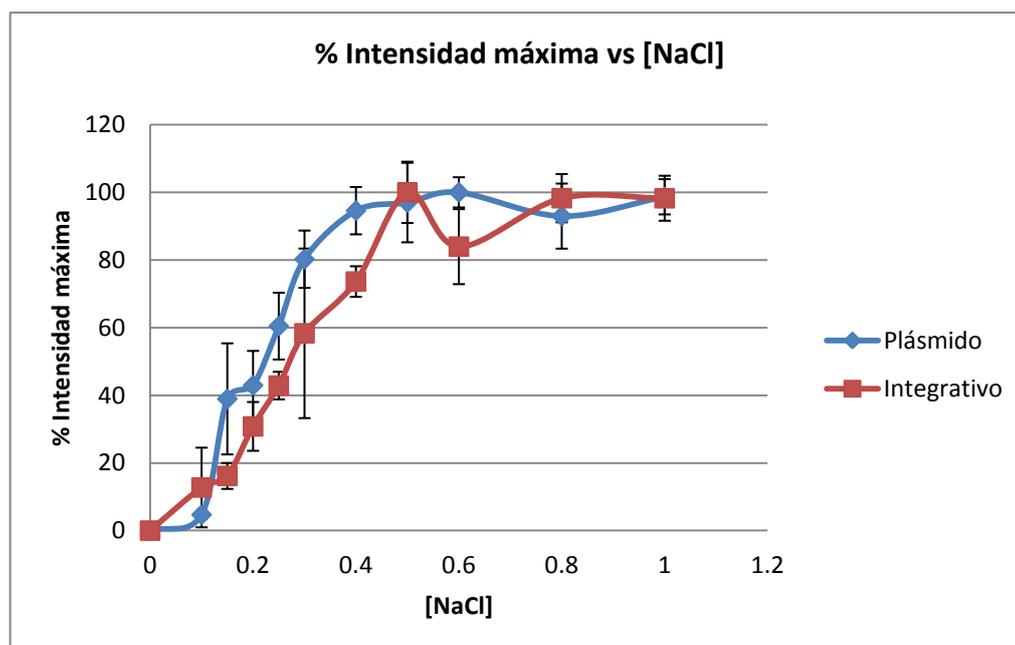


Figura 4. Representación de la intensidad máxima expresada en porcentaje en función de la concentración de NaCl. En esta gráfica se muestran las curvas obtenidas al representar el porcentaje de intensidad máxima

Resultados y discusión

alcanzado con cada concentración de NaCl. Los porcentajes se obtuvieron relativizando la intensidad obtenida en cada punto con el máximo de intensidad obtenida en el caso de la construcción plasmídica y en la integrativa. También se representa la desviación típica de cada máximo teniendo en cuenta las tres réplicas que se realizaron en cada experimento, no superando el 25% en ningún caso.

En la Figura 4 se puede observar que la dinámica de las construcciones plasmídica e integrativa es similar a rasgos generales. Sin embargo, como ya ha sido mencionado anteriormente, el retraso en el alcance de la saturación que sufre la construcción integrativa es apreciable, sobre todo en el intervalo entre 0,1 y 0,5 M.

Con el fin de aportar un valor numérico a esta diferencia se realizó el cálculo de la EC_{50} . La EC_{50} se define como la concentración media efectiva que se espera produzca un cierto efecto en el 50% de los organismos testeados de una población bajo ciertas condiciones (IUPAC, 1993). Aplicando esta definición al caso que nos ocupa sería la concentración media de estrés que produciría el 50% de activación del gen *GRE2*, traducido en intensidad de luz. Así pues, utilizando los puntos de la curva que conforman una recta (0,1 a 0,5) se obtiene una ecuación lineal, de la cual se puede obtener la concentración para la cual el porcentaje de intensidad máxima es igual a 50. De esta manera se obtuvo que la EC_{50} correspondiente a la construcción plasmídica y a la integrativa respectivamente fue 220 mM y 281 mM. Por tanto, sí es notable, aunque ligera, la diferencia entre la saturación del promotor en el caso del plásmido, que se produce a concentraciones menores y en el caso de la integración, que se produce a concentraciones más elevadas.

Esta respuesta más dinámica observada en la construcción integrativa puede deberse a las diferencias estructurales entre el promotor que se encuentra en su entorno natural (cromosoma de levadura) y en el plásmido. Además, la estructura de los nucleosomas en los plásmidos es diferente a la de éstos en el cromosoma y, ya que la remodelación de la cromatina es un mecanismo de regulación de la expresión génica, ésta podría ser una causa de la diferencia en la respuesta.

Sin embargo, para poder obtener conclusiones más sólidas sería necesario repetir estos experimentos con otros genes de respuesta a estrés para determinar si esta tendencia es general. Además, resultaría interesante comprobar el comportamiento de este mismo gen con sus componentes estructurales, como por ejemplo con su terminador natural, lo cual sería posible con la construcción 2 obtenida en este trabajo (Figura 1).

4. Comprobación del funcionamiento del sistema en medio YPD

Los experimentos llevados a cabo con el sistema luciferasa se han realizado de manera habitual utilizando como medio de cultivo SD, incompleto en el caso de cepas con construcciones plasmídicas y completo en el caso de construcciones integrativas. Esta manera de proceder era necesaria ya que las construcciones plasmídicas contienen un marcador de auxotrofia, normalmente de histidina, por tanto era necesario utilizar un medio selectivo. Sin embargo, las cepas que poseen la misma construcción integrada en el

genoma son capaces de crecer en medio no selectivo, por tanto se espera el mismo resultado en medio YPD con el sistema luciferasa al obtenido con medio de cultivo SD.

