

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Estudio de la regulación dinámica de la expresión
génica en respuesta a estrés osmótico en levadura.**

TESIS DOCTORAL

Alessandro Rienzo

DIRECTORES

Markus Proft

Amparo Pascual-Ahuir Giner

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad y por el Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.

Para la realización de esta tesis doctoral, el autor ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2009-015162, Proyecto BFU2008-00271, del Ministerio de Educación y Ciencia.

ABSTRACT

Cells respond to environmental stimuli by fine tuned regulation of gene expression. In this thesis we investigate the dose dependent modulation of the genetic response upon nutrient and stress signals in yeast. A destabilized version of firefly luciferase was used in living yeast cells as a real-time reporter for gene expression. This highly sensitive and non-invasive system can be simultaneously used upon many different experimental conditions in small culture aliquots. This allows the dose–response behaviour of gene expression driven by any yeast promoter to be reported and can be used to quantify important parameters, such as the threshold, sensitivity, response time, maximal activity and synthesis rate for a given stimulus.

We applied the luciferase assay to the nutrient-regulated *GAL1* promoter and the stress-responsive *GRE2* promoter. We find that luciferase expression driven by the *GAL1* promoter responds dynamically to growing galactose concentrations, with increasing synthesis rates determined by the light increment in the initial linear phase of activation. The *GAL1* gene is activated with continuously increasing synthesis rates in a well defined range of galactose concentrations, correlating with a dynamic increase of histone remodeling and subsequent association of the RNAPII complex. Dose dependent chromatin remodeling appears to be the basis for the dynamic *GAL1* expression since mutants with impaired histone dynamics show severely truncated dose response profiles.

In the case of the *GRE2* promoter, we demonstrate that the very short-lived version of luciferase used here is an excellent tool to quantitatively describe transient transcriptional activation. The luciferase expression controlled by the *GRE2* promoter responds dynamically to a gradual increase of osmotic or oxidative stress stimuli, which is mainly based on the progressive increase of the time the promoter remains active. In contrast, the *GRE2* promoter operates like an off/on switch in response to increasing osmotic stress with almost constant synthesis rates and exclusively temporal regulation of histone remodeling and RNAPII occupancy. The Gal3 inducer and the Hog1 MAP kinase seem to determine the different dose response strategies at the two promoters. Our analysis reveals important differences in the way dynamic signals create dose sensitive gene expression outputs. Taken together, the luciferase assay described here is an attractive tool to rapidly and precisely determine and compare kinetic parameters of gene expression.

Additionally, the function of the specific transcription factor Smp1 involved in the yeast osmostress response was investigated. Location analyses upon osmotic stress reveal that Smp1 associates preferentially with the whole transcribed regions (ORFs) upon stress as opposed to other transcriptional activators involved in the osmostress response. However, Smp1 seems to be important for stress-activated gene expression only in the presence of the natural induced gene and not of artificial promoter fusions. This highlights the possible role of Smp1 in regulating gene expression from ORF sequences rather than promoter regions.

RESUMEN

Las células responden a los estímulos ambientales a través de una regulación precisa de la expresión génica. En este trabajo se investigó la modulación dosis dependiente de la expresión de genes activados en respuesta a estrés y por nutrientes. Se utilizó una versión desestabilizada de luciferasa de luciérnaga en células vivas de levadura como reportero para la detección de la expresión génica en tiempo real. Este sistema altamente sensible y no invasivo puede ser utilizado simultáneamente en diferentes condiciones experimentales a través de pequeñas alícuotas de cultivo. Esto permite la caracterización dosis-respuesta de la regulación de los promotores de levadura y puede ser utilizado para cuantificar parámetros importantes como el umbral, la sensibilidad, el tiempo de respuesta, la actividad máxima y el ratio de síntesis provocado por un determinado estímulo.

Se aplicó el ensayo luciferasa al promotor *GAL1* regulado por nutrientes y al promotor *GRE2* activado en respuesta a estrés. Se observó que la expresión de la luciferasa activada por el promotor *GAL1* responde de forma dinámica a las crecientes concentraciones de galactosa, con un incremento del ratio de síntesis determinado por el aumento de luz en la fase lineal inicial de la activación, en función de una gama de concentraciones de galactosa bien definidas. Este mecanismo de regulación depende de un aumento en la remodelación de las histonas y la consecuente asociación del complejo ARN pol II. La remodelación de la cromatina dosis dependiente parece ser la base de la expresión dinámica de *GAL1*, pues los mutantes relacionados con la dinámica de las histonas muestran perfiles dosis respuesta severamente afectados.

En el caso del promotor *GRE2*, se demostró que una versión de una luciferasa desestabilizada es una herramienta excelente para describir de forma cuantitativa la

activación transcripcional transitoria. La expresión de la luciferasa controlada por el promotor *GRE2* responde de forma dinámica al aumento gradual de estímulo de estrés osmótico u oxidativo. La activación se observa principalmente en el incremento progresivo del tiempo en que el promotor permanece activo. Diferentemente de *GAL1*, el promotor *GRE2* opera a través de un cambio apagado/encendido en respuesta a un aumento de estrés osmótico a través de ratios de síntesis prácticamente constantes y cuya regulación solamente depende de la remodelación de la cromatina y de la permanencia de la ARN pol II. Finalmente, se puede especular que el inductor Gal3 y la MAPK Hog1 son las moléculas determinantes para las diferentes estrategias de respuesta dinámica para los dos promotores. En este trabajo se identifican importantes diferencias en la señalización dinámica determinada por la dosis de estímulo en la expresión génica. En conjunto, el ensayo de luciferasa presentado en este trabajo puede ser una herramienta interesante para determinar y comparar de forma rápida y precisa los parámetros de la expresión génica.

Adicionalmente se investigó la función del factor de transcripción Smp1 involucrado en la respuesta a osmoestrés en levadura. Un análisis de la asociación a la cromatina in vivo bajo estrés osmótico demostró que Smp1 se une preferentemente a regiones transcritas (ORFs) lo que refleja un comportamiento diferente comparando con otros activadores transcripcionales de la respuesta a estrés osmótico. Sin embargo, Smp1 parece ser importante para la expresión génica activada por estrés osmótico sólo en la presencia del gen natural inducido y no de fusiones artificiales del promotor. Esto evidencia el posible papel de Smp1 en la regulación de la expresión génica desde secuencias ORF y no en las regiones promotoras.

RESUM

Les cèl·lules responen als estímuls ambientals a través d'una regulació precisa de l'expressió gènica. A aquest treball es va investigar la modulació dosi dependent de l'expressió de gens activats en resposta a estrès i per nutrients. Es va utilitzar una versió desestabilitzada de luciferasa de cuca de llum en cèl·lules vives de llevat com a reporter per a la detecció de l'expressió gènica a temps real. Aquest sistema altament sensible i no invasiu pot ser utilitzat simultàniament en diferents condicions

experimentals a través de xicotetes alíquotes de cultiu. Això permet la caracterització dosi-resposta de la regulació dels promotors de llevat i pot ser utilitzat per a quantificar paràmetres importants com el llindar, la sensibilitat, el temps de resposta, l'activitat màxima i el rati de síntesi provocat per un determinat estímul.

L'assaig luciferasa es va aplicar al promotor GAL1 regulat per nutrients i al promotor GRE2 activat en resposta a estrès. Es va observar que l'expressió de la luciferasa activada pel promotor GAL1 respon de forma dinàmica a les creixents concentracions de galactosa, amb un increment del rati de síntesi determinat per l'augment de llum en la fase lineal inicial de l'activació, en funció d'una gama de concentracions de galactosa ben definides. Aquest mecanisme de regulació depèn d'un augment en la remodelació de les histones i la conseqüent associació del complex ARN pol II. La remodelació de la cromatina dosi dependent sembla ser la base de l'expressió dinàmica de GAL1, ja que els mutants relacionats amb la dinàmica de les histones mostren perfils dosi-resposta severament afectats.

En el cas del promotor GRE2, es va demostrar que una versió d'una luciferasa desestabilitzada és una eina excel·lent per a descriure de forma quantitativa l'activació transcripcional transitòria. L'expressió de la luciferasa controlada pel promotor GRE2 respon de forma dinàmica a l'augment gradual d'estímul d'estrès osmòtic o oxidatiu. L'activació s'observa principalment a l'increment progressiu del temps al qual el promotor roman actiu. De forma diferent de GAL1, el promotor GRE2 opera a través d'un canvi apagat/encès en resposta a un augment d'estrès osmòtic a través de ratis de síntesi pràcticament constants i als quals la seua regulació només depèn de la remodelació de la cromatina i de la permanència de l'ARN pol II. Finalment, es pot especular que l'inductor Gal3 i la MAPK Hog1 són les molècules determinants per a les diferents estratègies de resposta dinàmica per als dos promotors. A aquest treball s'identifiquen importants diferències a la senyalització dinàmica determinada per la dosi d'estímul a l'expressió gènica. En conjunt, l'assaig luciferasa presentat a aquest treball pot ser una eina interessant per a determinar i comparar de forma ràpida i precisa els paràmetres de l'expressió gènica.

Adicionalment, es va investigar la funció del factor de transcripció Smp1 involucrat en la resposta a osmoestrès en llevat. Una anàlisi de l'associació a la cromatina in vivo sota l'estrès osmòtic va demostrar que Smp1 s'uneix preferentment a regions transcrites (ORFs), el qual reflecteix un comportament diferent comparant amb altres activadors transcripcionals de la resposta a estrès osmòtic. Tot i així, Smp1 sembla ser important per a l'expressió gènica activada per estrès osmòtic només en la presència

del gen natural induït i no de fusions artificials del promotor. Això evidencia el possible paper de Smp1 en la regulació de l'expressió gènica des de seqüències ORF i no a les regions promotores.

Agradecimientos

Siempre había pensado que escribir la hoja de agradecimientos fuese una mera formalidad, algo que había que hacer "porque si", respetando el clásico esquema de agradecer a los jefes primero y luego los profesores más importantes y los compañeros de laboratorio, y finalmente a la familia y a las personas queridas que igual no han tenido nada que ver con la escritura de la tesis.

Y ahora que estoy delante de la pantalla del ordenador se me hace difícil "cumplir con esta formalidad", porque lo que voy a escribir, aunque siga el esquema más clásico de los agradecimientos, es algo que no siento como una formalidad sino que expresa mi más sincera gratitud.

Muy agradecido a mis jefes, Markus y Payo, por haber creído en mi y por haber seguido confiando en mis capacidades pese a los fracasos, reluciendo una paciencia que a veces he llegado hasta a envidiar. Siempre encontrando el tiempo para atender mis dudas, siempre encontrando nuevas soluciones a los problemas, siempre dedicándome más tiempo de lo que he pedido y siempre generando un un ambiente de trabajo familiar en el que muy pocos doctorandos puedan haber disfrutado, quitando importancia a los errores, valorando los éxitos, estando pendientes de mi trabajo sin agobiarme ni una vez. Y dejándome trabajar siempre a mi manera y a mi estilo.

Agradecido a Paco Madueño por haberme dado la posibilidad de llegar a España, por haber creído en mi tratándome con amistad y respeto, haciendo mucho más de lo que habría debido de hacer por mi sin que yo se lo pidiera.

Agradecido a Ramón y Mariche por ayuda, apoyo moral y por haber generado un ambiente de trabajo que no lo puedo ni contar a los amigos porque no me tomarían en serio. Recuerdo que acababa de llegar a España y ni los conocía, pero me invitaron a una paella en su casa en la playa, luego se tuvieron que marchar y nos dejaron las llaves para que se la devolviésemos el lunes siguiente. Éramos unos 20-25 entre estudiantes, doctorandos y post doc. Yo no estaba ni en su laboratorio.

Cierto es que si el buen ambiente del laboratorio es en parte responsabilidad de los jefes, por otra parte también es haber tenido la

suerte de encontrar unos compañeros muy simpáticos. Podría llenar hojas con anécdotas y recuerdos, pero éste no es ni el sitio más apropiado, ni sería conveniente por algunos compañeros. :) Así que voy a citar simplemente sus nombres, aunque cada uno esté muy atado a muchos recuerdos del pasado y del presente. Empezando por orden cronológico: Fernando "Fernan Lee", Marta, Mar, Rafa "Rafinski", Alba, Elena, Laura, Isa, Pablo, Sara, Dani, amigos antes que compañeros de laboratorio.. pero también compañeros de otros laboratorios como Gaetano, Edu, Borja, Ceci, Patricia, Laura, Vanesa, Lucía, Marta, Ana, Majo, Marta, Gerardo, Yassine.. el elenco es muy largo! Un gracias (doble) para Alba que curó el "resum" en valenciano!

Por último pero no por orden de importancia, quiero agradecer a mi familia que siempre ha creído en mí y me ha apoyado en mis elecciones. Me refiero a mis padres pero también a mi novia y mi hija que en realidad ha entorpecido bastante la escritura de mi tesis con su nacimiento pero me ha regalado una energía vital constante que me ha sido imprescindible para escribir y terminar este trabajo.

Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
1. El proceso de la activación transcripcional en células eucariotas.....	1
2. Maquinaria de la transcripción y estructura de la cromatina.....	2
2.1 SWI/SNF.....	6
2.2 SAGA.....	7
2.3 MEDIADOR.....	7
2.4 Variante de la histona H2A.Z.....	8
3. Los genes <i>GAL</i> : Sistema modelo para comprender la activación transcripcional en levadura.	9
3.1 Genes estructurales del sistema <i>GAL</i>	9
3.2 Regulación de los genes <i>GAL</i>	10
3.3 Función de modificadores de la cromatina en la inducción de los genes <i>GAL</i>	13
4. Respuesta a estrés osmótico en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
5. Genes reporteros.....	26
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y condiciones de crecimiento.....	36
2. Transformación de levadura.....	38
3. La medición de la actividad de la luciferasa en tiempo real en células de levadura in vivo.....	39
4. Construcción de plásmidos.....	40
5. Manipulaciones de ADN.....	41
6. Purificación de ARN total de levadura con fenol ácido.	43
7. PCR cuantitativa en tiempo real con EVA Green™	47
8. Electroforesis de ácidos nucleicos.....	48
9. Northern blot.....	49
RESULTADOS	54

1. Construcción y optimización de un sistema luciferasa para la cuantificación de la expresión génica en células vivas de levadura.....	54
2. Determinación de la regulación dinámica del promotor <i>GAL1</i> en respuesta a la concentración del inductor galactosa usando el sistema luciferasa.....	56
3. Determinación de la dinámica de acumulación de ARN pol II y remodelación de la cromatina en el promotor <i>GAL1</i>	58
4. El efecto de mutaciones en los complejos SWI/SNF, SAGA y mediador y en la histona H2A.Z a la respuesta dinámica del promotor de <i>GAL1</i>	61
5. Efecto de mutaciones en SAGA, SWI/SNF, MEDIATOR a la remodelación dinámica de las histonas en el promotor <i>GAL1</i>	64
6. Determinación de la regulación dinámica del promotor <i>GRE2</i> en respuesta a estrés hiperosmótico usando el sistema luciferasa: Un ejemplo para la activación transitoria de un promotor por estrés ambiental.....	66
7. Reclutamiento de ARN pol II y remodelación de la cromatina en el promotor <i>GRE2</i>	71
8. El efecto de mutaciones en los complejos SWI/SNF, SAGA y mediador y en la histona H2A.Z a la respuesta dinámica del promotor de <i>GRE2</i>	73
9. Determinación de la regulación dinámica del promotor <i>GRE2</i> en respuesta a estrés oxidativo.	76
10. Determinación de la dosis-respuesta de otros promotores activados por estrés....	78
11. Estudio de los mecanismos que confieren los perfiles dosis-respuesta en los genes <i>GAL1</i> y <i>GRE2</i>	82
12. Estudios de la función de Smp1 en la respuesta a estrés salino.....	85
12.1. Determinación de la dinámica de la acumulación de Smp1 en los genes osmoinducibles <i>GRE2</i> , <i>HOR2</i> y <i>ALD6</i>	86
12.2 Función de Smp1 en la activación de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico.....	92

12.3 Estudio de la función de Smp1 en la regulación de genes reporteros inducibles por NaCl.....	94
DISCUSIÓN.....	98
CONCLUSIONES.....	110
BIBLIOGRAFÍA.....	112
ANEXO.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organización del ADN en el núcleo.....	3
Figura 2. Papel de las enzimas pertenecientes al regulón <i>GAL</i> en el metabolismo de la galactosa en levadura.....	9
Figura 3. Los tres estados de regulación del promotor <i>GAL1</i> en función de la fuente de carbono en el medio de crecimiento.....	11
Figura 4. Regulación bajo estrés osmótico de la expresión génica a través de la ruta HOG.....	18
Figura 5. Esquema de los factores de transcripción específicos activados por Hog1 en condiciones de estrés abiótico.....	21
Figura 6. Modelo de represión/activación de Sko1-Cyc8-Tup1 regulado por la MAP kinasa Hog1 en respuesta a estrés.....	22
Figura 7. Perfiles de unión de Smp1 a lo largo de las regiones codificantes de genes osmoinducibles.....	25
Figura 8 . Estructura de la luciferasa de luciérnaga.....	30
Figura 9. Etapas de la oxidación de luciferina por la luciferasa de luciérnaga.....	31
Figura 10. Construcciones de plásmidos generados en el trabajo presentado.....	55
Figura 11. Perfiles de la actividad in vivo del promotor <i>GAL1</i> en presencia de diferentes concentraciones de galactosa.....	57
Figura 12. Tasas de síntesis máxima y tiempos de respuesta para el promotor del gen <i>GAL1</i> en respuesta a diferentes concentraciones de galactosa.....	58

Figura 13. Reclutamiento de ARN pol II en función de la concentración de galactosa en el promotor <i>GAL1</i>	60
Figura 14. Cuantificación de la asociación de la histona H3 en función de la concentración de galactosa en el promotor <i>GAL1</i>	61
Figura 15. Perfiles dosis-respuesta del promotor <i>GAL1</i> en células de levadura sometidas a diferentes concentraciones de galactosa en los mutantes (a) <i>gcn5</i> , (b) <i>snf2</i> (c) <i>htz1</i> y (d) <i>gal11</i> , utilizando la construcción p413 <i>GAL1</i> -lucCP ⁺	62
Figura 16. Los complejos SAGA, SWI/SNF, Mediator y la histona Htz1 son importantes para la respuesta dinámica del promotor <i>GAL1</i> a diferentes concentraciones de galactosa.....	64
Figura 17. Cuantificación de la asociación de la histona H3 en función de la concentración de galactosa en el promotor <i>GAL1</i>	65
Figura 18. Perfiles dosis-respuesta del promotor <i>GRE2</i> bajo diferentes concentraciones de (a) NaCl, (b) KCl y (c) sorbitol.....	67
Figura 19. Perfiles de la tasa máxima de síntesis (V _{max}) y de actividad máxima (A _{max}) de <i>GRE2</i> en condiciones de diferentes estreses.....	69
Figura 20. Cuantificación de la asociación de la ARN polimerasa II (A) y de la histona H3 (B) en función de la concentración de NaCl en el promotor <i>GRE2</i>	72
Figura 21: Perfiles dosis-respuesta del promotor <i>GRE2</i> sometido a diferentes concentraciones de NaCl en los mutantes (a) <i>snf2</i> , (b) <i>gcn5</i> (c) <i>htz1</i> y (d) <i>gal11</i> , utilizando la construcción p413 <i>GRE2</i> -lucCP ⁺	74
Figura 22. Función de los complejos SAGA, SWI/SNF, Mediator y la histona Htz1 en la respuesta dinámica del promotor <i>GRE2</i> a diferentes concentraciones de NaCl.....	76
Figura 23. Comportamiento dosis-respuesta del promotor de <i>GRE2</i> en condiciones de estrés oxidativo.....	77
Figura 24. Perfiles dosis-respuesta de los promotores (A) <i>HOR2</i> y (B) <i>ALD6</i> bajo diferentes concentraciones de NaCl.....	79
Figura 25. Comparación de la Actividad Máxima y de la Velocidad Máxima de diferentes promotores de genes osmoinducibles en presencia de NaCl.....	80
Figura 26. Perfiles dosis-respuesta de los promotores (A) <i>SOD2</i> y (B) <i>CTT1</i> bajo diferentes concentraciones de menadiona.....	81
Figura 27. Comparación de la Actividad Máxima y de la Velocidad Máxima de diferentes promotores de genes de respuesta a estrés oxidativo en presencia de Menadiona.....	82
Figura 28. La asociación de Gal4 y Gal3 con <i>GAL1</i> en el rango dinámico de concentraciones de galactosa.....	84

Figura 29. La asociación de Sko1 y Hog1 con el promotor <i>GRE2</i> condiciones de estrés salino.....	85
Figura 30. Determinación de la dinámica de la asociación de Smp1 en los genes osmoinducibles (A) <i>GRE2</i> , (B) <i>HOR2</i> y (C) <i>ALD6</i>	86
Figura 31. Determinación de la dinámica de asociación de Rpb3 en los genes osmoinducibles (A) <i>GRE2</i> , (B) <i>HOR2</i> y (C) <i>ALD6</i>	88
Figura 32. Determinación de la densidad del factor de transcripción Sko1 en distintas regiones de los genes osmoinducibles <i>GRE2</i> y <i>HOR2</i>	90
Figura 33. Determinación de la densidad del factor de transcripción Hot1 en distintas regiones de los genes osmoinducibles <i>GRE2</i> y <i>HOR2</i>	91
Figura 34. Análisis de transcripción de los genes osmoinducibles <i>ALD6</i> , <i>GRE2</i> y <i>HOR2</i> bajo estrés osmótico en presencia y ausencia del factor de transcripción Smp1.....	93
Figura 35. Comparación de los perfiles dosis-respuesta de los promotores <i>GRE2</i> y <i>ALD6</i> bajo diferentes concentraciones de NaCl en presencia y ausencia del factor Smp1.....	94
Figura 36. Modelo: Comparación de la regulación dosis-dependiente de la expresión génica de genes en respuesta a estrés con genes regulados por nutrientes.....	103

ÍNDICE DE LAS TABLAS

Tabla 1: Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.....	36
Tabla 2: Plásmidos utilizados en este trabajo.....	41
Tabla 3: Sondas utilizadas para los diferentes análisis <i>Northern</i>	51

ABREVIATURAS

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- Amax** Actividad máxima
- ARN** Ácido ribonucleico
- ARNm** Ácido ribonucleico mensajero
- bp** *Base pair* (par de bases)
- BSA** *Bovine Serum Albumin* (álbumina de suero bovino)
- ChIP** *Chromatin Immunoprecipitation* (Inmunoprecipitación de cromatina)
- CT** Cromatina Total
- dCTP** *2'-deoxycytidine 5'-triphosphate* (2'-deoxicitidina 5'-trifosfato)
- DMSO** *Dimethyl Sulfoxide* (dimetil sulfóxido)
- dATP** *Deoxyadenosine triphosphate* (desoxiadenosin trifosfato)
- dCTP** *Deoxycytidine triphosphate* (desoxicitidín trifosfato)
- dGTP** *Deoxyguanosine triphosphate* (desoxiguanosin trifosfato)
- dNTP** *Deoxynucleotide Triphosphate* (desoxinucleótido trifosfato)
- dTTP** *Deoxythymidine triphosphate* (desoxitimidín trifosfato)
- EC50** *half maximal effective concentration* (concentración media efectiva)
- EDTA** *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (ácido etilen diamino tetraacético)
- g** gramos
- GFP** *Green Fluorescent Protein* (proteína fluorescente verde)
- h** Horas
- HA** Hemaglutinina
- HEPES** *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperaziniletanosulfónico)
- HOG** *High Osmolarity Glycerol* (ruta de respuesta a alta osmolaridad)
- IP** Muestras Inmunoprecipitadas
- J** Julio
- kan^r** Gen de resistencia a kanamicina
- kb** Kilobases
- kDa** KiloDaltons
- l** litros
- LB** Medio Luria-Bertani
- M** molaridad
- MAPK** *Mitogen Activated Protein Kinase* (proteína quinasa activada por mitógeno).
- MAPK** *Mitogen Activated Protein Kinase* (proteína quinasa activada por mitógeno).
- MAPKK** *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase* (proteína quinasa quinasa activada por mitógeno).
- MAPKKK** *Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase* (proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno).
- min** Minutos
- mol** moles
- MOPS** *3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*, (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico)
- myc** Péptido de la proteína de humanos c-myc
- OD** *Optical Density* (densidad óptica)
- ORF** *Open Reading Frame* (pauta de lectura abierta)

O/N *Over Night* (hasta el día siguiente)

p peso

PBS *Phosphate-Buffer Saline* (tampón salino de fosfatos)

PCR *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PEG *Polyethylene Glycol* (polietilenglicol)

PMSF *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoruro de fenilmetilsulfonyl)

qPCR *quantitative Polymerase Chain Reaction* (reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa)

rpm Revoluciones por minuto

SRaff Medio mínimo SD con Rafinosa como fuente de carbono

SD *Synthetic Defined* (medio mínimo)

SDS *Sodium Dodecyl Sulfate* (dodecil sulfato sódico)

SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico)

SSC *Sodium Saline Citrate* (citrateo salino sódico)

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

Ta temperatura de annealing

TAE *Tris-Acetate-EDTA* (tampón Tris-acetato-EDTA)

TAP *Tandem Affinity Purification* (Purificación doble de proteínas por afinidad)

TBS *Tris-buffered saline* (tampón salino de Tris)

TEMED *Tetramethylethylenediamine* (tetrametiletilenodiamina)

Tm temperatura de melting

Tris *Tris(hydroxymethyl)aminomethane* (tris(hidroximetil) aminometano)

UV ultravioleta

V voltios

v volumen

Vmax Velocidad máxima

W Watios

Wt *Wild Type* (cepa silvestre)

YPD *Yeast extract-Petpone-Dextrose* (Medio rico).

° C Grados centígrados.

INTRODUCCIÓN

1. El proceso de la activación transcripcional en células eucariotas.

Uno de los procesos celulares que controla de forma más directa la expresión génica es la transcripción del ADN, llevada a cabo por la enzima ARN polimerasa (ARN pol). La transcripción es un proceso mediante el cual se transfiere la información contenida en una secuencia del ADN hacia una secuencia de aminoácidos, utilizando diversos ARN como intermediarios. Durante la transcripción genética, las secuencias de ADN son copiadas a ARN mediante ARN polimerasas que sintetizan un ARN mensajero, manteniendo la información de la secuencia del ADN. En el caso de las eucariotas, el proceso se realiza en el núcleo.

La levadura, como los demás organismos eucariotas, presenta tres tipologías de ARN Pol, ARN Polimerasa I, II y III, que se encargan de producir diferentes tipos de ARNs. La ARN Pol I se ocupa de la síntesis de una parte del ARN ribosómico, la ARN Pol III se encarga de transcribir ARNs de pequeño tamaño como el ARN de transferencia, mientras que la ARN Pol II es la holoenzima responsable de la iniciación de la maquinaria de la transcripción y, generalmente, lleva a cabo la síntesis de ARN mensajero (ARNm) *in vivo*, molécula responsable de codificar para proteínas estructurales y otros ARNs no codificantes (Barberis *et al.*, 1995; Hengartner *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1994; Koleske and Young, 1994; Thompson and Young, 1995; Emili and Ingles, 1995; Koleske and Young, 1995). La ARN polimerasa II (pol II) actúa en conjunto con cinco factores generales de transcripción conocidos como TFIIB, -D, -E, -F y -H ya que sola no es capaz de reconocer un promotor e iniciar la transcripción (Conaway and Conaway, 1997).

La maquinaria de la transcripción es un complejo proteico que contiene ARN pol II, factores de transcripción generales y componentes adicionales llamados proteínas reguladoras del supresor de la ARN polimerasa B (SRB), necesarias para el crecimiento de la célula de levadura (Maldonado *et al.*, 1996).

El proceso de transcripción de la ARN Pol II se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. El inicio de la transcripción en eucariotas (y en levadura), es un proceso altamente regulado en el que participan un gran número de proteínas, desde factores de transcripción que se unen de forma específica al ADN, hasta complejos remodeladores y modificadores de la cromatina, que alteran esta estructura,

controlando la unión de estos mismos activadores y permitiendo a continuación la unión de los componentes de la maquinaria general de la transcripción y la ARN Pol II (Struhl *et al.*, 1998; Pugh, 2000; Orphanides y Reinberg, 2002; Li *et al.*, 2007).

El mecanismo de la transcripción empieza con la unión de los activadores transcripcionales en secuencias específicas del ADN en respuesta a señales celulares. Estos factores reclutan a coactivadores transcripcionales como por ejemplo los complejos remodeladores de cromatina ATP dependientes y los complejos modificadores de histonas, que producen una relajación de la estructura de la cromatina, permitiendo así la entrada de los factores generales de la transcripción (GTFs) y la ARN Pol II para la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC). Cabe recordar que la organización de la cromatina es capaz de afectar todas las etapas de la transcripción, desde la unión del activador transcripcional, hasta la formación del PIC, y también pasos posteriores como la elongación (revisado en Workman and Kingston, 1998).

2. Maquinaria de la transcripción y estructura de la cromatina.

El genoma de los organismos eucariotas se organiza dentro del núcleo celular en una estructura altamente regulada denominada cromatina, cuya unidad fundamental es el nucleosoma. Los nucleosomas son estructuras básicas compuestas por una parte proteica constituida por un hétero-octámero de histonas y una porción de ADN de 146 pares de bases enrollada en la misma histona (Luger *et al.*, 1997). Cada octámero está compuesto por dos copias de cada uno de los heterodímeros H2A, H2B, H3 y H4 (Schafer *et al.*, 2005) (Figura 1 B).

Se forma por lo tanto una estructura que se puede compactar en órdenes superiores, para formar una fibra de 30 nm por ejemplo (transcripcionalmente inactiva) que, en función de las exigencias de la célula, puede volver a desorganizarse para que las secuencias de ADN puedan ser utilizadas otra vez para la transcripción (Luger and Hansen, 2005). Estas fibras se pueden organizar en fibras de orden aún superior hasta formar los cromosomas, una estructura altamente compacta durante la mitosis (Figura 1 A).

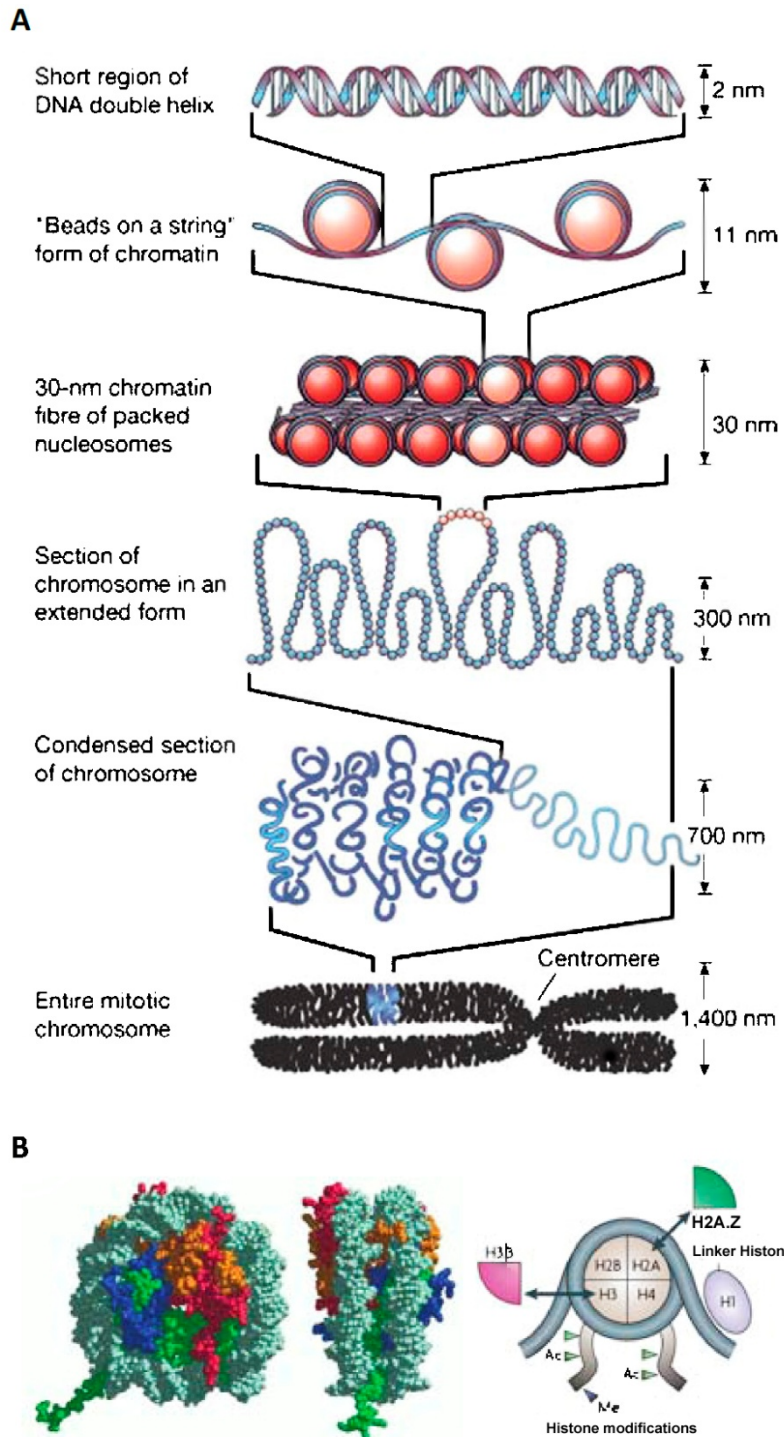


Figura 1: Organización del ADN en el núcleo. (A) Estructura del ADN en la cromatina. La organización más básica es constituida por el nucleosoma; aumentando el orden del nivel de organización, las estructuras se compactan formando en principio una fibra de 30 nm de diámetro. Estas fibras se pueden organizar originando estructuras de orden superior. (B) Organización del nucleosoma obtenido a través de una difracción de rayos X (frontalmente y lateralmente). Las histonas son representadas por diferentes colores mientras que el ADN se corresponde a la estructura gris. A la derecha, representación esquemática del nucleosoma,

donde se indican unos ejemplos de modificación de histonas (Ac, acetilación y Me, metilación) y las variantes de histonas, H3.3 y H2A.Z (Figuras de Jiang and Pugh 2009b; Luger *et al.* 1997; Felsenfeld and Groudine, 2003).

La transcripción regulada de los genes de clase II (genes que codifican proteínas) implica una asociación entre activadores y represores específicos, cofactores, complejos transcripcionales generales y cromatina. Activadores (y represores) se unen de forma específica a los promotores y estimulan (o inhiben) la transcripción. La activación transcripcional consiste, por lo menos en parte, en facilitar el reclutamiento de la maquinaria transcripcional en el sitio de la iniciación de la transcripción (Cheng *et al.*, 1994; Hengartner *et al.*, 1995; Ingles *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991; Xiao *et al.*, 1994; Sheldon and Reinberg, 1995; Emili and Ingles, 1995 ; Carey, 1995).

La estructura de la cromatina y la presencia de nucleosomas en el ADN genómico en organismos eucariotas es uno de los principales obstáculos para la transcripción eficiente de los genes (Knezetic and Luse, 1986; Bresnick and Felsenfeld, 1993; Felsenfeld, 1992; Lorch *et al.*, 1988; Workman and Roeder, 1987).

El acceso de la maquinaria transcripcional a la cromatina es regulado por enzimas modificadores de la cromatina, que suelen formar parte de grandes complejos proteicos. Las histonas, a través de una cola N-terminal y de los dominios globulares, pueden ser modificadas post-traduccionalmente en residuos específicos, alterando de esta forma la estructura de la cromatina a través de interacciones directas con los elementos del nucleosoma y de la maquinaria nuclear (Kouzarides, 2007). En función del mecanismo de acción, se clasifican en dos grupos fundamentales: (i) los complejos modificadores de histonas que catalizan la modificación post-traduccionale de las histonas y (ii) los complejos remodeladores de la cromatina que alteran las interacciones entre el ADN y las histonas de forma ATP dependiente.

(i) Los complejos modificadores de histonas alteran la estructura de la cromatina a través de la modificación química de las histonas con grupos fosfatos, metilos o acetilos. Otras modificaciones han sido también descritas, como la ubiquitinación, la sumoilación y la ADP-ribosilación. A excepción de la ubiquitinación que ocurre en los extremos C-terminales de las subunidades H2A y H2B, las otras reacciones se

producen en los extremos N-terminales de las colas de las histonas y, adicionalmente, en sus dominios globulares (Kouzarides, 2007).

Generalmente, a excepción de la metilación, la modificación de histonas produce cambios en la carga neta de los nucleosomas, lo cual debilita las interacciones establecidas entre el ADN y las histonas, disminuyendo la estabilidad del nucleosoma. Algunas modificaciones pueden también influir directamente en estructuras de orden superior de la cromatina, generando por ejemplo sitios de reconocimiento para otras proteínas (Seet *et al.*, 2006).

Las modificaciones de histonas mejor caracterizadas son la acetilación y la deacetilación. Las histonas acetiltransferasas (HAT) son una familia de enzimas que acetila grupos ϵ -amino de las lisinas, altamente conservados en las histonas. Para esta reacción se requiere el cofactor acetil-CoA como donador de grupo acetilo. La acetilación de la lisina introduce una carga negativa y neutraliza por lo tanto la interacción entre la cola de la histona y el grupo fosfato del ADN, produciendo la pérdida del empaquetamiento de las histonas H3 y H4 sobre el ADN, en un proceso que, generalmente aunque no siempre, está asociado con la activación transcripcional (Deckert and Struhl, 2001; Wu and Grunstein, 2000; Struhl, 1998; Shivaswamy and Iyer, 2008). Además el proceso de acetilación de la lisina crea nuevas superficies de unión para factores que presentan bromodominios, como la subunidad ATPasa del complejo SWI/SNF, el factor TAF250 o la subunidad Gcn5 de los complejos multiproteicos SAGA y ADA (Winston and Allis, 1999).

(ii) En los últimos años se ha podido mostrar que la activación de la expresión génica involucra la participación de numerosos complejos “co-activadores” que son reclutados a sitios activamente transcritos para modular la estructura de la cromatina.

Estos complejos carecen de la capacidad de unirse a los genes de forma específica, por lo que los factores de transcripción suelen dirigir su reclutamiento hacia los promotores donde realizan su acción. Una vez posicionados, utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para alterar las interacciones entre ADN e histonas y mediar diferentes acciones como por ejemplo el deslizamiento de nucleosomas, (variando la posición de estos en el ADN), o la creación de un estado remodelado en el que el ADN sea más accesible aunque las histonas permanezcan unidas, o la disociación completa entre el ADN y las histonas y el reemplazamiento de histonas por variantes de histonas (Mohrmann and Verrijzer, 2005).

Entre los co-activadores más importantes hay que nombrar el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, el complejo SAGA con actividad histona acetilasa y el complejo "Mediator" (Weake and Workman, 2010).

2.1 SWI/SNF.

El complejo multiproteico SWI/SNF, altamente conservado en los organismos eucariotas (Kingston y Narlikar, 1999), es capaz de alterar la posición de los nucleosomas a lo largo del ADN (Whitehouse *et al.*, 1999), produciendo un deslizamiento y desplazamiento total de los nucleosomas diana. Sus funciones, por lo tanto, están normalmente relacionadas con la desorganización de la cromatina para facilitar el anclaje de los complejos transcripcionales y, en consecuencia, con la regulación positiva de la transcripción (Narlikar *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2006; Lorch *et al.*, 1999; Cote *et al.*, 1994; Hirschhorn *et al.*, 1992; Imbalzano *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 1994; Peterson and Tamkun, 1995; Winston and Carlson, 1992). Sin embargo, se conocen también algunos genes regulados negativamente por estos complejos (Angus-Hill *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 1999; Sudarsanam and Winston, 2000).

SWI/SNF tiene la capacidad de unirse al ADN y a los nucleosomas con alta afinidad, pero sin especificidad de secuencia (Côté *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 1996). Aunque el mecanismo por el que actúa este complejo no está del todo claro, estudios recientes han sugerido un modelo en el que utilizaría un sistema de "bombeo" de ADN para generar anillos ("loops") transitorios de ADN en la superficie del octámero (Zhang *et al.*, 2006; Zofall *et al.*, 2006); este mecanismo implica la disociación del ADN en el límite del nucleosoma, con una reasociación del ADN dentro del nucleosoma, formando así una protuberancia de ADN sobre la superficie del octámero. El "bulto" (loop) de ADN se propagaría entonces a lo largo de toda la superficie del octámero de histonas como si fuera una ola. De este modo, el ADN se posicionaría de nuevo sin cambios en el número total de contactos ADN-histona (Flaus and Owen-Hughes, 2003). Este modelo es consistente con la habilidad del complejo para utilizar la energía derivada de la hidrólisis del ATP y generar torsiones superhelicoidales, movilizar nucleosomas y aumentar la accesibilidad del ADN nucleosomal (Smith y Peterson, 2005a; Zofall *et al.*, 2006).

El motor de dicho complejo es la subunidad ATPasa Swi2/Snf2, precursora de una subfamilia de la superfamilia SF2 de ATPasas y helicasas estimuladas por ADN (Flaus

et al., 2006), Swi2-Arp7-Arp9 translocan ADN de forma ATP-dependiente conduciendo al remodelado de la cromatina, posteriormente Swi3-Swp73-Snf6 se unen a histonas produciendo la pérdida de dímeros de histonas H2A-H2B y finalmente Snf5 y Swi1 interaccionan con los dominios de activación acídicos de los factores de transcripción (Prochasson *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2007).

La funcionalidad del complejo SWI/SNF se requiere para la transcripción de menos del 5% de los genes de la levadura en condiciones normales de crecimiento (Holstege *et al.*, 1998), además, se encuentra presente solo entre 100-500 copias por núcleo (Côté *et al.*, 1994). Estas evidencias sugieren que el complejo SWI/SNF debe ser dirigido *in vivo* a lugares específicos dentro de los promotores de los genes que regula (Peterson and Workman, 2000).

2.2 SAGA.

El complejo multiproteico (y multifuncional) SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetiltransferasa), es un coactivador transcripcional de aproximadamente 1,8 MDa involucrado en el mecanismo de inicio y de elongación de la transcripción. Este complejo actúa modificando de forma covalente las colas de las histonas (Roth *et al.*, 2001) a través de dos actividades catalíticas inherentes: una acetiltransferasa de histonas (HAT) catalizada por la subunidad Gcn5 (Balasubramanian *et al.*, 2001) que se dirige preferentemente a la histona H3 (Hampsey, 1997; Brown *et al.*, 2000) y una desubiquitinasa dirigida a la histona H2B (Henry *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2004; Daniel and Grant, 2007). Esta actividad facilita el contacto de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) durante la activación transcripcional en levadura (Barbaric *et al.*, 2003).

Estudios anteriores han demostrado que la subunidad Gcn5 de SAGA se halla en todos los promotores activos y su densidad es proporcional al nivel de actividad transcripcional (Robert *et al.*, 2004). El complejo también realiza otras actividades relacionadas con la transcripción, como facilitar la unión de TBP (TATA-binding protein) (Dudley *et al.*, 1999) o reprimir la transcripción (Ricci *et al.* 2002; Helmlinger *et al.*, 2008).

2.3 MEDIADOR.

Otro complejo multiproteico que funciona como coactivador transcripcional es el Mediador (Liao *et al.*, 1995). Este complejo es necesario para la transcripción de casi

todos los genes de clase II en levadura (Holstege *et al.*, 1998) y se ha demostrado asociarse tanto con factores de transcripción generales como con la ARN polimerasa II, funcionando como un co-activador a través de la unión al dominio C-terminal de la holoenzima ARN polimerasa II y actuando como un puente molecular entre polimerasa y factores de transcripción (Björklund and Gustafsson 2005; Reeves, *et al.*, 2003; Taatjes, 2010).

2.4 Variante de la histona H2A.Z.

Además de las modificaciones histónicas llevadas a cabo por la célula, otro mecanismo de regulación que facilita el proceso de la transcripción de forma directa o indirecta, es la incorporación de variantes de histonas en la cromatina.

El posicionamiento de los nucleosomas a lo largo de la cromatina está fuertemente implicado en la regulación de la expresión génica, ya que el empaquetamiento del ADN en nucleosomas afecta a la accesibilidad de las secuencias (Yuan *et al.*, 2005), impidiendo o facilitando la interacción de las proteínas de unión al ADN con sus secuencias específicamente reconocidas (Anderson and Widom 2000; Wallrath *et al.*, 1994; Venter *et al.*, 1994), y acercando o alejando secuencias de ADN no contiguas para que puedan interactuar con los complejos reguladores de la transcripción (Stunkel *et al.*, 1997). Esta sustitución obliga a la remodelación de nucleosomas con el fin de inducir de forma rápida los genes reprimidos (Ahmad and Henikoff, 2002).

En algunos nucleosomas, la variante histónica H2A.Z (codificada por el gen *HTZ1* en levadura) sustituye a la histona H2A a través del complejo SWR1 (Swi2/Snf2-related ATPase) (Mizuguchi *et al.*, 2004). Esta sustitución está involucrada en la regulación transcripcional de un grupo de genes, antagonizando de esta forma la propagación del silenciamiento por heterocromatina (Santisteban *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001; Larochelle and Gaudreau, 2003; Meneghini *et al.*, 2003). Esta variante constituye el 5-10% de H2A en la cromatina total (West and Bonner, 1980) y su distribución en el genoma es enriquecida en regiones intergénicas (promotoras) más en las regiones codificantes. Su densidad es inversamente proporcional al ratio de transcripción y a la presencia de ARN pol II; no obstante, Htz1 parece no tener una función en la represión transcripcional en levadura (Li *et al.*, 2005). Se demostró además que H2A.Z facilita el plegamiento de los filamentos de nucleosomas en una estructura más compacta, inhibiendo las interacciones intra-fibra y la agregación (Fan *et al.*, 2002).

3. Los genes *GAL*: Sistema modelo para comprender la activación transcripcional en levadura.

El grupo de genes *GAL* es el conjunto de genes estructurales y reguladores que permiten a las células de utilizar galactosa como fuente de carbono; se trata de uno de los sistemas más estudiados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un modelo importante para la comprensión de la regulación transcripcional de eucariotas.

3.1 Genes estructurales del sistema *GAL*.

Los genes *GAL* se agrupan en genes estructurales (*GAL1*, *GAL10*, *GAL2* y *GAL7*) y reguladores (*GAL4*, *GAL80* y *GAL3*) y sus productos génicos son capaces de transportar las moléculas de galactosa al interior de las células y de metabolizarlas (Johnston, 1987).

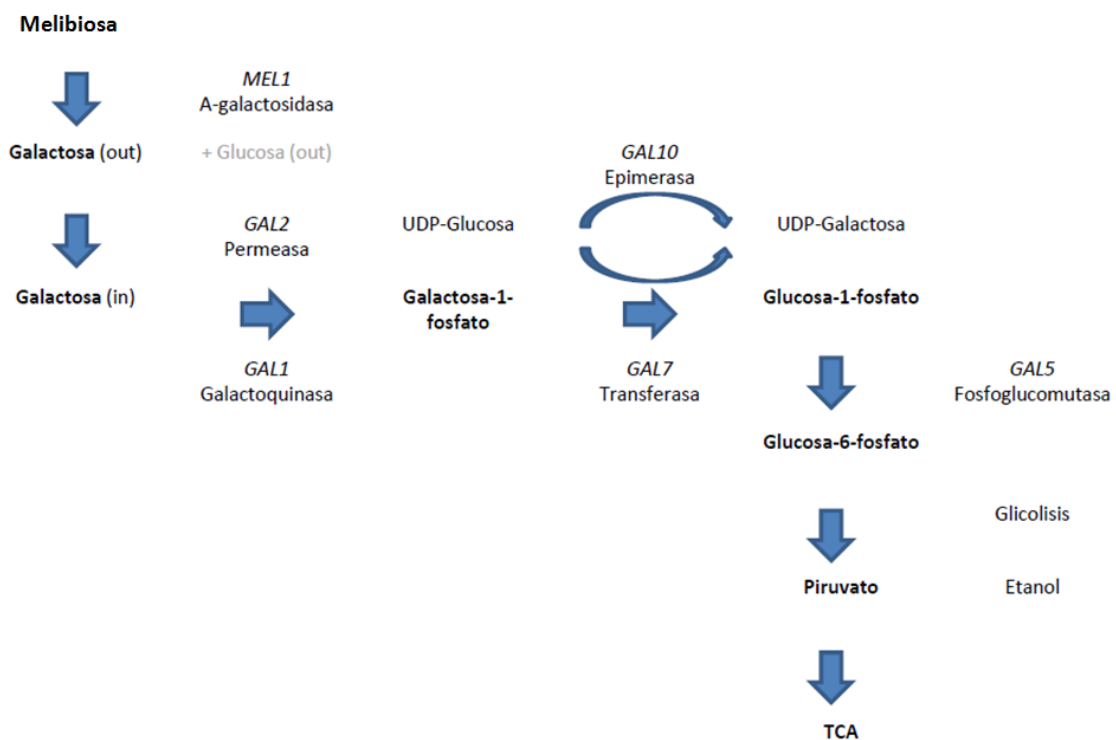


Figura 2. Papel de las enzimas pertenecientes al regulón *GAL* en el metabolismo de la galactosa en levadura. Figura adaptada de Bhat and Iyer, 2009.

El gen *GAL1*, regulado en respuesta a nutrientes (Lohr, 1997), codifica la enzima galactoquinasa que fosforila la α -D-galactosa en α -D-galactosa-1-fosfato en el

primer paso del catabolismo de la galactosa (Figura 2) (Johnston, 1987; Lohr *et al.*, 1995).

Los genes *GAL* se caracterizan por la presencia de una o más secuencias de 17 pares de bases en sus promotores denominada Upstream Activating Sequences (UASg) (Johnston, 1987). En función del número de estas secuencias en los promotores, se definen dos grupos de genes *GAL*: los genes que presentan dos UASg no presentan una expresión relevante en ausencia de galactosa y son inducidos a niveles muy altos en su presencia. La alta inducción es debida a la unión cooperativa de la proteína Gal4 a los sitios adyacentes, mientras que la represión es debida a la interacción dímero - dímero de la proteína Gal80 que se produce entre los dos dímeros adyacentes de Gal4 (Melcher and Xu, 2001).

Por otra parte, los promotores con una sola secuencia UASg tienen una expresión basal a causa de la ausencia de la interacción dímero dímero de Gal80. Estos genes son moderadamente inducidos debido a la ausencia de cooperatividad de la unión con Gal4 (Lohr *et al.*, 1995; Johnston, 1987).

3.2 Regulación de los genes *GAL*.

El sistema de regulación de los genes *GAL*, cuyos componentes principales son los productos génicos de *GAL3*, *GAL4* y *GAL80*, es dirigido por un mecanismo de activación y represión, según la fuente de carbono presente en el medio. La regulación de esos genes ha sido ampliamente analizada en el pasado tanto por técnicas genéticas clásicas como por enfoques bioquímicos. La inducción por galactosa de los genes estructurales depende de la proteína Gal4, un activador transcripcional que regula la expresión génica uniéndose directamente a la secuencia activadora UASg del promotor *GAL1* (Bhat and Murthy, 2001; Traven *et al.*, 2006; Melcher and Xu, 2001).

La regulación de *GAL1* se caracteriza por 3 estados, dependiendo de la fuente de carbono en el medio: **estado inducido** (ausencia de glucosa y presencia de galactosa), **estado no inducido** (ausencia de glucosa y de galactosa) y **estado reprimido** (en presencia de glucosa) (Houseley *et al.*, 2008).

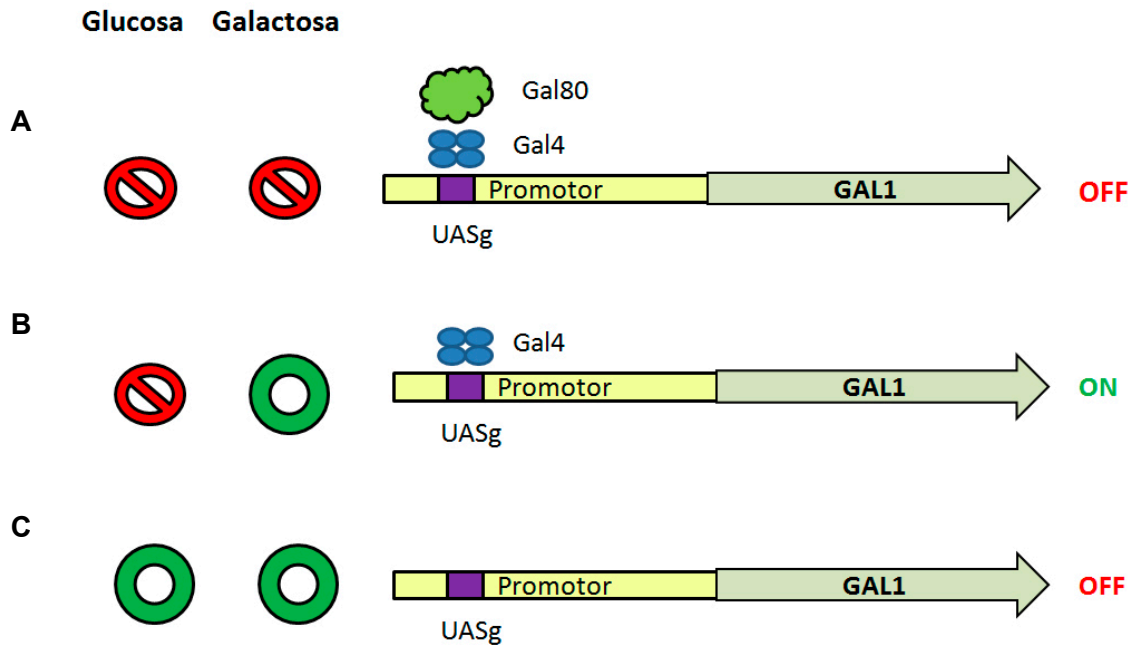


Figura 3. Los tres estados de regulación del promotor *GAL1* en función de la fuente de carbono en el medio de crecimiento. En ausencia de glucosa (A,B) el factor de transcripción Gal4 se une a la secuencia UASg del promotor *GAL1*. Específicamente, en ausencia de galactosa (A), Gal4 se halla en el promotor pero está reprimido por la presencia del represor Gal80 que inhibe su función de activador transcripcional. En presencia de galactosa (B), Gal3 promueve la pérdida de actividad inhibitoria de Gal80 hacia Gal4 permitiendo que éste último pueda regular de forma positiva la transcripción. En presencia de glucosa (C) el factor Gal4 pierde afinidad con la secuencia UASg y por lo tanto no hay transcripción.

El factor de transcripción Gal4 se asocia preferentemente con el motivo UASg del promotor *GAL1* solamente en ausencia de glucosa como fuente de carbono (Figura 3 A y B). En ausencia también de galactosa (Figura 3 A), este factor de transcripción está ubicado en la secuencia UASg del promotor de *GAL1* pero su función de activador es reprimida por la presencia del regulador transcripcional Gal80. Este represor forma un dímero Gal80-Gal80 y se une al dominio de activación transcripcional de Gal4 en ausencia de galactosa, estabilizando la interacción Gal4-Gal80 y formando un heterotetrámero $(Gal4)_2(Gal80)_2$ que inhibe la función activadora de Gal4 (Johnston, 1987; Lohr et al., 1995). Además los sitios de unión adyacentes a UASg estabilizan el homodímero Gal80-Gal80 y eso conlleva la represión total de los genes *GAL* (Melcher and Xu, 2001; Wu et al., 1996; Koh et al., 1998).

En presencia de galactosa (Figura 3 B) los efectos inhibitorios de Gal80 son anulados por la acción del transductor de señal Gal3. Gal3 es un homólogo de la galáctoquinasa Gal1, que en presencia de sustratos, galactosa y ATP, se une físicamente a Gal80 (Bhaumik, 2011; Lohr, 1984; Cavalli and Thoma 1993; Lohr, 1993). Una vez reconocida la molécula de galactosa, Gal3 es capaz de asociarse físicamente a la proteína Gal80, anulando así su propiedad de inhibidor hacia el activador transcripcional Gal4 (Peng and Hopper 2002; Jiang *et al.*, 2009). Esta unión implica el reclutamiento de la ARN polimerasa por parte del activador Gal4 mismo (Torchia and Danzinger 1980; Johnston *et al.* 1987; Lue *et al.*, 1987; Chasman and Kornberg 1990; Yun *et al.*, 1991; Leuther and Johnston 1992; Parthun and Jaehning 1992; Melcher and Johnston 1995; Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Blank *et al.*, 1997; Yano and Fukasawa 1997; Koh *et al.*, 1998; Platt and Reece 1998; Vollenbroich *et al.*, 1999; Bhaumik and Green 2001; Jeong *et al.*, 2001; Larschan and Winston 2001; Melcher and Xu 2001; Carrozza *et al.*, 2002; Timson *et al.*, 2002; Bryant and Ptashne 2003; Menezes *et al.*, 2003)

Los mecanismos moleculares inherentes al proceso en que la interacción Gal3-Gal80 acabe con la acción inhibitoria de Gal80 hacia Gal4 y facilite la formación del estado inducido del gen, no se han descubierto del todo. La controversia se genera con la incertidumbre de que Gal3 pueda empezar a interactuar con Gal80 en el citoplasma, en el núcleo o en ambos sitios y si es determinante el tránsito de Gal3 y/o Gal80 del citoplasma al núcleo para la inducción de los genes *GAL*.

Hay dos publicaciones que intentan contestar a la primera pregunta. La primera sugiere que Gal3 interactúe con Gal80 exclusivamente en el citoplasma y lo secuestre de Gal4 nuclear (Peng and Hopper, 2002). Otra hipótesis es que Gal3 en el citosol se una a las moléculas de galactosa para migrar dentro del núcleo para luego unirse a Gal80 (Wightman *et al.*, 2009). Las dos hipótesis difieren no solo a nivel de los compartimentos celulares en que Gal3 y Gal80 empiezan a interactuar, sino también a nivel de la dinámica de "trafficking" nucleo-citoplasma de estas dos proteínas.

La inducción muy rápida del sistema y el cambio relativamente lento de Gal80-Gal4 a Gal80 libre, en conjunto con la importancia de la presencia de Gal3 en el núcleo, sugiere un modelo (Egriboz *et al.*, 2013) en que Gal3 se podría asociar con el dímero Gal4-Gal80 sin la necesidad de que Gal80 se disocie físicamente de Gal4.

Tal modelo cobra más valor considerando que la interacción entre Gal3 y Gal80 tiene que ocurrir en un dominio proteico diferente de donde se une Gal4 y el sitio de unión

de Gal80 con Gal4 ha sido parcialmente determinado (Kumar *et al.*, 2008), pero la superficie de unión a Gal3 no. Además la unión transitoria de Gal3 con Gal80 tiene que alterar alguna propiedad de Gal80 que es esencial para su afinidad con Gal4. Una de las propiedades de Gal80 en asociación con Gal4 es su capacidad de formar dímeros (Pilauri *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008) pero no hay evidencias directas que expliquen si la interacción de Gal3 con Gal80 afecte a la formación del homodímero Gal80-Gal80.

En presencia de glucosa (Figura 3 C), los genes *GAL* permanecen inactivos no solamente por la interacción de Gal4-Gal80 sino también por la unión del factor de transcripción Mig1 a secuencias específicas de los promotores *GAL*. Mig1 contiene un dominio dedo de zinc del tipo Cys2His2 que se une específicamente al ADN a través de secuencias consenso ricas en GC flanqueadas por una región rica en AT (Lundin *et al.*, 1994). Su función principal es reprimir la transcripción en presencia de glucosa, como por ejemplo los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo de azúcares alternativos como maltosa, sacarosa o galactosa (Schuller, 2003; Carlson, 1999).

En presencia de glucosa, Mig1 es defosforilado en el citoplasma por el complejo Reg1-Glc7 y después importado al núcleo. En el núcleo se une a las secuencias de los promotores de los genes reprimidos por glucosa, donde recluta al complejo co-represor Cyc8-Tup1. Cuando las células encuentran escasez de glucosa, Mig1 es fosforilado por la proteína quinasa SWI/SNF y trasladado fuera del núcleo (Schuller, 2003).

3.3 Función de modificadores de la cromatina en la inducción de los genes *GAL*.

Además del sistema de regulación formado por Gal3, Gal4 y Gal80, otros mecanismos regulan la actividad de *GAL1*. Los nucleosomas se posicionan en la caja TATA y en los sitios de inicio de la transcripción impidiendo la unión en *cis* a la maquinaria de la transcripción: en el caso de *GAL1*, *GAL10*, *GAL7* y *GAL80* además, los elementos UASg se encuentran en una posición libre de nucleosomas independientemente de la fuente de carbono, de forma que Gal4 se puede unir a esta región sin que sea necesaria la acción de remodelación de la cromatina (Lohr, 1997).

Durante la inducción del gen *GAL1*, Gal4 es la proteína responsable para el reclutamiento de los complejos adicionales para la iniciación de la transcripción.

Gal4 recluta directamente a SAGA (Brown *et al.*, 2001; Bhaumik *et al.*, 2004) y después al Mediador, a través de la interacción con la subunidad Gal11 (Jeong *et al.* 2001) y la subunidad Srb4 (Koh *et al.* 1998). La formación del macrocomplejo de la transcripción sigue con el reclutamiento de TBP (Melcher and Johnston, 1995), TFIIIB (Wu *et al.*, 1996), TFIIIE (Bryant and Ptashne, 2003) Cdk8 (conocido también como Srb10) (Ansari *et al.*, 2002) el complejo SWI/SNF (Yudkovsky *et al.*, 1999) y los componentes del proteasoma Sug1 (Gonzalez *et al.*, 2002) y Sug2 (Chang, 2001) y finalmente la ARN pol II y otras proteínas (Bryant and Ptashne, 2003).

SAGA es el primer complejo a ser reclutado en los promotores de los genes *GAL* durante su activación (Bryant and Ptashne, 2003; Bhaumik and Green 2001; Hall and Struhl, 2002) gracias a la acción directa de Gal4 (Bhaumik *et al.*, 2004; Kuras *et al.*, 2003 Jeong *et al.*, 2001). Gal4 recluta a SAGA al promotor de *GAL1* a través de su interacción con la subunidad de SAGA Tra1 (Bhaumik, 2011). La interacción entre el complejo SAGA y el activador Gal4 es estabilizada por la acción de la subunidad 19S RP del proteasoma: esta subunidad favorece también la unión del mediador al promotor de *GAL1* (Bhaumik, 2011).

Durante la activación transcripcional, SAGA interactúa con la secuencia UASg (Bryant and Ptashne, 2003; Larschan and Winston, 2001) ayudando a ensamblar el complejo de preinicio PIC en el promotor (Bhaumik *et al.*, 2004) a través de la subunidad Spt3 (Larschan and Winston, 2001; Bhaumik, 2011), llevando a cabo la modificación de las histonas mediante su actividad HAT. Este proceso promueve el inicio de la transcripción, permitiendo el desplazamiento de los nucleosomas sobre la cromatina y facilitando así también la elongación (Roberts and Winston, 1997; Lee *et al.*, 2010).

Otro complejo que regula la remodelación de la cromatina a nivel de los genes *GAL* durante sus activación es el Mediador. En la literatura existen conceptos controvertidos acerca de la dependencia del reclutamiento del Mediador con otros co-activadores. Green y su equipo demostraron que SAGA es un componente esencial para la presencia del Mediador en la secuencia UASg, pero no fueron capaces de detectar una interacción entre las subunidades Srb4 y Gal11 (del Mediador) con Gal4. Sin embargo, otro grupo de trabajo, midiendo la densidad del complejo Mediador en ausencia de SAGA, notó un retraso considerable en su reclutamiento, a demostración de que SAGA no es necesario estrictamente. A través de otros ensayos, concluyeron que el Mediador tampoco es necesario para el reclutamiento de SAGA en la secuencia UAS en *GAL1* (Bhaumik *et al.*, 2004).

Por lo contrario, tres informes han demostrado que el Mediador puede ser reclutado en los genes *GAL* independientemente de SAGA (Bryant and Ptashne, 2003; Larschan and Winston, 2005; Lemieux and Gaudreau, 2004).

Algunos artículos describen que el reclutamiento del Mediador en los genes regulados por Gal4 se ve disminuido en ausencia de SAGA *in vivo* (Larschan and Winston, 2005) o moderadamente retrasado (Lemieux and Gaudreau, 2004), mientras que otros indican que el Mediador se une con una cinética parecida también en ausencia de SAGA, pero esto no conduce a la formación de PIC productiva (Bryant and Ptashne, 2003).

Se puede especular que el Mediador sea un blanco directo del dominio de activación Gal4, pero que la presencia de SAGA en UASg pueda estabilizar la interacción de las subunidades del Mediador y que sea esencial para la formación de PIC y para la completa transcripción de los genes (Bryant and Ptashne, 2003).

El complejo SWI/SNF es reclutado en las secuencias UASg de los genes *GAL1* y *GAL7* dependiendo de la presencia de TAFIIs, ARN pol II y del complejo Mediador (sólo con la presencia artificial del complejo Mediador en el promotor de *GAL1* se obtiene el reclutamiento de SWI/SNF y de SAGA). Aunque el mecanismo de posicionamiento de SWI/SNF en *GAL* está descrito ampliamente en la literatura, hay una controversia acerca de su grado de dependencia con el complejo SAGA y con el proceso de acetilación en general: Wilson *et al.*, 1996 sugieren que el reclutamiento de SWI/SNF no necesita la acetilación de la cromatina por parte de la subunidad Gcn5 de SAGA, Syntichaki *et al.*, 2000 hace referencia a ensayos *in vivo* e *in vitro* que determinan que la acetilación de la histona H3 por parte de Gcn5 es un requisito previo para el reclutamiento y el mantenimiento del complejo SWI/SNF en el promotor de estos genes.

Se ha demostrado también que el complejo SWI/SNF interactúa directamente con las regiones ácidas de activación de proteínas como Gcn4, Hap4, Gal4, Pho4, Swi5 y VP16 (Natarajan *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 2002, Neely *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999; Prochasson *et al.*, 2003). Esta cooperación ayuda a desestabilizar la interacción histona-ADN, sugiriendo que el complejo puede actuar en conjunto con otros factores de remodelación de la cromatina. Sin embargo, se demostró que SWI/SNF tiene afinidad con el ADN y con los nucleosomas también sin alguna secuencia específica (Quinn *et al.*, 1996; Cote *et al.*, 1998), asociándose, tanto *in vivo* como *in vitro*.

humanos, a la holoenzima ARN polimerasa II (Wilson *et al.*, 1996 Cho *et al.*, 1998, Neish *et al.*, 1998).

Varios estudios genéticos en levadura sugieren que el complejo SWI/SNF funciona en conjunto con la subunidad Gcn5 HAT para contrarrestar los efectos represivos de la cromatina. Es importante destacar que los genes de levadura regulados por SWI/SNF superan ampliamente los que son controlados por Gcn5 (Holstege *et al.*, 1998)

Los elementos funcionales en el reclutamiento del complejo in vivo (o targeting) en el ADN son dos bromo dominios de interacción que funcionan como dominios de unión acetil-lisina. Uno está ubicado en la porción N-terminal de la subunidad Snf5 y el otro en el segundo cuarto de la subunidad Swi1 de SWI/SNF (Prochasson *et al.*, 2003).

4. Respuesta a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los cambios ambientales de osmolaridad pueden ser una fuente de estrés fundamental para las células. El estrés salino e hipertónico provoca la pérdida de agua y un aumento de la fuerza iónica del interior de la célula, que puede causar muerte celular en ausencia de una defensa eficiente. La respuesta a estrés hiperosmótico ha sido investigada profundamente en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* y es una de las rutas más detalladamente estudiadas en células eucariotas a nivel molecular (de Nadal *et al.*, 2002; Hohmann, 2002).

La ruta central de transducción de señal que opera bajo estrés osmótico es la cascada de MAP quinasas HOG (High Osmolarity Glycerol) o ruta HOG (Albertyn *et al.*, 1994; Brewster *et al.*, 1993). La MAP quinasa Hog1 tiene múltiples funciones en la respuesta a estrés osmótico. Directamente es capaz de modular el transporte de iones en la membrana plasmática, regula la progresión del ciclo celular durante el estrés, modula la eficiencia de la traducción y coordina un complejo programa transcripcional en el núcleo (de Nadal y Posas, 2010).

El estrés osmótico se caracteriza por una variación de la osmolaridad debida a una disminución del potencial hídrico del ambiente en el cual está ubicada la célula. Este cambio es generado por el aumento de la concentración de iones intracelulares que provocan una pérdida de agua en el citosol, provocando un cambio inmediato del volumen celular. El proceso de deshidratación es rápido (aproximadamente un minuto) y se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que ésta acumula iones tóxicos en beneficio del citoplasma y los orgánulos (Serrano, 1996). Las

células deshidratadas pueden sobrevivir y recuperar sucesivamente su turgencia si la severidad del estrés es fisiológicamente aceptable.

La adaptación celular en estas condiciones ocurre a diferentes niveles fisiológicos que incluyen el arresto temporal del ciclo celular, la reestructuración del citoesqueleto de actina y la reprogramación del metabolismo (Tao *et al.*, 1999; Blomberg, 2000), además de activar un mecanismo de respuesta a estrés que conlleva el aumento de la concentración citosólica del osmolito compatible glicerol (Albertyn *et al.*, 1994; Brewster *et al.*, 1993) y la exclusión de cationes tóxicos (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001). La respuesta fisiológica incluye la expresión de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la producción de proteínas protectoras y el reajuste en los niveles de carbohidratos y aminoácidos (Gasch *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Yale and Bohnert, 2001). Un ambiente hiperosmótico altera también la estructura, la permeabilidad y las propiedades mecánicas de la membrana celular (Wood, 1999; Causton *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2000). La alteración de la permeabilidad y de la flexibilidad de la membrana pueden afectar también la actividad de proteínas transmembrana, como los transportadores y los osmosensores (Posas *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1999; van der Heide *et al.*, 2001). Es a través de estos osmosensores que las células de levadura perciben el estrés osmótico y pueden llevar a cabo una respuesta rápida a través de diversas vías. Como escrito antes, la más importante de ellas es la ruta HOG (de Nadal and Posas, 2010), esquematizada en la Figura 4.

