

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Adaptación a estrés osmótico
en *Saccharomyces cerevisiae* :**

**Caracterización genómica de factores de
transcripción involucrados y represión de
la biosíntesis de ergosterol**

TESIS DOCTORAL

Fernando Martínez Montañés

DIRECTORES

Markus Proft

Amparo Pascual-Ahuir Giner



D. **Markus Proft**, Doctor en Ciencias Biológicas, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas y D. **Amparo Pascual-Ahuir Giner**, Doctora en Ciencias Biológicas, Profesora contratada Doctor del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN:

Que D. **Fernando Martínez Montañés**, Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de investigación que lleva por título **“Adaptación a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae*: caracterización genómica de factores de transcripción involucrados y represión de la biosíntesis de ergosterol”**.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, en noviembre de 2010.

Dr. Markus Proft

Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner.

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2005-01714) y por la ayuda concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-00271) 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) del Ministerio de Educación y Ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral no hubiera podido ser escrita bajo mi pluma si mis profesores de licenciatura, Ramón Serrano y Consuelo Montesinos -Ramón y Mariche-, no me hubieran animado a proseguir mi formación con estudios de doctorado ni me hubieran recomendado ponerme en contacto con Markus Proft y Amparo Pascual-Ahuir -Markus y Payo-. Les estaré siempre muy agradecido por haberme guiado en este camino que sin lugar a dudas volvería a tomar tantas veces fuera necesario si tuviera la oportunidad de retroceder en el tiempo.

Payo y Markus no sólo me han enseñado el método científico, el cual saben aplicar con la rigurosidad que caracteriza al buen investigador; me han tratado siempre con mucho cariño e infinita paciencia. Además han sabido alentarme en los momentos difíciles y bajo su tutela he aprendido cómo debe actuar un científico serio y honrado. Siempre les tendré como un magnífico ejemplo de humildad, rectitud, honestidad e inteligencia bien encauzada.

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación he tenido la suerte de compartir laboratorio con otros científicos de la misma envergadura que mis directores de tesis, como José Ramón Murguía -Joserra- y Lynne Yenush. De Joserra he aprendido muchísimo, tanto a nivel científico como a nivel personal y me siento orgulloso de tenerle como maestro y amigo. También quisiera hacer constancia, con rotunda sinceridad, la enorme valía de Lynne como investigadora y mentora. Ha sido un auténtico honor trabajar cerca de ellos y disponer en cualquier momento de sus acertados consejos. También extendiendo mi gratitud a José Miguel Mulet -JM- por la ayuda prestada durante la realización de este trabajo.

Por supuesto, no puedo ni quiero concluir este apartado de agradecimientos sin hacer una cordial mención a todos los compañeros que he tenido la suerte de conocer en mi periplo en la Universidad Politécnica de Valencia, desde la dura etapa en el laboratorio de prácticas de la Escuela de Ingenieros Agrónomos al último periodo en el laboratorio 1.09 del IBMCP. Ha sido todo un placer compartir banco de trabajo, alegrías, penas, abrazos y risas con cada uno de ellos. En mí tienen un fiel amigo.

Esta tesis doctoral va dedicada a todos los miembros de mi amada familia, pues todo lo que soy en esta vida es gracias a ellos. Mi corazón está formado por un pedacito de cada uno de vosotros y soy tremendamente afortunado por teneros a mi lado.

También mis amigos más allegados merecen mi afectuosa dedicatoria. Bien sabéis quienes sois. Agradezco vuestra preocupación, consejos, interés por los resultados obtenidos e incondicional apoyo.

Por último, todo el esfuerzo plasmado en este trabajo va dedicado especialmente a Marta Moreno Torres: mi pareja, mi amiga, mi fuente de felicidad y ojalá mi eterna compañía. Sólo tú sabes lo que ha costado todo esto y sólo tú mereces que concluya mis agradecimientos escribiendo, con absoluta admiración, tu nombre.

El autor,

Valencia, a 21 de octubre de 2010.

RESUMEN

Tanto en la naturaleza como en procesos industriales, *Saccharomyces cerevisiae* se ve sometida a diferentes situaciones adversas para su crecimiento, como lo son las condiciones de estrés oxidativo y osmótico. El estrés osmótico desencadena una respuesta compleja en células eucariotas para sobrevivir, reparar daños y ajustar la célula a las nuevas condiciones. La adaptación afecta a funciones fisiológicas muy distintas y conlleva a la inducción de la expresión de genes de defensa a través de la activación de rutas de transducción de señales. Las cascadas de MAP quinasas se encuentran entre las rutas más importantes e investigadas, puesto que están conservadas en todos los organismos eucariotas superiores. Una vez activadas, las MAP quinasas desatan complejos programas transcripcionales. La ruta HOG responde específicamente a estrés osmótico y está conservada en levaduras, plantas y mamíferos. Su MAP quinasa Hog1p se activa rápidamente y coordina una respuesta adaptativa a distintos niveles fisiológicos, como la modulación de la actividad de los transportadores de iones en la membrana citoplasmática, la parada del ciclo celular, la modulación de la traducción de mRNAs y la activación transcripcional de cientos de genes en el núcleo.

La respuesta transcripcional para la adaptación a estrés osmótico es sorprendentemente compleja, por lo que la cuantificación de la unión directa a la cromatina de cada factor de transcripción implicado es la mejor forma experimental para comprender la organización genómica del programa transcripcional durante estrés osmótico. La inmunoprecipitación de cromatina combinada con microensayos (ChIP-Chip) ya se ha aplicado con éxito a proteínas que son reclutadas a la cromatina. Previamente al comienzo de esta investigación, se llevó a cabo un primer ensayo ChIP-Chip para uno de los factores de transcripción bajo la ruta HOG, Sko1p. Este análisis identificó como blancos de Sko1p los promotores de genes que codifican otros reguladores, como Mot3p y Rox1p.

En este trabajo se ha realizado un estudio detallado de la función de los factores de transcripción Mot3p y Rox1p durante la adaptación celular a estrés. Los resultados obtenidos sugieren que ambos represores transcripcionales regulan la expresión de

genes de la biosíntesis de ergosterol bajo estrés osmótico en un proceso controlado por la MAP quinasa Hog1p. Además, en otra vía de control, se ha demostrado la regulación negativa del principal activador de la expresión de los genes *ERG*, Ecm22p, a través de los factores Mot3p, Rox1p y de Hog1p. La represión de la biosíntesis de ergosterol ha sido demostrada a su vez en condiciones de estrés oxidativo, aunque la respuesta en este caso es sólo parcialmente dependiente de Mot3p/Rox1p y Hog1p. Por último, se ha mostrado que la mutación *upc2-1* confiere una alta sensibilidad a estrés salino y oxidativo debido a una mayor acumulación de ergosterol y a la sobreexpresión de los genes *ERG2* y *ERG11*, demostrando así la importancia fisiológica de la bajada de los niveles de ergosterol para la adaptación a estrés.

Por otra parte, esta tesis doctoral ha aportado interesante información sobre la compleja red de regulación transcripcional que opera bajo estrés osmótico en levadura. La aplicación de la tecnología ChIP-Chip y ChIP-Seq ha permitido la obtención de nuevos datos de localización a lo largo del genoma de levadura de los factores de transcripción Hot1p y Smp1p -blancos directos de la MAP quinasa Hog1p- y del regulador Mot3p. El estudio detallado de Hot1p ha verificado su unión a genes involucrados en el transporte y biosíntesis de glicerol y se ha propuesto un nuevo sitio consenso de unión en sus pocos blancos en el genoma de levadura. Sin embargo, Mot3p se une tanto a promotores de genes que se inducen como que se reprimen por estrés osmótico, añadiendo complejidad a su papel en la adaptación al estrés. Por último, en el caso de Smp1p, se ha revelado una inesperada unión en los ORF de genes osmoinducibles, sugiriendo la posibilidad de revisar su papel descrito como factor de iniciación de la transcripción.

RESUM

Tant en la naturalesa com en processos industrials, *Saccharomyces cerevisiae* es veu sotmesa a diferents situacions adverses per al seu creixement, com ho són les condicions d'estrés oxidatiu i osmòtic. L'estrés osmòtic desencadena una resposta complexa en cèl·lules eucariotes per a sobreviure, reparar danys i ajustar la cèl·lula a les noves condicions. L'adaptació afecta funcions fisiològiques molt distintes i comporta la inducció de l'expressió de gens de defensa a través de l'activació de rutes de transducció de senyals. Les cascades de MAP quinases es troben entre les rutes més importants i investigades, ja que estan conservades en tots els organismes eucariotes superiors. Una vegada activades, les MAP quinases deslliguen complexos programes transcripcionals. La ruta HOG respon específicament a estrés osmòtic i està conservada en llevats, plantes i mamífers. La seua MAP quinasa Hog1p s'activa ràpidament i coordina una resposta adaptativa a distints nivells fisiològics, com la modulació de l'activitat dels transportadors d'ions en la membrana citoplasmàtica, la parada del cicle cel·lular, la modulació de la traducció de mRNAs i l'activació transcripcional de centenars de gens en el nucli.

La resposta transcripcional per a l'adaptació a estrés osmòtic és sorprenentment complexa, per la qual cosa la quantificació de la unió directa a la cromatina de cada factor de transcripció implicat és la millor forma experimental per a comprendre l'organització genòmica del programa transcripcional durant estrés osmòtic. La immunoprecipitació de cromatina combinada amb microassajos (ChIP-Chip) ja s'ha aplicat amb èxit a proteïnes que són reclutades a la cromatina. Prèviament al començament d'esta investigació, es va dur a terme un primer assaig ChIP-Chip per a un dels factors de transcripció davall la ruta HOG, Sko1p. Esta anàlisi va identificar com a blancs de Sko1p els promotors de gens que codifiquen altres reguladors, com Mot3p i Rox1p. En este treball s'ha realitzat un estudi detallat de la funció dels factors de transcripció Mot3p i Rox1p durant l'adaptació cel·lular a estrés. Els resultats obtinguts suggerixen que ambdós repressors transcripcionals regulen l'expressió de gens de la biosíntesi d'ergosterol baix estrés osmòtic en un procés controlat per la MAP quinasa Hog1p. A més, en una altra via de control, s'ha demostrat la regulació negativa del

principal activador de l'expressió dels gens *ERG*, *Ecm22p*, a través dels factors *Mot3p*, *Rox1p* i d'*Hog1p*. La repressió de la biosíntesi d'ergosterol ha sigut demostrada de la mateixa manera en condicions d'estrés oxidatiu, encara que la resposta en este cas és només parcialment dependent de *Mot3p/Rox1p* i *Hog1p*. Finalment, s'ha mostrat que la mutació *upc2-1* conferix una alta sensibilitat a estrés salí i oxidatiu a causa d'una major acumulació d'ergosterol i a la sobreexpressió dels gens *ERG2* i *ERG11*, demostrant així la importància fisiològica de la baixada dels nivells d'ergosterol per a l'adaptació a estrés.

D'atra banda, esta tesi doctoral ha aportat interessant informació sobre la complexa xarxa de regulació transcripcional que opera baix estrés osmòtic en llevat. L'aplicació de la tecnologia ChIP-Chip i ChIP-Seq ha permés l'obtenció de noves dades de localització al llarg del genoma de llevat dels factors de transcripció *Hot1p* i *Smp1p* - blancs directes de la MAP quinasa *Hog1p*- i del regulador *Mot3p*. L'estudi detallat d'*Hot1p* ha verificat la seua unió a gens involucrats en el transport i biosíntesi de glicerol i s'ha proposat un nou lloc consens d'unió en els seus pocs blancs en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. No obstant això, *Mot3p* s'unix tant a promotors de gens que s'indueixen com que es reprimixen per estrés osmòtic, afegint complexitat al seu paper en l'adaptació a l'estrés. Finalment, en el cas de *Smp1p*, s'ha revelat una inesperada unió en els *ORF* de gens osmoinduïbles, suggerint la possibilitat de revisar el seu paper descrit com a factor d'iniciació de la transcripció.

ABSTRACT

Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is exposed to different adverse growth conditions, such as osmotic or oxidative stress, both in nature and in industrial processes. Osmotic stress triggers a complex response in eukaryotic cells in order to survive, repair damage and adjust the cells to the new environmental conditions. This adaptation affects multiple physiological functions and entails the induction of defense gene expression through the activation of signaling transduction pathways. MAP kinase cascades are among the most important pathways to respond to stress, and they are evolutionarily conserved in all higher eukaryotes. Specifically, the HOG (High Osmolarity Glycerol) pathway responds to hyperosmotic stress and is conserved in yeast, plants and mammals. Its Hog1p MAP kinase is quickly activated upon stress and coordinates an adaptive response at several physiological levels such as the modulation of ion transport activity at the plasma membrane, the transition through the cell cycle, mRNA translation and transcriptional activation of hundreds of genes in the nucleus.

The transcriptional program upon osmotic stress is surprisingly complex in yeast and involves several partially redundant transcription factors. Therefore, the quantification of the direct binding of these factors to chromatin is the best experimental procedure to understand the genomic organization of the transcriptional program during osmotic stress. The technology of chromatin immunoprecipitation combined with microarrays (ChIP-Chip) has already been successfully applied to several transcription factors and proteins that are recruited to chromatin.

Previously, ChIP-Chip analyses were carried out for Sko1p, a transcription factor under control of the HOG pathway. This analysis identified the promoters of genes encoding several other regulators, such as Mot3p and Rox1p, as Sko1p targets.

In this work a detailed study of the function of Mot3p and Rox1p during cellular stress adaptation has been carried out. The obtained results suggest that both transcriptional repressors regulate the expression of ergosterol biosynthesis genes upon osmotic stress in a process which is controlled by the Hog1p MAP kinase.

Furthermore, another control level has been identified here, which consists in the transcriptional down regulation of *ECM22* encoding the main *ERG* gene activator, through Mot3p, Rox1p and Hog1p. Repression of ergosterol biosynthesis also occurs in oxidative stress conditions, although in this case the response is only partially dependent of Mot3p/Rox1p and Hog1p. Finally, it has been shown that the *upc2-1* mutation confers severe sensitivity to salt and oxidative stress due to the hyper accumulation of ergosterol and overexpression of *ERG2* and *ERG11*. These results highlight the relevance of the modulation of ergosterol levels to stress adaptation in yeast cells.