Para realizar esta comprobación se llevó a cabo un experimento idéntico al realizado en el punto 3 (inducción simple con un baremo amplio de concentraciones de NaCl), con la diferencia de que las células fueron crecidas en medio YPD alcanzando una OD de 2,225.

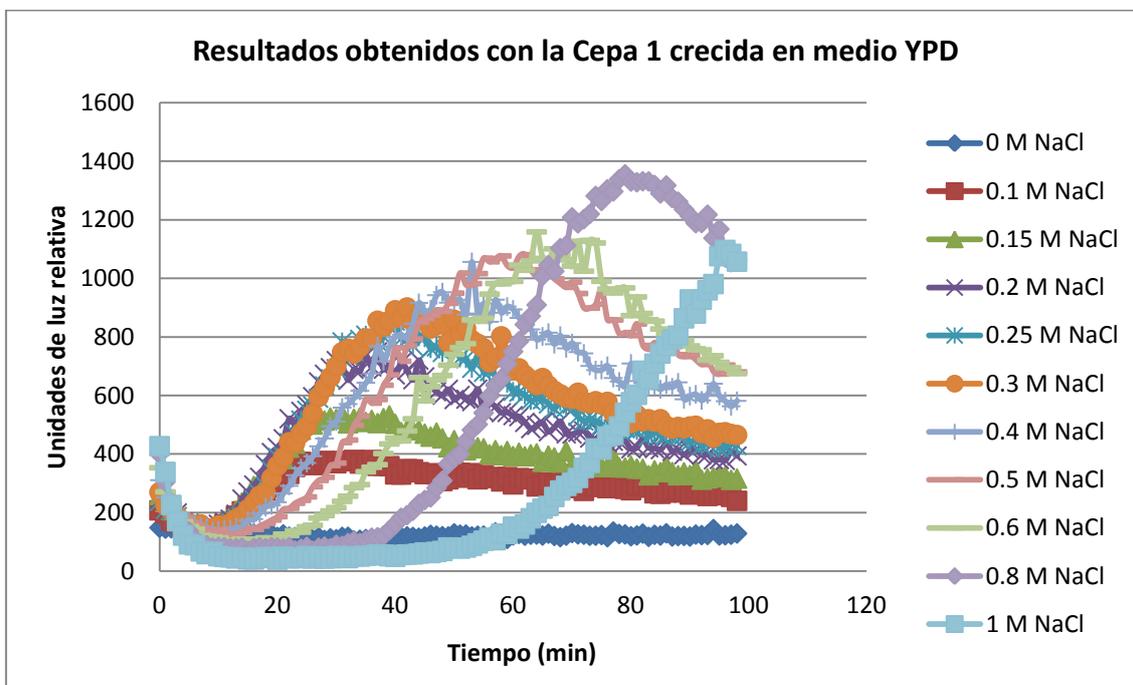


Figura 5. Representación de las curvas dosis-respuesta obtenidas con el sistema luciferasa al crecer las células en medio de cultivo YPD. En esta gráfica se muestran las curvas obtenidas al representar la intensidad de luz obtenida en unidades de luz relativa en función del tiempo, expresado en minutos. Cada curva en el gráfico pertenece a una concentración distinta de NaCl, de 0 M a 1 M. Los resultados pertenecen al comportamiento del gen *GRE2* integrado en la construcción 1 (Cepa 1). Los datos fueron relativizados en función de la OD alcanzada. La desviación típica de los triplicados no superó el 15%.

En la figura 5 podemos observar un comportamiento de la dinámica transcripcional similar al obtenido con la misma cepa crecida en medio de cultivo SD (Figura 3, B). En este caso, el retraso en la inducción correspondiente a concentraciones elevadas de NaCl es notablemente mayor a los casos anteriores. De hecho, se observa que la curva correspondiente a 1 M de NaCl no ha alcanzado el máximo en el intervalo de tiempo que ha durado el experimento, necesitando un mayor tiempo de inducción.

También se observa de manera más clara el mayor dinamismo en la respuesta discutido en el punto 3, observándose un aumento progresivo de la intensidad máxima en cada curva con el aumento de la concentración de NaCl, lo cual concuerda con los resultados obtenidos hasta el momento con la construcción integrativa.

5. Estudio comparativo de la memoria transcripcional en condiciones de estrés osmótico entre la construcción integrativa y la construcción plasmídica

En estudios previos se ha observado el fenómeno de memoria transcripcional. El caso más estudiado es el de los genes *GAL*. En este trabajo se pretendió estudiar la existencia del fenómeno de memoria transcripcional en el gen *GRE2*. Previamente se han obtenido resultados con este mismo gen aplicando el sistema luciferasa en una construcción plasmídica, por tanto, en este trabajo se realizaron los mismos ensayos utilizando la construcción integrativa con el fin de contrastar los resultados.

Se realizaron dos tipos de ensayos. Uno de ellos fue para comprobar la existencia de memoria transcripcional al inducir dos veces las células con NaCl. Por otra parte, se realizó otro tipo de ensayo para comprobar la resistencia adquirida a estrés oxidativo con H₂O₂ tras una primera inducción con NaCl.

