

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## Optimización de la detección de daños oxidativos en la célula viva y en tiempo real.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Carolina Bets Plasencia

DIRECTOR/A: Amparo Pascual-Ahuir Giner y Markus Hans Proft

*Curso Académico: 2013-2014*

Valencia, Septiembre de 2014





## Datos Personales

**Nombre y apellidos:** Carolina Bets Plasencia

## Datos del trabajo de final de grado

**Título del TFG:** Optimización de la detección de daños oxidativos en la célula viva y en tiempo real.

**Lugar de realización:** Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia.

**Localidad y fecha:** Valencia, Septiembre de 2014.

**Tipo de Licencia:** Creative Commons: "Reconocimiento No Comercial-Sin Obra Derivada"

**Tutor Académico:** Dña. Amparo Pascual-Ahuir Giner.

**Cotutor:** D. Markus Hans Proft.

## Resumen

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un modelo muy importante para comprender los mecanismos moleculares de la defensa a diferentes tipos de estrés. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es uno de los estreses fundamentales para todas las células. El aumento de ROS puede producirse por agentes externos (como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona) o por la propia célula (por ejemplo, durante la respiración). Ante estas situaciones de estrés, las células de levadura modifican su capacidad transcripcional para adaptarse a las condiciones ambientales y sobrevivir. Esta adaptación, se produce gracias al reconocimiento del estrés por parte de los factores de transcripción, encargados de generar una respuesta transcripcional mediante el reconocimiento y la unión específica a sitios reguladores en *cis* y el favorecimiento del acceso del complejo de pre-iniciación de la transcripción a los promotores. Para poder estudiar como factores de transcripción específicos contribuyen al perfil de respuesta transcripcional es necesario un sistema que permita cuantificar la modulación de la expresión génica por estrés en tiempo real y en células vivas.

Para ello, en el presente trabajo se emplea un sistema de luciferasa desestabilizada (lucCP<sup>+</sup>) como herramienta para detectar y cuantificar los daños oxidativos producidos por varios tratamientos en levadura. Para ello, se aplican dos tipos de reporteros con el gen lucCP<sup>+</sup> cuya expresión está regulada por los dos principales factores de transcripción que actúan en respuesta a estrés oxidativo: Yap1 y Skn7. Posteriormente, se compara de forma cuantitativa las respuestas dependiendo de la dosis de los dos reporteros en varias condiciones de estrés oxidativo externo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; menadiona), así como también se determinan las sensibilidades de ambos reporteros a los distintos tipos de oxidación intracelular.

Por otro lado, también se emplea el sistema luciferasa desestabilizada para estudiar la dinámica transcripcional en respuesta a estrés salino y osmótico de los promotores *GRE2* y *SOD2* en diferentes medios de cultivo. Es decir, se ha investigado sobre la manera en la que el metabolismo fermentativo y respiratorio influyen en la respuesta a nivel transcripcional a

diversos estreses tanto salino como oxidativo. Para ello, se han empleado medios que emplean glucosa como fuente de energía (medio completamente fermentativo) y medios que emplean galactosa como fuente de energía (medio parcialmente respiratorio). Estos ensayos se han complementado con un ensayo de crecimiento en medio líquido, que permite evaluar la sensibilidad de las células de levadura a medio con glucosa y con galactosa. Como resultado de estos ensayos se confirmó que cuando las células crecen en medio con galactosa responden a estrés salino de forma mucho más sensible (la saturación de la respuesta es más rápida a bajas concentraciones de sal), también se pudo deducir que el crecimiento es inhibido de forma más eficiente cuando las células se someten a estrés en medio con galactosa.

Por último, se midió la producción de glicerol, osmolito que juega un papel importante en la osmoadaptación, comparándose los resultados de la producción en medio con glucosa con la producción en medio con galactosa. Se confirmó que cuando las células de levadura crecen en medio con galactosa la cantidad de glicerol producida es significativamente menor en comparación con el medio de glucosa.

### **Palabras clave**

*Saccharomyces cerevisiae*, expresión génica, regulación transcripcional, ROS, Yap1, Skn7, luciferasa, estrés oxidativo, estrés osmótico, glucosa, galactosa, fermentación, respiración y glicerol.

## **Abstract**

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is an important model to understand the molecular mechanisms of the defense to different types of stress. Production of reactive oxygen species (ROS) is one of the fundamental stresses for all cells. The increase of ROS can be produced by external agents (like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and menadione) or by the cell itself (for example, during cellular respiration). In these situations of stress, yeast cells modify their transcriptional capacity to adapt to environmental conditions and survive. This adaptation occurs via stress-induced activation of transcription factors, which recognize and bind specific regulatory sites in *cis* and facilitate the access of the transcriptional pre-initiation complex to the promoters. To study how specific transcription factors contribute to the transcriptional response profile, a system is needed to quantify the modulation of gene expression by stress in real time and in living cells.

Thus, in the present work a destabilized luciferase system (lucCP<sup>+</sup>) is used as a tool to detect and quantify oxidative damage produced by various treatments in yeast. Specifically we apply two types of reporters with the gene lucCP<sup>+</sup> whose expression is regulated by the two key transcription factors that act in response to oxidative stress: Yap1 and Skn7. Subsequently, the dose dependent responses obtained for the two reporters are compared in a quantitative manner in various conditions of external stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; menadione) and the sensitivity is determined for both reporters.

On the other hand, the destabilized luciferase system is also used to study the dynamic transcriptional response to salt and osmotic stress of the *GRE2* and *SOD2* promoters in different culture media. Specifically, the way the fermentative or respiratory metabolism influence in the transcriptional response to diverse saline and oxidative stresses has been investigated. Therefore, growth media with glucose (fully fermentative medium) or galactose (partially respiratory medium) as an energy source were used to quantify the differences in the dynamic dose response to stress with various stress-responsive luciferase reporters. These assays have been supplemented with growth assays in liquid medium, which allows evaluating the sensitivity of yeast cells to salt stress comparing glucose and galactose medium. As a result it was confirmed that galactose growth renders the transcriptional response to salt stress more sensitive (faster saturation of the response at lower salt concentrations), and that yeast growth is more efficiently inhibited by salt stress in galactose medium.

Finally, the glycerol production upon salt stress was compared in yeast cells grown in glucose or galactose. Glycerol is one of the most important osmolytes in the osmoadaptation process of yeast cells. It was confirmed that yeast cells grown on galactose medium produce significantly less amounts of glycerol as compared to glucose medium.

## **Key words**

*Saccharomyces cerevisiae*, gene expression, transcriptional regulation, ROS, Yap1, Skn7, luciferase, oxidative stress, osmotic stress, glucose, galactose, fermentation, respiration and glycerol.

## AGRADECIMIENTOS

Ha llegado el momento de dar las gracias a las personas que han formado parte de esta aventura durante los últimos cuatro años, así como a aquellas personas que de una forma u otra han hecho que este trabajo fuera posible.

En primer lugar, agradecer a mis tutores Markus y Payo por la oportunidad que me dieron de realizar el TFG en su laboratorio. Gracias también por los conocimientos y las ganas que me habéis ido transmitiendo día a día, por vuestra paciencia, vuestra dedicación y vuestros ánimos y sobre todo, gracias por confiar en mí desde el primer día y ayudarme a hacer este proyecto posible.

También quiero darles las gracias a mis compañeras del laboratorio: Elena, Sara, Alba, Sandra, Isa y Evy. Gracias por echarme una mano en el trabajo siempre que hizo falta. Gracias por haber hecho que los días de laboratorio fueran más amenos y divertidos y por haber conseguido que me sintiera muy agusto allí desde el primer día.

Por otra parte, quiero darles las gracias a mis *biotecs*: David, Jose H., Laura R, Miriam, Olga, Jose A., Pablo, Sario, Silvia y Laura G, ya que sin ellos estos cuatro años no hubieran sido lo mismo. Gracias a ellos he reído, he llorado, me he divertido, he aprendido... ellos han sido lo que han hecho que estos cuatro años fueran increíbles. Gracias por haberme aguantado todo este tiempo y por todos los momentos que he vivido con vosotros.

También agradecer a mis amigas de toda la vida, porque sé que durante estos cuatro años han tenido que aguantar mis largas ausencias, pero aún así siempre han seguido ahí apoyándome en todo momento. Amparo, Marta, Carmen, Laura, Virginia, Paula, Anna, Leyre e Irene. Sois las mejores.

También quiero darle las gracias a una de las personas más importantes durante estos años de carrera. Gracias César por animarme cuando más lo necesitaba, por hacerme reír día tras días, por confiar y creer en mí, por apoyarme. Gracias por ser tú.

Por último, pero no menos importante, agradecer a mis padres y a mi hermana todo lo que me han apoyado y aguantado estos cuatro años. Ellos han sido los pilares fundamentales durante todo este tiempo, los que no han dejado de confiar ni creer en mí ni un solo minuto, los que siempre han estado a mi lado haciéndome todo más fácil, los que han aguantado mis agobios, mis lloros... Gracias por darme la oportunidad de estar haciendo lo que me gusta y sobre todo gracias por educarme y enseñarme a ser persona. Gracias.

# ***Índice general***

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Regulación de la transcripción en eucariotas .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Respuesta a estrés y regulación de la expresión génica         en levaduras .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Mecanismos de regulación de la transcripción en respuesta a estrés oxidativo .....	4
1.2.2. Mecanismos de regulación de la transcripción en respuesta a estrés osmótico .....	5
<b>1.3. Sistema luciferasa .....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y condiciones de cultivo ...</b>	<b>10</b>
<b>3.2. Construcciones de plásmidos empleadas .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Técnica de transformación empleada: Transformación de         <i>S. cerevisiae</i> por el método del acetato de litio.....</b>	<b>11</b>
<b>3.4. Medida de la actividad luciferasa en tiempo real y en células         vivas de levadura .....</b>	<b>12</b>
3.4.1. Análisis de los datos obtenidos mediante los ensayos de actividad luciferasa: cálculo de $A_{\text{max}} \text{ corregida}$ y $EC_{50}$ .....	12
<b>3.5. Ensayos de crecimiento continuo en medio líquido .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6. Medida de la producción de glicerol en células vivas         de levadura en diferentes condiciones .....</b>	<b>13</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Análisis comparativo de Yap1 y Skn7 frente a diferentes         estreses oxidativos .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Análisis comparativo de la dinámica transcripcional en         respuesta a estrés salino y oxidativo en diferentes medios         de cultivo .....</b>	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>34</b>

# ***Índice de figuras***

<b>Figura 1.</b> Ruta de señalización HOG en levadura ( <i>Saito y Posas, 2012</i> ).....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Modelo de la represión/activación del complejo Sko1-Cyc8-Tup1 desencadenado por la MAPK Hog1 ( <i>Proft y Struhl, 2002</i> ).....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema del gen reportero luciferasa (lucCP <sup>+</sup> ) desestabilizado ( <i>Fan et al, 1997</i> ).....	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Perfiles dosis-respuesta para las construcciones 3xAP1-lucCP <sup>+</sup> (A) y 6xSkn7-lucCP <sup>+</sup> (B) con agua oxigenada.....	<b>15-16</b>
<b>Figura 5.</b> Actividad máxima calculada para las construcciones 3xAP1-lucCP <sup>+</sup> y 6xSkn7-lucCP <sup>+</sup> bajo el efecto de agua oxigenada.....	<b>16</b>
<b>Figura 6.</b> Perfiles dosis-respuesta para las construcciones 3xAP1-lucCP <sup>+</sup> (A) y 6xSkn7-lucCP <sup>+</sup> (B) con menadiona.....	<b>17</b>
<b>Figura 7.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción 6xSkn7-lucCP <sup>+</sup> en (A) <i>wild type</i> , (B) en $\Delta$ <i>skn7</i> y (C) en $\Delta$ <i>yap1</i> con agua oxigenada.....	<b>18-19</b>
<b>Figura 8.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción 6xSkn7-lucCP <sup>+</sup> en (A) <i>wild type</i> , (B) en $\Delta$ <i>skn7</i> y (C) en $\Delta$ <i>yap1</i> con menadiona.....	<b>20-21</b>
<b>Figura 9.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción SOD2-lucCP <sup>+</sup> con agua oxigenada en medio con glucosa (A) y con galactosa (B).....	<b>22-23</b>
<b>Figura 10.</b> Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de agua oxigenada en medio con glucosa (A) y medio con galactosa (B), en la construcción SOD2-lucCP <sup>+</sup> .....	<b>23</b>
<b>Figura 11.</b> Actividad luciferasa de la construcción constitutiva GPD-lucCP <sup>+</sup> en medio SD y SGal.....	<b>24</b>
<b>Figura 12.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción SOD2-lucCP <sup>+</sup> con cloruro de sodio en medio con glucosa (A) y galactosa (B).....	<b>24-25</b>
<b>Figura 13.</b> Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de agua oxigenada en medio con glucosa y galactosa en la construcción SOD2-lucCP <sup>+</sup> .....	<b>25</b>
<b>Figura 14.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción GRE2-lucCP <sup>+</sup> con cloruro de sodio en medio con glucosa (A) y galactosa (B).....	<b>26</b>
<b>Figura 15.</b> Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de cloruro de sodio en medio con glucosa y galactosa en la construcción GRE2-lucCP <sup>+</sup> .....	<b>27</b>
<b>Figura 16.</b> Curvas de crecimiento para la cepa <i>wild type</i> en medio YPD e YPGal, para cada una de las condiciones de NaCl (0-1,2M).....	<b>28</b>
<b>Figura 17.</b> Perfiles de rendimiento absoluto de crecimiento de la cepa <i>wild type</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 18.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción SOD2-lucCP <sup>+</sup> con cloruro de potasio en medio con glucosa (A) y galactosa (B).....	<b>29</b>
<b>Figura 19.</b> Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de cloruro de potasio en medio con glucosa y con galactosa en la construcción SOD2-lucCP <sup>+</sup> .....	<b>30</b>

<b>Figura 20.</b> Perfiles dosis-respuesta para la construcción GRE2-lucCP <sup>+</sup> con cloruro de potasio en medio con glucosa (A) y galactosa (B).....	<b>30-31</b>
<b>Figura 21.</b> Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de cloruro de potasio en medio con glucosa y con galactosa en la construcción GRE2-lucCP <sup>+</sup> .....	<b>31</b>
<b>Figura 22.</b> Producción de glicerol de la cepa <i>wild type</i> en presencia de estrés salino en medio con YPD e YPGal.....	<b>32</b>

# ***Índice de tablas***

<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> empleadas en este trabajo.....	<b>10</b>
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos empleados en este trabajo.....	<b>11</b>
<b>Tabla 3.</b> Stándard fluorométrico necesario para el empleo del kit de glicerol.....	<b>14</b>
<b>Tabla 4.</b> Reacción <i>Máster Mix</i> necesaria para el empleo del kit de glicerol.....	<b>14</b>

# ***Abreviaturas***

**A<sub>control</sub>**: actividad luciferasa medida en las muestras sin estrés al mismo tiempo que una A<sub>max</sub>

**AD**: dominio activador presente en el dominio efector de un TF

**ADN**: ácido desoxirribonucleico

**A<sub>max</sub> corregida**: actividad luciferasa máxima corregida respecto a la OD del cultivo y el valor del control (A<sub>control</sub>)

**A<sub>max</sub>**: actividad luciferasa máxima para ciertas condiciones y promotor

**AP-1**: *activator protein 1 element*

**ARN**: ácido ribonucleico

**ARNm**: ARN mensajero

**ARN Pol II**: ARN polimerasa II

**ATP**: trifosfato de adenosina

**CRD**: *cysteine-rich-domain*

**DBD**: dominio de unión al ADN (*DNA Binding Domain*)

**DHAP**: dihidroxiacetonafofosfato

**DMSO**: dimetilsulfóxido

**EC<sub>50</sub>**: concentración media efectiva

**EDTA**: ácido etilendiaminotetraacético

**EtOH**: etanol

**Gdp**: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

**GFP**: *Green Fluorescence Protein*

**GFTs**: factores generales de la transcripción

**Gpp**: glicerol-3-fosfato fosfatasa

**h**: horas

**HCl**: cloruro de hidrógeno

**his**: histidina

**HIS3**: gen de *S.cerevisiae* que condifica para una enzima que participa en la biosíntesis de la histidina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrógeno

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

**KCl**: cloruro de potasio

**leu:** leucina

**lucCP<sup>+</sup>:** gen reportero de la luciferasa desestabilizada

**M:** molar

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

**met:** metionina

**min:** minutos

**MIP:** proteínas intrínsecas de membrana

**mL:** mililitros

**mM:** miliMolar

**NaCl:** cloruro de sodio

**NLS:** señal de localización nuclear

**nm:** nanómetros

**OD:** densidad óptica de los cultivos

**OD<sub>50%</sub>:** la mitad de la densidad óptica máxima que alcanzan los cultivos

**PEG:** polietilenglicol

**pH:** potencial de hidrógeno

**PIC:** complejo de pre-iniciación de la transcripción formado por la ARN polimerasa y los GFTs

**RD:** dominio represor presente en el dominio efector de un TF

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**rpm:** revoluciones por minuto

**SD:** *Synthetic Dextrose*

**SGal:** *Synthetic Galactose*

**STRE:** elemento de respuesta a estrés (*Stress Response Element*)

**t<sub>50%</sub>:** tiempo que tarda un cultivo en ciertas condiciones en alcanzar la OD<sub>50%</sub>

**TBP:** proteína de unión a la caja TATA (*TATA-binding protein*)

**TFs:** factores de transcripción

**Tris:** tris (hidroximetil) aminometano

**ura:** uracilo

**UV:** ultravioleta

**WT:** cepa silvestre (*Wild Type*)

**YPD:** *Yeast extract-Peptone-Dextrose*

**YPGal:** *Yeast extract-Peptone-Galactose*

**$\lambda_{em}$ :** longitud de onda de emisión

**$\lambda_{ex}$ :** longitud de onda de excitación

**$\mu$ l:** microlitros

**$\mu$ M:** micromolar

# ***1. Introducción***

### 1.1. Regulación de la transcripción en eucariotas.

La estructura del ADN consiste en una secuencia lineal de desoxirribonucleótidos y, es esta secuencia la que dicta los componentes que forman las proteínas, el producto final de la mayor parte de los genes (*Klug et al., 2006*).

El primer paso de la expresión génica en esta transferencia de información es la transcripción. La transcripción es el proceso mediante el cual la información contenida en la secuencia de ADN se transfiere a una secuencia complementaria de ARN. Una vez sintetizado, este ARN actúa de molécula mensajera que lleva la información codificada. De ahí su nombre, ARN mensajero. En eucariotas el ARN se sintetiza en el núcleo de las células. Una vez sintetizado, la mayor parte del ARN migra hacia el citoplasma, donde se produce la síntesis de proteínas (*Klug et al., 2006*).

La molécula encargada de la síntesis del ARN es la denominada ARN polimerasa. Los eucariotas presentan tres ARN polimerasas diferentes que catalizan la transcripción de genes nucleares (*Patikoglou y Burley, 1997*). La encargada de transcribir estos genes nucleares que codifican proteínas es la ARN polimerasa II (ARN Pol II) junto con la maquinaria de transcripción basal (*Casamassimi y Napoli, 2007*).

La actividad de la ARN Pol II está regulada por elementos del propio gen que actúan en *cis* (<<próximo a>> o <<al mismo lado que>>) y por algunos factores de actuación en *trans* (<<al otro lado de>>) que se unen al ADN de estos primeros elementos (*Klug et al., 2006*).

Los elementos de ADN que actúan en *cis* se encargan de regular la iniciación de la transcripción de la ARN Pol II.

La primera de estas secuencias, denominada núcleo del elemento promotor ("*core promoter*") determina el lugar donde la ARN Pol II se une al ADN y dónde empieza a copiar el ADN en ARN. Es el lugar donde se forma el complejo de preiniciación de la transcripción (PIC). Un ejemplo de núcleo del elemento promotor de actuación en *cis*, muy conservado en levadura es el denominado caja TATA (*Basehoar et al., 2004*), que se encuentra en muchos, pero no en todos los genes de células eucariotas aguas arriba ("*upstream*") del sitio de inicio de la transcripción en distancia variable. Es el sitio donde la ARN Pol II se une al molde de ADN y, típicamente la transcripción empieza aproximadamente a 25-30 pares de bases corriente abajo de ella, esta posición se denomina sitio de inicio de la transcripción (*Klug et al., 2006*).