On the other hand, this thesis reveals interesting data about the complex transcriptional regulation network that operates upon osmotic stress in yeast. ChIP-Chip and ChIP-Seq technology contribute new information about the genome-wide location of the transcription factors Hot1p and Smp1p, direct targets of the Hog1p MAP kinase, and the Mot3p regulator. Detailed studies of Hot1p prove its binding to genes involved in glycerol transport and biosynthesis, and a new consensus site has been proposed for Hot1 binding to the limited set of genomic targets. Mot3p binds both osmo-inducible and -repressible promoters, adding complexity to its function in stress adaptation. Finally, in the case of Smp1p, an unexpected binding within the coding sequences of osmoinducible genes has been shown, suggesting a function of Smp1p beyond transcriptional initiation.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras	VII
Índice de tablas	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
¿Cómo responde <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a los cambios en las condiciones ambientales? .	3
1. Circuitos de percepción y transducción de señales en levadura	4
2. La ruta HOG de respuesta a estrés hiperosmótico.	5
3. Papel de la quinasa Hog1 en la respuesta y adaptación a estrés osmótico.....	9
Respuesta a estrés osmótico a nivel transcripcional	13
4. Factores de transcripción identificados bajo la ruta HOG.	13
5. Conexión ente la ruta HOG y otras rutas de respuesta a estrés en levadura.	22
6. Redes de regulación transcripcional bajo estrés osmótico.....	24
7. Impacto del estrés osmótico en la expresión génica global	27
Regulación negativa de la expresión génica bajo estrés osmótico: biosíntesis de ergosterol 29	
8. Estructura y funciones de la membrana plasmática	29
9. Biosíntesis de esteroides en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
10. Control transcripcional de la síntesis de ergosterol en levadura.....	34
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2- Medios de crecimiento y tratamientos aplicados a los cultivos	44
4. Plásmidos empleados.....	46
5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados	47
6. Ensayos de sensibilidad en medio sólido y líquido	48
7. Técnicas estándar de laboratorio empleadas	49
8. Análisis <i>Western Blot</i>	55
9. Análisis de expresión de RNA mensajeros (Northern Blot)	59
10. Cuantificación de ergosterol total de células de levadura.....	62
11. Disrupción génica con el sistema <i>loxP-CRE</i> y rescate con gen marcador	64
12. Medición de la concentración intracelular de iones.....	65
13. Etiquetado de proteínas con epitopos myc o HA.	65
14. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	67

15.	Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real con EVA Green™	71
16.....	Ensayo de localización genómica en micromatrices con sondas solapantes (<i>ChIP-on-Chip on Tiling Microarrays</i>)	72
17.	Secuenciación masiva de cromatina inmunoprecipitada (ChIP-Seq).....	79
18.	Estudio de interacciones regulatorias mediante herramientas informáticas.....	84
RESULTADOS		87
1.	Mot3p y Rox1p son importantes para el crecimiento y la modulación de los niveles de ergosterol bajo estrés salino	91
2.	La represión de la expresión de algunos genes <i>ERG</i> depende de Mot3p, Rox1p y de la MAP quinasa Hog1p.....	95
3.	Hog1p controla el reclutamiento de la RNA Pol II en respuesta a estrés osmótico de forma positiva y negativa	98
4.	El represor Mot3p ocupa el promotor de <i>ERG2</i> bajo estrés salino dependientemente de Hog1	101
5.	La regulación de la biosíntesis de ergosterol bajo estrés implica la represión transcripcional de <i>ECM22</i>	103
6.	La adaptación a estrés oxidativo también implica la represión de genes <i>ERG</i> y la regulación de la biosíntesis de ergosterol.....	105
7.	La mutación <i>upc2-1</i> provoca la pérdida de regulación de los niveles de ergosterol y de la expresión de los genes <i>ERG</i>	107
8.	Los mutantes <i>mot3rox1</i> y <i>upc2-1</i> también son hipersensibles a estrés causado por otros cationes tóxicos.....	112
9.	La regulación del nivel de ergosterol en células de levadura es fisiológicamente relevante para la adaptación a estrés.	113
	En <i>Saccharomyces cerevisiae</i> existe una red de regulación transcripcional en respuesta a estrés osmótico	123
	Localización genómica de los reguladores Hot1p y Mot3p bajo estrés osmótico (ChIP-Chip)	126
1.	El análisis ChIP-Chip revela muy pocas regiones blanco de Hot1p <i>in vivo</i> a lo largo del genoma de levadura	127
2.	La ocupación de regiones intergénicas por Hot1p coincide con una mayor expresión de los genes adyacentes.	129
3.	Hot1p regula a un discreto grupo de genes osmoinducibles.....	132
4.	El análisis de los promotores blanco de Hot1p sugiere un nuevo sitio consenso de unión al DNA.....	134
5.	Mot3p se une <i>in vivo</i> tanto a promotores de genes inducidos como reprimidos por estrés osmótico.	138

6.	La unión de Mot3p a promotores <i>in vivo</i> podría requerir otros factores adicionales	140
	Localización genómica del regulador Smp1p bajo estrés osmótico (ChIP-Seq)	144
	DISCUSIÓN.....	155
	CONCLUSIONES	171
	BIBLIOGRAFÍA.....	175
	DATOS SUPLEMENTARIOS.....	193
1.	Listas de oligonucleótidos empleados en este trabajo	195
A.	Etiquetado de proteínas con epitopos myc o HA	195
B.	PCR cuantitativa en tiempo real.....	198
C.	sondas de DNA para análisis <i>Northern</i>	202
D.	Técnicas de interrupción génica.....	204
2.	Análisis fenotípico de factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión génica bajo estrés salino	205
3.	Perfiles de expresión de genes ERG bajo estrés salino.....	208
4.	Análisis de proteínas fusionadas con epitopos myc o HA.....	210
5.	Localización genómica del regulador Hot1p (ChIP-Chip).....	212
A.	Lista de regiones intergénicas más enriquecidas por Hot1p bajo estrés osmótico....	212
B.	Análisis de regiones dudosas y falsos positivos	214
6.	Datos de localización genómica de Mot3p (ChIP-Chip)	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la ruta HOG de respuesta a estrés osmótico.....	7
Figura 2. Funciones conocidas de la MAP quinasa Hog1 en la respuesta y adaptación a estrés osmótico.....	9
Figura 3. Mecanismos mediante los cuales Hog1p controla la acumulación de glicerol.....	11
Figura 4. Regulación bajo estrés osmótico de la expresión del gen osmoinducible <i>GRE2</i> dependiente del factor de transcripción Sko1p y de las quinasas Hog1p y Sch9p.	16
Figura 5. Clasificación de los genes blanco identificados del factor de transcripción Sko1p.	25
Figura 6. Representación de la bicapa lipídica y del movimiento de los fosfolípidos dentro de la misma.....	30
Figura 7. Distribución de los esteroides en la membrana plasmática de una célula eucariota....	31
Figura 8. Ruta de biosíntesis de esteroides en mamíferos y levadura.....	33
Figura 9. Esquema del control transcripcional de genes <i>ERG</i> en respuesta a diferentes estímulos.....	35
Figura 10. Representación del modo utilizado de transferencia de proteínas de gel a membrana.....	57
Figura 11. Representación figurada del proceso de inmunoprecipitación de cromatina.	70
Figura 12. Ejemplos de visualización de archivos .bar y .bed tras la detección de una región enriquecida por ChIP-Chip.	79
Figura 13. Flujo de trabajo de los experimentos ChIP-chip y ChIP-seq.....	80
Figura 14. Comparación del flujo de trabajo del análisis de datos Chip-chip y ChIP-seq.	83
Figura 15. Las células de levadura reducen drásticamente su contenido en ergosterol en respuesta a estrés osmótico y salino.	91
Figura 16. Importancia de Mot3p y Rox1p para la adaptación a estrés por NaCl.	92
Figura 17. Mot3p y Rox1p son necesarios para la reducción de los niveles de ergosterol bajo estrés osmótico.....	93
Figura 18. Los mutantes <i>mot3</i> y <i>rox1</i> acumulan excesivamente Na ⁺ bajo estrés salino.....	94
Figura 19. Los genes <i>ERG</i> responden de forma diferente a estrés por NaCl.	95
Figura 20. Mot3p, Rox1p y Hog1p controlan la represión de <i>ERG2</i> y <i>ERG11</i> bajo estrés osmótico.....	96

Figura 21. La expresión de <i>ERG6</i> no se ve afectada bajo estrés osmótico.	97
Figura 22. La expresión de <i>ERG2</i> y <i>ERG11</i> apenas se ve afectada en células adaptadas a sal. ..	98
Figura 23. Hog1p estimula la ocupación de la RNA Pol II en genes inducibles por estrés osmótico.....	99
Figura 24. Hog1p reduce la densidad de RNA Pol II en los genes <i>ERG2</i> y <i>ERG11</i> bajo estrés osmótico.....	99
Figura 25. Hog1p no es reclutada de forma estable a los promotores de los genes <i>ERG2</i> y <i>ERG11</i>	100
Figura 26. Hog1 estimula la unión del represor Mot3 al promotor de <i>ERG2</i> y no de <i>ERG6</i> bajo estrés salino.	101
Figura 27. La abundancia de proteína de los represores Mot3p y Rox1p y del activador Ecm22p no se ve alterada en los primeros minutos de estrés salino.....	102
Figura 28. Los niveles de proteína de Mot3p se ven aumentados transitoriamente bajo estrés salino de modo dependiente de Hog1p.....	103
Figura 29. La expresión de <i>ECM22</i> se reprime bajo estrés de manera dependiente de Mot3p, Rox1p y Hog1p.	104
Figura 30. Impacto del tratamiento con menadiona en el contenido celular de ergosterol....	105
Figura 31. La expresión de <i>ERG2</i> y <i>ERG11</i> es rápidamente reprimida después del tratamiento con menadiona.....	106
Figura 32. Los mutantes <i>mot3</i> y <i>hog1</i> son sensibles a estrés oxidativo causado por menadiona.	107
Figura 33. El mutante <i>upc2-1</i> acumula ergosterol excesivamente y de manera independiente de estrés oxidativo.	108
Figura 34. El mutante <i>upc2-1</i> es hipersensible a estrés oxidativo causado por menadiona....	109
Figura 35. El mutante <i>upc2-1</i> es hipersensible a estrés salino y osmótico.....	109
Figura 36. La expresión de <i>ERG2</i> y <i>ERG11</i> no responde a estrés salino en el mutante <i>upc2-1</i>	110
Figura 37. La adición exógena de ergosterol agrava la susceptibilidad de <i>upc2-1</i> a NaCl y menadiona	111
Figura 38. La pérdida de función de Mot3p y Rox1p causa sensibilidad a estrés por cationes tóxicos.	112
Figura 39. El mutante <i>upc2-1</i> es hipersensible a estrés por otros cationes tóxicos.....	113
Figura 40. Efecto del tratamiento con fluconazol y ketoconazol sobre los niveles totales de ergosterol.....	114

Figura 41. La hipersensibilidad de <i>mot3rox1</i> a higromicina B se atenúa con la inhibición de la biosíntesis de ergosterol.	115
Figura 42. La sensibilidad del mutante <i>upc2-1</i> a cationes tóxicos se alivia mediante el tratamiento con fluconazol.	115
Figura 43. Efecto de la adición del azol fluconazol a la adaptación a estrés salino.	116
Figura 44. Efecto de la adición de fluconazol a la tolerancia a estrés oxidativo por menadiona.	117
Figura 45. La adición de fluconazol y ketoconazol aumenta la susceptibilidad de las cepas mutantes <i>yap1</i> y <i>skn7</i> a estrés por H ₂ O ₂	119
Figura 46. Módulo incompleto dentro de la compleja red de regulación transcripcional bajo estrés osmótico.	124
Figura 47. Aproximaciones complementarias para descifrar la compleja red de regulación transcripcional que opera bajo estrés osmótico.	125
Figura 48. Comparación entre plataformas de hibridación en ensayos ChIP-Chip.	126
Figura 49. Ocupación in vivo de Hot1p en varias regiones intergénicas.	127
Figura 50. Regiones confirmadas blanco del factor de transcripción Hot1p.	131
Figura 51. Hot1p regula la expresión osmoinducible de <i>GPD1</i> , <i>DIA3</i> , <i>STL1</i> y <i>HOR2</i>	133
Figura 52. Motivo consenso para el sitio de unión de Hot1p y localización en los promotores de los blancos más robustos.	135
Figura 53. Presencia del motivo CGYMTTGGC en el genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	136
Figura 54. Alineamiento de los sitios de unión putativos para Hot1p conservados en especies de <i>Saccharomyces</i> relacionadas.	137
Figura 55. Presencia del motivo HAGGYA en las regiones intergénicas identificadas por ChIP-Chip de Mot3.	141
Figura 56. Representación esquemática de la localización de un factor de transcripción mediante ChIP-Chip.	142
Figura 57. Distribución de lecturas obtenidas por ChIP-Seq en regiones intergénicas y codificantes del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	145
Figura 58. Perfiles de unión de Smp1p a lo largo de las regiones codificantes de genes osmoinducibles.	149
Figura 59. Perfil de la unión de Smp1p en las 20 regiones codificantes más enriquecidas.	149

Figura 60. Modelo de control transcripcional de genes <i>ERG</i> en respuesta a diferentes estímulos.....	161
Figura 61. Cinéticas de crecimiento de mutantes de los factores de transcripción conocidos de la ruta HOG en condiciones de estrés salino.....	206
Figura 62. Ensayos de sensibilidad a estrés salino de nuevos factores de transcripción posiblemente involucrados en la respuesta adaptativa.	207
Figura 63. Represión transcripcional de algunos genes <i>ERG</i> bajo estrés osmótico.....	208
Figura 64. Regiones anotadas como falsos positivos del análisis ChIP-Chip de Hot1p.....	208

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de transcripción regulados por la ruta HOG.....	14
Tabla 2. Posibles blancos del factor de transcripción Hot1p al comienzo del presente trabajo.	18
Tabla 3. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.....	44
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	47
Tabla 5. Descripción de los anticuerpos utilizados en este trabajo.....	47
Tabla 6. Modo de preparación del gel de separación.....	56
Tabla 7. Genes candidatos a ser blanco del factor de transcripción Hot1p bajo estrés osmótico.	128
Tabla 8. Genes identificados por CHIP-Chip candidatos a ser blanco del factor de transcripción Mot3p bajo estrés osmótico.	139
Tabla 9. Regiones intergénicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con mayor número de lecturas tras el análisis CHIP-Seq de muestras Smp1-HA inmunoprecipitadas.	146
Tabla 10. Regiones codificantes a lo largo del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> más enriquecidas tras el análisis CHIP-Seq del factor de transcripción Smp1p.....	147
Tabla 11. Regiones codificantes entre 200 y 400 pares de bases después del codón ATG más enriquecidas por Smp1p a lo largo del genoma de <i>Sacchromyces cerevisiae</i>	151
Tabla 12. Oligonucleótidos empleados para el etiquetado de factores de transcripción con myc o HA y posterior confirmación de la fusión.....	197
Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para verificar promotores blanco de factores de transcripción bajo la ruta HOG.....	200
Tabla 14. Oligonucleótidos empleados para verificar por PCR cuantitativa la unión de Hot1p en regiones intergénicas de levadura.	201
Tabla 15. Oligonucleótidos empleados en el diseño de sondas de DNA para análisis <i>Northern</i>	203
Tabla 16. Oligonucleótidos empleados en la disrupción de los genes <i>MOT3</i> y <i>HOG1</i>	204
Tabla 17. Comprobación de la integración de los casetes en el genoma de levadura y expresión de las proteínas etiquetadas.....	210
Tabla 18. Lista completa de regiones enriquecidas por Hot1p bajo estrés osmótico.	213
Tabla 19. Lista completa de regiones enriquecidas por Mot3p bajo estrés osmótico..	221