La célula de levadura es capaz de detectar una diferencia en el potencial hídrico con el exterior a través de dos complejos transmembrana osmosensibles e independientes: el complejo osmosensor Sln1-Ypd1-Ssk1, conservado también en bacterias y plantas, es capaz de sentir la turgencia de la membrana, actuando la proteína Sln1 como receptor transmembrana e Ypd1 y Ssk1 como reguladores de respuesta (Posas and Saito, 1998). En este sistema, Ssk2 y Ssk22 son dos MAPKKK redundantes que participan en el proceso de fosforilación de la MAPKK Pbs2 a las que ambos sistemas convergen, y que es la responsable de la activación final de Hog1.

El otro complejo osmosensible transmembrana requiere Sho1 y otras proteínas como Hkr1 y Msb2 para la transducción de señal (Tatebayashi *et al.*, 2007, Tatebayashi *et al.*, 2015). El sistema comunica la diferencia de potencial hídrico a través de una pequeña proteína G denominada Cdc42 y un miembro de la familia PAK, Ste20. El blanco de Ste20 es la MAPKKK Ste11, que activa la MAPKK Pbs2 (Hohmann, 2009; Chen and Thorner, 2007; de Nadal *et al.*, 2007; Hohmann *et al.*, 2007; Tatebayashi *et al.*, 2007).

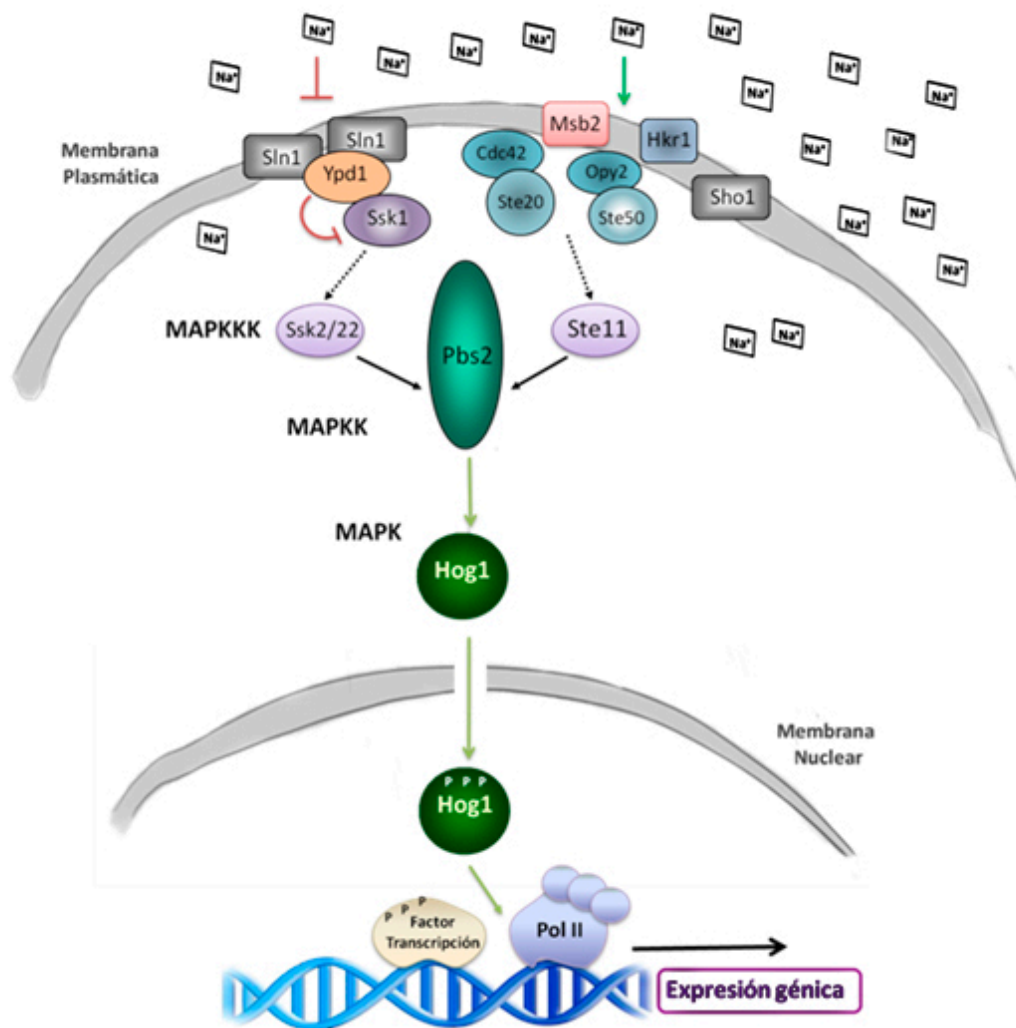


Figura 4. Regulación bajo estrés osmótico de la expresión génica a través de la ruta HOG. La célula de levadura es capaz de detectar un cambio en el potencial hídrico del ambiente en que se halla, a través de dos complejos transmembrana independientes que transducen la señal a sus correspondientes MAPKKK, Ssk2/22 y Ste11 - respectivamente. La activación de las MAPKKKs genera una cascada de quinasas común a través de la fosforilación de la MAPKK Pbs2 que fosforila la MAPK Hog1. Hog1 puede por lo tanto acceder al núcleo, regulando directamente e indirectamente la transcripción de un elevado número de genes.

Una vez activada, la MAPKK Pbs2 fosforila a Hog1 que, en su forma activa, coordina el programa transcripcional necesario para la adaptación de la célula a estrés osmótico (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; O'Rourke and Herskowitz, 2004).

Todo este proceso es muy rápido y ocurre en segundos, y es transitorio -entre 10 y 100 minutos-, dependiendo de la severidad del estrés, lo cual sugiere que existe un importante mecanismo de regulación que impide una activación demasiado extendida. Ya que la ruta HOG regula cientos de genes de forma significativa comparada con una

situación de no estrés, esta regulación negativa es absolutamente requerida, pues mantener la activación de Hog1 es perjudicial para el crecimiento celular (Maeda *et al.*, 1994).

El mecanismo de regulación principal del sistema de defensa de la célula está relacionado con el aumento de la concentración intracelular del glicerol, un osmolito requerido para proteger las biomoléculas del interior de la célula, reducir el potencial hídrico intracelular y reemplazar de forma parcial el agua perdida, restableciendo la estabilidad osmótica. Si el nivel de estrés no es dramático, un aumento de la concentración de glicerol puede proporcionar una adaptación fisiológica eficiente. En este caso, el aumento de glicerol es percibido por la célula y parece ser una de las señales que desactivan la ruta HOG, en un mecanismo "*feedback*" (Hohmann *et al.*, 2007). La defosforilación de las quinasas en la ruta HOG se lleva a cabo por proteínas tirosina fosfatasas (por ejemplo Ptp2 y Ptp3) y proteínas serina-treonina fosfatasas de la familia de PP2C (por ejemplo Ptc1). Algunas de ellas son además reguladas en respuesta a estrés (Hohmann *et al.*, 2007; Klipp *et al.*, 2005).

Una vez activada, la proteína quinasa Hog1 entra en el núcleo (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999), donde transduce la señal osmótica y regula la expresión génica a través de diferentes factores transcripcionales (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 1999; De Nadal *et al.*, 2003). Además de regular su actividad, Hog1 se asocia físicamente a los promotores de los genes a través de su interacción con los factores de transcripción (Alepez *et al.*, 2001; Proft and Struhl, 2002), participando así en otros procesos necesarios para la activación transcripcional.

La presencia de Hog1 en algunos promotores, ayuda al reclutamiento del complejo histona desacetilasa Rpd3-Sin3, modificando la estructura de la cromatina y permitiendo así la unión de la holoenzima de la ARN polimerasa II (De Nadal *et al.*, 2004). Hog1 interacciona también con el complejo remodelador SAGA en algunos promotores, permitiendo un apropiado inicio de la transcripción en condiciones de estrés osmótico severo (Zapater *et al.*, 2007).

Hog1 se asocia además con la cromatina también en las regiones codificantes, (Pascual-Ahuir *et al.*, 2006; Proft *et al.*, 2006), lo cual sugiere que la quinasa pueda jugar también un papel en la elongación selectiva de los genes inducidos en respuesta a estrés osmótico, asociándose a la ARN pol II y a otros componentes del complejo de elongación (Pokholok *et al.*, 2006).

Hog1 también regula directamente los transportadores de cationes de la membrana plasmática, fosforilando al menos dos de los transportadores de la membrana

plasmática, el antiportador de Na^+/H^+ Nha1 y el canal de K^+ Tok1, estimulando la salida de iones de la célula y permitiendo la re-asociación de aquellas proteínas que, tras el choque osmótico, se habían disociado de la cromatina (Proft and Struhl, 2004).

Finalmente Hog1 modula la progresión del ciclo celular en diferentes etapas (Escote *et al.*, 2004; Zapater *et al.*, 2005; Clotet *et al.*, 2006; Clotet and Posas, 2007) e inhibe a nivel transitorio la síntesis de proteínas a nivel de la elongación, fosforilando la quinasa Rck2 (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001; Uesono and Toh, 2002).

Se llevaron a cabo un gran número de experimentos genómicos para caracterizar los cambios globales de expresión génica en levadura bajo estrés hiperosmótico y salino (Gasch *et al.*, 2000, Ni *et al.*, 2009; Posas *et al.*, 2000, Rep *et al.*, 2000, Yale and Bohnert, 2001). Una importante característica de la respuesta transcripcional a estrés osmótico es, como citado antes, su naturaleza extremadamente transitoria. Además, el tiempo de respuesta transcripcional depende de la severidad del estrés osmótico (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 1999; Yale and Bohnert, 2001). La respuesta típica de un gen regulado positivamente por estrés osmótico en levadura se caracteriza por su inducción máxima a los 5-10 minutos con concentraciones moderadas de sal (0,4 M NaCl) mientras que, con concentraciones más severas (1 M NaCl) el mismo gen tardará bastante más (30-60 minutos) en activarse. Este fenómeno podría explicarse considerando que el estrés osmótico interfiere de forma general con la interacción de proteínas con el ADN in vivo debido a la fuerza iónica crítica (Proft and Struhl, 2004). En este escenario, una mayor concentración de NaCl prolongaría la fase de adaptación hasta que se ponga en marcha una transcripción eficiente y así se retrasaría la expresión de genes de defensa bajo condiciones más severas de estrés salino.

Análisis generales de expresión génica nos dan una idea del impacto que tiene el estrés osmótico en la transcripción global. Sin embargo, el número estimado de genes inducibles por estrés osmótico depende de la intensidad y de la cinética del estrés aplicado a las células. Los genes fuertemente regulados de forma positiva representan un 3-7% del genoma (alrededor de 200-350 diferentes genes) (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Yale and Bohnert, 2001). Un reciente estudio cinético de la expresión génica global aumenta este número al 23% del genoma (acerca de 1400 genes) incluyendo muchos genes regulados de forma moderada en condiciones de estrés salino (Ni *et al.*, 2009). Una de las motivaciones del trabajo presente fue precisamente

desarrollar un método para cuantificar la transcripción in vivo en respuesta a estrés para poder identificar diferentes grupos de promotores y su dinámica de responder al estímulo.

Se han identificado múltiples factores de transcripción involucrados en la respuesta celular a estrés osmótico. La quinasa Hog1 contacta directamente y fosforila a varios factores de transcripción involucrados en la regulación transcriptómica en respuesta a estrés, como son Sko1, Hot1, Smp1 y Rtg1/Rtg3, representados en la Figura 5 (Alepez *et al.*, 2003; de Nadal *et al.*, 2003; Rep *et al.*, 2001 Ruiz-Roig *et al.*, 2012, Proft *et al.*, 2001).

Evidencias genéticas y datos de expresión génica relacionan otros factores transcripcionales con la ruta HOG, como es el caso de Msn1, Msn2, Msn4 (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Nevitt *et al.*, 2004; Rep *et al.*, 1999; Schuller *et al.*, 1994).

Factores de Transcripción involucrados en la respuesta a estrés osmótico

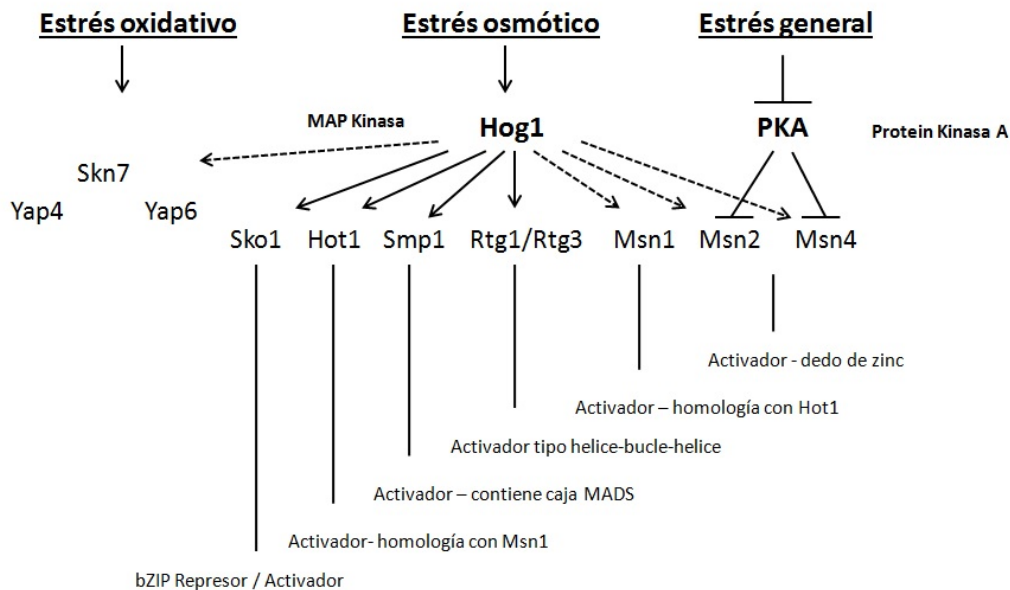


Figura 5. Esquema de los factores de transcripción específicos activados por Hog1 en condiciones de estrés abiótico.

Sko1 es un factor de transcripción de tipo “leucine zipper” y pertenece a la familia ATF/CREB. Sko1 forma un complejo con Tup1 y Cyc8 para reprimir la transcripción en condiciones normales y se convierte en activador en respuesta a estrés por fosforilación a través de la quinasa Hog1. Es una proteína nuclear involucrada en las respuestas a estrés oxidativo y osmótico (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001; Proft and Struhl 2004). Sko1 reconoce motivos de ADN llamados CRE (“cAMP Response Element”) y en condiciones normales se une a estas secuencias en los promotores de genes de respuesta a estrés osmótico (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001; Proft *et al.*, 1999).

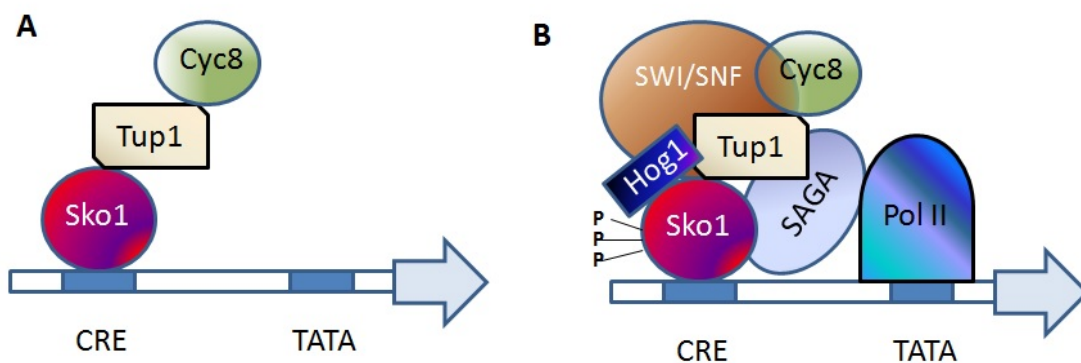


Figura 6. Modelo de represión/activación de Sko1-Cyc8-Tup1 regulado por la MAP quinasa Hog1 en respuesta a estrés. A. Sko1 regula los promotores reprimiéndolos en ausencia de estrés. Sko1 está unido a un motivo CRE presente en algunos genes osmoinducibles y recluta a los co-represores Cyc8-Tup1, que inhiben la formación del complejo de preiniciación de la transcripción. B. Bajo estrés hiperosmótico, la quinasa Hog1 entra en el núcleo donde es dirigida a los promotores diana por Sko1. Hog1 fosforila Sko1 en un dominio N-terminal, lo cual es un prerrequisito para el reclutamiento sucesivo de otros complejos modificadores de la cromatina. La activación completa del promotor se cumple pocos minutos después del choque osmótico. El complejo Sko1-Cyc8-Tup1-Hog1 fosforilado recluta a los complejos modificadores de la cromatina SWI/SNF y SAGA que permiten el reclutamiento de la ARN pol II y su activación (Proft and Struhl, 2002).

Sko1 regula la expresión del gen osmoinducible *GRE2* reconociendo los dos sitios CRE que se hallan en el promotor (Garay-Arroyo and Covarrubias, 1999; Rep *et al.*, 2001; Proft *et al.*, 2001). *GRE2* codifica una reductasa con similitud a la dihidroflavonol 4 reductasa presente en plantas. En las plantas, estas enzimas están involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios como los flavonoides y las antocianinas (Kristiansen and Rohde, 1991). En levadura, la expresión de *GRE2* está

bajo control de la ruta HOG y se activa específicamente y fuertemente en condiciones de estrés abiótico (Garay-Arroyo and Covarrubias, 1999), lo cual lo convierte en un excelente candidato en el estudio de regulación transcripcional activada por estrés osmótico.

El factor de transcripción **Hot1** es otro blanco directo de la quinasa Hog1 y controla la expresión de un grupo de genes osmoinducibles dependientes de la ruta HOG. Entre ellos se encuentran dos genes que codifican las enzimas clave de la biosíntesis de glicerol, *GPD1* (Rep *et al.*, 1999; Eriksson *et al.*, 2000) y *GPP2* (Rep *et al.*, 2000). Sin embargo, el único gen que parece depender totalmente de la presencia de Hot1 es *STL1* (Bai *et al.*, 2015), que codifica un simportador de glicerol/protones de la membrana plasmática (Ferreira *et al.*, 2005), y resulta ser el gen que aparece en análisis de expresión génica como el gen de levadura más fuertemente inducido por estrés osmótico (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Yale *et al.*, 2001). Su inducción desaparece completamente en los mutantes $\Delta hot1$ y $\Delta hog1$, aunque parece que Smp1 también afecta a su expresión (De Nadal *et al.*, 2003).

Hot1 es una proteína exclusivamente nuclear (Rep *et al.*, 1999) y está asociada al promotor de *GPD1* tanto en presencia como en ausencia de estrés, aunque los niveles de Hot1 en el promotor aumentan bajo estrés y en presencia de altas concentraciones de glucosa (Gomar-Alba *et al.*, 2015). La situación parece ser diferente en el promotor de *STL1*, donde Hot1 sólo se une bajo estrés osmótico y necesita a Hog1 para la asociación (Alepez *et al.*, 2001).

Msn2 es un activador de la transcripción relacionado con Msn4; se activa en condiciones de estrés translocándose del citoplasma al núcleo y uniéndose a los elementos de respuesta a estrés ("STRE"), activando la transcripción (Martinez-Pastor *et al.* 1996; Gorner *et al.* 1998). Msn2 y Msn4 son proteínas que comparten el 41% de identidad y sus funciones son ampliamente aunque no totalmente redundantes. Juntas pueden regular la expresión de aproximadamente 200 genes de respuesta a estrés, incluyendo choque térmico, osmótico, oxidativo, de pH ácido, falta de glucosa y altas concentraciones de etanol, reconociendo secuencias STRE (5'-CCCCT-3') en los promotores de sus genes blancos (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.* 2001).

Rtg1/Rtg3 son dos factores de transcripción que forman parte de la ruta retrógrada o RTG. La ruta RTG es un proceso por el que la actividad mitocondrial regula la

expresión de genes del núcleo que codifican proteínas mitocondriales (Parikh *et al.*, 1987). Este fenómeno engloba el conjunto de señales metabólicas que, emitidas desde la mitocondria, hacen que en el núcleo cambie el patrón de expresión de los genes implicados en la biogénesis y las funciones mitocondriales. En levadura, la ruta de respuesta retrógrada funciona como un mecanismo de respuesta a estrés ajustando rutas metabólicas y biosintéticas a las alteraciones sufridas (Liao *et al.*, 1991; Liao and Butow, 1993; Small *et al.*, 1995; Liu and Butow, 1999).

La RTG se regula de forma positiva o negativa. La regulación positiva depende de las proteínas Rtg1, Rtg2 y Rtg3. La proteína Rtg2 es un regulador de la ruta que parece funcionar como sensor de disfunciones mitocondriales promoviendo la acumulación en el núcleo del complejo Rtg1/Rtg3 (Sekito *et al.*, 2000). Mientras la RTG permanece inactiva, Rtg1 y Rtg3 se localizan en el citoplasma formando un heterodímero. Tras la activación a través de Rtg2, se disocian para translocarse al núcleo. Una vez en su interior, se re-asocian para unirse a secuencias de los promotores de sus genes diana. (Liao and Butow, 1993; Jia *et al.*, 1997; Ruiz-Roig *et al.*, 2012).

Hog1 puede activar el heterodímero Rtg1/Rtg3 durante la adaptación a osmoestrés a través de una fosforilación directa. De esta forma, la ruta retrógrada puede depender también de la ruta HOG. La biosíntesis de glicerol, molécula que funciona como el principal responsable del mecanismo de osmorregulación en levadura, requiere la acción de enzimas NADH dependientes y las mitocondrias son designadas a oxidar NADH a NAD⁺. Es posible que la adaptación al estrés requiera además reforzar la respiración en la mitocondria para favorecer la producción de ATP (Ruiz-Roig *et al.*, 2012). Entre los blancos directos de Rtg1/3 se encuentra el gen *CIT2* que codifica una isoforma peroxisomal de citrato sintasa, *PYC1* (una piruvato carboxilasa) y *DLD3* que codifica una isoforma citoplasmática de la D-lactato deshidrogenasa. Estos genes muestran un fuerte incremento de la expresión en situación de disfunción respiratoria y están también fuertemente inducidos en condiciones de estrés osmótico (Liao *et al.*, 1991; Chelstowska *et al.*, 1999; Epsein *et al.*, 2001).

Smp1 es un factor de transcripción putativo de la familia MADS-box y está involucrado en la regulación de la respuesta a estrés osmótico (Dodou and Treisman 1997; de Nadal E *et al.* 2003). Estudios de co-inmunoprecipitación y fosforilación in vivo mostraron que Hog1 y Smp1 interaccionan, siendo Smp1 fosforilado directamente por Hog1 en diferentes residuos dentro de su dominio de activación bajo estrés osmótico (Alepez *et al.* 2003; de Nadal *et al.*, 2003). La fosforilación de Smp1 es esencial para

su función, ya que un alelo mutante incapaz de ser fosforilado muestra una alteración de la expresión del gen *STL1::LacZ* (De Nadal *et al.*, 2003).

En trabajos anteriores de laboratorio se llevó a cabo un estudio de localización genómica del factor de transcripción Smp1 bajo estrés osmótico mediante análisis ChIP-Seq, una tecnología que proporciona una mayor resolución, sensibilidad y especificidad comparada con ChIP-Chip (Barski *et al.*, 2007; Barski y Zhao, 2009; Johnson *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2008).

Sorprendentemente, se observó una alta densidad de Smp1 en las regiones ORF correspondientes a genes inducibles por estrés osmótico, algunos de ellos alcanzaban una presencia entre 11 y 47 veces mayor, como en el caso de los genes *HOR2*, *ALD6*, *GRE2* (representados en la Figura 7), *PUT4*, *FMP43*, *HSP12* o *RTC3*. Además, muchos de sus promotores son blancos de otros factores de transcripción distintos a Smp1, pero también involucrados en la regulación de la expresión génica bajo estrés osmótico, lo cual sugiere que además de su presunta función en la iniciación de la transcripción (de Nadal *et al.*, 2001), podría estar involucrado en procesos transcripcionales diferentes de la expresión génica.

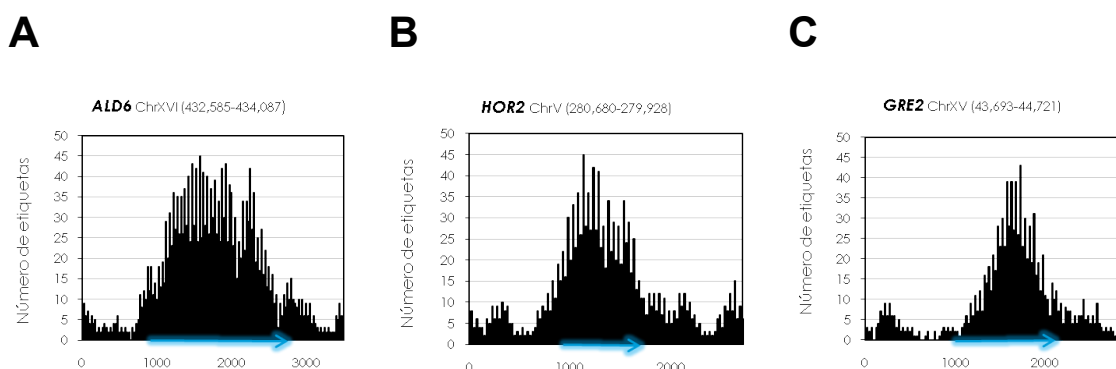


Figura 7. Perfiles de unión de Smp1 a lo largo de las regiones codificantes de genes osmoinducibles. Se muestra el número de etiquetas anotadas por ChIP-Seq en las regiones intergénicas y codificantes de los genes *ALD6* (a), *HOR2* (b) y *GRE2* (c). Las flechas muestran la longitud de la región codificante. Las barras verticales indican el número de secuencias anotadas cada 25 pares de bases desde 1 kb antes del codón de iniciación hasta 1 kb después del codón de terminación de cada gen.

Este reclutamiento inesperado en regiones codificantes ha sido observado también en otros factores de transcripción, como los activadores Gln3 y Gat1 (Georis, 2010).

5. Genes reporteros.

En el interior de la célula se realiza un gran número de fenómenos fisiológicos que se pueden atribuir a la diferencia de la expresión génica, mecanismo precisamente regulado en respuesta a un estímulo, a través de las rutas de señalización celulares.

Para obtener informaciones detalladas sobre la relación entre la activación / inhibición de diferentes rutas y sus efectos sobre la actividad transcripcional, es posible fusionar elementos reguladores como los promotores a genes que codifican las proteínas informadoras. Los genes que se utilizan se llaman "genes reporteros" y pueden ser utilizados como indicadores para monitorizar la expresión génica en las células (Rosenthal, 1987).

Los sistemas reporteros son utilizados tanto *in vivo* como *in vitro* para medir el potencial de regulación de regiones promotoras o *enhancer*, proteínas, ARNm, interacciones proteína-proteína, localización proteica, eventos recombinantes, búsqueda de nuevos elementos reguladores, como regiones de ADN y factores de transcripción (Ignowski *et al.*, 2004; Alam *et al.* 1990; Naylor, 1999; Golzio *et al.*, 2004). La actividad de un promotor y el papel funcional de los elementos de control se pueden medir mediante la vinculación de una secuencia de promotor a un gen reportero fácilmente detectable, contenida usualmente en un plásmido de expresión.

Los plásmidos recombinantes son sucesivamente introducidos en oportunas líneas celulares para poder monitorizar la concentración de la proteína reportera o su actividad enzimática (Gambhir *et al.*, 1999).

Es importante elegir como reportero un gen que no se expresa de forma nativa en la célula u organismo en estudio (actividad endógena ausente). Tiene además que ser distinguible de otras actividades enzimáticas parecidas presentes en la célula y no tiene que presentar competición o interferencia con otras actividades enzimáticas celulares. Por último, la elección del sistema depende también de la línea celular, del tipo de experimento y de la adaptabilidad del ensayo al estudio específico, considerando además que el experimento tiene que ser sensible y reproducible.

A continuación se presentarán los sistemas reporteros más comunes.

Cloranfenicol Acetil-transferasa (CAT).

El primer gen reportero utilizado para el análisis de la regulación transcripcional en células de mamífero, fue CAT (Cloranfenicol Acetil-transferasa), una enzima bacteriana que cataliza la transferencia del grupo acetilo de acetil-CoA a cloranfenicol. El producto génico presenta una estructura trimérica con tres subunidades idénticas de 25kDa cada una y es relativamente estable en las células de mamífero. Además, su detección y análisis son facilitados por la ausencia de proteínas endógenas con características parecidas. No obstante, este ensayo se basa en el uso de cloranfenicol marcado radioactivamente, lo cual limita su posterior aplicación en las células vivas (Rajamanickam *et al.*, 2005; Selbert and Rannie, 2002; Arnone *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2004).

Fosfatasa alcalina (AP).

AP es un término genérico para indicar una familia de fosfohidrolasas de monoéster ortofosfóricos, unas proteínas relativamente estables, expresadas tanto en bacterias como en mamíferos y cuya actividad óptima se manifiesta a pH alcalino.

Debido a su defosforilación de una amplia gama de sustratos naturales y sintéticos, se puede aplicar un amplio número de ensayos con diversos grados de sensibilidad para la medición de su actividad. Un ensayo espectrofotométrico estándar se basa en la hidrólisis de los sustratos de AP para generar el cambio de absorbancia. Los sustratos usados comúnmente para las enzimas de AP son fosfato de p - nitrofenilo (PNPP) (Schenborn *et al.*, 1999) , flavina adenina dinucleótido fosfato (FADP) (Harbron *et al.*, 1992) y quimioluminiscente fenil dioxetano sustituido con fosfato (CSPD).

Es un sistema reportero conveniente y versátil, pero desafortunadamente AP se expresa en prácticamente todos los tipos de células: la presencia de proteínas endógenas similares en los mamíferos disminuye la sensibilidad efectiva de la AP, limitando así sus aplicaciones (Gorr, 1996).

β -galactosidasa (β -gal).

La β -galactosidasa (β -gal) es una enzima bacteriana ampliamente caracterizada y estructuralmente es formada por un homotetrámero cuya subunidad base es de

116kDa (1023 aminoácidos): su función es de catalizar la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos (Jacobson *et al.*, 1994) y su sitio activo hidroliza a un disacárido en presencia de iones de potasio monovalentes (K^+) e iones de magnesio bivalentes (Mg^{2+}).

La enzima β -galactosidasa hidroliza específicamente el enlace β -glucosídico que une a la galactosa y la glucosa, los constituyentes de la lactosa. Dos sustratos artificiales incoloros de la β -galactosidasa son de gran utilidad para detectar y cuantificar colorimétricamente esta enzima. Cuando la β -galactosidasa rompe los enlaces β -glucosídicos del ONPG (orto-nitrofenil- β -galactósido) y el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido), los productos de la reacción son galactosa y compuestos de intenso color, el orto-nitrofenol (amarillo) y el 5-bromo-4-cloro-3-indol (azul), respectivamente. La β -galactosidasa también puede isomerizar el enlace glucosídico de la lactosa, dando lugar al disacárido 1,6-alolactosa, el cual es el auténtico inductor natural del operón de la lactosa.

En levadura, para llevar a cabo experimentos de clonación génica, este compuesto se puede utilizar como indicador de aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa, codificada en el gen *lacZ* del operón *lac*. Esta fusión ha sido largamente utilizada para cuantificar la expresión génica. Sin embargo, para poder utilizar este sistema reportero hace falta obtener un extracto celular o permeabilizar previamente las células. Este tratamiento limita su uso en análisis en que la integridad y la fisiología de la célula son requisitos esenciales, como por ejemplo los abordajes cinéticos. Para este tipo de ensayos se prefieren utilizar como reporteros proteínas fluorescentes o bioluminescentes.

Green fluorescent protein (GFP).

La **proteína verde fluorescente** (o **GFP**, por sus siglas en inglés, *green fluorescent protein*) es una proteína sintetizada por la medusa *Aequorea victoria* capaz de producir una fluorescencia en la zona verde del espectro visible. Con la GFP se puede investigar una gran variedad de procesos biológicos fundamentales, tales como la expresión genética o la localización intracelular de proteínas fusión. Esta proteína está constituida por 238 aminoácidos (28kDa) que, a través de once cadenas beta, forman un cilindro, en el centro del cual se encuentra una hélice alfa (Yang *et al.*, 1996, Prasher *et al.*, 1992). La GFP presenta dos picos de excitación: el primero, cercano a los 395 nm; el segundo, de 475 nm, y también dos picos de emisión: si es excitada a los 395 nm su pico de emisión será a los 508 nm, y si, por el contrario, es excitada a 475 nm, entonces la emisión ocurriría a 503 nm (Tsien, 1998).

La emisión de luz es consecuencia de un mecanismo secuencial y autocatalítico en ausencia de cofactores. La reacción inicia con una rápida circularización de la Ser65 y la Gly67 para formar un producto intermedio (imidazolin-5-one) seguido por una reacción de oxidación de la Tyr6. La reacción es termosensible, pero una vez formada, la GFP es muy estable.

El interés de la GFP desde el punto de vista biotecnológico reside en que esta proteína se comporta como una señal fluorescente capaz de expresarse en células mediante las técnicas rutinarias de transgénesis. Al llevar el mecanismo de producir la fluorescencia incorporada en su estructura, la fluorescencia de la GFP puede producirse y mantenerse espontáneamente en aquellas células vivas que incluyan el gen que la codifica, sin necesidad de añadir otros agentes o cromóforos. Su secuencia puede fusionarse a otras proteínas, proporcionando a éstas un dominio fluorescente como etiqueta, que sirve para poder seguir su actividad in vivo, seleccionar y aislar aquellas células que producen la proteína fusionada a GFP o cuantificar la cantidad de dicha proteína producida en un momento dado. Es utilizada como marcador fusionado a polipeptidos o como indicador de estados químicos-fisiológicos intracelulares, en todo tipo de células, subcompartimentos celulares y organismos, desde procariotas hasta mamíferos.

Al no tener una actividad enzimática, la GFP resulta un excelente indicador porque no interfiere con el estado fisiológico de la célula (Tsien, 1998; Fernandez *et al.*, 2006). La fluorescencia de la GFP unida a otras proteínas, dependiendo de las condiciones del medio puede ser utilizada para monitorizar procesos complejos intracelulares, como actividad y visualización de las señales en cascadas, cambios de pH, calcio, voltaje, potasio, dinámica de segundos mensajeros, activación enzimática, interacción proteína-proteína y cambios conformacionales (Tsien, 1998; Miyawaki, 2003; Zaccolo, 2004; Miyawaki, 2003).

El éxito de este reportero es debido también a la existencia de un elevado número de variantes que son utilizadas por su capacidad de emitir luz con diferentes longitudes, desde el cian hasta el rojo (Alieva *et al.*, 2008; Wiedenmann *et al.*, 2004; Deheyn *et al.*, 2007). La caracterización y la generación de nuevas variantes de proteínas fluorescentes con características especiales, han implicado nuevas aplicaciones. Por ejemplo, las variedades fotoactivables han permitido la medición precisa de eventos de difusión y tráfico molecular, además de dar lugar a métodos experimentales de muy

alta resolución, incluyendo la visualización mediante microscopía de moléculas individuales (Kremers *et al.*, 2011).

Luciferasas y su uso como reportero en ensayos de la expresión génica.

Luciferasa es un término genérico para la clase de enzimas oxidantes utilizados en ensayos de bioluminiscencia. Un ejemplo es la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Figura 8) (Gould and Subramani, 1988).

El término "Luciferasa de luciérnaga" como reactivo de laboratorio por lo general se refiere a luciferasa de *P. pyralis* aunque luciferasas recombinantes a partir de varias otras especies de luciérnagas son también disponibles de forma comercial. El nombre se deriva de Lucifer, cuyo significado es "portador de luz" (*Lucem ferre*).

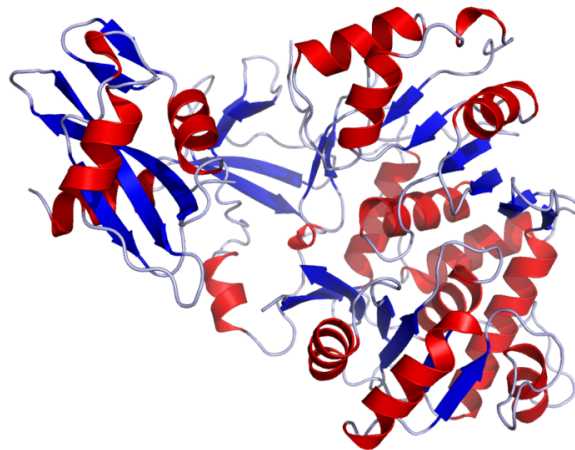
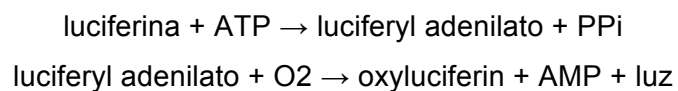


Figura 8 . Estructura de la luciferasa de luciérnaga. Este dato fue obtenido de Protein Data Bank (PDB 1CI) (Conti *et al.*, 1996)

La reacción catalizada por la luciferasa de luciérnaga se lleva a cabo en dos fases (Figura 9):



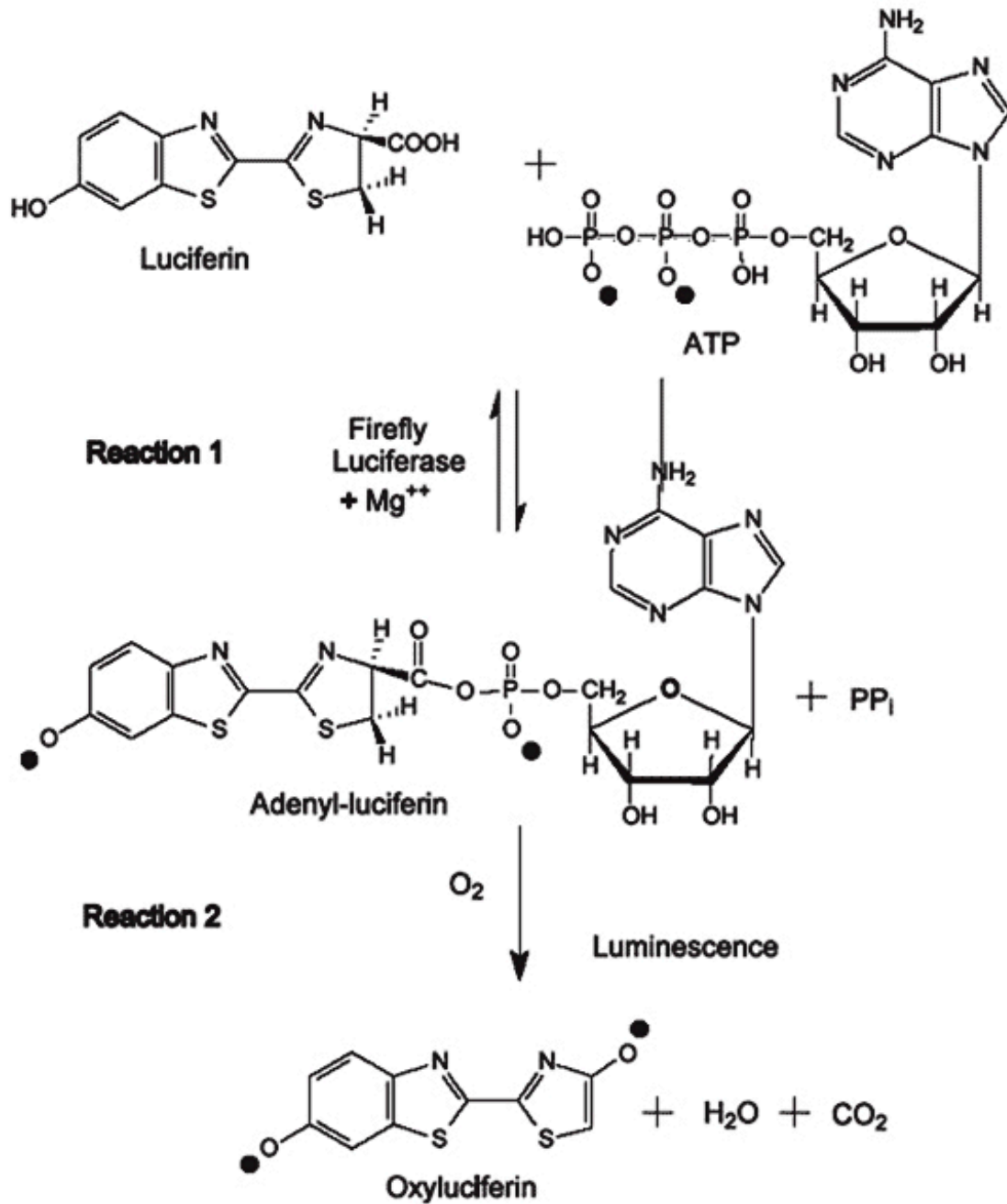


Figura 9. Etapas de la oxidación de luciferina por la luciferasa de luciérnaga. El producto de la reacción es la producción de un fotón.

La reacción es muy eficiente energéticamente, de modo que casi todo el consumo de energía en la reacción se transforma en luz (560 nm). Otra ventaja del uso de la luciferasa como reportero es la elevada sensibilidad de la detección de su actividad (emisión de fotones) por aparatos como el luminómetro o microscopios ópticos modificados para la detección de luz procedentes de células vivas o tejidos.

En la investigación, la luciferasa se utiliza comúnmente como reportero para evaluar la actividad transcripcional en células que son transformadas/transfectadas con una construcción genética que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor de interés. La luciferasa también se puede utilizar para detectar el nivel de ATP celular en ensayos de viabilidad celular o para los ensayos de actividad de quinasas (Fan and Wood, 2007).

El gen *Luc* (codifica la luciferasa de luciérnaga) puede ser acoplado a promotores endógenos y utilizado como reportero no invasivo de la actividad de los promotores. Los índices de la reacción entre la luciferina y el oxígeno son muy lentos hasta que son catalizadas por la luciferasa, a veces mediada por la presencia de varios cofactores. En particular, la Luciferasa de luciérnagas es una proteína de 62kDa que puede catalizar la oxidación del sustrato “luciferina” en presencia de O₂, ATP, Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺; la energía librada por esta reacción produce, tras un estado de excitación electrónica, la emisión de un fotón (Hastings and Johnson, 2003). Luciferasa no requiere excitación por fuentes externas de luz como otros reporteros fluorescentes, evitando así complicaciones como fotoblanqueamiento (“photobleaching”), fototoxicidad y respuestas endógenas a la luz. Más aún aplicado en levadura, los reporteros *Luc* no tienen problemas de autofluorescencia.

Aunque la luciferasa ha ganado popularidad en ensayos con bacterias y células de mamíferos, los ensayos con β-galactosidasa siguen siendo los genes reporteros más utilizados en levadura. Sin embargo, los ensayos con β-galactosidasa requieren más tiempo y son menos sensibles que los ensayos con luciferasa (De Wet *et al.*, 1987; Pazzagli *et al.*, 1992).

En levadura *in vivo*, la emisión de luz por parte de las luciferasas de las luciérnagas es más alta cuando el pH del medio de ensayo es menor de 3, y eso probablemente es debido al aumento de D-luciferina libre (sustrato de la luciferina) que facilita su difusión a través de las membranas citoplasmáticas (Leskinen *et al.*, 2003). Por lo tanto, ensayos de luciferasa *in vivo* requieren la suplementación suficiente de D-luciferina para garantizar la cuantificación prolongada de la actividad transcripcional.

OBJETIVOS

- Establecer un sistema reportero basado en luciferasa desestabilizada para la cuantificación y monitorización en la expresión génica *in vivo* y en tiempo real.
- Aplicación del sistema luciferasa para el estudio de la regulación transcripcional en respuesta a estímulos graduales: comparación de la respuesta a nutrientes y a estrés osmótico.
- Estudio de la función del factor de transcripción Smp1 en la regulación transcripcional en condiciones de estrés osmótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y condiciones de crecimiento.

En este trabajo se han utilizado las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* descritas en la siguiente tabla:

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741 (silvestre)	<i>MATa; his3Δ1, leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
$\Delta htz1$	BY4741 <i>htz1::KanMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta snf2$	BY4741 <i>snf2::KanMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta gcn5$	By4741 <i>gcn5::KanMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta gal11$	BY4741 <i>gal11::KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 p413GAL1-lucCP+	BY4741 con plásmido p413GAL1-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
BY4741 p423GAL1-lucCP+	BY4741 con plásmido p423GAL1-lucCP+ (2 micron, HIS3)	Este trabajo
$\Delta htz1$ p413GAL1-lucCP+	BY4741 <i>htz1::KanMX4</i> con plásmido p413GAL1-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
$\Delta snf2$ p413GAL1-lucCP+	BY4741 <i>snf2::KanMX4</i> con plásmido p413GAL1-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
$\Delta gcn5$ p413GAL1-lucCP+	By4741 <i>gcn5::KanMX4</i> con plásmido p413GAL1-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
$\Delta gal11$ p413GAL1-lucCP+	BY4741 <i>gal11::KanMX4</i> con plásmido p413GAL1-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
BY4741 p413GRE2-lucCP+	BY4741 con plásmido p413GRE2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
BY4741 p413HOR2-lucCP+	BY4741 con plásmido p413HOR2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
BY4741 p413ALD6-lucCP+	BY4741 con plásmido p413ALD6-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
BY4741 p413SOD2-lucCP+	BY4741 con plásmido p413SOD2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
BY4741 p413CTT1-lucCP+	BY4741 con plásmido p413CTT1-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
$\Delta htz1$ p413GRE2-lucCP+	BY4741 <i>htz1::KanMX4</i> con plásmido p413 GRE2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo

Δ snf2 p413 GRE2-lucCP+	BY4741 snf2::KanMX4 con plásmido p413 GRE2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
Δ gcn5 p413 GRE2-lucCP+	By4741 gcn5::KanMX4 con plásmido p413 GRE2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
Δ gal11 p413 GRE2-lucCP+	BY4741 gal11::KanMX4 con plásmido p413 GRE2-lucCP+ (CEN, HIS3)	Este trabajo
Rpb3-HA	W303-1A con 3xHA-RPB3	P. Mason; colección cepas laboratorio Proft/Pascual-Ahuir
Gal4-TAP	BY4741 con GAL4-TAP-HIS3	Open Biosystems
Gal3-TAP	BY4741 con GAL3-TAP-HIS3	Open Biosystems
Sko1-HA	W303-1A con 3xHA-SKO1-KanMX	colección cepas laboratorio Proft/Pascual-Ahuir
Hog1-HA	W303-1A con 3xHA-HOG1-KanMX	colección cepas laboratorio Proft/Pascual-Ahuir
W303-1A	MATa; his3 Δ -11,-15; leu2-3,112; trp1; ura3-1	R. Rothstein

Tabla1: Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.

Las células de levadura fueron crecidas incubándolas a 28 °C en agitación a 200 rpm en los medios YPD o SD descritos a continuación hasta una densidad óptica (OD) de 0,6-0,8 medida a la longitud de onda de $\lambda=600$ nm.

La absorbancia se midió mediante un espectrofotómetro DINKO SP8001 UV-Vis o Biophotometer *Plus* (Eppendorf). Se utilizó como blanco un volumen de medio de crecimiento sin células.

La preparación de medio **YPD** se llevó a cabo disolviendo 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona bacteriológica y 2 % de glucosa (en caso de medio sólido, se añadió también 2 % de agar bacteriológico) en agua desionizada y se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos. Para la selección de transformantes con marcador de resistencia a kanamicina se utilizó medio YPD suplementado con G418 (geneticina) a una concentración final de 200 μ g/ml.

Para la preparación del medio **SD** se disolvió en agua desionizada 0,67 % de *Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos, añadiendo ácido succínico (0.5 M) llevado a pH 5,5 con Tris (concentración final 50mM), 2 % de glucosa (dextrosa) y 2 % de agar bacteriológico en caso de medio sólido. A continuación, el medio se suplementó con los aminoácidos requeridos según la cepa a partir las disoluciones stock adenina 100x (2,5 g/l), uracilo 100x (2,5 g/l), triptófano 100x (2,5 g/l), histidina 100x (2,5 g/l) y leucina 100x (2,5 g/l). Las disoluciones se esterilizaron por filtración y se conservaron en alícuotas a 4 °C con la excepción del uracilo, conservado a temperatura ambiente.

En los ensayos donde se requirió someter las células de levadura a condiciones de estrés, se utilizaron los siguientes agentes:

En el caso de estrés osmótico, se sometieron las células de levadura crecidas en el medio oportuno hasta fase exponencial de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) o sorbitol según la cepa a tratar y el experimento llevado a cabo. En caso de requerir estrés oxidativo, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de menadiona.

2 Transformación de levadura.

La transformación de *S. cerevisiae* con los vectores utilizados se llevó a cabo creciendo cultivos de la cepa de levadura a transformar en medio YPD hasta alcanzar una OD de 0,6 - 0,8.

A continuación se precipitaron las células centrifugando los cultivos durante 3 minutos a 3000rpm en una minicentrífuga de sobremesa y se realizó un lavado con agua estéril para eliminar el medio de crecimiento. Se efectuó otro lavado con LiTE (0,1 M acetato de litio en 1xTE (10 mM Tris/HCl pH 7,6; 1 mM EDTA)) estéril. El precipitado obtenido se resuspendió en 0,5 ml de LiTE estéril y se pasó a un tubo de 1,5 ml. Se incubó la muestra a 30 °C durante 15 minutos, obteniendo células de levadura competentes.

La transformación se realizó añadiendo 200-600 ng de la construcción a introducir (en un volumen de 1-5 µL) a 60 µl de células competentes. Después, se adicionaron 300 µl de 10xLiTE/40%PEG4000 (1:10) preparado en fresco.

Se incubaron las células a 30°C durante 30 minutos y a continuación a 42°C durante 20 minutos. A continuación se pasó a centrifugar durante un minuto a 13000rpm (máxima velocidad), se realizó un lavado con agua estéril y se sembraron las células en placas con medio mínimo **SD** más la complementación de los aminoácidos requeridos para la selección de los transformantes según el vector utilizado. Finalmente se dejaron crecer a 28 °C durante 3 días.

Para los experimentos de inducción con galactosa, se cultivaron las cepas de levadura transformadas con los plásmidos con el marcador *HIS3* durante la noche en medio mínimo con Rafinosa (**SRaff**) como fuente de carbono (0,67 % de yeast nitrogen base, rafinosa al 2 %, 50 mM ácido succínico pH 5,5, 0,1 g/l leucina, 0,1 g/l de metionina, 0,025 g/l uracilo), a una densidad óptica de 0.6-0.8 a una longitud de onda de 600 nm.

Para los experimentos de estrés osmótico y oxidativo, las cepas de levadura transformadas se cultivaron durante la noche en medio mínimo con glucosa como

fuentes de carbono SD (0,67 % de yeast nitrogen base, 2 % de glucosa, 50 mM ácido succínico pH 5,5, 0,1 g/l leucina, 0,1 g/l de metionina, 0.025 g/l uracilo) a una densidad óptica de 0,5-0,6 medida a una longitud de onda $\lambda=600$ nm. Los ensayos de luciferasa se iniciaron después de la preincubación con luciferina como se describe a continuación.

3 La medición de la actividad de la luciferasa en tiempo real en células de levadura in vivo.

Una vez obtenido el cultivo a la OD deseada, se pasó a incubar el volumen de cultivo necesario para cada ensayo en agitación a 28°C durante 90 minutos (o como se indica) con una concentración final de luciferina (Sigma) de 0,5 mM obtenida a partir de una solución de 10 mM en DMSO como sustrato. El cultivo se distribuyó en alícuotas de 150 μ l (u otros volúmenes como se indica) en pocillos de una placa blanca de 96 pocillos (Nunc).

Para los experimentos con *GAL1*, la galactosa se añadió a la concentración final que se indica en cada ensayo a partir de un stock al 20 % preparado en agua estéril. Para los experimentos con *GRE2*, se añadieron NaCl, KCl, sorbitol, y menadiona a las concentraciones finales indicadas. La emisión de luz se registró (según el experimento, cada minuto hasta cada 4 minutos) a través de un luminómetro de microplacas GloMax 96 (Promega), considerando tres réplicas biológicas. Una vez obtenidas las medias de los triplicados a cada tiempo y condición, se calcularon varios parámetros a través del programa *Microsoft Excel* para tratar de definir cuantitativamente la respuesta transcripcional detectada.

Definimos la tasa de síntesis máxima de un promotor, o velocidad máxima (V_{max}) el valor del incremento máximo de la actividad luciferasa para cada concentración de estímulo. La tasa de error estandar entre las tres diferentes réplicas biológicas es del 10% en el caso del reportero con luciferasa en multicopia y <5 % en el caso de las construcciones centroméricas.

Definimos además la actividad máxima (A_{max}) de un promotor en una determinada condición ambiental como el valor máximo de unidades de luz detectado. Para obtener los valores de A_{max} se normalizaron los valores obtenidos respecto al blanco (control), restando la media de las unidades de luz medias en los pocillos sin aplicar estrés al tiempo en el que se detecta la A_{max} ($A_{control}$), y respecto al número de células, dividiendo por la densidad óptica a una longitud de onda $\lambda=600$ nm.

Definimos por último el valor EC_{50} o concentración media efectiva, como la concentración de estímulo necesaria para lograr la mitad de la activación transcripcional máxima. Para su cálculo se representaron los valores de A_{max} frente a la concentración de estrés a la que se dan estos en escala logarítmica. Los puntos de esta representación que caen en la zona lineal se ajustaron a una recta de regresión logarítmica (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.

4 Construcción de plásmidos.

Como vehículo de propagación y purificación de los plásmidos listados en la figura 10 se empleó la cepa DH5 α (*F'Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoRrecA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 λ-1 thi-1*) de *Escherichia coli*. Las células de bacteria se incubaron a 37 °C en medio Luria-Bertani LB (0.5% de extracto de levadura, 1% de triptona y 1% de NaCl, ajustado a pH 7). Para la preparación de medios sólidos se añadió un 2 % de agar y cuando fue requerido, se añadió el antibiótico ampicilina (50 μg/ml) o kanamicina (100 μg/ml) para la correcta selección de los transformantes.

La secuencia del gen de la luciferasa de la luciérnaga LucCP⁺, desestabilizada por la presencia de los motivos CL1, PEST y ARE, fue amplificada por PCR (cebadores #719 + #720, véase anexo) utilizando como “*template*” el plásmido pGL3 (R2.2) (Invitrogen, véase anexo). El fragmento LucCP⁺ (aproximadamente 2 kb) fue clonado en el vector del sistema Gateway (Invitrogen) pDONR221 (véase anexo) usando los adaptadores attB1 y attB2 del inserto y los adaptadores attP1 y attP2 de pDONR221 según las instrucciones de Invitrogen. La reacción tuvo lugar utilizando 1 μl de vector pDONR221 (150 ng/μl), 2 μl de tampón TE, 1 μl de BP Clonase II MIX y 66 ng de producto lucCP⁺ incubando 1 h a 25 °C y luego añadiendo 0,5 μl de proteinasa K e incubando durante 10 minutos a 37 °C. La construcción fue transformada en células DH5 α y se seleccionaron las células con los plásmidos recombinantes en medio LB sólido con kanamicina. Las construcciones correctas obtenidas por mini-preparación del ADN fueron identificadas por tratamiento con enzimas de restricción y electroforesis en geles TAE con 1 % de agarosa.

Para obtener las fusiones pGAL1-lucCP⁺ se llevaron a cabo las reacciones LR del sistema Gateway con los plásmidos pAG413GAL1-ccdB (CEN, HIS3, AmpR) y pAG423GAL1-ccdB (2 micron, HIS3, AmpR) del sistema “Yeast Advanced Gateway” (Alberti et al. 2007) según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se transformaron en la cepa DH5 α y se seleccionaron las células con los plásmidos recombinantes en medio LB sólido con ampicilina. Las construcciones correctas

obtenidas por mini-preparación del ADN, fueron identificadas por tratamiento con enzimas de restricción y electroforesis en geles TAE con 1 % de agarosa. Los plásmidos generados contienen la fusión pGAL1::lucCP⁺ y la secuencia pGAL1 está flanqueada por los sitios únicos de restricción *SacI* y *SmaI*. Así pues es posible, cortando previamente con dichas enzimas, clonar otros promotores sustituyendo así al promotor *GAL1*. Los promotores se obtuvieron amplificándolos previamente por PCR a partir de DNA genómico de levadura utilizando oligonucleótidos que, además de la secuencia complementaria, llevan adaptadores que generan en los extremos los mismos sitios de restricción. Así se subclonaron las regiones promotoras de *GRE2* (nucleótidos -940/-7), de *HOR2* (nucleótidos -948/-33), de *ALD6* (nucleótidos -785/-2), *SOD2* (nucleótidos -977/-16) y *CTT1* (nucleótidos -983/-10) (véase anexo para las secuencias de los cebadores utilizados).

Todas las fusiones lucCP⁺ que se crearon en este trabajo se verificaron por secuenciación utilizando el cebador M13-reverse. Los plásmidos fueron transformados en las cepas de levadura indicadas por el método de acetato de litio y los transformantes fueron seleccionados en medio mínimo (SD) sin histidina.

Los plásmidos utilizados en este trabajo fueron:

Nombre	Características	Procedencia
p413 GAL1-lucCP+	GAL1p-lucCP+, CEN, HIS3	Este trabajo
p423 GAL1-lucCP+	GAL1p-lucCP+, 2micron, HIS3	Este trabajo
p413 GRE2-lucCP+	GRE2p-lucCP+, CEN, HIS3	Este trabajo
p413 HOR2-lucCP+	HOR2p-lucCP+, CEN, HIS3	Este trabajo
p413 ALD6-lucCP+	ALD6p-lucCP+, CEN, HIS3	Este trabajo
p413 CTT1-lucCP+	CTT1p-lucCP+, CEN, HIS3	Este trabajo
p413 SOD2-lucCP+	SOD2p-lucCP+, CEN, HIS3	Este trabajo

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este trabajo.

5 Manipulaciones de ADN.

Extracción de ADN genómico de levadura:

Para la extracción de ADN genómico de levadura se incubaron cultivos de 3-5 ml de YPD toda la noche a 28 °C hasta alcanzar la fase estacionaria. Las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 30 segundos. A continuación se lavaron las células una vez con agua estéril y sucesivamente se resuspendieron en 200 µl de tampón de protoplastos (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 µl/ml β-mercaptoetanol, 0,2 mg/ml zimoliasa). La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora y se añadieron 200 µl de tampón de lisis (0,2 M NaOH, 1 % SDS; preparado en el momento). Después de agitar delicadamente (sin vortex), se procedió incubando a 65

°C durante 20 minutos y se añadieron 200 µl de acetato de potasio 5 M a pH 5,5. Se mezcló (sin vortex) el tubo, se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, en que se precipitó el ADN cromosómico mediante la adición de 600 µl de isopropanol. El precipitado de ADN que se obtuvo tras centrifugar 1 minuto a la máxima velocidad de la minicentrífuga se lavó una vez con 70 % de etanol y se dejó secar, siendo resuspendido para finalizar en 50 µl de tampón TE. Como molde para la PCR, se usó 1 µl de muestra.

PCR: En un volumen final de 50 µl se mezclaron: DNA template 10 ng, 5 µl tampón de PCR comercial 10x, dNTPs 200 µmol, 100 pmol de cada cebador y 1 unidad Taq DNA polimerasa Biotools®.

Programa utilizado para la PCR:

1x	2' a 95°C
40x	1' a 95°C
	1' a 53°C
	2' a 72°C
1x	10' a 72°C

Ligación: Para la ligación de fragmentos de ADN previamente cortados con enzimas de restricción, se utilizó una cantidad de ADN entre 0,2 y 1,5 µg, 1 µl de Buffer T4 Ligasa (10x) y 1 µl de enzima Ligasa del fago T4 (Fermentas) en un volumen total de 10 µl. Se dejó incubar a 10 °C o/n.

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa (Freeze Squeeze):

El aislamiento de fragmentos de ADN tras electroforesis se llevó a cabo mediante la técnica “freeze-squeeze” (Tautz y Renz, 1983) modificada. Se puede extraer fácilmente el ADN dentro de una rodaja de agarosa, comprimiendo la agarosa por centrifugación, consiguiendo así expulsar el líquido.

Después de haber separado la porción de ADN de interés a través de una electroforesis, la banda de agarosa fue previamente equilibrada con tampón Tris 10 mM a pH 8 durante 5 minutos en agitación y congelada durante al menos 2 horas a -80 °C para destruir la estructura del gel. Tras cortarla en pequeñas rodajas, se insertaron los fragmentos en un cartucho con filtro (0,45 µm Durapore®) obtenido del ADN Gel Extraction Kit de Montage™, y el filtro a su vez se insertó en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugó el dispositivo montado rápidamente durante 10 minutos a 12000 rpm, sin dejar descongelar los trozos de gel. De esta manera se retuvo la agarosa en el filtro y se recuperó el líquido en el fondo del tubo. A continuación se procedió con la purificación del ADN que contenía. Para ello se midió

el volumen obtenido y se añadió una décima parte de volumen de acetato de sodio 3 M y a continuación 2,5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se conservaron las muestras a -20 °C durante toda la noche y a continuación se procedió a la centrifugación de las mismas durante 10 minutos a 13000 rpm, precipitando de este modo el ADN, seguido de un lavado con 70 % etanol. Finalmente se resuspendió el precipitado en 20 µl de tampón Tris 10 mM pH 8 o tampón TE, según su posterior uso.

Finalmente se cuantificó el contenido de ADN por Nanodrop ND-1000.

6 Purificación de ARN total de levadura con fenol ácido.

El día anterior se incubaron los cultivos que contenían la cepa de interés en 20 ml de medio YPD que se dejaron crecer hasta la fase exponencial de crecimiento. Se lavaron con agua y los precipitados fueron resuspendidos en 400 µl de tampón TES (10mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS). Se añadió 400 µl de fenol ácido (equilibrado a pH 4) y se mezcló bien. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 65 °C y después se colocaron los tubos en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras para separar las fases durante 1 minuto a 10000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo de nuevo con 400 µl de fenol ácido. Tras pasar la fase acuosa a otro tubo, se añadieron 40 µl de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol. Se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 14000 rpm y se lavó el precipitado con etanol 70 %. El precipitado obtenido se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de tampón TE. Por último, se midió el contenido de ARN con la ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y se congelaron las muestras a -20 °C.

Precipitación de ácidos nucleicos con alcoholes: En primer lugar se llevó a cabo un tratamiento con fenol-cloroformo. Al mezclar una solución acuosa de ADN con fenol-cloroformo se desnaturalizan las proteínas y se separan de los ácidos nucleicos. Al centrifugar y separar las fases, las proteínas desnaturalizadas se quedan en la interfase y los ácidos nucleicos en la fase superior acuosa. La mezcla de fenol-cloroformo (1:1) es más efectiva para desnaturalizar proteínas que el fenol sólo. El cloroformo se mezcla con alcohol isoamílico en una relación 24:1 para facilitar la separación de fases y evitar formación de espuma durante las agitaciones.

El método de extracción consistió en añadir un volumen de fenol-cloroformo por un volumen de solución de ADN en un tubo. Se agitó brevemente en vortex y se centrifugó un minuto a 10000 rpm para separar las fases. Tras recuperar la fase

superior en otro tubo, se eliminó el fenol mediante extracción con un volumen de cloroformo-isoamílico. Se agitó la mezcla y se centrifugó un minuto y se procedió a recoger la fase superior.

La precipitación se realizó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto por volumen de solución acuosa. Para favorecer la formación del precipitado, la solución debe tener fuerza iónica alta, lo cual se consigue mediante la adición de sales. Éstas deben ser solubles en etanol para evitar que precipiten y conviene que su concentración sea la más alta posible tolerada por su solubilidad en etanol, ya que de esta forma los ácidos nucleicos quedan más limpios de impurezas. Para ello se añadió un volumen de acetato de sodio 0,3 M por volumen de muestra y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C.

Al día siguiente se centrifugó el precipitado formado durante 10 minutos a 13000 rpm y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol absoluto. Tras centrifugar, se dejó secar el precipitado hasta que se evaporó el resto de alcohol y se resuspendió en 15 µl de agua.

Mini-preparación de ADN plasmídico: Se dejó crecer un precultivo de las bacterias que contienen el plásmido de interés en 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico apropiado. Se coleccionaron las células por centrifugación de 1 minuto a 13000 rpm, se resuspendieron las células en 100 µl de tampón TE y se añadieron 200 µl de tampón de lisis (0,2 M NaOH, 1% SDS preparado en el momento). A continuación se añadieron 150 µl de 3 M K-Acetato pH 4,8 y se dejó el preparado en hielo durante 5 minutos. Sucesivamente se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm y se coleccionó el sobrenadante en un tubo nuevo, mezclándolo con 1 ml de etanol absoluto. Se precipitó centrifugando 10 minutos a 13000 rpm, se lavó con 0,5 ml de etanol 70 % y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos. A continuación se secó el pellet y se resuspendió en 50 µl de agua o tampón TE. Se utilizó 1 µl para el análisis con enzimas de restricción.

Inmunoprecipitación de la cromatina: El protocolo de inmunoprecipitación de la cromatina empleado es una modificación del método publicado por Kuras & Struhl, 1999.

Para realizarlo, se incubaron a 28 °C cultivos de cepas de levadura requeridas por el experimento en el medio de crecimiento especificado en el apartado "resultados". Se inocularon volúmenes apropiados según el ensayo. Una vez alcanzada la fase exponencial de crecimiento, se trató con la concentración requerida de agente para

provocar la activación del proceso fisiológico estudiado. Se llevó a cabo la cinética de tiempo deseada y se procedió a fijar las células añadiendo formaldehído a una concentración final del 1 % preparado en el momento a partir de un stock comercial a 37 %.

Se incubaron los cultivos a temperatura ambiente durante 20 minutos, moviéndolos ocasionalmente, y después se añadieron 6 ml de glicina 3 M, dejando incubar durante un tiempo variable, según el experimento, desde 5 minutos hasta el final de la cinética.

Se procedió a centrifugar las muestras durante 3 minutos a 3500 rpm y se lavaron las células dos veces con 50 ml de TBS (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) frío y una vez con 5 ml de tampón de lisis FA frío (50 mM Hepes/KOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % TritonX-100, 1 mM PMSF, 0,1 % deoxicolato sódico) con 0,1 % SDS. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis FA con 0,5 % SDS frío y se añadió 0,5 ml de bolas de vidrio. Las células se rompieron con ayuda de MiniBeadbeater-8™ (Biospec) a velocidad máxima en una cámara a 4 °C durante 1 minuto y repitiendo la agitación 5 veces (dejando las muestras en hielo durante 2 minutos entre cada ronda de agitación) y a continuación se recogió el lisado en un nuevo tubo frío, centrifugándolo durante 1 minuto a 13000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el precipitado conteniente la cromatina insoluble se solubilizó en 1 ml de tampón de lisis FA con 0,1% SDS. Se centrifugó de nuevo 1 min a 13000 rpm y se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis FA con 0,1 % SDS. A continuación se llevó a cabo una sonicación de las muestras con el fin de obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 300-400 pares de bases. Para ello se utilizó un sonicador UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH). Se realizaron 4 rondas de sonicación durante 30-45 segundos, manteniendo en hielo las muestra entre una ronda y otra. Por último, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos en una minicentrífuga fría a 13000 rpm y el sobrenadante, que contiene los fragmentos de cromatina solubles, se transfirió a un nuevo tubo. Las muestras se almacenaron a -20 °C para utilizarlas el día siguiente o a -80 °C hasta su posterior uso.

La inmunoprecipitación de la cromatina se llevó a cabo mediante la utilización de bolas Dynabeads® (Invitrogen), que son partículas con propiedades magnéticas que permiten la separación de materiales biológicos como proteínas o ácidos nucleicos mediante su acople por afinidad a la superficie de las mismas. En nuestro trabajo, se utilizaron bolas que llevan acoplado covalentemente el ligando proteína A o G con afinidad por el anticuerpo α -HA (12CA5 monoclonal de ratón, Roche) o α -myc (9E10 monoclonal de ratón, Roche). Las bolas se suministraron en tampón PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,3) y el día anterior, previo

a su uso, se procedió a lavarlas 3 veces con 1 ml de tampón PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA.

Para ello, se sometió un campo magnético a las bolas en un concentrador de partículas magnéticas DynaMag™-2 (Invitrogen), de modo que el material se pudiese separar rápidamente del sobrenadante. Después de los lavados se añadió a las bolas magnéticas 1 ml de PBS suplementado con BSA y 5 µl [5 mg/ml] de anti-HA o anti-myc por IP. Por último se incubó la mezcla toda la noche a 4 °C. En el caso de la precipitación de proteínas fusionadas con el epítipo Tap, se utilizaron bolas magnéticas “Dynabeads Pan mouse IgG” (Invitrogen) simplemente lavadas con PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA.

A continuación, se llevaron a cabo tres lavados de las bolas con 1 ml de tampón PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA, se resuspendieron en el volumen original usando tampón de lisis FA con 0,1 % SDS y se incubaron junto a 500 µl de muestra (fragmentos de cromatina) durante al menos 90 minutos.

Consecuentemente se procedió a lavar las muestras inmunoprecipitadas. En primer lugar se realizaron dos lavados con 1 ml de tampón de lisis FA con 0,1 % SDS y después otros dos lavados con 1 ml de tampón de lisis FA suplementado con 0,1 % SDS y 0,5 M NaCl. A continuación se llevó a cabo otro lavado con 1 ml de tampón B (10 mM Tris/HCl pH 8, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,5 % NP-40, 0,5 % deoxicolato de sodio) y un último lavado con tampón TE. Entre cada lavado se incubaron las muestras durante 3-5 minutos en un rotor a temperatura ambiente y se separaron del sobrenadante sometiendo los tubos a un campo magnético. Se resuspendieron las bolitas en 250 µl de tampón C (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % SDS, 10 mM EDTA) y se eluyeron las muestras incubándolas durante 10 minutos a 65 °C, en agitación. Opcionalmente se realizaron varias rondas de elución. Después de separarlas por medio de un concentrador magnético, se transfirió el sobrenadante en un tubo nuevo con 250 µl de tampón TE y 20 µl de pronasa (20 mg/ml, Roche).