Además de esta región, los eucariotas presentan elementos reguladores en *cis* también conocidos como *upstream promotor elements* que influyen en la eficiencia y en la tasa de transcripción de la ARN Pol II, cuando el proceso continúa a partir del núcleo del elemento promotor. Estas secuencias reguladoras pueden estar a cualquier lado del gen, a cierta distancia del mismo e incluso dentro de él. Son reguladoras en *cis* porque se encuentran adyacentes a los genes que regulan. Se encargan de interactuar con uno o varios factores de transcripción (reguladores en *trans*), pudiendo incrementar la eficiencia de la iniciación de la transcripción y activar el promotor o reprimirlo. Así pues, se encuentran sitios de unión para reguladores génicos positivos y negativos (*Klug et al., 2006*). El efecto de estos elementos sobre los niveles de expresión es independiente de su orientación, aunque sí depende de su número y posición (*Swamy et al, 2009; Hahn y Young, 2011*).

Así pues, en eucariotas la iniciación de la transcripción es controlada por estos elementos de ADN de actuación en *cis*, que en conjunto forman el promotor (*Klug et al., 2006*).

Complementando las extensas secuencias reguladoras que actúan en *cis* hay diversos factores que actúan en *trans*, cuya función es facilitar la unión de la ARN Pol II y, por lo tanto, la

iniciación de la transcripción. Hay dos categorías: los factores de transcripción generales (GFTs: TFIIA, -B, -D, -E, -F y -H), que son absolutamente necesarios para la transcripción mediada por la ARN Pol II, y los factores de transcripción específicos, que influyen en la eficiencia de la tasa de transcripción (Klug et al., 2006).

En cuanto a los factores de transcripción generales, estos son esenciales ya que sin ellos la ARN Pol II no puede unirse directamente a los promotores eucarióticos ni iniciar la transcripción sin su presencia. Estas moléculas se ensamblan en el promotor en un orden específico formando el complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC), que proporciona una plataforma para que la polimerasa reconozca el promotor y se una a él. Uno de ellos, el TFIID, se une a la caja TATA a través de una de sus subunidades, denominada TBP (proteína de unión a caja TATA) (Klug et al., 2006).

Además de los factores de transcripción generales, hay otros factores de transcripción (específicos) que se unen a los sitios reguladores y afectan a la tasa de transcripción. Estos factores pueden actuar como factores positivos para incrementar la transcripción (activadores) o como factores negativos (represores) para disminuir la transcripción (Klug et al., 2006). Su número y posición podría influenciar en los niveles de expresión (Swamy et al. 2009), así pues cuando hay varios de estos juntos se produce un control combinatorial de la transcripción (Hahn y Young, 2011).

Los factores de transcripción presentan una estructura modular que consta de múltiples e independientes dominios. Están formados por el dominio DBD, mediante el cual interactúan con el ADN (Bricmont et al. 1991; Tornow et al. 1993; Scott et al. 2000) y, por el dominio efector que puede incluir un dominio activador (AD) o represor (RD) e incluye también una secuencia de localización nuclear (NLS) y dominios reguladores (Hahn y Young, 2011).

La activación de la transcripción es uno de los mecanismos más importantes de control de la regulación génica y es el punto final de muchas vías de señalización, incluyendo el control del crecimiento celular y la respuesta a distintas condiciones ambientales o estrés metabólico. El estado fundamental de un promotor de levadura es estar inactivo, así pues la transcripción debe de promoverse con uno o más de un TFs (Struhl 1999).

La diana principal de los activadores o represores son los cofactores (coactivadores y correpresores) (Anders et al, 2001; Hahn y Young, 2011). Los coactivadores son grandes complejos proteicos (Hahn y Young, 2011) que juegan un papel esencial en la mediación y/o facilitación del efecto de la maquinaria de transcripción mediante la interacción directa con GFTs, activadores y/o la ARN Pol II o indirectamente a través de la modificación de la cromatina. Estas dos actividades cooperan para estimular la formación del PIC lo que provoca un incremento de la transcripción. Algunos de los coactivadores que han sido descubiertos en levadura son: Mediador, SAGA, NuA4 y TFIID (Hahn y Young, 2011).

Mediador es un complejo de 25 subunidades que funciona como un intermediario entre los reguladores de la transcripción y los factores de transcripción generales (Biddick and Young 2005; Bjorklund and Gustafsson 2005). El Mediador es reclutado a sitios activamente transcritos por factores específicos de la transcripción, permitiendo el reclutamiento de la ARN Pol II dependiente de activadores (Bjorklund y Gustafsson 2005; Malik and Roeder 2005). También estimula la transcripción basal, al menos en parte, debido a la estabilización del PIC y a la estimulación de TFDIIH. Puede tener un efecto positivo o negativo en la transcripción y parece interactuar cooperativamente con otros coactivadores (Bryant y Ptashne 2003; Liu et al. 2008).

El complejo co-activador TFIID está formado por TBP y 14 TFs (*Matangkasombut et al. 2004; Cler et al. 2009*), los cuales son diana de factores de transcripción activadores (*Hahn y Young, 2011*).

El coactivador SAGA modula la expresión de muchos genes inducibles que son generalmente diferentes de los genes regulados por TFIID. Algunos ensayos han sugerido que este coactivador participa en la regulación de un 10% de los genes de levadura, la mayoría con caja TATA, regulados por estrés y altamente inducibles (*T. I. Lee et al. 2000; Huisinga y Pugh 2004*). SAGA es diana de activadores específicos y ejerce su función mediante modificaciones covalentes de la cromatina (presenta actividad histona H3 y H2B acetil transferasa), reclutamiento de la TBP y contacto directo con esta (*Baker y Grant, 2007*). Además tiene un papel complejo en la regulación de la transcripción ya que puede actuar a la vez como co-represor y co-activador (*Xue-Franzen et al, 2010*). La subunidad mayor de SAGA (Tra1) interacciona con varios activadores, permitiendo así la activación mediada por este complejo (*Brown et al, 2001; Fishburn et al, 2005; Reeves y Hahn, 2005*). Además, Tra1 también está presente en el complejo co-activador NuA4, pudiendo tener también un papel importante en su reclutamiento (*Grant et al, 1998b; Allard et al, 1999*).

La transcripción puede ser modulada por diferentes mecanismos (*Hahn 1998; Keaveney y Struhl 1998*): reclutamiento de coactivadores y factores de transcripción a los promotores, cambios conformacionales en la maquinaria de la transcripción que conducen a un incremento de la actividad, modificación de la cromatina a través de remodeladores ATP-dependientes y mediante modificaciones posteriores a la formación del PIC.

Uno de los mecanismos mejor estudiados es la activación de la transcripción por reclutamiento (*Ptashne y Gann 2002*). Gracias a la unión de varios factores de transcripción activadores, se produce el reclutamiento de la maquinaria transcripcional al ADN, lo que provoca un aumento del número de coactivadores y GTFs unidos a regiones promotoras (*Hahn y Young, 2011*).

Otro aspecto importante durante la transcripción es la regulación de la ocupación y posicionamiento de los nucleosomas (*Hahn y Young, 2011*). Es por este motivo que antes del inicio de la transcripción es necesaria la remodelación de la cromatina de forma que las secuencias promotoras queden libres de histonas y sean accesibles a las proteínas que inician la transcripción (*Klug et al., 2006*). Esto se consigue mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina por parte de los TFs. No obstante, estos por sí solos no son capaces de iniciar la transcripción (*Ptashne y Gann, 2002; Green, 2005*).

Así pues, gracias a diferentes mecanismos se favorece el reclutamiento del PIC y con ello la iniciación de la transcripción, a pesar de ello se desconoce en gran medida como interaccionan los co-activadores y como convergen las distintas rutas de señalización para modular la transcripción (*Green, 2005; Hahn y Young, 2011*).

### **1.2. Respuesta a estrés y regulación de la expresión génica en levaduras.**

Los organismos están constantemente desafiados por una multitud de cambios en el medioambiente, incluyendo fluctuaciones en los niveles de nutrientes, desequilibrio osmótico, exposición a moléculas tóxicas, temperaturas subóptimas, etc. Mientras que los organismos móviles o multicelulares pueden alterar estas condiciones gracias a cambios en su localización o fisiología, los organismos unicelulares como las levaduras han de adaptarse al entorno cambiante (*Morano et al, 2012*), para ello se producen cambios rápidos en la expresión génica (regulada a distintos niveles, desde la traducción del mensajero sintetizado hasta el acceso de la maquinaria transcripcional a la cromatina) y en la transducción de señales que le permiten a la célula adaptarse y sobrevivir (*Martínez-Montañés et al., 2010; de Nadal et al., 2011*). Estos

cambios son rápidos y reversibles, lo que permite a las células modificar su capacidad transcripcional en pocos minutos, volviendo al estado inicial tras la adaptación (*Gasch et al, 2000; Causton et al, 2001; Yale y Bohnert, 2001*).

En este aspecto, *Saccharomyces cerevisiae* ha servido como un potente modelo para describir la adaptación transcripcional a estreses tanto a escala genómica como a escala génica y ha permitido comprender los mecanismos moleculares básicos que controlan la transcripción, conservados en organismos superiores en muchos casos (*Martínez-Montañes et al, 2010; de Nadal et al, 2011*). Así mismo, se han visto que son cientos los genes que están implicados en respuesta a estrés osmótico y oxidativo en levadura (*Martínez-Montañes et al, 2010*).

Algunos genes, los llamados genes de respuesta general a estrés, no son específicos de un estrés particular, sin embargo hay otros genes que sí son exclusivos y se activan por un tipo específico de estrés (*Gasch et al, 2000; Causton et al 2001*). La respuesta general a estrés está mediada por dos activadores, Msn2 y Msn4, los cuales se unen a STRE (*Martínez et al, 1996; Schmitt y Mc Ente, 1996*). Bajo condiciones normales ambos activadores están secuestrados en el citosol con ayuda de la ruta de señalización TOR, en el momento que se produce una condición de estrés, Msn2 y Msn4 son hiperfosforilados y relocalizados en el núcleo gracias a un proceso controlado por cAMP (*Gorner et al, 1998*).

### **1.2.1. Mecanismos de regulación de la transcripción en respuesta a estrés oxidativo.**

Uno de los cambios ambientales más estudiados en *Saccharomyces cerevisiae* es el estrés oxidativo causado por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (*Halliwel 2006*).

El oxígeno molecular es relativamente poco reactivo e inofensivo, pero este puede verse sometido a una reducción parcial para formar numerosas formas de ROS. ROS son agentes tóxicos que pueden dañar una amplia variedad de componentes celulares, provocando la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas, daño genético a través de la modificación de ADN, etc. Así pues, se dice que se ha producido un estrés oxidativo cuando ni los antioxidantes ni los mecanismos de supervivencia celular son capaces de hacerle frente a ROS o a los daños causados por ellos. Hay varias enfermedades, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, artritis y el envejecimiento entre otras que se ha demostrado estar implicadas en el daño oxidativo (*Morano et al, 2012*).

La generación de ROS surge de las agresiones ambientales y de las reacciones secundarias producidas por el metabolismo aeróbico normal. La respiración mitocondrial proporciona la principal fuente de ROS en las células eucariotas a través de la fosforilación oxidativa (*Murphy 2009*). Para generar ATP, los electrones son transportados a lo largo de varios complejos proteicos que constituyen la cadena de transporte electrónico hasta el último aceptor. Los electrones que se escapan de esta cadena electrónica pueden resultar en la reducción de oxígeno y en la generación de ROS en levaduras (*Morano et al, 2012*). La formación de ROS también puede estar causada por metales pesados o por varios agentes genotóxicos, incluyendo la radiación UV, y agentes alquilantes (*Ikner y Shiozaki, 2005*).

*S.cerevisiae* responde a estrés oxidativo mediante una serie de respuestas celulares que aseguran la supervivencia de la célula tras la exposición a estas especies. Los sistemas de defensa a ROS incluyen, la reducción de la tasa de producción y, la reparación de los daños causados por ellos. Muchas respuestas son específicas de ROS, pero también existen respuestas a estreses generales que se activan como respuesta ante diversas condiciones de estrés (*Morano et al, 2012*).

La respuesta a elevados niveles de ROS es un paso crucial para prevenir la muerte celular. Una característica clave en esta respuesta es la reprogramación transcripcional de la expresión génica para proporcionar los cambios necesarios en las proteínas para devolver a la célula a un estado redox adecuado (Morano *et al*, 2012). Por este motivo, el estrés oxidativo provoca una elevada respuesta transcripcional en levaduras (Morano *et al*, 2012).

Dos de los principales reguladores transcripcionales en levadura que conducen a la producción de proteínas antioxidantes son Yap1 y Skn7 (Morano *et al*, 2012). Aunque muchas de las respuestas están reguladas por ambos factores, se ha visto que Yap1 y Skn7 responden de manera diferente a estímulos oxidativos (Lee *et al*, 1999; Brombacher *et al*, 2006).

El gen *YAP1* en *Saccharomyces cerevisiae* codifica para dicha proteína (Yap1p) que contiene un dominio básico con una cremallera de leucina (b-ZIP) similar al encontrado en la familia de activadores transcripcionales de mamíferos c-Jun. Así pues, se aisló gracias a su capacidad para unirse a la misma secuencia del DNA que el factor de transcripción de mamíferos AP-1 (Jun/Fos) tanto *in vivo* como *in vitro* (Harshman *et al.*, 1998). Yap1 afecta directamente a la transcripción de al menos cuatro genes antioxidantes implicados en el estado de oxidación celular: *GSH1*, *TRX2*, *YCF1*, *GLR1*, etc. (Fernandes *et al.*, 1997)

Yap1 se encuentra normalmente en el citoplasma, pero en respuesta a estrés oxidativo se acumula en el núcleo (Kuge *et al*, 1997). Este contiene en la región C-terminal tres residuos conservados de cisteína formando el dominio CRD (cysteine-rich-domain), y se piensa que la oxidación de estas cisteínas actúa como sensor del estado redox. Así pues, CRD es necesario para mantener a Yap1 en el citoplasma en ausencia de estrés (Kuge *et al.*, 1997). A su vez, Yap1 también presenta una secuencia de exportación nuclear a través de la cual el factor de exportación Crm1 mantiene a Yap1 en el citoplasma en condiciones normales. Cuando se produce un estrés oxidativo, la interacción entre Crm1 y Yap1 es inhibida (por oxidación de las cisteínas CRD), lo que hace que Yap1 se localice en el núcleo (Delaunay *et al.*, 2000; Kuge *et al.*, 2001), donde se une al elemento de respuesta AP-1 (5'-TTACTAA-3'). Además, en presencia de peróxido de hidrógeno, se produce la formación de un puente disulfuro intramolecular en Yap1 por parte de la proteína Orp1 (Gpx3) que provoca la oxidación de Yap1, lo que provoca su acumulación nuclear y activación transcripcional (Delaunay *et al.*, 2000; Kuge *et al.*, 2001).

Por otra parte, Skn7 también funciona en respuesta a estrés oxidativo. Este está presente en el núcleo de manera constitutiva, es decir tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés (Desmond *et al.*, 2000) y se activa mediante fosforilación (He *et al*, 2009) permitiendo su unión a la secuencia consenso GGC(C/T) GGC (Tsuji *et al.*, 2004). Solo se ha demostrado que active dos genes sin colaboración de Yap1, por lo que en la mayoría de los casos actúan conjuntamente (Mulford y Fassler, 2011), no obstante, ambos pueden actuar tanto cooperativamente como negativamente.

### **1.2.2. Mecanismos de regulación de la transcripción en respuesta a estrés osmótico.**

Las levaduras han sido consideradas un excelente modelo para el estudio de mecanismos de respuesta a estrés salino, debido a que tanto los hongos como las plantas tienen no solo un sistema de transporte iónico similar, sino que también comparten mecanismos de detoxificación catiónica así como rutas de transducción de señales.

Cuando las células se ven expuestas a elevadas concentraciones de sal se produce lo que se conoce como estrés osmótico que causa un repentino cambio en la concentración de soluto en torno a la célula, causando un cambio en el movimiento del agua a través de la membrana celular. En condiciones de altas concentraciones de sales, el agua se extrae de las células a

través de ósmosis. Gracias a sensores, a la transducción de señales, etc. las células han sido capaces de detectar este tipo de estrés y generar los mecanismos de respuesta adecuados para hacerle frente.

El ejemplo más importante de respuesta a estrés osmótico es la regulada a través de la ruta de MAP quinasa denominada HOG (High Osmolarity Glycerol) (Saito y Posas, 2012) (Figura 1). A través de la cual, una vez activada por hiperfosforilación y transitoriamente traslocada al núcleo, la MAP quinasa terminal, Hog1, ejecuta un programa transcripcional específico para la adaptación de la célula (Martinez-Montañes et al, 2010; de Nadal et al, 2011). Hog1 activa la transcripción a través de varios factores de transcripción específicos (TFs; Sko1, Hot1, Smp1, Msn2 y Rtg3) los cuales entran en contacto y son fosforilados mediante la quinasa (Proft y Serrano, 1999; Rep et al, 1999; Alepuz et al, 2003; de Nadal et al, 2003; Vendrell et al, 2011; Ruiz-Roig et al, 2012).

Como se observa en la figura 1, Skn7 también está implicado junto con Sln1 en la respuesta a estrés osmótico y regula la expresión, entre otros, del gen de la tioredoxina TRX2. Este papel de Skn7 es independiente de Hog1 (Li et al., 1998).

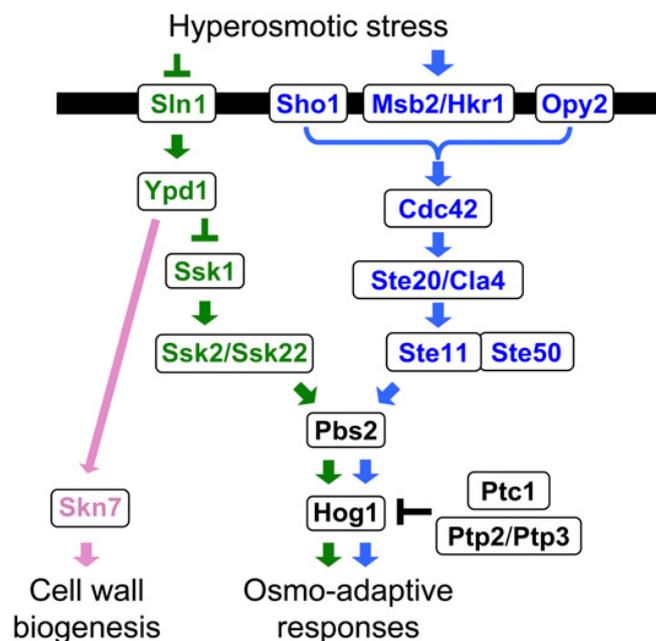


Figura 1. Ruta de señalización HOG en levadura (Saito y Posas, 2012). La parte superior de esta ruta comprende dos ramas Sln1 y Sho1. Ambas rutas convergen en una MAPKK común, Pbs2, que es el activador específico de la MAPK Hog1 (Brewster et al, 1993; Maeda et al, 1994). La rama Sln1 activa a las MAPKKKs Ssk2/Ssk22, las cuales activan Pbs2 (Maeda et al, 1995). Por otra parte, la rama de Sho1 activa a la MAPKKK Ste11, encargada de activar también a Pbs2 (Posas y Saito, 1997).

Entre los factores de transcripción específicos que activa Hog1, cabe destacar la función de Sko1. En condiciones normales Sko1 actúa como un represor transcripcional de diferentes genes inducidos por estrés osmótico como por ejemplo GRE2 (Proft et al, 2001), debido al reclutamiento del complejo represor Cyc8 (Ssn6)-Tup1 a los promotores diana. En cambio, en presencia de estrés osmótico Sko1 es fosforilado por Hog1 que se asocia al promotor, convirtiendo el complejo Cyc8-Tup1 en un activador transcripcional (Proft y Struhl, 2002; Saito y Posas, 2012), capaz de reclutar algunos coactivadores generales como la histona desacetilasa Rpd3, el coactivador SAGA, el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF y el Mediador (Proft y Struhl, 2002; de Nadal et al, 2004; Zapater et al, 2007). (Figura 2)

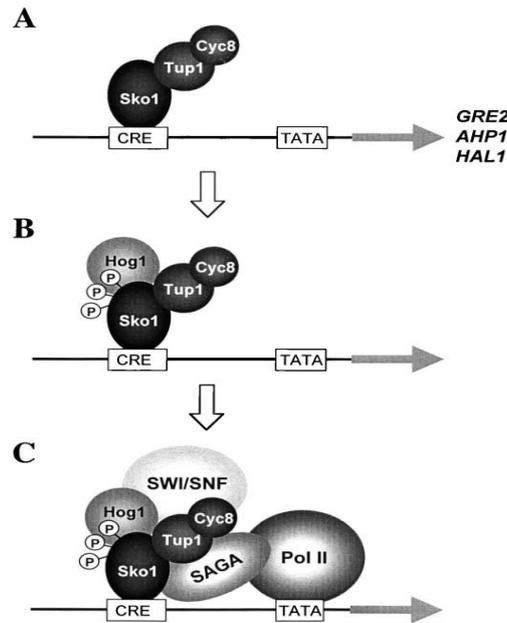


Figura 2. Modelo de represión/activación del complejo Sko1-Cyc8-Tup1 desencadenado por la MAPK Hog1. (A) Represión activa de la unión de Sko1 al promotor en condiciones normales. Sko1 se une a la secuencia reguladora CRE y recluta al correpresor Cyc8-Tup1, el cual inhibe la formación del complejo de preiniciación y constitutivamente detiene la transcripción. (B) Bajo condiciones de estrés, la quinasa Hog1 es transitoriamente translocada al núcleo, tras lo cual fosforila a Sko1. Esta fosforilación es un prerequisite para el posterior reclutamiento de los complejos remodeladores de la cromatina. (C) Activación completa del promotor, debido al reclutamiento por parte del complejo Cyc8-Tup1-Hog1 del complejo SWI/SNF y SAGA los cuales promueven la unión de la RNA Pol II y la activación de la transcripción (Proft y Struhl, 2002).