ABREVIATURAS

APDS	<i>Ammonium Peroxodisulfate</i> (peroxodisulfato de amonio)
bp	<i>Base pair</i> (par de bases)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (álbumina de suero bovino)
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> (Inmunoprecipitación de cromatina)
CRE	<i>cAMP Response Element</i> (elemento de respuesta a cAMP)
CT	Cromatina Total
DB71	<i>Direct Blue 71</i>
dCTP	<i>2'-deoxycytidine 5'-triphosphate</i> (2'-deoxicitidina 5'-trifosfato)
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i> (dimetil sulfóxido)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide Triphosphate</i> (desoxinucleótido trifosfato)
DTE	<i>1,4-dithioerithritol</i> (1,4-ditioeritritol)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (quimioluminiscencia mejorada)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (ácido etilen diamino tetraacético)
ERG	Genes de la ruta de biosíntesis de ergosterol
FDR	<i>False Discovery Rate</i> (Probabilidad de Falsos Positivos)
GCN	<i>General Control of Nutrients</i> (control general de nutrientes)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína fluorescente verde)
h	Horas
HA	Hemaglutinina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i> (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperaziniletanosulfónico)
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i> (ruta de respuesta a alta osmolaridad)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Muestras Inmunoprecipitadas
kan^r	Gen de resistencia a kanamicina
kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
LB	Medio Luria-Bertani

MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógeno).
MAPKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i> (proteína quinasa quinasa activada por mitógeno).
MAPKKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i> (proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno).
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i> (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico)
min	Minutos
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i> , (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico)
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico mensajero)
myc	Péptido de la proteína de humanos c-myc
OD	<i>Optical Density</i> (densidad óptica)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (pauta de lectura abierta)
PBS	<i>Phosphate-Buffer Saline</i> (tampón salino de fosfatos)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	<i>Polyethylene Glycol</i> (polietilenglicol)
PKA	<i>Protein Kinase A</i> (proteína quinasa A o dependiente de cAMP)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (proteína quinasa C)
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoruro de fenilmetilsulfonil)
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> (difluoruro de polivinilideno)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico ribosomal)
SD	<i>Synthetic Defined</i> (medio mínimo)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i> (base de datos del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
SSC	<i>Sodium Saline Citrate</i> (citrato salino sódico)
SRE	<i>Sterol Response Element</i> (elemento de respuesta a esteroides)
SREBP	<i>Sterol Response Element Binding Protein</i> (Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides)

STRE	<i>Stress Response Element</i> (elemento de respuesta a estrés)
TAE	<i>Tris-Acetate-EDTA</i> (tampón Tris-acetato-EDTA)
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i> (Purificación doble de proteínas por afinidad)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (tampón salino de Tris)
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> (tetrametiletilenodiamina)
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i> (tris(hidroximetil) aminometano)
Wt	<i>Wild Type</i> (cepa silvestre)
YPD	<i>Yeast extract-Petpone-Dextrose</i> (Medio rico).

INTRODUCCIÓN

¿Cómo responde *Saccharomyces cerevisiae* a los cambios en las condiciones ambientales?

1. Circuitos de percepción y transducción de señales
2. La ruta HOG de respuesta a estrés osmótico
3. Papel de Hog1p en la respuesta y adaptación al estrés

Respuesta de la levadura a estrés osmótico a nivel transcripcional

4. Factores de transcripción identificados bajo la ruta HOG
5. Conexión entre HOG y otras rutas de respuesta a estrés
6. Redes de regulación transcripcional bajo estrés osmótico
7. Impacto del estrés osmótico en la expresión génica global

Regulación negativa de la expresión génica bajo estrés osmótico: biosíntesis de ergosterol

8. Estructura y funciones de la membrana plasmática
9. Biosíntesis de esteroides en *Saccharomyces cerevisiae*
10. Control transcripcional de la síntesis de ergosterol

¿Cómo responde *Saccharomyces cerevisiae* a los cambios en las condiciones ambientales?

El medio ambiente es un factor determinante en la evolución de los organismos, ya que los cambios que experimenta comprometen la supervivencia de los mismos o al menos los alejan de su desarrollo óptimo, lo cual es considerado comúnmente como una situación de “estrés”.

Todos los tipos de células, incluidas las células individuales en organismos pluricelulares, tienen la habilidad de responder a los cambios en las condiciones ambientales. Para lograr este objetivo han adoptado estrategias que les llevan a modificar su metabolismo, regular su velocidad de crecimiento o sus programas de diferenciación y así sobrevivir y adaptarse a las condiciones adversas.

Los organismos unicelulares como las levaduras, viven libremente en la naturaleza y sufren amplias variaciones en su ámbito natural. Es esencial para la supervivencia de estas células disponer de rápidos mecanismos de respuesta a los repentinos cambios ambientales y de eficientes mecanismos de adaptación que les permitan mantener su capacidad de proliferar. Los cambios ambientales pueden ser físicos o químicos: temperatura, presión, radiación, concentración de solutos y agua, presencia de ciertos iones, agentes químicos tóxicos, pH y disponibilidad de nutrientes.

El hecho de que muchos de los procesos y mecanismos involucrados en la adaptación a diferentes tipos de estrés se conservan entre los eucariotas, hace de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* un buen modelo para el estudio de este proceso en otros organismos que, desde el punto de vista metodológico, son más difíciles de manejar. *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola. Las células de levadura se ven sometidas a estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante procesos industriales. Tanto el daño provocado por el estrés como la respuesta de la levadura al mismo depende del tipo y grado del estrés y del estado de desarrollo de la levadura en el momento en que

ocurre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrente este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares (por ejemplo las membranas) y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función.

1. Circuitos de percepción y transducción de señales en levadura

Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, la levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar el daño causado por el estrés. Además, para la supervivencia celular es importante la respuesta a nivel transcripcional y su estudio, en el caso de la adaptación a estrés osmótico, ha llevado a la descripción de varias vías de percepción y transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta (Hohmann, 2002; Rep *et al.*, 2000a).

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* poseen complejas vías de transducción de señales que permiten una rápida adaptación a los cambios ambientales, un atributo especial de las especies que no disponen de movilidad activa y espontánea. La coordinación de los procesos celulares de respuesta a los cambios en el medio depende normalmente de una compleja regulación de la expresión génica, bien mediante la activación o a través de la represión de la transcripción. La activación transcripcional está bien estudiada e implica la interacción de proteínas que reconocen secuencias específicas con sitios de reconocimiento en el DNA, el reclutamiento de la RNA polimerasa y sus factores asociados y la iniciación de la transcripción. Sin embargo, la represión transcripcional es más difícil de definir. Los organismos eucariotas tienen diferentes mecanismos para llevar a cabo la represión de determinados genes, como son la modulación del estado de acetilación de las histonas, la modulación de la cromatina, la interferencia con los activadores o directamente con la maquinaria transcripcional (Carlson, 1999; Kent *et al.*, 1994; Smith and Johnson, 2000; Watson *et al.*, 2000).

Un aspecto importante de la activación y/o represión transcripcional es que son dependientes de las condiciones ambientales de la célula. La disponibilidad de nutrientes, el suministro de oxígeno, los parámetros osmóticos, el pH o la temperatura controlan la expresión génica, y este tipo de control es mediado por cascadas de señalización que transforman un estímulo externo en una respuesta celular. Así mismo, cambios intracelulares como el daño al DNA o aberraciones metabólicas son detectados y producen una reacción al nivel transcripcional.

Como hemos comentado anteriormente, *Saccharomyces cerevisiae* posee rutas que detectan y responden rápidamente ante una señal y permiten a las células de levadura adaptarse con rapidez. Un ejemplo de estas importantes vías son las rutas de MAP quinasas, que contienen tres proteínas quinasas actuando en series una vez la cascada es activada: una MAPKKK que fosforila a una MAPKK que después fosforila a otra proteína MAPK. Las cascadas de MAP quinasas, encontradas en animales (Cooper, 1994; Marshall, 1994), plantas (Hirt, 2000) y hongos (Herskowitz, 1995) a menudo regulan factores de transcripción mediante su fosforilación por una MAPK que se transloca al núcleo en los primeros minutos después del estímulo.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han establecido y estudiado intensamente cinco cascadas funcionalmente distintas: la ruta de respuesta a feromonas, la ruta de crecimiento filamentoso invasivo, la ruta de respuesta a alta osmolaridad, la ruta de mantenimiento de la integridad celular y la ruta de formación de la pared de las esporas (Chen and Thorner, 2007; Gustin *et al.*, 1998; Posas *et al.*, 1998; Qi and Elion, 2005).

2. La ruta HOG de respuesta a estrés hiperosmótico.

Una de las rutas de señalización mejor caracterizadas es la ruta “High Osmolarity Glycerol” o ruta HOG (Albertyn *et al.*, 1994; Brewster *et al.*, 1993) que responde a estrés hiperosmótico. Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua

intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento del agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular.

Específicamente, cuando *Saccharomyces cerevisiae* se enfrenta a un aumento repentino de la osmolaridad externa sufre un cambio inmediato en el volumen celular debido a la pérdida de agua del citosol. Tal deshidratación es un proceso 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 organelos (Serrano, 1996).

Para sobrevivir y continuar con el crecimiento, las células deshidratadas pueden recuperar su turgencia siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable. La proliferación celular se reanuda después de un período de adaptación, el cual varía dependiendo de un número de factores, como pueden ser el tipo y la severidad del estrés, el fondo genético de la cepa y el estado de crecimiento (Blomberg, 2000). En esta fase de aclimatación las células de levadura experimentan una serie de cambios como reestructuración del citoesqueleto de actina, arresto transitorio del ciclo celular y reprogramación del metabolismo (Tao *et al.*, 1999). Al mismo tiempo se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular del osmolito compatible glicerol (Albertyn *et al.*, 1994; Brewster *et al.*, 1993) y la exclusión de cationes tóxicos (Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001). Parece que el acúmulo de glicerol no es sólo una causa de su mayor síntesis sino que además se estimula el influjo y se evita su pérdida a través de canales de intercambio, como la aquagliceroporina Fps1p, que modula su entrada y salida según convenga (Karlgrén *et al.*, 2005; Tamas *et al.*, 1999). Además, se induce 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.*, 2000b; Yale and Bohnert, 2001).

El estrés osmótico también altera la estructura, permeabilidad y propiedades mecánicas de la membrana plasmática (Wood, 1999). Análisis globales de expresión génica han revelado que la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos se ve afectada por estrés osmótico. La expresión de genes involucrados en la síntesis de fosfatidil-etanolamina y fosfatidil-colina aumenta mientras que la expresión de algunos genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de ergosterol disminuyen (Causton *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2000). Estos cambios podrían dar lugar a una alteración de la permeabilidad y/o flexibilidad de la membrana y también podrían afectar la actividad de proteínas transmembrana, como los transportadores y osmosensores (Posas *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1999b; van der Heide *et al.*, 2001).

Precisamente a través de osmosensores las células de levadura perciben el estrés osmótico y responden rápidamente a través de diversas vías. La más importante de ellas es la ruta HOG (de Nadal and Posas, 2010), esquematizada en la figura 1.

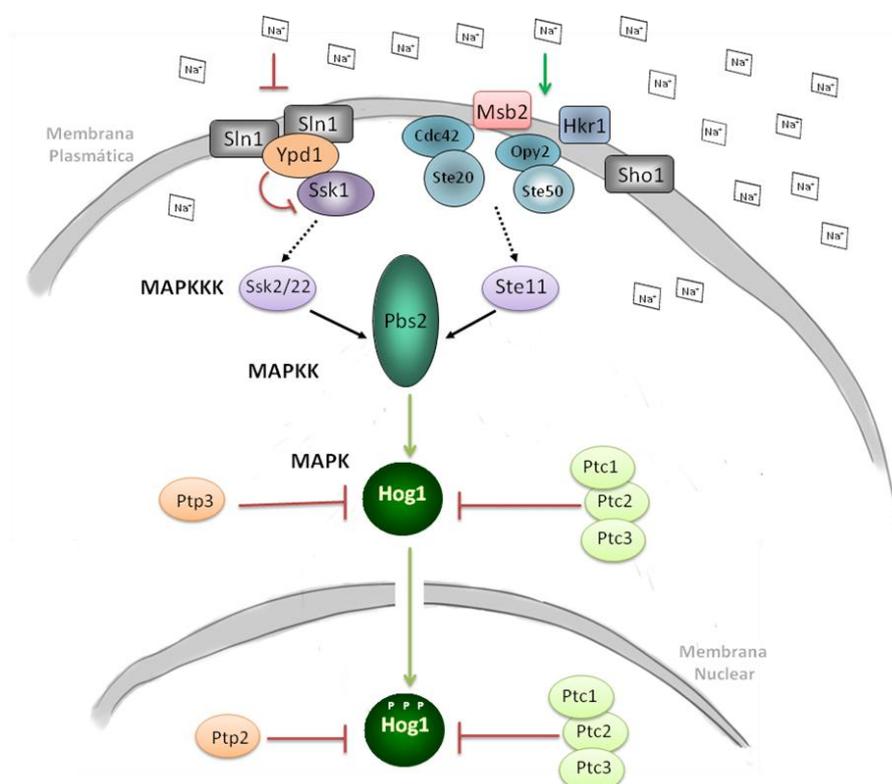


Figura 1. Representación esquemática de la ruta HOG de respuesta a estrés osmótico.

La ruta HOG se activa a través de dos ramas mediante mecanismos completamente diferentes. Estas dos ramas independientes convergen en la MAPKK Pbs2p; por una parte, un mecanismo involucra al complejo osmosensor Sln1-Ypd1-Ssk1, similar en bacterias y plantas, que parece sentir la turgencia de la membrana. Este sistema regula la actividad de las MAPKKK Ssk2p y Ssk22p. Por otra parte, hay otro sistema complejo y que no está caracterizado aún completamente. En este complejo están implicadas las proteínas Hkr1p y Msb2p que actúan como osmosensores y activan a Pbs2p en colaboración con otras proteínas, donde se incluye la proteína transmembrana Sho1p, Opy2p, Cdc42p, la quinasa Ste20p, Ste50p y la MAPKKK Ste11p (Chen and Thorner, 2007; de Nadal *et al.*, 2007; Hohmann *et al.*, 2007; Tatebayashi *et al.*, 2007). Los componentes de la rama Sho1 también están implicados en el desarrollo de pseudohifas y el apareamiento en *Saccharomyces cerevisiae* (O'Rourke and Herskowitz, 1998). Sho1p podría tratarse de un sensor que percibe señales relacionadas con la estructura externa y/o la cara superficial de la pared celular.

Una vez Pbs2p es activado, éste fosforila a Hog1p. La activación de la MAPK Hog1 es extremadamente rápida -ocurre en segundos- pero transitoria -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. Esta regulación negativa es absolutamente requerida, ya que mantener la activación de Hog1p es perjudicial para el crecimiento celular (Maeda *et al.*, 1994).

El principal mecanismo de regulación está relacionado con la concentración intracelular del osmolito glicerol, requerido para reemplazar parcialmente el agua perdida, proteger las biomoléculas del interior de la célula y reducir el potencial hídrico intracelular, restableciendo la estabilidad osmótica. Hay evidencias que indican que es la habilidad de los sensores para detectar un desequilibrio entre la parte interna y externa de la célula y no la osmolaridad extracelular lo que determina la duración de la fosforilación de Hog1p (Hohmann *et al.*, 2007). La defosforilación de las quinasas en la ruta HOG se lleva a cabo por proteínas tirosina fosfatasa (por ejemplo Ptp2p y Ptp3p) y proteínas serina-treonina fosfatasa de la familia de PP2C (por ejemplo Ptc1p).