Se prepararon muestras de cromatina total sin inmunoprecipitar (muestras CT), utilizando 50 µl de cromatina fragmentada a la cual se añadieron 450 µl de tampón TE y 20 µl de pronasa para obtener un volumen similar al de las muestras inmunoprecipitadas.

A continuación se llevó a cabo una desligación de las proteínas de la cromatina incubando las muestras durante 1 hora a 42 °C y 5 horas o toda la noche a 65 °C. Se siguió añadiendo 50 µl de CILi 4 M y se extrajeron los ácidos nucleicos con 1 ml de fenol-cloroformo/isoamilalcohol (1:1) y de nuevo con 1 ml de cloroformo/isoamilalcohol

(24:1). Sucesivamente el ADN se precipitó con 1 ml de etanol más 20 g de glicogen (20 g/l, Roche), mediante incubación o/n a -20 °C.

Al día siguiente se centrifugaron a 4 °C las muestras CT y las inmunoprecipitadas (IP) durante 10 minutos a la máxima velocidad de la minicentrífuga y se lavaron con 1 ml de etanol al 96 %, se secaron los pellets obtenidos que sucesivamente fueron resuspendidos en 100 µl de tampón TE.

7 PCR cuantitativa en tiempo real con EVA Green™.

Para cuantificar la cantidad de moléculas de ADN en las librerías, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real. Esta técnica consiente cuantificar de forma relativa la cantidad de una secuencia de ADN presente en las librerías obtenidas, en base a los ciclos de amplificación necesarios para llegar a una determinada cantidad de producto de PCR.

En el ensayo con EVA Green™, el producto de PCR puede ser detectado por la incorporación del fluoróforo comercial (colorante fluorescente descrito a continuación) durante su síntesis.

Las reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo se realizaron en un volumen total de 10 µl y contenían: 2 µl de ADN molde (fragmentos de Cromatina Total o Inmunoprecipitada obtenida mediante ChIP), 3 µl de la mezcla de cebadores 5' y 3' a 3,3 µM (véase Material Suplementario para las secuencias utilizadas) y 5 µl del mix compuesto por el "*Fast EvaGreen qPCR Master mix*" (Biotium; contiene el fluoróforo *Eva Green*®, el tampón de reacción, los dNTPs y la Taq DNA polimerasa) y el fluoróforo de referencia 5(6)-carboxy-X-rodamina (ROX™, Molecular Probes) diluido a 0.1 µM.

La PCR cuantitativa fue llevada a cabo en un detector de secuencias Applied Biosystem 7500 Fast utilizando las condiciones siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 5 segundos a 53 °C y 30 segundos a 72 °C.

Para el análisis de datos se utilizaron los programas 7300 System SDS software versión 1.4 (Applied Biosystems) y Bio-Rad CFX Manager 2.0 (Bio-Rad). Se analizó la curva de fusión del producto, producida como consecuencia de la caída de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de temperatura del producto (T_m), consintiendo la caracterización del fragmento amplificado y la discriminación de productos inespecíficos. Se compararon las curvas de disociación correspondientes a

una misma amplificación para garantizar la ausencia de productos inespecíficos o "primer dimer" (dimerización de los cebadores).

Para estudiar los cambios relativos en la cantidad de transcritos se suelen elegir regiones donde no se espera una unión específica de las proteínas como controles negativos (regiones intergénicas o teloméricas). En este trabajo se utilizaron oligonucleótidos específicos de la región codificante del gen *POL1* [+1796/+1996]. Comparando el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto a la señal base de la región interna de referencia con la región del gen problema en muestras inmunoprecipitadas (IP) y sin inmunoprecipitar (CT), se determinó el aumento de unión de los factores de transcripción en los promotores estudiados. La fórmula utilizada para determinar el grado de ocupación relativo fue: Grado de ocupación = $2^{[(IP - CT)_{POL1} - (IP - CT)_{Gen\ problema}]}$

La qPCR se realizó por duplicado, al menos sobre dos muestras de cromatina independientes para cada cepa y condición. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en una placa óptica de 96 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode #4346906, Applied Biosystems®), sellada con plástico adhesivo MicroAmp® Optical Adhesive Film Applied Biosystems®). Los resultados se representaron por la media del grado de ocupación obtenido para los dos experimentos (relativizando los valores respecto al valor inicial de ocupación al cual se le asignó un valor del 100 %) y la desviación estándar.

8 Electroforesis de ácidos nucleicos.

ADN

La separación de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Dependiendo del tamaño de las moléculas a separar, se prepararon geles de concentración de agarosa variable (entre 0,7 % y 1,5 % p/v) en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y conteniendo EtBr (0,5 µg/ml). Se añadió a las muestras tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilen cianol 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)). Las separaciones electroforéticas se realizaron a voltaje constante (desde 50 hasta 120 V, dependiendo de la concentración de agarosa del gel y del tamaño del fragmento de ADN de interés) en tampón TAE. Para visualizar el ADN mediante iluminación con luz UV, se utilizó el equipo UviTec Cambridge® con una cámara para la captura de imágenes. Los tamaños de las moléculas se estimaron por comparación

con el marcador de peso molecular *1Kb Plus DNA ladder* (Invitrogen) y *Mass Ruler DNA Ladder Mix* (Thermo Scientific®).

9 Northern blot.

Extracción de ARN de levadura.

Se incubaron cultivos de levadura de 50 ml YPD hasta la fase exponencial OD=0,8 sin y con tratamiento hiperosmótico (5 min, 10 min, 20 min y 30 min 0,4 M NaCl). Las células fueron sucesivamente recogidas por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y lavadas con agua MilliQ. A continuación, se resuspendieron en 700 µl de tampón TCES (Tris-HCl pH 8, 0,2 M, NaCl 0,2 M, EDTA 50 mM, SDS 2%) y se añadieron 700 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y aproximadamente 1 ml de bolas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Posteriormente se rompieron células sometiéndolas a agitación vigorosa mediante Mini *BeadBeater* en ciclos de 1 minuto, a través de tres repeticiones entre las cuales se mantuvieron los tubos en hielo al menos 2 minutos. Después los tubos fueron sometidos a centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm para descartar las bolas de vidrio y se recuperó la fase superior en la que se añadieron 600 µl de cloroformo:isoamílico (24:1) por cada tubo. Los tubos se agitaron manualmente y se volvieron a centrifugar 1 minuto a 13000 rpm. La fase superior se recuperó y se pasó a tubos nuevos en los que se añadieron 600 µl de isopropanol. Se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol 70 % y se dejó secar en bancada. Una vez seca, la muestra fue resuspendida en 30 µl de agua MilliQ estéril. La calidad y la cantidad de ARN de las muestras obtenidas se verificaron mediante geles de agarosa (1 g agarosa, 10 ml tampón MAE 10x, 84 ml agua MilliQ, 6 ml formaldehído 37 %). El tampón MAE 10x se preparó mezclando MOPS 0,2 M pH 7, NaAc 50 mM y EDTA 10 mM.

Se cargaron 5-10 µl de ARN (correspondientes a unos 10-30 µg de ARN total) diluidos en 20 µl de tampón de carga 1,25x (formamida desionizada 2,2 ml, formaldehído 37 % 0,8 ml, MAE 10x 0,5 ml, glicerol 80 % 0,4 ml, azul de bromofenol 2 % 0,1 ml) y 1 µl de bromuro de etidio (0,1 %) que permite la visualización mediante la luz ultravioleta, con el objetivo de comprobar que los geles tuvieran equilibradas las cargas entre muestras para poder ser comparables entre sí.

Se incubaron las muestras durante 10 minutos a 56 °C para romper las estructuras secundarias del ARN antes de ser cargadas en geles de agarosa. Se llevó a cabo una

electroforesis sometiendo a los geles a una corriente eléctrica de 120 V durante 2 horas. La visualización mediante luz ultravioleta permitió detectar dos bandas de 3,5 y 1,8 kb que se corresponden con los ARNr (ARN ribosomales) - subunidades mayor y menor respectivamente - que sirven como patrones.

Transferencia de ARN a membrana.

Una vez llevada a cabo la electroforesis de ARN, se realizó la transferencia a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) según el método descrito por Sambrook and Russell, 2001, ya que las moléculas de ARN desnaturalizadas tienen la capacidad de unirse covalentemente a membranas de nylon al iluminarse brevemente con luz ultravioleta.

El gel de ARN fue preincubado en tampón de incubación SSC 10x durante al menos 20 minutos (dos veces, cambiando el tampón para eliminar los restos de formaldehído) y sobre él se dispuso la membrana de nylon y dos papeles Whatman 3 MM, con cuidado especial para evitar la formación de burbujas; se añadieron trozos de papel de filtro con el fin de absorber el exceso de humedad. A continuación, se aplicó una placa de alrededor de 250 g que ejerciera peso sobre el gel para favorecer la capilaridad y se dejó transfiriendo toda la noche.

Las moléculas de ARN tienen cargas negativas y el filtro de membrana está cargado positivamente, así que se produce entre ellos una unión débil que se puede aumentar con la utilización de rayos ultravioleta. Por lo tanto, se procedió a fijar covalentemente el ARN al nylon utilizando durante un minuto UV Stratalinker (Stratagene) que dosifica la luz ultravioleta adecuada. Utilizando el botón de "auto cross-link", se determinó una dosis óptima de 0.12 J de luz de 254 nm. Por último, los filtros de membrana se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Obtención y marcaje radiactivo de sondas de ADN.

Para obtener las sondas se amplificaron los fragmentos de ADN correspondientes a los genes de interés mediante PCR según el siguiente programa: un primer paso de iniciación de 3 minutos a 95 °C seguido de 40 ciclos en los que se repiten 30 segundos a 95 °C para desnaturalizar el ADN, 30 segundos a 55 °C para permitir el alineamiento entre el cebador y el molde y 2,5 minutos a 72 °C durante los cuales se produce la síntesis de nuevas hebras de ADN (fase de extensión); finalmente se añadió un último paso no repetido de 10 minutos a 72 °C para asegurar la amplificación de cualquier hebra de ADN de cadena simple.

Cada reacción de PCR contenía 10 µl de tampón PCR 10x (*Biotools*), 10 µl dNTPs 2 mM, 1 µl del cebador 5' (100 µM), 1 µl del cebador 3' (100 µM), 1 µl de ADN (molde, ADN genómico de la cepa silvestre) y 1 µl de Taq ADN Polimerasa (5 Ud/µl, *Biotools*).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
ACT-1	ATTGAACACGGTATTGTCACCAAC	+518 pb en relación a ATG
ACT-2	CCTTACGGACATCGACATACACAC	+1182 pb en relación a ATG
GRE2-1	GAGGCCTTTGGTAACAACCC	+115 pb en relación a ATG
GRE2-2	GTAATCTGGCCTCCGATACG	+812 pb en relación a ATG
HOR2-1	TTTGTTCGACGTCGACGGTA	+45 pb en relación a ATG
HOR2-2	CCATTTCAACAGATCGTGCT	+750 pb en relación a ATG
ALD6-1	CGAGCAACCAACCGGTC	+64 pb en relación a ATG
ALD6-2	GCACCTTGGAAGTTAGCC	+1045 pb en relación a ATG

Tabla 3: Sondas utilizadas para los diferentes análisis *Northern*.

Una vez obtenida la sonda amplificada, se comprobaron la concentración y el tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. Se procedió al aislamiento del fragmento mediante una modificación del método estándar “*freeze-squeeze*”, descrita anteriormente. Se resuspendió en tampón 10 mM Tris-HCl pH 8, se cuantificó su concentración y se procedió a su marcaje radioactivo.

Las sondas radiactivas fueron generadas con el kit *High Prime* (Roche), de acuerdo a la técnica de marcaje con oligonucleótidos al azar como cebadores (Feinberg and Vogelstein, 1983; Feinberg and Vogelstein, 1984). La mezcla *High Prime* contiene oligonucleótidos al azar, el fragmento Klenow de la ADN Polimerasa, dATP, dGTP y dTTP en un tampón concentrado con glicerol 50%. Se procedió añadiendo 25-50 ng

de molde de ADN (sondas obtenidas en el paso anterior) en agua destilada y estéril hasta llegar a un volumen final de 11 µl por vial. Se continuó desnaturalizando el ADN introduciendo las muestras en un baño a 95 °C durante 10 minutos, seguido por un enfriamiento rápido en hielo. Tras mezclar bien *High Prime*, se añadieron 4 µl al ADN desnaturalizado y a continuación 2 µl de 250µCi *α[³²P]dCTP. Se mezcló y centrifugó antes de incubarlo a 37 °C durante al menos 10 minutos. Pasado este tiempo se paró la reacción añadiendo 2 µl de EDTA 0.2M (pH 8) y/o calentando las muestras a 65 °C durante 10 minutos.

Hibridación de las membranas con la sonda radiactiva y cuantificación de la señal.

Antes de llevar a cabo la hibridación, se sometieron las membranas a una pre-hibridación de 10 minutos a 65 °C con el tampón de hibridación para evitar posteriores hibridaciones inespecíficas. Posteriormente se pasó a la hibridación que consistió en incubar las membranas con la sonda marcada en 10 ml del tampón de hibridación PSE, obtenido mezclando NaPO₃ 1 M pH 7,2 3 ml, 10 % SDS 7 ml y EDTA 0,5 M 20 µl a 65 °C durante toda la noche. Se procedió lavando dos veces las membranas con tampón de lavado SSC 4X/SDS 0,1% durante 10 minutos, cambiando el tampón y una última vez con un tampón SSC 0,4X/SDS 0,1% durante 10 minutos. El tampón SSC 1x se realizó mezclando NaCl 1,5 M con citrato trisódico 0,15 M y ajustando el pH7 con HCl.

Una vez limpias, las membranas se sellaron con papel *Saran Wrap* y se dispusieron en un cassette Hypercassete™ (Amersham) para su exposición por autorradiografía. La duración de la exposición de los filtros por autorradiografía en los cassetes dependió de la eficacia de hibridación obtenida. Los híbridos radioactivos se detectaron con una película Fuji RX.

Cuantificación y reutilización de los filtros.

Se pasó a cuantificar la señal detectada exponiendo los filtros obtenidos en una pantalla Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager (es suficiente la mitad de tiempo de exposición respecto a una película) a temperatura ambiente. Después de la exposición, se escaneó la pantalla en un lector Fujifilm FLA5100™, utilizando el programa Fujifilm Image Reader. A continuación se procedió a la cuantificación mediante el software Image Gauge v. 4.0 de Fujifilm.

En algunos casos, los filtros todavía húmedos (envueltos en *Saran wrap*) fueron reutilizados al menos una vez más eliminando previamente la sonda radiactiva hibridada. Para ello se llevó a ebullición 1 litro de agua con 0.1 % SDS y se metió el filtro dentro, dejando enfriar la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente.

RESULTADOS

1. Construcción y optimización de un sistema luciferasa para la cuantificación de la expresión génica en células vivas de levadura.

La correcta adaptación fisiológica de la célula de levadura en respuesta a estrés osmótico es de absoluta importancia para su supervivencia pues el estrés salino e hipertónico provocan la pérdida de agua y un aumento de la fuerza iónica del interior de la célula. Estos efectos perjudican al correcto mantenimiento y desarrollo de las funciones metabólicas.

Como descrito en la introducción, la ruta central de transducción de señal que opera bajo estrés osmótico es la cascada de MAP quinasas *HOG*. Hog1 genera una respuesta dinámica a nivel transcripcional que puede depender de la gravedad del estrés (Posas *et al.*, 2000, Yale and Bohnert, 2001).

Hasta el día de hoy, poco se sabe sobre la regulación gradual de la expresión génica transitoria. Para comparar de forma cuantitativa la actividad transcripcional en las respuestas graduales a estrés abiótico en *S. cerevisiae*, se quiso introducir un ensayo en el cual se permita monitorizar la expresión génica en tiempo real y sin la necesidad de interrumpir la integridad de la célula.

Por lo tanto, se llevó a cabo la optimización de un método de ensayo reportero basado en luciferasa que fuese capaz de describir indirectamente el rendimiento de un promotor de forma cuantitativa en cultivos vivos de levadura, en base a la producción de luz.

Se eligió el gen luciferasa como reportero, debido a que su actividad es inmediatamente medible como emisión de fotones a partir de la oxidación de su sustrato luciferina y porque no requiere excitación exógena, como en el caso de otros marcadores fluorescentes.

El ensayo reportero "ideal" debería cumplir con los siguientes requisitos: (a) detección robusta de la expresión génica a partir de un promotor a una sola copia; (b) adaptabilidad a pequeñas alícuotas de cultivo, para permitir el análisis en serie bajo

muchas condiciones experimentales en un mismo ensayo; (c) permitir la detección en tiempo real de la expresión génica para producir una descripción cuantitativa del comportamiento del promotor en estudio; (d) aplicabilidad a respuestas transcripcionales transitorias.

En primer lugar, se subclonó una versión desestabilizada del gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor *GAL1*, tanto en un plásmido centromérico (p413GAL1-lucCP⁺) como multicopia (p423GAL1-lucCP⁺) (Figura 10).

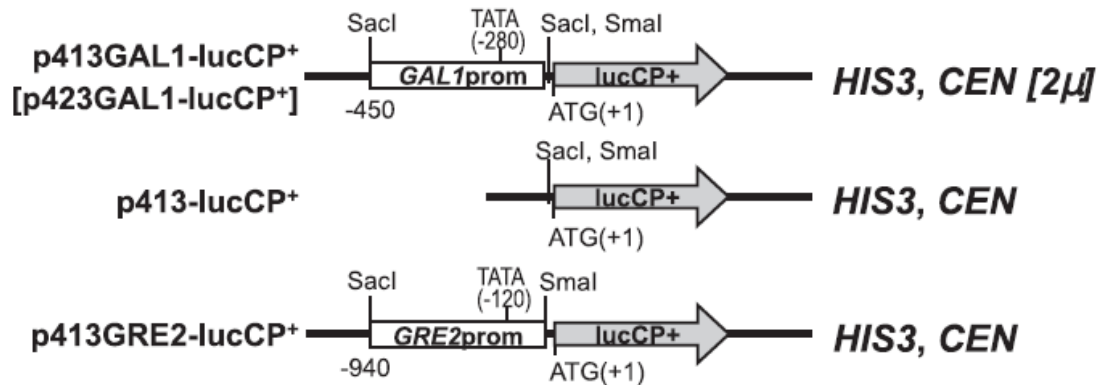


Figura 10. Construcciones de plásmidos generados en el trabajo presentado. El gen luciferasa de luciérnaga desestabilizado por contener dos motivos de degradación proteica (PEST y CL1) y un motivo de degradación de ARNm (ARE) fue subclonado bajo el control transcripcional del promotor del gen *GAL1* en una construcción multicopia (p423GAL1-lucCP⁺) y en una centromérica (p413GAL1-lucCP⁺). La eliminación de la secuencia regulatoria de *GAL1* creó el plásmido p413-lucCP⁺ con sitios de clonación únicos *SacI* y *SmaI* antes de la secuencia de *lucCP+*. La región del promotor del gen *GRE2* (nucleótidos -7 hasta -940) fue subclonada en el vector p413-lucCP⁺ para regular la expresión de la luciferasa en la construcción p413GRE2-lucCP⁺.

La desestabilización de luciferasa ocurre a dos niveles diferentes: Al nivel de la degradación proteica (motivos PEST y CL1) y al nivel de la degradación de ARNm (motivo ARE) (véase materiales y métodos).

Los primeros ensayos de inducción de las fusiones GAL1-lucCP⁺ nos indicaron que la presencia del gen reportero en una única copia era suficiente para determinar perfiles fiables dosis-respuesta en levadura. Por lo tanto, en los estudios dinámicos de la expresión génica del presente trabajo se utilizaron exclusivamente fusiones lucCP⁺ en plásmidos centroméricos.

2. Determinación de la regulación dinámica del promotor *GAL1* en respuesta a la concentración del inductor galactosa usando el sistema luciferasa.

Con el objetivo de poner a prueba la utilidad y la eficiencia del sistema luciferasa para determinar la regulación dinámica de promotores en levadura, se llevó a cabo una serie de ensayos para poder estudiar los cambios de actividad del promotor del gen *GAL1* a lo largo del tiempo sometido la célula a distintas concentraciones de galactosa como estímulo ambiental.

Para caracterizar un rango dinámico de sensibilidad a la galactosa, su inductor, se llevó a cabo un experimento donde se sometió la cepa de levadura que contiene el plásmido p413GAL1-lucCP⁺ a diferentes concentraciones de galactosa (desde 0,008 hasta 2%). Se midió la actividad del gen reportero mediante la determinación del aumento de luz por minuto en alícuotas de cultivo de levadura.

Se encontró (Figura 11) que el promotor del gen *GAL1* responde con una actividad retrasada y muy baja a concentraciones de galactosa de 0,02% (= 1 mM). Incrementando la concentración de galactosa se observó una respuesta cada vez más rápida, combinada con el aumento de la actividad del promotor hasta la concentración de galactosa de 0,5%. Nuevos aumentos de la concentración de galactosa no incrementan más la actividad del promotor, mientras que el tiempo que necesita el promotor para responder a los estímulos sigue disminuyendo ligeramente.

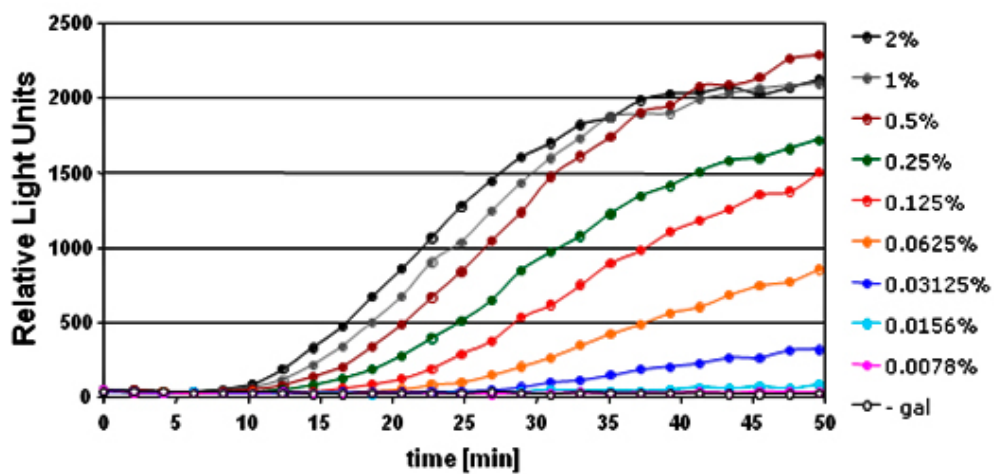


Figura 11. Perfiles de la actividad in vivo del promotor *GAL1* en presencia de diferentes concentraciones de galactosa. La cepa silvestre BY4741 con el plásmido p413GAL1-lucCP⁺ que expresa luciferasa bajo el control del promotor *GAL1* fue crecida en medio mínimo con rafinosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fue incubada con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Al tiempo 0 fue añadida galactosa a las concentraciones indicadas y se midió la emisión de luz correspondiente a través de un luminómetro en triplicado cada dos minutos. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%.

El sistema de luciferasa y la determinación continua de la actividad promotora permiten calcular la tasa de síntesis máxima de un promotor si se considera que la eficiencia de la traducción o la estabilidad del ARN mensajero no cambia significativamente en el periodo inicial de la activación transcripcional. Definimos este valor como la velocidad máxima V_{max} , que se calcula como incremento máximo de la actividad luciferasa para cada concentración de estímulo. Esto es posible en el caso de *GAL1* porque el promotor responde al estímulo con un aumento lineal de la actividad de la luciferasa para todas las concentraciones de galactosa que se han utilizado.

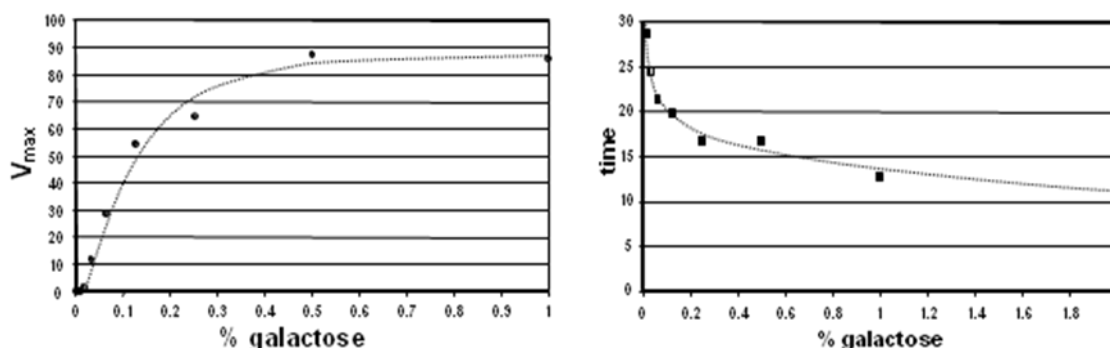


Figura 12. Tasas de síntesis máxima y tiempos de respuesta para el promotor del gen *GAL1* en respuesta a diferentes concentraciones de galactosa. El primer gráfico (izquierda) presenta como varía la tasa de síntesis máxima V_{max} del ensayo descrito en la figura 11 en función de la concentración de galactosa. Los valores V_{max} de *GAL1* fueron calculados analizando los datos correspondientes al incremento de producción de luz en la fase lineal de las curvas para cada concentración de galactosa. El segundo gráfico (derecha) muestra como varía el parámetro del tiempo transcurrido para activar la transcripción de *GAL1* en función de diferentes concentraciones de galactosa en el experimento previo; este valor corresponde al tiempo desde que la célula experimenta el estímulo a la activación transcripcional.

Esto se traduce en coeficientes de correlación $> 0,99$ para el análisis de regresión de cada una de las curvas de dosis-respuesta para *GAL1*. La Figura 12 muestra la correlación entre la V_{max} y la concentración de galactosa. La aplicación del sistema lucCP⁺ permite identificar el rango dinámico de *GAL1* que corresponde a las respuestas graduales de la actividad del promotor en función de las diferentes concentraciones del inductor.

El rango dinámico de la respuesta de *GAL1* se puede definir para las concentraciones de galactosa de 0,02% a 0,5%. Una mayor concentración de estímulo (más de 0,5% de galactosa), básicamente provoca curvas con perfiles de respuesta idénticos.

Otro parámetro para describir el comportamiento del promotor *GAL1* es el tiempo necesario para poderse activar en respuesta a estímulos y producir señales de luz detectables en el luminómetro. Se observó que con concentraciones menores de galactosa el tiempo de respuesta es mayor mientras que va respondiendo en tiempos cada vez más breves con concentraciones superiores (Figura 12, derecha).

3. Determinación de la dinámica de acumulación de ARN pol II y remodelación de la cromatina en el promotor *GAL1*.

El ensayo con luciferasa como gen reportero ofrece la posibilidad de estudiar el rango dinámico de respuestas de un gen a través del estudio de la actividad de su promotor si se considera que la eficiencia de la traducción o la estabilidad del ARN mensajero no cambia significativamente en el periodo inicial de la activación transcripcional.

Para averiguar que efectivamente son efectos transcripcionales que determinan la dinámica anteriormente observada con el sistema reportero lucCP⁺, se examinaron los niveles de acumulación de ARN pol II en el promotor *GAL1* en función de un gradiente de inducción con galactosa.

Se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, tratando las células de levadura con el mismo baremo de concentraciones de galactosa considerado en el experimento anterior, induciendo así la expresión del gen *GAL1* y monitorizando paralelamente el incremento de la densidad de la ARN polimerasa II en el promotor (Figura 13).

Para este fin, se utilizó una cepa de levadura que expresa la subunidad Rpb3 del complejo ARN pol II fusionada con tres epítomos HA. Se observó que en general el

aumento de la densidad de ARN pol II en *GAL1* provocado por las diferentes concentraciones de galactosa, coincide con los valores de actividad que se monitorizaron en el ensayo con luciferasa. Concentraciones crecientes de galactosa conllevan a una asociación cada vez más mayor de ARN pol II, hasta llegar a una densidad máxima con aproximadamente 0,5% de galactosa. A concentraciones > 0,5% de galactosa no se obtiene un aumento de la asociación de la maquinaria de la transcripción en *GAL1*.

Por lo tanto se confirmó que el gradiente creciente de concentraciones de galactosa aplicado, regula de forma gradual tanto la actividad de *GAL1-lucCP⁺* como el reclutamiento de ARN pol II, definiendo así el rango dinámico del promotor *GAL1*.

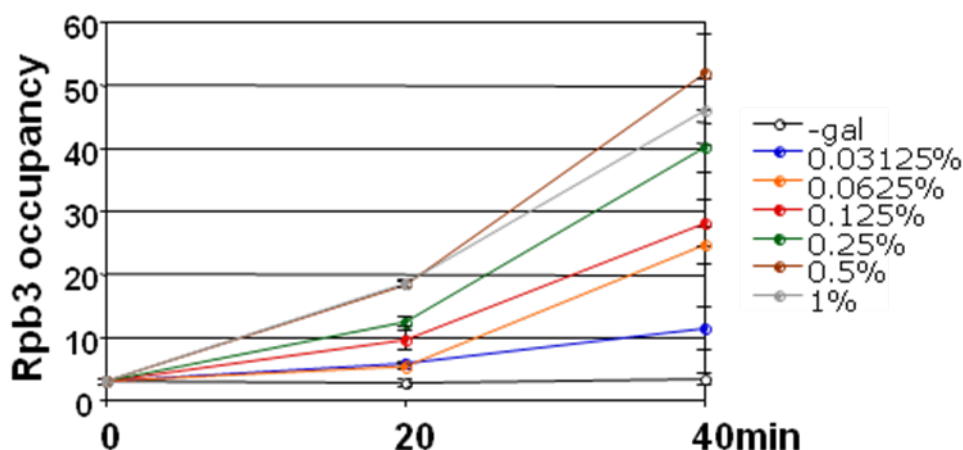


Figura 13. Reclutamiento de ARN pol II en función de la concentración de galactosa en el promotor *GAL1*. La cepa Rpb3-HA de levadura fue crecida hasta la fase exponencial en YP-rafinosa (minuto 0) y luego se suministraron por separado distintas concentraciones de galactosa para inducir el promotor *GAL1*. La densidad de Rpb3-HA fue determinada por ChIP a los tiempos 0, 20 y 40 minutos en la región [-280/-175] de *GAL1* y normalizada por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

Para comprobar si la dinámica transcripcional de *GAL1* observada también se manifiesta en una remodelación dinámica de la cromatina, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos anti H3 con el fin de monitorizar la densidad de los nucleosomas, utilizando las mismas condiciones del experimento anterior. Suministrando concentraciones crecientes de galactosa, se observó que la asociación de H3 disminuye de forma progresiva en el promotor (Figura 14),

presentando una densidad inversamente proporcional a la que se vio en el caso de la ARN pol II.

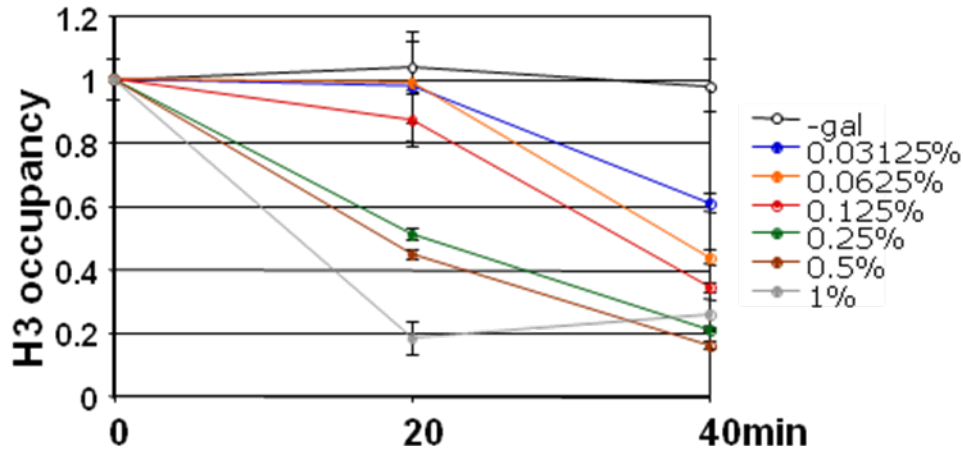


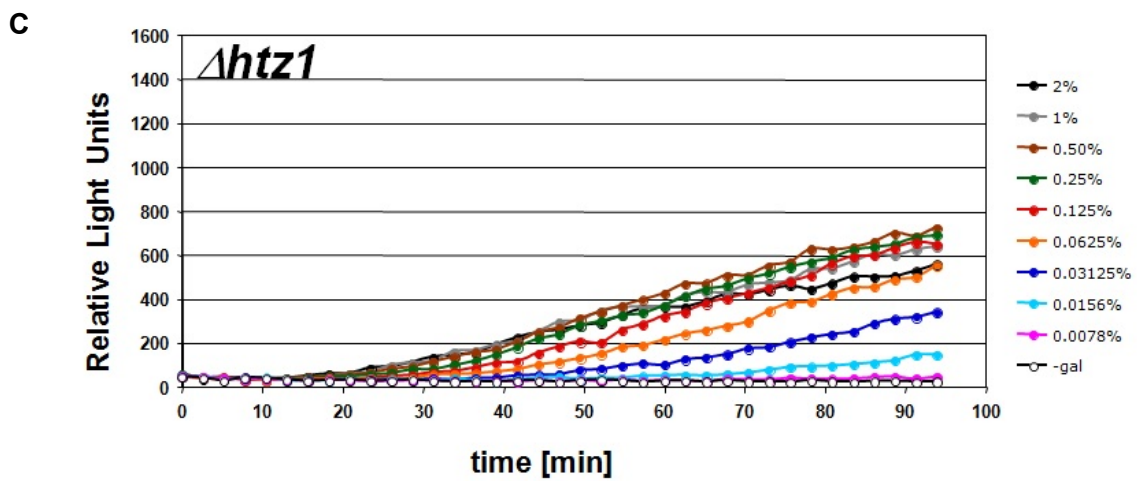
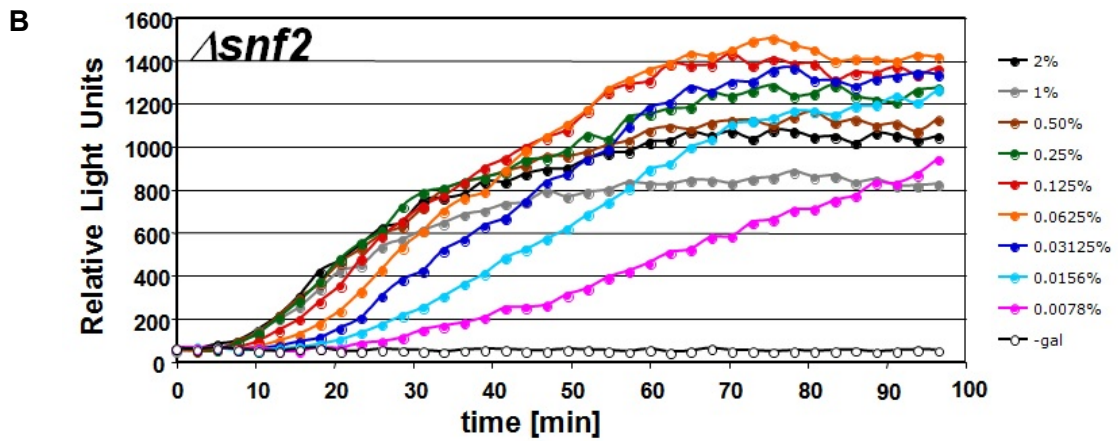
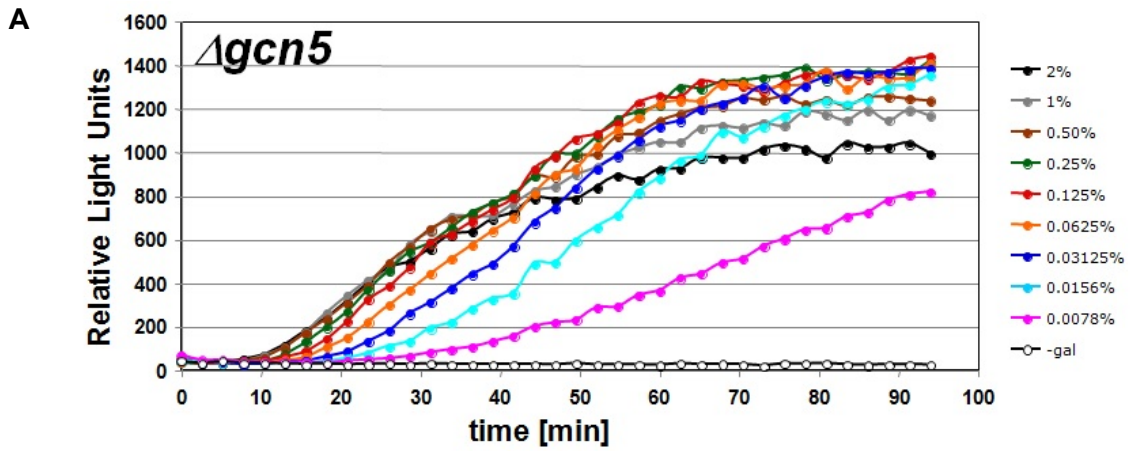
Figura 14. Cuantificación de la asociación de la histona H3 en función de la concentración de galactosa en el promotor *GAL1*. Las células fueron crecidas hasta la fase exponencial en medio YP-rafinosa y luego se suministraron por separado distintas concentraciones de galactosa para inducir *GAL1*. La densidad de H3 fue determinada por ChIP a los tiempos 0, 20 y 40 minutos en la región [-280/-175] de *GAL1* y monitorizado por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

4. El efecto de mutaciones en los complejos SWI/SNF, SAGA y mediador y en la histona H2A.Z a la respuesta dinámica del promotor de *GAL1*.

Los experimentos previos confirmaron que, en presencia de diferentes concentraciones de galactosa, la expresión de *GAL1* se modula a través de la V_{max} definiendo un rango dinámico por medio del sistema lucCP⁺. Este rango se caracteriza por una entrada gradual de ARN pol II y por la remodelación proporcional de histonas en el promotor de *GAL1* tras el estímulo proporcionado.

Se quiso determinar, por lo tanto, la función de complejos coactivadores y modificadores de la cromatina y su efecto al perfil dosis-respuesta de *GAL1*. Se midieron los perfiles de la respuesta del gen reportero p413*GAL1*-lucCP⁺ en las cepas mutantes *gcn5* (SAGA, complejo modificador de la cromatina), *snf2* (SWI/SNF, complejo remodelador de la cromatina), *gal11* (complejo Mediador), y *htz1* (H2A.Z;

variante de la histona H2) para averiguar el papel de los varios componentes en la regulación gradual y dinámica de la actividad del promotor *GAL1*.



D

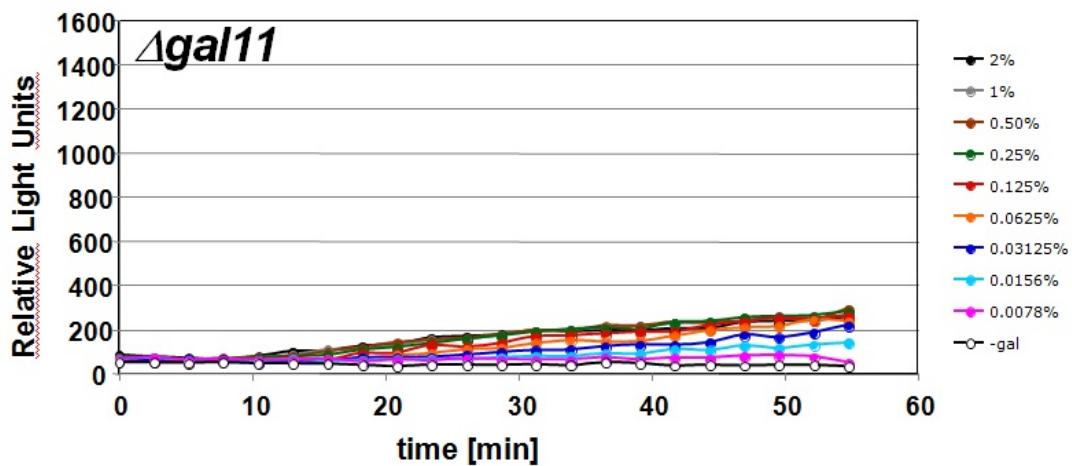


Figura 15. Perfiles dosis-respuesta del promotor *GAL1* en células de levadura sometidas a diferentes concentraciones de galactosa en los mutantes (a) *gcn5*, (b) *snf2* (c) *htz1* y (d) *gal11*, utilizando la construcción p413GAL1-lucCP⁺. Las células fueron crecidas en medio YP-Raff hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fueron incubadas con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Se aplicaron las diferentes condiciones de galactosa al tiempo 0. Se midió la emisión de luz cada dos minutos en alícuotas triplicadas de 150 μ l de cultivo de levadura. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%.

Se repitieron las inducciones con baremos exhaustivos de concentraciones de galactosa en cada mutante como en el experimento anterior y se calcularon las tasas máximas de síntesis en la fase inicial de la activación génica. Como se muestra en la Figura 15, todos los mutantes probados mostraron un rango dinámico reducido en su respuesta a las diferentes concentraciones de galactosa.

En general, se observó un aumento dinámico en las tasas de síntesis del promotor sólo por estímulos de galactosa muy leves. La tasa máxima de la síntesis regulada por el promotor se reduce en los mutantes, que no responden a diferentes concentraciones de galactosa de la forma tan eficiente como en la cepa silvestre. Mutantes en SAGA y SWI/SNF presentan una disminución importante en la actividad transcripcional, mientras que el mutante en el complejo Mediador y el mutante *htz1* muestran una reducción aun más pronunciada de la respuesta dinámica al estímulo. Se llegó a la conclusión de que los complejos de modificación de la cromatina y la variante de la histona Htz1 son necesarios para la respuesta dinámica completa del promotor de *GAL1* a diferentes estímulos de galactosa (Figura 16).

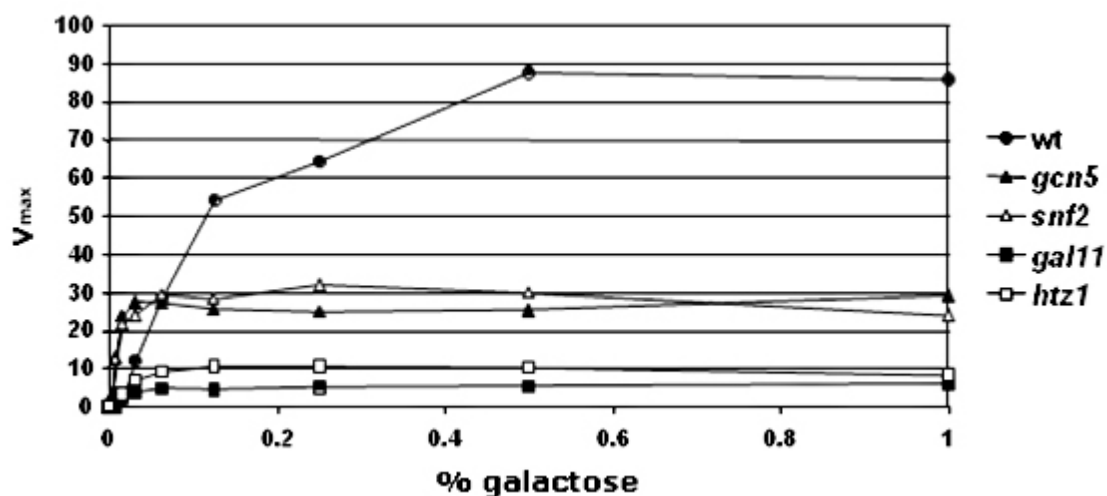


Figura 16. Los complejos SAGA, SWI/SNF, Mediator y la histona Htz1 son importantes para la respuesta dinámica del promotor *GAL1* a diferentes concentraciones de galactosa. Se determinaron los perfiles de inducción del gen reportero centromérico *GAL1-lucCP⁺* en los mutantes indicados (condiciones como en el experimento anterior) y se calcularon las tasas máximas V_{max} de síntesis. Se muestra la relación entre V_{max} y la correspondiente concentración de galactosa para cada cepa en comparación con la cepa silvestre (wt).

5. Efecto de mutaciones en SAGA, SWI/SNF, MEDIATOR a la remodelación dinámica de las histonas en el promotor *GAL1*.

Sucesivamente, se estudió el efecto de las mutaciones en los complejos modificadores de la cromatina tratadas anteriormente monitorizando cómo varía el desplazamiento de los nucleosomas en el promotor *GAL1*. Se determinó por lo tanto, a través de un estudio ChIP, la presencia de la histona H3 en la región [-280/-175] de *GAL1* a los tiempos 0, 20 y 40 minutos tratando con 3 concentraciones de galactosa: 0,03%, 0,25% y 1% (Figura 17).

En la cepa silvestre, una baja concentración de galactosa (0,03%) provoca un desplazamiento ineficiente de H3 del promotor con una cinética considerablemente más lenta respecto a niveles más altos de inductor, aunque, al cabo de 40 minutos la presencia de H3 haya disminuido a valores comparables en las tres concentraciones utilizadas. Este resultado está en acuerdo con el estudio de la actividad de *GAL1* que fue llevado a cabo a través del sistema luciferasa destabilizada. En el mutante *gcn5*, el

desplazamiento de la histona es más lento que en la cepa silvestre y nunca llega a remodelarse completamente.

Además se vio que en los mutantes *snf2* y *gal11* no se genera un cambio efectivo en la densidad de histona H3 en el promotor *GAL1* en presencia de galactosa. El mutante *htz1* presenta un rango dinámico ligeramente reducido que se refleja en una pérdida de sensibilidad al baremo de concentraciones de galactosa; H3 se desplaza aproximadamente con la misma velocidad en todas las concentraciones de galactosa estudiadas. En general, la pérdida de Htz1 tiene un efecto menos pronunciado en la dinámica de remodelación de los nucleosomas de *GAL1*.

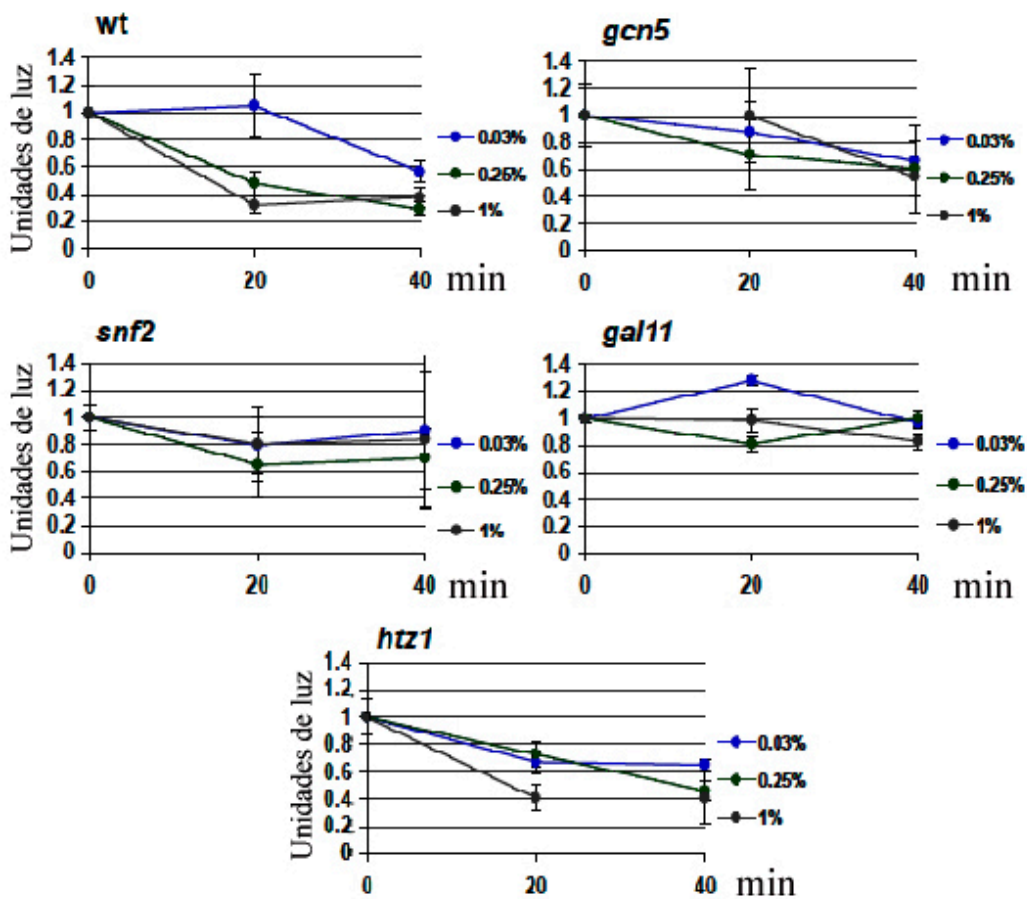


Figura 17. Cuantificación de la asociación de la histona H3 en función de la concentración de galactosa en el promotor *GAL1*. Las células de la cepa silvestre y de las cepas mutantes *snf2*, *gal11*, *htz1* y *gcn5* fueron crecidas en YP-rafinosa y luego se suministraron por separado distintas concentraciones de galactosa para inducir *GAL1*. La densidad de H3 fue determinada por CHIP a los tiempos 0, 20 y 40 minutos en la región [-280/-175] de *GAL1* y normalizada por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

Se vio como el sistema lucCP⁺ resultó útil para caracterizar los perfiles dosis-respuesta de *GAL1*, un gen regulado por nutrientes. La aplicación del sistema reportero lucCP⁺ en combinación con ensayos directamente dirigidos a la estructura de la cromatina, reveló que *GAL1*, en un rango definido de estímulos, adapta su actividad por medio de una remodelación gradual de la cromatina y una entrada gradual de ARN polimerasa II.

Teniendo en cuenta que el sistema lucCP⁺ tiene la característica de eliminar el producto final de la expresión génica, evitando así que la señal detectable se acumule, se quiso utilizar esta técnica para el estudio de genes de respuesta a estrés abiótico caracterizados por una activación transcripcional rápida y transitoria.

6. Determinación de la regulación dinámica del promotor *GRE2* en respuesta a estrés hiperosmótico usando el sistema luciferasa: Un ejemplo para la activación transitoria de un promotor por estrés ambiental.

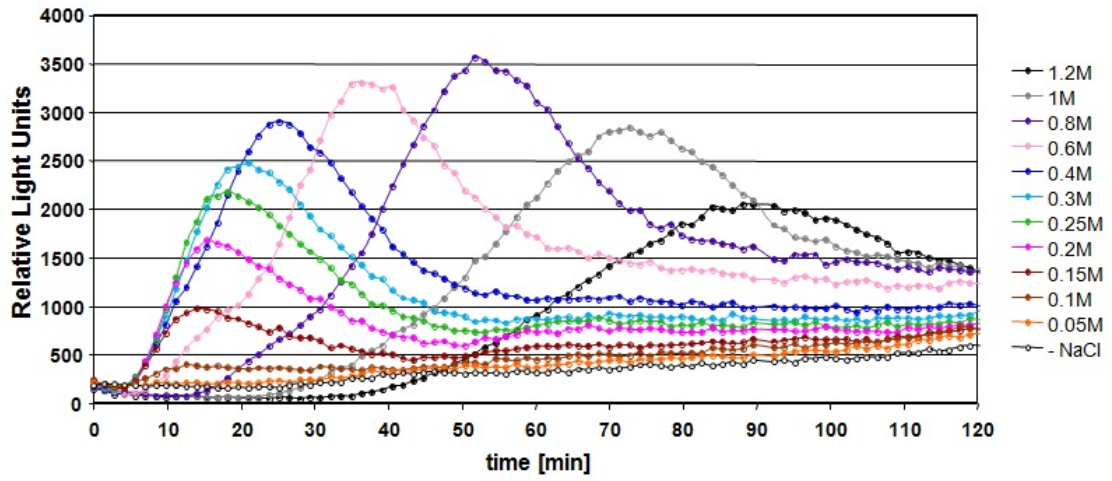
Se quiso aplicar la técnica de la detección continua de la actividad transcripcional por el reportero luciferasa para estudiar la actividad de promotores osmoinducibles. Se fusionó por lo tanto el promotor del gen *GRE2* con lucCP⁺ obteniendo la construcción p413GRE2-lucCP⁺.

GRE2 codifica la 3-methyl butanal reductasa y methyl glyoxal reductasa dependiente de NADPH. Es un gen altamente inducido por estrés osmótico, iónico, oxidativo, por presencia de metales pesados y calor. Es regulado por la ruta HOG a través del factor de transcripción Sko1 (Garay-Arroyo and Covarrubias 1999; Vido *et al.* 2001; Rep *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003; Hauser *et al.* 2007; Proft *et al.*, 2001).

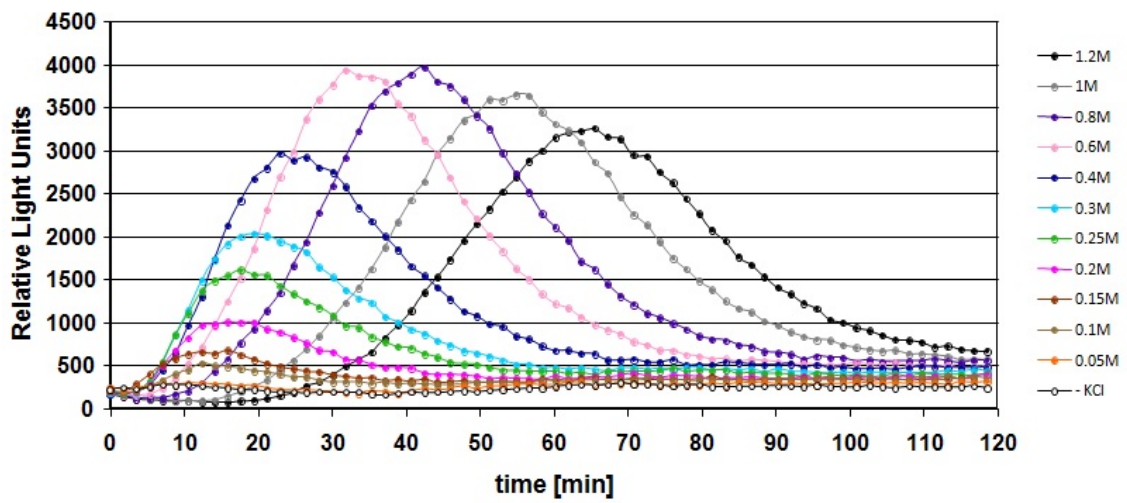
Como primer ensayo se utilizó un amplio baremo de concentraciones de NaCl para activar la fusión GRE2-lucCP⁺. Se generó una serie de curvas del tipo dosis-respuesta que representan las diferentes cinéticas de actividad de *GRE2* (Figura 18).

Analizando los resultados obtenidos, se observó que el sistema de luciferasa es capaz de determinar una respuesta dinámica del promotor *GRE2* generada por una multitud de estreses ambientales. Se midió la actividad de GRE2-lucCP⁺ durante un tiempo de 120 min en respuesta a un baremo de concentraciones de NaCl a través de la emisión de luz, que proporcionó los datos necesarios para determinar la forma en que se regula este promotor en respuesta a diferentes dosis de estrés.

A



B



C

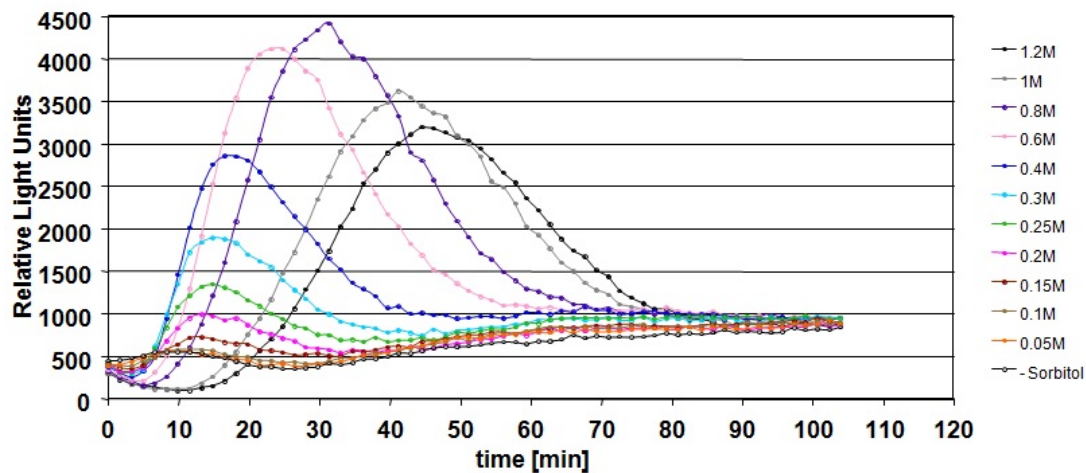


Figura 18. Perfiles dosis-respuesta del promotor *GRE2* bajo diferentes concentraciones de (a) NaCl, (b) KCl y (c) sorbitol. Se utilizó la construcción p413*GRE2*-lucCP⁺ en una cepa silvestre BY4741. Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fueron incubadas con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Se aplicaron las diferentes condiciones de estrés añadiendo (a) NaCl, (b) KCl y (c) sorbitol al medio al tiempo 0. Se midió la emisión de luz cada dos minutos en alícuotas triplicadas de 150 μ l de cultivo de levadura. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%.

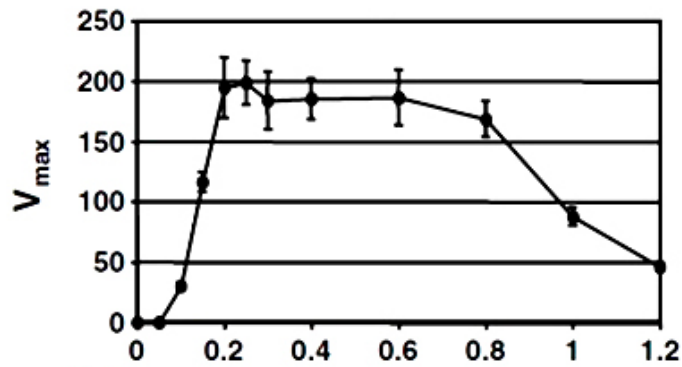
De este primer análisis se pueden considerar diferentes parámetros por curva: la tasa de síntesis máxima y la actividad máxima alcanzada del promotor, el tiempo necesario para alcanzar el nivel máximo, el tiempo de activación del promotor, entre otros. El promotor de *GRE2* está regulado principalmente al nivel del tiempo en que permanece activo y la mayor parte de las condiciones de estrés salino provocan una tasa de síntesis muy alta (V_{max}) (Figura 19 A).

Como descrito en la Figura 18 A, una actividad detectable de luciferasa con esta construcción se observa a partir de concentraciones de aproximadamente 100mM [NaCl]. Concentraciones más bajas generan una respuesta muy breve que es abortada de forma rápida en pocos minutos; en esta situación, la activación de *GRE2* resulta demasiado transitoria para poder describir su comportamiento a través del incremento lineal de la actividad de luciferasa. Entre 100-400mM [NaCl], la fusión *GRE2*-luciferasa se activa siempre en el mismo tiempo; las diferencias en las respuestas al estímulo osmótico se debe al tiempo en que el promotor permanece

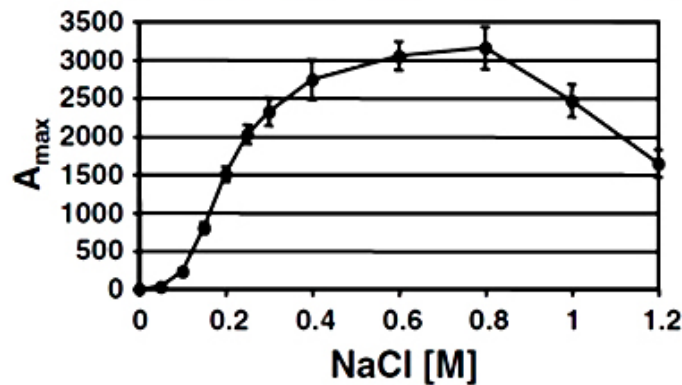
activo. Concentraciones superiores a 150mM activan el promotor de forma suficiente para poder analizar una serie de medidas que indican un incremento lineal y calcular así el ratio máximo de transcripción.

Este rango lineal, debido a la respuesta del promotor de *GRE2*, se hace más largo al aumentar la concentración salina. Concentraciones más elevadas de 400mM afectan a la actividad del reportero retrasando su inducción, lo cual puede ser debido a la interferencia con el proceso de la transcripción en general.

A



B



C

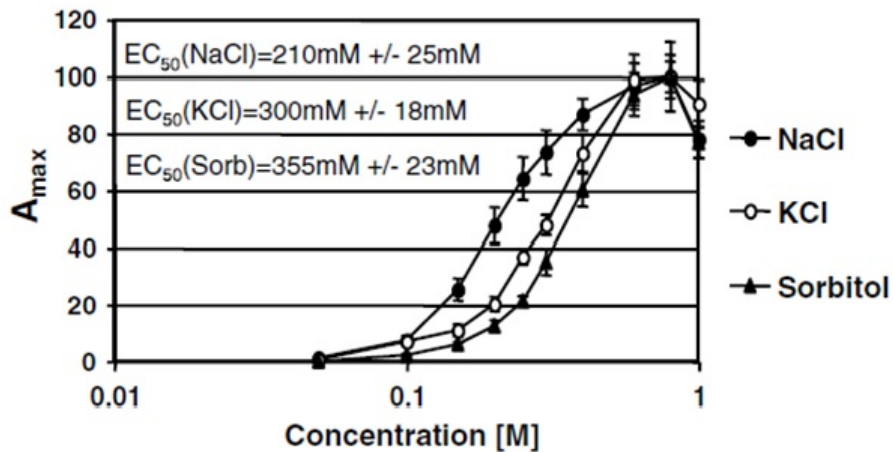


Figura 19. Perfiles de la tasa máxima de síntesis (V_{max}) y de actividad máxima (A_{max}) de *GRE2* en condiciones de diferentes estreses. (A) La tasa máxima de síntesis V_{max} de *GRE2* fue calculada analizando los datos correspondientes al incremento de producción de luz en la fase lineal de la curva de inducción con cada concentración de estímulo (NaCl). (B) La actividad máxima A_{max} indica el valor máximo alcanzado de actividad luciferasa durante el ensayo para cada concentración de estímulo. (C) Sensibilidad del promotor de *GRE2* a diferentes condiciones de osmoestrés; la EC_{50} fue calculada en presencia de estrés por NaCl, KCl y sorbitol, como indicado en Materiales y Métodos.

En conclusión, bajo un incremento de estrés salino aumenta básicamente la duración de la actividad promotora, con tasas de síntesis parecidas. El aumento progresivo del tiempo en que el promotor permanece activado conduce a incrementar la actividad máxima de luciferasa (A_{max}), alrededor de 0,8 M de NaCl (Figura 19 B) e indirectamente refleja la tasa de acumulación del producto final de la expresión génica.

A continuación se indujo el promotor *GRE2* con otras moléculas que provocan estrés osmótico en la célula: se aplicó un baremo de concentraciones de KCl y sorbitol (Figura 18 B y C) y se observaron curvas dosis-respuesta muy parecidas en comparación con las generadas por NaCl. La principal diferencia es un menor retraso de la respuesta transcripcional causada por altas concentraciones de KCl (> 400 mM). Este retraso se reduce aún más cuando utilizamos sorbitol como inductor para obtener la respuesta transcripcional del promotor (*GRE2*). Por lo tanto, es probable que el efecto inhibitor de la transcripción en general sea mayor en el caso de Na^+ en comparación con K^+ o sorbitol.

Llegamos a la conclusión de que el ensayo de luciferasa es adecuado para monitorizar cuantitativamente respuestas de la transcripción muy transitorias.

El tiempo progresivamente más largo en el estado activo del promotor lleva a un aumento de las actividades de luciferasa máxima (A_{max}), que alcanza un máximo alrededor de 0,8 M NaCl, KCl o sorbitol (Figura 19, se muestra para el NaCl). Las actividades máximas obtenidas utilizando diferentes agentes de estrés pueden ser utilizadas para definir la sensibilidad del promotor, en analogía a los valores EC_{50} comúnmente utilizados para la capacidad de fármacos para causar una reacción biológica. Por lo tanto, calculamos la EC_{50} definiéndola como el valor que se corresponde a aquella concentración de estímulo que, al ser administrada en un

periodo de tiempo definido, genera el 50% de la actividad máxima de la correspondiente fusión lucCP⁺. La relación de las actividades máximas A_{max} y las diferentes concentraciones de sal en escala logarítmica se representan en la Figura 19 C.

Este valor da la eficacia de los diferentes estímulos utilizados para la activación del promotor *GRE2* es de aproximadamente 210 mM (NaCl), 300 mM (KCl) y 355 mM (sorbitol).

7. Reclutamiento de ARN pol II y remodelación de la cromatina en el promotor *GRE2*.

Gracias a los ensayos descritos anteriormente, se vio que los perfiles dosis-respuesta de *GAL1* y *GRE2* presentan sustanciales diferencias: mientras que *GAL1* se caracteriza por una actividad gradual con una regulación dinámica de la V_{max}, la regulación de la actividad de *GRE2* es temporal y con una V_{max} casi constitutiva.

Para investigar de forma directa el proceso de la transcripción, se decidió monitorizar la asociación de la ARN pol II en el promotor *GRE2* en condiciones de estrés salino para comparar el reclutamiento de la maquinaria de la transcripción con las tasas de actividad detectadas anteriormente con el ensayo luciferasa.

Se llevaron a cabo experimentos ChIP para poder cuantificar la asociación de ARN polimerasa II, a través de la subunidad Rpb3 marcada con HA, en el promotor del gen *GRE2*.

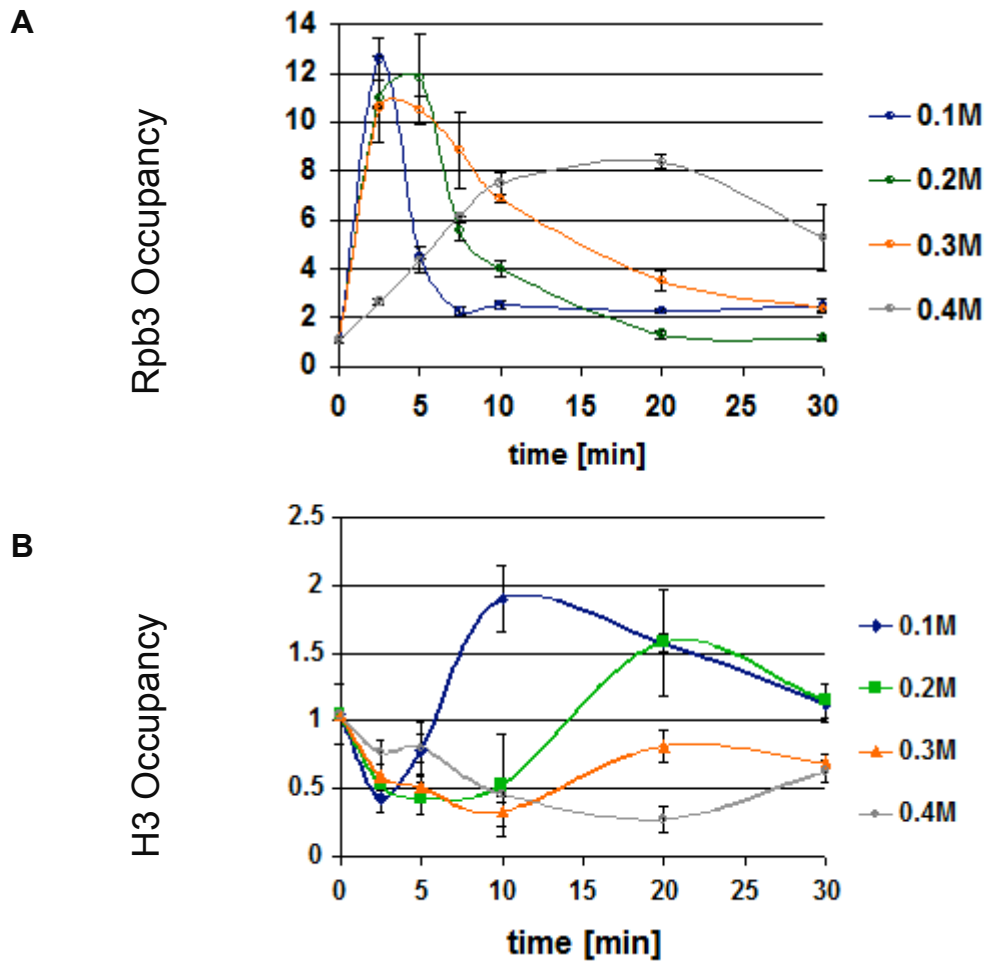


Figura 20. Cuantificación de la asociación de la ARN polimerasa II (A) y de la histona H3 (B) en función de la concentración de NaCl en el promotor *GRE2*. Las células fueron crecidas hasta la fase exponencial en YPD y luego se suministraron por separado distintas concentraciones de NaCl para inducir *GRE2*. La densidad de la ARN pol II y de la histona fue determinada por CHIP a los tiempos 0, 5, 10, 20 y 30 minutos en la región [-310/-153] de *GRE2* y normalizada por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representan la media de dos réplicas biológicas con su correspondiente Desviación Estándar.

El experimento demostró que hay una rápida asociación de ARN pol II con el promotor *GRE2* tratando con todas las concentraciones consideradas (0,1 a 0,4M NaCl). Aumentando la concentración se prolonga el tiempo de unión de la ARN pol II pero no su nivel absoluto. (Figura 20 A) Estos resultados coinciden con la regulación temporal observada a través del ensayo con lucCP⁺.