Como se ha visto, la activación de Hog1 en respuesta a estrés osmótico provoca la activación de un programa de adaptación celular. Esta adaptación incluye cambios en la acumulación de glicerol (Albertyn *et al*, 1994) y un restablecimiento del balance iónico (Proft and Struhl, 2004). El aumento de osmolaridad da lugar a la pérdida de agua, la disminución del tamaño celular y una detención temporal del crecimiento hasta que se produce la adaptación. Una de las principales estrategias para sobrevivir en estas condiciones de alta osmolaridad es producir y acumular osmolitos compatibles, como el glicerol, para mantener el equilibrio de agua y restablecer el volumen y la turgencia de las células (Blomberg y Adler 1989; Hohmann *et al*. 2007; Westfall *et al*. 2008; de Nadal *et al*. 2011). Aunque hay un elevado número de osmolitos compatibles como la trehalosa, aminoácidos y iones que contribuyen a la adaptación, el glicerol parece ser el osmolito más importante para el crecimiento de *S.cerevisiae* en presencia de estrés osmótico (Hohmann *et al*. 2007). Así pues, la acumulación intracelular de glicerol es una respuesta esencial para asegurar la supervivencia bajo condiciones osmóticas y, es la MAP quinasa Hog1 la responsable principal de esta acumulación (Albertyn *et al*. 1994).

La expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de glicerol actúan en respuesta a la activación de Hog1. El glicerol se genera en dos pasos a partir del intermediario glicolítico dihidroxiacetonafofosfato (DHAP). Estos dos pasos son catalizados por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gdp) y por la glicerol-3-fosfato fosfatasa (Gpp) (Hohmann, 2002). Para ambas enzimas *S.cerevisiae* posee dos isoformas diferentes codificadas por los genes *GPD1* y *GPD2* (Larsson *et al*, 1993; Albertyn *et al*, 1994; Eriksson *et al*, 1995; Ansell *et al*, 1997) y *GPP1* y *GPP2* (Hirayama *et al*, 1995; Norbeck *et al*, 1996; Pahlman *et al*, 2001). Cuando la célula detecta el estrés, el glicerol es rápidamente acumulado, siendo la acumulación muy significativa (Klipp *et al*. 2005). Este incremento tan rápido en la cantidad de glicerol no puede ser atribuido a un incremento en la transcripción particular de genes sino que han de haber otros mecanismos que permitan esta respuesta. Principalmente hay dos mecanismos que permiten esta producción tan rápida de glicerol: cambios en el metabolismo del carbono y

cambios en el transporte de glicerol. En cuanto al ajuste metabólico, se ha visto que la actividad de la 6-fosfofructo-2-quinasa, Pfk2, la cual es la responsable de controlar los niveles de fructosa-2,6-bifosfato, un activador clave de la glicolisis, está regulada por la MAP quinasa Hog1 (*Dihazi et al, 2004*). Por lo tanto Hog1 podría controlar directamente el flujo metabólico en respuesta a estrés. Por otra parte, se ha visto que Fps1, perteneciente a la familia MIP de proteínas y encargado de regular los niveles de glicerol intra y extracelulares, se abre en condiciones de estrés osmótico y en condiciones normales permanece cerrado (*Hohman et al, 2007*). Así pues, se estima que en cuestión de pocos minutos la célula en ausencia de estrés osmótico expulsa gran parte del glicerol, mediante este canal (*Luyten et al, 1995; Toh et al, 2001; Karlgren et al, 2005*). Por lo que una vez pasa el estrés osmótico, gran parte del glicerol que servía de osmoregulador es expulsado de la célula.

### 1.3. Sistema luciferasa.

La transcripción tradicionalmente se mide mediante la determinación directa o indirecta de la cantidad de ARNm de un gen de interés, o mediante la detección de un reportero de actividad enzimática cuya expresión está controlada por el promotor de interés. Sin embargo, estos modelos provocan un trastorno en la célula y son un proceso muy lento como para poder estudiar correctamente la dinámica de expresión génica (*Rienzo et al, 2012*). La introducción de reporteros fluorescentes, como GFP, permitió visualizar instantáneamente la actividad transcripcional sin necesidad de alterar la integridad celular (*Cormack, 1998*). Sin embargo, los reporteros fluorescentes necesitan ser excitados por una fuente de luz externa, lo cual sí que interfiere en la cuantificación de la expresión génica. Es por este motivo por el que el análisis mediante reportero requiere el uso de una versión desestabilizada del marcador fluorescente (*Mateus y Avery, 2000*). A diferencia de estos, la luciferasa de luciérnaga es un sistema de reportero muy versátil, el cual ha sido adaptado a estudios de expresión génica en mamíferos, insectos, plantas y hongos filamentosos (*Miraglia et al, 2011*). La luz emitida debido a la oxidación de su sustrato luciferina es una medida inmediata y muy sensible de la actividad enzimática sin necesidad de ningún tipo de excitación externa.

En levaduras, existen versiones desestabilizadas con una vida media de 20-30 minutos que han sido adaptadas para investigar la expresión en levadura (*Robertson et al, 2008; Robertson y Johnson, 2011*).

El gen reportero luciferasa ( $lucCP^+$ ), aquí empleado, contiene dos secuencias de degradación de proteínas, CL1 y PEST que se encuentran en la región del gen reportero que se traduce. Además de esta región, el gen reportero contiene en el 3' la secuencia ARE que promueve la degradación del ARNm (*Fan et al, 1997*) (Figura 3).



Figura 3. Esquema del gen reportero luciferasa ( $lucCP^+$ ) desestabilizado (*Fan et al, 1997*).

Así pues gracias a la fusión de este reportero con el promotor de interés se puede monitorizar la actividad transcripcional de dicho promotor a tiempo real en una célula viva (*Rienzo et al, 2012*). Este ensayo es de gran utilidad para determinar parámetros cinéticos como el ratio de síntesis, la duración de la actividad de la expresión génica, la máxima actividad, la fase de latencia, etc. y la manera en la que los cambios ambientales modulan estos parámetros, todo ello en células vivas y en pequeños volúmenes de cultivo (*Rienzo et al, 2012*).

## **2. *Objetivos***

Los objetivos generales de este trabajo son los siguientes:

- Caracterizar de forma cuantitativa la regulación transcripcional activada por Skn7 y Yap1 frente a diferentes estreses oxidativos.
- Comparar la dinámica transcripcional en respuesta a estrés salino y oxidativo de los promotores *GRE2* y *SOD2* en diferentes medios de cultivo.
- Comparar la eficiencia de crecimiento y la producción de glicerol en respuesta a estrés salino en diferentes medios de cultivo.

# ***3. Materiales y métodos***

### 3.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y condiciones de cultivo.

Las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo	Procedencia	Construcciones introducidas
<b>BY4741 (WT)</b>	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF	GRE2-lucCP <sup>+</sup> , CTT1-lucCP <sup>+</sup> , SOD2-lucCP <sup>+</sup> , CCP1-lucCP <sup>+</sup> , pAG413CYC1Δ-3x AP1-lucCP <sup>+</sup> , pAG413CYC1Δ-6x Skn7-lucCP <sup>+</sup> ; pAG413GPD-lucCP <sup>+</sup>
<b><i>Δyap1</i></b>	BY4741 <i>yap1::KAN</i>	EUROSCARF	pAG413CYC1Δ-6x Skn7-lucCP <sup>+</sup>
<b><i>Δskn7</i></b>	BY4741 <i>skn7::KAN</i>	EUROSCARF	pAG413CYC1Δ-6x Skn7-lucCP <sup>+</sup>

Los medios de cultivo empleados para crecer los cultivos de levadura fueron:

- El medio **YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose)** se preparó disolviendo en agua miliQ un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa, esto para producir medio YPD líquido, en el caso de querer medio YPD sólido, se añadió también 2% de agar. Para preparar YPGal se emplearon los mismos componentes pero en lugar de 2% de glucosa se añadió 2% de galactosa. Ambas disoluciones se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- El medio **SD (Synthetic Dextrose)** se preparó disolviendo en agua miliQ 0.67% de Yeast Nitrógeno Base sin aminoácidos y con sulfato de amonio y un 2% de glucosa, esto para producir medio SD líquido, en el caso de querer medio SD sólido, se añadió un 2% de agar. Para preparar SGal se emplearon los mismos componentes pero en lugar de 2% de glucosa se añadió 2% de galactosa. Ambas disoluciones se esterilizaron en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente se ajustó el pH del medio con 50mM de ácido succínico a pH 5.5 (pH ajustado con Tris). Además, se suplementó el medio con uracilo y los aminoácidos requeridos, en este caso con leucina y metionina desde diluciones al 100X (2.5g/l, 10g/l y 10g/l respectivamente) esterilizadas por filtración.

### 3.2. Construcciones de plásmidos empleadas.

Las construcciones plasmídicas empleadas en este trabajo, se recogen en la siguiente tabla:

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo.

Nombre de la construcción	Características
<b>pAG413CYC1Δ-lucCP+</b>	Plásmido de levadura centromérico AmpR HIS3 con el promotor troncal <i>CYC1</i> fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada ( <i>Rienzo et al, 2012</i> ).
<b>pAG413-GRE2-lucCP+</b>	Plásmido de levadura centromérico AmpR con el promotor del gen <i>GRE2</i> fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada ( <i>Rienzo et al, 2012</i> ).
<b>pAG413-CTT1-lucCP+</b>	Plásmido de levadura centromérico AmpR HIS3 con el promotor del gen <i>CTT1</i> fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada ( <i>Dolz et al, 2013</i> ).
<b>pAG413-SOD2-lucCP+</b>	Plásmido de levadura centromérico AmpR HIS3 con el promotor del gen <i>SOD2</i> fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada ( <i>Dolz et al, 2013</i> ).
<b>pAG413-CCP1-lucCP+</b>	Plásmido de levadura centromérico AmpR HIS3 con el promotor del gen <i>CCP1</i> fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada ( <i>Dolz et al, 2013</i> ).
<b>3xAP1-lucCP+</b>	Inserción del oligo 3XAP1 en el plásmido pAG413CYC1Δ-lucCP <sup>+</sup> .
<b>6xSkn7-lucCP+</b>	Inserción del oligo 6xSkn7 en el plásmido pAG413CYC1Δ-lucCP <sup>+</sup> .

### 3.3. Técnica de transformación empleada: Transformación de *S.cerevisiae* por el método del acetato de litio.

La transformación de *S.cerevisiae* con las construcciones plasmídicas obtenidas se realizó mediante el método del acetato de litio. Para ello, se crecieron las cepas de levadura a transformar en 50mL de YPD hasta una densidad óptica a la longitud de onda de 600nm de 0,7-1,2. Posteriormente, las células se precipitaron centrifugando los cultivos durante 3min a 3000rpm y se realizó un lavado con agua estéril, a continuación se volvieron a centrifugar las células en las mismas condiciones y se realizó un lavado con LiTE (0,1M acetato de litio en 1xTE (10 mM Tris/HCl pH 7,6, 1mM EDTA)) estéril. El precipitado obtenido tras los lavados se resuspendió en 0,5mL de LiTE estéril y se pasó a un tubo de 1,5mL, incubándose este a 30°C durante 15 minutos. De este modo se obtuvieron las células de levadura competentes.

Para transformar las células competentes se añadieron 2μl de la construcción a introducir (a una concentración de unos 0,1-10μg) a 60 μl de estas. A continuación, se adicionaron 300 μl de LiTE/40%PEG4000 preparado en fresco mezclando 9 volúmenes de una disolución de PEG4000 al 45% y 1 volumen de 10xLiTE (100mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM EDTA). Tras mezclarlo bien, las células se incubaron primero a 30°C durante 30 minutos y a continuación a 42°C durante 20 minutos de forma muy exacta, gracias a lo cual se produjo el shock térmico necesario para la introducción de la construcción. Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 13000rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado

con agua estéril. Las células se centrifugaron 1 minuto a 13000rpm, descartándose el sobrenadante y resuspendiendo las células en el líquido remanente. Finalmente, estas se sembraron en placas de medio mínimo SD+met+leu+ura entre 2 y 3 días a 28°C para la selección de los transformantes. La combinación de aminoácidos del medio dependerá del plásmido empleado o de si se trata de una doble transformación (cepa con dos plásmidos).

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

Para medir la actividad luciferasa en tiempo real y en células vivas de levadura se siguió el protocolo de *Rienzo et al* (2012). Se crecieron las cepas con las construcciones correspondientes durante toda la noche en agitación a 28°C en medio líquido SD/SGal hasta una densidad óptica a una longitud de onda de 600nm de 2-2.5. Después, el volumen de cultivo necesario para realizar el ensayo se incubó en agitación a 28°C con luciferina a una concentración final de 0.5mM (a partir de una solución a 10mM en DMSO) durante 90 minutos. El cultivo se distribuyó en alícuotas de 135µl en los pocillos de una placa blanca de 96 pocillos (*Nunc*). Previamente a la adición del cultivo, a estos pocillos se les había añadido el estrés deseado (NaCl, peróxido de hidrógeno, menadiona...) desde disoluciones a las concentraciones apropiadas para obtener las concentraciones finales indicadas. Cada condición fue analizada por triplicado. La emisión de luz se registró de forma continua (cada 2-4 minutos, según el experimento) empleando un luminómetro de microplacas *GloMax 96* (*Promega*). En estas representaciones, se omiten las barras de error con el fin de hacer que los gráficos sean más claro y facilitar su interpretación.

#### 3.4.1. Análisis de los datos obtenidos mediante los ensayos de actividad luciferasa: cálculo de $A_{\max \text{ corregida}}$ y $EC_{50}$ .

Para poder definir cuantitativamente la respuesta transcripcional detectada, se llevo a cabo el cálculo de varios parámetros a partir de los triplicados a cada tiempo y condición. Estos parámetros fueron calculados empleando el programa *Microsoft Excel* como se detalla a continuación.

$A_{\max}$ , actividad máxima de un promotor natural o artificial en una determinada condición, se define como el valor máximo de unidades de luz detectado para dicha condición. Para obtener los valores de  $A_{\max \text{ corregida}}$ , se normalizaron estos valores respecto al control, para ello se restó la media de las unidades de luz medias de los pocillos sin aplicar estrés al tiempo en el que se detecta la  $A_{\max}$  ( $A_{\text{control}}$ ), y respecto al número de células, dividiendo por la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm. No obstante, antes de normalizar los valores respecto al control se dividió cada  $A_{\max}$  por la máxima  $A_{\max}$  para llevarlo todo al 100%. En los casos en los que el valor obtenido para la  $A_{\max \text{ corregida}}$  fue negativo, se le asignó un valor de 0. Para la comparación de la actividad luciferasa entre varias construcciones se dividió el valor máximo de unidades de luz (de entre todos los valores obtenidos para todas las condiciones) a cada uno de los valores de unidades de luz y a su vez se normalizo respecto al número de células.

La  $EC_{50}$  o concentración media efectiva se corresponde con la concentración de estímulo (NaCl, menadiona, peróxido de hidrógeno...) necesaria para lograr la mitad de la activación transcripcional máxima. Para calcularla se representaron los valores de  $A_{\max \text{ corregida}}$  frente a la concentración de estrés a la que se dan estos y los puntos que seguían una tendencia lineal se ajustaron a una recta de regresión lineal (valores de  $r^2$  superiores a 0,95). A partir de la ecuación de dicha recta de regresión se calculó la concentración que induce la mitad de la actividad luciferasa máxima.

### 3.5. Ensayos de crecimiento continuo en medio líquido.

Un abordaje para comparar la sensibilidad de distintas cepas de *S.cerevisiae* frente a un determinado estrés es comparar las curvas de crecimiento en medio líquido de las mismas en presencia de este. Para ello se empleó la estación microbiológica *Bioscreen C* (*Thermo Labsystems*) que permite monitorizar el crecimiento de las mismas al medir de forma continua la densidad óptica del cultivo.

Para realizar el ensayo se prepararon por una parte los medios de cultivo (YPD e YPGal con NaCl al volumen necesario para lograr la concentración de sal deseada (0M, 0,6M, 0,8M, 1M y 1,2M) en 3mL) y por otra parte se inocularon precultivos de 3mL de YPD/YPGal de la cepa WT BY4741 y se crecieron durante toda la noche.

A continuación se mezclaron en tubos eppendorf 1500 $\mu$ l de cada medio de cultivo preparado anteriormente junto con 15 $\mu$ l del precultivo de la cepa WT BY4741. Seguidamente 340 $\mu$ l de cultivo se crecieron en los pocillos (cada condición por triplicado) de una placa de 100 pocillos transparentes, realizando medidas cada 30 minutos durante 72 horas. La densidad óptica se midió empleando un filtro de banda ancha (420-580nm) y manteniendo durante el ensayo la temperatura óptima para el crecimiento de las levaduras (28°C). Además, antes de realizar cada medida los cultivos se sometían a agitación a una amplitud máxima durante 30 segundos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa *Microsoft Excel*, calculando la media de los triplicados y representando la densidad óptica en función del tiempo para obtener las curvas de crecimiento. Posteriormente se normalizaron los datos restando la media de la densidad óptica a tiempo 0 de una condición a cada uno de los tiempos de dicha condición y así para todas las condiciones. A partir de estas representaciones se calculó el rendimiento absoluto de crecimiento, es decir en qué momento el cultivo llegaba a la mitad de la absorbancia máxima.

### 3.6. Medida de la producción de glicerol en células vivas de levadura en diferentes condiciones.

Para medir la producción de glicerol generado por la cepa WT BY4741 de *S.cerevisiae*, se empleó el *Glycerol Assay Kit* (*Sigma-Aldrich*) adecuado para la detección de glicerol en comidas, bebidas, formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas. Se trata de un kit que permite determinar la concentración de glicerol mediante un ensayo enzimático acoplado que implica a las enzimas glicerol quinasa y glicerol fosfato oxidasa, resultando en un producto colorimétrico (570nm)/fluorométrico ( $\lambda_{ex} = 535/\lambda_{em} = 587$ nm), proporcional a la cantidad de glicerol presente. El rango lineal de detección para este kit es de 10-1000 $\mu$ M (colorimétrico) y 2-50 $\mu$ M (fluorométrico).

Para realizar el ensayo se prepararon medios de cultivo de YPD y de YPGal y se inocularon con la cepa WT. Se crecieron las cepas durante toda la noche en agitación a 30°C y se seleccionaron aquellos medios que habían alcanzado una densidad óptica a una longitud de onda de 600nm de 0,8-1,5. A continuación, se tomaron tres muestras de 1000 $\mu$ l a tiempo 0 de cada cultivo (YPD, YPGal) y seguidamente se adicionó a cada cultivo NaCl a 0,8M y se incubaron a 30°C en agitación. Se volvieron a tomar tres muestras de 1000 $\mu$ l de cada cultivo a la hora, a las dos horas y a las cuatro horas.

Anteriormente a la toma de las muestras se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm de cada uno de los cultivos.

El tratamiento realizado para cada una de las muestras, fue el siguiente: las muestras se centrifugaron durante 3 minutos a 10000rpm, a continuación se eliminó el sobrenadante y se

resuspendieron las células en 1ml de aguamiliQ, seguidamente se hirvieron las muestras durante 10 minutos a 100°C, previamente a ello se agujereó la tapa para evitar que el eppendorf explotara. Se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 10000rpm y finalmente se tomaron 800µl del sobrenadante de cada una de las muestras y se congelaron a -20°C hasta su utilización.

A la hora de emplear el kit de glicerol, lo primero que se realizó fue la extracción de todos los reactivos almacenados a -20°C a temperatura ambiente, exceptuando el *Enzyme Mix* que debe permanecer en hielo hasta su uso. A continuación, se preparó el patrón de glicerol para la detección fluorométrica de la siguiente manera:

Tabla 3. Stándard fluorométrico necesario para el empleo del kit de glicerol.