5.1 Memoria transcripcional mediante inducción NaCl/NaCl

Para el estudio de la memoria transcripcional de *GRE2* en respuesta a estrés osmótico se llevó a cabo el siguiente modelo experimental. Se crecieron las células hasta una densidad óptica de alrededor de 3 (la OD óptima para realizar el ensayo es de 2-2,5; pero el precultivo original era fresco y presentaba un crecimiento elevado). Posteriormente se incubaron las células con 0,7 M de NaCl durante 90 minutos a 28 °C (células con memoria) y paralelamente se incubaron el mismo volumen de células con idéntico volumen de agua MiliQ estéril (células sin memoria). A continuación, se centrifugaron las células y se lavaron con agua MiliQ, posteriormente se añadió medio SD nuevo con luciferina (Rienzo et al., 2012) y se incubaron otros 90 minutos a 28 °C. Finalmente se transfirieron 120 µl de células a cada pocillo de una placa GloMax de 96 pocillos a la que previamente se le había añadido distintos volúmenes de NaCl. Previamente a la transferencia de las células a la placa e inmediatamente después de la segunda incubación se midió la OD de las células para la normalización de los datos obtenidos, a una longitud de onda de 600 nm.

Los resultados obtenidos en este caso con la construcción integrativa se compararon con los obtenidos previamente en otro trabajo con la construcción plasmídica mediante un ensayo idéntico (Poveda, 2014).

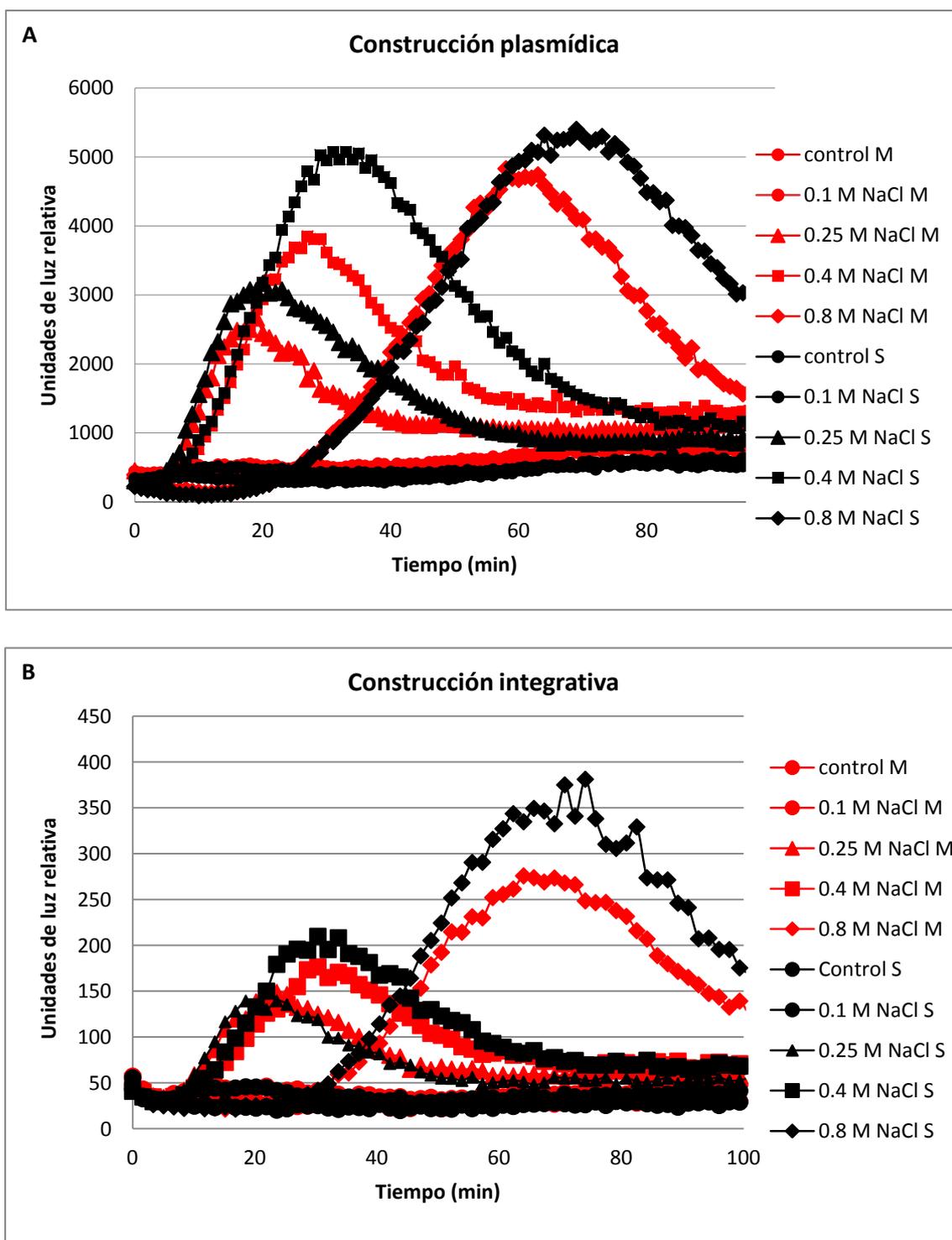


Figura 6. Estudio comparativo de la memoria transcripcional del gen *GRE2* en condiciones de estrés osmótico. Estas gráficas corresponden a las curvas dosis-respuesta a distintas concentraciones de NaCl, comparando las células que han sufrido un choque osmótico previo (M, con memoria) con las que no (S, sin memoria). La gráfica **A** corresponde a la construcción plasmídica y pertenece a un estudio anterior a éste (Poveda, 2014), mientras que la gráfica **B** corresponde a la construcción integrativa obtenida en este trabajo. Los datos han sido relativizados en función de la OD en ambos casos. La desviación típica de los triplicados no superó el 15%.