Paralelamente, se quiso estudiar de qué forma varía la densidad de las histonas en el promotor *GRE2* en respuesta a estrés salino, comparándola con el reclutamiento de la ARN pol II, a través de un análisis CHIP (Figura 20 B).

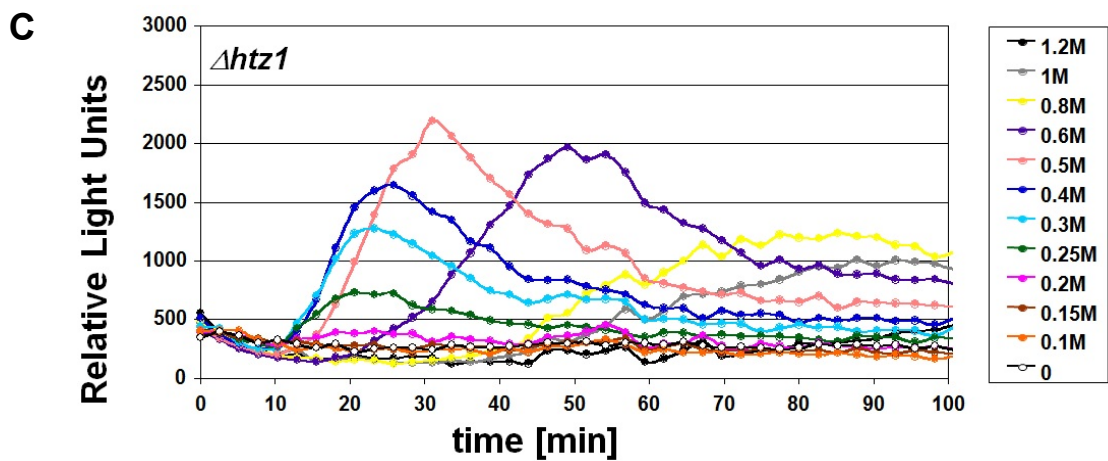
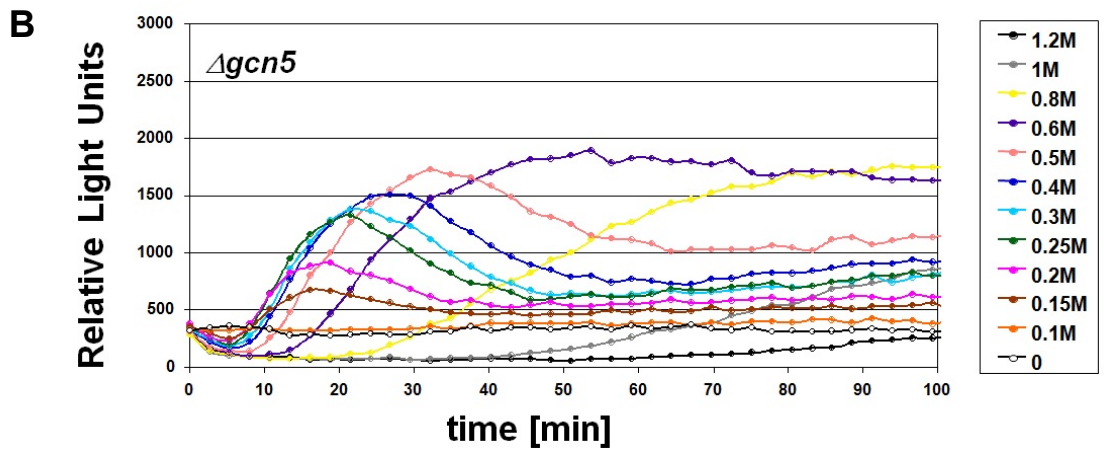
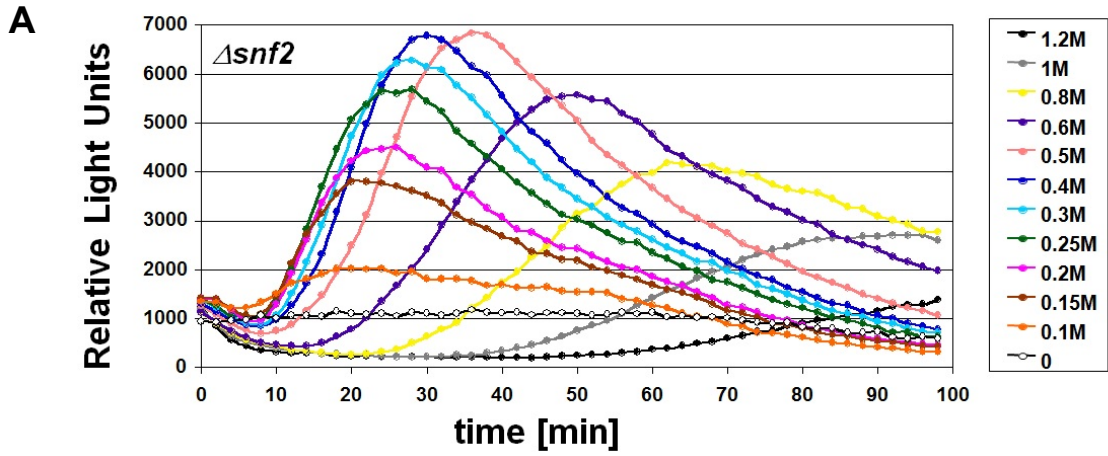
Tratando con las concentraciones consideradas (0,1 a 0,4M NaCl) se observa una rápida remodelación de la cromatina con consecuente disminución de la presencia de la histona H3 en el promotor *GRE2*, cuya reincorporación temporal depende de la concentración del estímulo.

Comparando el resultado de los dos experimentos, se concluyó que, en condiciones de estrés osmótico, se produce una pérdida de nucleosomas que coincide con la entrada de ARN pol II en el promotor *GRE2*. Ambos procesos están regulados temporalmente por el grado del estrés, pero su eficiencia no cambia.

8. El efecto de mutaciones en los complejos SWI/SNF, SAGA y mediador y en la histona H2A.Z a la respuesta dinámica del promotor de *GRE2*.

A continuación se quiso determinar la forma en que la actividad del promotor *GRE2* se ve afectada por deleciones de factores pertenecientes a complejos modificadores de cromatina. Se llevaron a cabo ensayos utilizando el sistema reportero p413*GRE2-lucCP*⁺ en las cepas mutantes para el gen *gcn5* (SAGA, complejo modificador de la cromatina), *snf2* (SWI/SNF, complejo remodelador de la cromatina), *gal11* (Complejo mediador), y *htz1* (H2A.Z; variante de la histona H2) para definir la importancia de factores de remodelación de la cromatina para la regulación de *GRE2*.

Se aplicó en cada experimento un amplio baremo de concentraciones de NaCl para inducir el reportero *GRE2-lucCP*⁺ (Figura 21). Para cada cepa mutante se calcularon las actividades máximas para cada concentración de NaCl.



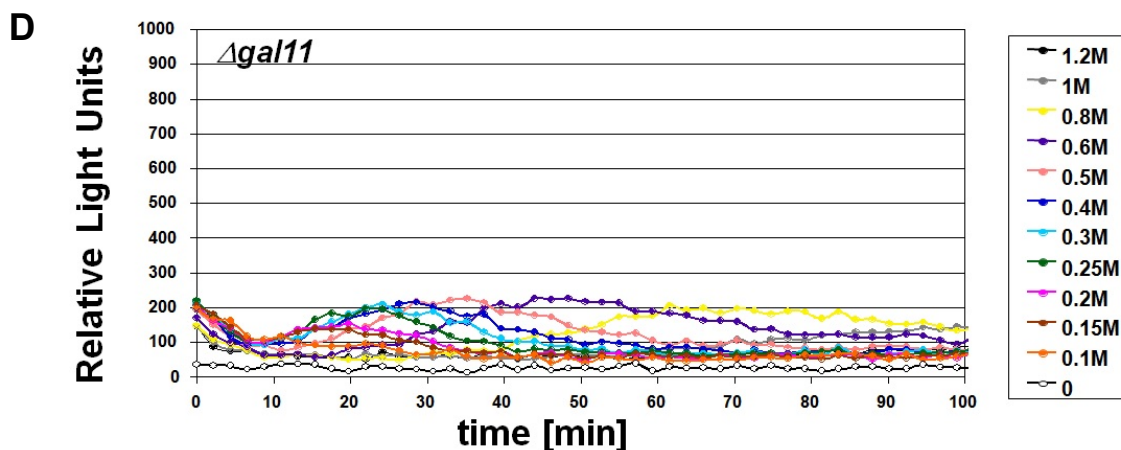


Figura 21: Perfiles dosis-respuesta del promotor *GRE2* sometido a diferentes concentraciones de NaCl en los mutantes (a) *snf2*, (b) *gcn5* (c) *htz1* y (d) *gal11*, utilizando la construcción p413*GRE2*-lucCP⁺. Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fueron incubadas con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Se aplicaron las diferentes condiciones de NaCl al tiempo 0. Se midió la emisión de luz cada dos minutos en alícuotas triplicadas de 150 μ l de cultivo de levadura. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%.

Ni la expresión absoluta ni el rango dinámico de *GRE2* parecen estar afectados en el mutante *snf2* y la actividad del promotor *GRE2* se muestra prácticamente idéntica a la cepa silvestre. Los mutantes *htz1* y *gcn5* presentan perfiles parecidos entre sí, caracterizados por una importante disminución en la actividad transcripcional a lo largo de todo el baremo de concentraciones consideradas, mientras que el mutante con pérdida de funcionalidad del Mediador (*gal11*) presenta el fenotipo más dramático de los analizados, con una capacidad transcripcional del promotor *GRE2* muy reducida.

Se concluyó que la función de SWI/SNF, a diferencia de lo observado para *GAL1*, no es esencial para la regulación dinámica de *GRE2*. La pérdida de función de SAGA o Htz1 baja en general el rendimiento de la expresión génica de *GRE2*, pero sigue habiendo un aumento gradual de A_{max} en el rango dinámico de [NaCl] (Figura 22).

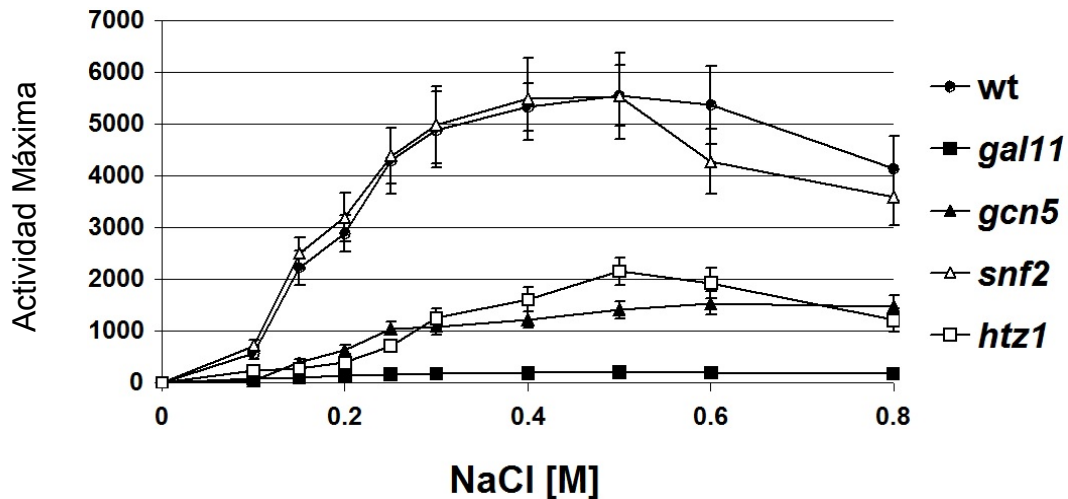


Figura 22. Función de los complejos SAGA, SWI/SNF, Mediator y la histona Htz1 en la respuesta dinámica del promotor *GRE2* a diferentes concentraciones de NaCl. Se determinaron los perfiles de inducción del gen reportero centromérico *GRE2-lucCP+* en los mutantes indicados (condiciones como en el experimento anterior) y se calcularon las actividades máximas de síntesis. Se muestra la relación entre A_{max} y la correspondiente concentración de NaCl para cada cepa en comparación con la cepa silvestre (wt).

9. Determinación de la regulación dinámica del promotor *GRE2* en respuesta a estrés oxidativo.

A través de los experimentos anteriores, se demostró que el promotor de *GRE2* presenta un mecanismo diferente de regulación respecto a *GAL1* y es caracterizado por una regulación dinámica temporal en condiciones de estrés salino. Para averiguar si el modo de regular *GRE2* es específico para NaCl o más general, aplicamos otras condiciones ambientales que inducen la expresión de *GRE2* como es el estrés oxidativo. Se utilizó una amplia gama de estrés oxidativo causado por menadiona para provocar la activación transitoria de *GRE2* utilizando el sistema *in vivo* de luciferasa desestabilizada.

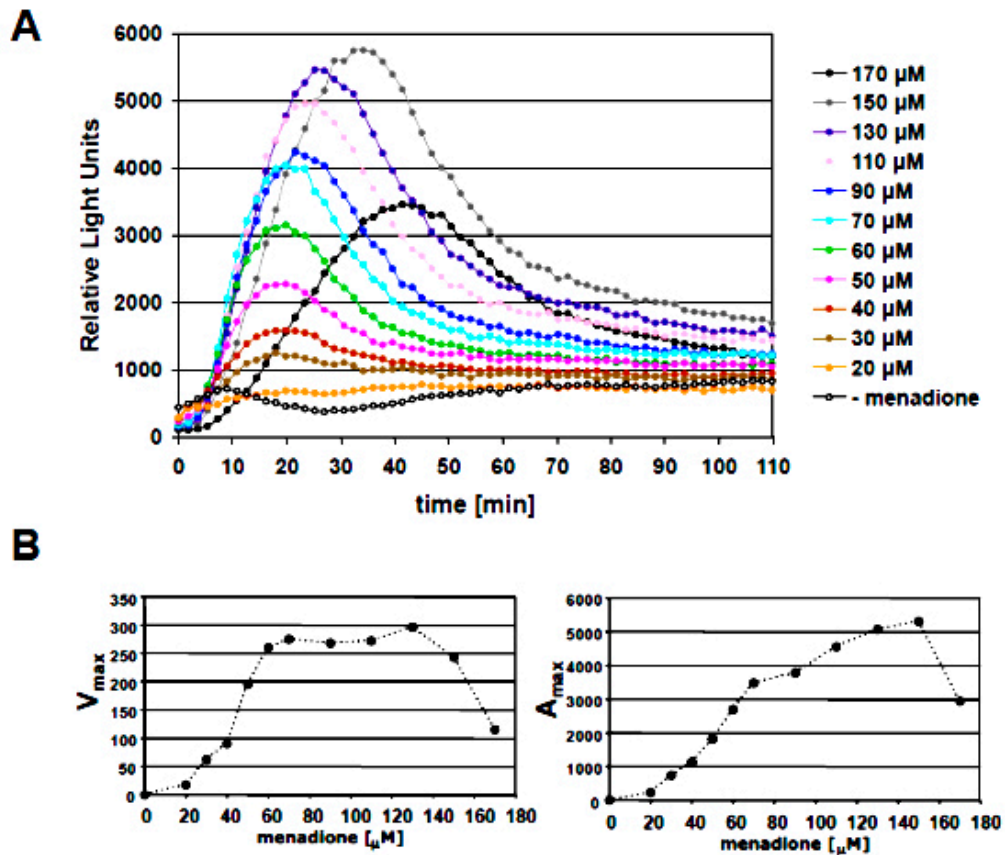


Figura 23. Comportamiento dosis-respuesta del promotor de *GRE2* en condiciones de estrés oxidativo. (A) Perfiles de inducción del gen reportero *GRE2-lucCP⁺* en las condiciones indicadas de estrés oxidativo. Para este ensayo se utilizó la cepa de levadura silvestre BY4741 con el plásmido p413*GRE2-lucCP⁺*, crecida en medio mínimo con glucosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después se incubó con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos antes de suministrar menadiona a las concentraciones indicadas. La emisión de luz fue medida de forma continua (cada dos minutos) en alícuotas triplicadas 150 μl de cultivo. (B) Perfiles de la tasa máxima de síntesis V_{max} de *GRE2* en diferentes concentraciones de menadiona y sus consecuentes actividades máximas de luciferasa (A_{max}). La tasa máxima de síntesis V_{max} de *GRE2* fue calculada analizando los datos de incremento de producción de luz en la fase lineal de la curva de inducción en función de la concentración de menadiona. La actividad máxima A_{max} indica el valor máximo alcanzado por la señal detectada por el luminómetro durante el ensayo.

Como se muestra en la Figura 23 A, la fusión *GRE2-lucCP⁺* empieza a responder a los tratamientos con concentraciones de menadiona de aproximadamente 30 μM . El aumento del estrés hasta 150 μM provoca la activación cada vez más larga del reportero con unas tasas de síntesis prácticamente constantes. Concentraciones de menadiona mayores de 150 μM parecen tener un efecto inhibitorio en general, lo cual coincide con la observación de que estas concentraciones (altas de menadiona) no permiten el crecimiento de nuestras cepas de laboratorio de levadura silvestre. En

general, la actividad del promotor del gen *GRE2* presenta perfiles de respuesta transcripcional muy similares en el caso de estrés oxidativo en comparación con el estrés salino. La Figura 23 B demuestra que la menadiona, sobre una amplia gama de dosis, provoca un aumento de actividad máxima con tasas de síntesis que permanecen en gran parte constante. Tomados en conjunto, estos datos demuestran que el ensayo in vivo y en tiempo real de la luciferasa desestabilizada es una herramienta fácil para definir tanto el rango de los estímulos y el modo de respuesta dinámica de los promotores a estos estímulos en levadura.

En conclusión, bajo concentraciones crecientes de estrés osmótico u oxidativo, la expresión génica controlada por el promotor del gen *GRE2* es activada basicamente con los mismos niveles de síntesis.

10. Determinación de la dosis-respuesta de otros promotores activados por estrés.

Después de haber descrito la dinámica de la regulación del promotor *GRE2* bajo diferentes condiciones de estrés salino y oxidativo, se quiso ampliar los estudios a otros promotores naturales de levadura que responden a estrés osmótico y oxidativo. Como ejemplos de genes osmoinducibles se eligieron *ALD6* y *HOR2* (Figura 24). Mientras que el promotor *GRE2* es regulado por el factor de transcripción Sko1, *ALD6* es regulado a través de Msn2/4 y *HOR2* por Hot1. Por lo tanto se amplió el estudio a promotores inducibles por estrés pero a través de diferentes factores de transcripción específicos.

ALD6 codifica una aldehído deshidrogenasa, *HOR2* (*GPP2*) una glicerol-3-fosfato fosfatasa involucrada en la biosíntesis de glicerol. Se fusionaron las regiones promotoras de los genes con lucCP⁺ y se cuantificó su respuesta dependiendo de la dosis en las mismas condiciones de estrés salino como en el caso de *GRE2*.

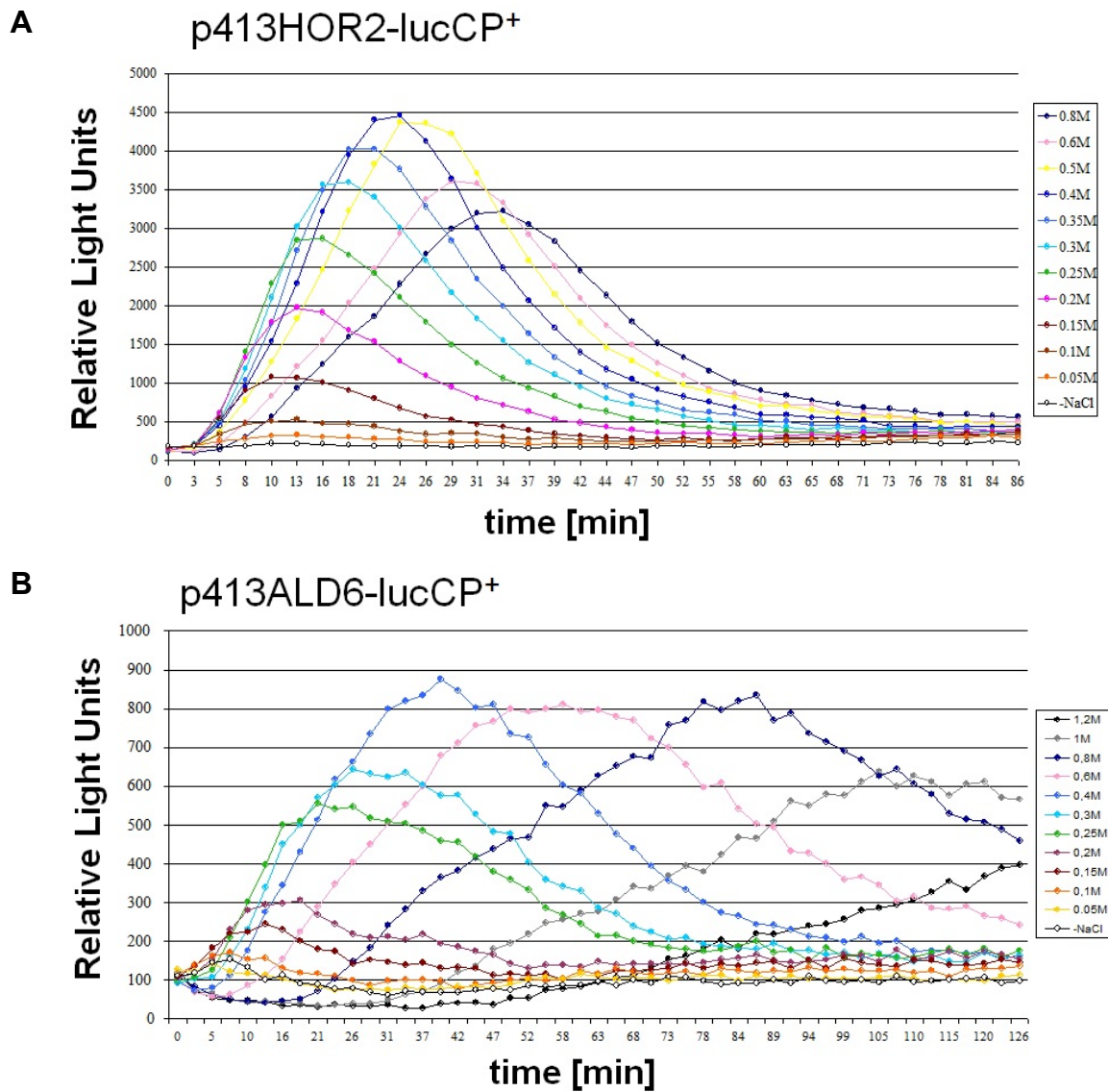


Figura 24. Perfiles dosis-respuesta de los promotores (A) *HOR2* y (B) *ALD6* bajo diferentes concentraciones de NaCl. Se utilizaron las construcciones p413ALD6-lucCP⁺ y p413HOR2-lucCP⁺ en una cepa silvestre BY4741. Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fueron incubadas con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Se aplicaron las diferentes condiciones de estrés añadiendo NaCl, al medio al tiempo 0. Se midió la emisión de luz cada dos minutos en alícuotas triplicadas de 150 μ l de cultivo de levadura. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%.

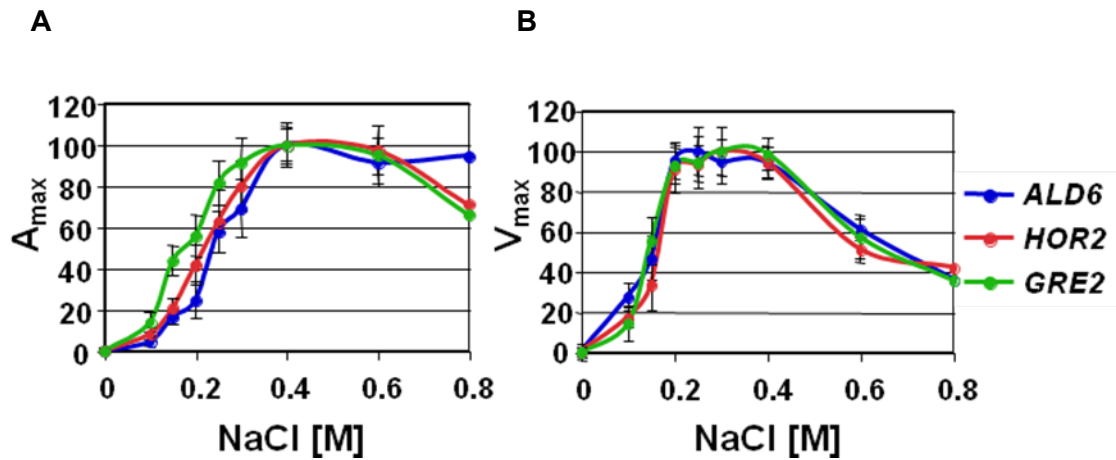


Figura 25. Comparación de la Actividad Máxima y de la Velocidad Máxima de diferentes promotores de genes osmoinducibles en presencia de NaCl. (A) Perfiles de las actividades máximas (A_{max}) de los promotores *GRE2*, *HOR2* y *ALD6* en condiciones de estrés generado por diferentes concentraciones de NaCl y (B) sus tasas de síntesis máximas (V_{max}). Se ajusta el valor máximo para cada fusión a 100%.

Se calcularon los perfiles de V_{max} y A_{max} y se compararon entre los tres promotores (Figura 25 A y B). Los datos generados por el análisis de la V_{max} y A_{max} muestran perfiles muy parecidos entre *GRE2*, *ALD6* y *HOR2*.

Se observó que la subida de A_{max} es gradual entre 0,1M y 0,4M de cloruro sódico, mientras que la V_{max} se mantiene constante y al máximo a partir de 0,2M. Los tres promotores comparten la característica de la regulación temporal con V_{max} casi constante en respuesta al gradiente de NaCl suministrado.

Sucesivamente, se quiso determinar la actividad de otros genes inducibles por estrés oxidativo como *CTT1* y *SOD2* a través de la fusión de sus promotores con el gen reportero $LucCP^+$, con el objetivo de determinar el comportamiento dosis-respuesta en general en condiciones de estrés oxidativo. *CTT1* codifica una catalasa T mientras que *SOD2* codifica una manganeso-superóxido dismutasa mitocondrial (Figura 26).

Se aplicaron las mismas condiciones del experimento anterior con estrés oxidativo, utilizando como agente inductor la menadiona. Los resultados obtenidos con distintas concentraciones se elaboraron para calcular la curva de la V_{max} y de la A_{max} .

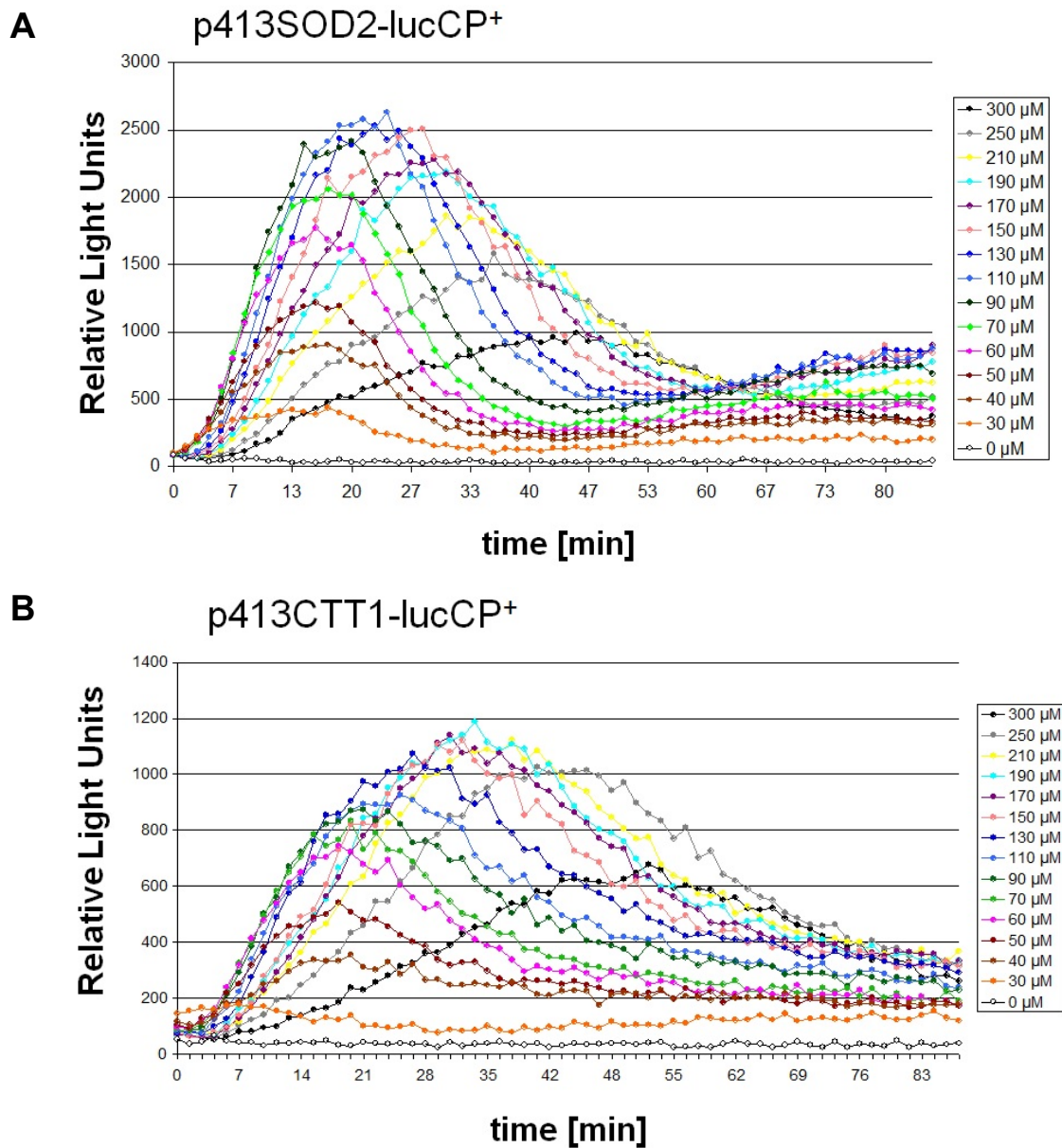


Figura 26. Perfiles dosis-respuesta de los promotores (A) *SOD2* y (B) *CTT1* bajo diferentes concentraciones de menadiona. Se utilizaron las construcciones p413SOD2-lucCP⁺ y p413CTT1-lucCP⁺ en una cepa silvestre BY4741. Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fueron incubadas con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Se aplicaron las diferentes condiciones de estrés añadiendo menadiona, al medio al tiempo 0. Se midió la emisión de luz cada dos minutos en alícuotas triplicadas de 150 μl de cultivo de levadura. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%.

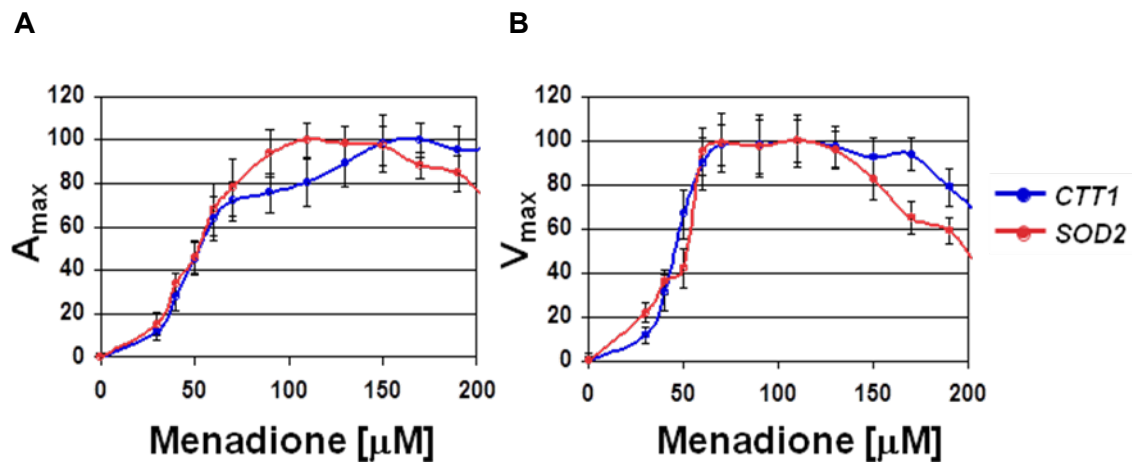


Figura 27. Comparación de la Actividad Máxima y de la Velocidad Máxima de diferentes promotores de genes de respuesta a estrés oxidativo en presencia de Menadiona. (A) Perfiles de las actividades máximas (A_{max}) de los promotores *CTT1* y *SOD2* en condiciones de estrés generado por diferentes concentraciones de Menadiona y (B) sus tasas de síntesis máximas (V_{max}). Se ajusta el valor máximo para cada fusión a 100%.

Se calcularon los perfiles de V_{max} y A_{max} y se compararon entre los dos promotores. (Figura 27 A y B); los datos generados por el análisis de la V_{max} y A_{max} presentan perfiles muy parecidos. Se observó que la subida de A_{max} es gradual entre 30 y 150 μM de Menadiona en el caso de *CTT1* y entre 30 y 100 μM en el caso de *SOD2*. A concentraciones más elevadas de Menadiona, se nota una disminución de la actividad máxima. En el mismo rango, sin embargo, se observa una velocidad de síntesis prácticamente constante.

Los dos promotores comparten la característica de la regulación temporal con V_{max} casi constante en respuesta a la estimulación gradual por menadiona.

11. Estudio de los mecanismos que confieren los perfiles dosis-respuesta en los genes *GAL1* y *GRE2*.

Después de haber descrito cómo responden dos promotores pertenecientes a rutas de señalización distintas como *GAL1* (metabolismo de galactosa) y *GRE2* (respuesta a estrés abiótico) a estímulos graduales, se quiso investigar los mecanismos que garantizan la regulación dosis-respuesta característica de estos mismos genes. La activación de *GAL1* depende del mecanismo de regulación descrito en la introducción

(Página X, 3.2). Para estudiar los factores que confieren la respuesta dinámica, se llevó a cabo un experimento ChIP con el fin de monitorizar los niveles de unión al promotor de *GAL1* del factor de transcripción Gal4 en presencia de diferentes concentraciones de galactosa.

El reclutamiento de Gal4 en el promotor *GAL1* en presencia de galactosa no parece ser particularmente modulado por la concentración del inductor galactosa. Se observa que, después de 20 minutos, su presencia aproximadamente se duplica independientemente de la concentración de galactosa.

Nos preguntamos entonces si la modulación de la actividad de *GAL1* depende del factor proteico Gal3 y más en concreto, de su nivel de asociación con el promotor *GAL1* en relación a la concentración de galactosa suministrada. Se llevó por lo tanto a cabo un análisis ChIP para estudiar el reclutamiento de este factor en ausencia y presencia de galactosa a partir de los minutos 10, 20 y 40 de su suministración, en cuatro concentraciones distintas (Figura 28).

Suministrando a las células dosis pequeñas de galactosa (0,0625 y 0,125%) se ve un lento reclutamiento de Gal3 que empieza a partir del minuto 10 aproximadamente. El incremento depende de la concentración de galactosa. Concentraciones más elevadas de galactosa provocan un reclutamiento más fuerte y más rápido de Gal3: con 0,25% de galactosa, en los primeros 10 minutos, la densidad de Gal3 aumenta 5 veces mientras que con 0,5% llega a ser hasta 10 veces superior. Entre 10 y 20 minutos, se alcanza la ocupación máxima para luego disminuir su asociación con el promotor, llegando en ambas concentraciones a niveles basales en el minuto 40 aproximadamente.

De este experimento se puede especular que Gal3 es la proteína encargada en dictar la regulación dinámica de *GAL1* durante el gradiente de galactosa, porque su asociación física con *GAL1* coincide con lo observado para la dinámica de ARN pol II y la actividad transcripcional.

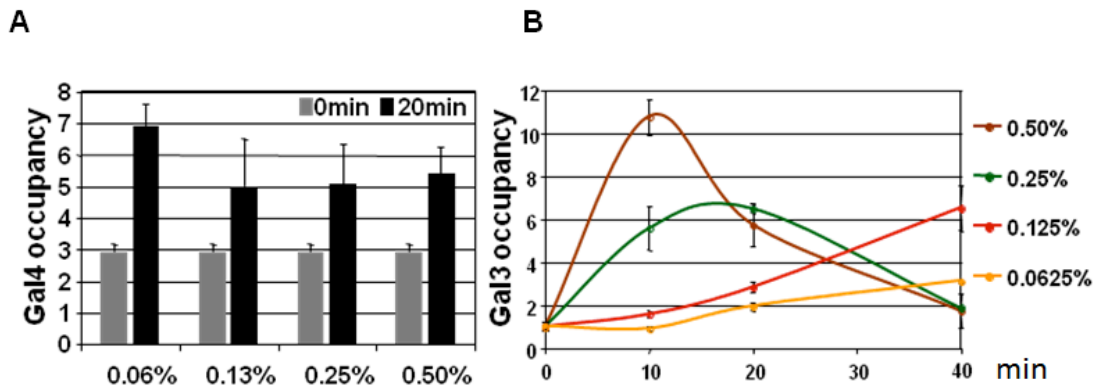


Figura 28. La asociación de Gal4 y Gal3 con *GAL1* en el rango dinámico de concentraciones de galactosa. Las células que expresan Gal4-TAP (a) y Gal3-TAP (b), fueron crecidas en medio YP-Raf hasta una OD de 0,8 y sucesivamente fue inducido el gen *GAL1* suministrando diferentes concentraciones de galactosa, como indicado en la figura. La unión de Gal4 (a) y Gal3 (b) fue determinada por ChIP en el promotor *GAL1* y normalizado por la región *POL1*. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

A continuación se quiso estudiar también la asociación de dos reguladores necesarios para activar el gen *GRE2* en respuesta a estrés osmótico: el factor de transcripción específico Sko1 y la MAP quinasa Hog1. Se llevó a cabo una serie de experimentos ChIP tratando las células de levadura con diferentes concentraciones de NaCl (0,2M 0,3M y 0,4M) y monitorizando la unión de los dos factores en el promotor de *GRE2* con el objetivo de encontrar reguladores que sean responsables de crear la dosis-respuesta específica de *GRE2* en condiciones de estrés por NaCl (Figura 29).

La unión de Sko1 se detecta en el promotor *GRE2* en ausencia de estrés salino y aumenta con 0,2M y 0,3M pero no con 0,4M [NaCl]. Este resultado no coincide con la activación cada vez mayor de *GRE2*. Se concluyó por lo tanto que Sko1 no es un candidato para conferir la dinámica de la dosis-respuesta de *GRE2*.

La entrada de Hog1 en el promotor *GRE2* en condiciones de estrés osmótico depende estrictamente de la concentración de NaCl con que tratamos a las células. Se nota como en los primeros minutos el reclutamiento de Hog1 en el promotor es muy rápida y mantiene una velocidad de acumulación constante. Con concentraciones bajas de NaCl (0,2M) se obtuvo la asociación máxima a los 5 minutos que rápidamente vuelve a niveles basales en aproximadamente 10 minutos. Aumentando la concentración de NaCl se nota como la velocidad de reclutamiento de Hog1 en el promotor se mantiene constante pero el pico de acumulación máxima se ve cada vez más retrasado a lo

largo del tiempo, llegando en el caso de 0,4M a una densidad 8 veces superior con respecto a la ausencia de estrés en los primeros 10 minutos.

En general se observa una rápida y transitoria asociación de Hog1 con *GRE2*, que además se modula de forma temporal por la concentración del estímulo. Por lo tanto, la dinámica asociación de la MAP quinasa podría ser un mecanismo que asegura la expresión dependiente del estímulo en el caso de *GRE2*.

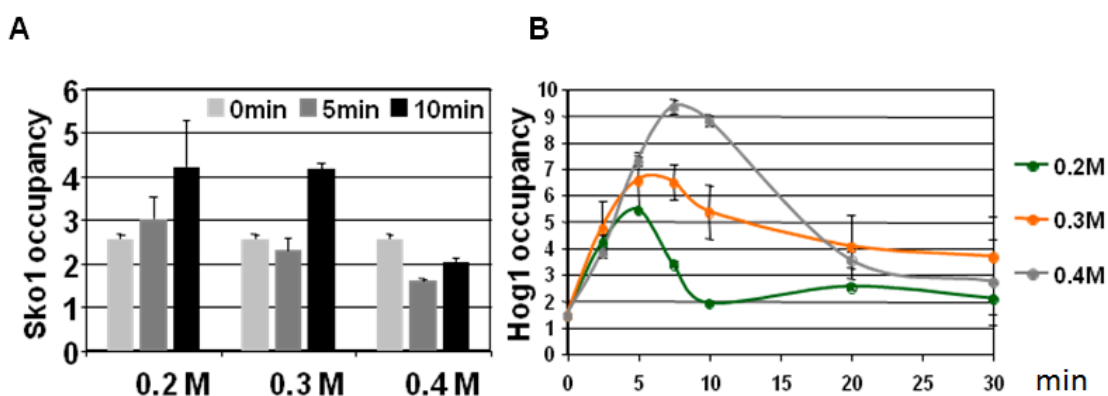


Figura 29. La asociación de Sko1 y Hog1 con el promotor *GRE2* condiciones de estrés salino. Las células que expresan Sko1-HA (a) y Hog1-HA (b), fueron crecidas en medio YPD hasta una OD de 0,8 y sucesivamente fueron suministradas diferentes concentraciones de NaCl, como indicado en la figura. La unión de Sko1 (a) y Hog1 (b) fue determinada por CHIP en el promotor *GRE2* y normalizado por la región *POL1*. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

12. Estudios de la función de Smp1 en la respuesta a estrés salino.

El factor de transcripción Smp1 está involucrado en la regulación de la respuesta a estrés osmótico (Dodou and Treisman 1997; de Nadal *et al.*, 2003). Cuando se activa, Hog1 fosforila directamente a Smp1 en diferentes residuos dentro de su dominio de activación (Alepez *et al.*, 2003; de Nadal *et al.*, 2003).

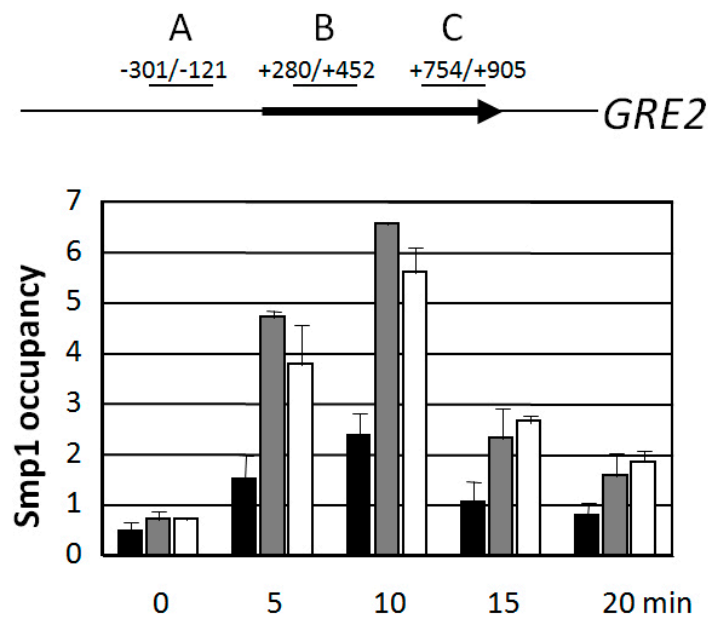
Como citado en la introducción, en condiciones de estrés se observó por experimentos ChIP-seq una alta densidad de Smp1 en las regiones ORF correspondientes a genes inducibles por estrés osmótico, como *HOR2*, *GRE2*, *ALD6* y otros. Se quiso profundizar el posible papel de Smp1 en la activación transcripcional y elongación de genes osmoinducibles.

12.1. Determinación de la dinámica de la acumulación de Smp1 en los genes osmoinducibles *GRE2*, *HOR2* y *ALD6*.

En primer lugar se quiso estudiar la dinámica del reclutamiento del factor de transcripción Smp1 en condiciones de estrés salino en regiones correspondientes a genes osmoinducibles mediante ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, con el propósito de confirmar los estudios previos realizados por ChIP-SEQ que describían la unión del factor Smp1 en las regiones transcritas de los genes inducibles bajo estrés osmótico.

Se suministró un estímulo de 0,4M [NaCl] a un cultivo de levadura que expresa Smp1 como fusión con el epítipo HA y se monitorizó la variación de la densidad de Smp1 en los genes osmoinducibles *GRE2*, *HOR2* y *ALD6*, tanto en la región del promotor como en las regiones 5' y 3' de la ORF (Figura 30).

A



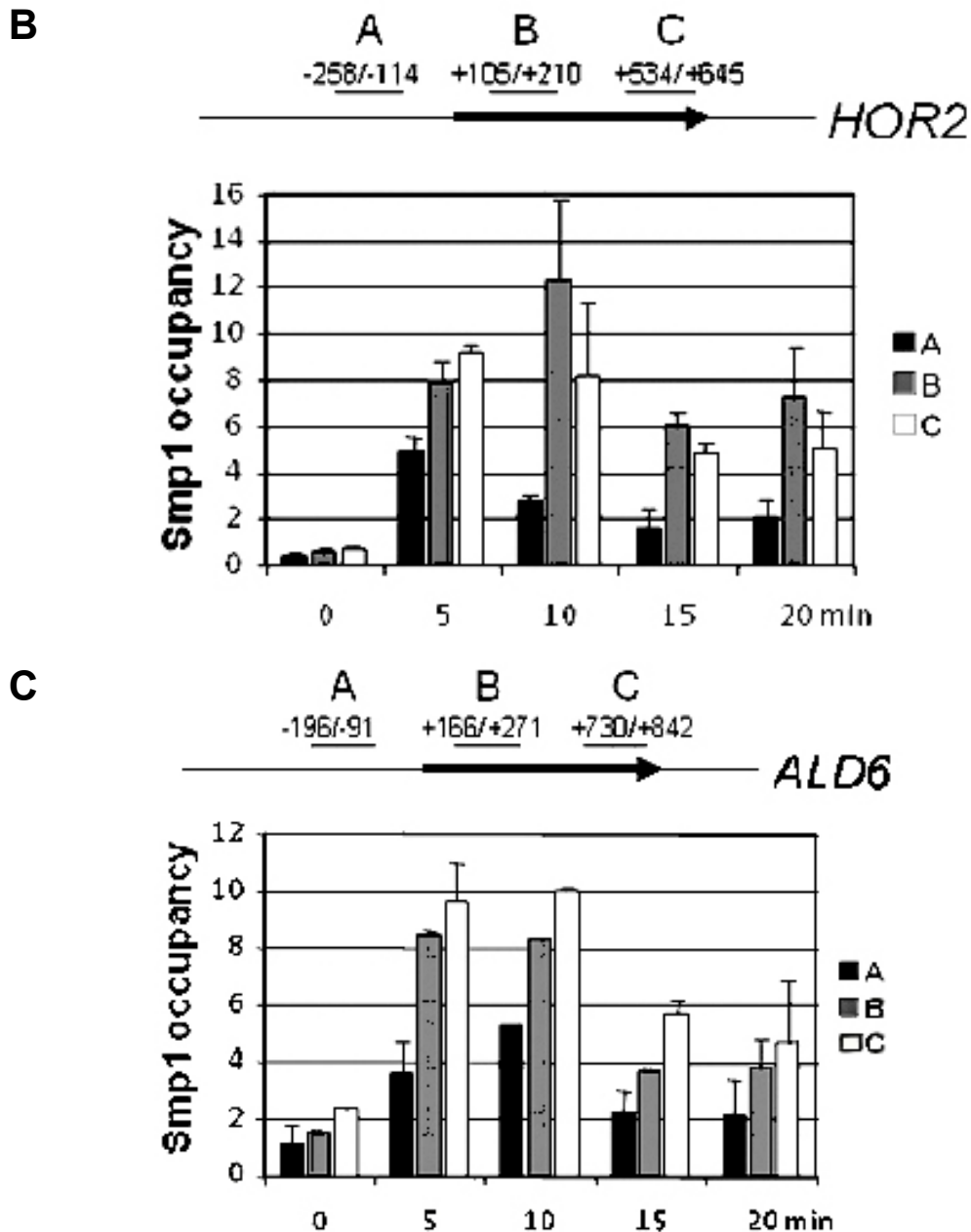
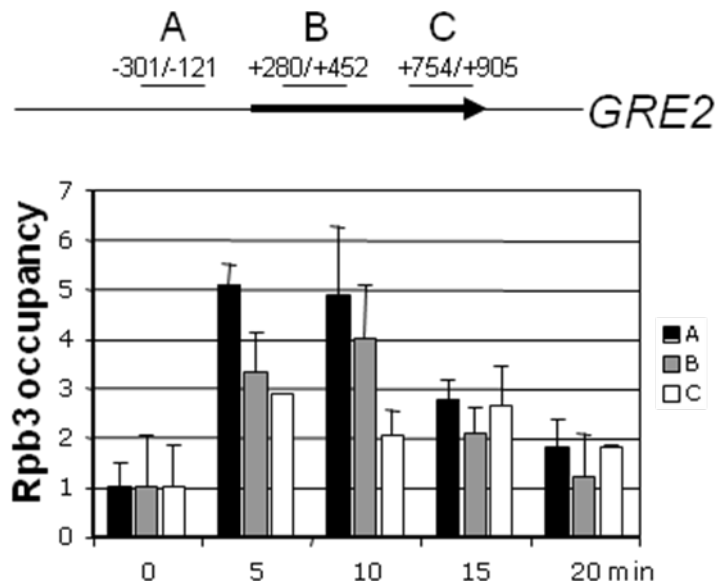


Figura 30. Determinación de la dinámica de la asociación de Smp1 en los genes osmoinducibles (A) *GRE2*, (B) *HOR2* y (C) *ALD6*. La cepa Smp1-HA de levadura fue criada hasta la fase exponencial en YPD (minuto 0) y luego se suministró una cantidad de NaCl correspondiente a una concentración de 0,4M. La densidad de Smp1-HA fue determinada por CHIP a los tiempos 0, 5, 10, 15 y 20 minutos en las regiones [-301/-121], [+280/+452] y [+754/+905] del gen *GRE2*, [-258/-114], [+105/+210] y [+534/+645] del gen *HOR2*, y [-196/-91], [+166/+271] y [+730/+842] del gen *ALD6* y normalizada por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

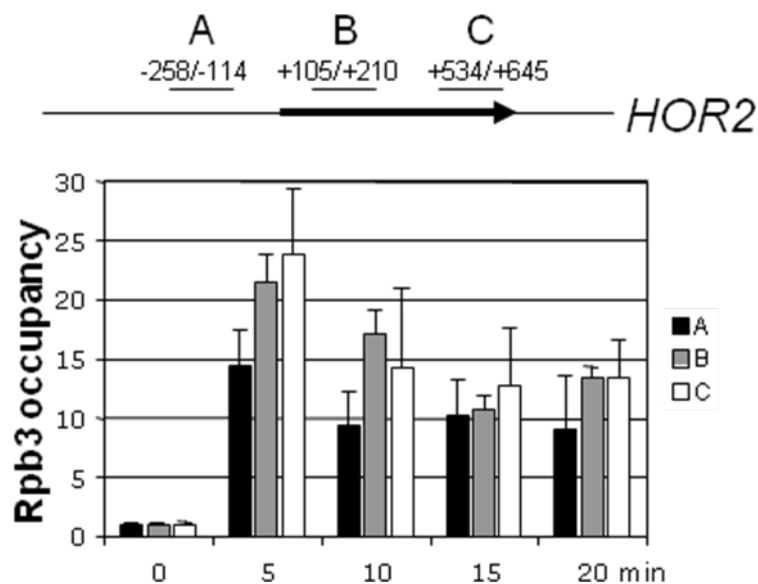
Los resultados evidencian que en condiciones de estrés osmótico hay efectivamente una rápida asociación de Smp1 con las regiones de los genes considerados, especialmente se manifiesta una mayor unión de Smp1 en regiones codificantes, tanto en la región 5' como en 3'.

A continuación se quiso determinar si el patrón de unión de Smp1 coincide con el de ARN pol II. Se monitorizó por lo tanto la presencia de la subunidad Rpb3 de la ARN polimerasa II reproduciendo la misma cinética del experimento anterior en las mismas regiones consideradas.

A



B



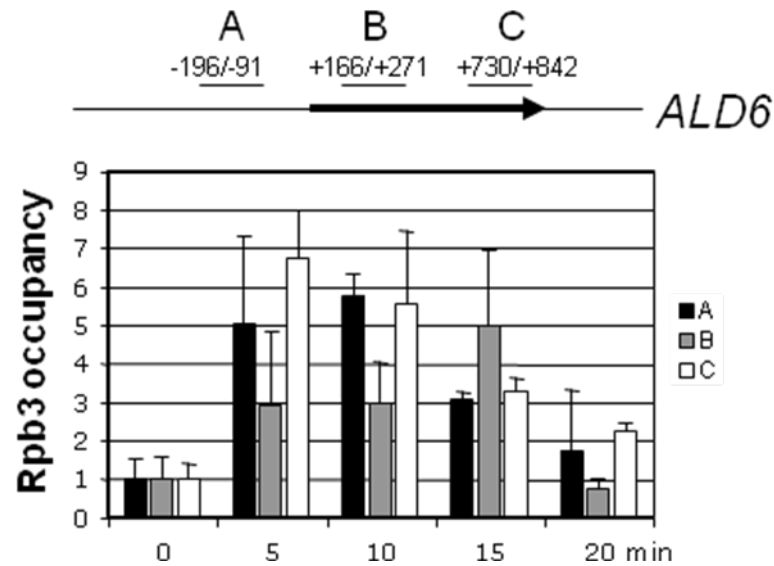
C

Figura 31. Determinación de la dinámica de asociación de Rpb3 en los genes osmoinducibles (A) *GRE2*, (B) *HOR2* y (C) *ALD6*. La cepa Rpb3-HA de levadura fue criada hasta la fase exponencial en YPD (minuto 0) y luego se suministró una cantidad de NaCl correspondiente a una concentración de 0,4M. La densidad de Rpb3-HA fue determinada por ChIP a los tiempos 0, 5, 10, 15 y 20 minutos en las regiones [-301/-121], [+280/+452] y [+754/+905] del gen *GRE2*, [-258/-114], [+105/+210] y [+534/+645] del gen *HOR2*, y [-196/-91], [+166/+271] y [+730/+842] del gen *ALD6* y normalizada por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

Analizando los resultados obtenidos por análisis ChIP en respuesta a estimulación por estrés osmótico, se quiso monitorizar la entrada de la ARN polimerasa II en los promotores de los genes considerados y consecuentemente en las ORFs. A partir del minuto 5 se nota un incremento importante de la presencia de Rpb3 (de 5 hasta 15 veces más con respecto a una situación sin estímulo, dependiendo del gen considerado), cuya unión se corresponde con el inicio de la transcripción. La densidad de Rpb3 empieza a disminuir a partir del minuto 10, cuando efectivamente empieza a finalizar el proceso de transcripción de los genes.

Este experimento, en conjunto con el anterior, ponen en evidencia la correlación entre Smp1, Rpb3 y la transcripción, siendo los dos factores presentes a lo largo de la ORF de los genes considerados cuando la transcripción es activa.

Se puede concluir que el factor de transcripción Smp1 actúa en conjunto con la ARN polimerasa II a lo largo de su transcripción en la ORF de los genes considerados, aunque, a diferencia de la polimerasa, Smp1 se asocia relativamente menos en las regiones promotoras con respecto a las ORFs.

Finalmente se quiso comparar el patrón de unión de Smp1 a la cromatina con otros factores específicos de transcripción activados en las mismas condiciones de estrés osmótico. Se eligieron los factores de transcripción Sko1 y Hot1, cuyos blancos son respectivamente los genes *GRE2* y *HOR2* y se monitorizaron sus niveles de asociación con los genes osmoinducibles diana, tanto en la región del promotor como en la ORF, en respuesta a estrés por NaCl.

A través de una inmunoprecipitación de la cromatina, se monitorizó la entrada del factor de transcripción Sko1 en el gen osmoinducible *GRE2*, tanto en la región del promotor como en las regiones 5' y 3' de su ORF. En paralelo se quiso averiguar su especificidad estudiando la eventual presencia en distintas regiones de otro gen osmoinducible activado por la misma MAP quinasa (*HOR2*) (Figura 32).

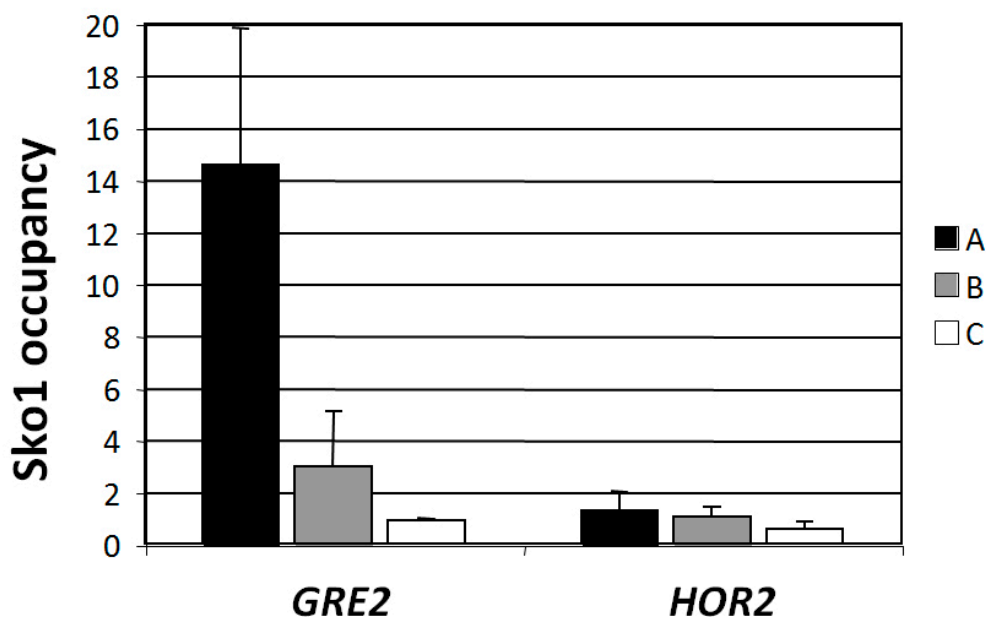


Figura 32. Determinación de la densidad del factor de transcripción Sko1 en distintas regiones de los genes osmoinducibles *GRE2* y *HOR2*. La cepa Sko1-HA de levadura fue crecida hasta la fase exponencial en YPD. La densidad de Sko1-HA fue determinada por ChIP en las regiones [-301/-121], [+280/+452] y [+754/+905] del gen *GRE2* y [-258/-114],

[+105/+210] y [+534/+645] del gen *HOR2*. Los datos fueron normalizados por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

A diferencia de Smp1, el factor de transcripción Sko1 regula la transcripción de *GRE2* a través de su unión con el motivo CRE de su promotor y no se encuentra en las regiones ORF del gen. Además, como demuestran los datos en la Figura 32, Sko1 es un factor específico para *GRE2* ya que no se detecta su presencia en las regiones del gen *HOR2*.

A continuación se llevó a cabo un estudio de la dinámica de reclutamiento del factor de transcripción Hot1 en la región promotora y las regiones codificantes 5' y 3' de los genes osmoinducibles *GRE2* y *HOR2* en ausencia y presencia de estrés salino (generado por 0,4 M [NaCl]) (Figura 33).

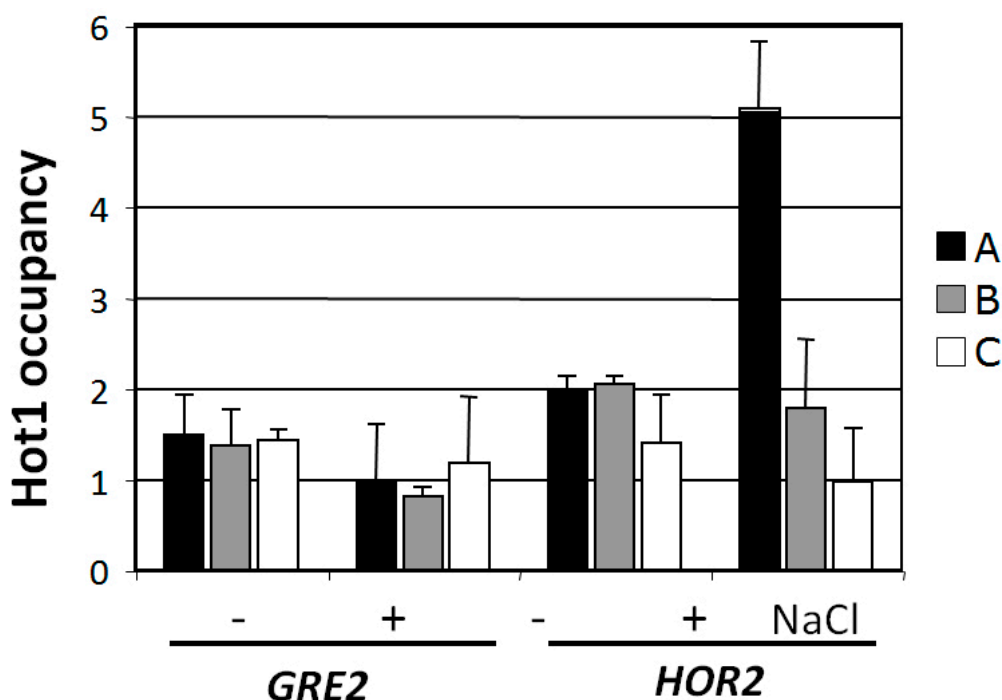


Figura 33. Determinación de la densidad del factor de transcripción Hot1 en distintas regiones de los genes osmoinducibles *GRE2* y *HOR2*. La cepa Hot1-HA de levadura fue crecida hasta la fase exponencial en YPD (minuto 0) y luego se suministró una cantidad de NaCl correspondiente a una concentración de 0,4M. La densidad de Hot1-HA fue determinada por ChIP a los minutos 0 y 5 en las regiones [-301/-121], [+280/+452] y [+754/+905] del gen *GRE2* y [-258/-114], [+105/+210] y [+534/+645] del gen *HOR2*. Los datos fueron normalizados por la región control *POL1* [+1796/+1996]. Los datos representados son la media de dos réplicas biológicas con la correspondiente desviación estándar.

De forma similar a los resultados del estudio llevado a cabo con Sko1, también en el caso de Hot1 se observó que este factor de transcripción es específico para su gen diana.

En condiciones de estrés osmótico, los dos factores de transcripción blancos directos de la MAP quinasa Hog1 (Sko1 y Hot1) se asocian exclusivamente con los promotores de sus genes específicos *GRE2* y *HOR2* respectivamente. La presencia de estos factores se limita a la región promotora y no en la codificante, como en el caso de Smp1.

12.2 Función de Smp1 en la activación de la expresión génica en respuesta a estrés osmótico.

Comparando los comportamientos de Sko1 y Hot1 con la dinámica de Smp1, destaca la diferencia de este último por su presencia en la ORF de los genes osmoinducibles.

Con el fin de verificar si su presencia tiene un papel en la transcripción de esos genes junto con la ARN polimerasa II o si no es estrictamente necesario, se llevó a cabo un estudio de transcripción mediante Northern blot para medir la expresión de los genes *ALD6*, *GRE2* y *HOR2* en una cepa de levadura silvestre y otra con pérdida de función para el factor Smp1.

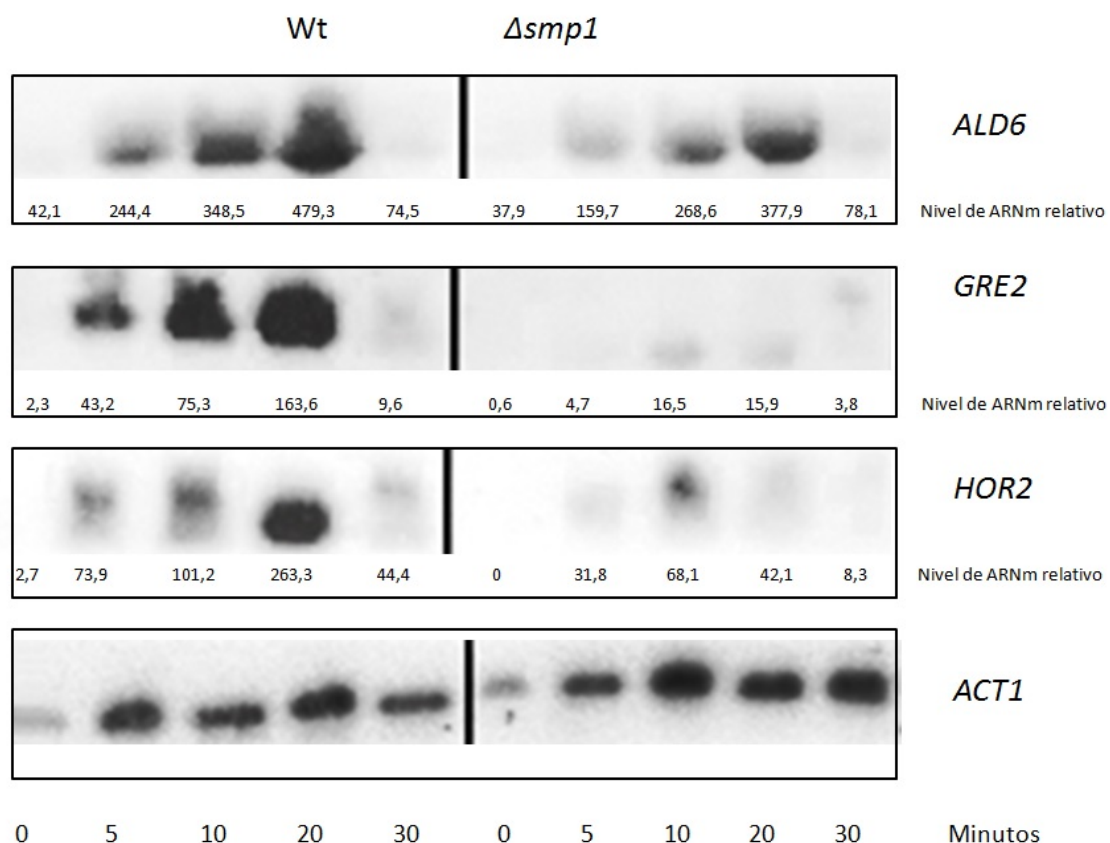


Figura 34. Análisis de transcripción de los genes osmoinducibles *ALD6*, *GRE2* y *HOR2* bajo estrés osmótico en presencia y ausencia del factor de transcripción Smp1. Las células fueron crecidas en medio YPD hasta fase exponencial y a continuación sometidas a un estrés osmótico de 0.4M NaCl durante 30 minutos. Se cuantificaron los niveles de ARNm de los genes *ALD6*, *GRE2* y *HOR2* (y de *ACT1* como control) mediante análisis *Northern*. El nivel relativo de ARNm de los genes mostrados en las gráficas se calculó como el cociente entre el ARN mensajero normalizado por el mensajero de *ACT1* a los tiempos considerados de estrés osmótico.