Número	Glycerol Standard (100mM)	Agua	Concentración final de glicerol
1	50µl	950µl	0.05mM
2	30µl	970µl	0.03mM
3	15µl	985µl	0.015mM
4	0µl	1000µl	0Mm

Para la realización del ensayo se necesitó preparar también la reacción *Master Mix* formada por:

Tabla 4. Reacción *Máster Mix* necesaria para el empleo del kit de glicerol.

Reactivo	Volumen
Assay Buffer	3,2Ml
Enzyme Mix	64µl
ATP	32µl
Dye Reagent	32µl

A continuación, se transfirieron 10µl de cada muestra patrón y de cada una de las muestras que se habían almacenado a -20°C (diluidas 1:10 en aguamiliQ) a una placa negra de 96 pocillos (*Nunc*) junto con 100µl de la reacción *Master Mix*. La placa se dejó a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos antes de realizar el ensayo. La fluorescencia se registró empleando un luminómetro de microplacas *GloMax 96 (Promega)* a través del filtro *Green Optical Kit*, que presenta una excitación de 525nm y una emisión de 586-648nm.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa *Microsoft Excel*. Los datos se normalizaron restando el valor obtenido para el estándar de 0mM (blanco) a cada uno de los valores obtenidos. A continuación, se representó la fluorescencia frente a la concentración de glicerol (para los valores estándar) obteniendo así un curva patrón, la cual se ajustó a una recta de regresión lineal (valores de  $r^2$  superiores a 0,95). A partir de la ecuación de dicha recta de regresión se calculó la concentración de glicerol presente en cada muestra. Para poder comparar los valores obtenidos para YPD e YPGal se representó la concentración de glicerol frente al tiempo.

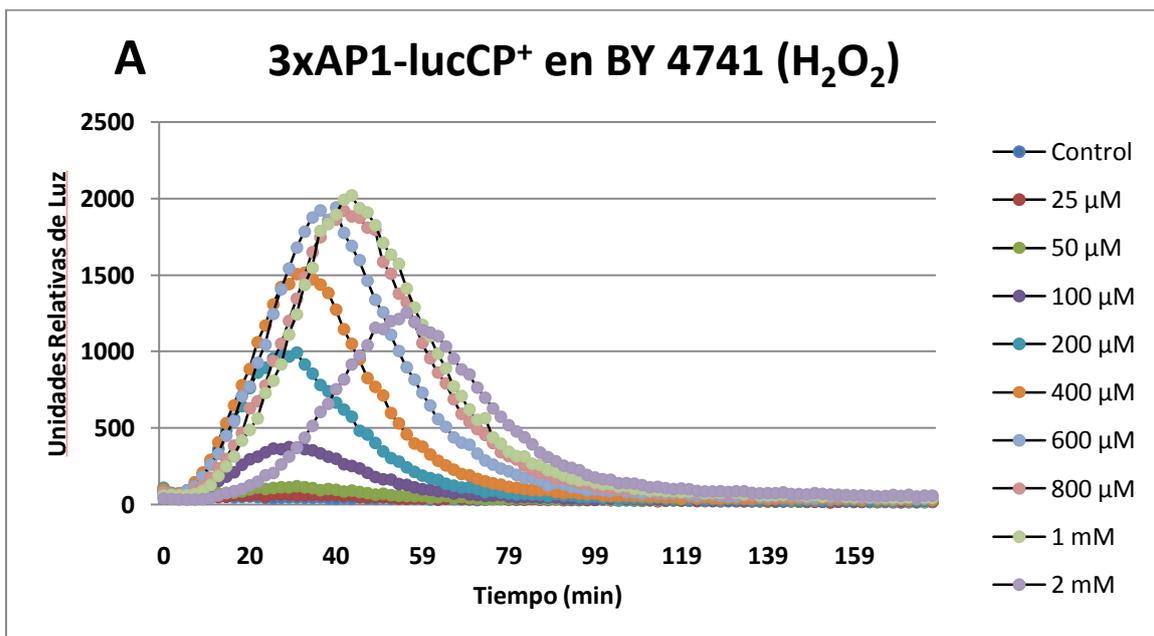
## ***4. Resultados y discusión***

#### 4.1. Análisis comparativo de Yap1 y Skn7 frente a diferentes estreses oxidativos.

Ante situaciones de estrés oxidativo, los factores de transcripción Yap1 y Skn7 se activan de forma transitoria generando una respuesta transcripcional que permite a la célula adaptarse a esta situación cambiante. Gracias a experimentos previos (Poveda, 2014) se sabe que las células de levaduras transformadas con el plásmido pAG413-CYC1Δ-3xAP1-lucCP<sup>+</sup> responden en gran medida a agua oxigenada y también, aunque de forma menor, a menadiona. Además, también se sabe que en estos casos el comportamiento depende completamente de Yap1.

A raíz de esto, surgió como uno de los objetivos de este trabajo caracterizar el comportamiento tanto del *wild type* como de los mutantes *yap1* y *skn7* pero esta vez transformados con la construcción plasmídica pAG413-CYC1Δ-6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (contiene múltiples inserciones del elemento consenso para el factor de transcripción Skn7 en el promotor troncal CYC1) ante diferentes condiciones de estrés oxidativo para así poder determinar el tipo de respuesta transcripcional que se produce en cada caso, así como establecer si en este caso la actividad depende de Skn7 o no. Para ello, se empleó un sistema luciferasa desestabilizada y se aplicó un amplio rango de estreses en cultivos de células de levadura vivas con el fin de obtener el comportamiento dosis-respuesta.

Lo primero que se realizó fue la comparación entre las cepas *wild type* BY4741 con la construcción pAG413-CYC1Δ-3xAP1-lucCP<sup>+</sup> y BY4741 con la construcción pAG413-CYC1Δ-6xSkn7-lucCP<sup>+</sup>, tratadas con agua oxigenada y menadiona (Figura 4 y 6).



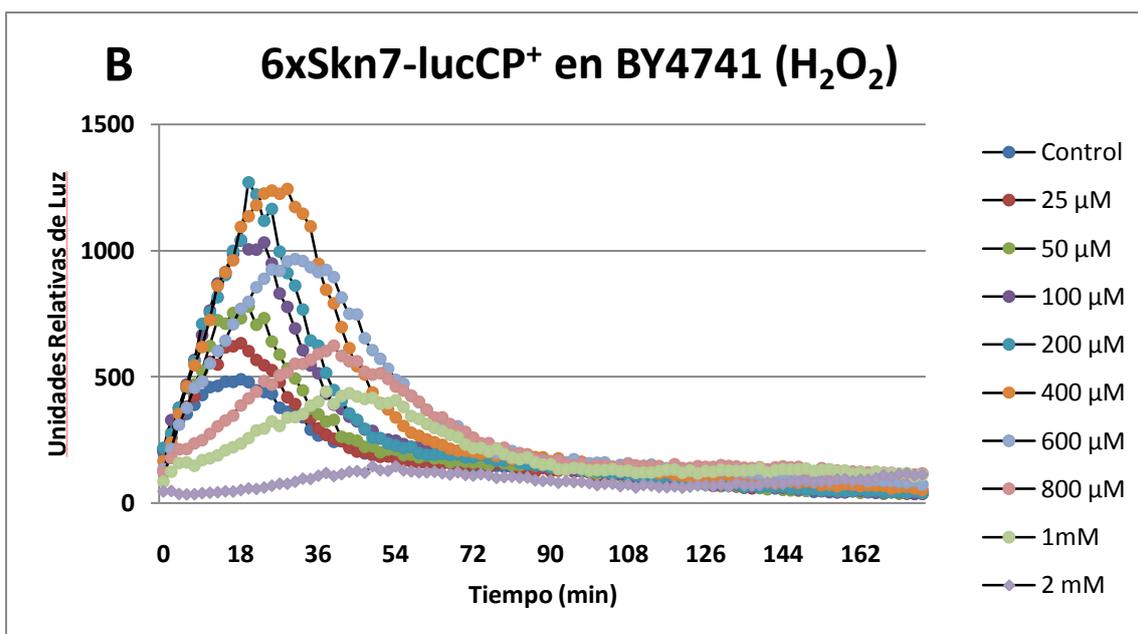


Figura 4. Perfiles dosis-respuesta para las construcciones 3xAP1-lucCP<sup>+</sup> (A) y 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (B) con agua oxigenada. Se utilizó un rango de concentraciones de agua oxigenada de 0-2mM para comparar la respuesta entre ambas construcciones. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

Se observa (Figura 4) como en ambos casos se produce una respuesta transitoria y dinámica frente a estrés oxidativo. En el caso de la construcción 3xAP1-lucCP<sup>+</sup> (Figura 4A) se observa como la respuesta transcripcional aumenta de manera progresiva hasta alcanzar su máximo a una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1mM y posteriormente vuelve a su estado inicial disminuyendo la actividad (a concentraciones iguales o superiores a 2mM) tras la adaptación. A pesar de que el comportamiento es similar, en el caso de la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (Figura 4B) la concentración necesaria para alcanzar la máxima respuesta transcripcional es menor (200μM), además el descenso de la respuesta génica es mucho más drástico ya que a una concentración de 2mM prácticamente ya no existe inducción. Todo ello, se puede observar mejor en la figura 5 en la que se ha representado para cada concentración de agua oxigenada la actividad máxima del promotor natural, pudiendo ver con claridad el valor máximo de unidades de luz detectado para cada condición.

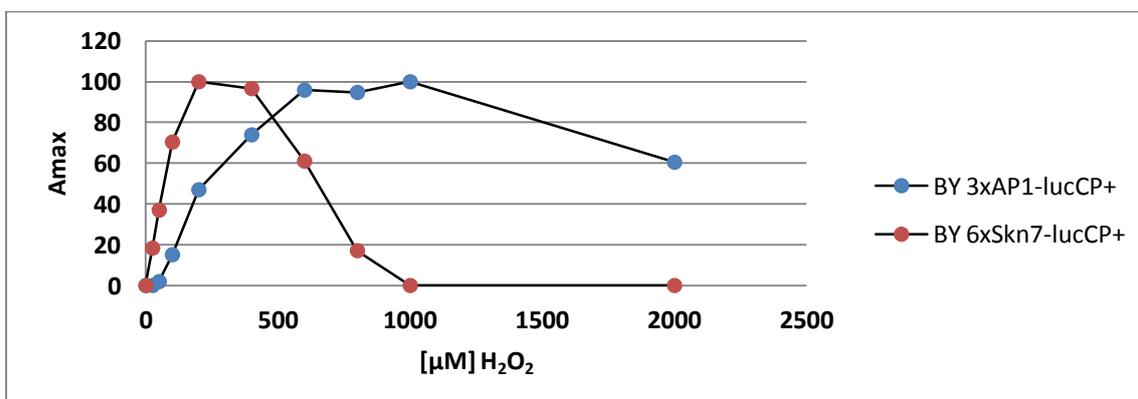


Figura 5. Actividad máxima calculada para las construcciones 3xAP1-lucCP<sup>+</sup> y 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> bajo el efecto de agua oxigenada.

A continuación, se aplicó menadiona como un inductor de la oxidación intracelular alternativo y se cuantificaron los cambios en la expresión génica que este causaba en las mismas construcciones (Figura 6).

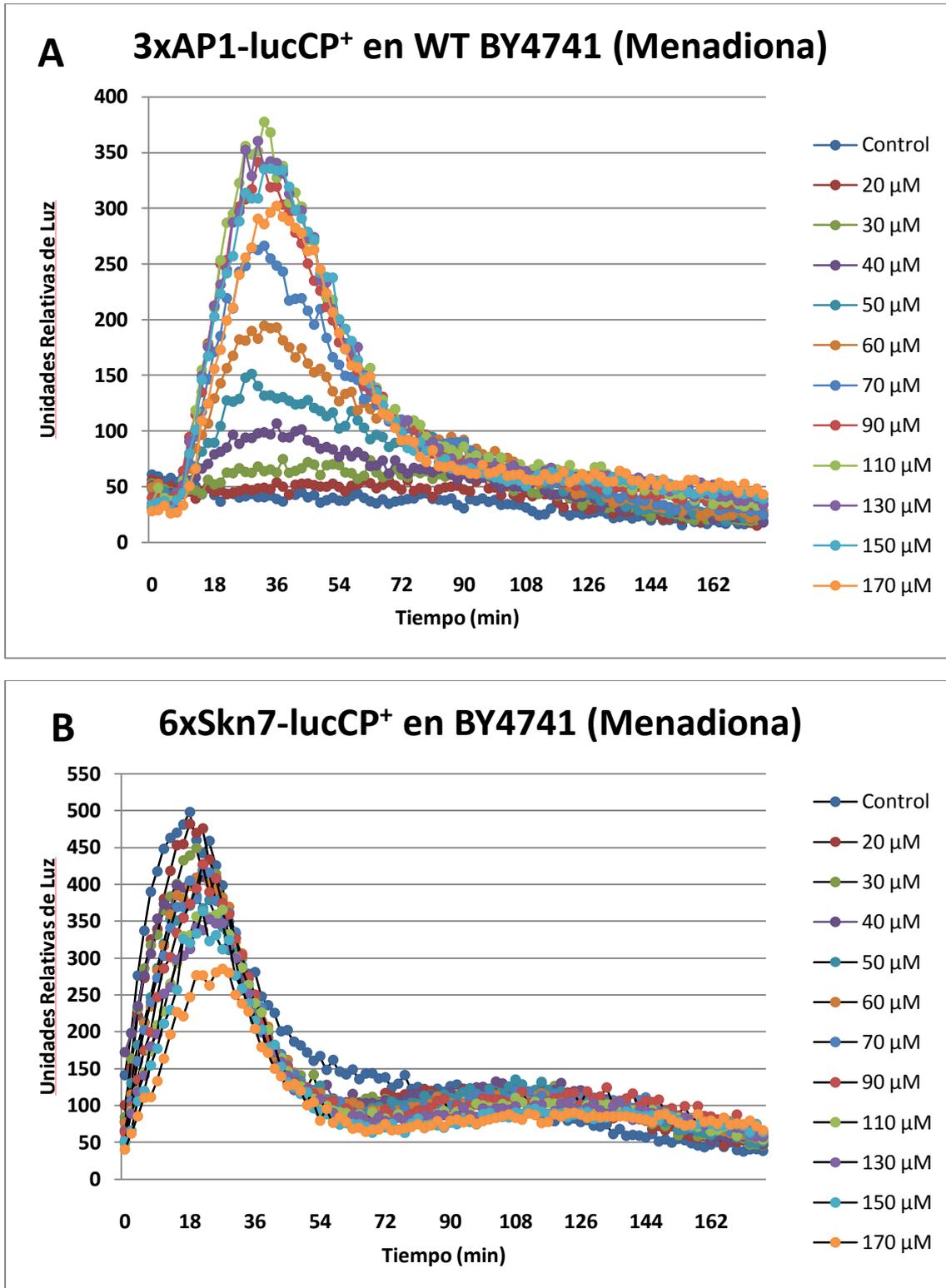
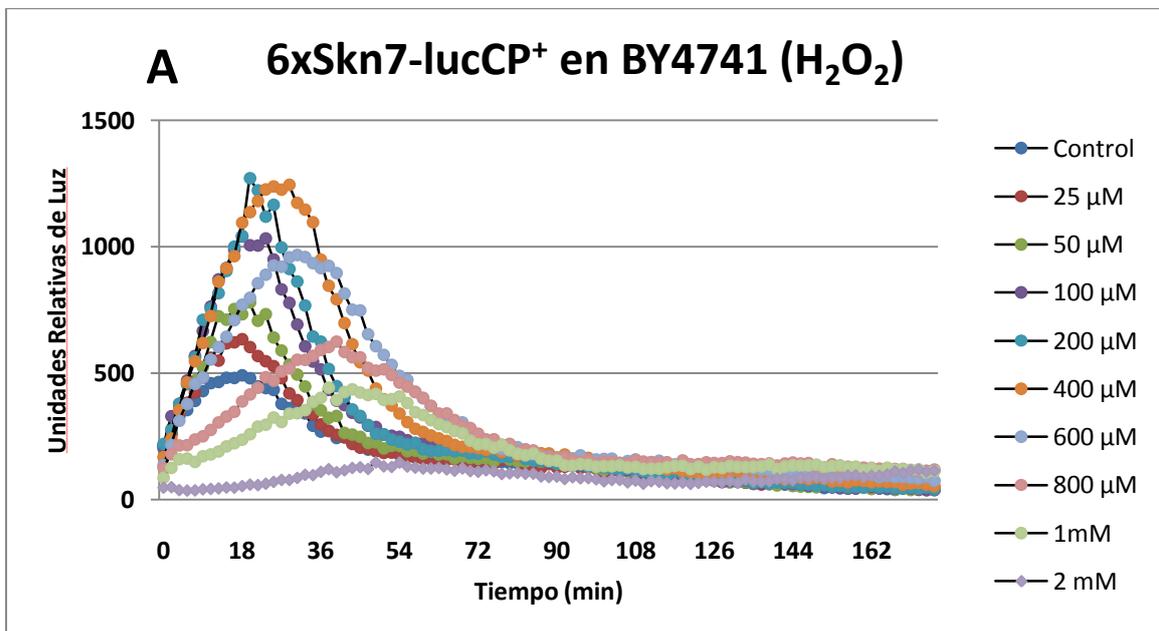


Figura 6. Perfiles dosis-respuesta para las construcciones 3xAP1-lucCP<sup>+</sup> (A) y 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (B) con menadiona. Se utilizó un rango de concentraciones de menadiona entre 0-170μM para comparar la respuesta entre ambas construcciones. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

En el caso de la construcción 3xAP1-lucCP<sup>+</sup> (Figura 6A) se observa inducción desde aproximadamente una concentración de 50µM hasta 130µM de menadiona, mostrando la máxima actividad a 110µM. En cambio, en la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (Figura 6B) la respuesta que se produce es inespecífica ya que para una concentración de 0µM de menadiona la respuesta transcripcional es máxima, lo que pone de manifiesto que a pesar de que en esta condición (control) las células únicamente hayan sido tratadas con el volumen equivalente del disolvente EtOH sin menadiona (EtOH a una concentración de 10%), el elemento *cis* Skn7 es capaz de activarse en estas condiciones y no se activa más en presencia de las diferentes concentraciones de menadiona.

Otro aspecto a considerar al comparar las figuras 4 y 6 es que en ambas construcciones la respuesta a menadiona (Figura 6) es mucho menor que la respuesta a agua oxigenada (Figura 4). Esto puede ser debido a que el estrés oxidativo causado por agua oxigenada se da en el citosol, mientras que el causado por menadiona al no ser soluble en agua, se da en membranas lipídicas. Debido a esto, la menadiona se incorpora fácilmente dentro de ambientes membranosos, pudiendo causar la disfunción de la mitocondria (Monteiro et al, 2013), lo cual derivaría en menos especies ROS en el citosol que activen los factores de transcripción Yap1 y Skn7. Esto explicaría su menor respuesta frente a este compuesto.

Posteriormente, se quiso estudiar si la activación de la transcripción en la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> dependía de los factores Skn7 y/o de Yap1. Para ello, se pasó a comparar la cepa BY4741 con la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> con los mutantes *yap1* y *skn7* transformados con la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup>. Para ello, todas las cepas transformadas fueron sometidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 7).