Como se puede observar, la dinámica transcripcional es similar en la construcción plasmídica y en la construcción integrativa. A concentraciones bajas de NaCl no se observa diferencia entre las células con y sin memoria; a concentraciones medias de NaCl se observa una mayor inducción de *GRE2* en las células sin memoria y esta diferencia es más notable a concentraciones mayores (0,8 M). En el caso de la construcción plasmídica, las diferencias en la inducción de las células con memoria y sin memoria son más elevadas, de la misma manera que se alcanzan unos mayores niveles de unidades relativas de luz.

Por otra parte, en ambos casos se observa un retraso en el inicio de la transcripción a concentraciones elevadas de NaCl, resultado que ya se ha observado previamente en ensayos con inducción simple. Además, en el caso de la construcción plasmídica se puede observar de nuevo el aumento progresivo de la intensidad máxima de luz emitida, siendo la diferencia entre 0,4 M y 0,8 M más notable en esta construcción. Este resultado sigue apoyando esta respuesta más dinámica observada previamente en los ensayos realizados con esta construcción.

En base a los resultados obtenidos, podemos deducir que el gen *GRE2* en respuesta a estrés salino con NaCl no presenta el fenómeno de memoria transcripcional observado en los genes *GAL*. Es decir, según los resultados obtenidos con los genes *GAL*, cabría esperar una respuesta mayor y más rápida de *GRE2* en el segundo estímulo en las células con memoria. Sin embargo, se observa que la inducción ocurre al mismo tiempo e incluso aborta a una intensidad menor que en las células sin memoria. Este resultado podría explicarse ya que el gen *GRE2* responde a estrés, por tanto debe presentar una inducción rápida en cualquier caso para asegurar la supervivencia celular.

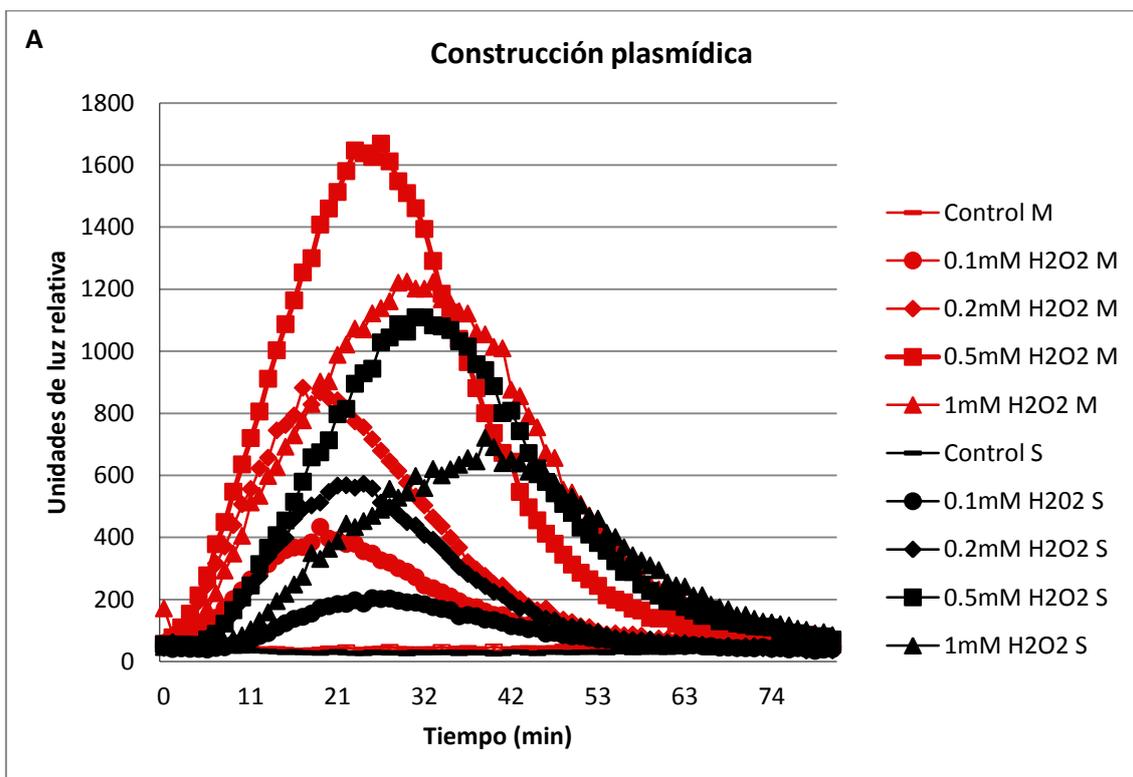
Los resultados obtenidos con la construcción integrativa apoyan la hipótesis formulada a partir de los resultados obtenidos con la construcción plasmídica. Esta hipótesis formula que durante el primer choque se producen moléculas de defensa, tales como proteínas, para combatir el estrés salino. Al cambiar a medio sin sal después del primer choque, este promotor deja de inducirse, sin embargo al volver a sufrir otro choque de estrés salino el promotor vuelve a inducirse, aunque en menor medida que en el choque anterior ya que las moléculas de defensa sintetizadas durante la exposición anterior se mantienen en el citosol. Por tanto, en el caso de *GRE2* no se produce una memoria transcripcional como se conoce en los genes *GAL*, sino más bien una resistencia adquirida. Además, este resultado concuerda con las moléculas defensivas que se observan en generaciones de células posteriores al primer choque osmótico (Poveda, 2014).

5.2 Memoria adquirida mediante inducción con NaCl/H₂O₂

En el siguiente experimento se pretendió comparar los resultados obtenidos en memoria cruzada con estrés salino y oxidativo en la construcción plasmídica con la construcción integrativa de este trabajo.