Mediante análisis *Northern*, se confirmó que la ausencia del factor de transcripción Smp1 afecta a la correcta expresión de los genes *GRE2* y *HOR2* (Figura 34 B), mientras que la expresión del gen *ALD6* parece sufrir una disminución menos importante de la cantidad de transcrito en el mutante *smp1*:

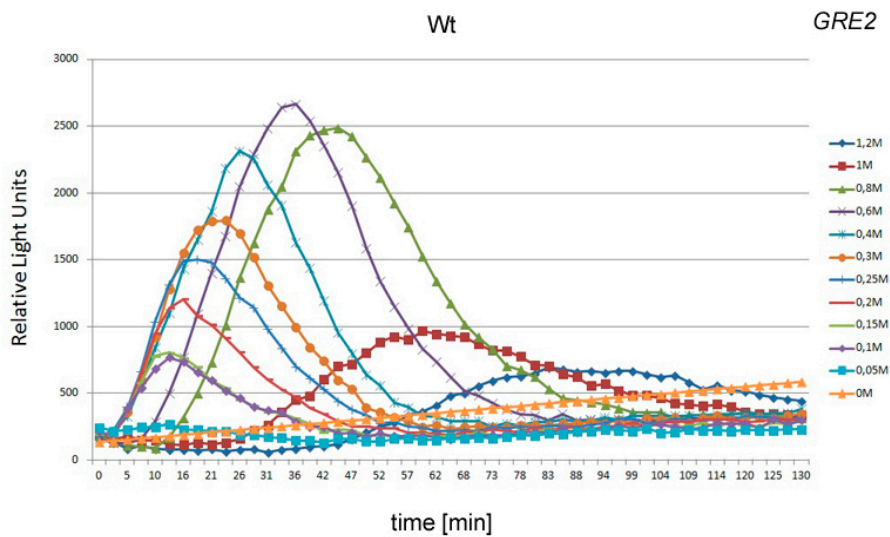
Se puede por lo tanto concluir que los factores de transcripción activados directamente por la MAP quinasa Hog1 considerados, tienen comportamientos distintos. Mientras que Sko1 y Hot1 regulan la actividad de los genes *GRE2* y *HOR2* respectivamente a través de uniones específicas en la región promotora, Smp1 podría contribuir a la

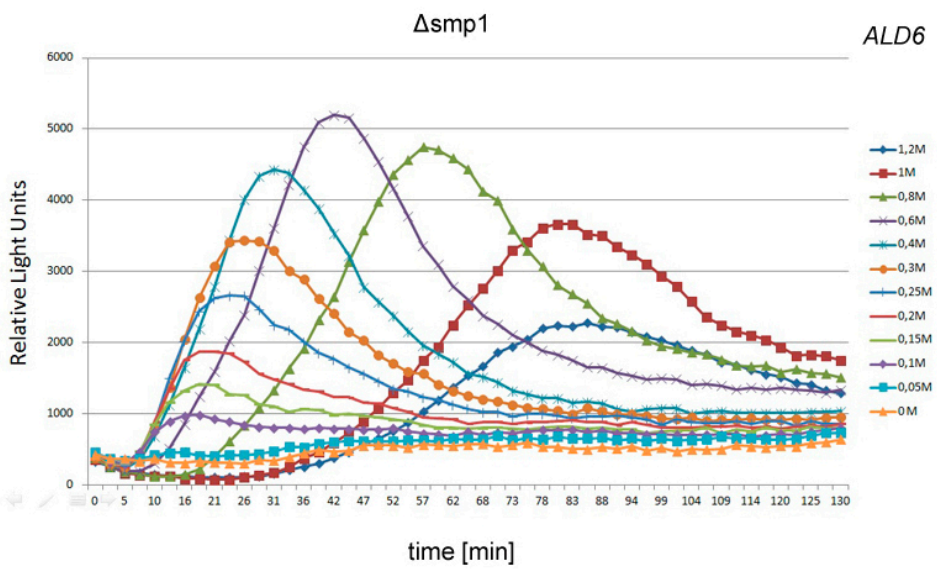
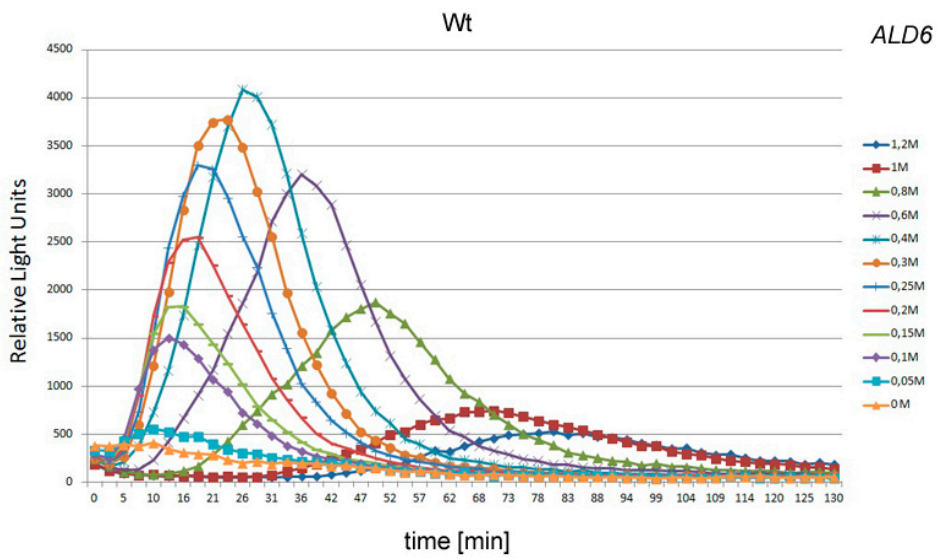
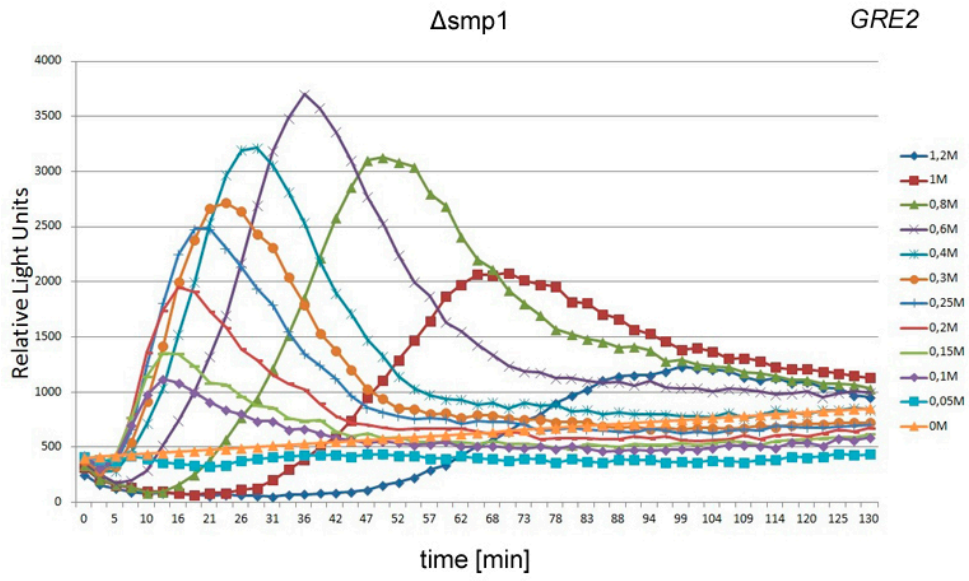
regulación de estos mismos genes con su asociación a lo largo de la región transcrita, coincidiendo con la presencia de la ARN polimerasa II.

12.3 Estudio de la función de Smp1 en la regulación de genes reporteros inducibles por NaCl.

A continuación se llevó a cabo una serie de ensayos reporteros comparando la actividad de los promotores *GRE2* y *ALD6* en la cepa silvestre y en un mutante *smp1* (Figura 35) para poder profundizar el estudio de los efectos de Smp1 en la regulación de los promotores osmoinducibles.

A





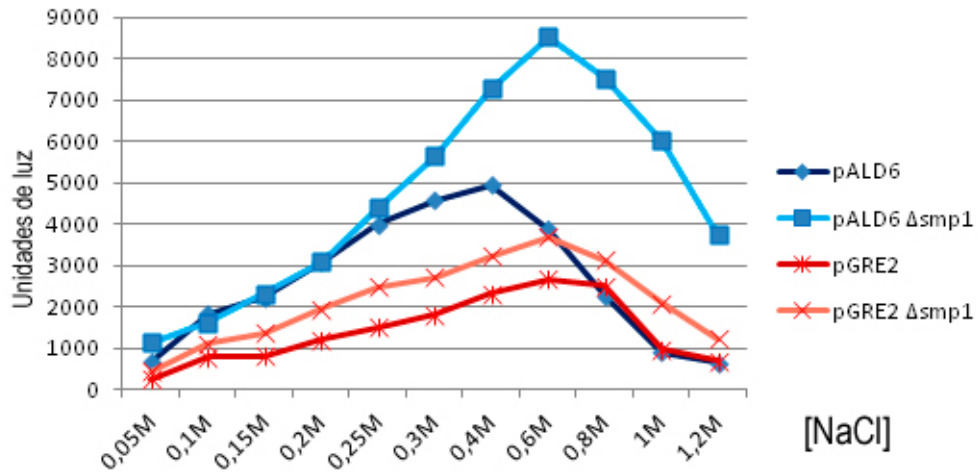
B

Figura 35. Comparación de los perfiles dosis-respuesta de los promotores *GRE2* y *ALD6* bajo diferentes concentraciones de NaCl en presencia y ausencia del factor Smp1. (A) Se utilizaron las construcciones p413GRE2-lucCP⁺ y p413ALD6-lucCP⁺ en una cepa silvestre BY4741 y una con pérdida de función para Smp1. Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa hasta una OD de entre 0.6 y 0.8 y después fueron incubadas con el sustrato luciferina (0,5mM) durante 90 minutos. Se aplicaron las diferentes concentraciones de NaCl al medio al tiempo 0. Se midió la emisión de luz cada dos minutos en alícuotas triplicadas de 150 μl de cultivo de levadura. La desviación estándar entre triplicados presentaba valores menores al 10%. (B) Comparación de la Actividad Máxima en los promotores osmoinducibles *ALD6* y *GRE2*. Perfiles de las actividades máximas (*A*_{max}) generados a través de los datos obtenidos en el ensayo (A).

Analizando los perfiles delineados por la actividad de *ALD6* y de *GRE2* en presencia e NaCl, se puede concluir que la inducción por NaCl de los promotores considerados no depende de Smp1.

DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta el uso de un ensayo reportero en tiempo real basado en fusiones con luciferasa de luciérnaga desestabilizada que tiene el fin de medir los perfiles de activación de los promotores en células vivas de levadura.

Una de las mayores ventajas de este ensayo de transcripción indirecto es que permite cuantificar los perfiles de respuesta de forma continua para los promotores estudiados, consintiendo además la aplicación de diversas condiciones experimentales en paralelo.

Esto es de gran ayuda para definir diferentes parámetros cuantitativos de la expresión génica regulada por los promotores de levadura y podría ser una herramienta interesante para la comparación funcional entre distintos grupos de promotores. Es importante observar que el ensayo de luciferasa no puede distinguir entre los eventos transcripcionales, la estabilidad de ARNm y la traducción. Por lo tanto, para obtener un cuadro completo de las características de regulación de un promotor, se debería de combinar la aplicación de esta técnica con otros ensayos específicos con el fin de complementar la información, como por ejemplo un análisis ChIP.

Sin embargo, los resultados del estudio de los promotores *GAL1* y *GRE2* presentados en este trabajo representan eventos transcripcionales, pues estos genes son reprimidos bajo las condiciones normales de crecimiento. Por lo tanto, la expresión de luciferasa, estimulada con diferentes condiciones de estrés o concentraciones de galactosa, es una consecuencia directa de la activación transcripcional.

A través del ensayo con luciferasa desestabilizada se llegaron a obtener informaciones interesantes sobre el rendimiento de los promotores al cambiar de las condiciones ambientales. Las fusiones de los promotores *GAL1* y *GRE2* con luciferasa reprodujeron fielmente las informaciones publicadas anteriormente basados en experimentos Northern. Específicamente, se confirmó que la expresión de *GAL1* se estimula con 2% de galactosa, alcanzando su nivel máximo alrededor de 40 min. Este nivel se mantiene durante el crecimiento en galactosa (Kundo and Peterson, 2010). La expresión de *GRE2* alcanza unos niveles muy elevados y transitorios en presencia de NaCl, produciendo picos máximos 10-30 minutos después de la administración de 0,4 M NaCl y 45-60 minutos en presencia de 0,7 M NaCl (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*,

2001). El ensayo de luciferasa desestabilizada reproduce de forma precisa los comportamientos de estos promotores (figuras 11 y 18).

Dada la alta sensibilidad de detección de la luz en el sistema de luciferasa, el primer parámetro inmediatamente accesible a través de este ensayo para describir las características de un promotor es la sensibilidad del mismo. Se puede por lo tanto definir el rango de estímulos que pueden activar la expresión génica. Concretamente se determinó que la concentración mínima de galactosa que es capaz de activar *GAL1* es aproximadamente 0,02% y que se puede obtener una respuesta transcripcional en *GRE2* a partir de una concentración de sal > 100mM o una concentración de menadiona de alrededor de 30µM.

Es importante destacar que estos niveles de umbral dependen de la sensibilidad de detección de la luz. La activación de los promotores *GRE2* y *GAL1* podría ocurrir en presencia de niveles de estimulación todavía más bajos pero no podría ser detectable por este tipo de ensayo. De todas formas, los valores umbral determinados en este trabajo pueden servir para comparar de forma cuantitativa diferentes clases de promotores de levadura. En general, el ensayo de luciferasa en células vivas ofrece la posibilidad de probar el rendimiento de un promotor de interés en respuesta a múltiples condiciones ambientales en un solo experimento.

La determinación exacta de los niveles máximos de expresión génica utilizando diferentes condiciones de estrés permite además obtener datos para describir la sensibilidad del promotor, definiendo el valor de EC₅₀ por los agentes utilizados. En el caso del promotor *GRE2*, se observó que su activación es más sensible a NaCl comparada con KCl o sorbitol. La EC₅₀ obtenida a través de este ensayo no considera solamente eventos transcripcionales sino todo el proceso de la expresión génica, incluyendo la estabilidad del ARNm y de la proteína.

La definición a nivel experimental de la sensibilidad para diferentes promotores a través de esta técnica, puede ayudar a comprender los sistemas de regulación más complejos, como por ejemplo los programas de expresión génica bajo diferentes estímulos de estrés. Un ejemplo es la respuesta transcripcional a osmoestrés en levadura, un proceso que implica un elevado número de factores de transcripción específicos que presumiblemente forman productos génicos diferentes y altamente modulables en respuesta a determinadas condiciones de estrés (Martinez-Montañes *et al.*, 2010).

En base a estudios genómicos previos (Ni *et al.*, 2009) se puede especular que los primeros genes osmoinducibles activados en presencia de un agente de estrés, tendrán niveles de umbral menores (o mayor sensibilidad a estrés) en comparación con los genes con regulación más indirecta. El ensayo reportero descrito en este trabajo ofrece la posibilidad de probar esta hipótesis determinando la sensibilidad de grupos de promotores blanco de diferentes factores de transcripción en respuesta a estrés y muchos otros desafíos ambientales.

Otro parámetro importante para la caracterización de los promotores es definir sus tasa de síntesis y el modo en que las condiciones ambientales modulan la tasa de transcripción. Si se asume que en la fase inicial de la activación de la fusión promotor luc-CP⁺ el incremento de luz es directamente proporcional a la tasa de transcripción y sólo marginalmente es influenciada por la estabilidad de la estabilidad diferencial de ARNm o la eficiencia de la traducción, entonces el aumento en unidades de luz en función del tiempo describe la producción de ARNm por minuto.

De esta manera se determinó que el promotor *GAL1* responde a concentraciones crecientes de galactosa con un aumento de la actividad prácticamente constante. Este comportamiento dinámico se observa en un rango específico de estímulo de galactosa (0,02-0,5%). En condiciones de concentraciones más elevadas, la tasa de síntesis del promotor *GAL1* alcanza su saturación y no puede aumentar más. Se puede por lo tanto especular que el rango de concentraciones de galactosa que induce una actividad dosis-sensible del *GAL1* refleja una adaptación a las concentraciones de azúcar encontrados por la levadura en la naturaleza.

Otro parámetro que se puede obtener a través de este ensayo y que describe el rendimiento de un promotor es el tiempo que transcurre entre el suministro del estímulo y la transcripción productiva. Los mecanismos de inducción de los genes de levadura no son uniformes y están involucrados también otros procesos como la asociación de factores de transcripción específicos, los co-activadores y las moléculas de señalización con el promotor, las modificaciones de la cromatina, la remodelación y desalojo del nucleosoma y el reclutamiento de la ARN polimerasa II.

Esto, junto con el tiempo que las rutas de señalización necesitan para desencadenar la activación a nivel de la cromatina, determinará el tiempo de respuesta para los diferentes promotores. El ensayo con luciferasa puede estimar indirectamente este tiempo de respuesta, basándose en el tiempo necesario para producir una emisión de luz medible a partir de la administración del estímulo. Este parámetro puede ser

valioso para poder estudiar la dinámica de la percepción y la transducción de la señal para una expresión génica eficiente.

Como era de esperar, se estimó que el tiempo de respuesta mínimo para el promotor osmoinducible *GRE2* es mucho más breve (3-4 min) que el del promotor *GAL1* (8-10 min) regulado por nutrientes. Inesperadamente se observó que la estimulación de *GAL1* se produjo con un retraso progresivamente más largo en función de la disminución de la concentración de galactosa. Se puede especular que un estímulo débil puede provocar una remodelación de la cromatina ineficiente o incompleta y por lo tanto un retraso en el reclutamiento de la ARN polimerasa II en el locus *GAL1*.

El ensayo de luciferasa aplicado en este trabajo es una herramienta valiosa para el estudio de respuestas transcripcionales muy transitorias, una regulación característica de los genes de respuesta a estrés.

Anteriormente se observó que el promotor *GRE2* se activa en condiciones de estrés osmótico por la acción del factor de transcripción Sko1 y, en condiciones de estrés oxidativo, a través del factor de transcripción Yap1 (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2001).

Utilizando el reportero *GRE2-lucCP⁺* se observó que *GRE2* se activa muy rápidamente y con una alta tasa de síntesis (V_{max}). Sin embargo se detectaron tasas de síntesis menores en valores umbral de estrés (100-150 mM NaCl o 30-40 μ M Menadiona). Un informe reciente muestra que los niveles umbral de estrés conducen a una activación de genes de tipo bimodal en que dos diferentes poblaciones de células responden o no al estímulo de forma individual. Este mecanismo es llevado a cabo a través de la remodelación de la cromatina (Pelet *et al.*, 2011). Esto se reflejaría en la observación de una tasa de síntesis total intermedia generada por el promedio de dos poblaciones distintas de células suministrando una concentración umbral de agente inductor.

En presencia de concentraciones más elevadas de estrés, el parámetro principal de regulación de *GRE2* es el tiempo en que permanece activa la tasa de síntesis máxima del promotor. Se ha demostrado que la activación y la acumulación nuclear en respuesta a estrés de la MAPK Hog1, que activa directamente Sko1, aumentan linealmente con la dosis de estrés (Pelet *et al.*, 2011). Por lo tanto, es más probable que lo que define el tiempo de la actividad promotora de *GRE2* en respuesta a estrés sea el tiempo en que Hog1 permanece en el núcleo. En el caso de la respuesta oxidativa de *GRE2*, se puede especular que sea el tiempo que Yap1 permanece unido a la región de control de *GRE2*, siendo Yap1 principalmente regulado a nivel de su acumulación nuclear tras la oxidación (Kuge *et*

al., 1997). Considerando estos factores juntos, se puede concluir que la rápida activación de *GRE2* para alcanzar la síntesis máxima es tan importante como su desactivación oportuna, regulación que depende estrictamente de la dosis de estrés.

Este comportamiento conduce a una actividad de estado estacionario máxima que aumenta gradualmente y que sólo se reduce en presencia de dosis elevadas de estrés > 0,4 M NaCl o > 150 µM Menadiona. Estos tratamientos severos de estrés reducen la eficiencia de la transcripción en general. Se ha demostrado que el estrés salino provoca la disociación de las proteínas del ADN genómico *in vivo* y que esto puede afectar al tiempo de activación transcripcional (Proft and Struhl, 2004).

La adaptación de la expresión génica es un proceso fino y altamente regulado e implica una extensa red de regulación a la que toman parte diferentes promotores. El ensayo de luciferasa aplicado en este trabajo ayuda a analizar la expresión dinámica en células vivas y permite comparar cuantitativamente el rendimiento de diferentes promotores. Para profundizar la contribución individual de los factores de transcripción con el fin de obtener un perfil de expresión más exhaustivo, se generó una fusión de lucCP⁺ con la introducción de uno o múltiples sitios de unión de un promotor específico para los factores de transcripción en este sistema. A través de estas construcciones se llegó a comparar la actividad de motivos de ADN responsables de la regulación de genes inducibles por estrés osmótico o oxidativo, como los sitios STRE, CRE y AP1, revelando sensibilidades características para cada elemento (Dolz-Edo *et al.*, 2013).

El ensayo de luciferasa aquí presentado puede por lo tanto proporcionar un enfoque importante para describir de forma cuantitativa y en tiempo real estos promotores sintéticos.

La sensibilidad del sistema luciferasa ha permitido en este trabajo descifrar también distintos mecanismos de la regulación gradual de la transcripción. Se comparó la regulación por nutrientes [*GAL1*] con la regulación por estrés osmótico [*GRE2*].

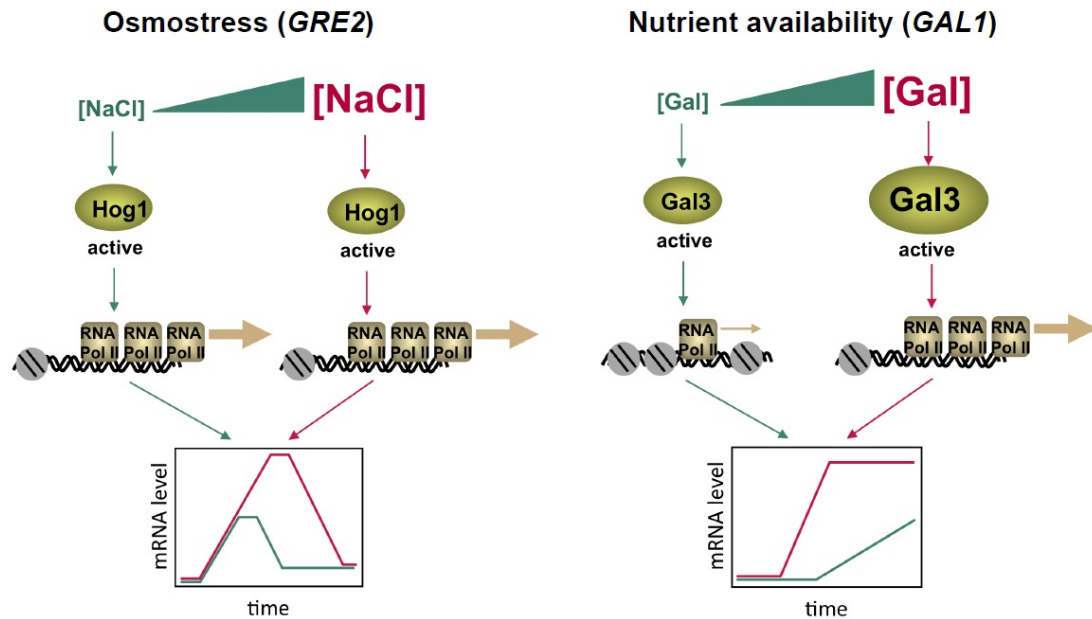


Figura 36. Modelo: Comparación de la regulación dosis-dependiente de la expresión génica de genes en respuesta a estrés con genes regulados por nutrientes. Panel izquierdo: El gen osmoinducible *GRE2* muestra un mecanismo de regulación "apagado/encendido" en respuesta al aumento de estrés salino. La MAP quinasa Hog1 se activa rápidamente y de forma independiente a la dosis de estrés, desencadenando la activación inmediata del promotor *GRE2* a niveles máximos, con una remodelación del nucleosoma y una ocupación de la ARN pol II completa. Panel derecho: El gen *GAL1* regulado por nutrientes muestra una actividad transcripcional progresiva en función de crecientes concentraciones de galactosa. Cantidades crecientes del inductor Gal3 en el estado activado, conducen a una actividad del promotor *GAL1* en constante aumento, lo cual implica una remodelación del nucleosoma y una asociación de la ARN pol II gradual.

En concentraciones umbral, la inducción del gen *GAL1* con galactosa es lenta e ineficiente. Esta característica podría ser debida a la estructura de la cromatina presente en la región del promotor *GAL1*, cuyo impedimento estérico dificulta la unión del inductor Gal3 con el promotor. Además, los bajos niveles iniciales de Gal3 en combinación con las bajas concentraciones de galactosa hacen que el gen *GAL1* responda lentamente y con tasas de transcripción sub-óptimas. Es probable que, con pocas moléculas Gal3 presentes en una célula que no ha metabolizado galactosa durante un tiempo considerable, el paso limitante para una eficiente transcripción de los genes *GAL* sea la concentración de Gal3 activo unido con el activador transcripcional Gal4. En este modelo, el grado de contrarrestar la represión mediada por el factor Gal80 y el reclutamiento adicional de los co-activadores SAGA y SWI/SNF aumentarían de forma gradual con la concentración de galactosa. Por otro lado, el

hecho que la expresión de Gal3 misma se activa por galactosa hace que el sistema GAL sea especialmente modulable. Un sensor inducible como Gal3 permite a la célula de adaptar la sensibilidad de la activación de los genes GAL a las necesidades ambientales de forma que, por ejemplo, las células de levadura que se encuentran con frecuencia en un medio con presencia de galactosa como fuente de energía pueden responder más fácilmente en la siguiente ronda de estimulación (Zacharioudakis *et al.*, 2007; Kundu and Peterson, 2010).

La memoria de la transcripción en levadura es un mecanismo fisiológico que se ha identificado principalmente en los genes de respuestas a los estímulos nutricionales (Brickner *et al.*, 2007; Ahmed and Brickner, 2007). La actividad de un promotor regulada de forma gradual en un rango de concentraciones de metabolitos puede modular su sensibilidad a través de señales específicos de transducción. Esto podría ser un esquema general para la expresión génica estimulada por nutrientes en levadura.

Es importante recordar que el ensayo reportero utilizado en este trabajo mide la expresión de los genes en poblaciones de células, por lo tanto no es posible especular sobre la contribución de una sola célula en el perfil global de la expresión.

Para abordar esta cuestión, se llevaron a cabo análisis de clasificación de poblaciones de células que acumulan marcadores fluorescentes durante un tiempo fijo de la inducción génica. Esos enfoques han demostrado que las concentraciones de estímulo, tanto durante la inducción con galactosa como con sal, pueden crear patrones de expresión bimodales en que algunas células son activas transcripcionalmente y otras no (Pelet *et al.*, 2011; Acar *et al.*, 2005). Sin embargo, estos ensayos subestiman la naturaleza dinámica de la inducción transcripcional graduada. Por ejemplo, no se observó inducción en concentraciones < 0,05% de galactosa y no se detectó un aumento de la transcripción de GAL1 en concentraciones > 0,2% (Acar *et al.*, 2010, Acar *et al.*, 2005)

Los datos obtenidos reflejan que las tasas de síntesis de GAL1 son reguladas de forma muy gradual, lo cual está en acuerdo con informes anteriores (Hawkins and Smolke, 2006; Apostu and Mackey, 2012). Es importante destacar que, pese a que en concentraciones > 0,2 % la respuesta no es bimodal sino llevada a cabo por todas las células, todavía se observa un importante aumento gradual de la expresión de GAL1. Por lo tanto, el ajuste de la tasa de síntesis de GAL1 a un aumento gradual de concentraciones de galactosa es la capacidad de una sola célula y muy probablemente es determinada por una remodelación de la cromatina.

La adaptación de la expresión génica a diferentes grados de estrés citotóxico parece seguir un principio completamente diferente. Intuitivamente se podría pensar que un producto génico implicado en la detoxificación de un estrés agudo tiene que ser producido en el menor tiempo posible, por lo menos en la primera fase de la defensa llevada a cabo por la célula, independientemente de la gravedad del estrés.

Tal respuesta de "emergencia" se identifica aquí en el caso del gen osmoinducible *GRE2*. En este gen se observaron niveles máximos de desalojo del nucleosoma y una formación muy rápida del complejo de preiniciación (experimentalmente 2 min). Es importante destacar que, a diferencia de *GAL1*, una dosis baja de inductor también provoca la inducción máxima de *GRE2*. Nuestros datos sugieren que la activación de la ruta de señalización HOG en condiciones de estrés salino leve, desencadena de todas formas la misma señal a sus promotores diana, que en todos los casos conduce a una activación transcripcional completa en los primeros pasos de la adaptación.

Sólo en concentraciones de sal $> 0,4$ M NaCl se nota un retraso progresivo en la expresión génica, lo cual se puede explicar por la inhibición general del proceso de la transcripción y una desaceleración de la transducción de señal a alta osmolaridad (Proft and Struhl, 2004; Babazadeh *et al.*, 2013).

Nuestros resultados indicaron además que el mecanismo de regulación encendido/apagado no es restringido a *GRE2* sino es una característica de respuesta común en los genes de respuesta a estrés. Se puede especular que una condición de estrés agudo puede inducir generalmente una expresión génica regulada a través del cambio de actividad génica encendido/apagado, en que la severidad del estrés determina el tiempo en que este estado permanece activo. Este modelo de regulación otorga a la célula una protección rápida y eficiente, con una producción de ARNm en continuo incremento desde los niveles más bajos de estrés (FIGURA 25).

Esto implica además que la adaptación dinámica de la expresión génica a estrés no se obtiene de la activación gradual sino a través de una oportuna inactivación de la transcripción, un proceso cuyas bases moleculares son todavía poco conocidas y por lo tanto de especial interés para futuros estudios acerca de la regulación por estrés.

En general, las respuestas a estrés osmótico y oxidativo podrían ser optimizadas a través de una activación transcripcional muy rápida, que no podría ser acelerada durante la memoria transcripcional. El efecto más evidente de memoria en la expresión de *GRE2* es una reducción de la amplitud en condiciones de estrés salino repetidas (Poveda *et al.*, datos no publicados). Esta reducción es producida por una

acumulación de proteínas de defensa, como el transportador de cationes Ena1 en caso de estrés salino. Se puede por lo tanto especular que los genes inducidos por estrés podrían ser modulados predominantemente a través de la capacidad de defensa celular que determina el tiempo necesario para mantener la expresión génica máxima. Merece la pena señalar que se ha publicado un trabajo donde se observó un efecto positivo de la memoria para en respuesta de levadura a estrés oxidativo cuando las células fueron tratadas previamente con una dosis leve de sal (Guan *et al.*, 2012). Trabajos futuros podrían revelar la importancia de una resistencia adquirida versus la memoria transcripcional bajo diferentes tipos de estreses y dosis.

La expresión nuclear de *GAL1* y *GRE2* es modulada a través de señales que se originan en el citoplasma y que llegan a los genes nucleares a través de proteínas específicas como Gal3 o Hog1. Gal3, unido a la galactosa o Hog1 fosforilado, interactúan físicamente con sus genes diana a través de factores de transcripción.

En este trabajo se revela que la asociación dinámica de Gal3 o Hog1 durante la estimulación gradual de los genes *GAL1* y *GRE2* respectivamente coincide con la remodelación de la cromatina, con la densidad de la ARN polimerasa II y con los productos génicos de los genes regulados. Además Gal3 y Hog1 podrían ser las moléculas responsables para la respuesta dosis-específica observada en sus genes diana. Los niveles de la proteína Gal3 en el estado no inducido son muy bajos, lo cual explica la necesidad de elevadas concentraciones de activadores para inducir de forma eficiente la transcripción de los genes *GAL*. Diferentemente, los niveles de la proteína Hog1 son elevados de forma constitutiva (aproximadamente 10 veces más abundantes que Gal3 no inducido (Ghaemmaghami *et al.*, 2003) independientemente de las condiciones de estrés, asegurando así un ratio de señalización máximo también en condiciones de estrés leves.

En este trabajo concluimos que la asociación de Hog1 con su promotor diana *GRE2* se modula a través del tiempo de interacción y no del incremento de asociación misma entre moléculas, lo cual está en acuerdo con una fosforilación gradual de la MAP quinasa en diferentes concentraciones de estrés salino (Acar *et al.*, 2010).

Un orden adicional de regulación podría constituir la estructura de la cromatina en condiciones de estrés con los genes regulados por nutrientes. En el caso de *GAL1*, la remodelación de la cromatina parece tener más importancia en la modulación de la eficiencia de la transcripción. En acuerdo con esta observación, se vio en este trabajo que los complejos modificadores de la cromatina SAGA y Swi/Snf son de importancia crucial para el incremento dinámico de la actividad de *GAL1*. En el caso de *GRE2*, la

remodelación del nucleosoma podría ocurrir de forma más simple y podría ser menos importante para la regulación de la activación de la transcripción.

Este modelo apoyaría la observación presentada en este trabajo de que Swi/Snf es totalmente prescindible para la regulación de *GRE2*, e incluso en ausencia de SAGA la transcripción es estimulada de forma gradual en función de la dosis de estrés salino.

En conjunto, los genes inducibles de levadura siguen diferentes rutas de estimulación gradual que se pueden resumir en rápidos sistemas de encendido/apagado en el caso de los genes de respuesta a estrés o regulaciones más lentas y graduales en el caso de genes regulados por nutrientes. La eficiencia de la transducción de la señal es el paso determinante para el tipo de respuesta y su refuerzo durante la memoria confiere una forma de cambiar de un modo a otro.

El estudio del factor de transcripción Smp1 en este trabajo ha mostrado que los diferentes activadores específicos de la expresión génica que actúan bajo estrés osmótico pueden tener funciones en etapas diferentes de la respuesta al estrés. La asociación de Smp1 específicamente en las regiones transcritas de genes inducibles contrasta con el comportamiento de otros activadores como Hot1 o Sko1 que actúan a través de su unión física en las regiones promotoras de los genes regulados. Estos resultados amplían los modelos que actualmente tenemos para describir la activación génica en respuesta a estrés osmótico.

En el modelo general de control transcripcional de los genes osmoinducibles activados por la ruta HOG la detección de estrés osmótico a través de múltiples sistemas de recepción transmembrana se traduce rápidamente en la acumulación de Hog1, fosforilada y activada, en el núcleo. Hog1 se une físicamente a los factores de transcripción específicos (descritos en la introducción) activando la transcripción de los genes por ellos controlados y actuando en conjunto con la RNA pol II a lo largo de la elongación transcripcional. En este modelo, la función de los factores de transcripción como Hot1 o Sko1 sería el reclutamiento de la MAP quinasa activada en las regiones promotoras que ellos ocupan a través de sus interacciones directas con motivos de reconocimiento en las regiones 5' de los genes diana de Hog1. Smp1 parece tener una función diferente puesto que apenas se asocia con regiones promotoras. Podemos especular que Smp1 tiene un papel en la transcripción en un paso después del reclutamiento de Hog1 al gen osmoinducible.

Para esclarecer más una posible función de Smp1 en la región transcrita, sería interesante llevar a cabo experimentos ChIP en un fondo $\Delta hog1$ y especialmente

investigar la función de Smp1 en el reclutamiento de otros coactivadores transcripcionales. De particular interés sería RSC, miembro del complejo SWI/SNF, que interactúa físicamente con Hog1 fosforilado y tiene una función importante en la remodelación de la cromatina dentro de regiones ORF durante la activación bajo estrés osmótico (Mas *et al.*, 2009; Nadal-Ribelles *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Se ha establecido un sistema basado en luciferasa desestabilizada (lucCP⁺) de la cuantificación de la expresión génica en tiempo real y en células vivas de levadura.

El sistema lucCP⁺ permite cuantificar la regulación transcripcional de forma continua y simultánea bajo muchas condiciones ambientales y permite así describir el perfil dosis-respuesta para cualquier promotor de interés.

Con el sistema lucCP⁺ se pueden determinar varios parámetros cuantitativos de la expresión génica como la tasa de síntesis máxima (V_{max}), la actividad máxima (A_{max}), el tiempo desde la suministración del estímulo hasta la activación de la transcripción y el valor de EC₅₀.

La aplicación del sistema lucCP⁺ a genes activados por nutrientes (como *GAL1*) o por estrés osmótico (como *GRE2*) revela importantes diferencias en su regulación gradual:

En el caso de *GAL1* la actividad promotora como la remodelación de la cromatina y la asociación de la ARN pol II aumentan de forma gradual en un rango de concentraciones de galactosa. Gal3 parece ser la proteína que confiere esta regulación graduada.

En el caso de *GRE2* el parámetro principal que se regula en un rango de estrés creciente es el tiempo durante se transcribe activamente, mientras tanto la actividad promotora como la remodelación de la cromatina y la asociación de la ARN pol II permanecen prácticamente constantes. Hog1 parece ser la proteína que confiere esta regulación temporal.

El factor de transcripción Smp1 se asocia preferentemente con regiones ORF de algunos genes osmoinducibles, coincidiendo con el complejo de la ARN polimerasa II. Su función para la activación transcripcional depende de la presencia de la región transcrita del gen inducido.

Los resultados de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones científicas originales:

1. **Rienzo A**, Pascual-Ahuir A, Proft M. (2012) The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast*. Jun;29(6):219-31. doi: 10.1002/yea.2905. Epub 2012 Jun 2.
2. Dolz-Edo L, **Rienzo A**, Poveda-Huertes D, Pascual-Ahuir A and Proft M (2013) Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol Cell Biol* 33:2228-2240.
3. **Rienzo A**, Poveda-Huertes D, Aydin S, Buchler NE, Pascual-Ahuir A, Proft M. (2015) Different mechanisms confer gradual control and memory at nutrient and stress regulated genes in yeast. *Mol Cell Biol*. 2015 Aug 17. pii: MCB.00729-15.
[Aceptado]

BIBLIOGRAFÍA

- Acar M, Becskei A and van Oudenaarden A (2005) Enhancement of cellular memory by reducing stochastic transitions. *Nature* 435:228-232.
- Acar M, Pando BF, Arnold FH, Elowitz MB, van Oudenaarden A (2010) A general mechanism for network-dosage compensation in gene circuits. *Science* 329:1656-1660.
- Ahmed S and Brickner JH (2007) Regulation and epigenetic control of transcription at the nuclear periphery. *Trends Genet* 23:396-402.
- Alam J and Cook JL (1990) Reporter gene: application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry* 118, 245-254.
- Alberti S, Gitler AD and Lindquist S (2007) http://www.igmm.cnrs.fr/IMG/pdf/pAdvancedGateway_vector_kit.pdf
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, and Prior BA (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 PM, Jovanovic A, Reiser V, and Ammerer G (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell*, 7, 767-777.
- Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, and Posas F (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J*, 22, 2433-2442
- Alieva NO, Konzen KA, Field SF, Meleshkevitch EA, Hunt ME, Beltran-Ramirez V, Miller DJ, Wiedenmann J, Salih A, and Matz MV (2008) Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PLoS ONE* 3, e2680.

- Angus-Hill ML, Schlichter A, Roberts D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, and Cairns BR (2001) A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell* 7: 741-751.
- Anderson JD and Widom J (2000) Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *J Mol Biol* 296(4):979-87.
- Ansari AZ, Koh SS, Zaman Z, Bongards C, Lehming N, Young RA and Ptashne M (2002) Transcriptional activating regions target a cyclin-dependent kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14706–14709
- Apostu R and Mackey MC (2012) Mathematical model of GAL regulon dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Theor Biol* 293:219-235.
- Arnone M I, Dmochowski I J and Gache C (2004) Using reporter genes to study cis-regulatory elements. *Methods in Cell Biology* 74, 621- 652.
- Babazadeh R, Adiels CB, Smedh M, Petelenz-Kurdziel E, Goksor M and Hohmann S (2013) Osmostress-induced cell volume loss delays yeast Hog1 signaling by limiting diffusion processes and by Hog1-specific effects. *PLoS One* 8:e80901.
- Bai C, Tesker M and Engelberg D (2015) The yeast Hot1 transcription factor is critical for activating a single target gene, STL1. *Mol Biol Cell*. 26(12):2357-74. doi: 10.1091/mbc.E14-12-1626.
- Balasubramanian R, Pray-Grany MG, Selleck W and Grand PA (2002) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 277, 7989-7995
- Barbaric S, Reinke H and Hörz W. (2003) Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the PHO5 promoter. *Mol Cell Biol*. 2003 May; 23(10):3468-76

- Barberis A, Pearlberg J, Simkovich N, Farrell S, Reinagel P, Bamdad C, Sigal G, and Ptashne M (1995) Contact with a component of the polymerase II holoenzyme suffices for gene activation. *Cell* 81, 359-368.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schonnes DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I and Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823-837.
- Barski A and Zhao K (2009) Genomic location analysis by ChIP-Seq. *J Cell Biochem*, 107, 11-18.
- Bhat PJ and Murthy TV (2001) Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction.
- *Mol Microbiol.* 2001 Jun;40(5):1059-66. Review.
- Bhat PJ and Lyer RS (2009) Epigenetics of the yeast galactose genetic switch. ePublication. *J. Biosci.* 34 513–522.
- Bhaumik SR and Green MR (2001) SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* 15: 1935–1945
- Bhaumik SR, Raha T, Aiello DP and Green MR (2004) In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev* 18: 333–343.
- Bhaumik SR (2011) Distinct regulatory mechanisms of eukaryotic transcriptional activation by SAGA and TFIID. *Biochimica et biophysica acta* 1809(2), 97-108.
- Bilsland-Marchesan E, Arino J, Saito H, Sunnerhagen P and Posas F (2000) Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol*, 20, 3887-3895.
- Björklund S and Gustafsson CM (2005) The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci.* 2005 May; 30(5):240-4. Review

- Blank TE, Woods MP, Lebo CM, Xin P and Hopper JE (1997) Novel Gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2566–2575.
- Blomberg A (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett*, 182, 1-8.
- Bresnick EH and Felsenfeld G (1993) Evidence that the transcription factor USF is a component of the human beta-globin locus control region heteromeric protein complex. *J. Biol Chem* 268,18824-18834.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E and Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259, 1760-1763.
- Brickner DG, Cajigas I, Fondufe-Mittendorf Y, Ahmed S, Lee PC, Widom J and Brickner JH (2007) H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5:e81.
- Bryant GO and Ptashne M (2003) Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol. Cell* 11: 1301–1309.
- Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Merzlyak EM, Shkrob MA, Lukyanov S and Lukyanov KA (2006) A genetically encoded photosensitizer. *Nat Biotechnol.* Jan; 24(1):95-9. Epub 2005 Dec 20.
- Cairns BR, Schlichter A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD and Winston F (1999) Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol Cell* 4: 715-723.

- Campbell RE and Davidson MW (2010) Fluorescent reporter protein. In *Molecular Imaging with Reporter Genes* (ed. Gambhir, S. S. and Yaghoubi, S. S.), pp. 3-40. New York: Cambridge University Press.
- Carey MF (1995) A holistic view of the complex. *Curr Biol* 9, 1003-1005.
- Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2(2):202-7.
- Carrozza MJ, John S, Sil AK, Hopper JE, and Workman JL (2002) Gal80 confers specificity on HAT complex interactions with activators. *J. Biol. Chem.* 277: 24648–24652.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, and Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 12, 323-337.
- Cavalli G and Thoma F (1993) Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J.* Dec;12(12):4603-13.
- Chasman DI and Kornberg RD (1990) GAL4 protein: purification, association with GAL80 protein, and conserved domain structure. *Mol. Cell. Biol.* 10: 2916–2923.
- Chen RE and Thorner J (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1311-1340.
- Chang C, Gonzalez F, Rothermel B, Sun L, Johnston SA and Kodadek T (2001) The Gal4 activation domain binds Sug2 protein, a proteasome component, in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 276: 30956–30963.
- Chelstowska A, Liu Z, Jia Y, Amberg D and Butow RA (1999) Signalling between mitochondria and the nucleus regulates the expression of a new D-lactate dehydrogenase activity in yeast. *Yeast* 15, 1377–1391.

- Cheng JL, Attardi LD, Verrijzer CP, Yokomori K and Tjian R (1994) Assembly of recombinant TFIIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79, 93-105.
- Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ and Davis RW (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell*. Jul ;2(1):65-73.
- Clotet J, Escote X, Adrover MA, Yaakov G, Gari E, Aldea M, de Nadal E and Posas F (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J*, 25, 2338-2346.
- Clotet J and Posas F (2007) Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol*, 428, 63-76.
- Conaway R and Conaway J (1997) General transcription factors for RNA polymerase II. *prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 56:327-346.
- Conti E, Franks NP and Brick P (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure* v4 pp.287-298.
- Cote J, Quinn J, Workman JL and Peterson CL (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SFN complex. *Science* 265, 53-60.
- Côté J, Peterson CL and Workman JL (1998) Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4947-4952.
- Davidson MW and Campbell RE (2009) Engineered fluorescent proteins: innovations and applications. *Nat. Methods* 6, 713-717.

- de Nadal E, Alepuz PM and Posas F (2002). Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO J* 21, 735-740.
- De Nadal E, Casadome L and Posas F (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*, 23, 229-237.
- de Nadal E and Posas F (2010) Multi-layered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* 29, 4-13.
- De Wet JR, Wood KV, De Luca M, Helsinki DR and Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 725-737.
- Deckert J and Struhl K (2001) Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* 21: 2726-2735.
- Deheyn DD, Kubokawa K, McCarthy JK, Murakami A, Porrachia M, Rouse GW and Holland ND (2007) Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus. *Biol. Bull.* 213, 95–100.
- Dimri P, Lee X, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E, Linskens M, Rubelj I and Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Cell Biology Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 92, pp. 9363-9367.
- Dodou E and Treisman R (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17(4):1848-59.
- Dolz-Edo L, Rienzo A, Poveda-Huertes D, Pascual-Ahuir A and Proft M (2013) Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol Cell Biol* 33:2228-2240.

- Egriboz O, Jiang F, and Hopper JJ (2013) Rapid GAL Gene Switch of *Saccharomyces cerevisiae* Depends on Nuclear Gal3, Not Nucleocytoplasmic Trafficking of Gal3 and Gal80 Genetics Society of America doi:10.1534/genetics.111.131839.
- Emili A and Ingles CJ (1995) The RNA polymerase II carboxy-terminal domain: links to a bigger and better "holoenzyme"? *Curr Opin Genet Dev* 5, 204-209.
- Epstein CB, Waddle JA, Hale W, Dave V, Thornton J, Macatee TL, Garner HR and Butow RA (2001) Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol Biol Cell* 12, 297–308.
- Eriksson P, Alipour H, Adler L and Blomberg A (2000) Rap1p-binding sites in the *saccharomyces cerevisiae* GPD1 promoter are involved in its response to NaCl. *J Biol Chem*, 275, 29368-29376.
- Escote X, Zapater M, Clotet J and Posas F (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol*, 6, 997-1002.
- Fan F and Wood KV (2007) Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 5 (1): 127–36.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* Jul 1; 132(1):6-13.
- Feinberg AP and Vogelstein B (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem.* Feb;137(1):266-7.
- Felsenfeld G, and Groudine M (2003) Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453.

- Fernandez C, Domingo B, Picazo F, Pérez JM, Tranque P, Llopis J (2006) Analisis de la Dinamica Celular con Proteinas Fluorescentes. Universidad de Castilla La Mancha. Revista Cientifica de Divulgacion No 5.
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H and Silver PA (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. EMBO J, 17, 5606-5614.
- Flaus A and Owen-Hughes T (2003) Mechanisms for nucleosome mobilization. Biopolymers 68 (4): pp. 563–78. doi:10.1002/bip.10323. PMID 12666181.
- Gambhir SS, Barrio JR, Herschman HR and Phelps ME (1999) Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression. Nuclear Medicine and Biology 26, 481-490.
- Garay-Arroyo A and Covarrubias A (1999) Three Genes Whose Expression is Induced by Stress in Saccharomyces cerevisiae YEAST. Yeast 15, 879–892.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB and Storz G (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell 11, 4241-4257.
- Geisler S, Lojek L, Khalil AM, Baker KE and Collier J (2012) Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes. Molecular cell 45(3), 279-291.
- Georis I (2010) Comunicación en “EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast”
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O’Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. Nature 425:737-741.
- Golzio M, Rols MP, Gabriel B and Teissie J (2004) Optical imaging of in vivo gene expression: a critical assessment of the methodology and associated technologies. Gene Therapy 11, S85-S91.

- Gomar-Alba M, Morcillo-Parra M and Olmo M (2015) Response of yeast cells to high glucose involves molecular and physiological differences when compared to other osmotic stress conditions. *FEMS Yeast Res* (5). pii: fov039. doi: 10.1093/femsyr/fov039.
- Gorner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H and Schuller C (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev*, 12, 586-597.
- Gorr SU (1996) Differential storage of prolactin, granins (chromogranin B and secretogranin II), and constitutive secretory markers in rat pituitary GH4C1 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 3575-3580.
- Gould SJ and Subramani S (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175 (1): 5–13.
- Grant PA, Duggan L, Côté J, Roberts SM, Brownell JE, Candau R, Ohba R, Owen-Hughes T, Allis CD, Winston F, Berger SL and Workman JL (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* 11, 1640-1650.
- Guan Q, Haroon S, Bravo DG, Will JL and Gasch AP (2012) Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192:495-505.
- Hall DB and Struhl K (2002) The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):46043-50. Epub 2002 Sep 23.
- Harbon S, Eggelte, HJ, Fisher M and Rabin BR (1992) Amplified assay of alkaline phosphatase using flavin-adenine dinucleotide phosphate as substrate. *Analytical Biochemistry* 206, 119-24.
- Hargreaves DC and Crabtree GR (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*, 21: 396-420.

- Hastings JW and Johnson CH (2003) in *Methods in Enzymology; Biophotonics*, eds Mariott AG, Parker I (Academic, San Diego) pp75-104.
- Hawkins KM and Smolke CD (2006) The regulatory roles of the galactose permease and kinase in the induction response of the GAL network in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281:13485-13492.
- Hengartner CJ, Thompson CM, Zhang J, Chao DM, Liao SM, Koleske AM, Okamura S and Young RA (1995) Association of an activator with RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev* 9, 887-910.
- Hirschhorn JN, Brown SA, Clark CD and Winston F (1992) Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-2298.
- Hohmann S, Krantz M and Nordlander B (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol*, 428, 29-45.
- Hohmann S (2009) Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 583: 4025–4029.
- Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES and Young RA (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-728.
- Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 300-372.
- Houseley J, Rubbi L, Grunstein M, Tollervey D and Vogelauer M (2008) A ncRNA modulates histone modification and mRNA induction in the yeast GAL gene cluster.
- *Mol Cell*. 5;32(5):685-95. doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.027.

- Ignowski JM and Schaff DV (2004) Kinetic analysis and modeling of firefly luciferase as a quantitative reporter gene in live mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* 86, 827-834.
- Imbalzano AN, Kwon H, Green MR and Kingston RE (1994) Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481-485.
- Ingles CJ, Shales M, Cress WD, Triezenberg SJ and Greenblatt J (1991) Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16. *Nature* 351, 588-590.
- Jacobson R, Zhang R and Matthews B (1994) Three dimensional structure of β -galactosidase from E.coli. *Nature*. 1994 Jun 30;369(6483):761-6.
- Jeong CJ, Yang SH, Xie Y, Zhang L and Johnston SA (2001) Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry* 40: 9421–9427.
- Jia Y, Rothermel B, Thornton J and Butow RA (1997) A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol* 17, 1110–1117.
- Jiang C and Pugh B F (2009) Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* 10: 161-172.
- Jiang FL, Frey BR, Evans ML, Friel JC and Hopper JE (2009) Gene activation by dissociation of an inhibitor from a transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 29: 5604–5610.
- Cheng JX, Gandolfi M and Ptashne M (2004) Activation of the Gal1 Gene of Yeast by Pairs of ‘Non-Classical’ Activators. *Current Biology*, Vol 14, 1675, 1679.
- Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM and Wold B (2007) Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science*, 316, 1497-1502.

- Johnston S A, Salmeron JM and Dincher SS (1987) Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell* 50: 143–146.
- Lemieux K and Gaudreau L (2004) Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UASG requires the Mediator, TAFIIs, and RNA polymerase II. *The embo journal* 23, 4040-4050.
- Knezetic JA and Luse DF (1986) The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95-104.
- Kim YJ, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH and Kornberg RD (1994) A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77, 599-608.
- Kingston RE and NarlikarGJ (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13: 2339-2352.
- Klipp E, Nordlander B, Krüger R, Gennemark P and Hohmann S 2005 Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat Biotechnol.* 2005 Aug;23(8):975-82. Epub 2005 Jul 17. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2006 Oct;24(10):1293.
- Koh SS, Ansari AZ, Ptashne M and Young RA (1998) An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* 1: 895–904.
- Koleske AJ and Young RA (1994) An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.
- Koleske AJ and Young RA (1995) The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem, Sci.* 20, 113-116.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.

- Kremers GJ, Gilbert SG, Cranfill PJ, Davidson MW and Piston DW (2011) Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci.* 2011 Jan 15;124(Pt 2):157-60. doi: 10.1242/jcs.072744.
- Kristiansen KN and Rohde W (1991) Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol- 4-reductase and molecular analysis of ant18 mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 230, 49–59.
- Kuras L, Borggreffe T, Kornberg RD (2003) Association of the Mediator complex with enhancers of active genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13887–13891.
- Kuras L and Struhl K (1999) Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*, Jun 10;399(6736):609-13.
- Kundu S and Peterson CL (2010) Dominant role for signal transduction in the transcriptional memory of yeast GAL genes. *Mol Cell Biol* 30:2330-2340.
- Kwon H, Imbalzano AN, Khavari PA, Kingston RE and Geen MR (1994) Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* 370, 477-481.
- Larschan E and Winston F (2001) The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes & development* 15(15), 1946-1956.
- Laurent BC and Carlson M (1992) Yeast SNF2/SWI2, SNF5 and SNF6 proteins coordinately with the gene-specific transcriptional activators GAL4 and BicoD. *Genes Dev.* 6, 1707-1715.
- Laurent BC, Treitel MA and Carlson M (1991) Functional interdependence of the yeast SNF2, SNF5, and SNF6 proteins in transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2687-2691.

- Leskinen P, Virta M and Karp M (2003) One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast Functional Analysis Report*, *Yeast* 20: 1109-1113.
- Lemieux K and Gaudreau L (2004) Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UASG requires the Mediator, TAFIIs, and RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4040–4050.
- Leuther K K and Johnston SA (1992) Nondissociation of GAL4 and GAL80 in vivo after galactose induction. *Science* 256: 1333–1335.
- Lohr D (1984) Organization of the GAL1-GAL10 intergenic control region chromatin. *Nucleic Acids Res.* 1984 Nov 26;12(22):8457-74.
- Li B, Pattenden SG, Lee D, Gutiérrez J, Chen J, Seidel C, Gerton J and Workman JL (2005) Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51):18385-90.
- Li B, Carey M and Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128: 707- 719.
- Liao XS, Small WC, Srere PA and Butow RA (1991) Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 38–46.
- Liao X and Butow RA (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72, 61–71.
- Liao SM, Zhang J, Jeffery DA, Koleske AJ, Thompson CM, Chao DM, Viljoen M, van Vuuren HJ and Young RA (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374, 193-196.

- Lin YS, Ha I, Maldonado E, Reinberg D and Green MR (1991) Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353, 569-571.
- Liu Z and Butow RA (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* 19, 6720–6728.
- Lohr D (1993) Chromatin structure and regulation of the eukaryotic regulatory gene GAL80. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 15;90(22):10628-32.
- Lohr D (1997) Nucleosome transactions on the promoters of the yeast GAL and PHO genes. *J Biol Chem* 272: 26795–26798.
- Lohr D, Venkov P and Zlatanova J (1995) Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J* 9: 777–787.
- Lorch Y, La Pointe JW and Kornberg RD (1988) On the displacement of histones from DNA by transcription. *Cell* 55, 743-744.
- Lorch Y, Zhang M and Kornberg RD (1999) Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* 96: 389-392.
- Lue NF, Chasman DI, Buchman AR and Kornberg RD (1987) Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3446–3451.
- Luger K and Hansen JC (2005) Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* 15: 188-196.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF and Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.

- Lundin M, Nehlin JO and Ronne H (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol* 14(3):1979-85.
- MacFaddin D (2000) *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM and Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369, 242-245.
- Maldonado E, Shiekhattar R, Sheldon M, Cho H, Drapkin R, Rickert P, Lees E, Anderson CW, Linn S and Reinberg D (1996) A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. *Nature*. 1996 May 2;381(6577):86-9.
- Manafi M, Kneifel W and Bascomb S (1991) Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol Rev.* 55:335-348.
- Martinez E (2002) Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* 50, 925-947.
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H and Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*, 15, 2227-2235.
- Mas G, de Nadal E, Dechant R, Rodríguez de la Concepción ML, Logie C, Jimeno-González S, Chávez S, Ammerer G and Posas F (2009) Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J*, 28, 326-336.
- Melcher K and Johnston SA (1995) Gal4 interacts with tatabinding protein and coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2839–2848.

- Melcher K and Xu HE (2001) Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO J.* 20: 841–851.
- Menezes RA, Amuel C, Engels CR, Gengenbacher U, and Labahn J (2003) Sites for interaction between Gal80p and Gal1p in *Kluyveromyces lactis*: structural model of galactokinase based on homology to the GHMP. *J Mol Biol.* 2003 Oct 24;333(3):479-92.
- Miyawaki A (2003) Fluorescence imaging of physiological activity in complex system using GFP-based probes. *Current Opinion in Neurobiology.* 13: 591-596.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S and Wu C (2004) ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303(5656):343-8.
- Mohrmann L and Verrijzer CP (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* 1681: 59-73.
- Murray PR, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (1999) *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Nadal-Ribelles M, Mas G, Millán-Zambrano G, Solé C, Ammeres G, Chávez S, Posas F and de Nadal E (2015) H3K4 monomethylation dictates nucleosome dynamics and chromatin remodeling at stress-responsive genes. *Nucleic Acids Research* Vol. 43, No. 10 4937–4949 doi: 10.1093/nar/gkv220
- Naylor LH (1999) Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology* 58, 749-757.
- Narlikar GJ, Fan HY and Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108: 475-487.

- Natarajan K, Li H, Mariuzza RA and Margulies DH (1999) MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet.*;1(1):32-46. Review.
- Neely KE, Hassan AH, Wallberg AE, Steger DJ, Cairns BR, Wright AP and Workman JL (1999) Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol. Cell* 4, 649–655.
- Neely KE, Hassan AH, Brown CE, Howe L and Workman JL (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/ SNF subunits. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1615–1625.
- Neigeborn L and Carlson M (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108, 845-858.
- Neish AS, Anderson SF, Schlegel BP, Wei W and Parvin JD (1998) Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* 26: 847–853.
- Nevitt T, Pereira J, Azevedo D, Guerreiro P and Rodrigues-Pousada C (2004) Expression of YAP4 in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Biochem J.* 2004 Apr 15;379(Pt 2):367-74.
- Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D and Umansky L (2009) Dynamoc and coplex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23, 1351-1363.
- O'Rourke SM and Herskowitz I (2004) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell* 15:
- 532–542.
- Orphanides G and Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* 108: 439-451.

- Parthun MR and Jaehning JA (1992) A transcriptionally active form of GAL4 is phosphorylated and associated with GAL80. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4981–4987.
- Pascual-Ahuir A, Posas F, Serrano R and Proft M (2001) Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem*, 276, 37373-37378.
- Pascual-Ahuir A, Struhl K and Proft M (2006) Genome-wide location analysis of the stress-activated MAP kinase Hog1 in yeast. *Methods*, 40, 272-278.
- Pascual-Ahuir A, Vanacloig-Pedros E and Proft M (2014) Toxicity Mechanisms of the Food Contaminant Citrinin: Application of a Quantitative Yeast Model. *Nutrients* 2014, 6, 2077-2087; doi:10.3390/nu6052077.
- Pazzagli M, Devine JH, Peterson DO and Baldwin TO (1992) Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. *Anal Biochem* 204: 315-323.
- Pelet S, Rudolf F, Nadal-Ribelles M, de Nadal E, Posas F and Peter M (2011) Transient activation of the HOG MAPK pathway regulates bimodal gene expression. *Science* 332:732-735.
- Peng G and Hopper JE (2002) Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8548–8553.
- Peterson CL and Herskowitz I (1992) Characterization of the yeast SWI1, SWI2 and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* 68, 573-583.
- Peterson CL and Tamkun JW (1995) The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *Trends Biochem Sci* 20, 143-146.
- Platt A and Reece RJ (1998) The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J.* 17: 4086–4091.

- Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB and Young RA (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science*, 313, 533-536.
- Posas F and Saito H (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* 17: 1385–1394.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E and Arino J (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* 275, 17249-17255.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG and Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. Volumen 111 pp. 229-233.
- Prochasson P, Neely KE, Hassan AH, Li B and Workman JL (2003) Targeting activity is required for SWI/SNF function in vivo and is accomplished through two partially redundant activatorinteraction domains. *Mol Cell* 12: 983-990.
- Proft M and 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, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Ariño J, Serrano R and Posas F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* 1;20(5):1123-33.
- Proft, M and 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. *Molecular cell*, Vol 9, 1307-1317, June 2002 by Cell Press.

- Proft, M and and Struhl K (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 118, 351-361.
- Proft M, Mas G, de Nadal E, Vendrell A, Noriega N, Struhl K and Posas F (2006) The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol Cell*, 23, 241-250.
- Pugh BF (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255: 1-14.
- Quinn J, Fyrberg AM, Ganster RW, Schmidt MC and Peterson CL (1996) DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 379: 844-847.
- Rajamanickam C and Jeejabai R (2005) Evaluation of the cardiac isoform of alpha2- macroglobulin as a factor inducing cardiac hypertrophy. *Methods in Molecular Medicine* 112, 261-275.
- Reiser V, Ruis H and Ammerer G (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 10, 1147-1161.
- Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA and Hohmann S (1999) Different signaling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145 (Pt3), 715-727.
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the
- induction of subsets of high osmolarity glycerol pathwaydependent genes. *J Biol Chem* 275: 8290–8300.
- Rep M, Proft M, Remize F, Tamas M, Serrano R, Thevelein JM and Hohmann S (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding

enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol*, 40, 1067-1083.

- Reeves WM and Hahn S (2003) Activator-independent functions of the yeast mediator sin4 complex in preinitiation complex formation and transcription reinitiation. *Mol Cell Biol*. 2003 Jan;23(1):349-58.
- Rienzo A, Pascual-Ahuir A, Proft M. (2012) The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast*. Jun;29(6):219-31. doi: 10.1002/yea.2905. Epub 2012 Jun 2.
- Rizzo MA, Davidson MW and Piston DW (2010) Fluorescent protein tracking and detection. In *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual* (ed. Goldman, R. D., Spector, D. L. and Swedlow, J. R.), pp. 3-34. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rosenthal N (1987) Identification of the regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Methods in Enzymology* 152, 704-720.
- Ruiz-Roig C, Noriega N, Duch A, Posas F and de Nadal E (2012) The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Molecular Biology of the Cell MBoC* in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E12-04-0289>).
- Saha A, Wittmeyer J and Cairns BR (2006) Mechanisms for nucleosome movement by ATPdependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl Cell Differ* 41: 127-148.
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. <http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/jczs/ml-introduction/content.pdf>

- Santangelo GM (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(1):253-82.
- Schafer G, Smith EM and Patterson HG (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* linker histone Hho1p, with two globular domains, can simultaneously bind to two four-way junction DNA molecules. *Biochemistry* 44(50):16766-75.
- Schmidt D, Stark R, Wilson MD, Brown GD and Odom DT (2008) Genome-scale validation of deep-sequencing libraries. *PLoS One*, 3, e3713.
- Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC and Ruis H (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J*. 1994 Sep 15;13(18):4382-9.
- Schuller HJ (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43(3):139-60.
- Schwarz, S, Kehrenberg C, Doublet B and Cloeckert A (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 519-542.
- Seet BT, Dikic I, Zhou MM and Pawson T (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 473-483.
- Sekito T, Thornton J and Butow RA (2000) Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol.Biol.Cell* 11:2103-2115.
- Selbert S and Rannie D (2002) Analysis of transgenic mice. *Methods in Molecular Medicine* 180, 305-341.
- Serrano R (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol*, 165, 1-52.

- Serrano R and Rodriguez-Navarro A (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 399-404.
- Sheldon M and Reinberg D (1995) Transcriptional activation: turning-up transcription. *Curr Biol* 5, 43-46.
- Schenborn E and Groskreutz D (1999) Reporter gene vectors and Assays. *Molecular Biotechnology* 13, 29-44.
- Shivaswamy S and Iyer VR (2008) Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast: dual role for SWI/SNF in the heat shock stress response. *Mol Cell Biol* 28: 2221-2234.
- Small WC, Brodeur RD, Sandor A, Fedorova N, Li G, Butow RA and Sreer PA (1995) Enzymatic and metabolic studies on retrograde regulation mutants of yeast. *Biochemistry* 34, 5569–5576.
- Smith CL and Peterson CL (2005) ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol* 65: 115-148.
- Stern M, Jensen R and Herskowitz I (1984) Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J. Mol. Biol.* 178, 853-868.
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 12: 599-606.
- Stunkel W, Kober I and Seifart KH (1997) A nucleosome positioned in the distal promoter region activates transcription of the human U6 gene. *Mol Cell Biol* 17(8):4397-405.
- Sudarsanam P and Winston F (2000) The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* 16: 345-351.

- Suzuki-Fujimoto T, Fukuma M, Yano KI, Sakurai and Vonika HA (1996) Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2504–2508.
- Syntichaki P, Topalidou I and Thireos G (2000) The Gcn5 bromodomain coordinates nucleosome remodelling. *Nature*. Mar 23;404(6776):414-7.
- Tao W, Deschenes RJ and Fassler JS (1999) Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. *J Biol Chem*, 274, 360-367.
- Tautz D and Renz M (1983) An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Jul 1;132(1):14-9.*
- Tatebayashi K, Tanaka K and Yang HY (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* 26:3521–3533.
- Tatebayashi K, Yamamoto K, Nagoya M, Takayama T, Nishimura A, Sakurai M, Momma T and Saito H (2015) Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Commun.* 6:6975. doi: 10.1038/ncomms7975.
- Teige M, Scheikl E, Reiser V, Ruis H and Ammerer G (2001) Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5625-5630.
- Thompson CM, Koleske AJ, Chao DM and Young RA (1993) A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CYD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* 73, 1361-1375.
- Timson DJ, Ross HC and Reece RJ (2002) Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry. *Biochem. J.* 363: 515–520.

- Torchia MG and Danzinger RG (1980) Reversed-phase highperformance liquid-chromatographic assay for cefoxitin in proteinaceous biological samples. *J. Chromatogr. A* 181: 120–122.
- Traven A, Jelacic B and Sopta M (2006) Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep*;7(5):496-9. Review.
- Tsien RY (1998) The Green Fluorescent Protein. *Annual Reviews Biochemistry*. 67: 509-544.
- Uesono Y and Toh E (2002) Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J Biol Chem*, 277, 13848-13855.
- Vanacloig-Pedros E, Bets C, Pascual-Ahuir A and Proft M (2015) Coordinated Gene Regulation in the Initial Phase of Salt Stress Adaptation. *J. Biol. Chem.*17;290(16):10163-75. doi: 10.1074/jbc.M115.637264.
- Van der Heide T, Stuart MC and Poolman B (2001) On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J*, 20, 7022-7032.
- Venter U, Svaren J, Schmitz J, Schmid A and Hörz W (1994) A nucleosome precludes binding of the transcription factor Pho4 in vivo to a critical target site in the PHO5 promoter. *EMBO J* 13(20):4848-55.
- Vollenbroich V, Meyer, Engels JR, Cardinali G and Menezes RA (1999) Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. *Mol. Gen. Genet.* 261: 495–507.
- Wallrath LL, Lu Q, Granok H and Elgin SC (1994) Architectural variations of inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. *Bioessays* 16(3):165-70.
- Weake VM and Workman JL (2010) Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet*, 11, 426-437.

- Whitehouse I, Flaus A, Cairns BR, White MF, Workman JL and Owen-Hughes T (1999) Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 400 (6746):784-7.
- Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F and Nienhaus GU (2004) Identification of GFP-like proteins in nonbioluminescent, azooxanthellate anthozoa opens new perspectives for bioprospecting. *Mar. Biotechnol.* 6, 270–277.
- Wightman R, Bell R and Reece RJ (2008) Localization and interaction of the proteins constituting the GAL genetic switch in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 7: 2061–2068.
- Wilson CJ, Chao DM, Imbalzano AN, Schnitzler GR, Kingston RE and Young RA (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell*. Jan 26;84(2):235-44.
- Winston F and Allis CD (1999) The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* 6: 601-604.
- Winston F and Carlson M (1992) Yeast SWI/SNF transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* 8, 387-391.
- Wood JM (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 230-262.
- Workman JL and Kingston RE (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67: 545-579.
- Workman JL and Roeder RG (1987) Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* 51, 613-622.
- Wu J and Grunstein M (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* 25: 619-623.

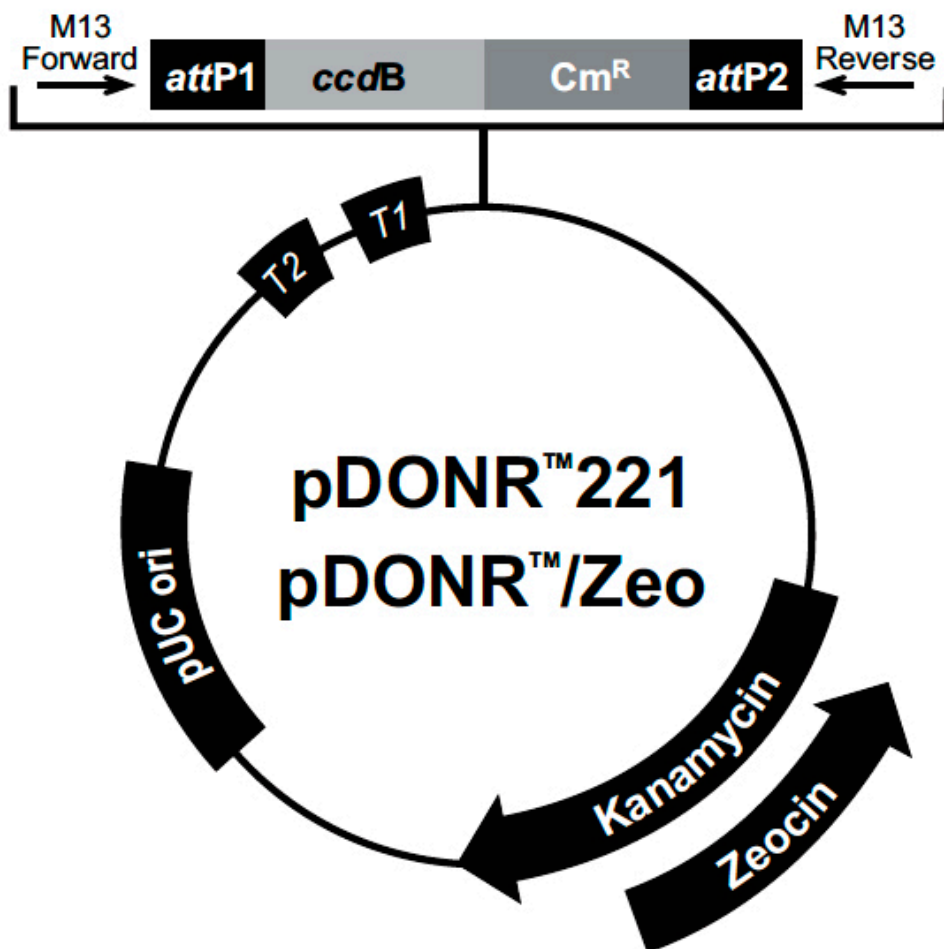
- Wu Y, Reece RJ and Ptashne (1996) Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.* 15: 3951–3963.
- Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Flores O and Ingles CJ (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 14, 7013-7024.
- Yale J and Bohnert HJ (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem* 276, 15996-16007.
- Yang F, Moss LG and Phillips GN (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14, 1246-1251.
- Yang X, Zaurin R, Beato M and Peterson CL (2007) Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATPdependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol* 14: 540-547.
- Yano K and Fukasawa T (1997) Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p with Gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1721–1726.
- Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I and Yamamoto KR (1992) Roles of SWI1, SWI2 and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258, 1598-1604.
- Yuan GC, Liu YJ, Dion MF, Slack MD, Wu LF, Altschuler SJ and Rando OJ(2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* 309(5734):626-30.
- Yudkovsky N, Logie C, Hahn S and Peterson CL (1999) Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev* 13: 2369–2374.