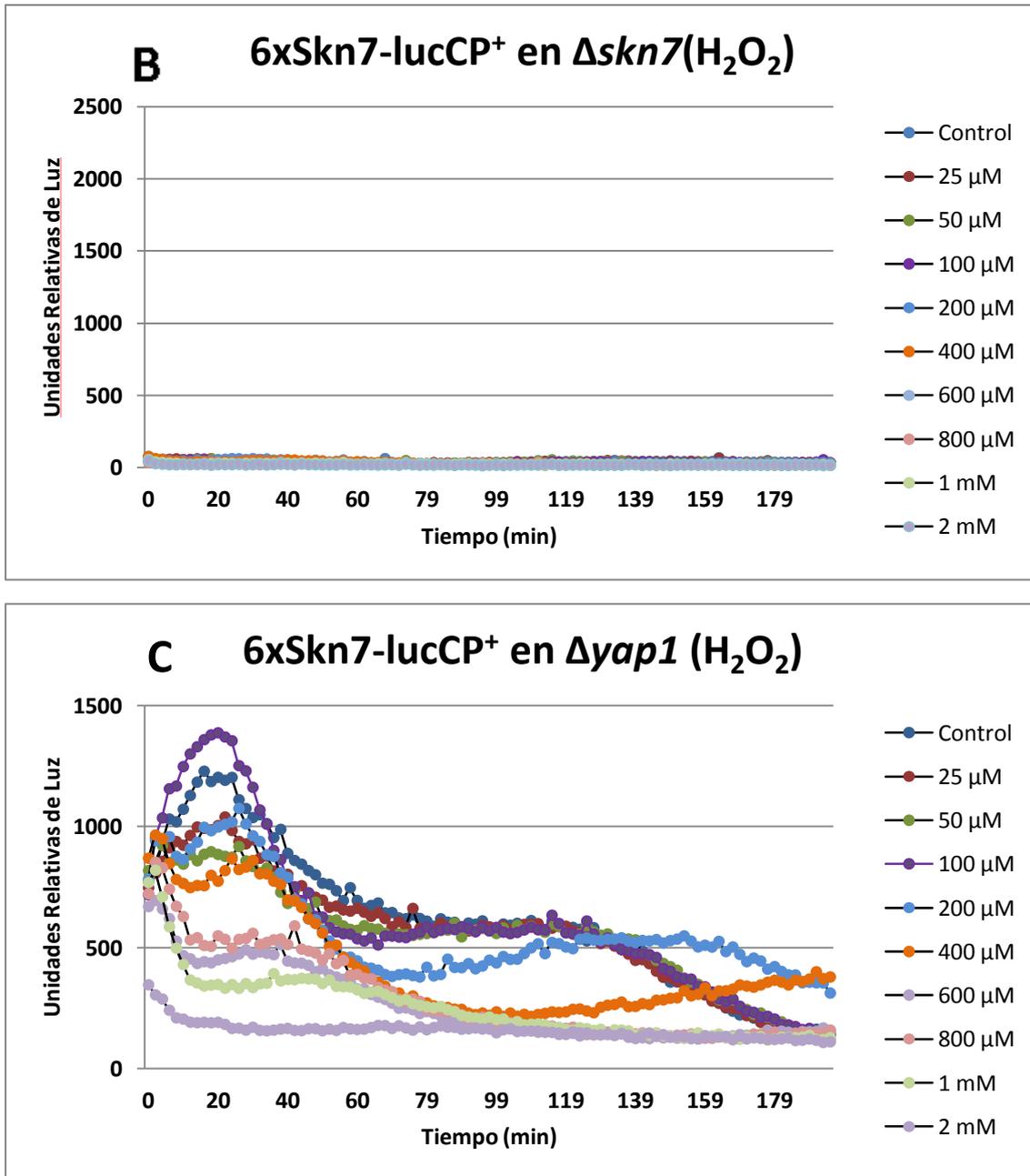
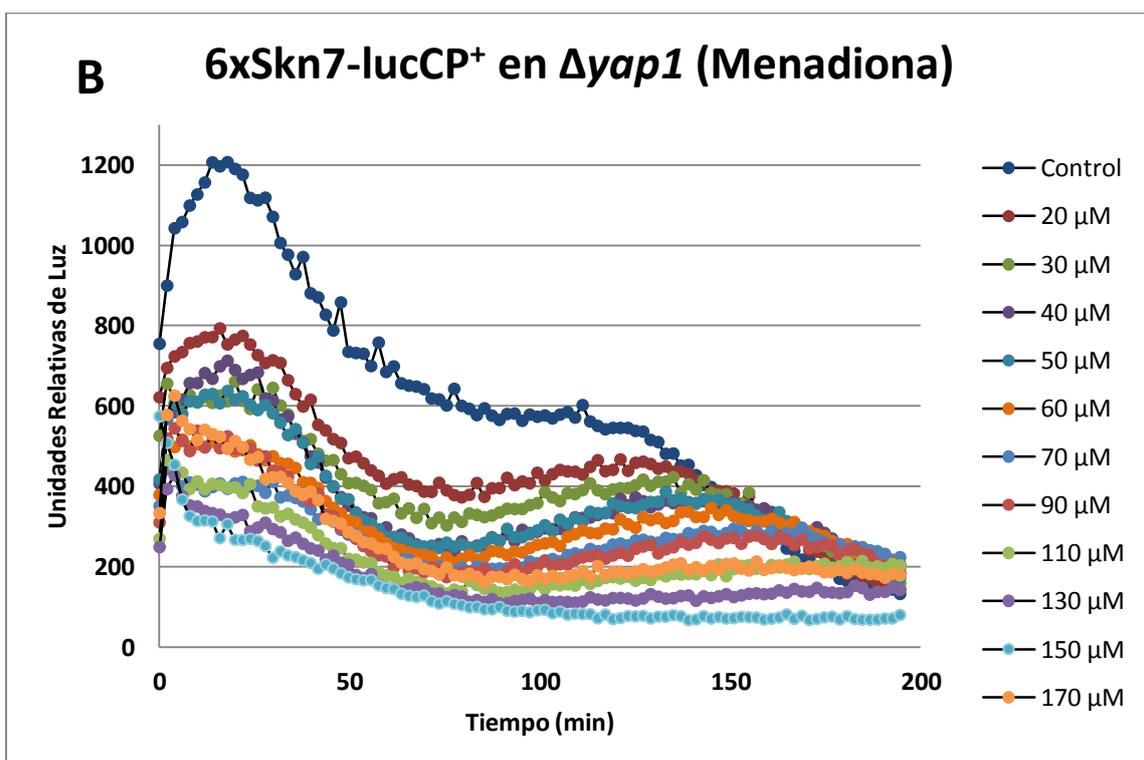
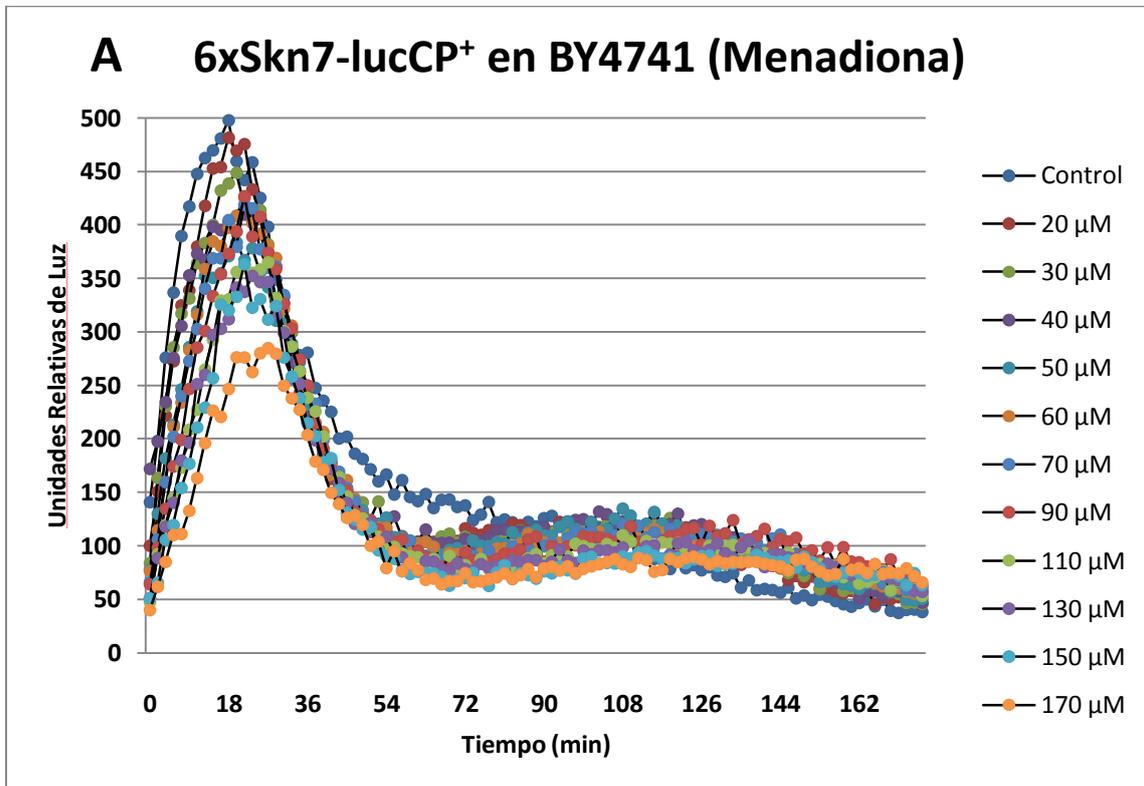


Figura 7. Perfiles dosis-respuesta para la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (A) en *wild type*, (B) en  $\Delta skn7$  y (C) en  $\Delta yap1$  con agua oxigenada. Se utilizó un rango de concentraciones de agua oxigenada entre 0-2mM para comparar la respuesta entre estas construcciones. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

Tras cuantificar la actividad del gen reportero de luciferasa en estas construcciones (Figura 7) se puede afirmar que la actividad de este promotor depende totalmente del factor de transcripción Skn7, ya que cuando la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> se introduce en el mutante *skn7* (Figura 7B) no se observa ningún tipo de respuesta (no hay inducción) y esto es así porque al carecer del factor de transcripción Skn7, este no se activa en presencia de estrés oxidativo lo que provoca que no se active la cascada de señalización necesaria para que se produzca la respuesta transcripcional y por lo tanto, tampoco se forma el complejo de inicio de la transcripción. En cambio, cuando 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> se introduce en el mutante *yap1* (Figura 7C) sí que hay respuesta ya que el factor de transcripción Skn7 que detecta el estrés sí que está presente en esta construcción.

Estos datos confirman que la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> permite detectar la activación transcripcional por estrés oxidativo específica del factor Skn7.

Posteriormente, se quiso comprobar también si la inducción por menadiona (incluyendo la activación por parte del tratamiento con el disolvente EtOH) dependía de Skn7. Para ello, se comparó la inducción entre la cepa BY4741 con la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> con los mutantes *yap1* y *skn7* transformados por la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (Figura 8):



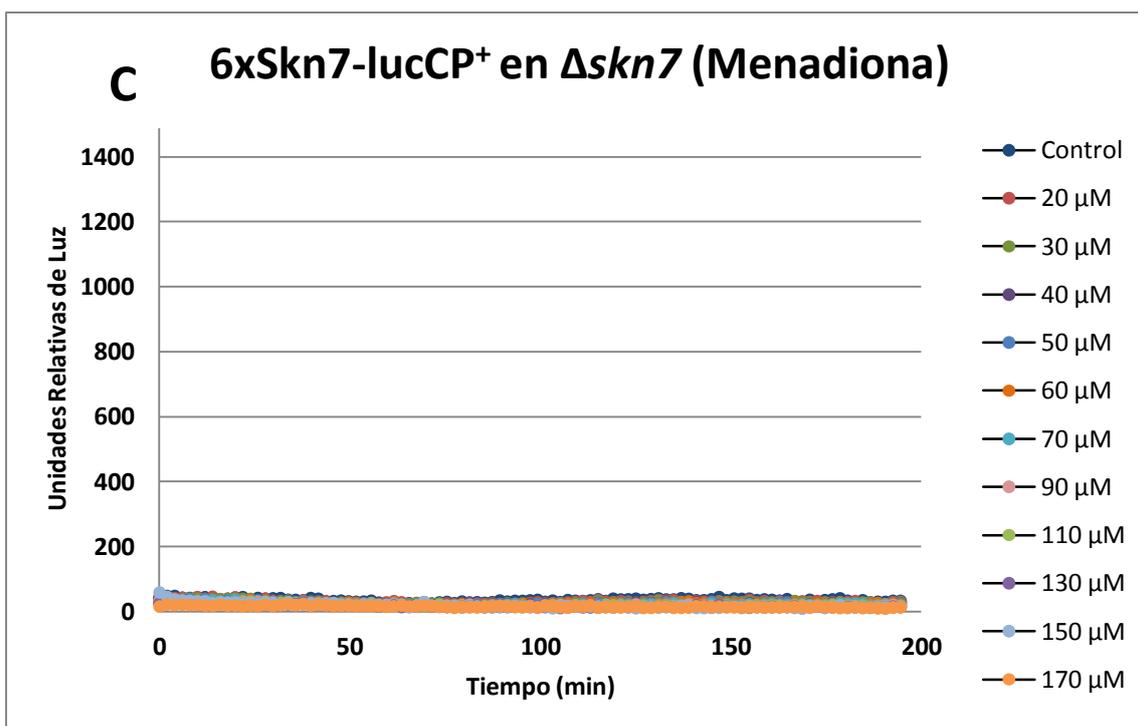


Figura 8. Perfiles dosis-respuesta para la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> en (A) *wild type*, (B) en  $\Delta yap1$ , (C) en  $\Delta skn7$  con menadiona. Se utilizó un rango de concentración de menadiona entre 0-170 $\mu$ M para comparar la respuesta entre ambas construcciones. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

Se observó como al igual que con agua oxigenada, la respuesta del promotor artificial con sitios consenso de unión para Skn7 dependía totalmente de Skn7, ya que en el mutante *skn7* (Figura 8C) tratado con menadiona tampoco existía ningún tipo de respuesta. En cambio, en el mutante *yap1* (Figura 8B) sí que se activaba la expresión génica.

Así pues se concluye que la actividad del promotor artificial CYC1 $\Delta$ -6xSkn7 depende totalmente de Skn7. Además, otro aspecto a considerar que se ha observado en todos los ensayos con la construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> (Figura 4B, 6B, 7 y 8) es que sorprendentemente el factor de transcripción Skn7, no solo responde a estrés oxidativo, sino que este también se activa ante otro tipo de perturbaciones, ya que en todos los controles (10% SD-his en el caso del estrés con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 10% de EtOH en el caso del estrés con menadiona) se produce una activación transcripcional que depende únicamente de Skn7 como se ha especificado anteriormente, esta activación es mayor cuando se trata del control con EtOH.

Así pues, de estos ensayos se podría deducir que la activación de Skn7 es mucho más compleja que la del factor de transcripción Yap1, ya que podría estar implicado en otro tipo de respuestas.

#### 4.2. Análisis comparativo de la dinámica transcripcional en respuesta a estrés salino y oxidativo en diferentes medios de cultivo.

Se quiso investigar si el metabolismo fermentativo o respiratorio influía a la manera en la que las células responden a nivel transcripcional a diversos estreses tanto salino como oxidativo. Para ello, se eligieron los medios SD (medio completamente fermentativo que emplea glucosa como fuente de energía) y SGal (medio parcialmente respiratorio que emplea galactosa como fuente de energía).

Como modelo experimental se estudió la respuesta a estrés oxidativo, en este caso empleando agua oxigenada como fuente de estrés, de la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> en un medio con glucosa y otro con galactosa.

Al emplear glucosa como medio de crecimiento, las células normalmente realizan un metabolismo fermentativo en el que no interviene ni la mitocondria ni la cadena respiratoria. Sin embargo, al crecer las células en medio con galactosa se induce la respiración, ya que este azúcar es menos preferido por las células y su fermentación no sirve para cubrir todas las necesidades específicas celulares. En estas condiciones la levadura activa de forma significativa el proceso mitocondrial de la respiración y la fosforilación oxidativa.

Así pues, el siguiente objetivo del trabajo fue comprobar si la inducción de la respiración modulaba la respuesta transcripcional a estrés oxidativo.

Para ello, se crecieron las células que contenían la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> en las mismas condiciones de agua oxigenada, pero unas fueron crecidas en medio con glucosa y otras en medio con galactosa (Figura 9 y 10):

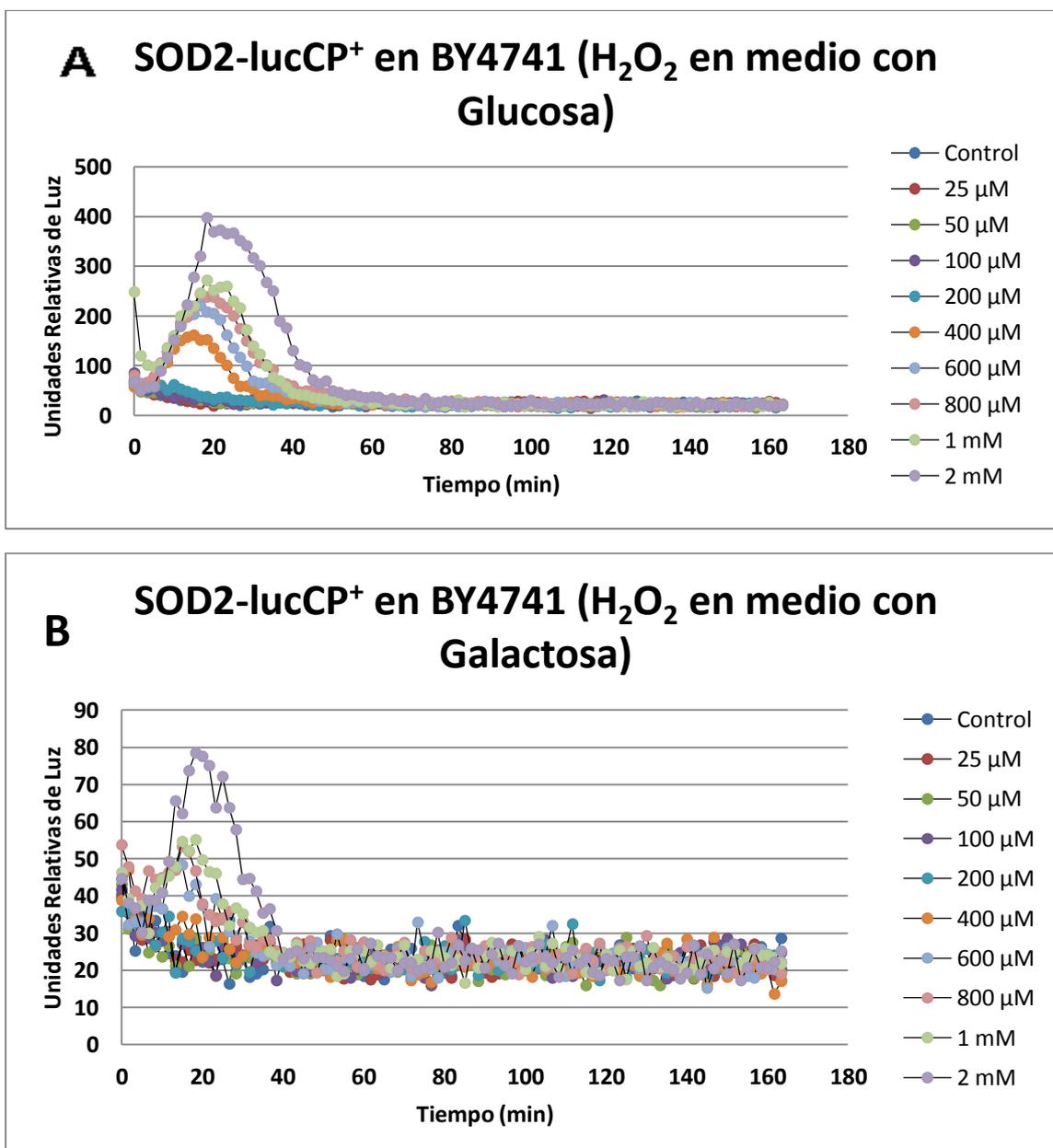


Figura 9. Perfiles dosis-respuesta para la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> con agua oxigenada en medio con glucosa (A) y con galactosa (B). Se utilizó un rango de concentraciones de agua oxigenada de 0-2mM para comparar la respuesta entre ambos medios. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

Sorprendentemente, se observó que el medio con galactosa aparentemente no inducía tanto la respuesta a estrés oxidativo como el medio con glucosa (Figura 9). Cuando las células se crecen en medio con glucosa (Figura 9A), se observa cómo a partir de una concentración de 400 $\mu$ M de agua oxigenada se activa la respuesta transcripcional que alcanza su nivel máximo (400 unidades relativas de luz) a una concentración de 2mM. En cambio, durante el crecimiento de las células en medio con galactosa (Figura 9B) el estrés aplicado genera unos niveles muy bajos de unidades relativas de luz que se mantienen a lo largo del tiempo, lo que implica que la activación de la transcripción se ve afectada. Observamos como el máximo lo alcanza a 2mM pero esta vez a aproximadamente 80 unidades relativas de luz (mucho menos inducción comparado con glucosa (Figura 9A)).

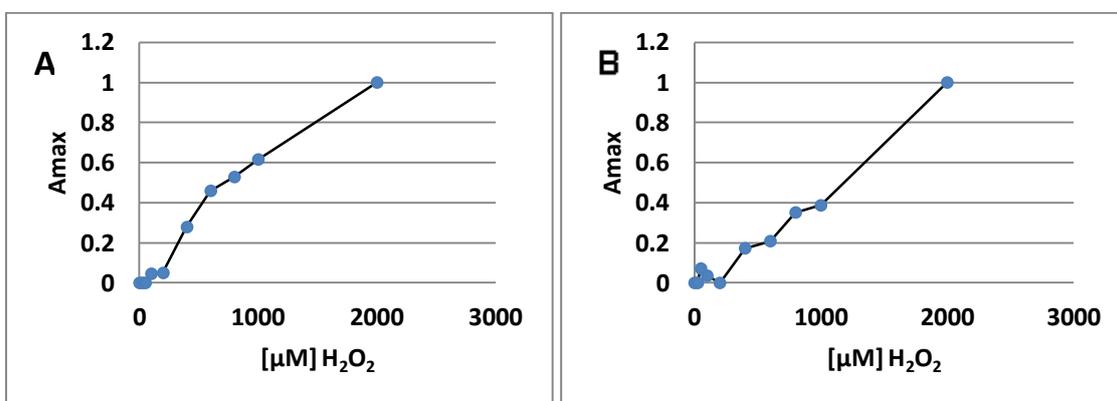


Figura 10. Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de agua oxigenada en medio con glucosa (A) y medio con galactosa (B), en la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup>.