Se ha descrito anteriormente la existencia de una memoria cruzada que consiste en la adquisición de resistencia a estrés oxidativo de las células tras una exposición previa a estrés salino (Guan et al., 2012). Además, estos resultados fueron observados también en un trabajo previo con una construcción plasmídica del gen *GRE2*, el cual responde tanto a estrés salino como a estrés oxidativo. Por tanto, el objetivo de este ensayo es la comparación de los resultados obtenidos anteriormente con los de la respuesta al mismo ensayo llevado a cabo en la cepa con la construcción integrativa.

El procedimiento experimental se detalla a continuación. En primer lugar se crecieron las células en medio SD completo, esta vez alcanzaron una OD de alrededor de 3 a una longitud de onda de 600 nm. Posteriormente, se incubaron las células con 0,7 M de NaCl (células con memoria) y paralelamente otro precultivo de células con el mismo volumen de agua MiliQ estéril (células sin memoria), durante 60 minutos a 28 °C. A continuación, se precipitaron las células y se lavaron con agua estéril; se precipitaron de nuevo y se añadió medio SD nuevo con luciferina (Rienzo et al., 2012) dejándose incubar durante 90 minutos a 28 °C. Acto seguido se midió la OD final de cada cultivo con el fin de normalizar los datos finales e inmediatamente después se añadió 150 µl de células a cada pocillo de una placa GloMax de 96 pocillos a los que previamente se había añadido el volumen apropiado de NaCl.



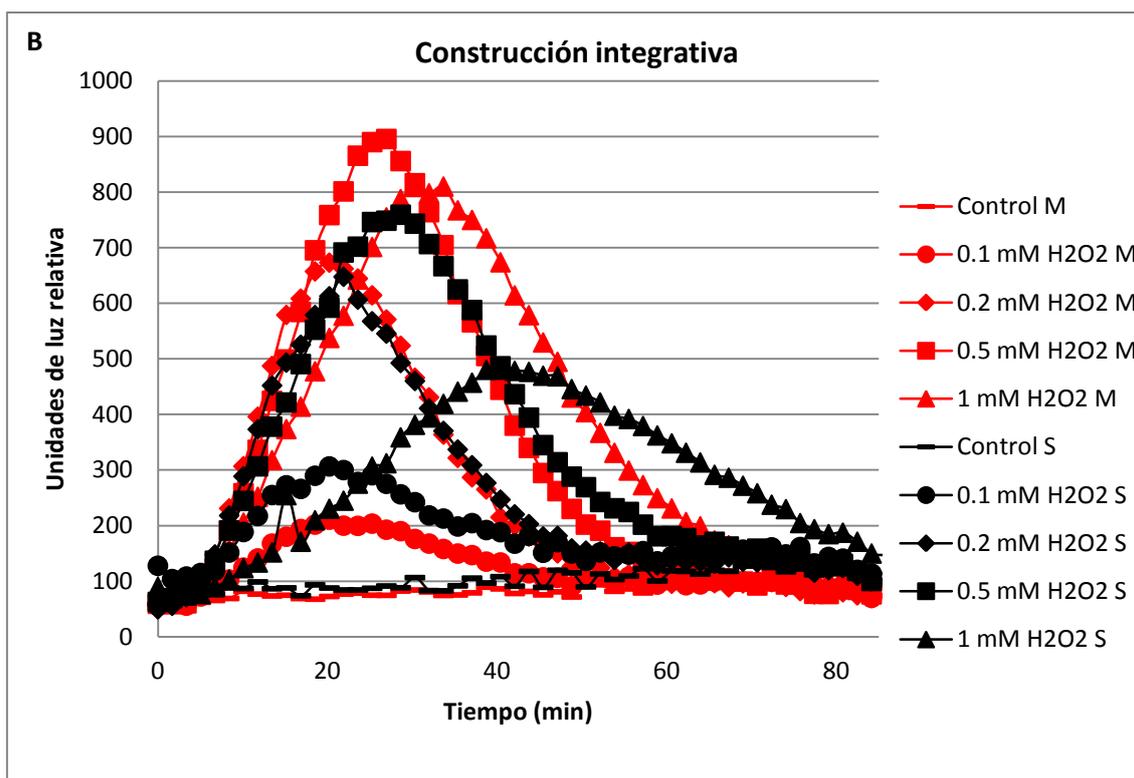


Figura 7. Estudio comparativo de memoria transcripcional cruzada para H_2O_2 y NaCl del gen *GRE2*. En esta figura se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas al someter a las células a distintas concentraciones de agua oxigenada (0 a 1 mM). Las curvas en rojo corresponden a las células con memoria (M), que han sido expuestas a un choque osmótico previo. Las curvas en negro pertenecen a las células sin memoria que no han sido sometidas al primer choque osmótico. La gráfica A pertenece a un trabajo anterior (Poveda, 2014), correspondiente al gen *GRE2* en una construcción plasmídica. Por otra parte, la gráfica B corresponde a la construcción integrativa obtenida en este trabajo. Los datos fueron relativizados en función de la OD medida después de la segunda incubación. La desviación típica de los triplicados no superó el 15%.

En la figura 7 podemos observar un comportamiento similar entre A y B, construcciones plasmídica e integrativa respectivamente. Como ya se había observado en A, la cepa con memoria presenta una mayor inducción del gen. En B, esta mayor inducción de las células con memoria se observa a concentraciones medianas y elevadas de H_2O_2 . En ambos casos se observa un adelanto en la inducción, siendo más notable en la construcción plasmídica. Este adelanto en la inducción es claramente visible a concentración 1 mM de H_2O_2 . De la misma manera que en casos anteriores, se observa que la cepa con la construcción integrativa alcanza unos niveles menores de unidades de luz relativa.