- Yun SJ, Hiraoka Y, Nishizawa M, Takio K and Titani K (1991) Purification and characterization of the yeast negative regulatory protein GAL80. *J. Biol. Chem.* 266: 693–697.
- Zacharioudakis I, Gligoris T and Tzamarias D 2007. A yeast catabolic enzyme controls transcriptional memory. *Curr Biol* 17:2041-2046.
- Zaccolo M (2004) Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses. *Circulation Research Journal of American Heart Association, Inc.* 94: 866 – 873.
- Zapater M, Clotet J, Escote X and Posas F (2005) Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle*, 4, 6-7.
- Zapater M, Sohrmann M, Peter M, Posas F and de nadal E (2007) Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmostress conditions. *Mol Cell Biol*, 27, 3900-3910.
- Zhang Y, Smith CL, Saha A, Grill SW, Mihardja S and Smith SB (2006) DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell* 24: 559-568.
- Zofall M, Persinger J, Kassabov SR and Bartholomew B (2006) Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* 13: 339-346.

ANEXO

1. Mapa de los plásmidos utilizados.

pDONR 221



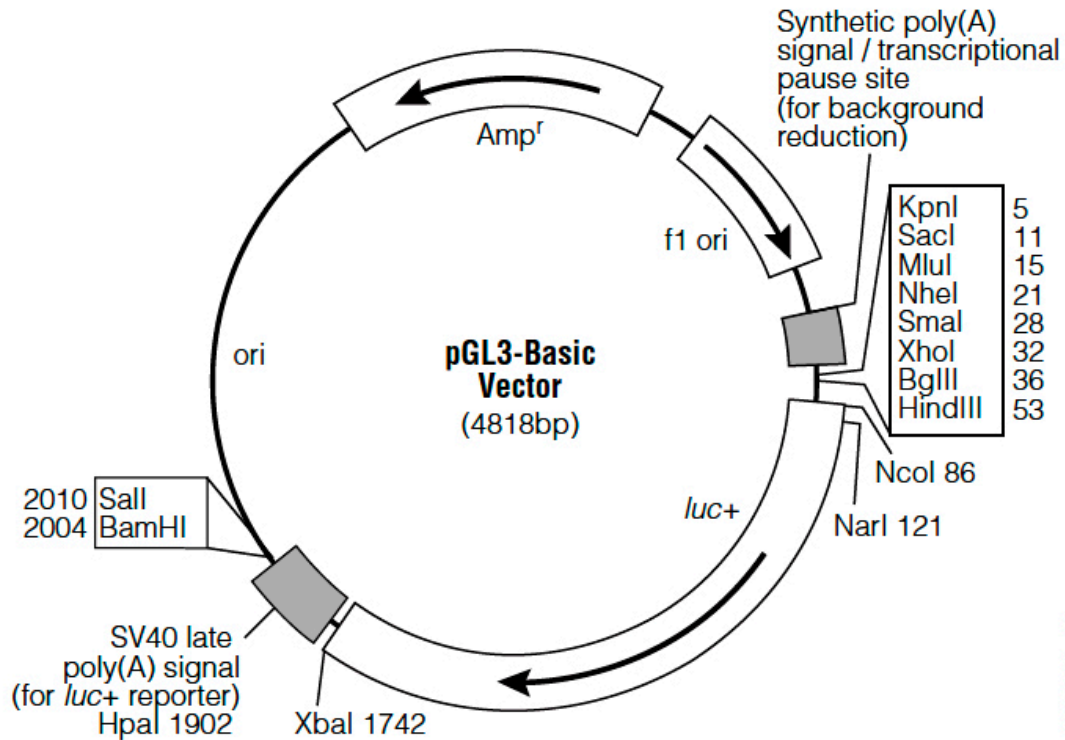
Comments for:

	pDONR™221 4761 nucleotides	pDONR™/Zeo 4291 nucleotides
<i>rrnB</i> T2 transcription termination sequence (c):	268-295	268-295
<i>rrnB</i> T1 transcription termination sequence (c):	427-470	427-470
M13 Forward (-20) priming site:	537-552	537-552
<i>attP1</i> :	570-801	570-801
<i>ccdB</i> gene (c):	1197-1502	1197-1502
Chloramphenicol resistance gene (c):	1825-2505	1847-2506
<i>attP2</i> (c):	2753-2984	2754-2985
M13 Reverse priming site:	3026-3042	3027-3043
Kanamycin resistance gene:	3155-3964	---
EM7 promoter (c):	---	3486-3552
Zeocin resistance gene (c):	---	3111-3485
pUC origin:	4085-4758	3615-4288

(c) = complementary strand

fuelle: www.invitrogen.com

pGL3



fuelle: www.promega.com

2. Lista de los cebadores utilizados en este trabajo (con la exclusión de los utilizados para amplificar las sondas del Northern Blot que aparecen en Materiales y Métodos).

Nombre Primer	Secuencia 5' - 3'	Región	Descripción
HOR2-948SacI	CCCCGAGCTCTGAAAGTAGCGCATCCTGAA	HOR2	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
HOR2-33SmaI	CCGGCCCCGGCCACTGATCTGGTAAACACTAG	HOR2	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
STL1-947SacI	CCCCGAGCTCTGATATTACGAGCGACCTAG	STL1	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
STL1-45SmaI	CCGGCCCCGGGCTAACTTGTATGCTAGAACACGTA	STL1	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
GRE2-940SacI	CCCCGAGCTCTTGGCTAACCATCTTACAG	GRE2	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
GRE2-7SmaI	CCGGCCCCGGCGTGTGATACTGCTATCT	GRE2	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
ALD6-	CCCCGAGCTCACAACCTTCCGCGGACGC	ALD6	Subclonar en

785Sacl			pAG413-lucCP ⁺
ALD6-2SmaI	CCGGCCCGGGTATTCTGATAGTATGTGTTTGT	ALD6	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
M13fw	GTAAAACGACGGCCAG		Primer de secuenciación
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC		Primer de secuenciación
GAL1-280	AGTAACCTGGCCCCACAAAC	Promotor GAL1	ChIP
GAL1-175	CGCTGATTAATTACCCAGAA	Promotor GAL1	ChIP
POL1+1796	CTGCACTGGCAAAACAGAAA	ORF POL1	ChIP
POL1+1996	GACGGCCAATAGAGCTGAAC	ORF POL1	ChIP
GRE2-310	CATTTCAACAATTGGCCCTCACCTC	Promotor GRE2	ChIP
GRE2-153	GATCTACTTCCGCGAGAAAATTCCG	Promotor GRE2	ChIP
GRE2-301	AATTGGCCCTCACCTCTTTT	Promotor GRE2	ChIP
GRE2+280	GCGATTTATTAATTCCTGCTGTG	ORF GRE2	ChIP
GRE2+452	GGTTCCAGGATTCTTCGTT	ORF GRE2	ChIP
GRE2+754	GCCTTCCAAAAGAGGGAAAC	ORF GRE2	ChIP
GRE2+905	TTATGGGTAGCACCAGAACC	ORF GRE2	ChIP
HOR2+105	GGGATTTCCGTAAGGACAAA	ORF HOR2	ChIP
HOR2+210	GGCAAAGTCTGGAGCGAAC	ORF HOR2	ChIP
HOR2+534	AGACGCTCCAGCAGGTATTG	ORF HOR2	ChIP
HOR2+645	TGATGGATTTCGTGTTTTTG	ORF HOR2	ChIP
ALD6-196	GGTTGAGTAACACATCAAACACC	Promotor ALD6	ChIP
ALD6-91	CGAATTGAATATTACCAAACCTTCTT	Promotor ALD6	ChIP
ALD6+166	GAGGTCTCTTCTGCCACCAC	ORF ALD6	ChIP
ALD6+271	GGCCTCTTTCTCTTGGGTCT	ORF ALD6	ChIP
ALD6+730	AGCTGGCTTTTACCGTTCT	ORF ALD6	ChIP
ALD6+842	ACCAAATGGGCGGACTTAC	ORF ALD6	ChIP
GRE2-121	TTGATCGGACTTTTTCTTTTT	Promotor GRE2	ChIP
GRE2 -940 Sacl	CCCCGAGCTCTTGGCTAACCATCTTACAG	Promotor GRE2	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
GRE2 -7 SmaI	CCCCGAGCTCTTGGCTAACCATCTTACAG	Promotor GRE2	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
ALD6 -785 Sacl	CCCCGAGCTCACAACCTTCCGCGGACGC	Promotor ALD6	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺
ALD6 -2 SmaI	CCGGCCCGGGTATTCTGATAGTATGTGTTTGT	Promotor ALD6	Subclonar en pAG413-lucCP ⁺

HOR2 -948 Sacl	CCCCGAGCTCTGAAAGTAGCGCATCCTGAA	Promotor HOR2	Subclonar en pAG413- lucCP ⁺
HOR2 -33 SmaI	CCGGCCCCGGGCCACTGATCTGGTAAACACTAG	Promotor HOR2	Subclonar en pAG413- lucCP ⁺
SOD2 -977 Sacl	CCCCGAGCTCCATGGTTAGCTAGGCCTGAAG	Promotor SOD2	Subclonar en pAG413- lucCP ⁺
SOD2 -16 SmaI	CCGGCCCCGGGTAAGGTCGATTCGGATCGGAT	Promotor SOD2	Subclonar en pAG413- lucCP ⁺
CTT1 -983 Sacl	CCCCGAGCTCCTAAGGCCTTGATTCGATCGGA	Promotor CTT1	Subclonar en pAG413- lucCP ⁺
CTT1 -10 SmaI	CCGGCCCCGGGTTTCGATCCGAAATCGTGCTA	Promotor CTT1	Subclonar en pAG413- lucCP ⁺

3. Plásmidos generados en este trabajo:

pAG413-GRE2-lucCP⁺: Plásmido de levadura centromérico *AmpR HIS3* con el promotor del gen *GRE2* fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada.

pAG413-CTT1-lucCP⁺: Plásmido de levadura centromérico *AmpR HIS3* con el promotor del gen *CTT1* fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada.

pAG413-SOD2-lucCP⁺: Plásmido de levadura centromérico *AmpR HIS3* con el promotor del gen *SOD2* fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada.

pAG413-GAL1-lucCP⁺: Plásmido de levadura centromérico *AmpR HIS3* con el promotor del gen *GAL1* fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada.

pAG413-HOR2-lucCP⁺: Plásmido de levadura centromérico *AmpR HIS3* con el promotor del gen *HOR2* fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada.

pAG413-ALD6-lucCP⁺: Plásmido de levadura centromérico *AmpR HIS3* con el promotor del gen *ALD6* fusionado con el gen de la luciferasa desestabilizada.

(Rienzo *et al.*, 2012)

Research Article

The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell

Alessandro Rienzo, Amparo Pascual-Ahuir* and Markus Proft*

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, Ciudad Politécnica de la Innovación, Valencia, Spain

*Correspondence to:

M. Proft and A. Pascual-Ahuir,
Instituto de Biología Molecular y
Celular de Plantas,
CSIC-Universidad Politécnica de
Valencia, Ciudad Politécnica de la
Innovación, Edificio 8E, Ingeniero
Fausto Elío s/n, E-46022 Valencia,
Spain.

E-mail: mproft@bmc.upv.es;

apascual@bmc.upv.es

Abstract

A destabilized version of firefly luciferase was used in living yeast cells as a real-time reporter for gene expression. This highly sensitive and non-invasive system can be simultaneously used upon many different experimental conditions in small culture aliquots. This allows the dose–response behaviour of gene expression driven by any yeast promoter to be reported and can be used to quantify important parameters, such as the threshold, sensitivity, response time, maximal activity and synthesis rate for a given stimulus. We applied the luciferase assay to the nutrient-regulated *GALI* promoter and the stress-responsive *GRE2* promoter. We find that luciferase expression driven by the *GALI* promoter responds dynamically to growing galactose concentrations, with increasing synthesis rates determined by the light increment in the initial linear phase of activation. In the case of the *GRE2* promoter, we demonstrate that the very short-lived version of luciferase used here is an excellent tool to quantitatively describe transient transcriptional activation. The luciferase expression controlled by the *GRE2* promoter responds dynamically to a gradual increase of osmotic or oxidative stress stimuli, which is mainly based on the progressive increase of the time the promoter remains active. Finally, we determined the dose–response behaviour of a single transcription factor binding site in a synthetic promoter context, using the stress response element (STRE) as an example. Taken together, the luciferase assay described here is an attractive tool to rapidly and precisely determine and compare kinetic parameters of gene expression. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: luciferase; gene expression; dose–response; promoter; *Saccharomyces cerevisiae*

Received: 20 January 2012

Accepted: 27 April 2012

Introduction

Dynamic modulation of gene expression is of fundamental importance to understanding how biological systems respond to external stimuli. Yeast is an excellent model that serves to describe both the impact of environmental changes on transcription at the whole-organism level and to characterize the molecular events that lead to stimulus-specific activation of gene expression (Hahn and Young, 2011). Complex transcriptional programmes have been discovered by transcriptomic analyses under many environmental cues (Gasch, 2007) and genomic location analyses reveal that those programmes

are executed by the dynamic interaction of many specific transcription factors with their target promoters (Harbison *et al.*, 2004). Moreover, many transcriptional responses are transient and strictly regulated by the duration and strength of the environmental insult (Yosef and Regev, 2011). As a result, a given stimulus provokes many different transcriptional outputs among the responding genes, which ultimately guarantees a fine-tuned and efficient adaptation. In the future, it will be crucial to describe the dynamic behaviour of individual promoters and how a characteristic transcriptional output is achieved by the specific transcription factors acting on them (Yosef and Regev, 2011).

It will be important to develop methodology that allows quantitative description of the modulation of gene expression in response to varying stimuli.

Transcription is traditionally measured by the direct or indirect determination of the steady-state level of the mRNA of a gene of interest, or by the detection of a reporter enzyme activity whose expression is controlled by the promoter of interest. However, these methods require the disruption of the cell, and it is very time consuming to study differential gene expression in a truly kinetic manner or upon a variety of different stimuli. The introduction of fluorescent reporters such as GFP allowed the study of gene expression in the single living cell, which allowed transcriptional activity to be visualized instantaneously without disrupting the integrity of the cell (Cormack, 1998). However, fluorescent reporters need excitation from an external light source, which interferes with a continuous quantification of gene expression during biological responses. Additionally, many transcriptional responses are transient. Thus, their analysis by reporter assays requires the use of destabilized versions of the fluorescent marker proteins, which are relatively long-lived in the case of GFP (Mateus and Avery, 2000). The bioluminescent reaction catalysed by firefly luciferase is a versatile reporting system, which has been adapted to gene expression studies in mammals, insects, plants and filamentous fungi (Miraglia *et al.*, 2011). The emitted light from the oxidation of its substrate luciferin is an immediate and very sensitive measure of its enzyme activity without the need for external excitation. In yeast, short-lived versions of firefly luciferase with half-lives of 20–30 min have been created and adapted to monitor Ca^{2+} -regulated transcriptional responses in *Schizosaccharomyces pombe* (Deng *et al.*, 2006) and to investigate oscillatory gene regulation upon respiration cycles in *S. cerevisiae* (Robertson *et al.*, 2008; Robertson and Johnson, 2011). In this study we adapted a destabilized luciferase assay to the simultaneous analysis of gene expression in real time, using small culture aliquots. The aim of the study was to establish a rapid and easy method in budding yeast for the quantitative description of promoter behaviour under many environmental conditions. This method is useful to determine kinetic parameters such as the synthesis rate, duration of gene expression activity, maximal steady-state activity or the lag phase after stimulation and, importantly, the way different

environmental changes modulate those parameters in the living cell. A key point is the assay of gene expression in a dose-sensitive manner with the luciferase system. This reveals quantifiable parameters, such as the expression rate or the sensitivity for a specific gene, which are important to understand the modulation of gene expression by continuously changing stimuli. Here, we determine the dynamic dose–response curves for the nutrient regulated *GAL1* promoter, the stress-regulated *GRE2* promoter and a single STRE sequence with the live-cell luciferase system.

Materials and methods

Plasmid constructions

The firefly luciferase gene containing the CL1 and PEST protein degradation sequences and the *ARE* mRNA degradation sequence (*lucCP*⁺) was amplified from plasmid pGL3(R2.2; Promega) by PCR and recombined into Gateway entry vector pDONR221 (Invitrogen). The *GAL1*–*lucCP*⁺ constructs were obtained by cloning the *lucCP*⁺ gene into the Gateway destination vectors pAG413–*GAL1p*–*ccdB* (*HIS3*, *CEN*) and pAG423–*GAL1p*–*ccdB* (*HIS3*, 2μ) (Alberti *et al.*, 2007). The constitutive *GPD*–*lucCP*⁺ construct was obtained by cloning the *lucCP*⁺ gene into the Gateway destination vector pAG413–*GPD*–*ccdB* (*HIS3*, *CEN*). The entire *GAL1* promoter region was removed from pAG413–*GAL1*–*lucCP*⁺ by *SacI* digestion and religation, yielding the promoter-less luciferase fusion plasmid p413–*lucCP*⁺. In this construct, two unique restriction sites (*SmaI* and *SacI*) right in front of the translation start of the luciferase gene allow promoter regions of interest to be subcloned. In this study we created two new promoter–*lucCP*⁺ fusions: The plasmid p413–*GRE2*–*lucCP*⁺ was obtained by the insertion of the PCR-amplified *GRE2* upstream regulatory region (nucleotides –7 to –940) into p413–*lucCP*⁺. The plasmid p413–*CYC1Δ*–*lucCP*⁺ was obtained by the insertion of the PCR-amplified *CYC1* upstream regulatory region (nucleotides –23 to –247) into p413–*lucCP*⁺. In the latter construct, new unique restriction sites (*MfeI*, *SphI*, *BspEI*) were introduced at the 5' end of the *CYC1* core promoter region to facilitate the insertion of specific binding sites for transcription factors of interest. Plasmid p413–1xSTRE–*lucCP*⁺

was constructed by the insertion of a synthetic oligonucleotide spanning the region –216/–240 of the *HSP12* gene, containing a single STRE (CCCCT) element (Varela *et al.*, 1995), into the *BspEI* site of p413CYC1Δ–lucCP⁺. All plasmids are available upon request.

Yeast strains and growth conditions

Yeast wild-type strain BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; EUROSCARF) was used in this study. For the galactose induction experiments, transformed yeast strains were grown at 28°C overnight in synthetic raffinose (SRaff) medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% raffinose, 50 mM succinic acid, pH 5.5, 0.1 g/l leucine, 0.1 g/l methionine, 0.025 g/l uracil) to optical density (OD)=0.5–0.6 at 600 nm. For the osmotic and oxidative stress experiments, transformed yeast strains were grown at 28°C overnight in synthetic dextrose (SD) medium (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 50 mM succinic acid, pH 5.5, 0.1 g/l leucine, 0.1 g/l methionine, 0.025 g/l uracil) to OD=0.5–0.6 at 600 nm. The luciferase reporter assays were then started by the preincubation with luciferin, as described below.

Real-time measurement of luciferase activity in living yeast cells

The culture volume necessary for the entire luciferase assay was incubated on a roller at 28°C for 90 min (or as indicated) with 0.5 mM luciferin (Sigma) from a 10 mM stock solution in DMSO. The culture was then distributed in 150 μl (or other volumes, as indicated) aliquots in white 96-well plates (Nunc). For the *GAL1* experiments, galactose was added to the indicated final concentrations from appropriate stock solutions in water. For the *GRE2* experiments, NaCl, KCl, sorbitol or menadione were added to the indicated final concentrations from appropriate stock solutions in water (NaCl, KCl, sorbitol) or ethanol (menadione). The light emission was recorded continuously (every 2–4 min) in a GloMax 96 microplate luminometer (Promega) in three biological replicates. Data were processed in Microsoft Excel. For the STRE–lucCP⁺ experiments the data were normalized by dividing the measured light units through the basal reporter activity obtained for the mock-treated cells. The maximal synthesis rate (V_{\max})

for the different luciferase reporters was calculated by linear regression of the appropriate intervals of the induction curves for each experimental condition. The time elapsed to engage in measurable light production was calculated to describe the lag phase between stimulation and active gene expression. These values were obtained after subtraction of basal reporter activity for each galactose concentration, fitting the appropriate intervals of the initial induction curves by linear regression and calculating the time value where each individual curve hits the time axis. For the determination of EC₅₀ values, the maximal luciferase activity (A_{\max}) was plotted against the stimulus concentration on a logarithmic scale. The resulting curves were fitted in the linear range in Microsoft Excel and the stressor concentration calculated, leading to half-maximal luciferase activity under each stress type. The typical error rate between three different biological replicates was 10% in the case of multicopy luciferase reporters and < 5% in the case of centromeric luciferase reporters. Error bars are included in Figure 1B but then omitted in the representation of dose–response curves, in order to make the graphs clearly visible.

Results

Construction and optimization of a live cell luciferase reporter assay

The quantitative comparison of gene expression in the model yeast *S. cerevisiae* should benefit from methods that allow to monitor promoter activities in real time and without the need to disrupt the integrity of the cell. We therefore aimed to establish a luciferase reporter assay that described indirectly the promoter performance in a quantitative manner, based on the light production from living yeast cultures. We chose luciferase as a reporter because its activity is immediately measurable as the light emission from the oxidation of its substrate luciferin and does not require any external excitation, as in the case of fluorescent markers. The ideal reporter assay should fulfil the following requirements: (a) robust detection of gene expression from a single promoter copy; (b) adaptable to small culture aliquots, to allow serial analysis under many experimental conditions; (c) allow the real-time detection of gene expression in a

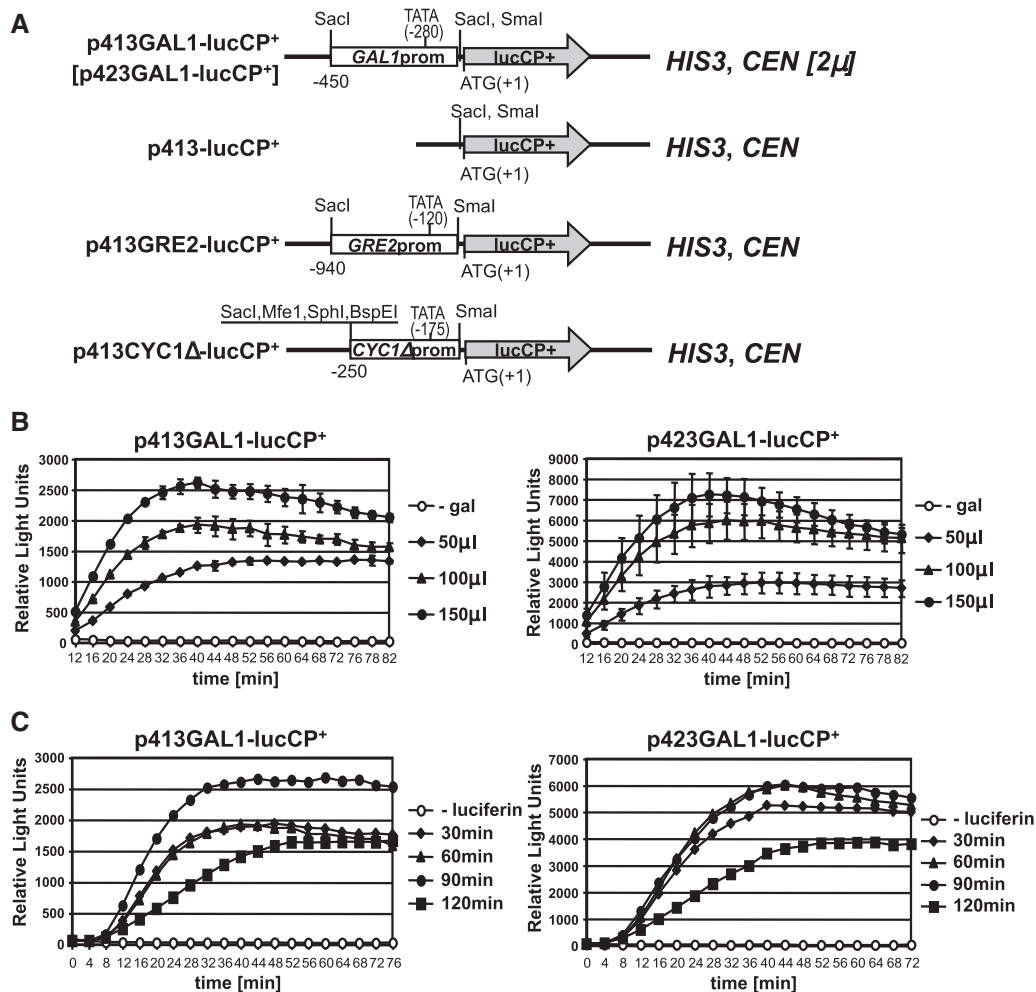


Figure 1. Construction and optimization of a live cell luciferase assay for yeast. (A) Plasmid constructions used in this study. The firefly destabilized luciferase gene containing the PEST and CLI protein degradation motifs and the ARE mRNA degradation motif was placed under transcriptional control of the *GAL1* promoter in the multicopy p423GAL1-lucCP⁺ construct and in the centromeric p413GAL1-lucCP⁺ construct. Removal of the *GAL1* upstream regulatory sequence creates plasmid p413-lucCP⁺ with unique cloning sites *SacI* and *SmaI* in front of lucCP⁺. The *GRE2* promoter region (-7 to -940) was subcloned to drive luciferase expression in construct p413GRE2-lucCP⁺. Plasmid p413CYC1 Δ -lucCP⁺ contains the core *CYC1* promoter region (-23 to -247) without regulatory elements as the lucCP⁺ upstream control region. (B) Comparison of the induction profiles of GAL1-lucCP⁺ centromeric (p413) and multicopy (p423) fusion constructs. Yeast wild-type BY4741 containing the indicated plasmids was grown in raffinose-containing minimal medium to mid-log phase and then incubated with luciferin (0.5 mM) for 90 min. Galactose was added (2% final concentration) at time point 0 and the light emission was measured in culture aliquots of 50, 100 and 150 μ l every 4 min in a microplate luminometer. Error bars represent SD from three biological replicates. (C) Effect of different luciferin preincubation on the induction profiles of centromeric and multicopy GAL1-lucCP⁺ reporter fusions. Growth conditions were the same as in (B). Light emission was measured after the indicated luciferin (0.5 mM) preincubation and galactose induction in 150 μ l culture aliquots

continuous manner, to yield a quantitative description of the promoter behaviour; (d) applicable to transient transcriptional responses.

We first subcloned a destabilized version of the firefly luciferase gene under the control of the *GAL1* promoter, both in centromeric

(p413GAL1-lucCP⁺) and multicopy (p423GAL1-lucCP⁺) plasmids (Figure 1A). The modified luciferase gene contains two protein degradation motifs (*PEST* and *CLI*) and the *ARE* mRNA degradation sequence. Both constructs were used to quantify the light emission from raffinose-grown culture

aliquots (50–150 μ l) after induction of the *GALI* promoter by the addition of 2% galactose in a microplate luminometer. As shown in Figure 1B, the multicopy version of *GAL1*–lucCP⁺ yields high light emission rates up to 7000 light units and a readily detectable expression profile upon galactose induction. The single-copy variant of the same *GALI*–luc fusion showed a two- to three-fold reduced activity as compared to the multicopy set-up. However, culture volumes of 150 μ l were sufficient to record a robust transcriptional response for the centromeric *GALI* fusion. We additionally noticed that the variance between different transformants in the luciferase assay was clearly higher in the multicopy experiment, probably due to varying copy numbers among different transformants. We concluded that single-copy lucCP⁺ fusions can be used as a continuous real-time reporter for gene expression in microwell plate-compatible culture volumes. We next wanted to optimize the luciferin preincubation step before the actual luminescence measurement. We monitored the activity of the *GAL1*–lucCP⁺ fusions after 30–120 min preincubation with 0.5 mM luciferin. As shown in Figure 1C, we observed the best induction profiles after a luciferin treatment of 90 min, while longer preincubations led to a decrease of the detectable luciferase activity. We routinely used centromeric lucCP⁺ fusions after preincubation of 90 min with 0.5 mM luciferin in 150 μ l culture aliquots. It is important to note that under these experimental conditions the luciferin concentration is not limiting. We proved this by the use of a highly active constitutive *GPD*–lucCP⁺ fusion, which produces very high and sustained light emission (~10 000 units) during 3 h (data not shown).

Dose–response of *GALI* promoter monitored with the real-time luciferase assay

The luciferase assay described above offers the opportunity to measure gene expression easily under many different environmental conditions. We next wanted to apply the reporter system to monitor the activity of the *GALI* promoter over a wide range of galactose concentrations in the growth medium. As shown in Figure 2A, we continuously recorded the luciferase activity of a *GAL1*–lucCP⁺ fusion in response to 0.008–2% galactose. We found that luciferase expression from the *GALI* promoter

responds with a delayed and very low activity to galactose concentrations of 0.02% (= 1 mM). With increasing galactose concentrations, we observed an increasingly more rapid response, combined with a faster increment of luciferase activity, up to a galactose concentration of 0.5%. Further increases of the galactose concentration did not further enhance *GAL1*–lucCP⁺ expression, while the time for the reporter to respond to the stimulus decreased slightly. To quantitatively describe the behaviour of the *GALI*–luciferase fusion, we calculated its activity by determining the rate of light increase/min in the linear range of promoter activity. We defined this value as the maximal synthesis rate of the promoter–luc fusion (V_{\max}). This is possible with high accuracy because the *GALI* promoter responds to the stimulus by a linear increase of luciferase activity for all galactose concentrations tested. This results in correlation coefficients > 0.99 for the regression analysis of each of the dose–response curves for *GALI*. Figure 2B shows the correlation between V_{\max} and the galactose concentration. The dynamic range of the *GALI* response can be defined for galactose concentrations in the range 0.02–0.5%. Stimulus concentrations > 0.5% basically provoke identical response curves. Another parameter to describe the *GALI* promoter performance is the time needed to respond to the stimulus. This response time is longer for low galactose concentrations and decreases along with the addition of higher galactose concentrations (Figure 2B).

Dose–response of the stress-inducible *GRE2* promoter: an example of the analysis of a transient transcriptional response with the real-time luciferase assay

We next wanted to test the utility of the luciferase reporter assay for a different type of transcriptional regulation: the rapid and transient response to stress. We therefore fused the osmotic and oxidative stress-activated *GRE2* promoter with the lucCP⁺ reporter. We first applied a broad range of osmotic stress conditions provoked by NaCl and recorded the dose–response curves over 2 h. As depicted in Figure 3A, a measurable luciferase activity expressed from the *GRE2* promoter occurs at NaCl concentrations of approximately 100 mM. Low osmotic stress stimuli cause a very transient response, which is rapidly aborted within a few minutes. In the concentration range 100–400 mM

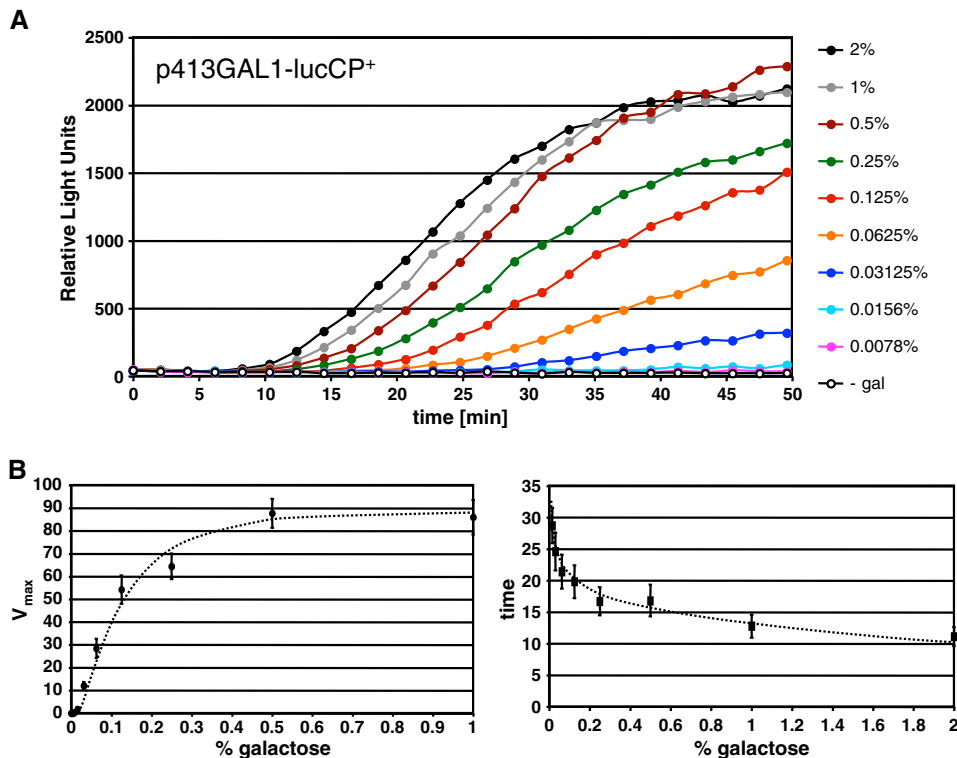


Figure 2. Dose–response behaviour of the *GAL1* promoter assayed with the live-cell luciferase system. (A) The *GAL1* promoter responds with different synthesis rates to increasing galactose stimuli. Yeast wild-type cells (BY4741) expressing luciferase under control of the *GAL1* promoter were grown in raffinose-containing minimal medium to mid-log phase and then incubated with luciferin (0.5 mM) for 90 min. At time point 0 galactose was added to the final concentrations indicated and the light emission was measured every 2 min in triplicate. (B) (left) Maximal synthesis rates (V_{max}) for *GAL1* were determined as the light increment in the linear phase of the induction curve for each galactose treatment tested and plotted against the galactose concentration; (right) time elapsed to engage in measurable light production was calculated as an indicator for the lag phase before active transcription for the different galactose stimuli

NaCl, the *GRE2*–luciferase fusion is always activated at the same time; however, the strength of the osmotic stress dictates the time during which the promoter fusion remains active. As a result, at low NaCl concentrations (100–150 mM), *GRE2* activation is too transient to result in a linear increase in luciferase activity. At salt concentrations > 150 mM the *GRE2* promoter is activated long enough to reach its maximal transcription rate and to produce a linear increase in luciferase activity. This linear range of the *GRE2* promoter response becomes progressively longer with increasing salt concentration. At NaCl concentrations > 400 mM an additional effect can be observed: with increasing stress intensities the expression of *GRE2*–*luc* is progressively delayed, which can be explained by a general inhibitory effect of high salt concentrations on the general transcription machinery. We next used KCl to activate the

GRE2 promoter (Figure 3B) and observed very similar dose–response curves, as compared to NaCl. The main difference was a minor delay of gene expression caused by high KCl concentrations (> 400 mM). This delay was further reduced when sorbitol was used to elicit the transcriptional response from the *GRE2* promoter (Figure 3C). Thus, it is probable that the inhibitory effect on transcription in general was greater in the case of Na^+ stress as compared to K^+ or sorbitol.

We conclude that the luciferase reporter assay is suitable to quantitatively monitor very transient transcriptional responses. The *GRE2*–*luc* reporter is mainly regulated at the level of the time it remains active and most of the salt stress conditions provoke a very high synthesis rate (V_{max} ; Figure 3D). Very high salt concentrations reduced V_{max} , probably due to general interference with

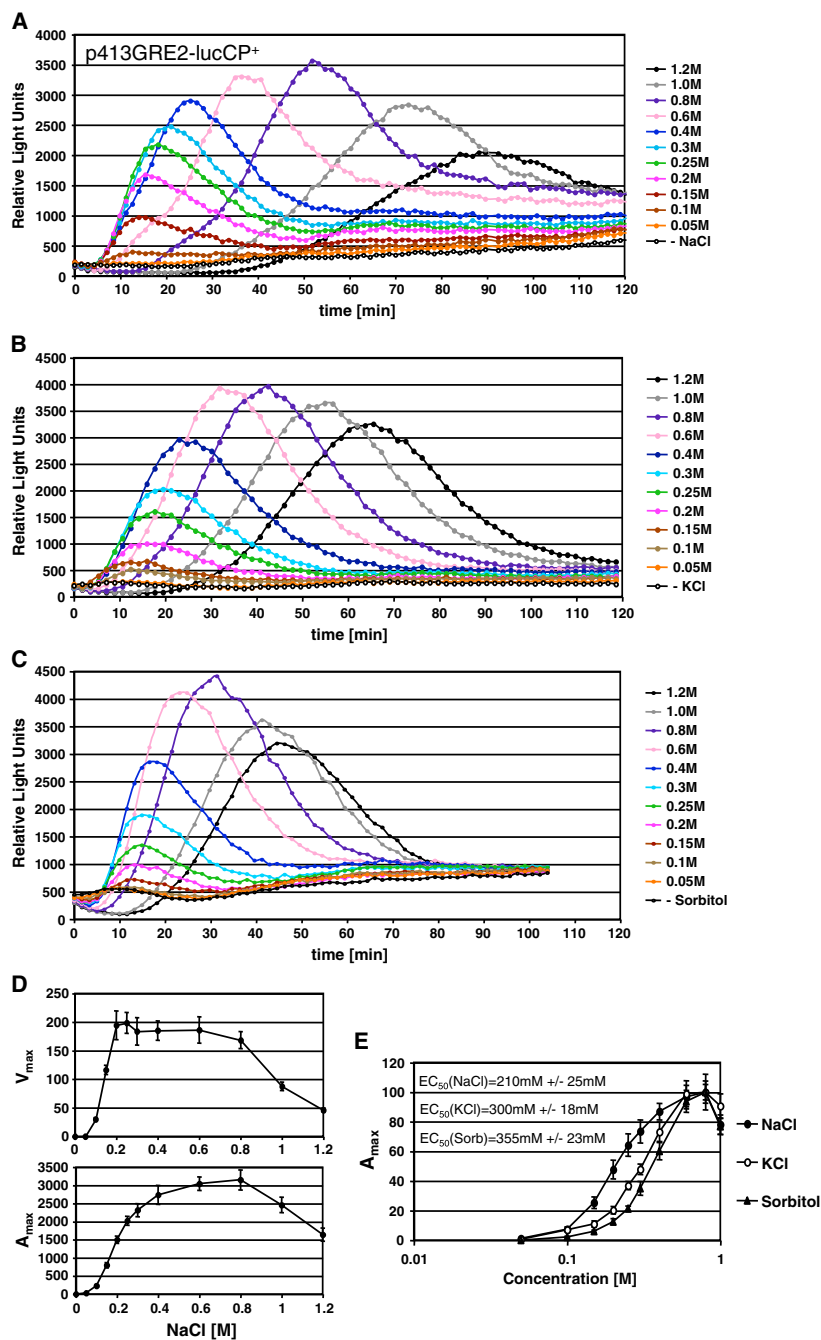


Figure 3. Dose–response behaviour of the GRE2 promoter upon osmotic stress, assayed using the live-cell luciferase system. The GRE2-driven luciferase reporter p413GRE2–lucCP⁺ was used in yeast wild-type cells BY4741. The cells were grown in glucose containing minimal medium to mid-log phase and then preincubated with luciferin (0.5 mM) for 90 min. At time point 0, the indicated osmotic stress treatments were started by addition of NaCl, KCl or sorbitol. The light emission was continuously measured (every 2 min) in 150 μ l culture aliquots. Dose–response curves for: (A) NaCl stress; (B) KCl stress; (C) sorbitol stress. (D) (upper) Maximal synthesis rates (V_{max}) for GRE2 were determined as the light increment in the linear phase of the induction curve for each NaCl treatment applied and plotted against the NaCl concentration; (lower) maximal steady-state activity for GRE2 (= maximal light production) was determined and plotted against the NaCl concentration. (E) Sensitivity of the GRE2 promoter to different osmotic stress conditions; the half-maximal effective concentration (EC_{50}) was calculated for NaCl, KCl and sorbitol stress, as indicated in Materials and methods

transcription. We also observed lower V_{\max} values for very low stress conditions. However, under these conditions the very transient activation of *GRE2* was not linear because of the short time of promoter activity. In conclusion, under increasing salt stress, gene expression controlled by the *GRE2* promoter was basically activated at similar synthesis rates. The progressively longer time in the activated state led to increasing maximal luciferase activities (A_{\max}), which peaked at around 0.8 M NaCl, KCl or sorbitol (Figure 3D, shown for NaCl). The maximal activities obtained for different stressor concentrations can be used to define the sensitivity of the promoter, in analogy to the EC_{50} values commonly used for the ability of drugs to cause a biological reaction. The relation of A_{\max} and the different salt concentrations on a logarithmic scale are depicted in Figure 3E. The derived half-maximal effective concentrations (EC_{50}) for the *GRE2* promoter were approximately 210 mM (NaCl), 300 mM (KCl) and 355 mM (sorbitol).

We finally wanted to test the *GRE2* promoter performance under a different stress condition in the luciferase system. We used a broad range of oxidative stress caused by menadione to elicit transient activation of *GRE2*. As shown in Figure 4A, the promoter started responding upon menadione treatments of approximately 30 μ M. Increasing menadione stress up to 150 μ M provoked progressively longer activation of the *GRE2*-luc fusion, with nearly constant synthesis rates. Menadione doses > 150 μ M seemed to cause a general inhibitory effect on gene expression, coinciding with the observation that those high menadione concentrations did not allow growth of our laboratory yeast strains. In general, we saw a very similar gene expression profile in the case of *GRE2* for oxidative stress as compared to salt stress. Figure 4B summarizes this behaviour, showing that menadione, over a great range of doses, caused increasing maximal activities at largely constant synthesis rates. Taking these factors together, we showed that the live-cell luciferase assay is an easy tool to use to define both the range of stimuli and the dynamic response mode of transiently activated yeast promoters.

Characterization of a single transcription factor binding sequence with the luciferase assay: analysis of the STRE site

Transcriptional responses to changes in the environment often involve many different specific DNA

binding factors, and yeast promoters usually contain several binding motifs which are targeted by the same or different transcriptional activators. We wanted to test whether the luciferase assay described here served to quantitate the transcriptional activation caused by the binding of an activator protein to a single recognition site. We chose to study the stress-response element (STRE) motif, which is recognized by the Msn2 and Msn4 transcription factors to activate gene expression in response to general stress (Marchler *et al.*, 1993; Martinez-Pastor *et al.*, 1996). We therefore inserted a single STRE site into the *CYC1* core promoter fused to lucCP⁺. The dose-response curves of the STRE-lucCP⁺ reporter are illustrated in Figure 5A, B, for salt and oxidative stress. The STRE element conferred readily detectable luciferase expression under both conditions and responded to NaCl concentrations \geq 150 mM and menadione concentrations \geq 40 μ M. The analysis of the maximal activity of the STRE-luc fusion in response to different strengths of saline stress revealed a less robust performance of the STRE site as compared to the natural *GRE2* promoter (Figures 3D, 5C). The EC_{50} value for NaCl was approximately 260 mM for STRE, indicating that gene expression driven by a single STRE site was less sensitive to salt stress as compared to the *GRE2* promoter. Additionally, STRE-lucCP⁺ does not support transcriptional activation at very high NaCl concentrations (\geq 0.8 M). We concluded that the live cell luciferase assay was able to monitor single transcription factor effects on gene expression. This application could be especially useful to quantitatively describe the impact of different transcriptional activators to the overall expression output.

Discussion

Here we report the use of a real-time assay to measure the activation profiles of yeast promoters in the living cell, based on fusions with destabilized firefly luciferase. A major advantage of this indirect transcription assay is that it allows continuous response profiles to be obtained for a given promoter-luciferase fusion under many different experimental conditions in parallel. This is of great help in defining various quantitative parameters of gene expression sustained by any yeast promoter

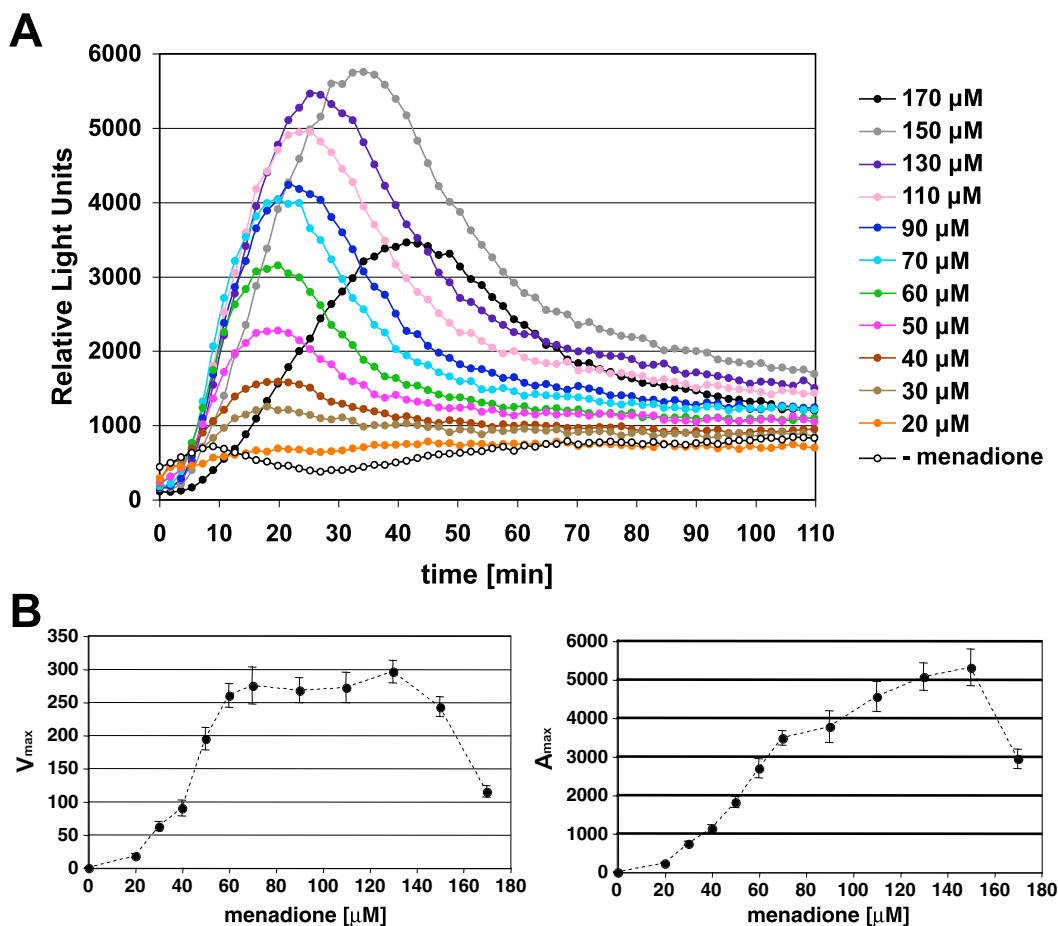


Figure 4. Dose–response behaviour of the *GRE2* promoter upon oxidative stress, assayed using the live-cell luciferase system. (A) The *GRE2*-driven luciferase reporter p413*GRE2*–*lucCP*⁺ was used in yeast wild-type cells BY4741. The cells were grown in glucose-containing minimal medium to mid-log phase and then preincubated with luciferin (0.5 mM) for 90 min. At time point 0 the indicated concentrations of menadione were added. The light emission was continuously measured (every 2 min) in 150 μl culture aliquots. (B) Maximal synthesis rates and steady-state activities were calculated for *GRE2* upon oxidative stress and plotted against the menadione concentration

and should be an interesting tool for functional comparison between different groups of promoters. It is important to note that the luciferase assay cannot distinguish between transcriptional events, mRNA stability and translation. Therefore, the main regulatory features identified from luciferase reporter experiments should be addressed by more specific assays, e.g. ChIP, to corroborate the importance of transcriptional regulation. However, the studies presented here for the *GAL1* and *GRE2* promoters most likely represent mainly transcriptional events, because both genes were actively repressed under normal growth conditions. Therefore, the stimulated expression of luciferase upon the various stresses and galactose concentrations is

a direct consequence of transcriptional activation. Thus, interesting insights about promoter performance upon changing environmental conditions can be derived by the indirect luciferase assay. Indeed, the *GAL1* and *GRE2* fusions with luciferase faithfully reproduced published Northern analyses. Specifically, *GAL1* expression is stimulated by 2% galactose, reaching its maximum around 40 min, which is maintained during growth in galactose (Kundu and Peterson, 2010) and *GRE2* expression is very strongly and transiently activated upon NaCl stress and peaks at 10–30 min upon 0.4 M NaCl and 45–60 min upon 0.7 M NaCl (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2001). This promoter behaviour is very well reproduced by the luciferase assay (Figures 2A, 3A).

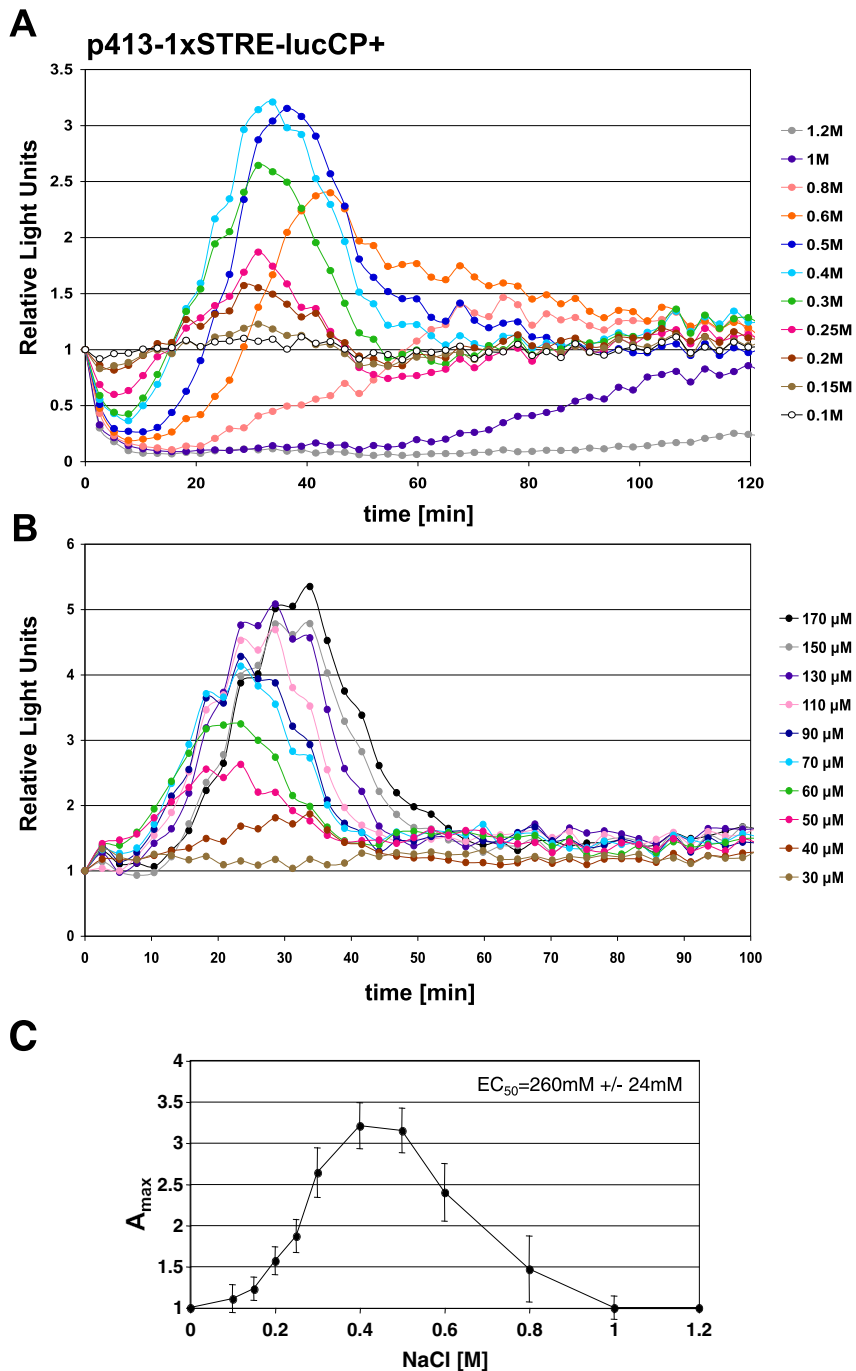


Figure 5. Dose–response behaviour of a single STRE element upon salt and oxidative stress, assayed using the live-cell luciferase system. The luciferase reporter p413-1xSTRE-lucCP⁺, which contains a single insertion of the STRE sequence in the *CYC1* core promoter was used in yeast wild-type cells BY4741. Experimental conditions were the same as in Figures 3 and 4. The data were normalized for the background activity of the reporter without stress. Dose–response curves for (A) NaCl; (B) menadione. (C) The maximal steady-state activity for STRE-lucCP⁺ was determined, plotted against the NaCl concentration and the half maximal effective concentration (EC_{50}) calculated

Given the high sensitivity of light detection from the luciferase system, one immediately accessible parameter for a specific promoter is the range of stimuli that activates gene expression. We determined here the minimal galactose concentration which was able to activate *GALI* as approximately 0.02%, and that a transcriptional response was triggered at *GRE2* by salt concentrations > 100 mM or menadione concentrations of about 30 μ M. It is important to note that these threshold levels depend on the sensitivity of light detection. Activation of the *GRE2* or *GALI* promoters can occur at even lower stimulation levels but might not be detectable by the luciferase assay. However, threshold levels determined by this assay will serve to quantitatively compare different classes of yeast promoters. In general, the live-cell luciferase assay provides the possibility to test the performance of a promoter of interest in response to a multitude of different environmental conditions in a single experiment.

The exact determination of the maximal level of gene expression for different stressor concentrations allows insights to be gained into the sensitivity of the promoter in the form of the EC_{50} value. In the case of the *GRE2* promoter, we show here that its activation was more sensitive to NaCl as compared to KCl or sorbitol. Again, the EC_{50} values calculated here do not imply only transcriptional events but the whole gene expression process, including mRNA and protein stability. Nevertheless, a sensitivity can be experimentally defined for different promoters, which can help us to understand more complex regulatory systems, such as gene expression programmes, upon different stress stimuli. One example is the transcriptional osmopressure response of yeast, which involves several specific transcription factors that presumably shape specific transcriptional outputs at different stress-responsive promoters (Martinez-Montanes *et al.*, 2010). Genomic binding surveys predict, in this case, that the more immediately targeted osmopressure genes would have lower stress thresholds or sensitivities as compared to more indirectly targeted genes (Ni *et al.*, 2009). The reporter assay described here offers the possibility to test these hypotheses by determining the sensitivity of groups of promoters targeted by different transcription factors upon osmopressure and many other environmental challenges.

Another important parameter to characterize promoters is to define their synthesis rates and

the mode in which environmental conditions modulate the transcription rate. If we assume that in the initial phase of the activation of promoter–lucCP⁺ fusions the light increment is directly proportional to the transcription rate and is only marginally influenced by differential mRNA stability or translation efficiency, then the increase in light units over time describes the mRNA production per minute. In this way we have found that the *GALI* promoter responds to increasing galactose concentrations with increasing activity. This dynamic behaviour is observed in a specific range of galactose stimuli (0.02–0.5%). Beyond these concentrations, the *GALI* promoter reaches saturation with respect to its synthesis rate, which cannot be further increased. We speculate that the range of galactose concentrations which provoke a dose-sensitive promoter activity for *GALI* might reflect an adaptation to the sugar concentrations encountered by yeast in nature. Transcription specific assays have to be applied to reveal the mechanisms of this dynamic response of the *GALI* promoter.

Another parameter which describes promoter performance is the time that elapses between the stimulus and productive transcription. The induction mechanisms for yeast genes are not uniform and involve the association of specific transcription factors, co-activators and signalling molecules with the promoter, extensive chromatin modifications, nucleosome remodelling and eviction, and recruitment of RNA polymerase II. This, together with the time the respective signalling paths need to trigger activation at the chromatin level, will dictate the response time for different promoters. The luciferase assay can estimate this response time indirectly, based on the time needed to yield a measurable light emission. This parameter might be helpful to study the dynamics of signal perception and transduction to efficient gene expression. Expectedly, we estimated here the minimal response time for the stress-regulated *GRE2* promoter as much shorter (3–4 min) than the nutrient-regulated *GALI* promoter (8–10 min). Unexpectedly, we found that *GALI* stimulation occurred with a progressively longer lag phase upon lower galactose concentrations. We speculate that low signal strengths provoke inefficient chromatin remodelling and a delay in the recruitment of RNAPII to the *GALI* locus. It will be important, therefore, to measure histone remodelling and eviction and recruitment of RNA polymerase II at *GALI* in response to the varying galactose concentrations.

The luciferase assay applied here is a valuable tool to dissect very transient transcriptional responses, typically observed upon stress. The analysis of the GRE2–lucCP⁺ reporter gives an example of such a response. The *GRE2* promoter is activated upon osmotic stress by the Sko1 transcription factor and upon oxidative stress by the Yap1 transcription factor (Proft *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2001). As expected, *GRE2* is activated very rapidly at high synthesis rates (V_{\max}). Interestingly, we detected apparently lower synthesis rates at threshold stress levels (100–150 mM NaCl or 30–40 μ M menadione). A very recent report shows that threshold stress levels lead to a bimodal gene activation with different populations of responding and non-responding individual cells, which is imposed by chromatin structure (Pelet *et al.*, 2011). This would lead to intermediate synthesis rates in a yeast culture at the lower end of the dose–response for a stress promoter such as *GRE2*. At higher stress doses the most regulated parameter of *GRE2* is the time it remains active at maximal synthesis rates. It has been shown that activation and nuclear accumulation of the osmostress responsive Hog1 MAPK, which directly activates Sko1, increases linearly with the stress dose (Pelet *et al.*, 2011). Therefore, it is most likely the time Hog1 resides in the nucleus that defines the time of *GRE2* promoter activity upon osmostress. In the case of the oxidative response of *GRE2*, we speculate that it is the time that Yap1 remains bound at the *GRE2* control region which increases upon harsher oxidant treatments, because Yap1 is mainly regulated at the level of its nuclear accumulation upon oxidation (Kuge *et al.*, 1997). Taking these factors together, for stress-activated transcription at *GRE2*, its rapid switch to maximal synthesis rate is equally important as its timely shut-down, strictly dependent of the stress dose. This behaviour leads to a gradually increasing maximal steady-state activity, which is only reduced at high stress doses, such as > 0.4 M NaCl or > 150 μ M menadione. These are stress treatments that probably reduce the efficiency of transcription in general. It has been shown that salt stress provokes the dissociation of DNA binding proteins *in vivo* and that this can affect the timing of transcriptional activation (Proft and Struhl, 2004).

The adaptation of gene expression is a fine-tuned process and involves many regulatory outputs at different promoters. The luciferase assay applied here helps to capture gene expression dynamics in the living cell and to quantitatively compare the

performance of different promoters. To further unravel the contribution of single transcription factors to the expression profile, we created a core promoter–lucCP⁺ fusion to allow for the introduction of single or multiple binding sites for transcription factors of interest in this system (Figure 1A; CYC1 Δ –lucCP⁺). The stress-activated STRE site was experimentally characterized here. As expected, we found much more reduced induction profiles for this minimal construct as compared to the natural *GRE2* promoter. Additionally, the single STRE element was less sensitive to salt stress, as judged by the higher EC₅₀ value for NaCl, and showed a less robust activation profile under a range of different salt stress conditions. These data might indicate that individual *cis*-elements partially contribute to the full sensitivity and maximal activity of a yeast promoter. Therefore, it will be important to quantify the performance of other stress-activated promoter motifs individually and in combination with each other, which can be easily done by repeated insertions in the CYC1 Δ –lucCP⁺ construct. The time-resolved luciferase assay presented here should provide a powerful approach to quantitatively describe such synthetic promoters. Altogether, we can expect interesting insights into the dynamic modulation of gene expression by live-cell methodology, as described here.

Acknowledgements

We thank Takayoshi Kuno for the kind gift of plasmid pGL3, containing the destabilized firefly luciferase gene. This study was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant Nos BFU2008-00271 and BFU2011-23326). A.R. is the recipient of an FPI predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- Alberti S, Gitler AD, Lindquist S. 2007. A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **24**: 913–919.
- Cormack B. 1998. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Curr Opin Microbiol* **1**: 406–410.
- Deng L, Sugiura R, Takeuchi M, *et al.* 2006. Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 4790–4800.
- Gasch AP. 2007. Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* **24**: 961–976.

- Hahn S, Young ET. 2011. Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* **189**: 705–736.
- Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, *et al.* 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99–104.
- Kuge S, Jones N, Nomoto A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**: 1710–1720.
- Kundu S, Peterson CL. 2010. Dominant role for signal transduction in the transcriptional memory of yeast GAL genes. *Mol Cell Biol* **30**: 2330–2340.
- Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* **12**: 1997–2003.
- Martínez-Montañes F, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2010. Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmostress in yeast. *OMICS* **14**: 619–627.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, *et al.* 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.
- Mateus C, Avery SV. 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.
- Ni L, Bruce C, Hart C, *et al.* 2009. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* **23**: 1351–1363.
- Pelet S, Rudolf F, Nadal-Ribelles M, *et al.* 2011. Transient activation of the HOG MAPK pathway regulates bimodal gene expression. *Science* **332**: 732–735.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, *et al.* 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123–1133.
- Proft M, Struhl K. 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351–361.
- Rep M, Proft M, Remize F, *et al.* 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol Microbiol* **40**: 1067–1083.
- Robertson JB, Johnson CH. 2011. Luminescence as a continuous real-time reporter of promoter activity in yeast undergoing respiratory oscillations or cell division rhythms. *Methods Mol Biol* **734**: 63–79.
- Robertson JB, Stowers CC, Boczek E, Johnson CH. 2008. Real-time luminescence monitoring of cell-cycle and respiratory oscillations in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17988–17993.
- Varela JC, Praekelt UM, Meacock PA, *et al.* 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol* **15**: 6232–6245.
- Yosef N, Regev A. 2011. Impulse control: temporal dynamics in gene transcription. *Cell* **144**: 886–896.

Deciphering Dynamic Dose Responses of Natural Promoters and Single *cis* Elements upon Osmotic and Oxidative Stress in Yeast

Laura Dolz-Edo, Alessandro Rienzo, Daniel Poveda-Huertes, Amparo Pascual-Ahuir, Markus Proft

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain

Fine-tuned activation of gene expression in response to stress is the result of dynamic interactions of transcription factors with specific promoter binding sites. In the study described here we used a time-resolved luciferase reporter assay in living *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells to gain insights into how osmotic and oxidative stress signals modulate gene expression in a dose-sensitive manner. Specifically, the dose-response behavior of four different natural promoters (*GRE2*, *CTT1*, *SOD2*, and *CCP1*) reveals differences in their sensitivity and dynamics in response to different salt and oxidative stimuli. Characteristic dose-response profiles were also obtained for artificial promoters driven by only one type of stress-regulated consensus element, such as the cyclic AMP-responsive element, stress response element, or AP-1 site. Oxidative and osmotic stress signals activate these elements separately and with different sensitivities through different signaling molecules. Combination of stress-activated *cis* elements does not, in general, enhance the absolute expression levels; however, specific combinations can increase the inducibility of the promoter in response to different stress doses. Finally, we show that the stress tolerance of the cell critically modulates the dynamics of its transcriptional response in the case of oxidative stress.

Environmental stress causes rapid changes in the gene expression program of a cell in order for it to adapt and survive. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has served as a powerful model to describe transcriptional adaptation both at the genomic scale and at the gene-specific scale. Upon most stresses, activated expression of defense genes occurs rapidly and transiently. Genomic profiling has revealed that hundreds of genes are responsive to osmotic and oxidative stress in yeast (1–5). Some of the upregulated gene functions, the so-called general stress response genes, are not specific for the particular stress, while other defense genes are exclusively activated by a specific stress (1, 6). The general stress response is executed by two homologous zinc finger activators, Msn2 and Msn4, which bind to a conserved stress response element (STRE), 5'-CCCCT-3', located in the promoters of the responsive genes (7, 8). Under normal growth conditions, both activators are largely sequestered in the cytosol with the help of the TOR signaling pathway (9). Upon stress, Msn2 and Msn4 are hyperphosphorylated and relocate to the nucleus in a process controlled by the cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase A (10).

Osmotic stress is specifically sensed by the high-osmolarity glycerol (HOG) mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathway (11). Once activated by phosphorylation and transiently translocated to the nucleus, its terminal MAP kinase, Hog1, executes the transcriptional program specific for osmotic stress adaptation (12, 13). Hog1 activates transcription via several specific transcription factors (TFs; Sko1, Hot1, Smp1, Msn2, and Rtg3) which are directly contacted and phosphorylated by the kinase (14–20). The detailed study of Hot1- and Sko1-modulated transcription revealed that Hog1 plays multiple functions in the stimulation of gene expression. The MAP kinase can directly recruit RNA polymerase II in the case of Hot1-regulated genes (14). Furthermore, Hog1 is directly or indirectly involved in the recruitment of general coactivator complexes, such as the Rpd3 histone deacetylase, the SAGA coactivator, the SWI/SNF chromatin remodeling complex, and Mediator (21–23). The differential recruitment of transcriptional coactivator complexes might provide a mechanism to shape gene expression in a gene- and/or stress-

dependent manner. Indeed, it was reported that upon severe osmotic shock the SAGA function is more important than the Mediator function (23). The Sko1 repressor/activator, together with Hot1, is one of the principle transcription factors involved in the yeast osmotic stress response (24, 25). The Sko1 basic leucine zipper protein recognizes cAMP-responsive element (CRE) sequences [5'-T(G/T)ACGT(A/C)A-3'] in stress-regulated promoters (26, 27). Binding of Sko1 to CRE sites under normal growth conditions does not confer activation because of the presence of the Ssn6-Tup1 corepressor complex (17, 28). The Sko1 activator function is rapidly unmasked upon osmotic stress by recruitment of activated Hog1, which leads to subsequent stimulation of gene expression (22, 28).

Oxidative stress also triggers a major transcriptional response in yeast. Two main transcriptional activators, Yap1 and Skn7, have been implicated in this adaptive response (29–31). Although many oxidative stress-responsive defense genes are regulated by both factors, it seems that Yap1 and Skn7 respond to different oxidative stimuli (32, 33). The Yap1 basic leucine zipper protein preferentially binds to AP-1 sequences (5'-TTACTAA-3') in promoters of antioxidant genes (34). Yap1 transcriptional activity is modulated by its regulated import into the nucleus upon oxidative stress (35, 36). Hydrogen peroxide stress provokes specific intramolecular disulfide bonds in the Yap1 protein, which allow its nuclear accumulation and transcriptional activation (35, 37, 38).

Osmotic and oxidative stresses are physiologically connected. Osmotic stress causes overproduction of reactive oxygen species

Received 1 March 2013 Returned for modification 12 March 2013

Accepted 18 March 2013

Published ahead of print 25 March 2013

Address correspondence to Markus Proft, mproft@ibmcp.upv.es, or Amparo Pascual-Ahuir, apascual@ibmcp.upv.es.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/MCB.00240-13

(ROS), many antioxidant functions are highly inducible upon osmotic stress, and external addition of antioxidants rescues the sensitivity of yeast cells to osmotic stress (3, 4, 39). Additionally, an induction of the osmostress-sensing HOG pathway by some oxidative treatments has been reported (40). Therefore, it is important to understand to what level signaling pathways are shared upon both types of stresses.

The application of global location analysis has demonstrated that upon osmostress the transcriptional program is executed by the dynamic and complex binding of many transcription factors to their target promoters in the genome (2, 24). Considerable redundancy has been revealed; thus, in many cases of stress-activated defense genes, the binding of more than one transcriptional activator can be observed. Also, it seems that the transcription factors responding to osmostress regulate each other's expression in a hierarchical manner, which could be an additional way to create dynamic responses at different sets of target genes (2). Therefore, it is important to understand how fine-tuned gene expression is created in response to different stress stimuli, which makes it necessary to quantitatively compare the sensitivities of differentially regulated genes. This can be achieved by monitoring over an exhaustive range of stress conditions the gene expression output, which describes the dose-response behavior of a regulatory system (41). Here we apply such methods to different stress-regulated elements and investigate how gene expression is activated upon both osmotic and oxidative stimuli upon increasing stress doses in a time-resolved fashion in living yeast. We record the dose-response behavior of complete promoters and isolated upstream activating sequences. By covering the whole range of activating stress doses, we can define and compare the sensitivity, inducibility, and maximal activity for different regulatory elements. We show that natural stress-responsive promoters have different sensitivities to osmotic and oxidative stress, which are recapitulated by CRE-, STRE-, and AP-1-modulated gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and growth conditions. The *S. cerevisiae* strains used in this study were wild-type strain BY4741 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) and strains with the mutant alleles *sko1::KanMX4*, *hog1::KanMX4*, *ctt1::KanMX4*, *sod2::KanMX4*, *skn7::KanMX4*, and *yap1::KanMX4* (42, 43). A mutant with the double deletion *msn2::NAT msn4::KAN* in the BY4741 strain background was a gift from E. de Nadal (Barcelona, Spain). Yeast strains containing the indicated luciferase fusion genes were grown at 28°C in synthetic dextrose (SD) medium lacking histidine (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 50 mM succinic acid, pH 5.5, 0.1 g/liter leucine, 0.1 g/liter methionine, 0.025 g/liter uracil). For the luciferase assays, the cells were grown overnight to exponential growth phase and then preincubated with luciferin, as indicated below.

Plasmid constructions. Single-copy reporter fusions with destabilized luciferase (lucCP⁺) were constructed as described in reference 41. The upstream regulatory sequences of *GRE2* (nucleotides -940 to -7), *CTT1* (nucleotides -983 to -10), *SOD2* (nucleotides -977 to -16), and *CCP1* (nucleotides -976 to -5) were amplified by PCR and inserted (SacI/SmaI) into the lucCP⁺ expression vector p413-lucCP+ (41). For the assay of specific *cis*-regulatory elements, synthetic oligonucleotides containing three repetitions of STRE, CRE, or AP-1 sequences spaced by 8 to 9 nucleotides were inserted into the BspEI site of plasmid p413CYC1 Δ -lucCP⁺ (41). The sequences used were the following (the consensus sequence for each TF binding site is underlined): for STRE, 5'-CCGGCG ATATCAGCCCCTGGAAAAAGCCCCTGCGCAAAGCCCCT-3'; for CRE, 5'-CCGGCGATATCATTACGTAATAGAATACATTACGTAATC

GCGATCATTACGTAAT-3'; and for the AP-1 element, 5'-CCGGCATC GATCTTACTTAAAGCGCGAAATTAGTAACCGGCTAATTACTAAGT-3'. The correct single insertion of each element was confirmed by DNA sequencing. Combinations of regulatory elements were created by additional insertion of the oligonucleotides into the single restored BspEI site after the initial insertion.