Algunas de ellas son además reguladas en respuesta a estrés (Hohmann *et al.*, 2007; Klipp *et al.*, 2005).

La red de transducción de señales HOG es necesaria para la adaptación al estrés pero no solo induce la acumulación de osmolitos, sino que además tiene un impacto profundo en algunos aspectos de la fisiología celular de la levadura, como vamos a ver en el siguiente apartado.

3. Papel de la quinasa Hog1 en la respuesta y adaptación a estrés osmótico.

La respuesta adaptativa mediada por la MAP quinasa Hog1 es compleja e involucra diferentes procesos celulares que deben ser modificados para una correcta adaptación al estrés osmótico (figura 2).

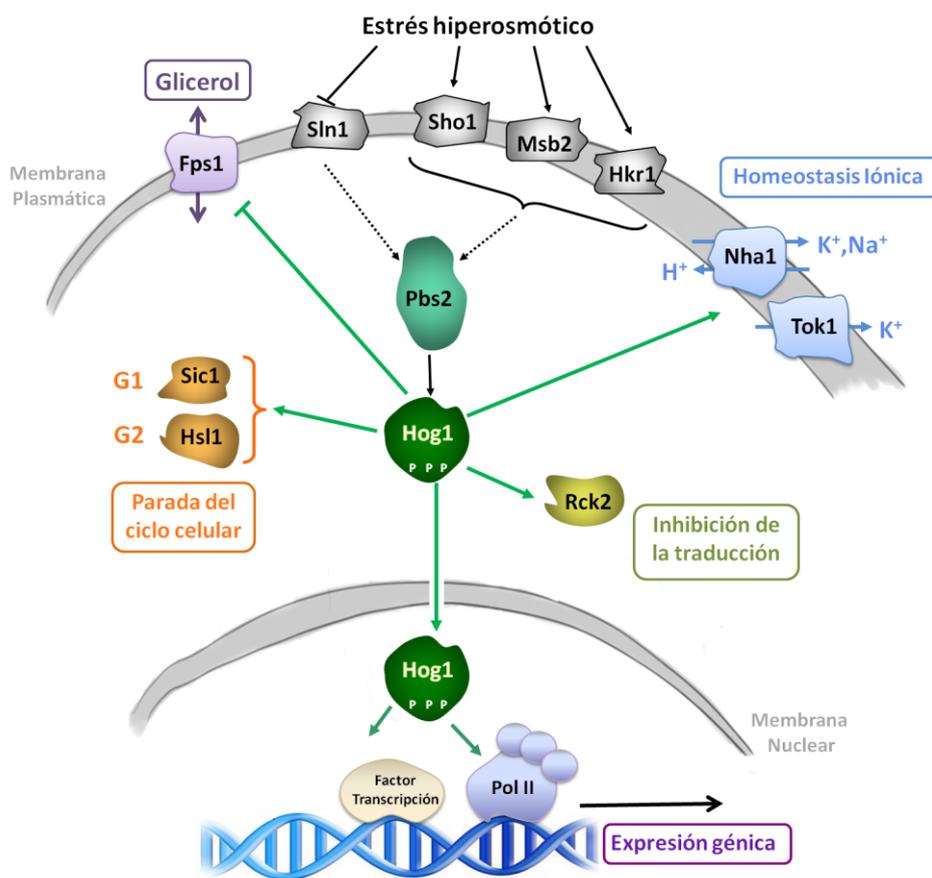


Figura 2. Funciones conocidas de la MAP quinasa Hog1 en la respuesta y adaptación a estrés osmótico.

La activación de Hog1p conlleva su rápido traslado al 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.*, 1999b; De Nadal *et al.*, 2003). Pero además de regular su actividad, Hog1p 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). De esta manera, Hog1p participa en otros procesos necesarios para la activación transcripcional. En algunos promotores su asociación al promotor da lugar al reclutamiento del complejo histona desacetilasa Rpd3p-Sin3p, afectando a la estructura de la cromatina y permitiendo la unión de la holoenzima de la RNA polimerasa II (De Nadal *et al.*, 2004). Del mismo modo, Hog1p interacciona 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).

Sin embargo, la unión de Hog1p a la cromatina no se restringe a los promotores de los genes que regula sino que también se ha localizado en las regiones codificantes (Pascual-Ahuir *et al.*, 2006; Proft *et al.*, 2006), hecho que sugiere un importante papel como factor de elongación selectivo de los genes inducidos en respuesta a estrés osmótico asociándose a la RNA pol II y a diversos componentes del complejo de elongación (Pokholok *et al.*, 2006). Más reciente se ha descrito que Hog1p también interacciona con el complejo remodelador de la cromatina RSC para mediar su reclutamiento en los genes de respuesta a estrés y de esta forma permitir una adecuada progresión de la RNA pol II (Mas *et al.*, 2009).

Además de su función en el núcleo, Hog1p regula directamente transportadores de cationes de la membrana plasmática. El incremento en la concentración de sodio en la célula tras el choque osmótico provoca en el núcleo que muchas proteínas se disocian rápidamente de la cromatina. La reasociación de estas proteínas con la cromatina depende de que Hog1p fosforile al menos a dos de los transportadores de la membrana plasmática, el antiportador de Na^+/H^+ Nha1p y el canal de K^+ Tok1p. Esta fosforilación estimula la salida de iones de la célula (Proft and Struhl, 2004). Los niveles de sodio en la célula son mantenidos principalmente por la bomba de Na^+ Ena1p. La

expresión de *ENA1* está reprimida en condiciones normales de crecimiento y se induce en la respuesta a estrés osmótico de manera dependiente de Hog1p a través del factor de transcripción Sko1p (Marquez and Serrano, 1996; Proft and Serrano, 1999).

Como su nombre indica, probablemente la función más importante de la ruta HOG en la adaptación osmótica concierne al control de la acumulación de glicerol. El glicerol se produce a través del intermediario de la glucólisis dihidroxiacetonafosfato, en dos pasos. Éstos son catalizados por la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa (Gpd1p y Gpd2p en *S. cerevisiae*) y la glicerol-3-fosfatasa (Gpp1p y Gpp2p) (Hohmann, 2002).

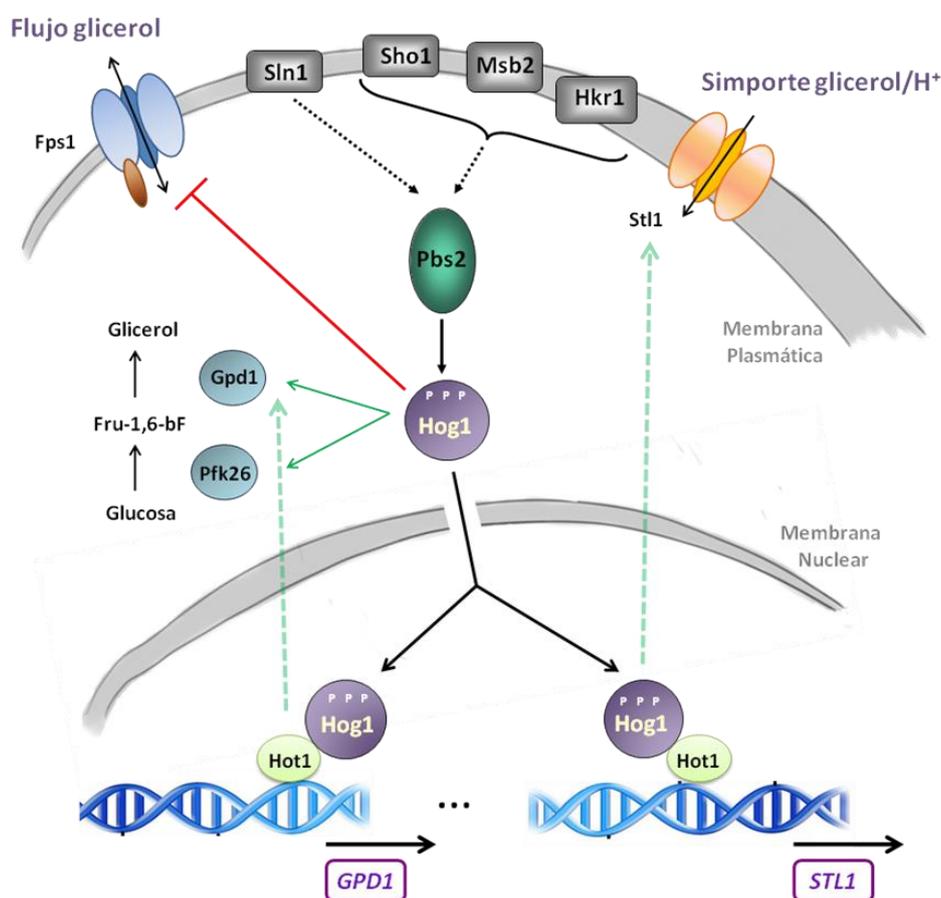


Figura 3. Mecanismos mediante los cuales Hog1p controla la acumulación de glicerol. La ruta HOG se muestra sólo esquemáticamente. Las flechas discontinuas representan la producción de proteína en lugar de regulación.

Hog1p interviene en el aumento del contenido en glicerol de la célula mediante diversos mecanismos (figura 3). Por una lado, Hog1p regula la expresión de genes

implicados en su síntesis, como *GPD1*, *GPP1 (RHR2)* y *GPP2 (HOR2)*, y en su transporte, como *STL1*, que permite su toma del medio externo (Ferreira *et al.*, 2005; Rep *et al.*, 1999; Rep *et al.*, 2000).

Además, Hog1p controla la actividad de la enzima fosfofructo-2-quinasa, que produce el activador glucolítico fructosa-2,6-bifosfato y este efecto parece que incrementa la tasa de producción de glicerol (Dihazi *et al.*, 2004). Por último, Hog1p podría impedir el escape de glicerol de la célula controlando la actividad del canal Fps1p (Hohmann *et al.*, 2007; Thorsen *et al.*, 2006). En células mutantes en Fps1p que mantienen el canal constitutivamente abierto se observa una importante sensibilidad a estrés hiperosmótico (Tamas *et al.*, 1999).

Por otra parte, la respuesta a estrés osmótico conlleva a una parada transitoria del ciclo celular. Tras su activación, Hog1p modula la progresión del ciclo celular en diversas etapas. La MAP quinasa regula la expresión de las ciclinas *CLN1* y *CLN2* y la estabilización por fosforilación directa de la proteína Sic1p, que inhibe al complejo Cdc28p unido a Clb5p y Clb6p que controla la transición de la fase G1 a S (Escote *et al.*, 2004; Zapater *et al.*, 2005). Además, Hog1p media la parada del ciclo celular regulando la expresión de la ciclina clb2p y fosforilando a la quinasa Hsl1p, necesaria para el inicio de la degradación de otra quinasa, Swe1p, lo cual es necesario para la apropiada progresión de la fase G2 del ciclo celular (Clotet *et al.*, 2006; Clotet and Posas, 2007).

Otro efecto inmediato que se produce tras el estrés osmótico es una inhibición transitoria de la síntesis de proteínas. La inhibición a través de Hog1p se produce posiblemente a nivel de la elongación fosforilando a la quinasa Rckp2p (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001; Uesono and Toh, 2002).

Respuesta a estrés osmótico a nivel transcripcional

Hasta hace poco era escaso el conocimiento acerca de las proteínas que median las respuestas transcripcionales por debajo de la ruta HOG. Sí se sabía que había varios factores de transcripción involucrados y sólo unos pocos genes cuya estimulación por estrés osmótico es controlada exclusivamente por la ruta HOG; además, los promotores a los que se unen, como los de los genes *GPD1* (codifica la deshidrogenasa glicerol-3-fosfato) y *ENA1* (codifica la principal bomba exportadora de sodio), parecen ser muy complejos (Eriksson *et al.*, 2000;Proft and Serrano, 1999;Rep *et al.*, 1999a).

4. Factores de transcripción identificados bajo la ruta HOG.

Al comienzo de este trabajo, se sabía que Hog1p contacta directamente y fosforila a los factores de transcripción Sko1p, Hot1p y Smp1p (Alepuz *et al.*, 2003;de Nadal *et al.*, 2003;Rep *et al.*, 2001). Además, recientemente se ha propuesto dos nuevos factores de transcripción, el complejo Rtg1p/Rtg3p, cuya delección confiere sensibilidad a estrés osmótico y que son fosforilados por Hog1p, aunque ninguna de estas fosforilaciones son esenciales para la regulación transcripcional en respuesta a estrés (Noriega, 2009).

Evidencias genéticas y datos de expresión génica relacionan otros factores transcripcionales con la ruta HOG, como es el caso de Msn1p, Msn2p, Msn4p y Yap4p (Martinez-Pastor *et al.*, 1996;Nevitt *et al.*, 2004;Rep *et al.*, 1999b;Schuller *et al.*, 1994). Además, el sistema de cascada de fosforilaciones Sln1p-Ypd1p controla otro regulador, Skn7p, involucrado en múltiples procesos celulares y relacionado tanto a la ruta HOG como a la ruta de integridad celular, aunque su principal función fisiológica está relacionada con la adaptación a estrés oxidativo (Krems *et al.*, 1996;Lee *et al.*, 1999;Morgan *et al.*, 1997). Yap6p es otro activador que ha sido añadido a la lista aunque sólo se ha visto regulación transcripcional bajo estrés salino cuando es sobreexpresado y su relevancia fisiológica en la adaptación osmótica está por descubrir (Mendizabal *et al.*, 1998).

Introducción

Proteína	Función	Evidencia	Referencia
Sko1p	Represor/Activador; requerido para la represión de sitios CRE	Diana de Hog1p; evidencia genética, asociación a promotores	(Proft y Serrano 1999), (Proft <i>et al.</i> , 2001), (Pascual-Ahuir <i>et al.</i> , 2001)
Msn2p/ Msn4p	Activadores; se unen a sitios STRE y median la expresión génica dependiente de PKA	Los genes diana dependen de Hog1p para su activación por estrés osmótico	(Schüller <i>et al.</i> , 1994; Rep <i>et al.</i> , 2000)
Hot1p	Activador; presente junto a Hog1p en ciertos promotores, donde es requerido para la normal expresión	Actividad regulada por la fosforilación directa por Hog1p	(Rep <i>et al.</i> , 1999b; Alepuz <i>et al.</i> , 2001)
Smp1p	Activador	Fosforilado por Hog1p	(de Nadal <i>et al.</i> , 2003)
Rtg1p/ Rtg3p	Complejo activador; involucrados en la respuesta retrógrada de comunicación entre núcleo y mitocondria	Son fosforilados por Hog1p	(Noriega , 2009)
Msn1p	Activador; involucrado en el crecimiento en pseudohifas y muchos otros procesos	Requerido para la expresión completa de algunos genes regulados por Hog1p	(Rep <i>et al.</i> , 1999b)
Skn7p	Activador; involucrado en la respuesta a estrés oxidativo y en el metabolismo de la pared celular	Parte de la cascada de fosforilación Sln1p-Ypd1p, activa genes hipo-osmóticos.	(Brown <i>et al.</i> , 1994)
Yap4p/ Yap6p	Activadores; involucrados en la expresión de la bomba Na ⁺ /Li ⁺ Ena1p.	Su sobreexpresión aumenta la tolerancia a sodio y litio	(Mendizabal <i>et al.</i> , 1998)

Tabla 1. Factores de transcripción regulados por la ruta HOG.