La mayor inducción del gen *GRE2* en la construcción integrativa apoya la hipótesis planteada anteriormente ante los resultados obtenidos con la construcción plasmídica (Poveda, 2014). La primera inducción con 0,7 M NaCl no es letal para las células, por tanto permite la producción de moléculas de defensa, como en el caso anterior, así como moléculas detoxificadoras, ya que se ha visto que el estrés osmótico produce de manera indirecta especies reactivas de oxígeno (ROS). De manera contraria al caso anterior (punto 5.1), al ser el tratamiento con H_2O_2 distinto al primer tratamiento con NaCl, las moléculas

de defensa sintetizadas durante el primer choque osmótico facilitan la respuesta transcripcional, a pesar de estar las células sometidas a estrés oxidativo. Por tanto, existe un efecto positivo al someter a las células a un primer estrés salino, ya que éstas adquieren una resistencia posterior a otro tipo de estrés, como es en este caso el estrés oxidativo.

6. Conclusiones y perspectivas futuras

En este trabajo se ha desarrollado un sistema integrativo de luciferasa desestabilizada que permite estudiar la dinámica transcripcional en respuesta a estrés a nivel cromosómico, *in vivo* y en tiempo real en el organismo *Saccharomyces cerevisiae*. Los estudios llevados a cabo en este trabajo han permitido esclarecer algunas hipótesis planteadas en trabajos anteriores, como la inexistencia de memoria transcripcional en el gen *GRE2* en respuesta a estrés salino, así como la existencia de una memoria adquirida cruzada entre un primer choque con NaCl y la resistencia a un estrés posterior con H₂O₂.

Los resultados obtenidos suponen la apertura a futuros experimentos. Uno de ellos sería el acercamiento del terminador natural de levadura en la construcción 2 (Figura 1) mediante el sistema de la recombinasa CRE con el fin de estudiar la relación de los promotores y terminadores y su función en la expresión génica. Además, con el fin de constatar algunos de los resultados obtenidos, sería necesaria la realización de estudios de proteínas de resistencia en el caso de la memoria transcripcional así como del papel de la cromatina en la regulación de esta respuesta.

Conclusiones

Conclusiones

Tras discutir los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- El sistema integrativo del gen de luciferasa LucCP+ funciona correctamente, permitiendo el estudio de la dinámica transcripcional *in vivo* y a tiempo real de promotores en el genoma de levadura.
- La dinámica transcripcional en respuesta a estrés osmótico del promotor *GRE2* fusionado al gen LucCP+ ofrece una respuesta muy similar a la de la construcción plasmídica, siendo la construcción integrativa más dinámica.
- El gen *GRE2* no presenta el fenómeno de memoria transcripcional observado en los genes *GAL*.
- La inducción con estrés salino del gen *GRE2* favorece su posterior respuesta transcripcional con estrés oxidativo.
- Se ha desarrollado una construcción integrativa que permitirá el estudio de la expresión génica con el reportero lucCP+ en el contexto cromosomal combinando promotor y terminador natural del gen de interés. Este sistema podría revelar la función de la interacción entre el promotor y el terminador en la dinámica transcripcional en respuesta a estrés.

Bibliografía

Bibliografía

AKERFELT, M., MORIMOTO, R. I. & SISTONEN, L. 2010 Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545–555.

ALBERTYN, J., HOHMANN, S., THEVELEIN, J. M. AND PRIOR, B. A. 1994 *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell Biol.* 14, 4135–4144.

ALEPUZ P. M., DE NADAL E., ZAPATER, M., AMMERER, G., POSAS, G. 2003 Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J* 22: 2433-2442

BERRY, D. B., GASCH, A. P. 2008 Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell* 19: 4580–4587

BERRY, D. B., GUAN, Q., HOSE, J., HAROON, S., GEBBIA, M., HEISLER, L. E., NISLOW, C., GIAEVER, G., GASCH, A. P. 2011 Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet.* 7(11): e1002353. doi:10.1371

BLOMBERG, A. AND ADLER, L. 1989 Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171, 1087–1092.

BRICKNER, J. H. 2009 Transcriptional memory at the nuclear periphery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 127–133.

CAPALDI, A. P., KAPLAN, T., LIU, Y., HABIB, N., REGEV, A., FRIEDMAN, N., O'SHEA, E. K. 2008 Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat Genet* 40: 1300–1306

CAUSTON, H. C., REN, B., KOH, S. S., HARBISON, C. T., KANIN, E., JENNINGS, E. G., LEE, T. I., TRUE, H. L., LANDER, E. S., YOUNG, R. A. 2001 Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12: 323–337

CHEN, D., TOONE, W. M., MATA, J., LYNE, R., BURNS, G., KIVINEN, K., BRAZMA, A., JONES, N., BAHLER, J. 2003 Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14: 214–229

CHEN, R. E. & THORNER, J. 2007 Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1311–1340.

CHI, Z. AND ARNEBORG, N. 2000 *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees up ethanol tolerance exhibit different adaptive responses response to produce ethanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 75–78.