Real-time measurement of luciferase activity. Aliquots of exponentially growing yeast cells expressing the destabilized luciferase gene under the control of the indicated natural and synthetic promoters were incubated at 28°C for 90 min with 0.5 mM luciferin (Sigma). The cultures were then transferred in 100- μ l aliquots in white 96-well plates (Nunc). NaCl, hydrogen peroxide, or menadione was added from appropriate stock solutions. The light emission was then recorded continuously in a GloMax microplate luminometer (Promega) in three biological replicates. Data were processed in Microsoft Excel software. For representations of the light units produced by each reporter fusion during stress induction, the raw data were normalized for the number of cells in each assay. For the determination of the half-maximal (50%) effective concentration (EC₅₀), the maximal luciferase activity for each stress dose (A_{max}) was plotted against the stimulus concentration on a logarithmic scale. The curves were fitted in the linear range using Microsoft Excel, and then the stressor concentration which caused the half-maximal luciferase activity for each type of stress was calculated.

Quantitative analysis of yeast growth. For sensitivity assays in continuous growth, fresh overnight precultures of the indicated strains in SD medium were diluted in triplicate in multiwell plates to the same initial optical density. Growth was then continuously monitored in a Bioscreen C system (Thermo) for 72 h in SD medium without or with 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM, or 2 mM hydrogen peroxide. The growth curves were processed in Microsoft Excel, and the half-maximal cell density was calculated for each strain. The time to reach half-maximal cell density (t_{50}) under each stress condition was compared to the t_{50} under nonstress conditions. This ratio was taken as an indicator of the relative growth efficiency.

RESULTS

The dose-response behavior of natural promoters upon osmotic and oxidative stress. Osmotic and oxidative stresses are harmful conditions for yeast cells and trigger transcriptional programs which include the activation of hundreds of defense genes. We compared the activation patterns of several stress-responsive promoters in yeast in a time-resolved fashion with the help of a destabilized luciferase assay (41). This assay makes use of a very short-lived version of luciferase which is rapidly degraded with the help of specific protein and mRNA degradation motifs. As the assay can be performed in small aliquots of living yeast cultures, the method is suitable to quantitate transient gene expression simultaneously under many different environmental conditions and continuously in real time. We aimed at defining common and distinct features of the dynamic and dose-dependent regulation of different yeast promoters. We chose to study the upstream control regions of the *GRE2*, *CTT1*, *SOD2*, and *CCP1* genes, all of which show strong inducibility upon osmotic and/or oxidative stress (7, 44–46). We focused on three different stress treatments: oxidative stress caused by hydrogen peroxide or menadione and osmotic stress caused by NaCl.

In order to obtain the entire dose-response behavior for all four promoters, we applied wide ranges of stress doses to single-copy luciferase reporters in living yeast cultures. The results are depicted in Fig. 1. We found that hydrogen peroxide caused a concentration-dependent increase of gene expression over a concentration range from 25 μ M to approximately 500 μ M, as indicated by the different maximal luciferase activities caused by each

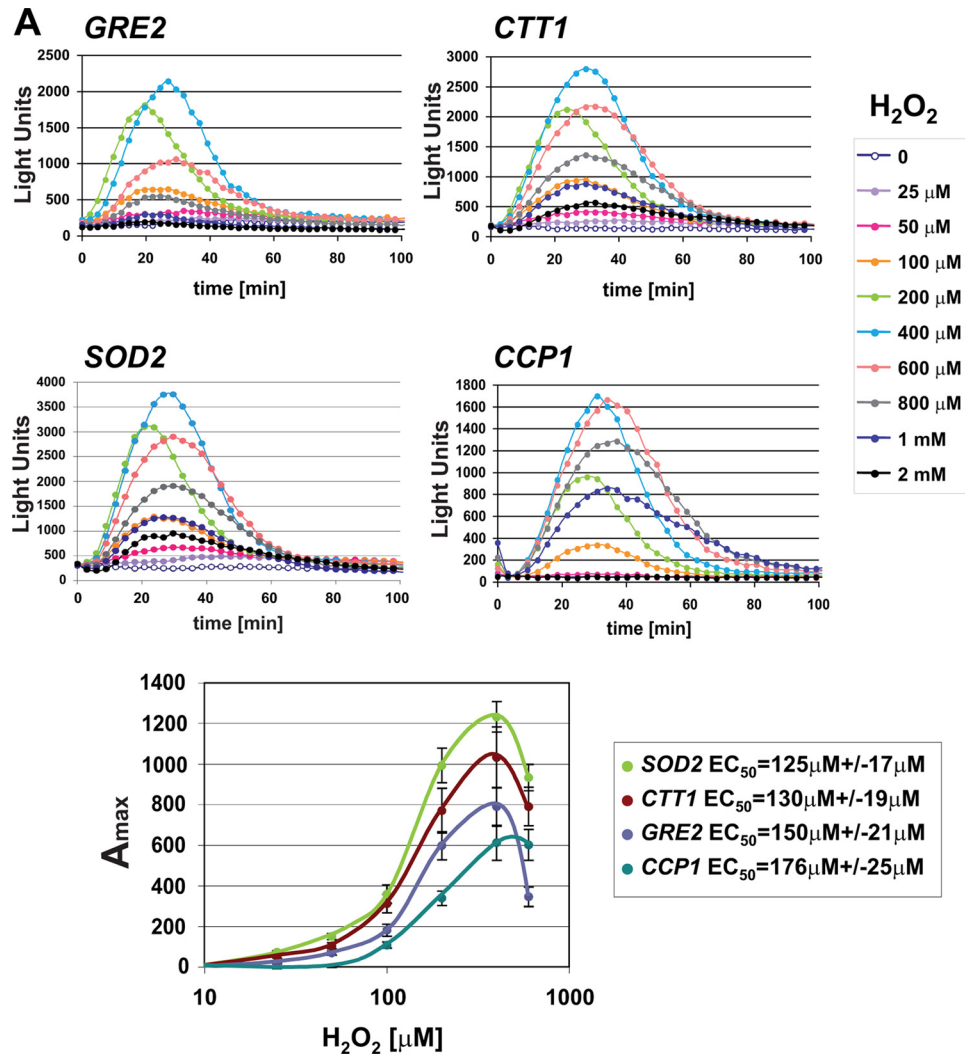


FIG 1 Comparison of the dose-response behavior of four yeast promoters upon oxidative and osmotic stress. The upstream control regions of the *GRE2*, *CTT1*, *SOD2*, and *CCP1* genes were analyzed by reporter fusions with destabilized luciferase in yeast wild-type strain BY4741. Liquid culture aliquots in glucose-containing minimal medium were preincubated with luciferin. At time zero, the indicated stress treatments were started and light emission was continuously recorded for the indicated times. The dose-response curves obtained for the various promoter-luciferase fusions are depicted in the upper panels for hydrogen peroxide (A), menadione (B), and NaCl (C) stress. The maximal steady-state activity was calculated for each promoter fusion for each stress dose, normalized for the cell number in the assay, and plotted against the stress dose (bottom). The dose-response curves were obtained for three independent culture aliquots and had an error of <15%. The EC_{50} was calculated for each stress type and promoter, as indicated in Materials and Methods.

dose within this range (Fig. 1A). This defines the dynamic range of H_2O_2 stress for all four promoter-luciferase fusions, for each of which it was similar but not identical. The *CTT1*- and *SOD2*-luciferase fusions appeared to respond to low hydrogen peroxide concentrations in a more sensitive manner than the *GRE2*- or *CCP1*-luciferase fusion. Accordingly, the H_2O_2 concentration required to stimulate gene expression to half-maximal activity (EC_{50}) is lower in the case of *CTT1* and *SOD2* than in the case of *GRE2* and *CCP1*.

We next applied menadione as an alternative inducer of intracellular oxidation and quantified the gene expression changes that it caused at the same promoters. A dose-sensitive response was observed at the four stress-regulated promoters at menadione concentrations ranging from 20 μM to approximately 120 μM (Fig. 1B). Menadione appeared to be a significantly less efficient inducer of gene expression than hydrogen peroxide at the four

promoters studied here and caused only roughly one-third of the induction observed for H_2O_2 . Similar to what we observed for hydrogen peroxide, the *CTT1*- and *SOD2*-driven luciferase reporters responded more efficiently to low menadione concentrations and, hence, were characterized by small EC_{50} s. Gene expression driven by the *GRE2* promoter was less sensitive to low menadione concentrations and needed higher drug concentrations to reach saturation. In the case of the *CCP1* gene, we observed a dose-response behavior for low menadione stimuli similar to that of *GRE2*, which was, however, more rapidly saturated at higher menadione concentrations, resulting in a low EC_{50} .

We finally quantified the dose responses of the four stress genes to osmotic stress provoked by NaCl (Fig. 1C). With the exception of the *CCP1*-luciferase fusion, which was not activated by any NaCl concentration, we observed dose-sensitive luciferase activities at salt concentrations ranging from 100 mM to approximately

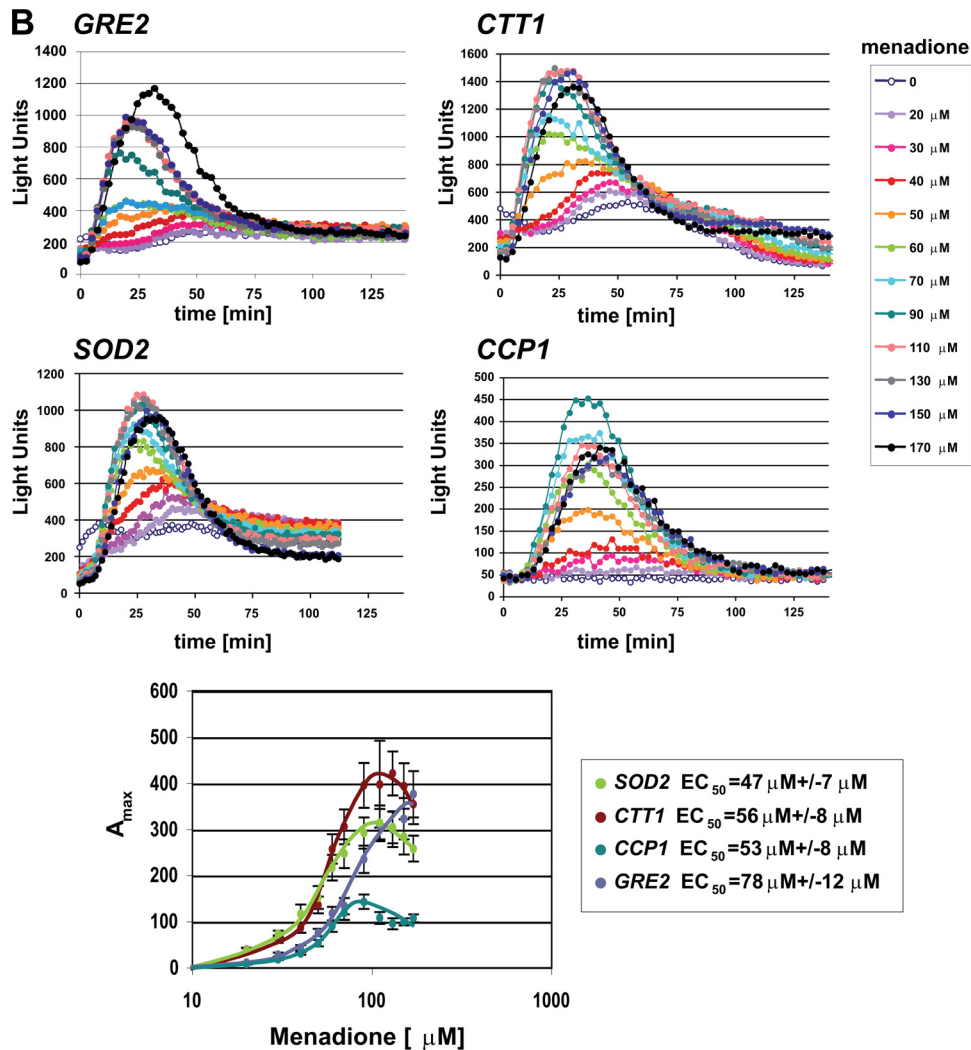


FIG 1 continued

500 mM for *CTT1* and *SOD2* and up to 800 mM for *GRE2*. The sensitivity to low-NaCl stimuli was almost identical for the *GRE2*-, *CTT1*-, and *SOD2*-driven reporters; however, *GRE2* showed a prolonged dynamic range with higher salt concentrations. This was reflected by the apparently lower saturation concentrations of NaCl for *CTT1* and *SOD2* than *GRE2*.

Taken together, our real-time measurements reveal differences in the dose-sensitive modulation of gene expression conferred by different yeast promoters. *GRE2*, *CTT1*, and *SOD2* are activated by both oxidative and osmotic stresses; however, their sensitivities differ for different stress treatments. The *CTT1* and *SOD2* promoters seem to confer more sensitive responses to hydrogen peroxide or menadione stress, while the *GRE2* promoter confers a more dynamic dose response upon salt stress. These differences can be visualized when we compare the maximal activity for the different promoters upon each stress type (Fig. 2). *GRE2* is preferentially activated by salt stress over oxidative stress, while *CTT1* and *SOD2* are equally activated by both stimuli. *CCP1*, on the other hand, is specifically activated by oxidative stimuli over salt stress. We next wanted to know whether the different dose responses of natural promoters could be the result of the different

sensitivities of single *cis* elements present in stress-responsive control regions.

Analysis of the dose response of single *cis* elements (CRE, STRE, and AP-1 sites) upon osmotic and oxidative stress. Several specific transcription factors (TFs) are known to trigger gene expression changes upon osmotic and oxidative stress. We focused on three different classes of well-documented TF-DNA interactions relevant for stress responses: the cAMP-responsive element (CRE) recognized by Sko1 (17, 47), the general stress-responsive element (STRE) bound by the Msn2 and Msn4 activators (7), and the AP-1 element targeted by the Yap family of activators (34). We aimed at identifying the dose-sensitive regulation of gene expression conferred by each type of *cis* element upon stress. Triple repetitions of each element were placed upstream of a nonregulated core promoter to drive the expression of destabilized luciferase and to allow the real-time measurement of the reporter activity. We quantified the luciferase reporter activity driven by the artificial promoters under the exhaustive stress conditions (H_2O_2 , menadione, NaCl) established as described above to obtain the dose response conferred by each element upon the various stress stimuli (Fig. 3A). In general, we noticed that the insertion of just

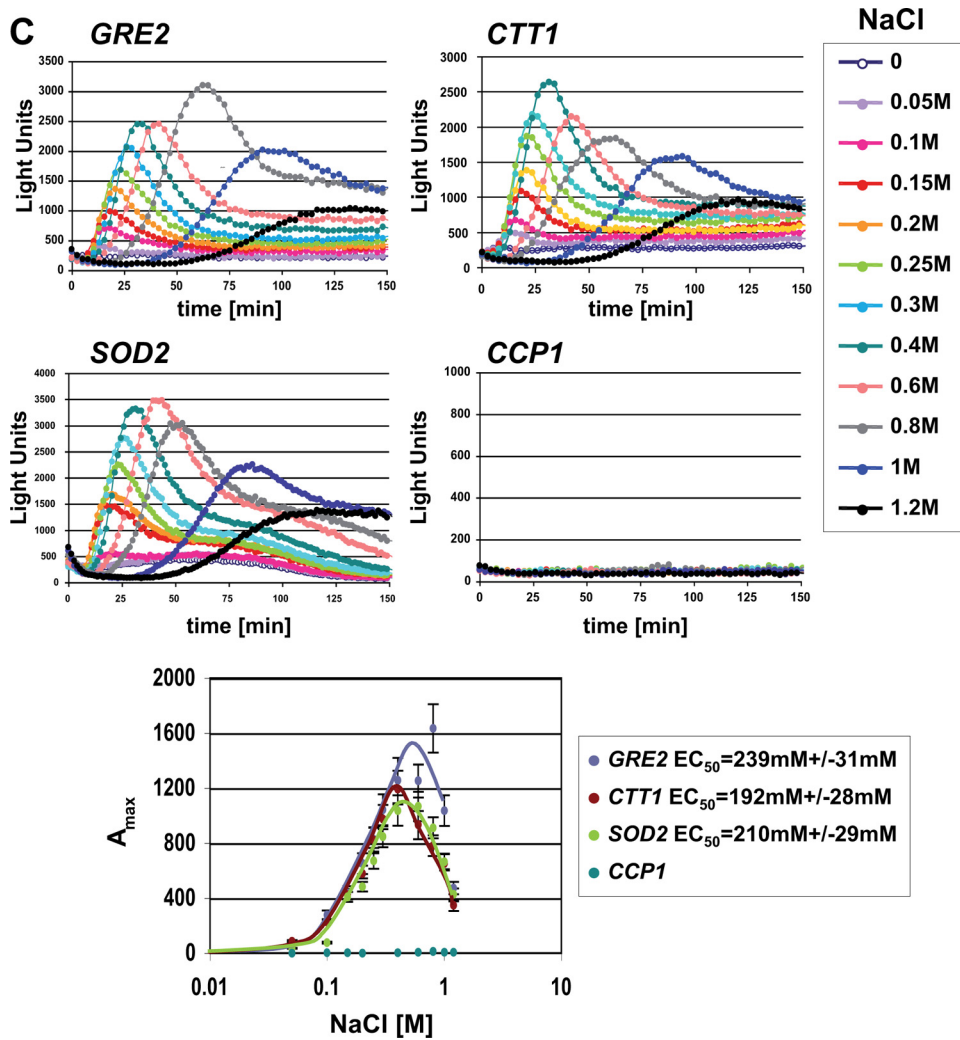


FIG 1 continued

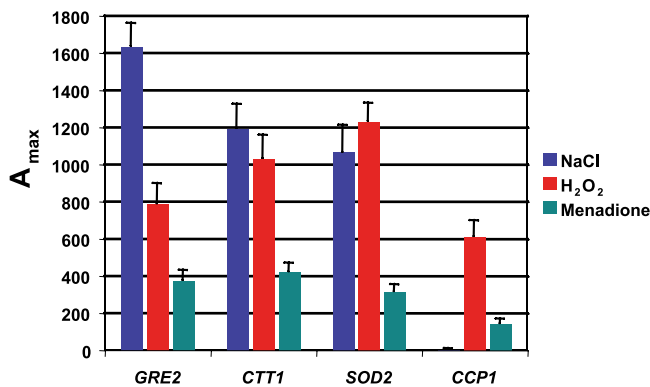


FIG 2 Maximal activation pattern of the *GRE2*, *CTT1*, *SOD2*, and *CCP1* promoters upon osmotic and oxidative stress. The optimal induction level (which was the maximal light emission in the real-time luciferase assay) for each promoter was obtained from the dose-response experiments whose results are shown in Fig. 1 for NaCl, hydrogen peroxide, and menadione treatment. The data presented are mean values derived from three biological replicates.

one type of *cis* element in the luciferase expression system was sufficient to reach maximal induction levels which were comparable to those obtained with full promoter regions, at least upon stress at the optimal dose for each type of element. This indicated that the elements were functional in the artificial promoter context created here and therefore allowed the comparison of the dose-sensitive performance of the three *cis* elements.

The CRE site conferred the efficient and sensitive induction of luciferase activity upon all three types of stress tested here (Fig. 3A). In contrast, the AP-1 site triggered activation of gene expression very efficiently upon hydrogen peroxide stress, moderately upon menadione treatment, and not at all upon salt stress. Introduction of the canonical STRE site significantly raised the initial uninduced reporter activity, which was only moderately activated by hydrogen peroxide or NaCl. To compare the performance of the different types of TF binding sites in a quantitative manner, we plotted the fold induction observed for each element under each stress treatment against the stress dose (Fig. 3B). Additionally, we could compare the maximal induction observed for each element across the three types of stimulus (Fig. 3C). We show that hydrogen peroxide triggered the most dynamic expression changes

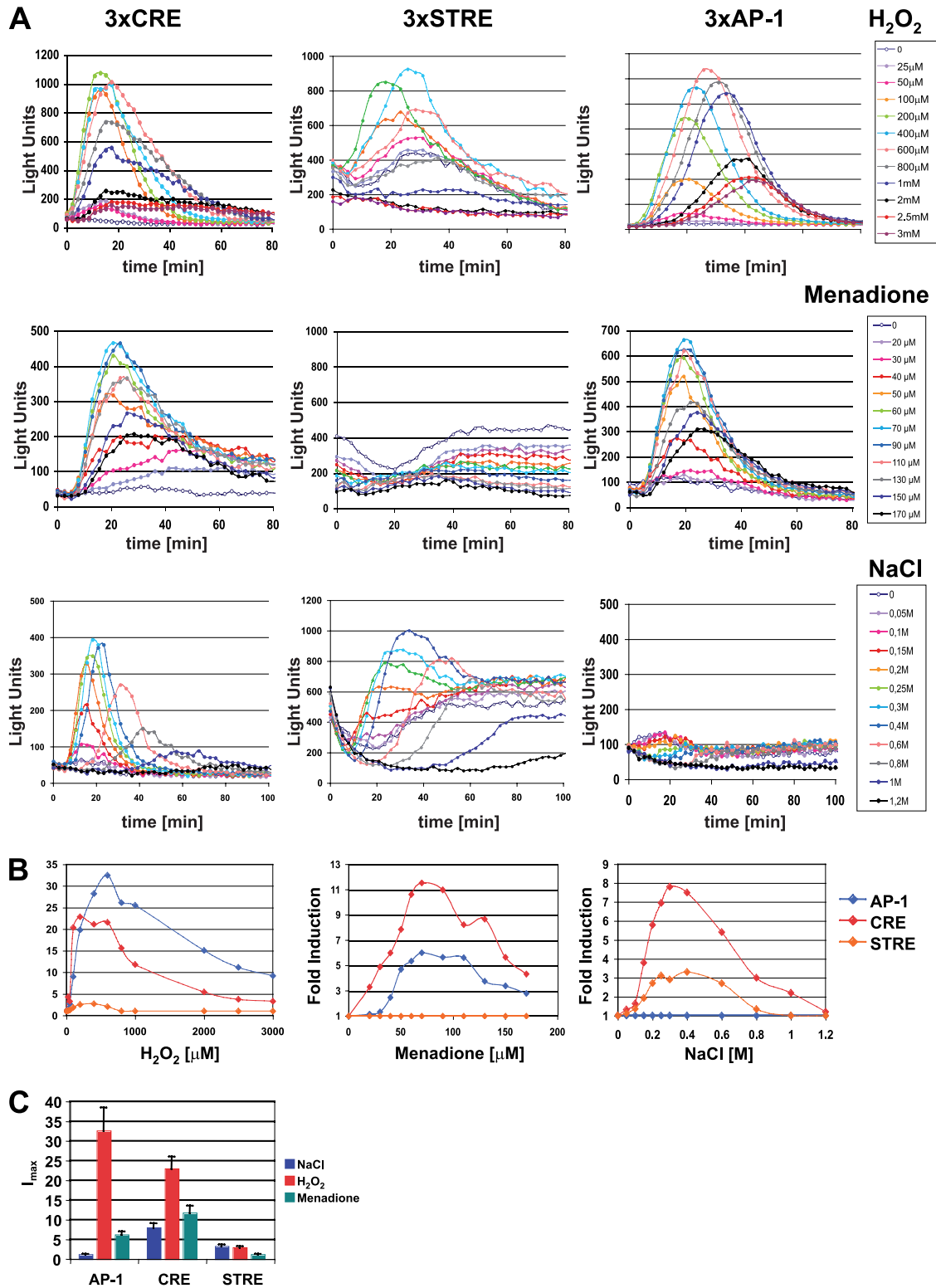


FIG 3 Comparison of the dose-response behavior of single *cis*-regulatory elements upon osmotic and oxidative stress. Destabilized luciferase genes driven by single regulatory elements (CRE, STRE, or AP-1) were used in yeast wild-type cells. The dose-sensitive activation of each element was monitored for hydrogen peroxide, menadione, and NaCl stress in the living cell. (A) The dose-response curves are depicted for each element and type of stress. The represented data are the mean values obtained from three independent culture aliquots, with the error being <15%. (B) Comparison of the dose-sensitive induction profiles for AP-1, STRE, and CRE. The maximal fold induction is plotted against the stress dose for the indicated stress treatments. (C) Comparison of the maximal fold induction (I_{max}) for AP-1, STRE, and CRE upon the indicated stresses.

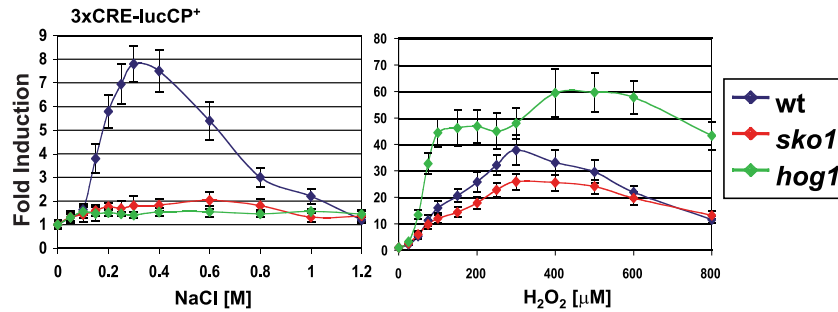


FIG 4 Activated gene expression from CRE sites occurs exclusively through Hog1 and Sko1 upon osmotic stress and independently of both factors upon oxidative stress. A CRE-driven luciferase reporter was used in yeast wild-type (wt) and *hog1* and *sko1* mutant cells. The dose-response curves upon NaCl and hydrogen peroxide stress were recorded for each strain background. The maximal fold induction is plotted against the stress dose for the indicated stress treatments to compare the CRE-driven luciferase performance for each strain. Data presented are the mean values from three biological replicates.

through the CRE and AP-1 sites and triggered expression changes to a minor degree through the STRE site. Oxidative stress provoked by menadione appeared to activate gene expression via CRE in a more sensitive way than via AP-1. Salt stress, in turn, induced the reporter gene activity mainly through CRE and moderately through STRE.

In summary, these data (i) confirm that AP-1 sites trigger specific signaling upon oxidative stress and show that they are the most efficiently induced by hydrogen peroxide, (ii) show that CRE sites can activate gene expression efficiently upon both salt and diverse oxidative stress treatments, and (iii) demonstrate that STRE sites confer only limited transcriptional activation upon salt and hydrogen peroxide stress. We next wanted to gain insights into the role of specific transcription factors and their role in the stress-specific activation of the *cis* elements investigated here.

Activation of CRE depends on Hog1 and Sko1 upon salt stress but not upon oxidative stress. Stress-activated transcription through CRE sites via the Sko1 repressor/activator, which is directly regulated by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress, has been reported (16, 17, 47). We addressed the question whether Sko1 and Hog1 were the only factors responsible for the upregulation of gene expression from CRE sites upon osmotic and oxidative stimuli. We therefore expressed the CRE-regulated luciferase reporter in mutant strains lacking Sko1 or Hog1 function and quantified the dose-response behavior upon NaCl and hydrogen peroxide stresses. We confirmed that CRE-mediated activation depends on Sko1 and Hog1 upon salt stress (Fig. 4, left). However, upon stimulation with hydrogen peroxide, we observed

a similar dose response in the wild-type and *sko1* mutant strains (Fig. 4, right). Loss of Hog1 function led to hyperactivation of the CRE-driven luciferase gene and to approximately 3-fold increased induction levels at low peroxide concentrations. These results identify the Sko1 and Hog1 regulators to be the exclusive activators through CRE upon osmotic stress, while both factors do not participate in activation through CRE upon oxidative stress.

Msn2 and Msn4 confer basal and stress-induced gene expression from STRE sites which is only partially affected by Hog1 upon osmotic stress. The transcriptional activators Msn2 and Msn4 are known to stimulate gene expression from STREs in response to general stress (7). We tested their contribution to NaCl- and H_2O_2 -induced transcription by the use of the STRE-driven luciferase reporter in living yeast cells. First, we quantified the complete dose-response performance upon both types of stress by comparing the wild type and the *msn2 msn4* mutant (data not shown). Interestingly, we found the most pronounced loss of reporter gene activity in the double mutant under basal growth conditions prior to stress. In Fig. 5, representative induction profiles are shown for both stresses. Loss of Msn2 and Msn4 function results in an approximately 5-fold decrease of the uninduced expression level. While in wild-type cells STRE-regulated luciferase activity transiently increased (2- to 3-fold upon both NaCl and H_2O_2 shock), the *msn2 msn4* mutant maintained the reduced reporter activity throughout the stress treatment. We concluded that the Msn2 and Msn4 factors are important not only for stress-induced transcription but also for normal levels of basal gene expression from STRE sites.

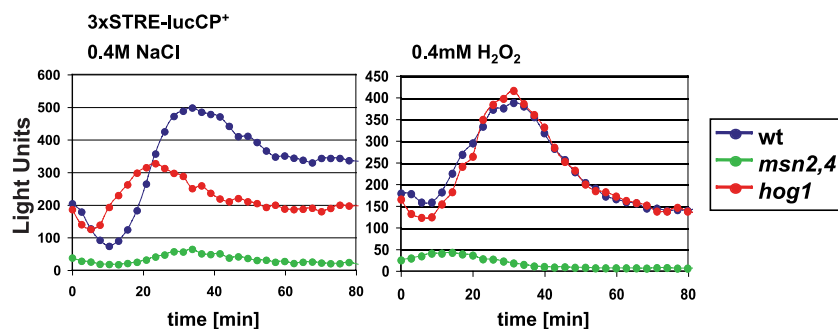


FIG 5 Msn2 and Msn4 sustain basal and stress-induced gene expression from STRE sites. A STRE-driven luciferase reporter was used in yeast wild-type and *msn2 msn4* and *hog1* mutant strains. The reporter activity was assayed in living cells treated with the indicated stress doses. The data presented are the mean values obtained from three independent culture aliquots, with the error being <15%.

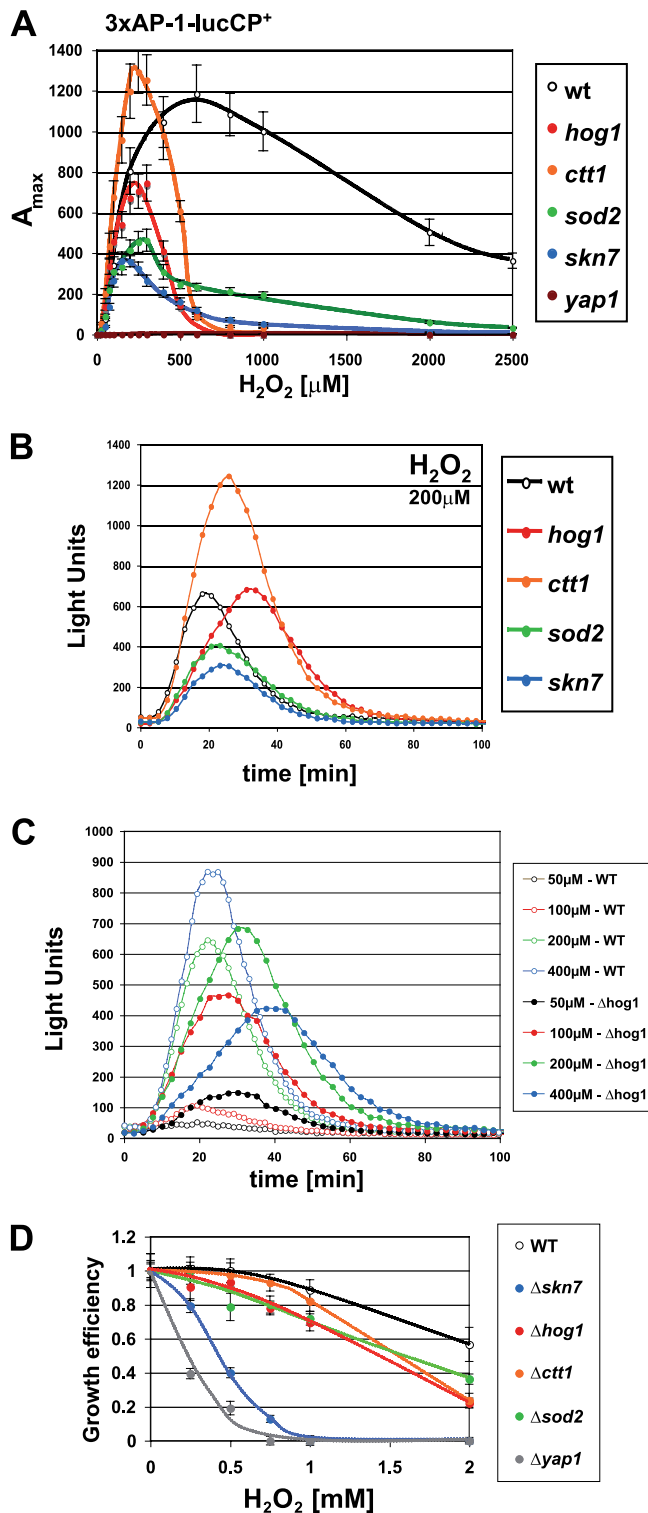


FIG 6 Cell physiology modulates the dose response of stress-activated gene expression. An AP-1-driven luciferase reporter was used in the indicated yeast strains, and its activation profiles were recorded upon growth of the living cell with hydrogen peroxide. (A) Yap1 is indispensable for H₂O₂-induced gene expression from AP-1 sites, while other mutants affected in oxidative stress signaling or defense show altered dose-response profiles. The maximal reporter activity was measured in triplicate upon each stress treatment and was plotted against the hydrogen peroxide concentration for each strain. (B) Snapshot of the AP-1-induced luciferase reporter activity in the indicated strains

We next wanted to distinguish the effect of Msn2 and Msn4 from that of indirect regulators, such as the Hog1 MAP kinase. Hog1 has been reported to act through STREs upon osmotic stress (48). We recorded the dose-response behavior of an STRE-dependent luciferase reporter in a *hog1* mutant and found no effect on the basal or the hydrogen peroxide-induced expression levels and a partial reduction of induction upon NaCl stress (Fig. 5; shown for representative stress doses).

The dynamic activation from AP-1 sites mediated by Yap1 upon oxidative stress is critically dependent on cell physiology. We next investigated the factors which modulate transcriptional activation from AP-1 sites upon oxidative stress. AP-1 sequences are targeted by the Yap family of transcriptional activators, and Yap1 has been identified to be one of the major transcription factors acting upon oxidative stress (30). We confirmed the pivotal role of the Yap1 protein in H₂O₂- and menadione-induced transcription from AP-1 sites (Fig. 6A and data not shown). When we tested other regulatory mutants for AP-1-activated gene expression, we found reduced reporter activity for the *skn7* mutant lacking a second specific transcription factor involved in the response to oxidative stress. To assess the function of Skn7 in the Yap1-mediated transcriptional response, we compared the dose-response behavior of AP-1-driven gene expression in *skn7* mutant cells with that in the wild type (Fig. 6A). We found that AP-1-regulated luciferase expression was impaired for high H₂O₂ concentrations, while for low peroxide doses (<200 μM), *skn7* mutants reached maximal reporter activities comparable to those for the wild type. The dose-response profile for the *skn7* mutant showed saturation at stress doses much lower than those for the wild type. We concluded that Skn7 is not directly involved in transcription from AP-1 sites, as it appeared to be normal for weak stress conditions. We assumed, rather, that a greater stress susceptibility in *skn7* mutants caused a truncated dose response at higher peroxide concentrations.

We wanted to gain more insights into how general stress sensitivity could change the dose-sensitive transcriptional response. Therefore, we investigated AP-1-stimulated gene expression in two additional mutant strains with mutations in genes affecting enzymatic activities required for efficient detoxification of oxidative stress: *sod2* (superoxide dismutase) and *ctt1* (catalase). In the case of *sod2*, we found a dose-response profile for hydrogen peroxide stress reduced similarly to that for the *skn7* mutant. Cells lacking Ctt1 showed even higher activation of the AP-1-induced luciferase reporter at low peroxide concentrations; however, activation upon higher stress doses was severely reduced compared to that in the wild type. These data suggested that the stress sensitivity of a cell critically modulates the dynamics of the dose-sensitive transcriptional response. In order to see how an increased sensitivity to peroxide stress affects the transcriptional induction profile, we focused on the AP-1-induced luciferase profiles *in vivo*

upon a mild oxidative stress (200 μM H₂O₂). The live cell luciferase profiles were obtained for three independent culture aliquots, and the error was <15%. (C) H₂O₂-induced gene expression is both positively and negatively affected by the loss of Hog1 function. The live cell AP-1-induced luciferase profiles were obtained in wild-type and *hog1* mutant cells at the indicated H₂O₂ concentrations. Data were derived from three independent culture aliquots, and the error was <15%. (D) Growth efficiency of the wild type and the different mutant strains upon hydrogen peroxide stress. Data were obtained from three independent culture aliquots for each strain.

different mutant backgrounds upon a moderate H_2O_2 insult. As depicted in Fig. 6B, we observed overactivation of the AP-1-driven reporter in the *ctt1* mutant strain upon treatment with 200 μM H_2O_2 . Compared to the length of activation in the wild type, this overactivation was produced for a longer time, during which the reporter remained actively expressed. These data indicate that under these specific stress conditions, a wild-type cell can efficiently reduce the oxidative insult within a few minutes, while *ctt1* mutants more slowly detoxify the oxidative stress and, hence, show an enlarged activation profile for the AP-1 site. Other mutants, such as *hog1*, *sod2*, or *skn7* mutants, showed a different phenotype under the same stress conditions. They showed a decreased efficiency of activation of AP-1-induced luciferase which resulted in a reduced maximal activity of the reporter. A possible explanation for this is that while a stress dose of 200 μM H_2O_2 is too low to interfere with efficient transcriptional activation in the wild type, in sensitive mutant backgrounds, the same stress dose can already provoke a general decrease in the efficiency of activated gene expression.

Taken together, these data suggest that the physiology of the cell can affect the transcriptional response in an important manner. Both positive and negative changes can be observed dependent on the stress dose. This was confirmed by comparing the *in vivo* activation profiles at low, medium, and high stress doses, for example, for the *hog1* mutant (Fig. 6C). The AP-1-induced luciferase reporter is clearly overactivated in the mutant at very low peroxide concentrations (50 to 100 μM), its activation is delayed but still as efficient as that of the wild type at moderate concentrations (200 μM), and its activation is severely decreased at higher peroxide concentrations (400 μM).

We finally determined the tolerance to oxidative stress of the different mutant strains. We found that growth efficiency was most severely affected by hydrogen peroxide in the *yap1* and *skn7* mutants, followed by the *sod2* and *hog1* mutants, which had moderate sensitivity, and the *ctt1* mutant, which was the least sensitive of the mutant strains tested (Fig. 6D). These data in general confirm the observation that increased stress sensitivity shifts the dose-response profile of gene activation toward low stress doses. The *sod2* mutant is a notable exception, which might imply that there is no simple correlation between stress tolerance and the efficiency of stress-induced gene expression.

Combination of *cis* elements and their effect on the dose-response behavior upon oxidative stress. Many stress-responsive yeast promoters contain more than one type of upstream activation element. Combinations of different *cis* elements might be advantageous for the cell to yield higher activated expression levels and/or to create specific stress responses for specific subsets of defense genes. We addressed the question of how combinations of different TF binding sites modulate the overall dose response by the use of the real-time luciferase assay. We created reporter genes under the control of the combinations of CRE-STRE, AP-1-STRE, and AP-1-CRE and recorded their dose-response behavior in comparison with that of reporters activated by just one of the combined elements. We performed this study with H_2O_2 as the stimulus because each of the elements alone was responsive to this specific stress. When we plotted the absolute levels of expression of each construct against the stress dose, we did not observe in any of the cases an enhanced gene expression by any combination of CRE, STRE, or AP-1 sites (Fig. 7). Strikingly, each combination gave an intermediate dose-response expression profile compared

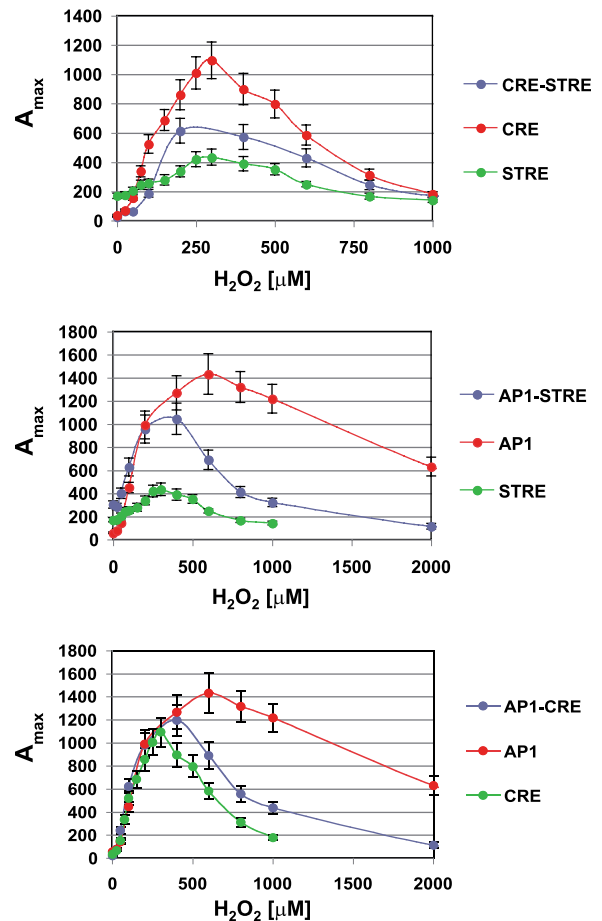


FIG 7 Combination of different stress-responsive *cis* elements does not enhance absolute expression levels. AP-1, CRE, and STRE sequences were combined to drive destabilized luciferase gene expression in yeast wild-type cells, and the luciferase activation profiles were recorded upon growing hydrogen peroxide stress. The maximal luciferase activity was determined in triplicate upon each stress treatment and was plotted against the hydrogen peroxide concentration for the indicated constructs.

to that of the respective single-element derivatives. This suggested that in the artificial promoters created here, each regulatory element activated transcription independently from the other without additive or synergistic effects. This effect was not caused by steric competition between neighboring sites, because the 3 \times CRE reporter showed significantly higher expression than the 1 \times CRE reporter (data not shown). However, we observed that in some instances the combination of *cis* elements enhanced the inducibility of the stress response. This was evident when we compared the induction profiles rather than the absolute expression profiles of a luciferase reporter controlled by AP-1 and CRE sites. The combination of both regulatory elements increased the induction profile upon oxidative stress by the combination of low uninduced expression levels (conferred by CRE) and high inducibility upon stress (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we measured how stress modulates gene expression over an exhaustive range in order to know the dynamic response of complex gene promoters and individual response el-

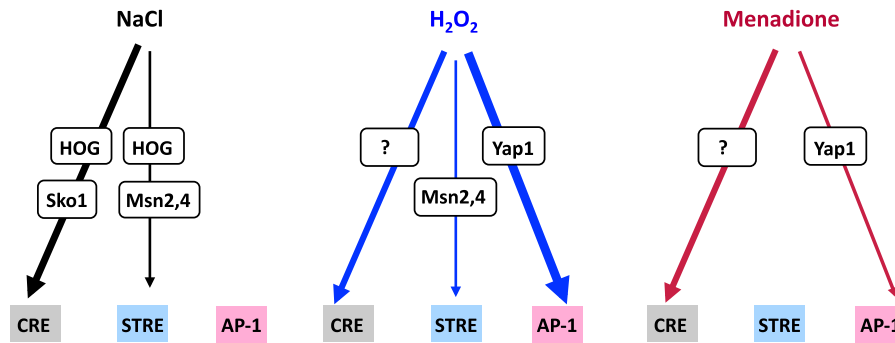


FIG 8 Model of differential gene expression upon osmotic and oxidative stress. The schematic representation summarizes the contribution of specific regulatory elements (CRE, STRE, and AP-1) to the induction of gene expression by the indicated stresses. The elements confer different inducibility upon the distinct stress treatments, as revealed by the dose responses reported here.

ements. The obtained dose-response profiles contain important biological information on the sensitivity of regulatory regions, the discrimination between different types of stress, the capacity of signal transducers and regulators to resolve dynamic stress doses, and the interference of the stress with transcriptional efficiency. It is important to note that the principle assay used here to measure dose-dependent gene expression is not a direct transcription assay but, rather, determines gene expression indirectly by the use of destabilized enzyme activity. However, all genes studied here are characterized by very low transcript levels under normal growth conditions but by the massive induction of transcription upon the relevant stress treatments. Therefore, the activation of luciferase activity in the reporter assays throughout the work is mainly a consequence of stimulated transcription at the diverse promoters and not due to regulation of transcript stability or translation. Additionally, we have confirmed for various promoter fusions that upon stress luciferase expression profiles generally correlate with the recruitment of PolII RNA at the corresponding endogenous genes (A. Rienzo, A. Pascual-Ahuir, and M. Proft, unpublished observations). We estimate that the luciferase reporter system detects gene expression with a delay of approximately 20 min with respect to the time of PolII binding at the promoter and approximately 15 min with respect to the time of mRNA production.

Complete dose responses allow quantitative comparison of the performance of promoters for specific stresses. Here we show that yeast promoters have characteristic activation patterns upon osmotic and oxidative stresses. The *GRE2* promoter is especially responsive to osmotic stress, where it is activated to expression levels higher than those in response to oxidative stress. Other promoters, such as *CTT1* or *SOD2*, seem to respond equally well to both stresses, while yet other promoters with an activation profile highly specific for oxidative stress exist, such as *CCP1*. These differences might reflect the specific contribution of the encoded enzyme activities to the adaptation to NaCl or oxidative stress. The Gre2 protein has methylglyoxal reductase activity and might therefore be involved in detoxifying this inhibitory compound, which accumulates upon osmotic and oxidative insult (49, 50). On the other hand, the Ctt1 and Sod2 enzymes degrade reactive oxygen species, which are directly generated by oxidative stress and only secondarily produced upon salt stress (39). The individual susceptibilities to different stresses might be conferred by specific combinations of upstream activating elements in promoters.

Here we quantified the dose-dependent regulation of three promoter elements relevant to osmotic and oxidative responses. Of note, the insertion of CRE, AP-1, or STRE sequences in an artificial core promoter was sufficient to efficiently activate gene expression to similar absolute expression levels, at least under their optimal induction conditions. Therefore, we assume that all three elements were as functional in the reporters created here as natural promoters, which allows their functional comparison. The CRE site conferred efficient activation upon salt stress and oxidative stress. In contrast, AP-1 mediated oxidative stress signaling that was especially efficient upon hydrogen peroxide stress, while it was completely unresponsive to salt stress. The STRE sequence seemed to confer very limited activation upon salt and oxidative stress. Different combinations of these *cis* regulators might therefore create dose-response profiles specific for natural promoters (Fig. 8). Indeed, the search for TF binding sites in the promoter regions (1 to 500 bp upstream of the ATG codon) of the four genes investigated here revealed striking differences: *GRE2* contains 2 CRE sites and no AP-1 or STRE site, while *CTT1*, *SOD2*, and *CCP1* contain different combinations of AP-1 and STRE sites. Additional elements, such as Skn7 or Hot1 binding sites, not investigated here, might add to the more salt-responsive induction profile of *GRE2* versus that of *CTT1* or *SOD2*. In general, our results indicate that single stress-responsive promoter elements confer efficient transcriptional activation which cannot be enhanced by including other types of *cis* elements in the same promoter. We speculate that upon the appropriate stimulation, elements such as CRE or AP-1 activate transcription to maximal levels. Combination of *cis* elements in natural promoters might therefore be more important to define the range of stimuli able to activate a particular promoter than to increase absolute expression levels.

Determining the specific dose responses for DNA elements also allows one to know how the signaling pathways operate to modulate their activities upon different stresses. Here we show that salt and oxidative stresses trigger adaptive responses separately in yeast (Fig. 8). This conclusion is supported by several experimental findings: (i) transcriptional activation through AP-1 elements is specific for oxidative stress and does not occur upon stress caused by any NaCl concentration known to cause ROS accumulation, and (ii) although CREs or STREs stimulate gene expression in response to both osmotic and oxidative stimuli, only the osmotic stimulus is triggered by the HOG osmosensing path-

way through the Sko1 or Msn2 and Msn4 transcription factors. This suggests that although it is well-known that osmotic stress causes oxidative damage, the ROS production caused by salt stress does not secondarily trigger a transcriptional response. Therefore, the induction of antioxidant systems by salt stress does not occur indirectly through ROS but, rather, is the product of independent signaling (osmotic or oxidative) to the respective antioxidant promoters.

The continuous measurement over a range of doses also allows comparison of the efficiencies with which different stresses stimulate gene expression. Here we show that different oxidative treatments, such as hydrogen peroxide and menadione treatments, have different impacts on the activation of both natural and artificial promoters. For example, in the case of activation through AP-1 sites, hydrogen peroxide is an approximately 5-fold better inducer of gene expression than menadione, while signaling through CRE sites seems to be less discriminative for menadione (Fig. 3). Activation of AP-1 by both oxidants is completely dependent on Yap1. Therefore, it is likely that hydrogen peroxide is a better inducer of Yap1 activity. The critical event in Yap1 induction upon oxidative stress is its oxidation in the cytosol and formation of specific disulfide bonds, which trigger nuclear import and gene activation (37, 38). Interestingly, it is known that different oxidants, such as hydrogen peroxide or diamide, provoke different activated forms of Yap1 (35, 51). This might have consequences for the transactivation properties of Yap1, as suggested here for hydrogen peroxide and menadione.

An important determinant that shapes gene expression responses is the inhibitory effect of the stress itself. Here we measured for three different stimuli how the expression of luciferase activity is modulated in response to gradually growing stress doses. As expected, we found in all cases that, within a certain range of concentrations, the maximal expression levels increased with the dose. The concentration ranges which provoked differential responses in the wild type were approximately 0.05 to 0.5 mM for hydrogen peroxide, 30 to 100 μ M for menadione, and 100 to 500 mM for NaCl. For harsher stress conditions, we observed that the maximal expression levels declined for all treatments. A plausible explanation for this is that the stress itself interferes with efficient gene expression. In line with this interpretation, it has been demonstrated that salt stress already disturbs the association of proteins with chromosomal DNA at moderate concentrations and that higher NaCl concentrations delay and decrease the efficiency of transcriptional activation (52, 53). Thus, salt stress directly interferes with transcription at critical concentrations. Severe oxidative stress also seems to inhibit but not delay gene expression (Fig. 1). It remains to be seen whether elevated ROS levels directly interfere with the process of transcription. Here we demonstrate that the stress tolerance of a yeast cell determines its way to mount a transcriptional response to different stress doses. This is especially interesting in cases of moderately sensitive strains, such as *ctt1* or *hog1* mutants, upon hydrogen peroxide stress. The growth inhibition by oxidative stress of these mutants occurs for different reasons and is caused by the lack of a specific antioxidant enzyme in the case of *ctt1* or supposedly by the lower level of expression of several antioxidant genes in the case of *hog1*. Both mutants showed a hypersensitive phenotype regarding their dose-response profile, which means that they overactivated gene expression at very low stress doses, saturated this response very early with low doses, and severely diminished the response upon

stronger oxidation (Fig. 6). It is likely that the reduced antioxidant capacity in *ctt1* and *hog1* mutants produces activation of the Yap1 peroxide sensor at lower H₂O₂ concentrations than in the wild type. On the other hand, inhibition of gene expression in general was accomplished much earlier with lower peroxide concentrations. These effects shift the optimal transcriptional response of sensitive mutants toward lower stressor concentrations. These experiments also have important practical implications. If we had performed a transcription assay of an inducible gene at a peroxide concentration of >0.5 mM, we might have come to the conclusion that Hog1 is an activator of the oxidative stress response, while the same experiment at <0.2 mM would have suggested a repressor role for Hog1 in oxidative stress signaling. However, our data indicate that Hog1 is not directly involved in transcriptional activation stimulated by oxidative stress. This is important to note, because activation of the HOG pathway has been reported to occur upon oxidative stress (40). Another example which highlights the importance of dose responses for the correct interpretation of biological systems comes from the comparison of the *skn7* and *yap1* mutants, defective in the two major transcriptional activators operating upon oxidative stress. Both mutants were highly sensitive to peroxide stress; however, only the lack of Yap1 completely abolished transcriptional activation from AP-1 sites upon H₂O₂ treatment, an expected result, given that Yap1 directly binds AP-1 sequences. A lack of Skn7 also dramatically decreased peroxide-activated gene expression controlled by AP-1; however, this happened only at high H₂O₂ concentrations, while the transcriptional response was unaffected at low stress doses. Therefore, Skn7 activity is not generally required for Yap1-mediated activation, and complete dose-response experiments are critical to differentiate the direct from indirect effects of regulators on stress-regulated gene expression.

As a conclusion, deciphering the dynamic response of gene expression yields important insights into the dose-sensitive modulation of promoters and specific promoter elements as well as their direct and indirect regulators. The application of time-resolved gene expression assays, as reported here, will certainly help us to understand how gene regulation is constantly adapted to changing environmental stress.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (grant BFU2011-23326 to M.P.) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (predoctoral FPI grant to A.R.).

We thank E. de Nadal for the kind gift of the Δ *msn2* Δ *msn4* mutant strain.

REFERENCES

1. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11:4241–4257.
2. Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D, Umansky L, Gerstein MB, Snyder M. 2009. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev.* 23:1351–1363.
3. Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Arino J. 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 275:17249–17255.
4. Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *Hot1p* and *Msn2p/Msn4p* are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J. Biol. Chem.* 275:8290–8300.

5. Yale J, Bohnert HJ. 2001. Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J. Biol. Chem.* 276:15996–16007.
6. Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 12:323–337.
7. Martinez-Pastor MT, 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.
8. Schmitt AP, McEntee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:5777–5782.
9. Beck T, Hall MN. 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402:689–692.
10. Gorner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schuller C. 1998. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12:586–597.
11. Saito H, Posas F. 2012. Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192:289–318.
12. de Nadal E, Ammerer G, Posas F. 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.* 12:833–845.
13. Martinez-Montanes F, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2010. Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmotic stress in yeast. *OMICS* 14:619–627.
14. Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, Posas F. 2003. Osmotic stress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.* 22:2433–2442.
15. de Nadal E, Casadome L, Posas F. 2003. Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 23:229–237.
16. Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R, Posas F. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* 20:1123–1133.
17. 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.
18. Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G, Ruis H. 1999. Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.* 19:5474–5485.
19. 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.
20. Vendrell A, Martinez-Pastor M, Gonzalez-Novo A, Pascual-Ahuir A, Sinclair DA, 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.
21. De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, Posas F. 2004. The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* 427:370–374.
22. 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.
23. Zapater M, Sohrmann M, Peter M, Posas F, de Nadal E. 2007. Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol. Cell. Biol.* 27:3900–3910.
24. Capaldi AP, Kaplan T, Liu Y, Habib N, Regev A, Friedman N, O'Shea EK. 2008. Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat. Genet.* 40:1300–1306.
25. Cook KE, O'Shea EK. 2012. Hog1 controls global reallocation of RNA Pol II upon osmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)* 2:1129–1136.
26. Proft M, Gibbons FD, Copeland M, Roth FP, Struhl K. 2005. Genome-wide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 4:1343–1352.
27. Vincent AC, Struhl K. 1992. ACR1, a yeast ATF/CREB repressor. *Mol. Cell. Biol.* 12:5394–5405.
28. Wong KH, Struhl K. 2011. The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes Dev.* 25:2525–2539.
29. Ikner A, Shiozaki K. 2005. Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat. Res.* 569:13–27.
30. Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. 2005. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol.* 15:319–326.
31. Toone WM, Jones N. 1999. AP-1 transcription factors in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:55–61.
32. Brombacher K, Fischer BB, Rufenacht K, Eggen RI. 2006. The role of Yap1p and Skn7p-mediated oxidative stress response in the defence of *Saccharomyces cerevisiae* against singlet oxygen. *Yeast* 23:741–750.
33. Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274:16040–16046.
34. Fernandes L, Rodrigues-Pousada C, Struhl K. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* 17:6982–6993.
35. Gulshan K, Rovinsky SA, Coleman ST, Moye-Rowley WS. 2005. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 280:40524–40533.
36. Kuge S, Jones N, Nomoto A. 1997. Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J.* 16:1710–1720.
37. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB. 2000. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19:5157–5166.
38. Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. 2001. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell. Biol.* 21:6139–6150.
39. Koziol S, Zagulski M, Bilinski T, Bartosz G. 2005. Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress. *Free Radic. Res.* 39:365–371.
40. Bilsland E, Molin C, Swaminathan S, Ramne A, Sunnerhagen P. 2004. Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol. Microbiol.* 53:1743–1756.
41. Rienzo A, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2012. The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast* 29:219–231.
42. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14:115–132.
43. Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Genteland E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Veronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285:901–906.
44. Galiuzzo F, Labbe-Bois R. 1993. Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 315:197–200.
45. Garay-Arroyo A, Covarrubias AA. 1999. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:879–892.
46. Kwon M, Chong S, Han S, Kim K. 2003. Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1623:1–5.
47. Pascual-Ahuir A, Posas F, Serrano R, Proft M. 2001. Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J. Biol. Chem.* 276:37373–37378.
48. Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* 13:4382–4389.
49. Aguilera J, Prieto JA. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* aldose reductase is implied in the metabolism of methylglyoxal in response to stress conditions. *Curr. Genet.* 39:273–283.
50. Aguilera J, Rodriguez-Vargas S, Prieto JA. 2005. The HOG MAP kinase

- pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 56:228–239.
51. Azevedo D, Tacnet F, Delaunay A, Rodrigues-Pousada C, Toledano MB. 2003. Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 35:889–900.
 52. Proft M, Struhl K. 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 118:351–361.
 53. Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA, Hohmann S. 1999. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145(Pt 3): 715–727.

Different Mechanisms Confer Gradual Control and Memory at Nutrient- and Stress-Regulated Genes in Yeast

Alessandro Rienzo,^a Daniel Poveda-Huertes,^a Selcan Aydin,^b Nicolas E. Buchler,^b Amparo Pascual-Ahuir,^a Markus Proft^c

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain^a; Department of Biology, Duke University, Durham, North Carolina, USA^b; Instituto de Biomedicina de Valencia, IBV-CSIC, Valencia, Spain^c

Cells respond to environmental stimuli by fine-tuned regulation of gene expression. Here we investigated the dose-dependent modulation of gene expression at high temporal resolution in response to nutrient and stress signals in yeast. The *GAL1* activity in cell populations is modulated in a well-defined range of galactose concentrations, correlating with a dynamic change of histone remodeling and RNA polymerase II (RNAPII) association. This behavior is the result of a heterogeneous induction delay caused by decreasing inducer concentrations across the population. Chromatin remodeling appears to be the basis for the dynamic *GAL1* expression, because mutants with impaired histone dynamics show severely truncated dose-response profiles. In contrast, the *GRE2* promoter operates like a rapid off/on switch in response to increasing osmotic stress, with almost constant expression rates and exclusively temporal regulation of histone remodeling and RNAPII occupancy. The Gal3 inducer and the Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase seem to determine the different dose-response strategies at the two promoters. Accordingly, *GAL1* becomes highly sensitive and dose independent if previously stimulated because of residual Gal3 levels, whereas *GRE2* expression diminishes upon repeated stimulation due to acquired stress resistance. Our analysis reveals important differences in the way dynamic signals create dose-sensitive gene expression outputs.

Cells continuously adapt their protein composition to changing environmental conditions. The regulation of gene expression is one of the fundamental mechanisms to adjust the global protein repertoire of the cell in order to maintain cell function and integrity in response to environmental challenges. Budding yeast is a powerful model to unravel the modes of transcriptional adaptation at the levels both of specific genes and of the whole organism (1, 2). Additionally, the basic structure of the signaling cascades responding to environmental perturbations is conserved from yeast to humans. It implies the alteration of core kinase activities, which modulate the expression of defense genes through a range of specific transcription factors. Extensive knowledge which precisely describes the molecular machinery and its global impact on gene expression in response to many types of stress has accumulated (3–7). However, the vast majority of these studies are performed with harsh environmental insults and therefore saturating stimulation. As a consequence, only very limited information or approaches are available to understand how cells adapt their gene expression programs to small or gradual changes in their environment.

It is assumed that cells have acquired mechanisms that ensure a transcriptional response which is finely adjusted according to the strength of the stress or stimulation. However, the nature of the signaling molecules which confer gradual transcription outputs remains to be determined in most cases. Fine-tuning of gene expression responses can occur with different purposes, and the generation of a graded response can be achieved at different stages along the signal transduction path. For example, a linear response to mating pheromone has been described for the yeast mating mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade (8). Additionally, specific transcriptional activators such as yeast Msn2 or Crz1 and mammalian NF- κ B transmit linear signals to their cognate promoters by modulating their nuclear accumulation (9–12).

The same signal transduction pathway might have to distinguish related signals that originated from different stressors. This

has been very recently described for yeast Msn2, a transcription factor responding to general stress and capable of filtering different stress inputs to generate graded gene expression outputs (13). Furthermore, among the often numerous genes activated in response to a given stress, the cell has to impose different sensitivities to guarantee an equilibrated adaptive response. Here, chromatin structure has been implied in modulating the threshold of gene activation in the yeast phosphate response (14), and different natural promoters and *cis* regulatory elements confer characteristic dose-sensitive expression profiles upon osmotic and oxidative stress (15).

Here we investigated the mechanisms that confer a gradual and dose-sensitive gene expression for two types of environmental cues: (i) the availability of a specific carbon and energy source and (ii) cytotoxic stress. We used two very well defined model genes, the nutrient-regulated *GAL1* and stress-regulated *GRE2* genes.

The expression of the yeast *GAL* genes is specifically upregulated by the presence of galactose in the growth medium via the transcriptional activator Gal4 (16). Gal4 is already bound at its target promoters under noninducing conditions (without galactose), but its activation domain is inhibited by direct binding of the Gal80 repressor protein (17, 18). Upon growth in glucose-

Received 24 July 2015 Accepted 11 August 2015

Accepted manuscript posted online 17 August 2015

Citation Rienzo A, Poveda-Huertes D, Aydin S, Buchler NE, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2015. Different mechanisms confer gradual control and memory at nutrient- and stress-regulated genes in yeast. *Mol Cell Biol* 35:3669–3683. doi:10.1128/MCB.00729-15.

Address correspondence to Amparo Pascual-Ahuir, apascual@ibmcp.upv.es, or Markus Proft, mproft@ibmcp.upv.es.

A.P.-A. and M.P. are co-senior authors.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

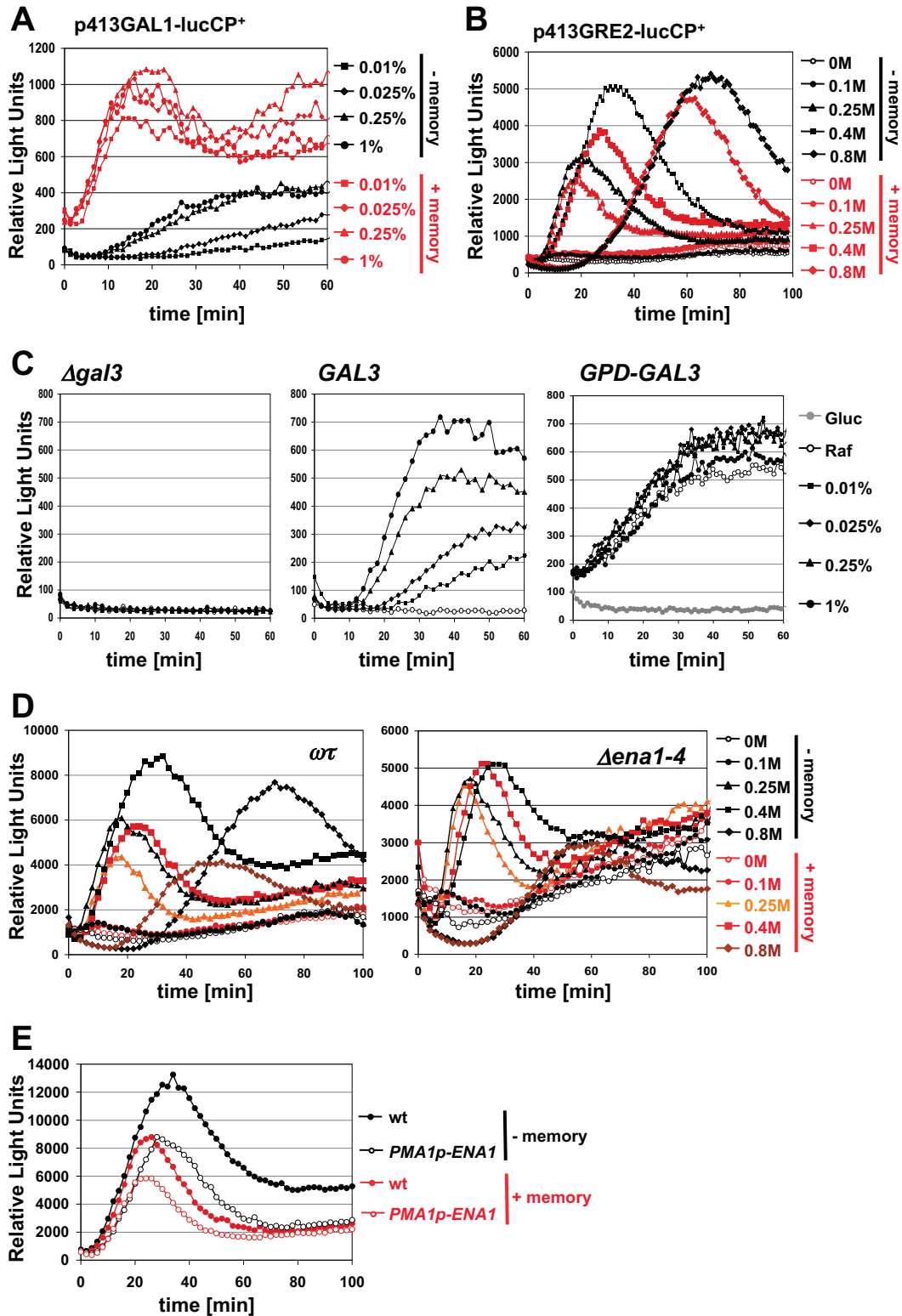


FIG 1 Comparison of transcriptional memory at the *GAL1* and *GRE2* genes. (A) *GAL1* expression is efficiently sensitized upon subsequent galactose induction. A *GAL1-lucCP⁺* reporter gene was used in live-cell luciferase assays to determine the expression rates in raffinose-containing minimal medium after supplementation with the indicated concentrations of galactose. Naive cells (– memory) were stimulated just once with galactose, while transcriptional memory (+ memory) was achieved by a previous galactose induction, as explained in Materials and Methods. (B) The stress-induced *GRE2* expression decreases and is not sensitized by repeated stimulation. A *GRE2-lucCP⁺* reporter gene was used in live-cell luciferase assays to determine the expression rates in glucose-containing minimal medium after supplementation with NaCl. Cells were pretreated with 0.7 M NaCl (+ memory) or not pretreated (– memory) before the induction with the indicated NaCl doses. (C) Effect of Gal3 levels on the dose response of *GAL1*. A *GAL1-lucCP⁺* reporter gene was used in live-cell luciferase

limiting and galactose-containing medium, *GAL* gene expression is induced with the help of the Gal3 inducer. Upon stimulation, Gal3 binds galactose and ATP, interrupts Gal80 inhibition of Gal4, and permits transcriptional activation (19–21). Gal4 additionally recruits chromatin-modifying complexes and mediator (22–27) in order to efficiently induce *GAL* gene expression.

GRE2 is a prototypical gene involved in the hyperosmotic and oxidative stress defense, which includes the stimulated gene expression encompassing hundreds of different cellular functions (5, 28). Its promoter is bound by the specific transcription factor Sko1 in a complex with the general corepressor Cyc8-Tup1 under normal noninducing growth conditions (29). Upon hyperosmotic stress, transcriptional activation of *GRE2* is rapidly achieved by the association of Sko1 with the stress-activated MAP kinase Hog1, which switches Sko1 from repression to activation by multiple phosphorylation and the additional recruitment of chromatin modifiers and the mediator complex (30). As a result, *GRE2* gene expression is very fast and transiently activated, as commonly observed for transcriptional stress responses in yeast.

Additionally, the cell's history can modulate the transcriptional response at specific genes. Transcriptional memory has been described for several inducible yeast genes, including *GAL1*. Here, a previous galactose induction facilitates the transcriptional response to the second galactose exposure. Different mechanisms have been proposed to establish transcriptional memory at the *GAL* genes, including the tethering of actively transcribed *GAL1* to the nuclear envelope via the histone variant Htz1, prolonged chromatin remodeling via Swi/Snf, or the inheritance of signaling compounds such as the Gal1 and Gal3 inducers (31–34).

The general architectures of the *GAL1* and *GRE2* regulons are very similar and involve a switch of a promoter-bound transcription factor from an inactive (or repressed) state to an active state by the direct association with a specifically activated inducer. Here, we identify important differences in how both systems respond to gradual or repeated stimulation. This was possible by the high temporal resolution and quantification of gene expression using destabilized luciferase reporters for the two types of genes. This allowed us to accurately define the dynamic range of gene regulation and identify the molecules which modulate the characteristic dose-response pattern for *GAL1* and *GRE2* during nutrient sensing or acute osmotic stress adaptation.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains. The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study were wild-type (wt) BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and strains carrying the mutant alleles *gal3::KanMX4*, *gcn5::KanMX4*, *snf2::KanMX4*, *gal11::KanMX4*, and *htz1::KanMX4* (35). Yeast strains expressing chromosomally tagged TAP fusion proteins were BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) with *GAL4-TAP-His3MX* and *GAL3-TAP-His3MX* (36). Yeast strains expressing chromosomally tagged hemagglutinin (HA) fusion proteins were W303-1A (*MATα leu2-3,112 trp1-1*

can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15) with $3\times$ HA-*HOG1*, $3\times$ HA-*SKO1* (30), and $3\times$ HA-*RPB3* (37). Yeast strains expressing firefly luciferase were MMY116-2C (*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 his3-11,15*) without *GAL1-Fluc* and MMY116-2C with *GAL1-FLuc* integrated in the *URA3* locus (a gift from A. Mazo-Vargas). DBY746 (*MATα ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 leu2-3,112*) and its *ena1-4::LEU2* derivative were used to study the effect of the *ENA* gene dose on the *GRE2* transcriptional memory.