Todos estos factores –ver tabla 1- pertenecen a diferentes familias de reguladores transcripcionales y los mecanismos con los que Hog1p controla la transcripción podrían diferir entre ellos.

Sko1p.

También llamado Acr1p, pertenece a la familia ATF/CREB, factores de transcripción relacionados con AP1, que en células de mamíferos son conocidos como proteínas de unión a secuencias CRE (*cAMP Response Element*). En condiciones normales, Sko1p se une a estas secuencias en los promotores de genes de respuesta a estrés osmótico. Por ejemplo, los promotores de *ENA1* y *HAL1*, inducibles por estrés salino, contienen sitios CRE y Sko1p media a través de ellos su represión en condiciones normales y activación después del choque osmótico (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a; Proft *et al.*, 1999; Rios *et al.*, 1997). El promotor de *GRE2*, contiene dos sitios CRE que median la regulación del gen a través de Sko1p (Rep *et al.*, 2001). Mientras que la expresión de *ENA1* está controlada de una manera compleja a través de múltiples mecanismos, la estimulación por estrés salino de la expresión de *HAL1* y *GRE2* está exclusivamente mediada por los sitios CRE (Marquez *et al.*, 1998; Marquez and Serrano, 1996; Proft *et al.*, 1999). La desrepresión bajo estrés osmótico de los genes dependientes de Sko1p requiere a Hog1p, de modo que la expresión de *ENA1*, *GRE2* y *HAL1* es baja y no responde al choque osmótico en un mutante $\Delta hog1$. Hog1p y Sko1p forman un complejo *in vivo* (Proft *et al.*, 1999) y la MAP quinasa fosforila a Sko1p en serina 108, treonina 113 y serina 126. Mutaciones en estos tres sitios de fosforilación convierten a Sko1p en un represor más efectivo.

La función represora de Sko1p requiere a Cyc8p y Tup1p (Marquez *et al.*, 1998; Proft *et al.*, 1999; Rep *et al.*, 2001). Estas proteínas forman un complejo que se une a ciertas proteínas de unión al DNA en levadura. Ambas inmunoprecipitan junto con Sko1p (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a; Proft *et al.*, 2001), aunque su interacción se ve perturbada cuando se usa un alelo de Sko1p que no puede ser fosforilado por Hog1p. El cambio de represor a activador conlleva adicionalmente el reclutamiento de los complejos modificadores de la cromatina SAGA y Swi/Snf, pero esto no resulta en una disociación

de Cyc8p-Tup1p (Proft *et al.*, 2002). En la figura 4 puede consultarse una representación esquemática de cómo Sko1p activa la transcripción de un gen osmoinducible a través de la ruta HOG tras un choque osmótico.

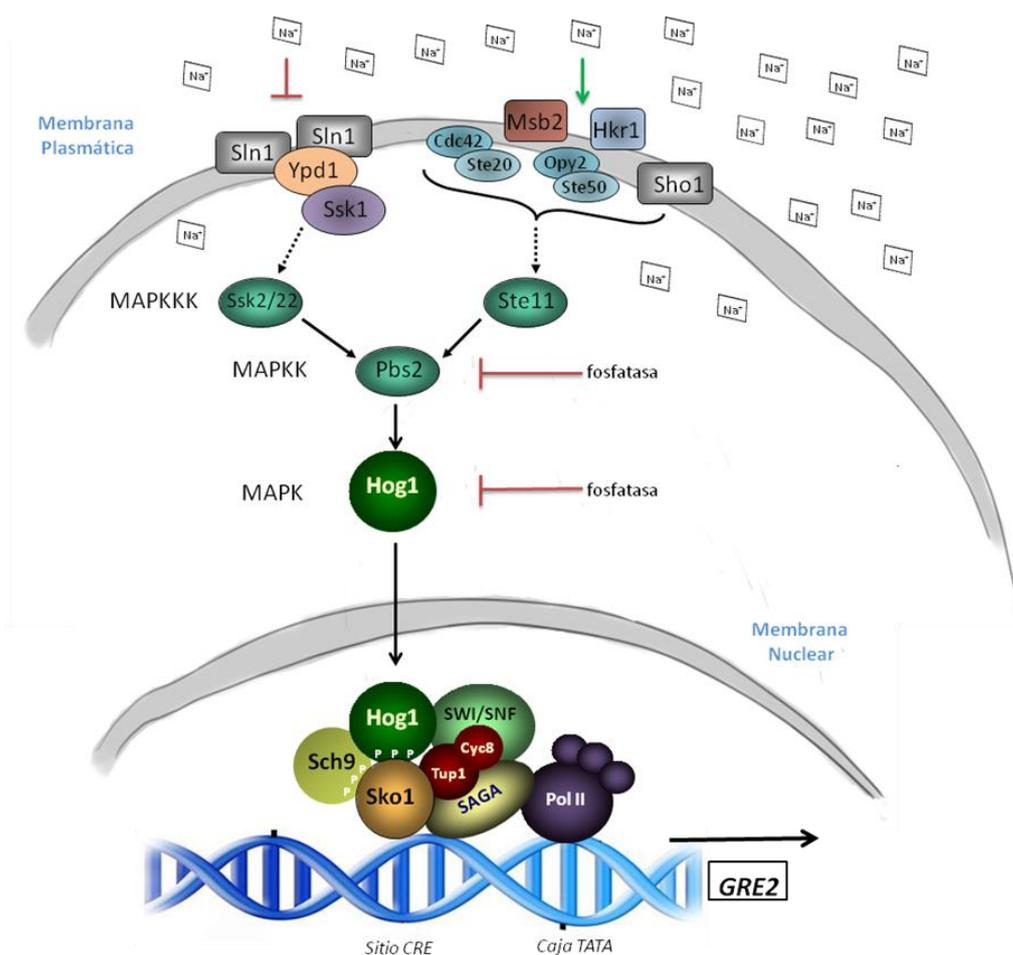


Figura 4. Regulación bajo estrés osmótico de la expresión del gen osmoinducible *GRE2* dependiente del factor de transcripción Sko1p y de las quinasas Hog1p y Sch9p.

La proteína quinasa A también contribuye al control de Sko1p (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001a; Proft *et al.*, 2001). Sko1p se encuentra en el núcleo en condiciones normales y la proteína quinasa A es requerida para la localización nuclear de Sko1p a través de la fosforilación de tres serinas en las posiciones 380, 393 y 399. La respuesta de *GRE2* y *HAL1* se reduce fuertemente en células que expresan un mutante Sko1p que no tiene los seis sitios de fosforilación (Proft *et al.*, 2001). Todos estos datos sugieren que la proteína quinasa A y Hog1p colaboran en el control de Sko1p, la primera a través de su localización nuclear y la segunda controlando su actividad.

La proteína Sko1p es blanco además de otras quinasas reguladoras. Se sugirió la existencia de otras quinasas que interaccionan con Sko1p bajo el control de la ruta HOG al observar que el factor de transcripción aún se ve fosforilado *in vivo* bajo estrés osmótico y de manera dependiente de Hog1p después de eliminar todos los sitios de fosforilación de Hog1p (Proft *et al.*, 2001). Una de estas quinasas es Sch9p, originalmente identificada como una proteína redundante de las subunidades catalíticas de la proteína quinasa A (Toda *et al.*, 1988) y que ha sido caracterizada como reguladora del control del tamaño celular y de la transcripción en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Crauwels *et al.*, 1997; Jorgensen *et al.*, 2004; Pedruzzi *et al.*, 2003). Sch9p, como otras moléculas involucradas en la percepción de nutrientes, es también determinante en el envejecimiento celular (Fabrizio *et al.*, 2004; Kaeberlein *et al.*, 2005). También se ha descubierto que esta quinasa de levadura está implicada en la activación transcripcional de genes inducibles por estrés osmótico (Pascual-Ahuir and Proft, 2007). Mutantes de pérdida de función *sch9* son sensibles a alta osmolaridad y muestran una alteración en la respuesta transcripcional a estrés osmótico de algunos genes de defensa. Sch9p interacciona *in vitro* con Hog1p y Sko1p y fosforila a éste último en residuos diferentes a los previamente identificados para Hog1p y la proteína quinasa A. Por otra parte, usando la técnica de inmunoprecipitación de cromatina, se ha demostrado que Sch9p es reclutada *in vivo* a los genes *GRE2* y *CTT1* exclusivamente bajo estrés osmótico y este reclutamiento depende de Hog1p y de Sko1p. Además, Sch9p se requiere para el correcto reclutamiento de Hog1p a estos genes (Pascual-Ahuir and Proft, 2007). Todos estos resultados indican que las quinasas que regulan la transcripción están íntimamente involucradas en la expresión génica.

Hot1p.

Esta proteína muestra similitud con Gcr1p, Ymr111p y Msn1p y la delección de *HOT1* suprime parcialmente la letalidad causada por sobreactivación de la ruta HOG (Rep *et al.*, 1999).

Hot1p parece controlar la expresión de un pequeño grupo de menos de diez genes blanco de Hog1p (tabla 2). Entre ellos se encuentran genes que codifican las dos enzimas clave de la biosíntesis de glicerol, *GPD1* y *GPP2*. Bajo estrés osmótico y en ausencia de Hot1p, se reducen a la mitad los niveles de mRNA de estos dos genes.

Gen	Función	Evidencia	Referencia
<i>GPD1</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa	Análisis Northern	(Rep <i>et al.</i> , 1999b)
<i>GPP2</i>	Glicerol-3-fosfatasa	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>STL1</i>	Simportador de glicerol/H ⁺	ChIP	(Alepuz <i>et al.</i> , 2003)
<i>CHA1</i>	Desaminasa catabólica L-serina/L-treonina	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>PHO84</i>	Simportador de fosfato inorgánico/H ⁺	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>NQM1</i>	Transaldolasa de función desconocida	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>FMP48</i>	Proteína mitocondrial de función desconocida	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>RTC3</i>	Proteína de función desconocida	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>PUT4</i>	Transportador de prolina	Análisis transcriptómico	(Rep <i>et al.</i> , 2000)
<i>CTT1</i>	Catalasa citosólica T	Análisis Northern	(Rep <i>et al.</i> , 1999b)
<i>HSP12</i>	Proteína de membrana que protege frente a la desecación	Análisis Northern	(Rep <i>et al.</i> , 1999b)

Tabla 2. Posibles blancos del factor de transcripción Hot1p al comienzo del presente trabajo.

STL1, que codifica un simportador de glicerol/protones de la membrana plasmática (Ferreira *et al.*, 2005), es un gen blanco de Hot1p interesante porque 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 Smp1p también afecta a su expresión (De Nadal *et al.*, 2003).

Hot1p es una proteína nuclear independientemente de la presencia de estrés osmótico (Rep *et al.*, 1999b). Mediante inmunoprecipitación de cromatina, se ha revelado que la proteína está asociada al promotor de *GPD1* en todas las condiciones, aunque los niveles de Hot1p en el promotor aumentan bajo estrés. La situación parece ser diferente en el promotor de *STL1*, donde Hot1p solo se une bajo estrés osmótico y necesita a Hog1p para la asociación (Alepuz *et al.*, 2001).

Msn1p.

Esta proteína comparte un 42% de homología dentro del dominio de unión al DNA con Hot1p y se supone que está involucrada, en múltiples procesos celulares, como el crecimiento en pseudohifas (Gagiano *et al.*, 1999) o la composición de carbohidratos de la pared celular (Lussier *et al.*, 1997).

La delección de *MSN1* disminuye la expresión de *GPD1*, *GPP2*, *CTT1* y *STL1* (Rep *et al.*, 1999b). Estos datos sugieren que Msn1p contribuye a la expresión de algunos genes blanco de la ruta HOG, aunque no se conocen genes cuya inducción osmótica dependa completamente de Msn1p ni se ha demostrado una relación directa con la cascada de MAP quinasas HOG.

Smp1p.

Es una proteína homóloga a Rlm1p, blanco de la proteína quinasa C (PKC) o ruta de MAP quinasas de integridad celular (Dodou and Treisman, 1997). Tiene propiedades como regulador negativo del crecimiento invasivo haploide y esporulación, estando también relacionado con la ruta HOG. Fue aislado en una búsqueda de genes cuya sobreexpresión causaba la inducción de la expresión de *STL1::LacZ*. Además, estudios de co-inmunoprecipitación y fosforilación *in vivo* mostraron que Hog1p y Smp1p interaccionan, siendo Smp1p fosforilado directamente por Hog1p en diferentes

residuos dentro de su dominio de activación bajo estrés osmótico (De Nadal *et al.*, 2003).

La fosforilación de Smp1p por la MAP quinasa es importante 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). Además, en el mismo estudio se describió una nueva función aparte de su implicación en la respuesta a estrés osmótico ya que es requerido para la supervivencia celular en fase estacionaria. En mamíferos, la regulación de factores de transcripción MEF2C, familia a la que pertenece Smp1p, está bajo control de la MAP quinasa p38, homóloga de Hog1p (Kyriakis and Avruch, 2001; McKinsey *et al.*, 2002).

Respuesta General a Estrés. Msn2p y Msn4p.

Desde hace más de 25 años se sabe que si exponemos células de levadura a algún tipo de estrés suave conseguimos mejorar fuertemente su habilidad para sobrevivir a choques mucho más fuertes. Además, células que crecen bajo disponibilidad de nutrientes limitada adquieren tolerancia a un rango de condiciones de estrés. Estas observaciones indican que *Saccharomyces cerevisiae* tiene un mecanismo de adquisición de tolerancia que protege a sus células de un número diferente de condiciones de estrés. A este sistema se le ha llamado respuesta general a estrés.

Análisis de expresión génica global han mostrado que la expresión de más del 10% de los genes de levadura responde a estrés en general, es decir, se ve afectada por diferentes condiciones de estrés aparentemente no relacionadas, como la falta de nutrientes, estrés oxidativo, choque térmico o estrés hiperosmótico. El número exacto de genes está comprendido entre los 200 y 300 genes inducidos y entre los 300 y 600 reprimidos (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000).

Una vía mediante la cual las células consiguen la inducción bajo diferentes condiciones de estrés es controlando la expresión de ciertos genes mediante diferentes rutas de percepción y señalización de estrés que convergen al nivel del promotor. Por ejemplo, algunos genes que se inducen por choque térmico a través del

factor de transcripción Hsf1p también se inducen por estrés oxidativo mediante Skn7p y ambos factores parecen operar a través del mismo sitio en el promotor, el llamado elemento de choque térmico (Raitt *et al.*, 2000). Otro ejemplo es *HAL1*, que se induce por estrés osmótico y agotamiento de aminoácidos; su expresión parece estar controlada por Sko1p y Gcn4p a través del mismo sitio en el promotor (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001b).