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

Bibliografía

- DAVIES, J. M., LOWRY, C. V. AND DAVIES, K. J. 1995 Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 317: 1–6.
- DE NADAL E., AMMERER, G., POSAS, F. 2011 Controlling gene expression in response to stress. *Nature reviews Genetics* 12: 833-845
- DE NADAL, E. & POSAS, F. 2010 Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J.* 29, 4–13.
- DE NADAL, E., ALEPUZ, P. M., POSAS, F. 2002 Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO reports* 3: 735-740
- DE NADAL, E., CASADOME, L., POSAS, F. 2003 Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 23: 229-237
- DE NADAL, E., ZAPATER, M., ALEPUZ, P. M., SUMOY, L., MAS, G., POSAS, F. 2004 The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* 427: 370–374
- DENG, L., SUGIURA, R., TAKEUCHI, M., SUZUKI, M., EBINA, H., TAKAMI, T., KOIKE, A., IBA, S., KUNO, T. 2006 Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 17: 4790-4800
- DURRANT, W. E. AND DONG, X. 2004 Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 185–209.
- GARAY-ARROYO, A., COVARRUBIAS, A. A. 1999 Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 879-892
- GASCH, A. P. 2007 Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* 24: 961-976
- GASCH, A. P., SPELLMAN, P. T., KAO, C. M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M. B., STORZ, G., BOTSTEIN, D., BROWN, P. O., 2000 Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 11: 4241-4257
- GEHART, H., KUMPF, S., ITTNER, A. & RICCI, R. 2010 MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness? *EMBO Rep.* 11, 834–840.
- GIETZ, R. D., SCHIESTL, R. H., WILLEMS, A. R., WOODS, R. A. 1995 Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355-360
- GUAN, Q., HAROON, S., GONZALEZ BRAVO, D., WILL, J. L., GASCH, A. P. 2012 Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192(2):495-505

Bibliografía

GUERTIN, M. J., PETESCH, S. J., ZOBECK, K. L., MIN, I. M. & LIS, J. T. 2010 *Drosophila* heat shock system as a general model to investigate transcriptional regulation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 1–9.

HARBISON, C. T., GORDON, D. B., LEE, T. I., RINALDI, N. J., MACISAAC, K. D., DANFORD, T. W., HANNETT, N. M., TAGNE, J. B., REYNOLDS, D. B., YOO, J., JENNINGS, E. G., ZEITLINGER, J., POKHOLOK, D. K., KELLIS, M., ROLFE, P. A., TAKUSAGAWA, K. T., LANDER, E. S., GIFFORD, D. K., FRAENKEL, E., YOUNG, R. A. 2004 Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431(7004):99-104.

HECKER, M., PANE-FARRE, J. AND VOLKER, U. 2007 SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related grampositive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 215–236.

HOHMANN, S. 2002 Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.

HOHMANN, S., KRANTZ, M. & NORDLANDER, B. 2007 Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* 428, 29–45.

IUPAC, 1993.

KANDROR, O., BRETSCHNEIDER, KREYDIN, E., CAVALIERI, D. AND GOLDBERG, A. L. 2004 Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol. Cell* 13: 771–781.

KELLEY, R. AND IDEKER, T. 2009 Genome-wide fitness and expression profiling implicate Mga2 in adaptation to hydrogen peroxide. *PLoS Genet.* 5: e1000488.

KENSLER, T. W., WAKABAYASHI, N. AND BISWAL, S. 2007 Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 89–116.

KRISTIANSEN, K. N. AND ROHDE, W. 1991 Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol- 4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 230, 49–59.

KUNDU, S. AND PETERSON, C. L. 2010 Dominant role for signal transduction in the transcriptional memory of yeast GAL genes. *Mol. Cell. Biol.* 30: 2330–2340.

LEWIS, J. G., LEARMONTH, R. P. AND WATSON, K. 1995 Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 141(Pt. 3): 687–694.

LOU, Y. AND YOUSEF, A. W. 1997 Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1252–1255.

Bibliografía

LU, D., MAULIK, N., MORARU, I. I., KREUTZER, D. L., AND DAS, D. K. 1993 Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 264: C715–C722.

MAGER, W. H., VARELA, J. C. 1993 Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol Microbiol.* Oct;10(2):253-8.

MARTÍNEZ-MONTAÑÉS, F. 2010 Adaptación a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae* : Caracterización genómica de factores de transcripción involucrados y represión de la biosíntesis de ergosterol. Proft ., MH. dir. ; Pascual-Ahuir Giner, MD. dir. , Valencia

MARTÍNEZ-MONTAÑÉS, F., PASCUAL-AHUIR, A. & PROFT, M. Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmotic stress in yeast. *OMICS* 14, 619–627 (2010).

MARTÍNEZ-PASTOR, M. T., MARCHLER, G., SCHULLER, C., MARCHLER-BAUER, A., RUIS, H., ESTRUCH, F. 1996 The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15: 2227-2235

MAS, G., DE NADAL, E., DECHANT, R., RODRIGUEZ DE LA CONCEPCIÓN, M. L., LOGIE, C., JIMENO-GONZÁLEZ, S., CHAVEZ, S., AMMERER, G., POSAS, F. 2009 Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J* 28: 326–336

MATEUS, C., AVERY, S. V. 2000 Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry. *Yeast* 16(14):1313-23

MATSUMOTO, H., HAMADA, N., TAKAHASHI, A., KOBAYASHI, Y. AND OHNISHI, T. 2007 Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. *J. Radiat. Res.* 48: 97–106.

MEWEA, H. W., ALBERMANN, K., HEUMANN, K., LIEBL, S. AND PFEIFFER, F. 1997 MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Res.* 25, 28–30.

MILLER, C., SCHWALB, B., MAIER, K., SCHULZ, D., DÜMCKE, S., ZACHER, B., MAYER, A., SYDOW, J., MARCINOWSKI, L., DÖLKEN, L., MARTIN, D. E., TRESCH, A., CRAMER, P. 2011 Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 7, 458.

NADEAU, S. I. & LANDRY, J. 2007 Mechanisms of activation and regulation of the heat shock-sensitive signaling pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 100–113.