Plasmid constructions. Single-copy reporter fusions with a destabilized luciferase gene (*lucCP+*) were constructed as described previously (38). The upstream regulatory sequences of *GRE2* (nucleotides –940 to –7), *GAL1* (nucleotides –450 to –1) (38), *CTT1* (nucleotides –983 to –10), *SOD2* (nucleotides –977 to –16) (15), *ALD6* (nucleotides –785 to –2), and *HOR2* (nucleotides –948 to –33) (this study) were used. An integrative version of the *GAL1-lucCP+* reporter fusion was constructed by insertion of the *lucCP+* gene into the pAG306GAL1-ccdB Gateway destination vector (39), which was integrated into the *URA3* locus of yeast wild-type strain W303-1A. An integrative version of the *GRE2-lucCP+* reporter fusion was constructed by insertion of the *lucCP+* gene before the *KanMX* marker in the pUG6 plasmid. The *lucCP+* *KanMX*-containing cassette was PCR amplified and fused to the *GRE2* promoter in the genomes of yeast wild-type strains BY4741 and W303-1A. Multicopy integration plasmid pRS406-GAL1pr-Fluc was built by swapping *MET25* with the *GAL1* promoter in pRS406-MET25-Fluc and integrating into strain MMY116-2C (40). Both the plasmid and integrated strains were gifts from A. Mazo-Vargas. For constitutive or induced overexpression of *GAL3* under the control of the *TDH3* or *GAL1* promoter, the entire *GAL3* gene was inserted in the Gateway destination vectors pAG416GPD-ccdB and pAG416GAL1-ccdB (39). For constitutive overexpression of *ENA1* under the control of the *PMA1* promoter, the plasmid pRS699-ENA1 (a gift from J. M. Mulet, Valencia, Spain) was used.

Live-cell luciferase assays. Yeast strains containing the indicated luciferase fusion genes were grown at 28°C in synthetic dextrose (SD) or synthetic raffinose (SRaff) medium lacking histidine (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, 50 mM succinic acid [pH 5.5], 0.1 g/liter leucine, 0.1 g/liter methionine, 0.025 g/liter uracil) to exponential growth phase. Culture aliquots were then incubated with 0.5 mM luciferin (Sigma) on a roller at 28°C for 90 min. The cells were then transferred in 100- μ l aliquots in white 96-well plates (Nunc) with or without the indicated concentrations of NaCl, menadione, or galactose supplied from appropriate stock solutions. The light emission was then continuously recorded in a GloMax microplate luminometer (Promega) in three biological replicates. Data were processed with Microsoft Excel software. For representation of the relative light units of each reporter gene, we normalized the raw data for the number of cells in each assay. The maximal synthesis rate (V_{max}) and the maximal luciferase activity (A_{max}) were calculated as described previously (38).

ChIP. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed essentially as described previously (41). For the immunoprecipitation of HA fusion proteins, a mouse monoclonal anti-HA antibody (12CA5; Roche) was used in combination with Dynabeads protein A (Invitrogen). For the immunoprecipitation of TAP fusion proteins, pan-mouse IgG Dynabeads (Invitrogen) were used. For the immunoprecipitation of histone H3, a polyclonal anti-H3 antibody (ab1791; Abcam) was used in combination with Dynabeads protein A (Invitrogen). Quantitative PCR (qPCR) analyses at the indicated chromosomal loci were performed in real time using

assays to determine the expression rates in raffinose-containing minimal medium after supplementation with the indicated concentrations of galactose. Cells were grown in synthetic glucose medium before induction was started in synthetic raffinose medium containing the indicated galactose concentrations. Δ *gal3* mutants containing plasmid-carried *GAL3* under constitutive control (*GPD-GAL3*) or the empty vector (Δ *gal3*) were compared with wild-type cells containing the empty vector (*GAL3*). Constitutive overexpression of *GAL3* leads to *GAL1* induction by raffinose; therefore, an additional control in glucose-containing SD medium is included in the last panel. (D) The decrease of *GRE2* expression upon repeated NaCl induction depends on a functional *ENA* gene cluster. The indicated strains (DBY746 background) were compared for *GRE2-lucCP+* expression under conditions identical to those for panel B. (E) Transient activation of *GRE2* depends on the *Ena1* levels. Yeast wild-type cells (BY4741) were assayed for *GRE2-lucCP+* expression in the presence of constitutive *ENA1* overexpression (*PMA1p-ENA1*) or the empty plasmid (wt) upon exposure to 0.4 M NaCl. Cells were pretreated (+ memory) or not (– memory) with 0.7 M NaCl. For all panels, the mean values for three independent biological replicas are shown for each galactose or NaCl concentration (standard deviation, <15%).

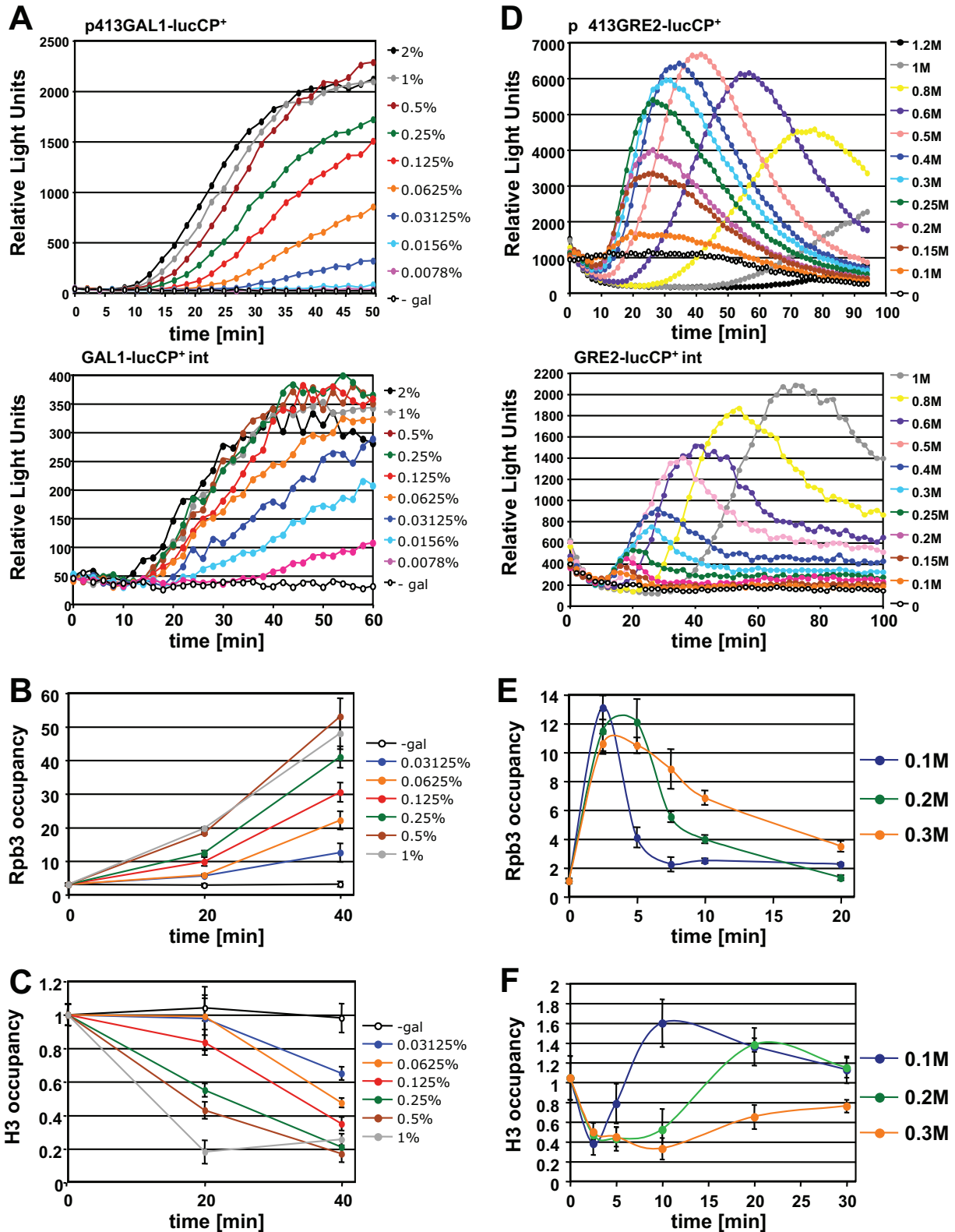


FIG 2 Comparison of the gradual gene expression, RNAPII occupancy, and histone remodeling at the *GAL1* and *GRE2* genes. (A) The expression of a *GAL1-lucCP⁺* reporter gene is dynamically modulated at the level of the synthesis rate. A live-cell luciferase assay was used to determine the expression rates in raffinose-containing minimal medium after supplementation with the indicated concentrations of galactose. *GAL1-luciferase* fusions were expressed from centromeric plasmids (upper panel) or after integration in the genome (lower panel). Data for the upper panel are from reference 38. The mean values for three independent biological replicates are shown for each galactose concentration (standard deviation, <15%). (B) Gradual association of RNAPII with the *GAL1* promoter is modulated by the galactose inducer concentration. ChIP of Rpb3-HA-expressing cells was used to determine the RNAPII density at the *GAL1*

an Applied Biosystems 7500 sequence detector and Fast EvaGreen Mastermix for qPCR (Biotium). All occupancy data are presented as fold IP over the *POL1* coding sequence (+1796/+1996) internal control. Each ChIP was performed in triplicate with three different chromatin samples. All primer sequences used for ChIP are available upon request.

Transcriptional memory experiments. For memory experiments at *GAL1*, cells containing the *GAL1-lucCP⁺* reporter gene were grown overnight in synthetic raffinose (SRaff) medium lacking histidine to exponential growth phase. A first round of induction was then performed for 2 h with 2% galactose, while naive cells remained in SRaff medium. Both cell cultures were then precipitated, washed once with water, and then incubated in fresh SD medium for 1 h. Finally, cells were changed to SRaff medium containing 0.5 mM luciferin for 90 min before starting the next induction with the indicated galactose concentrations and continuous measurement of luciferase activity. For the memory experiment under gradual Gal3 expression levels, the duration of the first round of galactose induction was reduced to 30 min.

For memory experiments at *GRE2*, cells containing the *GRE2-lucCP⁺* reporter gene were grown overnight in synthetic glucose (SD) medium lacking histidine to exponential growth phase. A first salt shock was applied by treatment with 0.7 M NaCl for 1 h, while naive cells remained in SD medium. We confirmed that those salt stress conditions did not cause any decrease in cell viability. Both cell cultures were then precipitated, washed once with water, and then incubated in fresh SD medium with 0.5 mM luciferin for 90 min. The indicated NaCl doses were then applied to aliquots of both cultures and the luciferase activity continuously measured.

Single-cell time-lapse luminescence microscopy. Cells with an integrated *GAL1-FLuc* reporter gene were grown over night in synthetic raffinose (SRaff) medium. We sonicated our yeast in a Diagenode Bioruptor UCD-200 sonicator for 30 s at medium intensity to obtain single-cell suspensions before loading them onto microfluidic plates (CellAsic). Bioluminescence imaging of yeast cells was performed with a DV Elite microscope equipped with UltimateFocus, an Evolve EMCCD camera, and a 60×/1.25-numerical-aperture (NA) phase oil objective lens. Cells were grown for 60 min at 30°C in SRaff medium at pH 3.8 with 200 μM beetle D-luciferin before switching to the SRaff-plus-galactose version of the same medium. We imaged cells every 4 min and processed raw data using same protocols as before (40). Briefly, cell segmentation was done in Cell-Stat (MATLAB plug-in [42]), and single-cell gene expression was fit to an exponential curve using the induction model described previously (40).

RESULTS

Comparison of transcriptional memory at the nutrient-controlled *GAL1* and stress-induced *GRE2* genes. Transcriptional memory effects in yeast have been found predominantly at nutrient-regulated genes. We therefore sought to compare how the dose-dependent gene expression was modulated after a previous stimulation at nutrient- versus stress-regulated loci. We chose two prototypical yeast genes which represent the two classes of regulation, *GAL1* and *GRE2*. To determine the dose-response behavior

of both genes, we applied reporter fusions with destabilized luciferase, which allow monitoring of gene expression in real time in the living yeast cell with a wide range of stimulus concentrations. We first investigated how the dose-sensitive induction of *GAL1* was modulated by repeated galactose exposure. The expression profile from *GAL1*-luciferase reporters in naive yeast cells was compared with that in cells that previously experienced a galactose induction. As shown in Fig. 1A, without prestimulus, *GAL1* responded with a gradual increase in reporter activity over the dynamic range of inducer concentrations. After previous stimulation, however, we observed a much faster response to galactose and an increased synthesis rate of the *GAL1*-luciferase reporter. Importantly, in the second response to galactose, even the lowest inducer concentration (0.01%) was able to activate *GAL1* gene expression to the maximal synthesis rate. We concluded that the *GAL1* dose response largely changed during the establishment of transcriptional memory and that the gene expression profile switched from a dose-sensitive graded mode to a dose-insensitive but highly responsive mode. These dynamic changes in dose-responsive *GAL1* stimulation are faithfully reproduced by the centromeric luciferase reporters used throughout this study compared to chromosomally integrated reporter genes (data not shown).

We next tested whether the dose-response behavior of the stress-activated *GRE2* gene changed upon repeated activation. Memory experiments were performed with the *GRE2*-luciferase real-time reporter and multiple NaCl induction. We observed in this case (Fig. 1B) that the induction of *GRE2* expression was neither faster nor more efficient nor more sensitive at low stress doses in the second round of stimulation. Irrespective of previous gene induction, *GRE2* expression always occurred at the same time and with remarkably similar synthesis rates. The only difference we observed was that cells which responded to salt stress for the second time aborted the induced *GRE2* expression a few minutes earlier than naive cells. Thus, it seemed that *GRE2* induction is not further enhanced or sensitized by previous stress treatment and that it instead reduced the amplitude of the transcriptional burst at *GRE2* in the second round of activation.

Next we wanted to gain insights into the mechanisms which sensitized *GAL1* gene expression to dose-independent maximal induction rates after previous induction. It has been previously reported that the transcriptional memory at *GAL1* was dominantly regulated by signaling molecules such as the Gal3 inducer (33). Thus, we manipulated the Gal3 levels and tested its impact on the dose-dependent induction profile of *GAL1*. As depicted in Fig. 1C, constitutive overexpression of *GAL3* led to a highly efficient *GAL1*-luciferase expression independently of the galactose

promoter in synthetic raffinose medium before and after induction with the indicated galactose concentrations. The mean values for three independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviation. (C) Nucleosome remodeling is gradually stimulated by increasing galactose inducer concentrations. ChIP of histone H3 was used to determine the nucleosome occupancy at the *GAL1* promoter in synthetic raffinose medium before and after induction with the indicated galactose concentrations. The mean values for three independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviation. (D) Dynamic dose-response profile of a *GRE2-lucCP⁺* reporter gene upon NaCl stress. A live-cell luciferase assay was used to determine the expression rates in glucose-containing minimal medium after supplementation with the indicated concentrations of NaCl. *GRE2*-luciferase fusions were expressed from centromeric plasmids (upper panel) or after integration in the genome (lower panel). The mean values for three independent biological replicates are shown for each salt concentration (standard deviation, <15%). (E) Modulation of RNAPII recruitment at *GRE2* over the dynamic range of NaCl concentrations. ChIP of Rpb3-HA-expressing cells was used to determine the RNAPII density at the *GRE2* promoter in synthetic glucose medium before and after induction with the indicated NaCl concentrations. The mean values for three independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviation. (F) The duration of transient nucleosome remodeling at *GRE2* is stimulated by increasing NaCl concentrations. ChIP of histone H3 was used to determine the nucleosome occupancy at the *GRE2* promoter in synthetic glucose medium before and after induction with the indicated NaCl concentrations. The mean values for three independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviations.

inducer concentration. Therefore, high *GAL3* levels can mimic the enhanced sensitivity of *GAL1* expression acquired during repeated galactose induction. The Gal3 inducer level is therefore a key element in changing the dose-response behavior at the *GAL1* gene during memory.

GRE2 expression was modulated by repeated stimulation in a manner opposite to that for *GAL1*, as the second wave of transient gene expression was shorter than the initial one in this case. We hypothesized that the accumulation of defense proteins in the first round of stimulation could prepare the cells for the second salt shock and thereby permit an efficient adaptation with a diminished transcriptional response. We considered two physiological adaptations as most relevant for the tolerance to salt stress: the accumulation of the osmolyte glycerol and the enhanced extrusion of Na^+ . Both processes can be blocked by single deletions in key structural genes, such as in the *gpd1* and *ena1-4* mutants, respectively. We repeated the memory experiments in those specific mutant strains. The *gpd1* cells were indistinguishable from the wild type (data not shown), but we detected important differences for the *ena1-4* mutant, which lacks all copies of the Ena Na^+ extrusion ATPase. As shown in Fig. 1D, in this mutant the *GRE2-lucCP⁺* reporter responded almost equally during the first and second exposures to NaCl stress. Finally, we altered the *ENA1* expression levels by the use of an additional copy of the gene under the control of the constitutive *PMA1* promoter. The effect of increasing *ENA1* expression was a subsequent decrease of the *GRE2* expression peak (Fig. 1E), thus providing additional evidence that the gradual *GRE2* expression depended on the amount of the Ena Na^+ pump. Taken together, these experiments show that important differences exist in the responses of differentially regulated genes to previous exposure. *GAL1* gene expression is highly sensitized to previous exposure, which leads to a dose-independent activation likely driven by the Gal3 inducer. The transient *GRE2* expression is not sensitized to previous exposure and seems to be modulated principally by the physiology of the cell, which dictates the amplitude of the transcriptional response at this gene.

Dose-dependent expression of *GAL1* in cell populations corresponds with gradual histone remodeling and RNAPII association. The pattern of the gradual response of *GAL1* to increasing galactose concentrations was recorded with real-time luciferase reporters, which were expressed from centromeric plasmids or integrated into the yeast genome. The *GAL1*-luciferase expression was stimulated to a detectable level with a minimal galactose concentration of approximately 0.02% for plasmid expression or 0.01% for genomic expression. Increasing stimulus concentrations provoked a continuous increase of the reporter activity until a threshold concentration of 0.5% was reached (Fig. 2A). Greater galactose concentrations did not further increase the reporter activity; however, they slightly decreased the lag time between stimulation and response. Since *GAL1* transcript levels are actively repressed in the absence of galactose, we interpreted the *GAL1*-luciferase expression data as the actual mRNA synthesis rates which are dynamically modulated in a stimulus dependent manner. Galactose concentrations from 0.02% to 0.5% result in a gradual activation of *GAL1* promoter activity. We next addressed whether this dynamic behavior was attributable to a galactose-dependent regulation of RNA polymerase II (RNAPII) association at *GAL1*. We performed *in vivo* ChIP experiments to quantify the association of the RNAPII subunit Rpb3 with the *GAL1* promoter within the range of galactose concentrations which apparently

cause graded transcription outputs. As shown in Fig. 2B, RNAPII recruitment is slow and inefficient at low threshold concentrations (0.03% galactose) and is continuously faster and more efficient until an upper threshold concentration of 0.5% galactose is reached. As a result, we can correlate the dynamic behavior observed with the *GAL1p*-driven luciferase expression system with the gradual association of the transcription machinery at the *GAL1* promoter.

We then wanted to know whether the gradual increase of *GAL1* promoter activity was accompanied by graded chromatin remodeling. Therefore, we determined the histone H3 density at *GAL1* by ChIP over the same range of galactose concentrations. As depicted in Fig. 2C, we found that the speed and efficiency of nucleosome remodeling at *GAL1* are gradually increased in the dynamic range of galactose concentrations. Thus, at the nutrient-regulated *GAL1* gene, an ample range of inducer concentrations is transduced to a graded remodeling of its nucleosomal promoter structure and the dynamic entry of the transcription machinery.

Dose-dependent expression of *GRE2* relies on the temporal regulation of histone remodeling and RNAPII association at constant synthesis rates. We next extended our analysis of graded gene regulation to the transiently activated *GRE2* gene. We first determined the complete dose-response profile in response to NaCl stress *in vivo* by the use of plasmid-borne or integrated *GRE2*-luciferase reporters. As shown in Fig. 2D, *GRE2* responded with characteristic and transient activation profiles in a NaCl concentration range from 0.1 M to 1 M. Moderate salt concentrations (0.15 to 0.4 M) induced *GRE2* always at the same time and with almost identical synthesis rates. However, in the same dynamic range of salt concentrations, a gradual increase of the stimulus (NaCl) provoked gradually increasing maximal reporter activities. This apparently was achieved by continuously prolonging the time during which *GRE2-lucCP⁺* remained actively expressed at maximal synthesis rates. In summary, in contrast to the gradual regulation of synthesis rates seen in the case of *GAL1*, the *GRE2*-luciferase reporter was dynamically regulated temporally while maintaining constant gene expression rates.

We then wanted to determine whether this particular dose-response profile correlated with transcriptional events. Thus, we directly measured the association of RNAPII and histone H3 by ChIP at *GRE2* at NaCl concentrations which cause dynamic changes in the maximal expression. We found that RNAPII association with the *GRE2* promoter occurred very rapidly at low salt concentrations (0.1 to 0.3 M) (Fig. 2E). Clearly, increasing salt concentrations did not stimulate the absolute RNAPII levels but continuously increased the time during which the RNA polymerase remained associated with *GRE2*. These data correlated well with the rapid loss of histone H3 from the *GRE2* promoter region, which was continuously prolonged, but not more efficient, in response to stimulation by increasing NaCl shock (Fig. 2F). Taking these observations together, we find that the differential expression of *GRE2* caused by increased stress doses is achieved mainly by regulating the time during which the promoter remains actively transcribed with practically constant synthesis rates, RNAPII occupancy, and histone eviction.

We then wanted to determine whether this temporal pattern of dose response was general for stress-responsive genes. Therefore, we quantified the dose-sensitive expression patterns of two more osmotic-stress-inducible natural promoters, *HOR2* and *ALD6*. The respective fusions with destabilized luciferase were suitable

for determination of the entire dose-response profiles for both genes upon NaCl stress (Fig. 3A). The comparison of the stimulus-dependent modulation of both the maximal expression and the synthesis rates revealed almost identical patterns for *GRE2*, *ALD6*, and *HOR2* (Fig. 3B). At all three genes the maximal synthesis rate was reached with low stress doses (0.2 M NaCl), while the maximal expression further increased until 0.4 M NaCl due to prolonged activation of the respective fusion genes. Finally we tested the dose-response behavior of two additional genes, *SOD2* and *CTT1*, in response to a different type of environmental cue such as oxidative stress (Fig. 3C). As depicted in Fig. 3D, the two genes showed very similar patterns of maximal gene expression and synthesis rates upon increasing stimulation with menadione compared to the previous patterns obtained for salt stress. Thus, the temporal modulation of gene activity in response to increasing stress doses might be a general feature for stress-responsive genes in yeast.

Increasing galactose stimuli gradually decrease the lag phase and cell-to-cell variability to activate *GAL1* gene expression. We investigated the dose-sensitive response of *GAL1* at the level of single cells. *GAL1* gene expression has been reported to occur in a bimodal fashion, especially at lower galactose concentrations (43–46). Therefore, we wanted to test to what degree bimodality was the source of the gradual *GAL1* regulation. We performed time-elapsing induction studies and recorded the traces of *GAL1*-luciferase-expressing single cells upon stimulation with different galactose concentrations. As shown in Fig. 4, a high galactose stimulus (0.5%) leads to a fast and homogeneous induction throughout the cell population, while lower galactose concentrations increase the lag phase and the heterogeneity of gene induction. However, even very low inducer concentrations (0.02%) activated *GAL1* expression in most of the cells over time, and the slope of *GAL1* induction was largely unaffected by the inducer concentration (Fig. 4d and e). Thus, the gradual decrease of *GAL1* expression in a cell population is mostly the result of a heterogeneous induction delay caused by suboptimal inducer concentrations.

SAGA, SWI/SNF, or mediator mutants cause severely reduced dose responses of *GAL1*. The expression of the *GAL1* gene is finely tuned depending on the galactose availability, and we have shown above that this regulation involves the graded modulation of promoter activity and nucleosome eviction in a cell population. We next wanted to know how impaired nucleosome remodeling affected the dynamic adaptation of *GAL1* promoter activity to changing inducer concentrations. Therefore, we determined the induction profile of the *GAL1*-luciferase reporter gene in response to a wide range of galactose concentrations in mutants with defects in various coactivator complexes. We included in this study the *gcn5* (SAGA histone acetyltransferase), *snf2* (SWI/SNF chromatin-remodeling complex), and *gal11* (mediator complex) mutants, with mutations in genes previously identified as important for full *GAL1* transcriptional activation via Gal4 (22–27), and additionally the *htz1* mutant in the histone variant H2AZ. The comparison of the dose-response profiles obtained for all mutant strains (Fig. 5A) revealed that loss of SAGA or SWI/SNF function significantly reduced the dynamic range of luciferase synthesis rates driven by the *GAL1* promoter (Fig. 5B). While wild-type cells continuously increase the expression rate until a galactose concentration of 0.5% is reached, *gcn5* and *snf2* mutants have truncated dose responses. Both mutants reach a maximal synthesis rate

at very low inducer concentrations, which cannot be further increased. The *gal11* and *htz1* mediator mutants revealed an even stronger reduction in the dynamic gene expression at *GAL1*. To attribute the observed loss of dynamic *GAL1* promoter activity in response to gradual increment of inducer to impaired chromatin remodeling, we next compared the changes in histone H3 occupancy among the different mutant strains. As shown in Fig. 5C, loss of SAGA, SWI/SNF, or mediator function impaired the efficient and dose-dependent histone eviction from the *GAL1* promoter. Thus, a correlation exists between efficient nucleosome removal and the gradual adaptation of *GAL1* promoter activity, which relies on the activity of the coactivator complexes investigated here. In the absence of histone variant H2AZ, we still observed efficient histone H3 remodeling at *GAL1* (Fig. 5B). Therefore, the defect of *htz1* mutants in the galactose-dependent modulation of *GAL1* gene expression is likely caused by effects other than impaired nucleosome eviction.

We next applied the same exhaustive analysis of dose-response profiling at the stress-regulated *GRE2* gene. An NaCl gradient was applied to the same set of mutants, and their dose-dependent *GRE2* expression profiles were determined (Fig. 6A). As the *GRE2* gene expression is dynamically regulated in response to increasing salt stress via modulation of its maximal expression level, we chose this parameter to identify alterations in the dose-dependent behavior of this gene. As shown in Fig. 6B, the loss of SWI/SNF activity did not affect the dose-response profile of *GRE2*. Mutations in SAGA or H2AZ caused a general reduction in the maximal *GRE2*-luciferase activities; however, a continuous increase in reporter activity was still observed in the dynamic inducer range (0.1 to 0.5 M NaCl). Loss of mediator function caused a very poor expression of *GRE2* at any salt concentration. Importantly, and different from the case for the *GAL1* gene, SWI/SNF activity is dispensable for the efficient adaptation of *GRE2* activity to increased stimulation by salt. Also, in the absence of SAGA, the absolute expression levels of *GRE2* decreased; however, the gradual increase in the maximal expression following the NaCl gradient was maintained. In conclusion, chromatin modifiers such as SWI/SNF or SAGA have distinct roles in the establishment of specific dose responses, exemplified here for the *GAL1* and *GRE2* genes.

Gradual association of Gal3 and temporally regulated recruitment of Hog1 recapitulate the different dose-response behaviors of *GAL1* and *GRE2*. The regulation of the dose-dependent expression of *GAL1* and *GRE2* depends on different mechanisms. We next investigated the signaling compounds which were responsible to establish a specific dose-response pattern at the two genes. We first focused at the specific transcription factors Gal4 and Sko1, which bind directly to the *GAL1* or *GRE2* promoter regions and confer galactose- or salt-induced transcriptional activation. We found that Gal4 binding to *GAL1* was generally stimulated by galactose but independently of the concentration tested (Fig. 7A). Sko1 binding to *GRE2* was slightly increased by low salt doses (Fig. 7B) but did not correlate with the increasing *GRE2* promoter activity observed before in this range of salt stimuli. Therefore, the differential binding of the direct transcriptional activator Gal4 or Sko1 was not a mechanism to establish the dynamic dose responses at the *GAL1* or *GRE2* gene. We then determined the association of a second class of regulators, the Gal3 inducer and the Hog1 MAP kinase. Both signaling molecules are imported into the nucleus upon stimulation, associate with the promoter regions via Gal4 or Sko1, and are required to trigger the transcriptional switch from repression to activation. As shown in

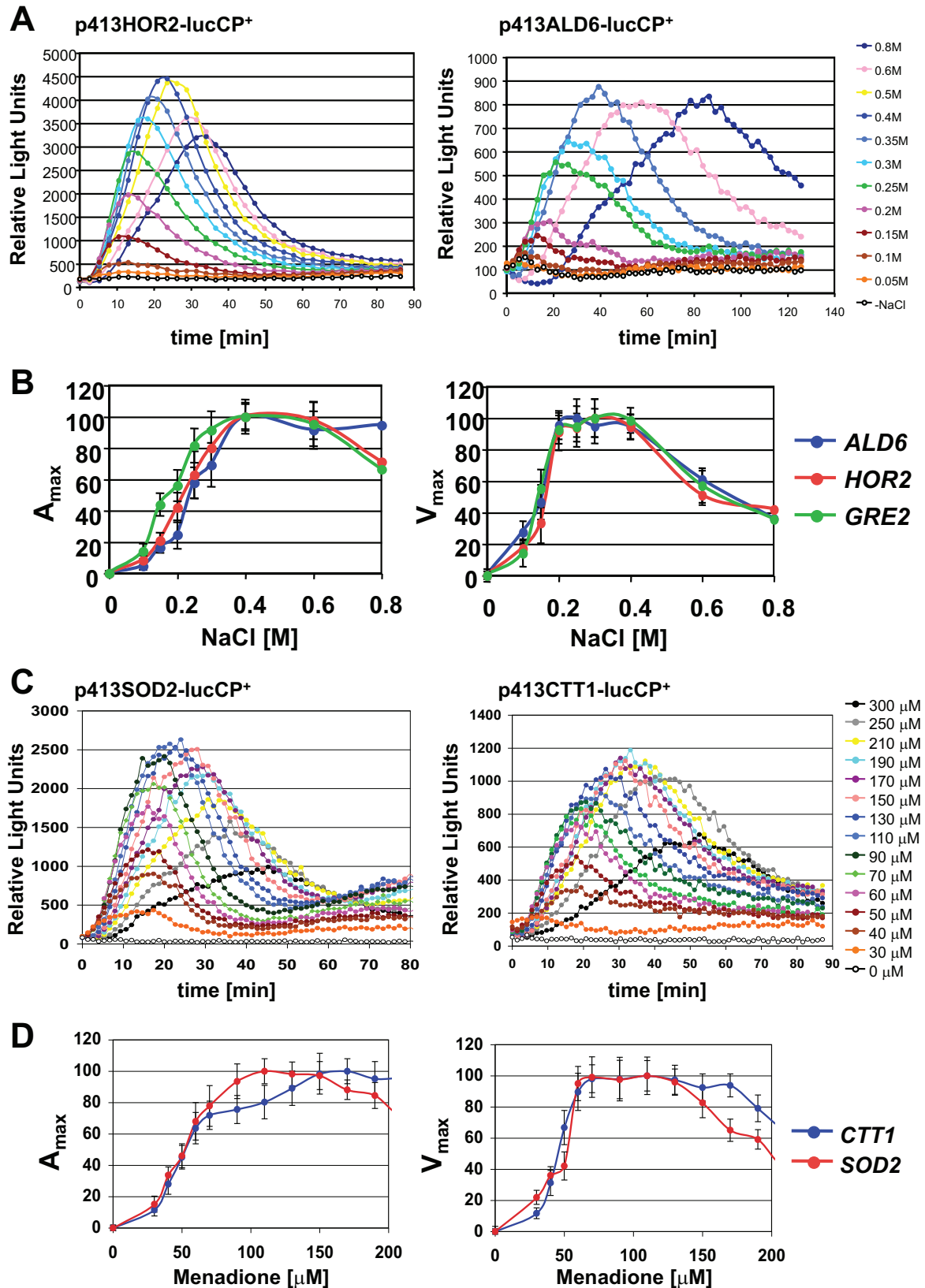


FIG 3 Dose-sensitive modulation of salt and oxidative stress-regulated yeast genes. (A) Live-cell reporter fusions with destabilized luciferase were used to determine the dose-response profiles of the *HOR2* and *ALD6* genes in response to NaCl stress. The mean values for three independent biological replicates are shown for each salt concentration (standard deviation, <15%). (B) Maximal expression levels (A_{\max}) and synthesis rates (V_{\max}) of the *ALD6*, *HOR2*, and *GRE2* genes upon NaCl stress. Error bars indicate standard deviations. For each gene, the highest value for A_{\max} or V_{\max} was adjusted to 100. (C) Live-cell reporter fusions with destabilized luciferase were used to determine the dose-response profiles of the *SOD2* and *CTT1* genes in response to menadione stress. The mean values for three independent biological replicates are shown for each menadione concentration (standard deviation, <15%). (D) Maximal expression levels (A_{\max}) and synthesis rates (V_{\max}) of the *SOD2* and *CTT1* genes upon menadione stress. Error bars indicate standard deviations. For each gene, the highest value for A_{\max} or V_{\max} was adjusted to 100.

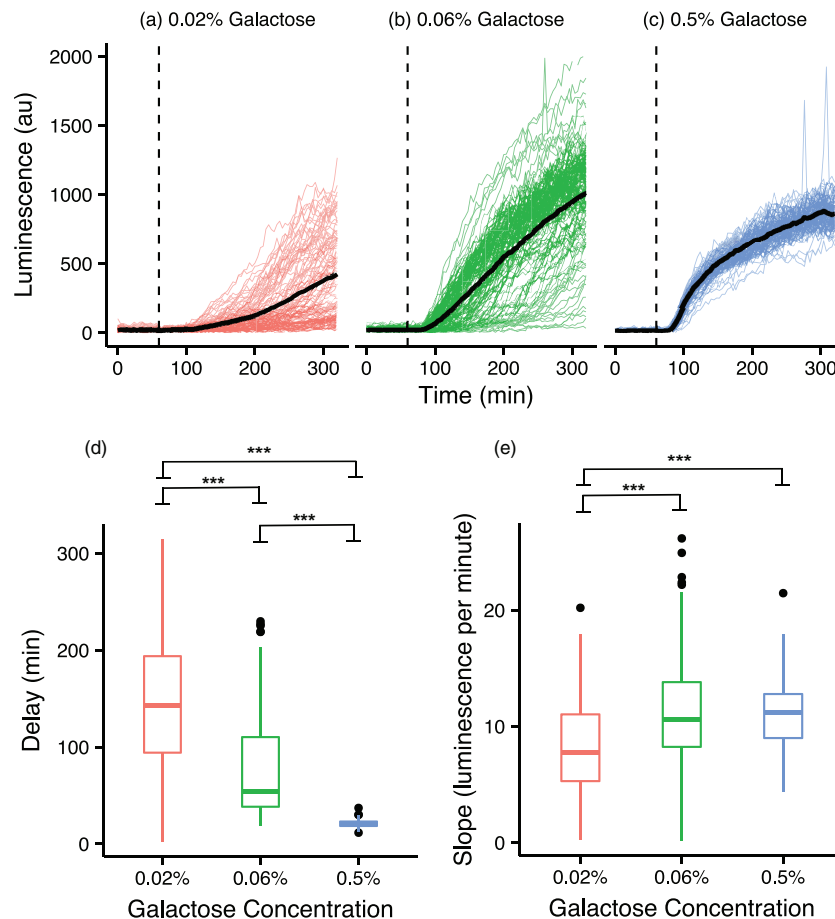


FIG 4 Graded dose response of *GAL1* expression results from a heterogeneous induction delay across the population. (a to c) Time-lapse luminescence microscopy was used to measure gene expression in single cells after induction (dashed line) in medium with 0.02, 0.06, and 0.5% galactose. Average gene expression is shown as black curve. (d and e) Distributions of the delay (d) and slope (e) of induction across different numbers of cells ($n = 90, 136, \text{ and } 97$, respectively). Statistical analysis confirms that the delay becomes longer whereas the slope is not significantly different across all galactose concentrations (***, $P < 0.001$ by Student's t test).

Fig. 7A, Gal3 association with the *GAL1* promoter increases gradually with increasing galactose concentrations. The Gal3 inducer bound slowly and less efficiently with low galactose concentrations and faster and more efficiently with higher galactose stimulation. These data correlated with the dynamic nucleosome remodeling, entry of RNAPII, and modulation of promoter activity in the same range of galactose concentrations. Of note, Gal3 association with *GAL1* in response to high galactose concentrations was transient, although expression of *GAL1* occurs for longer times. However, our observation is in agreement with previous findings that report transient Gal3 association with *GAL* genes only in the early phase of galactose induction (47).

The recruitment over time of the Hog1 MAP kinase was finally determined for increasing salt stress at *GRE2*. As shown in **Fig. 7B**, Hog1 association was indistinguishable at early time points for the different NaCl doses tested; however, Hog1 remained bound for longer times with increasing stimulus. These data correlated with the temporal regulation of gene expression, nucleosome remodeling, and RNAP II association at *GRE2* observed before. In conclusion, the different patterns of dose-dependent gene expression activity at *GAL1* and *GRE2* are recapitulated by the specific association pattern of transcriptional inducer molecules such as Gal3 or Hog1.

We finally wanted to determine whether the Gal3 inducer level was the decisive factor for the sensitivity and efficiency of *GAL* gene expression. We therefore placed the *GAL3* gene under the control of the *GAL1* promoter and monitored the effect of a gradual activation of *GAL3* by limiting galactose concentrations on the second round of *GAL1*-luciferase expression. As shown in **Fig. 7C**, the gradual increase of *GAL3* preactivation mimicked the transition from slow and insensitive to fast and highly sensitive *GAL1* gene activation. These data indicate that the Gal3 inducer level is an important determinant of regulating the dose-sensitive *GAL* gene expression.

DISCUSSION

Cells execute transcriptional programs in response to many different environmental stimuli and threats. A single cell such as a yeast cell has acquired a multitude of gene expression responses triggered by external stimuli, which is well documented by extensive literature published over the past decades. Traditionally these environmental stress responses were investigated with severe insults, which activate the signaling pathways to a maximal level. However, the adaptation to subtle changes in the cell's environment might be of more physiological importance, and generally we expect that cells are able to adapt their transcriptional re-

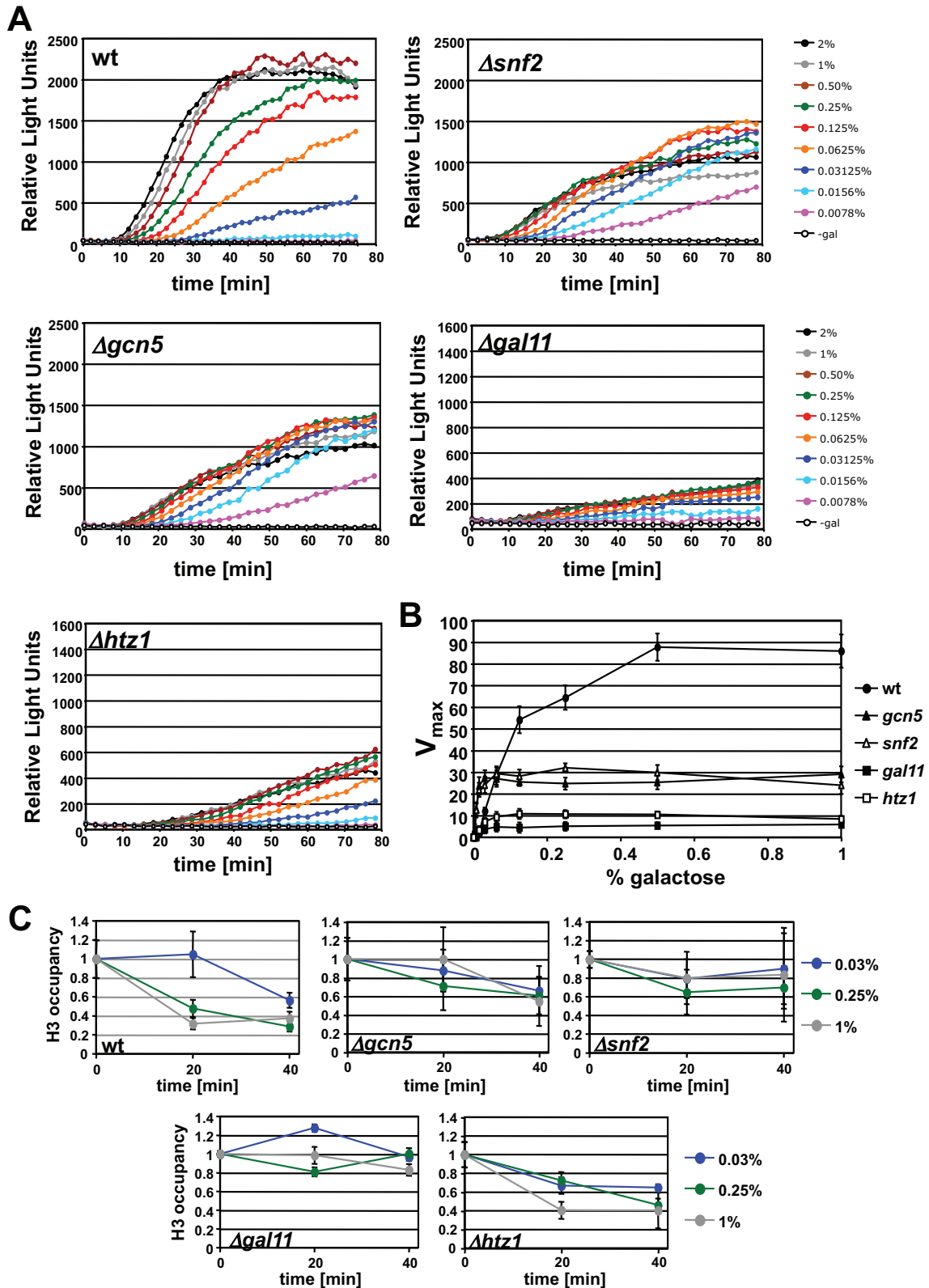


FIG 5 The efficiency of dose-sensitive regulation at *GAL1* depends on coactivator complexes and histone remodeling. (A) The *GAL1-lucCP⁺* reporter gene was used in live-cell luciferase assays in the indicated yeast strains to determine the expression rates in raffinose-containing minimal medium after supplementation with the indicated concentrations of galactose. The mean values for three independent biological replicates are shown for each galactose concentration (standard deviation, <15%). (B) Comparison of galactose-dependent modulation of *GAL1* synthesis rates. Data shown represent the mean values for the maximal synthesis rate for each galactose concentration determined in three independent biological replicates for the indicated yeast strains. Error bars indicate standard deviations. (C) Comparison of nucleosome remodeling at *GAL1* in response to increasing galactose inducer concentrations. ChIP of histone H3 was used to determine the nucleosome occupancy at the *GAL1* promoter in YP-raffinose medium before and after induction with the indicated galactose concentrations. The mean values for two independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviation.

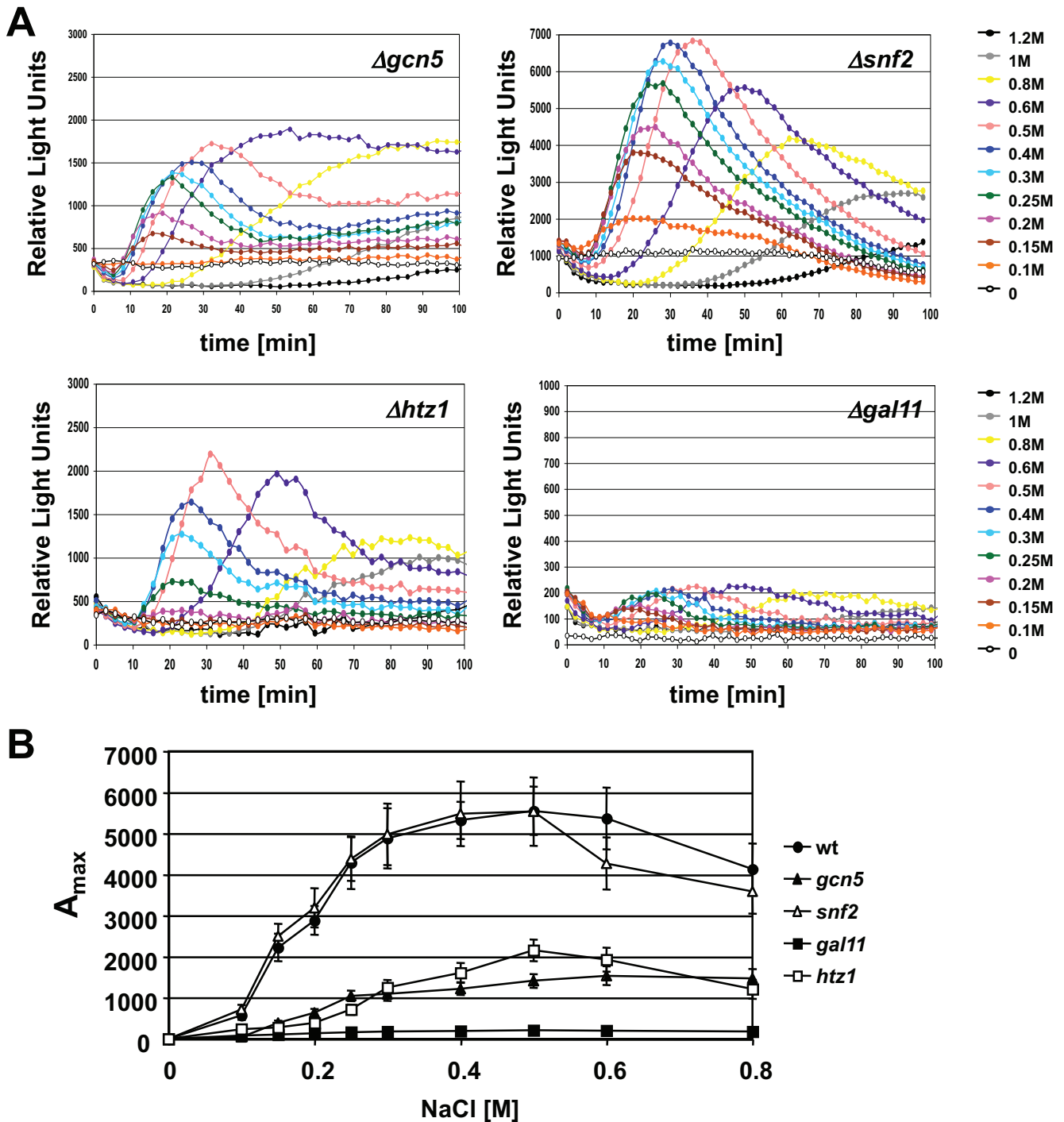
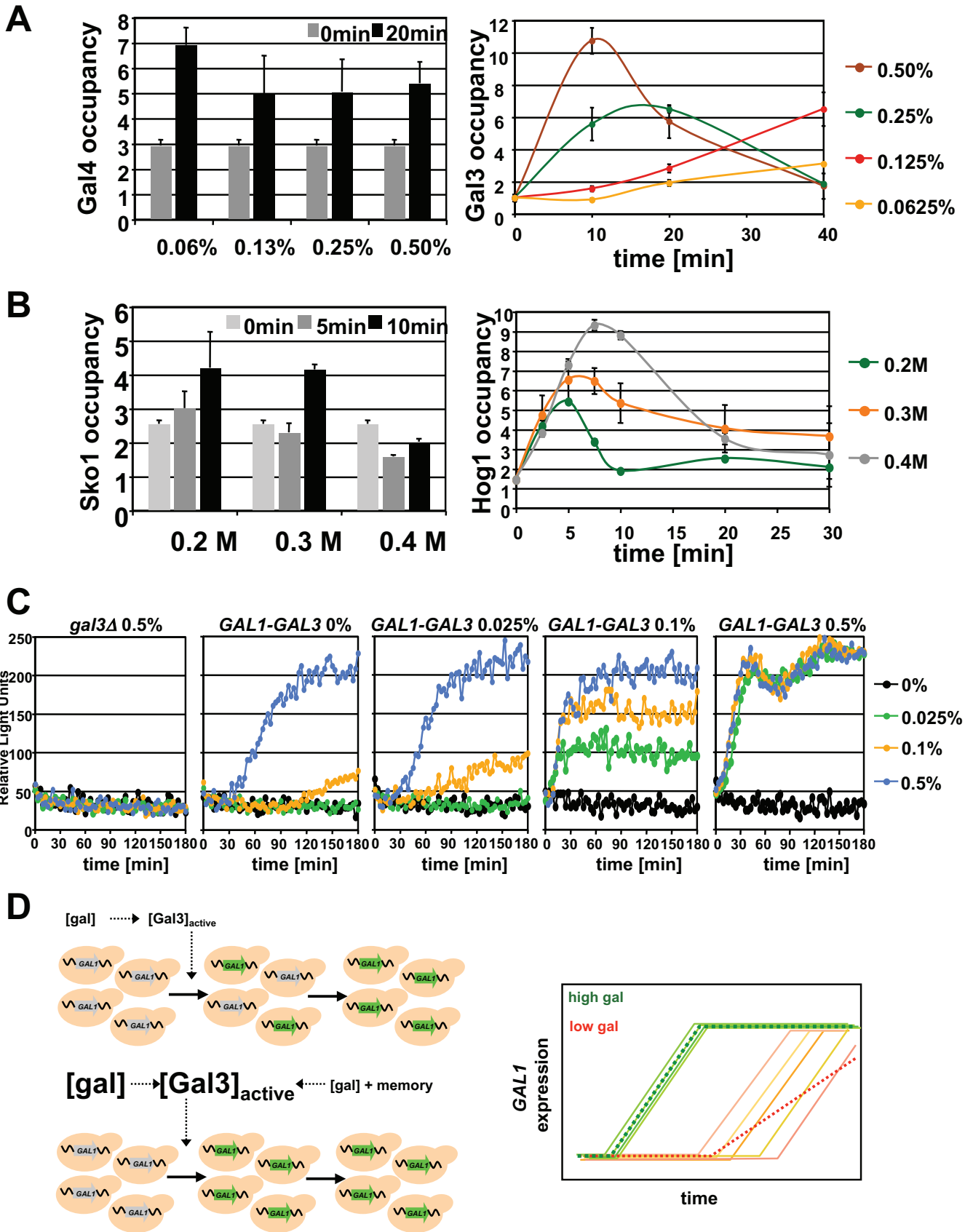


FIG 6 Function of coactivator complexes and histone H2AZ in the dose-sensitive regulation of *GRE2*. (A) The *GRE2-lucCP+* reporter gene was used in live-cell luciferase assays in the indicated mutant strains to determine the expression rates in glucose-containing minimal medium after supplementation with the indicated concentrations of NaCl. The mean values for three independent biological replicates are shown for each salt concentration (standard deviation, <15%). (B) Comparison of the NaCl-dependent modulation of *GRE2* gene expression. Data shown represent the mean values for the maximal expression rate for each salt concentration determined in three independent biological replicates. Error bars indicate standard deviations.

sponses gradually in response to the severity of the stress. It is largely unknown how gene regulatory systems adapt to these “suboptimal” signals, mostly because it is experimentally challenging to quantify the dynamic gene expression upon gradually changing stimulation. Here, the recent application of destabilized

luciferase reporters for continuous live-cell measurements in yeast turned out to be especially useful (15, 38). This real-time survey of gene expression activity reveals the dynamic range of differentially regulated groups of genes. In the case of the two genes studied in detail in cell populations here, we find a graded



dose response in concentration ranges well below the stimuli normally used for these types of genes: *GAL1* expression gradually adapts from 0.01 to 0.5% galactose, while *GRE2* expression continuously increases from 100 to 400 mM NaCl. These specific stimulus concentrations that provoke gradual outputs might reflect evolutionary adaptation to the naturally occurring environmental changes. It is important to note that the sensitivity of gene expression to a common signal, such as a nutrient or a stress, can be different for specific responsive genes. Here, the chromatin structure and the combination of different *cis*-regulatory elements in promoters have been implicated in creating characteristic dose sensitivities of yeast genes (14, 15). In our present study, we reveal different strategies that ensure an appropriate transcriptional activation corresponding to subtle environmental changes.

Galactose induction at the *GAL1* gene is slow and inefficient at threshold concentrations. This might be due to the repressive chromatin structure at the *GAL1* promoter region, which has to be overcome by the activated Gal3 inducer. The initial repressed levels of Gal3 in combination with low galactose concentrations delay the transition of *GAL1* to the on state. Consequently, the time point of active gene expression becomes much more variable for individual cells at low galactose doses; however, it is important to note that even at the lowest inducer concentrations, all cells finally actively express *GAL1* with comparable induction kinetics. Therefore, the key determinants which explain a gradual galactose response are the signaling events that permit the first round of transcription (Fig. 7D). It is likely that with few Gal3 molecules present in a cell that has not metabolized galactose over a longer time, the rate-limiting step for efficient *GAL* gene transcription is a threshold concentration of active Gal3 bound at the Gal4 transcriptional activator. In this model, the grade of active Gal3 counteracting the Gal80-mediated repression and additional recruitment of SAGA and Swi/Snf coactivators would increasingly favor *GAL1* transcriptional initiation along with growing galactose concentrations. On the other hand, the fact that the expression of *GAL3* itself is activated by galactose makes the *GAL* system especially modifiable. An inducible sensor such as Gal3 allows adaptation of the sensitivity of the *GAL* gene activation to environmental needs in a way that yeast cells, for example, which frequently encounter galactose as an energy source, would respond more readily in the following round of stimulation (33, 34). Of note, transcriptional memory in yeast has been identified predominantly at genes responsive to nutritional stimuli (31, 48). Thus, gradually regulated promoter activity over a range of metabolite concentrations with

the ability to modulate the sensitivity by specific inducible signal transducers might be a general scheme of nutrient-stimulated gene expression in yeast.

The adaptation of gene expression to different grades of cytotoxic stress seems to follow a different principle. Intuitively one might think that a gene product that functions in the detoxification of an acute stress has to be produced as soon as possible and, at least in the beginning of the stress defense, regardless of the strength of the insult. Such an “emergency” response is identified here in the case of the prototypical stress defense gene *GRE2*. At this gene, maximal levels of nucleosome eviction and preinitiation complex formation are observed almost immediately (experimentally at 2 min) after salt stress exposure. Importantly, and in contrast to the case for *GAL1*, low stress doses provoke maximal induction at *GRE2*. Our data suggest that activation of the HOG signaling pathway in the range of mild salt stress always triggers the same signal to its target promoters, which in all cases leads to full transcriptional activation in the first instances of adaptation. Only at salt concentrations above 0.4 M NaCl can a progressive delay in gene expression be observed, which can be explained by general inhibition of the transcription process and a slowdown of signal transduction at high osmolarity (49–51). Our results also indicate that the switch-like behavior is a general feature for stress-responsive promoters and not restricted to *GRE2* activation by salt stress. We therefore speculate that genes of acute stress responses might generally switch to active transcription easily and independently of the stress dose and that mainly the duration of the on state would be dictated by the strength of the stress. This regulatory mode can provide the cell the most efficient protection, as the absolute production of defense gene mRNAs continuously increases from very low stress levels to stress levels that actually start to inhibit gene expression in general (Fig. 3B). This also implies that the dynamic adaptation of gene expression to stress results not from gradual activation but from the timely shutdown of transcription, a process whose molecular basis is substantially unknown and therefore of special interest for future studies on stress regulation. In general, the osmotic and oxidative stress responses might be optimized to execute very rapid transcriptional activation, which cannot be further enhanced during transcriptional memory. In line with this assumption, the most notable effect of memory on the *GRE2* expression is a reduction in the amplitude during repeated salt stress. This reduction is produced by the accumulation of defense proteins such as the cation exporter Ena1 in the case of NaCl stress. Therefore, stress-induced genes might be

FIG 7 The Gal3 inducer and the Hog1 MAP kinase show different patterns of dose-dependent recruitment at target promoters. (A) Gal3 association with the *GAL1* promoter is gradually increased with galactose concentration. CHIP of Gal4-TAP- or Gal3-TAP-expressing yeast cells was used to determine the association of both factors with the *GAL1* promoter in synthetic raffinose medium after the indicated times of induction with different galactose concentrations. Left panel, Gal4 occupancy before and after 20 min of galactose induction; right panel, Gal3 occupancy before and after the indicated galactose induction. The mean values for three independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviations. (B) Hog1 occupancy at the *GRE2* promoter is temporally regulated in response to increasing NaCl stimuli. CHIP of Sko1-HA- or Hog1-HA-expressing yeast cells was used to determine the association of both factors with the *GRE2* promoter in synthetic glucose medium after induction with the indicated concentrations of NaCl. Left panel, Sko1 binding to *GRE2*; right panel, Hog1 recruitment at the *GRE2* promoter upon increasing salt stress. The mean values for three independent biological replicates are shown with the corresponding standard deviations. (C) Gradual induction of Gal3 confers increasing sensitivity of *GAL1* expression. The memory experiment of Fig. 1A was modified by a brief first induction with limiting galactose concentrations (depicted above the graphs). A *gal3* mutant was either transformed with the empty vector (left panel) or transformed with single-copy *GAL1prom-GAL3* (other panels). The galactose concentrations used for the second induction are given at the right. (D) Model of the dose-dependent regulation of *GAL1* expression. Low galactose concentrations provoke slow and heterogeneous promoter activation at the level of individual cells. The time needed for engagement of most of the cells in active transcription is long, while high galactose concentrations (or a low galactose stimulus after previous induction) provoke a fast and homogeneous transition to the on state. This regulation leads to a gradual reduction of *GAL1* expression levels in a cell population (depicted at the right). Shown is single-cell *GAL1* expression upon high and low galactose stimulation, with the dotted lines indicating the population average.

modulated predominantly by the cellular defense capacity, which determines the time needed to maintain maximal gene expression. It is worth noting that a positive memory effect has been reported recently for the yeast response to oxidative stress when the cells were previously treated with a mild dose of salt (52). Future work might therefore reveal the importance of acquired resistance versus transcriptional memory for different stress types and doses.

The nuclear expression of both *GAL1* and *GRE2* is modulated by signals which originate in the cytoplasm and are then sent to the chromosomal genes via signaling proteins Gal3 and Hog1, respectively. Galactose-bound Gal3 and phosphorylated Hog1 physically interact with their target genes through DNA-bound transcription factors. Here we show that the dynamics of Gal3 or Hog1 association during gradual stimulation faithfully reflect the grade of chromatin remodeling, RNAPII density, and transcriptional output of the regulated genes. Therefore, Gal3 and Hog1 are very likely to be responsible for the specific dose responses observed at their target genes. Importantly, Gal3 protein levels in the uninduced state are very low, which explains the need for high inducer concentrations to efficiently switch on transcription of *GAL* genes. In contrast, Hog1 protein levels are constitutively high (approximately 10-fold more abundant than uninduced Gal3 [36]) independently from the stress condition, thereby ensuring maximal signaling rates at low stress doses. Of note, the increasingly longer, but not more efficient, association of Hog1 with its *GRE2* target promoter reported here is in agreement with gradually longer phosphorylation of the MAP kinase upon increasing salt stimulation (53). An additional layer of regulation might affect the chromatin structure at stress- versus nutrient-regulated genes. In the case of *GAL1*, nucleosome remodeling seems to be more important to achieve efficient transcription, and accordingly, we find that the Swi/Snf and SAGA chromatin modifiers are crucial for the dynamic increase of *GAL1* activity. In the case of *GRE2*, nucleosome remodeling either might occur in a much easier fashion or might be less important for activated transcription. This notion is supported by our finding that Swi/Snf is completely dispensable for the dose-dependent *GRE2* regulation, and even in the absence of SAGA, the transcriptional output is gradually stimulated by increasing salt stress. Both coactivator complexes, however, have been shown to be recruited to the *GRE2* promoter upon salt shock (30). Taking our findings together, gradual stimulation of inducible yeast genes can be conferred by different principles, i.e., modulation of the time in the “on” state in the case of stress genes or gradual modulation of the transition to the “on” state in the case of nutrient-regulated genes. The efficiency of signal transduction is a key determinant for the type of response, and its reinforcement during memory provides a way to switch from one mode to another.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-23326), Generalitat de Valencia (ACOMP2011/031), and the NIH Director’s New Innovator Award (DP2 OD008654-01). Alessandro Rienzo was a recipient of a predoctoral FPI grant from Ministerio de Economía y Competitividad.

We thank J. M. Mulet for the kind gift of the *ENA1* overexpression plasmid pRS699-ENA1.

REFERENCES

1. Gasch AP, Werner-Washburne M. 2002. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* 2:181–192. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-002-0058-2>.
2. Hahn S, Young ET. 2011. Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* 189:705–736. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.127019>.
3. Dos Santos SC, Teixeira MC, Cabrito TR, Sa-Correia I. 2012. Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Front Genet* 3:63. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2012.00063>.
4. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11:4241–4257. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>.
5. Martinez-Montanes F, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2010. Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmolarity in yeast. *OMICS* 14:619–627. <http://dx.doi.org/10.1089/omi.2010.0046>.
6. Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190:1157–1195. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.128033>.
7. de Nadal E, Ammerer G, Posas F. 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* 12:833–845. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3055>.
8. Takahashi S, Pryciak PM. 2008. Membrane localization of scaffold proteins promotes graded signaling in the yeast MAP kinase cascade. *Curr Biol* 18:1184–1191. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.050>.
9. Cai L, Dalal CK, Elowitz MB. 2008. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature* 455:485–490. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07292>.
10. Giorgetti L, Siggers T, Tiana G, Caprara G, Notarbartolo S, Corona T, Pasparakis M, Milani P, Bulyk ML, Natoli G. 2010. Noncooperative interactions between transcription factors and clustered DNA binding sites enable graded transcriptional responses to environmental inputs. *Mol Cell* 37:418–428. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.016>.
11. Hao N, O’Shea EK. 2012. Signal-dependent dynamics of transcription factor translocation controls gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 19:31–39. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2192>.
12. Stewart-Ornstein J, Nelson C, DeRisi J, Weissman JS, El-Samad H. 2013. Msn2 coordinates a stoichiometric gene expression program. *Curr Biol* 23:2336–2345. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.043>.
13. Hao N, Budnik BA, Gunawardena J, O’Shea EK. 2013. Tunable signal processing through modular control of transcription factor translocation. *Science* 339:460–464. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1227299>.
14. Lam FH, Steger DJ, O’Shea EK. 2008. Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* 453:246–250. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06867>.
15. Dolz-Edo L, Rienzo A, Poveda-Huertes D, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2013. Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol Cell Biol* 33:2228–2240. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00240-13>.
16. Sellick CA, Campbell RN, Reece RJ. 2008. Galactose metabolism in yeast—structure and regulation of the leloir pathway enzymes and the genes encoding them. *Int Rev Cell Mol Biol* 269:111–150. [http://dx.doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01003-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01003-4).
17. Kumar PR, Yu Y, Sternglanz R, Johnston SA, Joshua-Tor L. 2008. NADP regulates the yeast GAL induction system. *Science* 319:1090–1092. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1151903>.
18. Thoden JB, Ryan LA, Reece RJ, Holden HM. 2008. The interaction between an acidic transcriptional activator and its inhibitor. The molecular basis of Gal4p recognition by Gal80p. *J Biol Chem* 283:30266–30272. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M805200200>.
19. Egriboz O, Jiang F, Hopper JE. 2011. Rapid GAL gene switch of *Saccharomyces cerevisiae* depends on nuclear Gal3, not nucleocytoplasmic trafficking of Gal3 and Gal80. *Genetics* 189:825–836. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.131839>.
20. Jiang F, Frey BR, Evans ML, Friel JC, Hopper JE. 2009. Gene activation by dissociation of an inhibitor from a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 29:5604–5610. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00632-09>.
21. Lavy T, Kumar PR, He H, Joshua-Tor L. 2012. The Gal3p transducer of the GAL regulon interacts with the Gal80p repressor in its ligand-induced

- closed conformation. *Genes Dev* 26:294–303. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.182691.111>.
22. Bhaumik SR, Green MR. 2001. SAGA is an essential *in vivo* target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev* 15:1935–1945. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.911401>.
 23. Brown CE, Howe L, Sousa K, Alley SC, Carrozza MJ, Tan S, Workman JL. 2001. Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* 292:2333–2337. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1060214>.
 24. Jeong CJ, Yang SH, Xie Y, Zhang L, Johnston SA, Kodadek T. 2001. Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry* 40:9421–9427. <http://dx.doi.org/10.1021/bi010011k>.
 25. Koh SS, Ansari AZ, Ptashne M, Young RA. 1998. An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* 1:895–904. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80088-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80088-X).
 26. Larschan E, Winston F. 2001. The *S. cerevisiae* SAGA complex functions *in vivo* as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev* 15:1946–1956. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.911501>.
 27. Lemieux K, Gaudreau L. 2004. Targeting of Swi/Snf to the yeast GAL1 UAS G requires the Mediator, TAF IIs, and RNA polymerase II. *EMBO J* 23:4040–4050. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600416>.
 28. de Nadal E, Posas F. 2010. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* 29:4–13. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.346>.
 29. Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R, Posas F. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* 20:1123–1133. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.5.1123>.
 30. 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00557-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00557-9).
 31. Brickner DG, Cajigas J, Fondufe-Mittendorf Y, Ahmed S, Lee PC, Wadom J, Brickner JH. 2007. H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 5:e81. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050081>.
 32. Kundu S, Horn PJ, Peterson CL. 2007. SWI/SNF is required for transcriptional memory at the yeast GAL gene cluster. *Genes Dev* 21:997–1004. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1506607>.
 33. Kundu S, Peterson CL. 2010. Dominant role for signal transduction in the transcriptional memory of yeast GAL genes. *Mol Cell Biol* 30:2330–2340. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01675-09>.
 34. Zacharioudakis I, Gligoris T, Tzamarias D. 2007. A yeast catabolic enzyme controls transcriptional memory. *Curr Biol* 17:2041–2046. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.044>.
 35. Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Veronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285:901–906. <http://dx.doi.org/10.1126/science.285.5429.901>.
 36. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425:737–741. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02046>.
 37. Mason PB, Struhl K. 2003. The FACT complex travels with elongating RNA polymerase II and is important for the fidelity of transcriptional initiation *in vivo*. *Mol Cell Biol* 23:8323–8333. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.22.8323-8333.2003>.
 38. Rienzo A, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2012. The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast* 29:219–231. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.2905>.
 39. Alberti S, Gitler AD, Lindquist S. 2007. A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24:913–919. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1502>.
 40. Mazo-Vargas A, Park H, Aydin M, Buchler NE. 2014. Measuring fast gene dynamics in single cells with time-lapse luminescence microscopy. *Mol Biol Cell* 25:3699–3708. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E14-07-1187>.
 41. Kuras L, Struhl K. 1999. Binding of TBP to promoters *in vivo* is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* 399:609–613. <http://dx.doi.org/10.1038/21239>.
 42. Kvarnstrom M, Logg K, Diez A, Bodvard K, Kall M. 2008. Image analysis algorithms for cell contour recognition in budding yeast. *Opt Express* 16:12943–12957. <http://dx.doi.org/10.1364/OE.16.012943>.
 43. Acar M, Becskei A, van Oudenaarden A. 2005. Enhancement of cellular memory by reducing stochastic transitions. *Nature* 435:228–232. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03524>.
 44. Acar M, Pando BF, Arnold FH, Elowitz MB, van Oudenaarden A. 2010. A general mechanism for network-dosage compensation in gene circuits. *Science* 329:1656–1660. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1190544>.
 45. Biggar SR, Crabtree GR. 2001. Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *EMBO J* 20:3167–3176. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.12.3167>.
 46. Gandhi SJ, Zenklusen D, Lionnet T, Singer RH. 2011. Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated. *Nat Struct Mol Biol* 18:27–34. <http://dx.doi.org/10.1038/nsm.1934>.
 47. Abramczyk D, Holden S, Page CJ, Reece RJ. 2012. Interplay of a ligand sensor and an enzyme in controlling expression of the *Saccharomyces cerevisiae* GAL genes. *Eukaryot Cell* 11:334–342. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.05294-11>.
 48. Ahmed S, Brickner JH. 2007. Regulation and epigenetic control of transcription at the nuclear periphery. *Trends Genet* 23:396–402. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.009>.
 49. Babazadeh R, Adiels CB, Smedh M, Petelenz-Kurziel E, Goksoy M, Hohmann S. 2013. Osmostress-induced cell volume loss delays yeast Hog1 signaling by limiting diffusion processes and by Hog1-specific effects. *PLoS One* 8:e80901. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080901>.
 50. Miermont A, Waharte F, Hu S, McClean MN, Bottani S, Leon S, Hersen P. 2013. Severe osmotic compression triggers a slowdown of intracellular signaling, which can be explained by molecular crowding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5725–5730. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1215367110>.
 51. Proft M, Struhl K. 2004. MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* 118:351–361. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.016>.
 52. Guan Q, Haroon S, Bravo DG, Will JL, Gasch AP. 2012. Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192:495–505. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.143016>.
 53. Pelet S, Rudolf F, Nadal-Ribelles M, de Nadal E, Posas F, Peter M. 2011. Transient activation of the HOG MAPK pathway regulates bimodal gene expression. *Science* 332:732–735. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1198851>.