Al comparar el comportamiento de la actividad máxima (Figura 10) calculada como se indica en el apartado de materiales y métodos. Se observa cómo en el caso del medio con glucosa (Figura 10A) la actividad transcripcional comienza teniendo unos niveles máximos de actividad muy bajos y estos van aumentando progresivamente hasta alcanzar el máximo. En cambio, en el caso del medio con galactosa (Figura 10B) el comportamiento es totalmente distinto ya que no se observa un incremento progresivo de estos valores, sino que lo que se observa es que los niveles se mantienen más o menos todos alrededor de los mismos valores (bajos) para al final producirse un pequeño incremento de la actividad.

Como se observó que los niveles de actividad luciferasa inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajaban de forma general en medio con galactosa, se quiso explorar la posibilidad de que el ensayo reportero de luciferasa produjera de forma más general menos actividad en un medio de crecimiento con galactosa comparado con glucosa.

Para ello, se realizó un ensayo con la construcción pAG413GPD-lucCP<sup>+</sup> que presenta un reportero constitutivo con una elevada expresión del gen luciferasa. En este ensayo únicamente se cuantificaron los niveles de actividad luciferasa (sin presencia de estrés) en glucosa y galactosa. Se vio como la actividad producida en medio con galactosa era menor (aproximadamente un 80% menos de actividad) en comparación con el medio de glucosa (Figura 11).

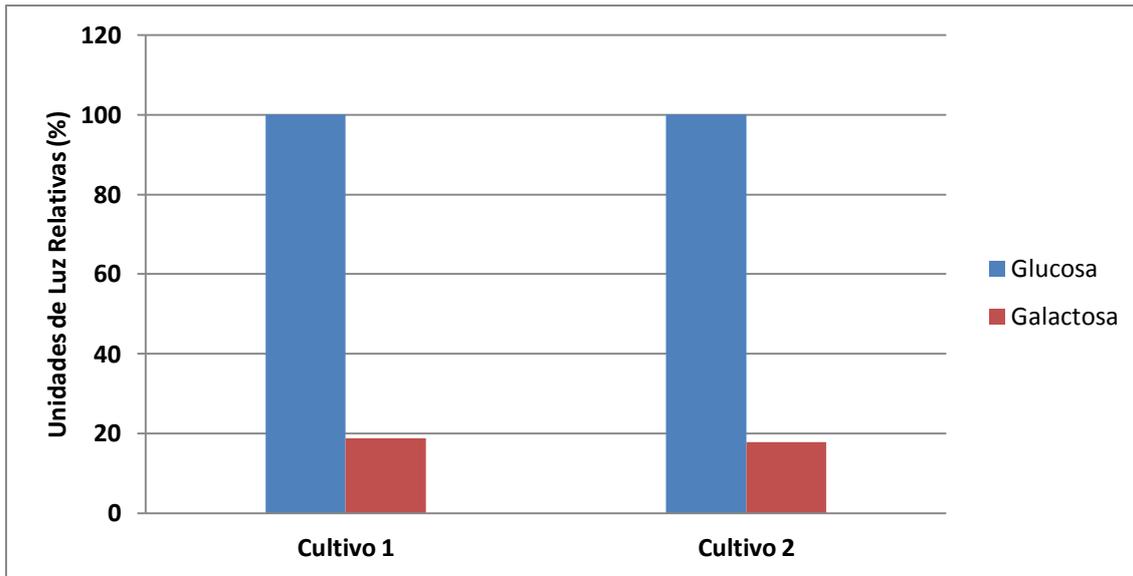
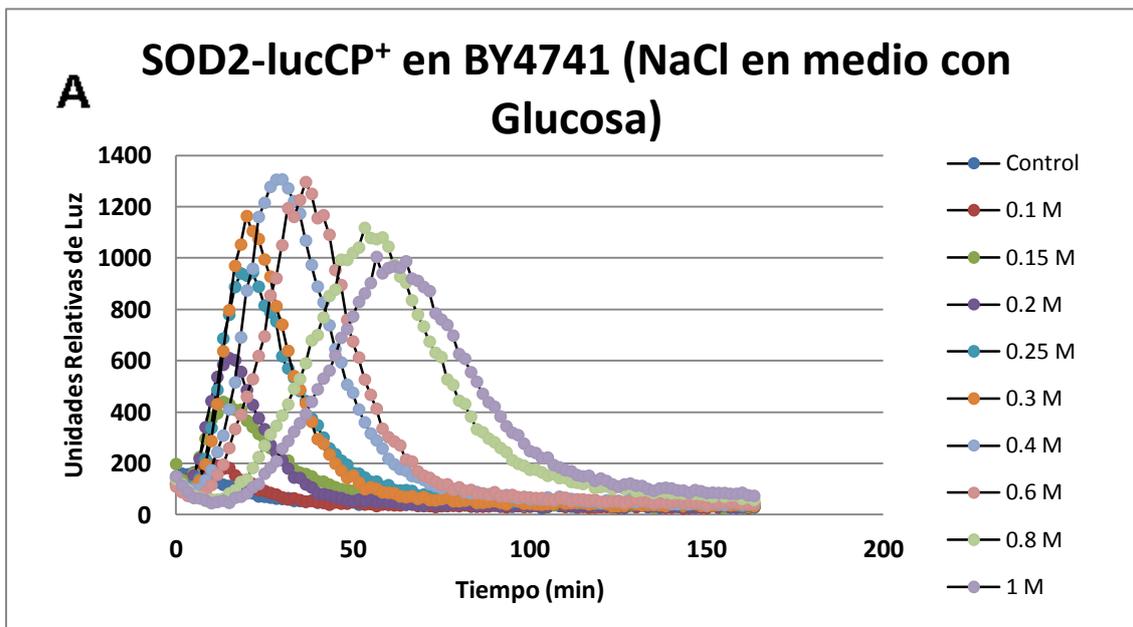


Figura 11. Actividad luciferasa de la construcción constitutiva GDP-lucCP<sup>+</sup> en medio SD y SGal.

Gracias a la Figura 11, se puede confirmar que el medio SGal genera una actividad luciferasa más baja que el medio con SD.

Una de las hipótesis que podría explicar este comportamiento es que en el medio con galactosa la captación de la luciferina sea menor que en el medio con glucosa y por ello se produzca una menor actividad luciferasa.

Aún así, el sistema lucCP<sup>+</sup> se puede emplear para comparar la dinámica transcripcional del medio SD frente al medio SGal. Para ello, se estudió la inducción por estrés salino de la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> (Figura 12) mediante NaCl:



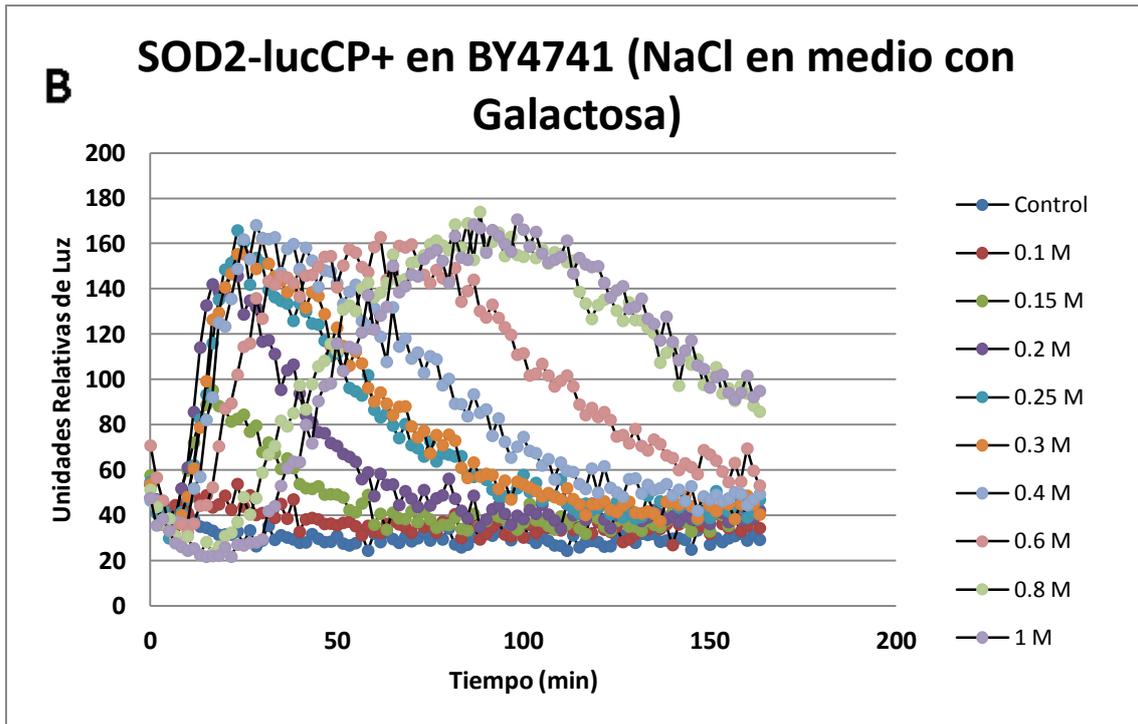


Figura 12. Perfiles dosis-respuesta para la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> con cloruro de sodio en medio con glucosa (A) y galactosa (B). Se utilizó un rango de concentraciones de NaCl entre 0-1M para comparar la respuesta entre ambos medios. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

En la figura 12 se continúa observando como la actividad luciferasa que se genera en galactosa es mucho menor que en glucosa. No obstante, lo que es importante destacar de estos ensayos es la diferencia en cuanto al comportamiento dinámico que se produce en estos medios. En la figura 13 podemos observar esto mejor. Se ve como en medio con glucosa la inducción alcanza su nivel máximo a una determinada concentración de NaCl, mayor que la necesaria en el medio con galactosa. En este medio de cultivo la activación incrementa en un rango más amplio de concentraciones de NaCl. En cambio, en medio con galactosa las células una vez activan la respuesta transcripcional, alcanzan su activación máxima a concentraciones menores de NaCl.

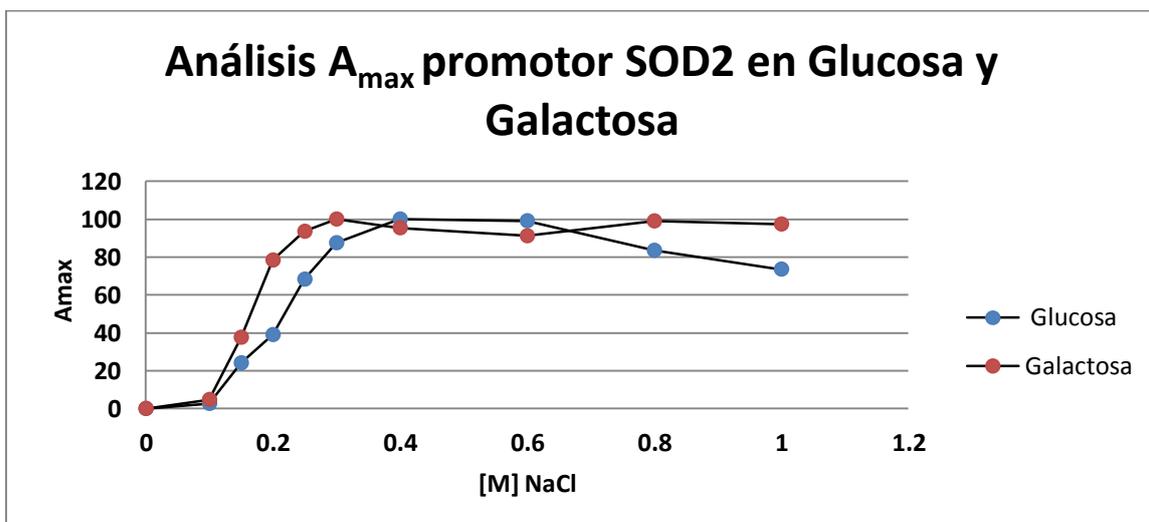


Figura 13. Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de agua oxigenada en medio con glucosa y con galactosa en la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup>.

Esta diferencia se confirma mediante el cálculo de la  $EC_{50}$  de la forma en la que se explica en materiales y métodos. Gracias a este cálculo se determina que la concentración necesaria para alcanzar la mitad de la activación transcripcional máxima es mayor en el caso de glucosa (197mM) que en el caso de galactosa (138mM), lo que corrobora que en galactosa se alcanza antes el nivel máximo transcripcional, en cambio en glucosa se necesita mayor concentración para poder alcanzarlo. Es decir, en medio con galactosa las células presentan una mayor sensibilidad a estrés salino comparado con el medio con glucosa.

Para confirmar que el comportamiento anteriormente descrito no dependía de un promotor en concreto como *SOD2*, sino que era un fenómeno más general de la respuesta a estrés salino. Se repitió el experimento con la construcción GRE2-lucCP<sup>+</sup> a las mismas concentraciones de estrés salino (Figura 14 y 15):

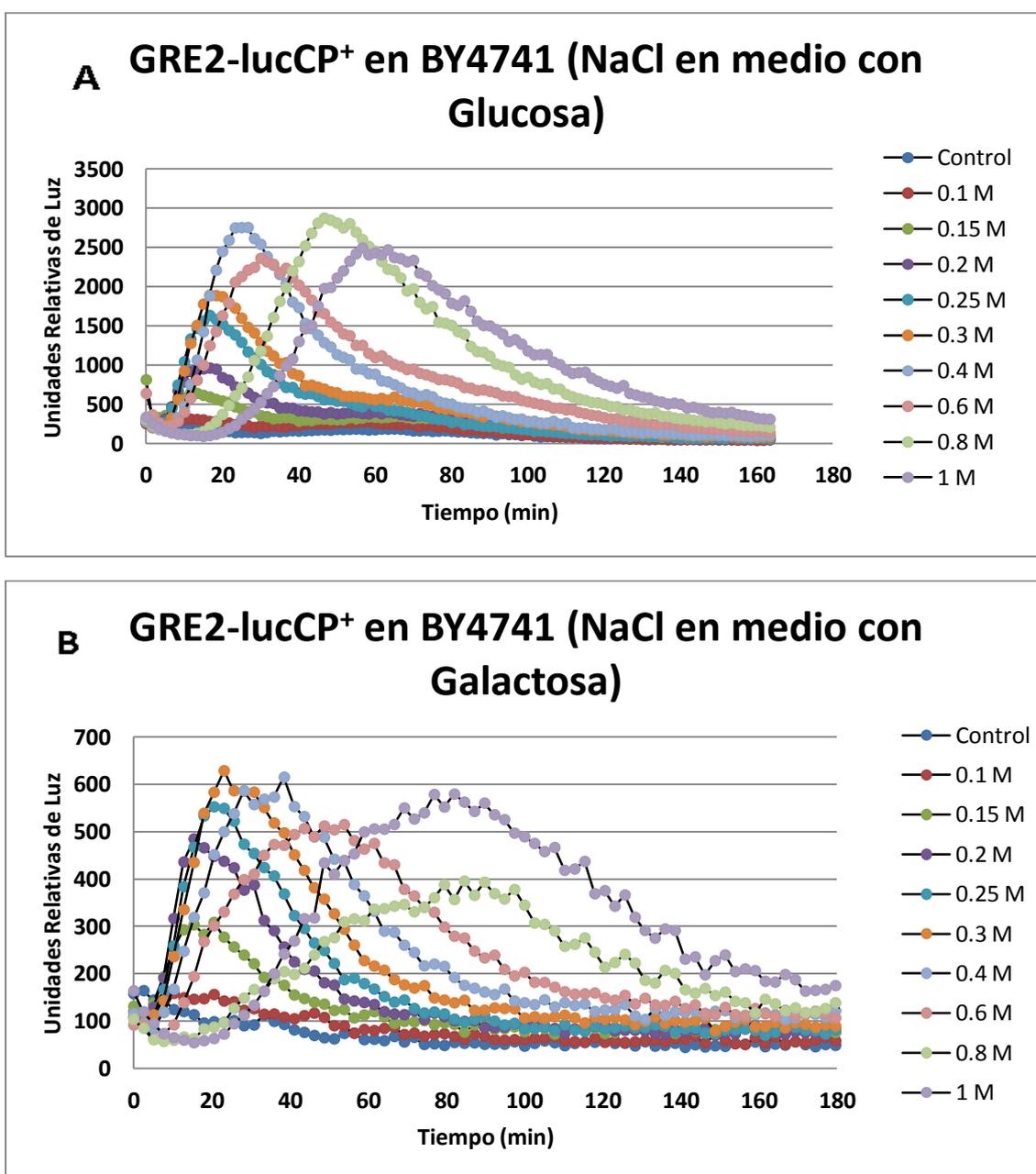


Figura 14. Perfiles dosis-respuesta para la construcción GRE2-lucCP<sup>+</sup> con cloruro de sodio en medio con glucosa (A) y galactosa (B). Se utilizó un rango de concentraciones de NaCl entre 0-1M para comparar la respuesta entre

ambos medios. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

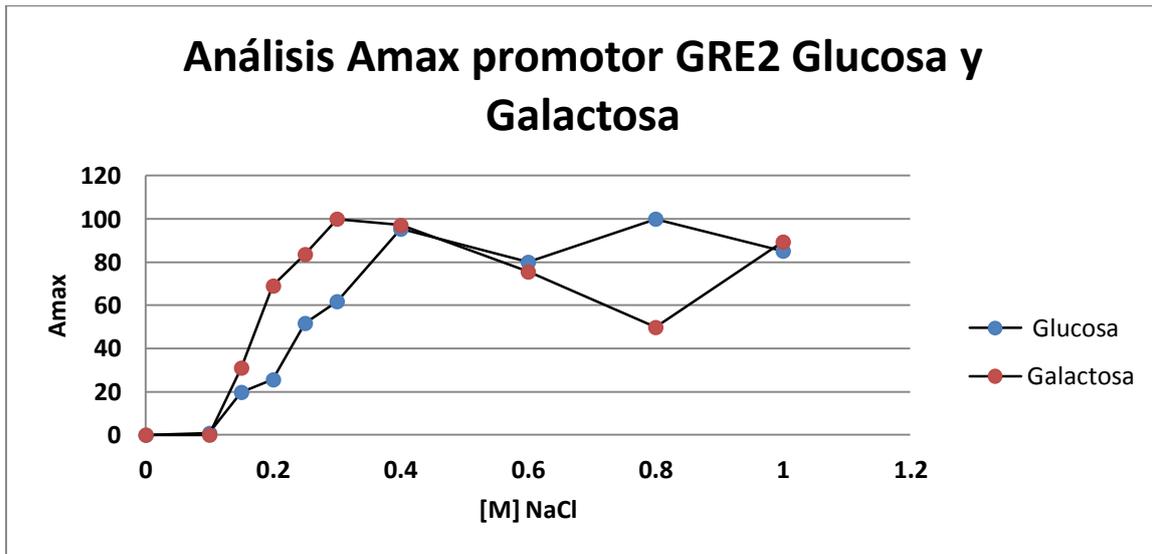


Figura 15. Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de cloruro de sodio en medio con glucosa y con galactosa en la construcción GRE2-lucCP<sup>+</sup>.

El comportamiento obtenido con el reportero GRE2-lucCP<sup>+</sup> (Figura 14 y 15) fue muy similar al caso de *SOD2*. También en el caso del promotor *GRE2*, al calcular la EC<sub>50</sub> se seguía viendo como la cantidad de NaCl necesaria para llegar a la mitad de la activación transcripcional máxima seguía siendo mayor en el caso de glucosa (257 mM) que en el caso de galactosa (187 mM).

Otro comportamiento que se puede observar tanto en la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> como en GRE2-lucCP<sup>+</sup> (Figura 12B y 14B) es que cuando las células crecen en medio con galactosa, se produce un retraso en la activación de la respuesta transcripcional, cosa que no ocurre en medio con glucosa.