NEVITT, T., PEREIRA, J., AZEVEDO, D., GUERREIRO, P., RODRIGUES-POUSADA, C. 2004 Expression of YAP4 in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *The Biochemical journal* 379: 367-374

Bibliografía

NI, L., BRUCE, C., HART, C., LEIGH-BELL, J., GELPERIN, D., UMANSKY, L., GERSTEIN, M. B. AND SNYDER, M. 2009 Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev.* 23, 1351–1363.

NING, L., DING, Y., FROMM, M., AVRAMOVA, Z. 2014 Different gene-specific mechanisms determine the 'revised-response' memory transcription patterns of a subset of *A. thaliana* dehydration stress responding genes *Nucleic Acids Research.* 9(42): 5556-5566

O'ROURKE, S. M., HERSKOWITZ, I. & O'SHEA, E. K. 2002 Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet.* 18, 405–412.

PARSELL, D. A. AND LINDQUIST, S. 1994 Heat shock proteins and stress tolerance. In "The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones" (Morimoto, R. I., Tissie`res, A. and Georgopoulos) C. (Eds),. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, pp. 457–494.

POSAS, F., CHAMBERS, J. R., HEYMAN, J. A., HOFFLER, J. P., DE NADAL, E., ARINO, J. 2000 The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275: 17249-17255

POVEDA, D. 2014 Estudio en tiempo real de la dinámica y memoria transcripcional en la adaptación a estrés, PROFT, M., dir., PASCUAL-AHUIR, A., dir. Universitat Politècnica de València

PROFT, M., PASCUAL-AHUIR, A., DE NADAL, E., ARINO, J., SERRANO, R., POSAS, F. 2001 Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* 20: 1123-1133

PROFT, M., SERRANO, R. 1999 Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* 19: 537-546

REP, M., REISER, V., GARTNER, U., THEVELEIN, J. M., HOHMANN, S., AMMERER, G., RUIS, H. 1999 Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol* 19: 5474-5485

RIENZO, A., PASCUAL-AHUIR, A., PROFT, M. 2012 The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast* 29: 219-231

RIEZMAN, H. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle* 3, 61–63 (2004).

RITCHER, K., HASLBECK, M. & BUCHNER, J. 2010 The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* 40, 253–266.

SAKURAI, H. & ENOKI, Y. Novel aspects of heat shock factors: DNA recognition, chromatin modulation and gene expression. *FEBS J.* 277, 4140–4149 (2010).

Bibliografia

SCHENK, P. M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J. P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S. C., MANNERS, J. M. 2000 Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11655–11660.

SCHOLZ, H., FRANZ, M. AND HEBERLEIN, U. 2005 The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature* 436: 845–847.

SCHULLER, C., BREWSTER, J. L., ALEXANDER, M. R., GUSTIN, M. C., RUIS, H. 1994 The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J* 13: 4382-4389
SIMEONOV, A., YASGAR, A., JADHAV, A., LOKESH, G. L., KLUMPP, C., MICHAEL, S., AUSTIN, C. P., NATARAJAN, A. AND INGLESE, J. 2008 Dual-fluorophore quantitative high-throughput screen for inhibitors of BRCT-phosphoprotein interaction. *Anal Biochem* 375: 60–70.

SORENSEN, J. G., NIELSEN, M. M., KRUIHOFFER, M., JUSTESEN, J. & LOESCHCKE, V. 2005 Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress. Chaperones* 10, 312–328.

SWAN, T. M. AND WATSON, K. 1999 Stress tolerance in a yeast lipid mutant: membrane lipids influence tolerance to heat and ethanol independently of heat shock proteins and trehalose. *Can. J. Microbiol.* 45: 472–479.

THORNE, N., INGLESE, J. AND AULD, D. S. 2010 Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology; *Chem Biol.* 17(6): 646-657

WEAKE, V. M. & WORKMAN, J. L. 2010 Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nature Rev. Genet.* 11, 426–437.

WESTFALL, P. J., BALLON, D. R. & THORNER, J. 2004 When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science* 306, 1511–1512.

YALE, J. & BOHNERT, H. J. 2001 Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J. Biol. Chem.* 276, 15996–16007 (2001).

YANCEY, P. H., CLARK, M. E., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. AND SOMERO, G. N. 1982 Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217, 1214–1222.

ZAPATER, M., SOHRMANN, M., PETER, M., POSAS, F., DE NADAL, E. 2007 Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol Cell Biol* 27: 3900–3910

Anexo

Anexo I. Resumen de los cebadores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia	Región que amplifica
GRE2-301	5' –AATTGGCCCTCACCTCTTTT- 3'	Promotor GRE2 (301 pb), sitios loxP
LucSeqRev	5' –GGTGATGTCCACCTCAATG- 3'	LucCP+ (150 pb)
LucCP-BglII	5' –CCGGAGATCTAAAACGACGGCCAGTGAG - 3'	LucCP+
LucCP-Sall+ARE	5' –GGCCGTCGACTTATCATGTCTGCTCGAAGCG -3'	LucCP+
LucCP-Sall-ARE	5' –GGCCGTCGACGCCCTAGACGTTGATCCTG- 3'	LucCP+
LucCPnew BglII	5' –CCGGAGATCTGCATTCCGGTACTGTTGG-3'	LucCP+
LucCPnewSall	5' –CCGGGTCGACGCATTCCGGTACTGTTGG-3'	LucCP+
GRE2-luc-KAN1	5'- TACGATTTTCAAACAAACAGATAGCAGTATCACACGCCCGTAAATCC ATGGCCGATGCTAAGAAC- 3'	LucCP+-Kan
GRE2-luc-KAN2	5'– TAATAACGTTAATATATATAAATATTATCTATTTTCATTTAAAGTGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG- 3'	LucCP+- Kan