Por otra parte, otros muchos genes de respuesta general a estrés están controlados mediante los llamados sitios *STRE* (Elementos de Respuesta a Estrés) a través de los reguladores transcripcionales Msn2p y Msn4p (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt and McEntee, 1996). Los elementos de respuesta a estrés se encuentran en muchos promotores de levadura y cerca de 150 genes muestran una expresión alterada en un doble mutante *msn2msn4* (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000). Pero además los dos factores podrían unirse a otros elementos en los promotores, tal vez en conjunción con otros factores.

Las dos proteínas son sólo idénticas en un 32%, aunque sus dominios de unión al DNA en dedos de zinc son muy similares y se unen a la misma secuencia. Parece que estos factores de transcripción tienen funciones redundantes, aunque generalmente Msn2p tiene una contribución mucho más fuerte (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

Bajo condiciones óptimas de crecimiento, ambas proteínas son citosólicas y al someter a las células a diferentes condiciones de estrés Msn2p y Msn4p se dirigen al núcleo de una manera rápidamente reversible e independiente de la síntesis proteica. Mutaciones que eliminan algunos sitios de fosforilación dependientes de la proteína quinasa A conducen a una localización nuclear aún en condiciones de crecimiento óptimas (Gorner *et al.*, 1998).

En condiciones de estrés osmótico no se sabe si Hog1p controla directamente a Msn2/4p. Sí se sabe que su localización en el núcleo es necesaria aunque no se ve afectada en un mutante *hog1* y la activación de sitios *STRE* requiere a Hog1p en condiciones de estrés osmótico (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

5. Conexión ente la ruta HOG y otras rutas de respuesta a estrés en levadura

Dado que la ruta HOG comparte proteínas quinasas y fosfatasas con otras rutas de MAP quinasas, existen numerosos nudos de interacción entre estas rutas. De hecho, mutaciones de *PBS2* o *HOG1* resultan en una mayor estimulación por estrés osmótico de la ruta de desarrollo de pseudohifas y de la ruta de respuesta a feromonas (Davenport *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 1996; O'Rourke *et al.*, 1998). Además, los perfiles transcripcionales del mutante $\Delta hog1$ muestran que muchos de los genes blanco de la ruta de respuesta a feromonas se inducen altamente después del choque osmótico (Rep *et al.*, 2000).

Por otra parte, la ruta de integridad de la pared celular se activa en respuesta a una amplia variedad de estímulos que causan la expansión de la misma. Su función principal es mantener la integridad celular controlando el ensamblaje de la pared durante el crecimiento, desarrollo y bajo impactos externos que llevan a una expansión celular o daño de la propia pared (Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Jung and Levin, 1999). La cascada de MAP quinasas de la ruta de integridad celular media la respuesta transcripcional a través de dos reguladores, Rlm1p y el complejo SBF (Heinisch *et al.*, 1999). Interesantemente, el factor de transcripción Smp1p, homólogo de Rlm1p, es un blanco directo de Hog1p bajo estrés osmótico (De Nadal *et al.*, 2003).

A primera vista, la ruta HOG y la ruta de integridad celular confieren funciones opuestas. La primera es estimulada bajo estrés hiperosmótico mientras que la segunda es estimulada bajo un choque hipo-osmótico. Además, las respuestas mediadas por la ruta de integridad celular centran su objetivo en la disminuida presión de turgencia en la pared celular o que la pared sustente la presión de manera efectiva mientras que la ruta HOG parece mediar el desarrollo de dicha presión. Sin embargo, un punto de vista alternativo es que las dos rutas colaboran en el mismo proceso. La ruta HOG parece controlar el hinchamiento o el encogimiento de la célula a nivel de la membrana plasmática mientras que la ruta de integridad celular hace lo mismo a nivel de la pared celular. La respuesta mediada por la ruta HOG conduce a un aumento en la presión de

turgencia, lo cual es interpretado por la ruta de integridad celular para coordinar la expansión y rigidez de la pared y así disminuir la presión de turgencia. Las MAP quinastas de ambas rutas parecen operar de manera que sólo una es activa al mismo tiempo (Davenport *et al.*, 1995), aunque durante el crecimiento de las células ambas rutas podrían ser activadas o desactivadas dentro de cortos intervalos de tiempo para lograr un balance entre la expansión celular y el desarrollo de la pared celular. El enlace entre ambas rutas podría ser Skn7p.

Skn7p.

Es una proteína con una extensa similitud al factor de transcripción de estrés por calor Hsf1p y funciona como un activador transcripcional en muchos procesos celulares, como son el ciclo celular (Bouquin *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1995), la respuesta a estrés oxidativo (Brombacher *et al.*, 2006; Charizanis *et al.*, 1999a; Charizanis *et al.*, 1999b; He *et al.*, 2009; Krems *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 1997), la respuesta a estrés por calor (Raitt *et al.*, 2000), metabolismo de la pared celular (Brown *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2002) y crecimiento filamentoso inducido por falta de nitrógeno (Lorenz y Heitman, 1998). Además, interacciones genéticas y físicas relacionan Skn7p con la ruta HOG (Ketela *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Tao *et al.*, 1999); la eliminación de *SKN7* causa un defecto en el crecimiento en combinación con la eliminación de *PTC1*, que codifica una de las fosfatasas de la ruta HOG. Este crecimiento defectuoso se suprime eliminando *HOG1* o *PBS2*, lo cual se ha interpretado como una evidencia de que Skn7p modula la actividad de la ruta (Ketela *et al.*, 1998). Pero también se puede decir que Skn7p funciona en un sistema con una función contraria a la de la ruta HOG. De este modo, el sistema Sln1p-Ypd1p se activa en respuesta a baja osmolaridad con la consiguiente inactivación de la ruta HOG y activación de Skn7p (Fassler *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2002).

La relación entre el papel de Skn7p en la regulación osmótica y el estrés oxidativo es menos obvia. Fue aislado en una búsqueda de mutantes sensibles a estrés oxidativo (Krems *et al.*, 1996) y se une a promotores de genes controlados por estrés oxidativo, como *TRX2*, (Morgan *et al.*, 1997) y *TSA1* (Lee *et al.*, 1999). Además Skn7p se requiere

para la expresión estimulada de un gran número de genes bajo estrés oxidativo (Lee *et al.*, 1999). Parece claro a la vista de estos datos que Skn7p juega un papel importante en la defensa celular frente al daño oxidativo. La respuesta a este tipo de estrés está controlada además por otro factor de transcripción, Yap1p (Beckhouse *et al.*, 2008; Brombacher *et al.*, 2006; Jamieson, 1998). Interesantemente, parece que Skn7p tiene un papel como soporte de Yap1p para inducir la expresión de sus genes blanco (Lee *et al.*, 1999).

A pesar de que está involucrada en múltiples procesos celulares, Skn7p no es una proteína esencial, lo cual sugiere que está involucrada en sistemas parcialmente redundantes. De hecho, en todos los sistemas donde se ha mostrado que tiene una función, Skn7p coopera o asiste a otros factores de transcripción.

6. Redes de regulación transcripcional bajo estrés osmótico

Precisamente uno de los objetivos de la genómica funcional es descubrir y dilucidar las intrincadas redes genéticas que coordinan la activación transcripcional de diferentes circuitos dentro de una célula. La redundancia de la actuación de diferentes reguladores en los programas transcripcionales bajo estrés osmótico hace que esta respuesta adaptativa sea difícil de explicar mediante experimentos que nos muestran los cambios en la expresión génica de un organismo hibridando cDNAs en una micromatriz de DNA. Desafortunadamente, este tipo de experimentos no distinguen entre los efectos directos de la unión de un factor de transcripción y los efectos indirectos que resultan de un factor de transcripción que induce la expresión de otros factores. Además, los análisis informáticos, como la búsqueda de motivos de DNA a los que se unen las proteínas, sólo son aproximaciones indirectas que identifican posibles genes regulados conjuntamente.

La combinación de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina con los ensayos en micromatrices de DNA, comúnmente llamada ChIP-Chip (Ren *et al.*, 2000), ha abierto la posibilidad en los últimos años de identificar las regiones a las cuales los

factores de transcripción se unen *in vivo* a lo largo de todo el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Harbison *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002; Nal *et al.*, 2001).

Previo a este trabajo se llevó a cabo un análisis de localización genómica para identificar los promotores blanco de uno de los factores de transcripción regulado por la ruta HOG, Sko1p (Proft *et al.*, 2005). Este trabajo reveló información importante sobre la función biológica de Sko1p ya que se demostró que regula la inducción por estrés osmótico de varios genes que codifican factores de transcripción involucrados en otras respuestas a estrés y Ptp3, que codifica una fosfatasa que regula a la quinasa Hog1p (figura 5).

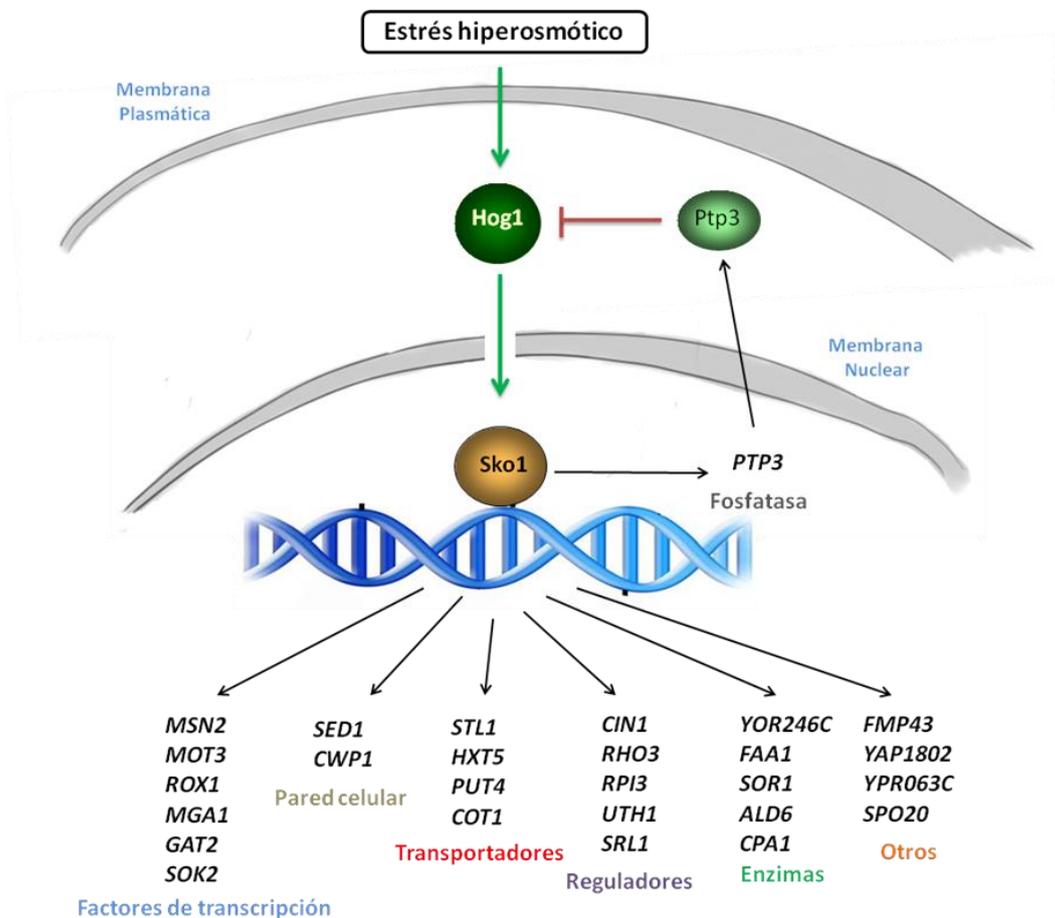


Figura 5. Clasificación de los genes blanco identificados del factor de transcripción Sko1p.

Las redes de factores de transcripción son de gran relevancia en los complejos programas transcripcionales, como el relacionado con el ciclo celular (Simon *et al.*,

2001) y también a nivel general (Harbison *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2002). Este estudio previo a nuestro trabajo indica que Sko1p activa una red reguladora además de inducir genes que codifican proteínas que ayudan a mitigar el estrés osmótico. En primer lugar, Sko1p activa la transcripción de *MSN2* permitiendo que la respuesta inicial a un estrés específico refuerce la respuesta general a estrés. En segundo lugar, se une a los promotores de los genes *MOT3*, *ROX1* y *MGA1*, que codifican factores de transcripción. La expresión de *MOT3* y *MGA1* se induce fuertemente por estrés salino (6 y 15 veces, respectivamente) y se ve significativamente reducida en una cepa $\Delta sko1$ y mucho más afectada en una cepa $\Delta hog1$. Sin embargo, la expresión de *ROX1* se induce sólo de forma suave bajo estrés osmótico, siendo independiente de Sko1p o Hog1p (Proft *et al.*, 2005).

Mot3p y Rox1p reprimen de manera sinérgica la transcripción de genes de falta de oxígeno (Kastaniotis *et al.*, 2000; Sertil *et al.*, 2003). Ambos genes son inducibles por estrés osmótico y esto señala que podrían tener una función fisiológica bajo este estrés. Esta función no se conoce hasta el momento, aunque sí que se ha investigado una conexión entre anaerobiosis y tolerancia a estrés osmótico (Krantz *et al.*, 2004). Mot3p está también involucrado en la regulación de la síntesis de ergosterol y en la función de la vacuola (Hongay *et al.*, 2002), lo cual podría ser crítico por la salida del agua y el desajuste del balance iónico producido por el estrés osmótico.

Por otra parte, Mga1p es un activador central en el programa transcripcional que controla la diferenciación de las células de levadura a la formación de pseudohifas, y su sobreexpresión, causa inducción del crecimiento pseudohifal (Borneman *et al.*, 2006; Lorenz y Heitman, 1998). Aunque el crecimiento en forma de pseudohifas es un fenómeno a largo plazo asociado con la falta de nutrientes, el proceso podría ser iniciado de una manera transitoria bajo estreses ambientales y detenido una vez la célula se ha adaptado a las nuevas condiciones ambientales (Proft *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, la contribución relativa de Sko1p a la expresión inducida por estrés osmótico varía considerablemente entre los genes *MSN2*, *MOT3*, *MGA1* y *ROX1*. Los cuatro promotores se activan por estrés osmótico y

Sko1p se une a ellos, aunque contribuye en más de un 50% a la transcripción de *MSN2* y *MOT3*, menos de un 50% a la de *MGA1* y parece que nada a la de *ROX1*. Este modesto efecto de Sko1p sugiere que hay otros factores que contribuyen a la regulación de estos promotores. Además, en este estudio se demostró que Sko1p se asocia al promotor de *STL1*, cuya alta inducción por estrés osmótico se atribuía anteriormente sólo al activador Hot1p (Rep *et al.*, 2000). Por tanto parece que la expresión de muchos genes inducibles por estrés osmótico está determinada por la combinación de varios factores de transcripción actuando en el mismo promotor, lo cual explica el hecho de que ellos solos no pueden regular todos los genes bajo control de Hog1p. Cada uno de estos factores ejerce un efecto limitado en la expresión génica global regulando un pequeño grupo de genes osmoinducibles (Causton *et al.*, 2001) por lo que no parece suficiente para explicar el impacto que tiene Hog1p sobre la expresión génica. Además, mutantes con deleciones múltiples de factores de transcripción siguen mostrando inducción residual de ciertos genes en respuesta a estrés osmótico (Gasch *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 1999b; Treger *et al.*, 1998). Esto hace sospechar que se requieren factores de transcripción adicionales para regular la expresión génica bajo estrés osmótico.