Al analizar la respuesta transcripcional de los elementos anteriores en medio con glucosa y galactosa se observó como en todos los casos la respuesta en medio con galactosa era mucho más baja y de comportamiento diferente al medio con glucosa. En vista de estos resultados se decidió estudiar la sensibilidad de la cepa WT a NaCl en medio YPD e YPGal mediante un ensayo de crecimiento en medio líquido en presencia de distintas concentraciones de NaCl. Así, se determinó de qué manera afectaba el metabolismo (glucosa frente a galactosa) al crecimiento de las células en diferentes condiciones de estrés salino.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes (Figura 16):

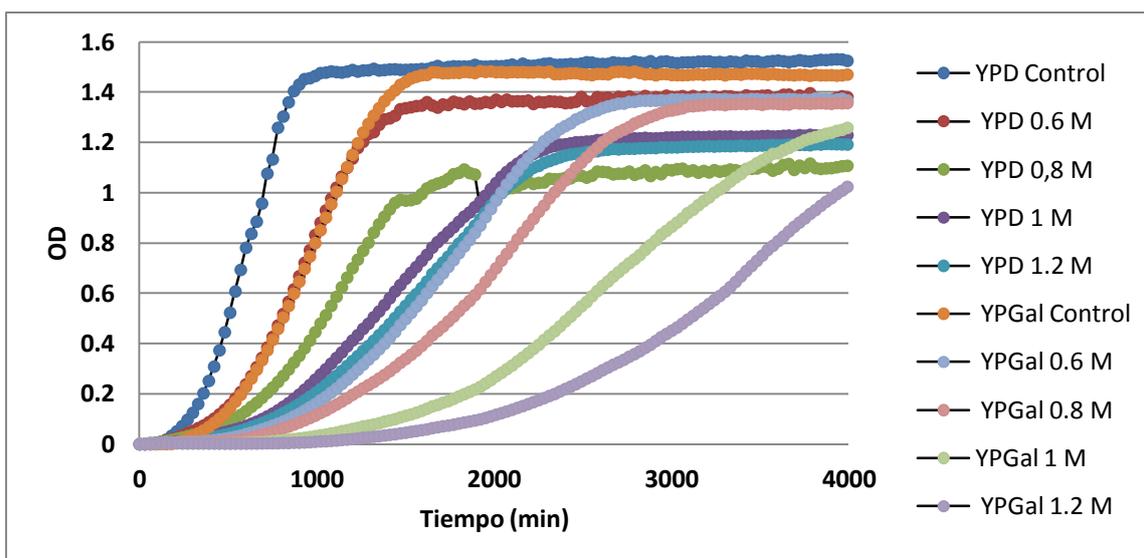


Figura 16. Curvas de crecimiento para la cepa *wild type* en medio YPD e YPGal, para cada una de las condiciones de NaCl (0-1,2M). En los gráficos se representa la media de la densidad óptica de los triplicados.

Como se observa en la figura 16, en el caso del cultivo de galactosa el crecimiento celular se ve mucho más afectado por NaCl, las curvas correspondientes al medio YPGal presentan un mayor retraso en comparación con las del medio YPD.

A partir de estas curvas de crecimiento se calculó el rendimiento absoluto de crecimiento en cada condición respecto a las condiciones óptimas (sin estrés). Para este cálculo, primero se definió para cada condición el  $t_{50\%}$ , es decir, el tiempo que necesita dicha cepa para alcanzar la mitad de la OD máxima ( $OD_{50\%}$ , alcanzada tras la fase exponencial de crecimiento en ausencia de estrés). El rendimiento absoluto de crecimiento para cada condición se definió como el cociente entre el  $t_{50\%}$  en ausencia de estrés y el  $t_{50\%}$  para cada condición por 100 (Figura 17).

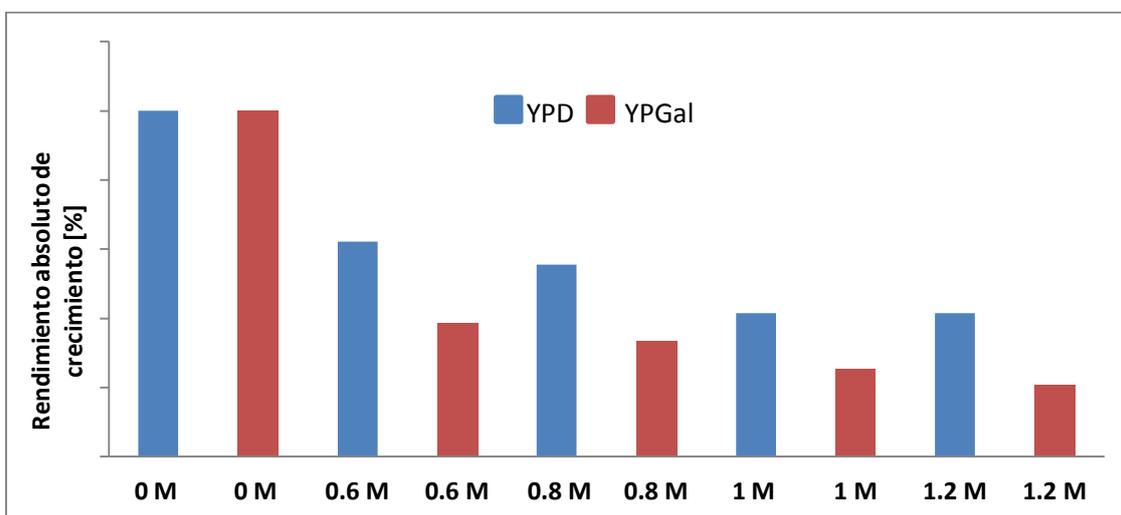


Figura 17. Perfiles de rendimiento absoluto de crecimiento de la cepa *wild type*. El rendimiento absoluto de crecimiento se calculó como el cociente entre al tiempo que tarda en alcanzar la mitad de la OD máxima en condiciones sin estrés y en condiciones de estrés producido por NaCl por 100. Esto se realizó tanto para el medio YPD como YPGal.

Como se observa en la figura 17, en todos los casos el rendimiento absoluto de crecimiento es más bajo en el caso de YPGal. Este experimento sirvió para observar la sensibilidad que presentaban las células ante estos dos medios de cultivo, así, en medio con galactosa la

sensibilidad a NaCl es mayor y por ello tardan más en alcanzar cierta OD, de forma que su eficiencia de crecimiento disminuirá rápidamente tanto al crecer en dicho medio como al aumentar la intensidad de estrés.

Llegado a este punto del trabajo, la pregunta que se planteaba era el porqué en galactosa el comportamiento era tan diferente y menor en comparación con el medio en glucosa. Entre las hipótesis que se barajaban se encontraba la posibilidad de que en el caso del medio con galactosa, en el cual las células tienen la mitocondria inducida, el efecto del NaCl sobre ella fuera tan tóxico que se produjera una disminución de la inducción. Para ver si esto era así, se obtuvieron como antes las curvas dosis-respuesta para los reporteros SOD2-lucCP<sup>+</sup> y GRE2-lucCP<sup>+</sup>, pero en lugar de con NaCl, con KCl que es menos tóxico (Figura 18):

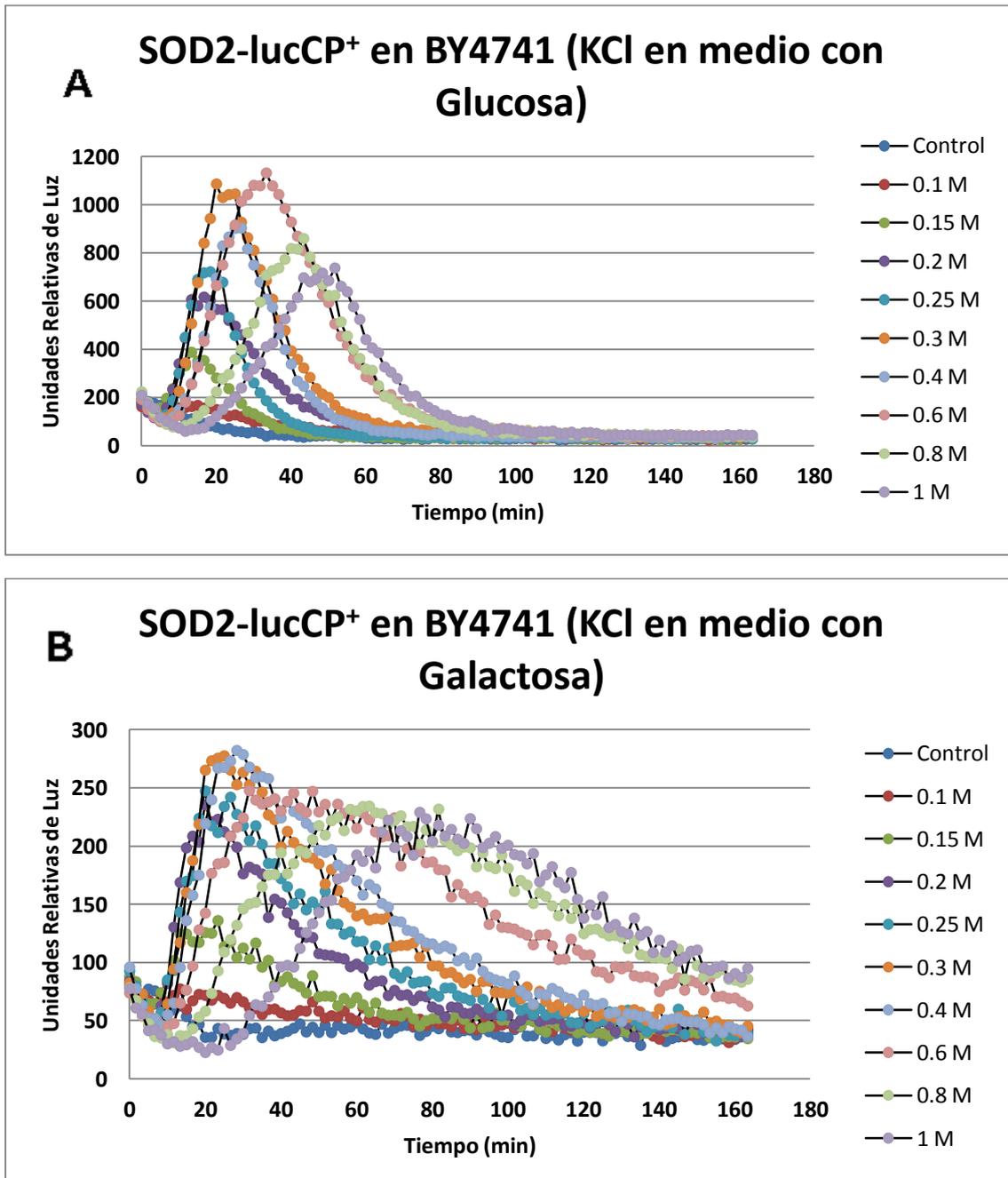


Figura 18. Perfiles dosis-respuesta para la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup> con cloruro de potasio en medio con glucosa

(A) y galactosa (B). Se utilizó un rango de concentraciones de KCl entre 0-1M para comparar la respuesta entre ambos medios. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

Como se observa en la figura 18, no hay gran diferencia entre el efecto que producía el NaCl y el que produce el KCl. Así pues, esta posible hipótesis habría que descartarla. Así mismo, al igual que se hizo con los ensayos anteriores, también se obtuvieron las gráficas correspondientes a la  $A_{max}$  (Figura 19) y a la  $EC_{50}$ . Las cuales también pusieron de manifiesto que las diferencias eran mínimas. La  $EC_{50}$  continuó siendo mayor para el caso del cultivo con glucosa (214 mM) que para el cultivo con galactosa (177 mM).

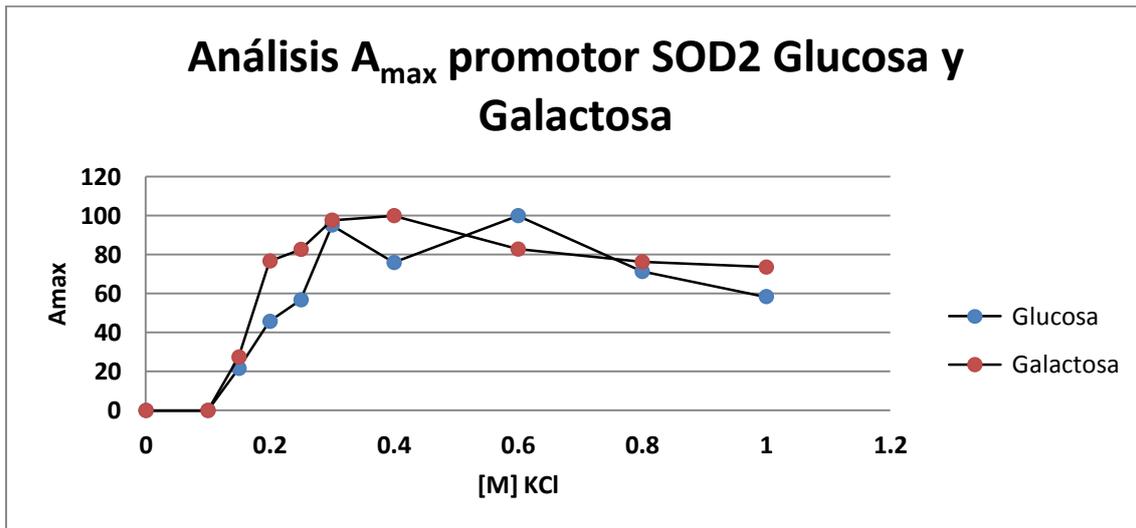
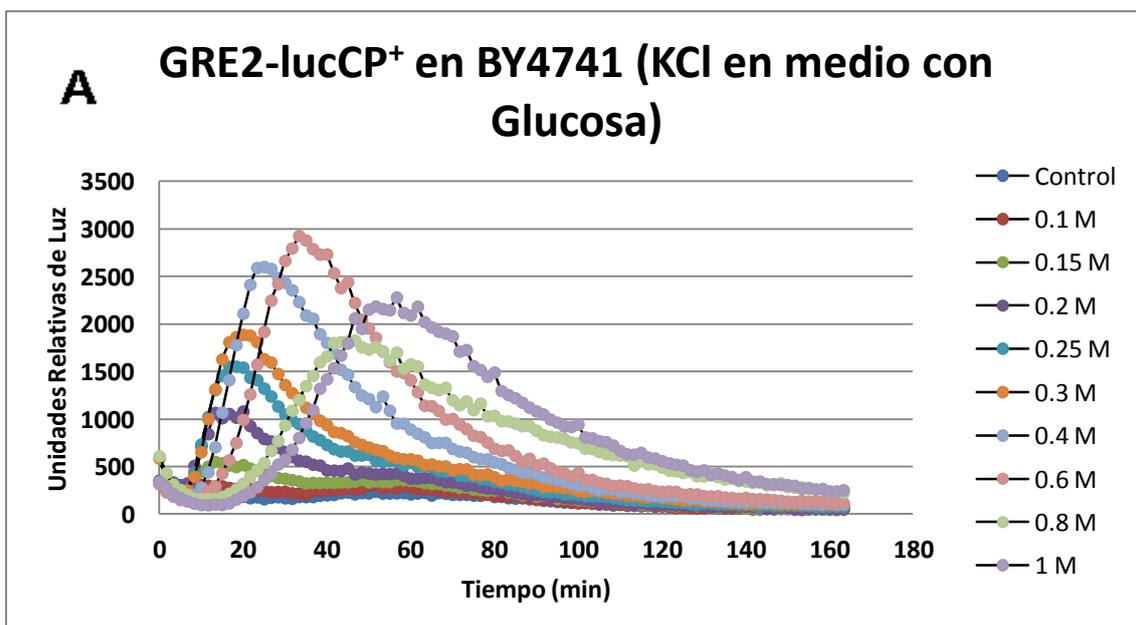


Figura 19. Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de cloruro de potasio en medio con glucosa y con galactosa en la construcción SOD2-lucCP<sup>+</sup>.

En la figura 19, se observa un comportamiento muy similar al obtenido con NaCl.

Posteriormente, se realizó este ensayo también con la construcción GRE2-lucCP<sup>+</sup> (Figura 20 y 21) y se obtuvieron resultados muy similares. Además los valores de la  $EC_{50}$ , 174mM para el cultivo en galactosa y 272mM para el cultivo de glucosa, mostraron una diferencia aún mayor en la sensibilidad al estímulo en comparación con los dos medios de cultivo.



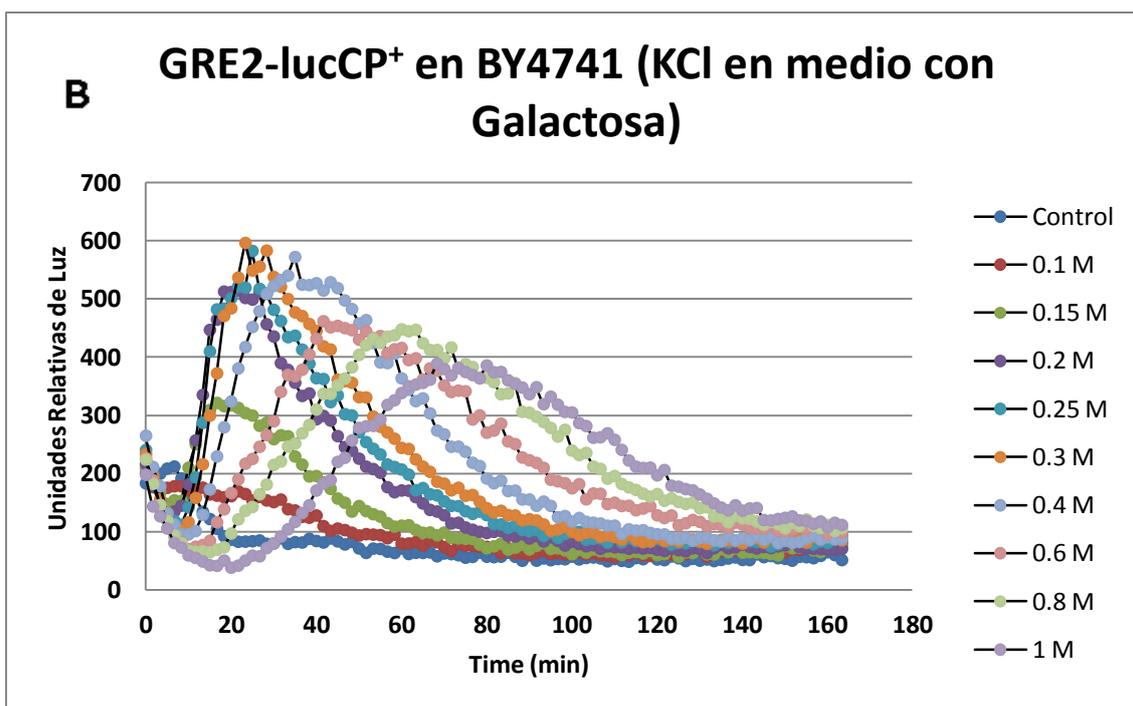


Figura 20. Perfiles dosis-respuesta para la construcción GRE2-lucCP<sup>+</sup> con cloruro de potasio en medio con glucosa (A) y galactosa (B). Se utilizó un rango de concentraciones de KCl entre 0-1M para comparar la respuesta entre ambos medios. En los gráficos se representa la media de emisión de luz de los triplicados normalizada respecto a la OD de los cultivos empleados. El error de las medias es aproximadamente del 15%.

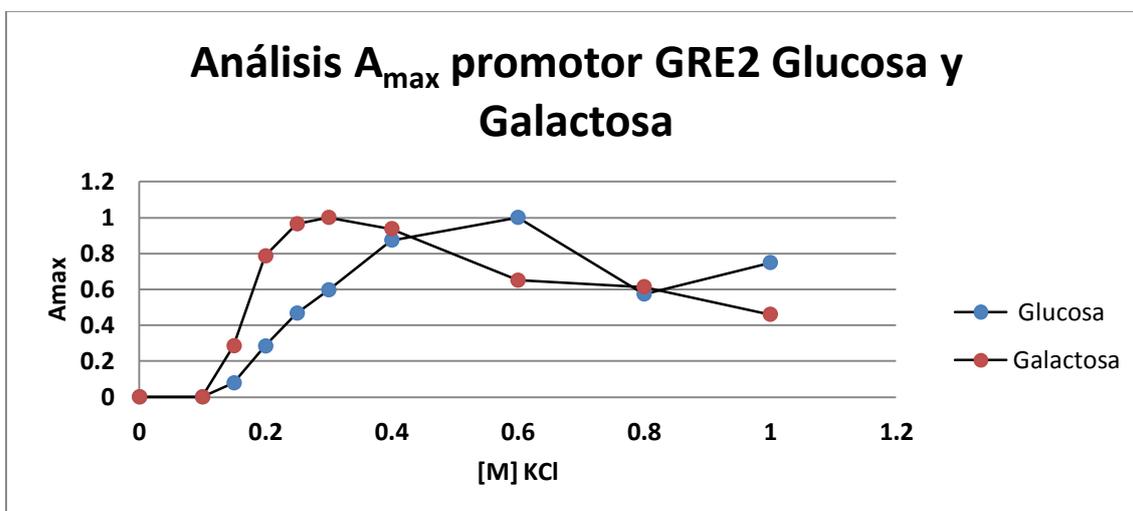


Figura 21. Relación entre la actividad máxima y las diferentes concentraciones de cloruro de potasio en medio con glucosa y con galactosa en la construcción GRE2-lucCP<sup>+</sup>.