7. Impacto del estrés osmótico en la expresión génica global

La respuesta global a nivel transcripcional de células de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a estrés osmótico y a otros estreses ha sido analizada en diferentes estudios independientes (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Yale *et al.*, 2001). En general, el estrés osmótico altera la expresión de aproximadamente el 10% de los genes de levadura. Muchos de los genes que se inducen también son estimulados por otras condiciones de estrés. De hecho, el grupo de genes cuya expresión responde específicamente a un choque hiperosmótico es relativamente pequeña (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000). Sin embargo, el número de genes que responden a estrés osmótico depende de la severidad del choque y del tiempo aplicado. En este sentido, un estudio reciente sobre la expresión génica global con estrés osmótico muestra un aumento del número de genes

inducidos a más del 20% del genoma -cerca de 1400 genes- a lo largo de una cinética de tiempo (Ni *et al.*, 2009).

En la mayoría de los casos, los estudios sobre la regulación de la expresión génica se han centrado en los genes que son inducidos por estrés osmótico, aunque hay un gran número de genes que muestran una regulación totalmente diferente y sus niveles de transcritos disminuyen bajo estrés osmótico (Gasch *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000). Entre los principales grupos de genes reprimidos están los que codifican proteínas ribosomales y los relacionados con el crecimiento celular. La represión de todos estos genes se correlaciona con la disminución de la iniciación de la traducción, la parada transitoria del ciclo celular y del crecimiento que se observa en respuesta a diferentes condiciones de estrés. La combinación de estos efectos en la disminución de la síntesis de proteínas y de la traducción podría ayudar a conservar la masa y energía necesarias mientras la célula se adapta a las nuevas condiciones.

Es importante resaltar que el número de transcritos reprimidos es tan grande como el de los inducidos, viéndose afectados más de 1300 genes bajo estrés osmótico (Ni *et al.*, 2009). Además de los genes involucrados en la síntesis de proteínas, existen otros procesos representados por un pequeño número de genes reprimidos, que incluye la biosíntesis de la pared celular, funciones relacionadas con el citoesqueleto y las chaperonas, glucosilación y secreción de proteínas, metabolismo del piruvato y aminoácidos, biosíntesis de nucleótidos, replicación de DNA y otros.

Sin embargo, en este apartado introductorio al trabajo presentado, vamos a hablar de otro proceso que también se ve regulado en respuesta a estrés y que no ha sido objeto de demasiada atención: el metabolismo de los lípidos. Se sabe que bajo estrés osmótico la expresión de genes involucrados en la síntesis de algunos lípidos de membrana se ve incrementada, mientras que la expresión de algunos genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de ergosterol disminuye (Causton *et al.*, 2001; Rep *et al.*, 2000). Esto sugiere que la estructura y propiedades de la membrana plasmática también se ven afectadas por el choque osmótico, de tal

manera que para adaptarse eficientemente las células deben regular su contenido de ergosterol.

Regulación negativa de la expresión génica bajo estrés osmótico: biosíntesis de ergosterol

8. Estructura y funciones de la membrana plasmática

Todas las membranas celulares están formadas por lípidos y proteínas y tienen una estructura básica común. El componente lipídico está formado por muchos millones de moléculas de lípidos ordenados en dos láminas íntimamente superpuestas, formando una bicapa lipídica que actúa como barrera de permeabilidad.

Los lípidos de las membranas tienen una parte hidrofílica y una o dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas. Los más abundantes son los fosfolípidos, en los cuales el grupo del extremo hidrofílico se encuentra unido al resto de la molécula por medio de un grupo fosfato. Todas las moléculas con propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas reciben el nombre de anfipáticas. Esta característica también la presentan otros tipos de lípidos de membrana –los esteroides y los glucolípidos–, que tienen azúcares en su cabeza hidrofílica.

El ambiente acuoso dentro y fuera de la célula impide a los lípidos de la membrana escaparse de la bicapa, pero nada impide que se desplacen lateralmente y cambien de posición los unos respecto a los otros dentro del plano de la bicapa. Los movimientos de los fosfolípidos de un lado de una monocapa a otro (llamados comúnmente *flip-flop*) son raros pero las moléculas lipídicas giran muy rápidamente sobre su eje longitudinal y constantemente intercambian su lugar con el de las moléculas vecinas (figura 6). A la facilidad con la que las moléculas lipídicas se desplazan dentro de una monocapa se le llama *fluidez* y ésta es esencial para sus funciones, siendo distinta a otra propiedad también importante de la membrana, la *flexibilidad*, que es la capacidad de la membrana para doblarse formando compartimentos cerrados.

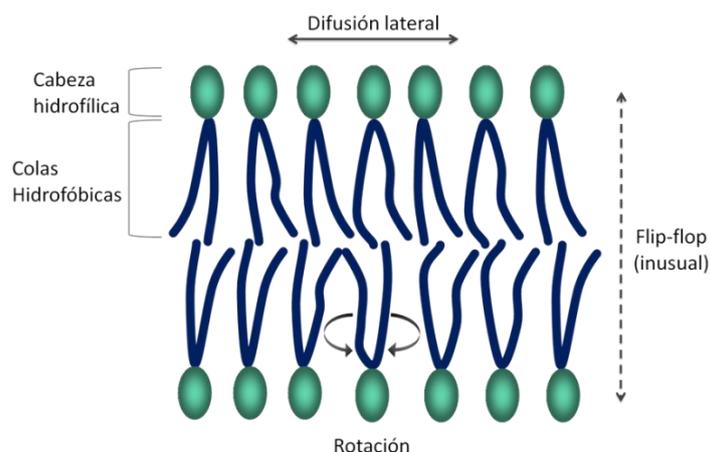


Figura 6. Representación de la bicapa lipídica y del movimiento de los fosfolípidos dentro de la misma.

El grado de fluidez de una membrana celular ha de mantenerse dentro de unos ciertos límites. La fluidez de una bicapa lipídica a una temperatura determinada depende de su composición de fosfolípidos y, especialmente, de la naturaleza de las colas hidrocarbonadas: cuanto más regular y más compacto sea el empaquetamiento en la bicapa, más viscosa y menos fluida será la bicapa. Dos propiedades de las colas hidrocarbonadas afectan su empaquetamiento en la bicapa: su longitud y su insaturación (el número de dobles enlaces que contienen). Una longitud de la cadena menor reduce la tendencia de las colas hidrocarbonadas a interactuar entre sí, de forma que aumenta la fluidez de la bicapa. Las levaduras ajustan constantemente tanto la longitud como la insaturación de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de su bicapa para mantener relativamente constante la fluidez de la membrana. Ésta es importante para la célula por muchas razones; permite a las proteínas de membrana difundir rápidamente en el plano de la bicapa y que interactúen unas con otras, lo cual es crucial, por ejemplo, en los procesos de señalización celular (Los y Murata, 2004).

En las células eucariotas, la fluidez de la membrana está modulada por la presencia del esteroil colesterol (figura 7). Estas cortas y rígidas moléculas se encuentran en grandes cantidades en la membrana plasmática, donde rellenan los espacios existentes entre las moléculas vecinas de fosfolípidos de forma que endurecen la bicapa y la

hacen menos permeable (Henneberry y Sturley, 2005; Sturley, 2000; van der Rest *et al.*, 1995).

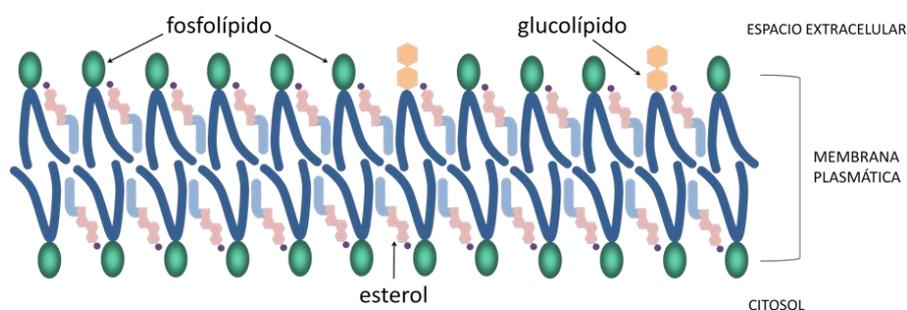


Figura 7. Distribución de los esteroides en la membrana plasmática de una célula eucariota.

La biosíntesis de esteroides es un proceso metabólico crucial de la célula y está fuertemente regulada al nivel de la expresión de genes que codifican enzimas en los múltiples pasos biosintéticos (Espenshade y Hughes, 2007). Debido a su importancia médica, la regulación de la homeostasis del colesterol ha sido muy estudiada en células de mamíferos (Brown y Goldstein, 2009). Aquí, dos activadores transcripcionales llamados *SREBP* han sido identificados como reguladores positivos de genes involucrados en la biosíntesis de colesterol y toma en respuesta a deficiencia de colesterol (Goldstein *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Yokoyama *et al.*, 1993).

9. Biosíntesis de esteroides en *Saccharomyces cerevisiae*

El esteroide predominante en levadura es el ergosterol, el cual es idéntico al colesterol excepto por la presencia de dobles enlaces en los carbonos 7 y 22 y un grupo metil en el carbono 28. Su síntesis y modificaciones son muy similares a las que ocurren en células de mamífero para el colesterol, actuando de manera similar respecto a la fluidez de la membrana (Sturley, 2000). El hecho que la ruta biosintética del ergosterol comparta muchos pasos altamente conservados con la ruta del colesterol (figura 8), convierte a *Saccharomyces cerevisiae* en un sistema modelo

atractivo para entender la homeostasis de esteroides (Espenshade *et al.*, 2007; Henneberry *et al.*, 2005; Sturley, 2000).

La principal fuente de obtención de ergosterol en la levadura es mediante su biosíntesis interna mientras haya suficiente oxígeno disponible, el cual sirve como cofactor esencial de varios pasos enzimáticos en la ruta (Lorenz y Parks, 1991). Bajo condiciones anaeróbicas estrictas, el ergosterol se convierte en esencial para las células de levadura y tiene que ser tomado del exterior en un proceso normalmente reprimido en presencia de oxígeno (Ishtar Snoek y Yde, 2007).

El ergosterol no se sintetiza en condiciones de crecimiento anaeróbicas y la expresión de los genes que codifican enzimas biosintéticas está controlada por los niveles de oxígeno. Mot3p es el factor de transcripción responsable de la represión de algunos genes *ERG* en estas condiciones (Hongay *et al.*, 2002). Por otra parte, la expresión de *MOT3* está regulada por estrés osmótico a través del factor de transcripción Sko1p (Proft *et al.*, 2005).

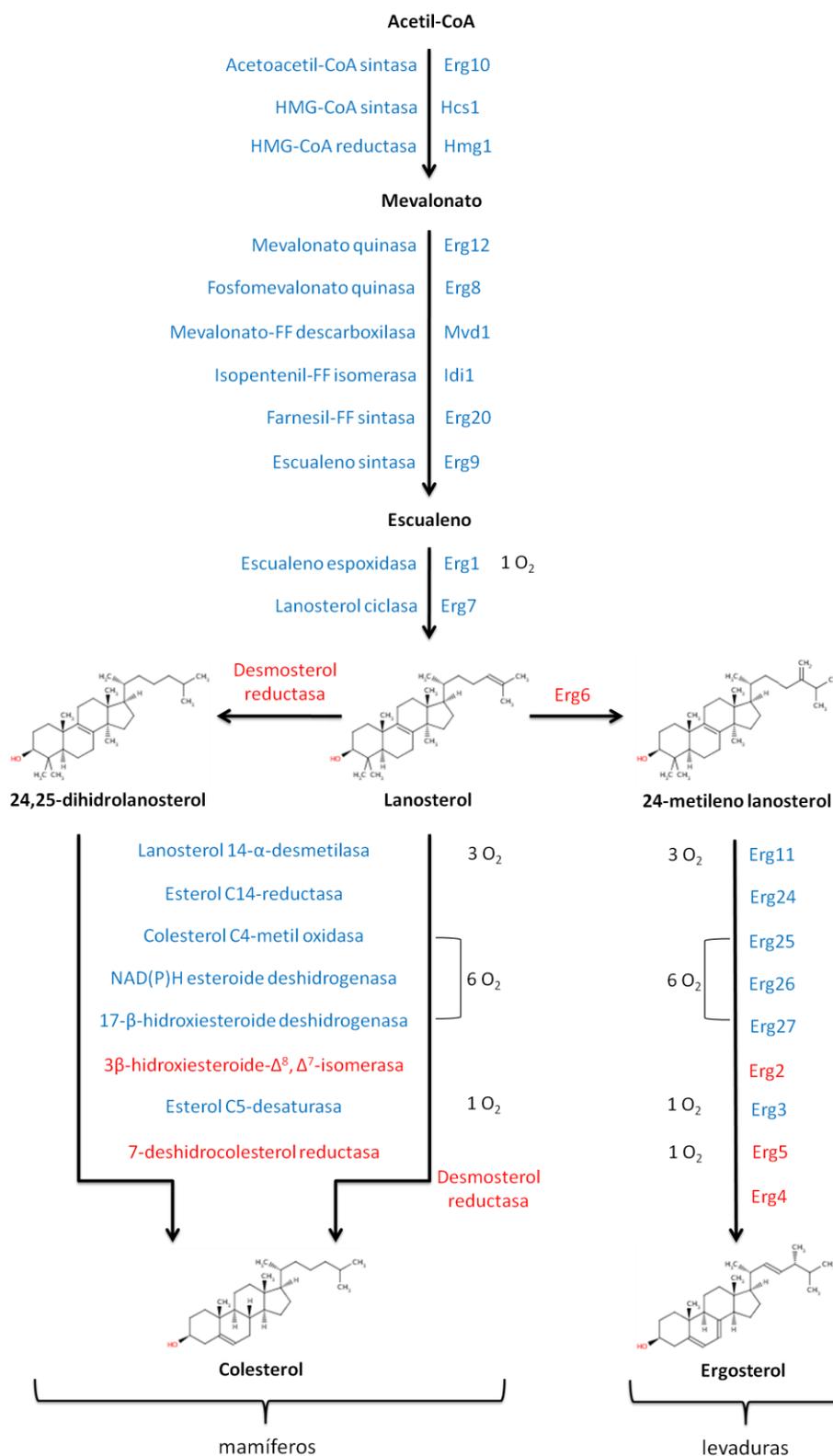


Figura 8. Ruta de biosíntesis de esteroides en mamíferos y levadura. Las enzimas mostradas en azul están conservadas en levadura y mamíferos, mientras que las de color rojo son únicas de cada ruta. Se muestra los requerimientos de oxígeno para aquellas enzimas dependientes de oxígeno. Adaptación de (Espenshade *et al.*, 2007).