Podemos observar también, como al igual que con NaCl, cuando las construcciones crecen en medio con galactosa (Figura 18B y 20B) también se produce un retraso en la activación transcripcional.

Hasta el momento, se ha observado como la respuesta transcripcional se satura con concentraciones más bajas de estrés salino si las células crecen en galactosa. Además, se ha observado como esto es independiente del catión, ya que ocurre tanto con Na<sup>+</sup> como con K<sup>+</sup>. Así pues, hasta el momento se puede concluir que existe una mayor sensibilidad a estrés salino en medio con galactosa. Llegado a este punto, se quiso investigar de donde procedía esta mayor sensibilidad. Para ello, se quiso estudiar uno de los osmolitos más importantes que

interviene en la respuesta a estrés osmótico y que juega un papel importantísimo en la osmoadaptación, el glicerol. Así pues, se quiso saber si en medio con galactosa al haber una menor inducción de la transcripción también se producía una menor producción de glicerol.

Para realizar el ensayo se prepararon medios de cultivo de YPD y de YPGal y se inocularon con la cepa WT. Se crecieron las cepas durante toda la noche en agitación a 30°C y se seleccionaron aquellos medios que habían alcanzado una densidad óptica a una longitud de onda de 600nm de 0,8-1,5. A continuación, se tomaron tres muestras de 1000µl a tiempo 0 de cada cultivo (YPD, YPGal) y seguidamente se adicionó a cada cultivo NaCl a 0,8M y se incubaron a 30°C en agitación. Se volvieron a tomar tres muestras de 1000µl de cada cultivo a la hora, a las dos horas y a las cuatro horas.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en la figura 22.

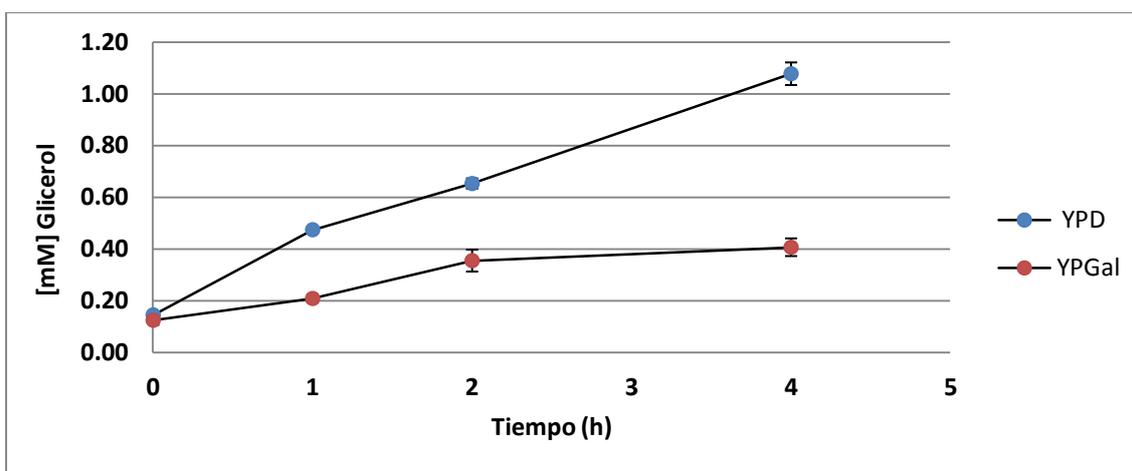


Figura 22. Producción de glicerol de la cepa *wild type* en presencia de estrés salino en medio con YPD e YPGal.

En la figura 22 se observa como la producción de glicerol en medio con galactosa es mucho menor que la producción de glicerol en medio con glucosa. La cepa *wild type* en medio YPD aumenta la concentración de glicerol cuatro veces en cuatro horas mientras que en medio YPGal la cepa *wild type* solo aumenta una vez en las mismas condiciones.

A la hora de intentar explicar el porqué de una menor acumulación de glicerol en medio con galactosa, una posible hipótesis sería que al haber en este medio un mayor retraso en el crecimiento celular en presencia de estrés osmótico, esto podría afectar de forma negativa a la respuesta transcripcional sobre todo a concentraciones altas de estrés osmótico.

Otra explicación podría ser que en medio con galactosa, en el cual existe un metabolismo parcialmente respiratorio con flujo metabólico menor en la ruta glicolítica, se produce una menor concentración de intermediarios glicolíticos y con ello una menor producción de glicerol.

Así pues, se ha demostrado que existe una interconexión entre el metabolismo respiratorio y la respuesta a estrés osmótico, no obstante para poder afirmar que tipo de conexión existe, haría falta realizar más experimentos.

## ***5. Conclusiones***

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El sistema luciferasa es una herramienta eficaz para el estudio de la dinámica transcripcional de los factores de transcripción Yap1 y Skn7.
- La construcción 6xSkn7-lucCP<sup>+</sup> permite detectar la activación transcripcional por estrés oxidativo específica del factor Skn7.
- La activación de Skn7 es mucho más compleja que la del factor de transcripción Yap1 y, podría estar implicado en otro tipo de respuestas.
- Los niveles de actividad luciferasa inducidos por estrés salino y osmótico bajan de forma general en medio con galactosa.
- La respuesta transcripcional se satura con concentraciones más bajas de estrés salino si las células crecen en galactosa.
- El medio de cultivo afecta al crecimiento de las células en diferentes condiciones de estrés salino.
- La producción de glicerol en medio con galactosa es mucho menor que la producción de glicerol en medio con glucosa.

## ***6. Referencias***

- ALBERTYN, J.; HOHMANN, J.S.; PRIOR, B.A. (1994). Characterization of the osmotic-stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr. Genet*, 25:12–18.
- ALBERTYN, J.; HOHMANN, J.S.; THEVELEIN, J.M.; 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, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J*, 22:2433-2442.
- ALLARD, S.; UTLEY, R.T.; SAVARD, J.; CLARKE, A.; GRANT, P. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing esa1p and the ATM-related cofactor tra1p. *EMBO J*, 18: 5108–5119.
- ANDERS, M.N.; BRYAN, D.L.; TIJAN, R. (2001). Transcriptional coactivator complexes. *Annu. Rev. Biochem*, 70:475-501.
- ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. (1997). The two isoenzymes for yeast NAD<sub>2</sub>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J*, 16:2179–2187.
- BAKER, S.P.; GRANT, P.A. (2007). The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*, 26: 5329–5340.
- BASEHOAR, AD.; ZANTON, S.J.; PUGH, B.F. (2004). Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell*, 116: 699-709.
- BIDDICK, R.; YOUNG, E.T. (2005). Yeast mediator and its role in transcriptional regulation. *C. R. Biol*, 328: 773–782.
- BJORKLUND, S.; GUSTAFSSON, C.M. (2005). The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem. Sci*, 30: 240–244.
- BLOMBERG, A.; ADLER, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*, 171:1087–1092.
- BREWSTER, J.L.; de VALOIR, T.; DWYER, N.D.; WINTER, E.; GUSTIN, M.C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259: 1760–1763.
- BRICMONT, P.A.; DAUGHERTY, J.R.; COOPER, T.G. (1991). The DAL81 gene product is required for induced expression of two differently regulated nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*, 11: 1161–1166.
- BROMBACHER, K.; FISCHER, B.B.; RUFENACHT, K., EGGEN, R.I. (2006). The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defense of *Saccharomyces cerevisiae* against single oxygen. *Yeast*, 23:741-750
- BROWN, C.E.; HOWE, L.; SOUSA, K.; ALLEY, S.C.; CARROZZA, M.J. (2001). Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*, 292: 2333– 2337.

- BRYANT, G.O.; PTASHNE, M. (2003). Independent recruitment in vivo by gal4 of two complexes required for transcription. *Mol. Cell*, 11: 1301–1309.
- CASAMASSIMI, A.; NAPOLI, C. (2007). Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: An overview. *Biochimie*, 89:1439-1446.
- CAUSTON, H.C.; REN, B.C.; KOH, S.S.; HARBISON, C.T.; KANIN, E. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 12: 323–337.
- CLER, E.; PAPAI, G.; SCHULTZ, P.; DAVIDSON, I. (2009). Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cell. Mol. Life Sci*, 66: 2123–2134.
- CORMACK, B. (1998). Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr Opin Microbiol*, 1:406-410.
- DELAUNAY, A.; ISNARD, A.D.; TOLEDANO, M.B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo J*, 19:5157-5166.
- de NADAL, E.; AMERER, G.; POSAS, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet*, 12:833-845.
- 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.Bio*, 23:229-237.
- de NADAL, E.; ZAPATER, M.; ALEPUZ, P.M.; SUMOY, L.; MAS, G.; POSAS, F. (2004). The MAPK recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*, 427:370-374
- DESMOND, C.R.; JOHNSON, A.L.; ERKINE, A.M.; MAKINO, K.; MORGAN, B.; GROSS, D.S.; JOHNSTON, L.H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular Biology of the cell*, 11: 2335-2347.
- DIHAZI, H.; KESSLER, R.; ESCHRICH, K. (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J. Biol. Chem*, 279: 23961–23968.
- DOLZ, L. (2013). *Monitorización en tiempo real de la expresión génica: empleo de la levadura como modelo para definir parámetros cuantitativos de la respuesta a estrés osmótico y oxidativo*. Trabajo Final de Carrera. Univ. Politécnica de Valencia. 115pp.
- ERIKSSON, P.; ANDRE, L.; ANSELL, R.; BLOMBERG, A.; ADLER, L. (1995). Molecular cloning of *GPD2*, a second gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison to *GPD1*. *Mol. Microbiol*, 17:95–107.
- FAN, X.C.; MYER, V.E.; STEITZ, J.A. (1997). AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes & development*, 11: 2557-2568.
- FERNANDES, L.; RODRIGUES-POUSADA, C.; STRUHL, K. (1997). Yap, a Novel Family of Eight bZIP Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *American Society for Microbiology*, 12:6982-6993.
- FISHBURN, J.; MOHIBULLAH, N.; HAHN, S. (2005). Function of a eukaryotic transcription activator during the transcription cycle. *Mol. Cell*, 18: 369–378.

- GASH, A.P.; SPELLMAN, P.T.; KAO, C.M.; CARMEL-HAREL, O.; EISEN, M.B. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 11: 4241–4257.
- GORNER, W.; DURCHSCHLAG, E.; MARTINEZ-PASTOR, M.T.; ESTRUCH, F.; AMMERER, G.; HAMILTON, B.; RUIS, H.; SCHULLER, C. (1998). Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev*, 12: 586-59
- GRANT, P.A.; SCHIELTZ, D.; PRAY-GRANT, M.G.; STEGER, D.J.; REESE, J.C. (1998b). The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol. Cell*, 2: 863–867.
- GREEN, M.R. (2005). Eukaryotic transcription activation: right on target. *Molecular cell*, 18: 399-402
- HAHN, S. (1998). Activation and the role of reinitiation in the control of transcription by RNA polymerase II. *Biol*, 63: 181–188.
- HAHN, S.; YOUNG, E.T. (2011). Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics*, 189: 705-736.
- HALLIWELL, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141: 312–322.
- HARSHMAN, K.D.; MOYE-ROWLEY, W.S.; PARKER, C.S. (1998). Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell*, 53:321-330.
- HE, X.J.; MULFORD, K.E.; FASSLER, J.S. (2009). Oxidative Stress Function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 Receiver Domain. *Eukaryotic Cell*, 8: 768-778.
- HIRAYAMA, T.; MAEDA, T.; SAITO, H.; SHINOZAKI, K. (1995). Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (*HOR*) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet*, 249:127–138.
- 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.
- HUISINGA, K.L.; PUGH, B.F. (2004). A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell*, 13: 573–585.
- IKNER, A.; SHIOZAKI, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res*, 569:13-27.
- KARGLEN, S.; PETERSSON, N.; NORDLANDER, B.; MATHAI, J.C.; BRODSKY, J.L.; ZEIDEL, M.L.; BILL, R.M.; HOHMANN, S. (2005). Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmotic stress signaling. *J. Biol. Chem*, 280: 7186-7193
- KEAVENEY, M.; STRUHL, K. (1998). Activator-mediated recruitment of the RNA polymerase II machinery is the predominant mechanism for transcriptional activation in yeast. *Mol. Cell*, 1: 917–924.

- KLIPP, E.; NORDLANDER, B.; KRUGER, R.; GENNEMARK, P.; HOHMANN, S. (2005). Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat. Biotechnol*, 23: 975–982.
- KLUG, W.S.; CUMMINGS, M.R.; SPENCER, C.A. (2006). *Conceptos de genética*. Octava edición, Editorial Pearson Educación S.A. Madrid. 920pp.
- KUGE, S.; ARITA, M.; MURAYAMA, A.; MAETA, K.; IZAWA, S.; INOUE, Y.; NOMOTO, A. (2001). Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol*, 21:6139-6150
- KUGE, S.; JONES, N.; NOMOTO, A. (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J*, 16:1710-1720
- LARSSON, K.; ERIKSSON, P.; ANSELL, R.; ADLER, L. (1993). A gene encoding *sn*-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol*, 10:1101–1111.
- LEE, T.I.; CAUSTON, H.C.; HOLSTEGE, F.C.; SHEN, W.C.; HANNETT, N. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature*, 405: 701–704.
- LEE, J.; GODON, C.; LAGNIEL, G.; SPECTOR, D.; GARIN, J.; LABARRE, J.; TOLEDANNO, M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem*, 274:16040-16046.
- LI, S.; AULT, A.; MALONE, C.L.; RAITT, D.; DEAN, S.; JOHNSTON, L.H.; DESCHENES, R.J.; FASSLER, J.S. (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *Embo J*, 17:6952-6962.
- LIU, X.; VORONTCHIKHINA, M.; WANG, Y.L.; FAIOLA, F.; MARTINEZ, E. (2008). STAGA recruits Mediator to the MYC oncoprotein to stimulate transcription and cell proliferation. *Mol. Cell. Biol*, 28: 108–121.
- LUYTEN, K.; ALBERTYN, J.; SKIBBE, W.F.; PRIOR, B.A.; RAMOS, J.; THEVELIN, J.M.; HOHMANN, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J*, 14:1360–1371.
- MAEDA, T.; TAKEWAKA, M.; SAITO, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269: 554–558.
- MAEDA, T.; WURGLER-MURPHY S.M.; SAITO, H. (1994). A twocomponent system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369: 242–245.
- MALIK, S.; ROEDER, R.G. (2005). Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.*, 30: 256–263.
- MARTINEZ-MONTAÑES, F.; PASCUAL-AHUIR, A., PROFT, M. (2010). Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmotic stress in yeast. *Omics : a journal of integrative biology*, 14: 619-627
- MARTINEZ-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

- MATANGKASOMBUT, O.; AUTY, R.; BURATOWSKI, S. (2004). Structure and function of the TFIID complex. *Adv. Protein Chem*, 67: 67– 92.
- MATEUS, C.; AVERY, S.V. (2000). Destabilized green fluorescent protein for monitoring dynamic changes in yeast gene expression with flow cytometry. *Yeast*, 16:1313-1323.
- MIRAGLIA, L.; KING, F.; DAMOISEAUX, R. (2011). Seeing the light: luminescent reporter gene assays. *Comb Chem High Throughput Screen*, 14:648-657.
- MONTEIRO, J.P.; MARTINS, A.F.; NUNES, C.; MORAIS, C.M.; LÚCIO, M.; REIS, S.; PINHEIRO, T.J.; GERALDES, C.F.; OLIVEIRA, P.J.; JURADO, A.S. (2013). A biophysical approach to menadione membrane interactions: relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochim Biophys Acta*, 1828: 1899-1908.
- MORANO, K.A.; GRANT, C.M.; MOYE-ROWLEY, W.S. (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190: 1157–1195
- MULFORD K.E.; FASSLER, J.S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic Cell*, 10: 761-769.
- MURPHY, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J*, 417: 1–13.
- NORBECK, J.; PAHLMAN, A.K.; AKHTAR, N.; BLOMBERG, A.; ADLER, L. (1996). Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem*, 271:13875–13881.
- PAHLMAN, A.K.; GRANATH, K.; ANSELL, R.; HOHMANN, S.; ADLER, L. (2001). The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J. Biol. Chem*, 276:3555–3563.
- PATIKOGLU, G.; BURLEY, S.K. (1997). Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 26:289-325.
- POSAS, F.; SAITO, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, 276: 1702–1705.
- POVEDA, D. (2014). *Estudio en tiempo real de la dinámica y memoria transcripcional en la adaptación a estrés*. Trabajo Final de Carrera. Univ. Politécnica de Valencia. 120pp.
- PROFT, M.; PASCUAL-AHUIR, A.; de NADAL, E.; ARIÑO, J.; SERRANO, R. (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.
- PROFT, M.; STRUHL, K. (2002). Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol. Cell*, 9:1307-1317

- PROFT, M.; STRUHL, K. (2004). MAP Kinase-Mediated Stress Relief that Precedes and Regulates the Timing of Transcriptional Induction. *Cell Press*, 118:351-361.
- PTASHNE, M.; GANN, A. (2002). *Genes and Signals*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- REEVES, W.M.; HAHN, S. (2005). Targets of the Gal4 transcription activator in functional transcription complexes. *Mol. Cell. Biol*, 25: 9092–9102.
- REP, M.; REISER, V.; GARTNER, U.; THEVELEIN, J.M.; HOHMANN, S.; AMMERER, G.; RUIS, H. (1999). Osmotic stress-induces 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 cell. *Yeast*, 29:219-231.
- ROBERTSON, J.B.; JOHNSON, C.H. (2011). Luminescence as a continuous real-time reporter of promoter activity in yeast undergoing respiratory oscillations or cell division rhythms. *Methods in molecular biology*, 734: 63-79.
- ROBERTSON, J.B.; STOWERS, C.C.; BOCZKO, E.; JOHNSON, C.H. (2008). Real-time luminescence monitoring of cell-cycle and respiratory oscillations in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 17988-17993.
- RUIZ-ROIG, C.; NORIEGA, N.; DUCH, A.; POSAS, F.; de NADAL, E. (2012). The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Mol. Biol. Cell*, 23:4286-4296.
- SAITO, H.; POSAS, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192: 289-318.
- SCHMITT A.P.; MC ENTEE, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 5777-5782
- SCOTT, S.; ABUL-HAMD, A.T.; COOPER, T.G. (2000). Roles of the Dal82p domains in allophanate/oxalurate-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*, 275: 30886–30893.
- STRUHL, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell*, 98: 1–4.
- SWAMY, K.B.; CHO, C.Y.; CHIANG, S.; TSAI, Z.T.; TSAI, H.K. (2009). Impact of DNA-binding position variants on yeast gene expression. *Nucleic acids research*, 37: 6991-7001.
- TOH, T.H.; KAYINGO, G.; der MERWE, M.J.; KILIAN, S.G.; HALLSWORTH, J.E.; HOHMANN, S.; PRIOR, B.A. (2001). Implications of *FPS1* deletion and membrane ergosterol content for glycerol efflux from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, 1:205–211.
- TORNOW, J.; ZENG, X.; GAO, W.; SANTANGELO, G.M. (1993). GCR1, a transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*, complexes with RAP1 and can function without its DNA binding domain. *EMBO J*, 12: 2431–2437.
- TSUZI, D.; MAETA, K.; TAKATSUME, Y.; IZAWA, S.; INOUE, Y. (2004). Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Letters*, 565: 148-154.

VENDRELL, A.; MARTINEZ-PASTOR, M.; GONZALEZ-NOVO, A.; PASCUAL-AHUIR, A.; SINCLAIR, D.A.; PROFT, M.; POSAS, F. (2011). Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the Hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Rep*, 12:1062-1068.

WESTFALL, P.J.; PATTERSON, J.C.; CHEN, R.E.; THORNER, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 105: 12212–12217.

XUE-FRANZEN, Y.; JOHNSON, A.; BRODIN, D.; HENRIKSSON, J.; BURGLIN, T.R. (2010). Genome-wide characterisation of the Gcn5 histone acetyltransferase in budding yeast during stress adaptation reveals evolutionarily conserved and diverged roles. *BMC Genomics*, 11: 200.

YALE, J.; BONHART, H.J. (2001). Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem*, 276: 15996-16007

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 on the external osmotic stress conditions. *Mol. Cell. Biol*, 27: 3900-3910