10. Control transcripcional de la síntesis de ergosterol en levadura

En *Saccharomyces cerevisiae*, el control transcripcional de los genes *ERG* ha sido intensamente estudiado mediante tratamientos que impiden una síntesis eficiente de ergosterol y que causan el agotamiento de esteroides. Esto se puede lograr por inhibición de enzimas biosintéticas mediante drogas o bajando la concentración de oxígeno.

Cuando los niveles de esteroides son reducidos, la expresión de genes *ERG* que catalizan los pasos finales de la biosíntesis de ergosterol, como *ERG2* y *ERG3*, se incrementan considerablemente. Dos factores de transcripción relacionados estructuralmente, Ecm22p y Upc2p, han sido identificados como los principales activadores de estos genes (*Vik y Rine, 2001*). Ambos factores se unen al llamado *SRE* (*Sterol Regulatory Element*), y regulan a los genes *ERG1, ERG2, ERG3, ERG7, ERG25, ERG26* y *ERG27*. Aunque la unión de Upc2p y Ecm22p a los promotores de otros genes *ERG* no ha sido investigada directamente, el sitio de unión *SRE* se encuentra en muchos promotores de otros genes *ERG* (figura 9).

Ecm22p es el principal activador transcripcional de *ERG2* en condiciones normales de crecimiento, pero cuando en ausencia de oxígeno los esteroides se agotan, los niveles de Ecm22p bajan y Upc2p sustituye a Ecm22p en los promotores de los genes *ERG* (*Davies et al., 2005*). Se ha mostrado que mutaciones puntuales de ambos factores transcripcionales, llamadas *upc2-1* y *ecm22-1*, aumentan la capacidad de activación transcripcional bajo condiciones normales. En el caso de *upc2-1*, permite la toma externa de esteroides aún en presencia de oxígeno (*Crowley et al., 1998; Davies et al., 2005*). Hap1p es otra proteína reguladora que se une directamente a los promotores de los genes *ERG* confiriendo una regulación dependiente de los niveles de oxígeno (*Davies y Rine, 2006; Hickman y Winston, 2007*).

Bajo condiciones normales de crecimiento, Mot3p actúa en combinación con el factor de transcripción Rox1p -otro blanco de Sko1p- reclutando al complejo represor Tup1-Ssn6p para reprimir determinados genes que se expresan en anaerobiosis

(Kastaniotis *et al.*, 2000; Klinkenberg *et al.*, 2005; Sertil *et al.*, 2003). Además, Mot3p ha sido identificado como un represor transcripcional directo de los genes *ERG2* y *ERG6*, contribuyendo al control de la ruta de ergosterol bajo anaerobiosis (Hongay *et al.*, 2002). El aumento en la expresión de *ERG2* depende principalmente de Ecm22p, ya que la eliminación de *MOT3* no tiene un efecto significativo en la activación de *ERG2* por Upc2p. Sin embargo, la activación por Ecm22p si se ve aumentada en una cepa Δ *mot3*, lo cual sugiere que Mot3p reprime la expresión de *ERG2* dependiente de Ecm22p pero no de Upc2p (Davies y Rine, 2006).

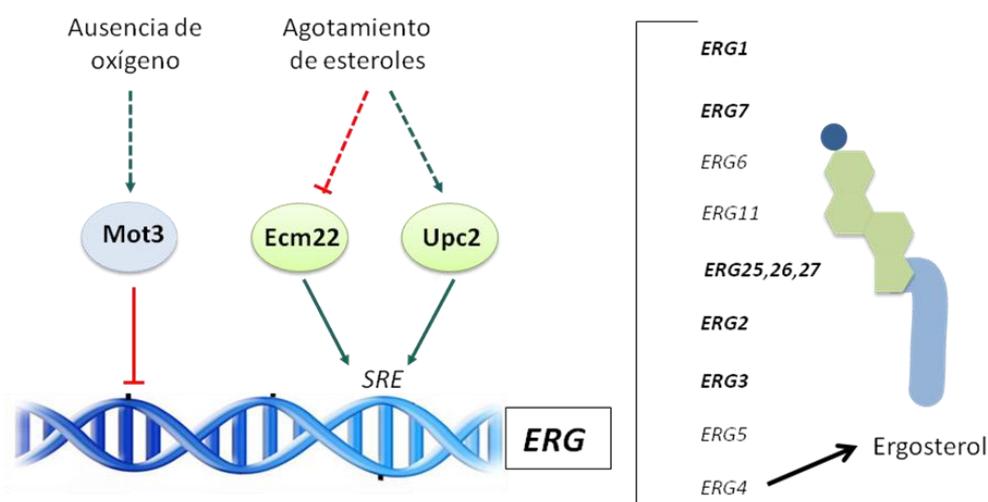


Figura 9. Esquema del control transcripcional de genes *ERG* en respuesta a diferentes estímulos.

A pesar de la caracterización de los factores de transcripción mencionados, los cuales parece que ajustan la expresión de los genes *ERG* a la falta de ergosterol, se carece de conocimiento sobre la naturaleza de las rutas de transmisión de señales que actúan sobre la homeostasis de ergosterol, así como de las condiciones ambientales distintas a la falta de esteroides que causan una diferente expresión de la ruta *ERG*. Además, la mayoría de las terapias antifúngicas se dirigen a la biosíntesis de ergosterol subrayando la necesidad de adquirir un conocimiento detallado de los mecanismos que controlan la homeostasis de ergosterol en levadura (Carrillo-Munoz *et al.*, 2006).

En este trabajo se aportan evidencias sobre la importancia de la represión de algunos genes *ERG* y la bajada en los niveles celulares de ergosterol en la adaptación a

estrés hiperosmótico y oxidativo; proceso que es controlado en parte por los factores de transcripción Mot3p y Rox1p y la MAP quinasa terminal de la ruta HOG, Hog1p.

OBJETIVOS

El funcionamiento molecular de las rutas de señalización y transmisión de señales es de gran interés científico. La ruta de MAP quinasas HOG responde específicamente a estrés osmótico y está conservada en levaduras, plantas y mamíferos, lo cual la sitúa entre las rutas más investigadas. Su estudio está proporcionando un conocimiento imprescindible para comprender los mecanismos moleculares de la adaptación celular a estrés y su importancia se ve reflejada en la frecuente publicación de revisiones en revistas de alto prestigio. Previamente a este trabajo se demostró que la regulación de la transcripción en las rutas de respuesta a estrés osmótico es sorprendentemente compleja e involucra al menos seis factores de transcripción. El análisis genómico de la localización del factor Sko1p identificó muchos blancos nuevos del programa transcripcional durante el estrés osmótico y dio la oportunidad de comprender por primera vez el funcionamiento de la respuesta mediante las interacciones directas de factores de transcripción con el genoma de la levadura.

Dos de los promotores blanco de Sko1p bajo estrés osmótico codifican otros factores de transcripción, Mot3p y Rox1p, que han sido seleccionados en este trabajo con el fin de conocer su contribución en la respuesta a estrés. Además, se han escogido los otros dos factores de transcripción conocidos que interactúan directamente con la MAP quinasa Hog1 y son regulados por ella, Hot1p y Smp1p, con el fin de comprender con mayor detalle la organización genómica del programa transcripcional.

Concretamente, los objetivos específicos de este trabajo han sido los siguientes:

- Determinación del papel de los represores Mot3p y Rox1p en la adaptación a estrés osmótico en *Saccharomyces cerevisiae*. Estudio de la regulación de la biosíntesis de ergosterol y su importancia en la resistencia al estrés.
- Identificación de los blancos a nivel genómico de los factores de transcripción Hot1p, Smp1p y Mot3p durante estrés osmótico. Estudio de la red de regulación transcripcional activada por la ruta HOG en respuesta al estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*
 2. Medios de crecimiento y tratamientos aplicados
 3. Determinación del número y tamaño celular
 4. Plásmidos empleados
 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados
 6. Ensayos de sensibilidad en medio sólido y líquido
 7. Técnicas estándar de laboratorio empleadas
 8. Análisis *Western blot*
 9. Análisis de expresión de mRNAs (*Northern blot*)
 10. Cuantificación de ergosterol total de células
 11. Disrupción génica mediante el sistema loxP-CRE
 12. Medición de la concentración intracelular de iones
 13. Etiquetado de proteínas con epitopos myc o HA
 14. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)
 15. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real
 16. Localización genómica mediante ChIP-Chip
 17. Secuenciación masiva de cromatina IP (ChIP-Seq)
 18. Estudio de interacciones regulatorias mediante herramientas informáticas
-

En primer lugar se detallan las cepas de levadura, los medios de crecimiento y tratamientos aplicados a los cultivos, así como los plásmidos y anticuerpos empleados para llevar a cabo los diferentes experimentos que componen este trabajo. Los tampones, disoluciones, reactivos y medios tecnológicos utilizados se describen en cada método donde han sido utilizados.

1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

En este trabajo se han utilizado las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se muestra en la tabla 3. En ella se indica el genotipo y procedencia de cada cepa, así como la cepa de origen y/o la mutación introducida.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741 (silvestre)	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
$\Delta hog1$	BY4741 <i>hog1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta rtg1$	BY4741 <i>rtg1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta rtg3$	BY4741 <i>rtg3::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta skn7$	BY4741 <i>skn7::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta yap1$	BY4741 <i>yap1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta gat2$	BY4741 <i>gat2::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta mga1$	BY4741 <i>mga1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta msn2$	BY4741 <i>msn2::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta msn4$	BY4741 <i>msn4::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta sko1$	BY4741 <i>sko1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta hot1$	BY4741 <i>hot1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta msn1$	BY4741 <i>msn1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta smp1$	BY4741 <i>smp1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta rox1$	BY4741 <i>rox1::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta mot3$	BY4741 <i>mot3::KANMX4</i>	EUROSCARF
$\Delta rox1 \Delta mot3$	BY4741 <i>rox1::KanMX4 mot3::his5+ (S. pombe)</i>	Este trabajo
W303-1A (silvestre)	<i>MATa; ura3-1; his3-11,-15; leu2,3-112; trp1</i>	R. Rothstein

RPB3-HA	W303-1A con 3xHA-RPB3	Paul Mason
RPB3-HA $\Delta hog1$	W303-1A con 3xHA-RPB3 <i>hog1::KanMX4</i>	M. Proft
MSN1-HA	W303-1A con MSN1-3xHA-KAN	Este trabajo
HOG1-HA	W303-1 ^a con HOG1-3xHA-KAN	M. Proft
MSN2-HA	W303-1A con MSN2-3xHA-KAN	Este trabajo
MSN4-HA	W303-1A con MSN4-3xHA-KAN	Este trabajo
SMP1-HA	W303-1A con SMP1-3xHA-KAN	Este trabajo
RTG1-HA	W303-1A con RTG1-3xHA-KAN	Este trabajo
MGA1-HA	W303-1A con MGA1-3xHA-KAN	Este trabajo
GAT2-HA	W303-1A con GAT2-3xHA-KAN	Este trabajo
ROX1-myc	W303-1A con ROX1-2myc-KAN	Este trabajo
ECM22-myc	W303-1A con ECM22-2my-KAN	Este trabajo
HOT1-myc	W303-1A con HOT1-9myc-TRP1	Fancesc Posas
FY1339 (silvestre)	<i>MATa; ura3Δ0; his3Δ200; trp1Δ63</i>	Fred Winston
FY2081	FY1339 con MOT3-18myc::TRP1	Fred Winston
MOT3-myc $\Delta hog1$	<i>MOT3-18myc::TRP1 $\Delta hog1::loxP-his5+(S. pombe)-loxp$</i>	Este trabajo
WPY361	W303-1A con <i>upc2-1</i> (mutación puntual)	Will Prinz
BYROX1TAP	BY4741 con ROX1-TAP-HIS3	OPEN BIOSYSTEMS
BYECM22TAP	BY4741 con ECM22-TAP-HIS3	OPEN BIOSYSTEMS
BYSKO1TAP	BY4741 con SKO1-TAP-HIS3	OPEN BIOSYSTEMS
BYUPC2TAP	BY4741 con UPC2-TAP-HIS3	OPEN BIOSYSTEMS
BYMOT3TAP	BY4741 con MOT3-TAP-HIS3	OPEN BIOSYSTEMS
BYMOT3TAP $\Delta hog1$	BY4741 con MOT3-TAP-HIS3 <i>$\Delta hog1::KAN$</i>	Este trabajo
BYROX1TAP $\Delta hog1$	BY4741 con ROX1-TAP-HIS3 <i>$\Delta hog1::KAN$</i>	Este trabajo

Tabla 3. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.

2- Medios de crecimiento y tratamientos aplicados a los cultivos

En condiciones normales de trabajo, las células de levadura fueron incubadas a 28 °C en agitación a 200 rpm en los medios YPD o SD, descritos a continuación.

La preparación de medio YPD se llevó a cabo disolviendo 1% de extracto de levadura, 2% de peptona bacteriológica, 2% de glucosa (en caso de medio sólido, se añadió también 2% de agar bacteriológico) en agua 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 µg/ml.

Para la preparación del medio SD se disolvió 0.67% de *Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos, pero con ácido succínico 0.5M llevado a pH 5.5 con Tris, 2% de glucosa (dextrosa) y 2% de agar bacteriológico solo en caso de medios sólidos. El medio se suplementó con los aminoácidos y bases requeridas según la cepa a partir las disoluciones stock adenina 100x (2.5g/l), uracilo 100x (2.5g/l), triptófano 100x (2.5g/l), histidina 100x (2.5g/l) y leucina 100x (2.5g/l). Las disoluciones se esterilizaron por filtración y se conservaron en alícuotas a 4 ° C.

En este trabajo de investigación se requirió además someter a las células de *Saccharomyces cerevisiae* a condiciones de estrés osmótico u oxidativo. Para ello, se utilizaron los siguientes agentes:

En el caso de estrés osmótico, se sometió a células de levadura crecidas en YPD hasta fase exponencial de crecimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, cloruro de potasio 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 los agentes oxidativos menadiona o agua oxigenada.

Para los ensayos de sensibilidad a cationes tóxicos, a las células incubadas en medio YPD se les añadió concentraciones crecientes de los agentes tetrametilamonio, cloruro de calcio, norespermidina o higromicina B.

En aquellos experimentos donde se requería una alteración en la ruta de biosíntesis de ergosterol, se trató a células de *Saccharomyces cerevisiae* incubadas en YPD con concentraciones bajas de las drogas fluconazol (20-30 µM, disuelto en un

stock 16mM de DMSO) y ketoconazol (2-4 μ M, disuelto en un stock 47 mM de metanol).

Por último, la toma exógena de ergosterol se propició incubando la cepa correspondiente en medio mínimo SD junto a una concentración final de ergosterol entre 1 y 10 μ g/ml a partir de un stock en cloroformo.

3. Determinación del número y tamaño celular

Para medir el número de células y el tamaño de las mismas se incubó levadura hasta la fase de crecimiento requerida según el experimento. Se obtuvo una alícuota (dilución 1:100 en medio isotónico) de la muestra y se procedió a su sonicación durante 5-10 segundos (0.7 ciclos, amplitud 70) para separar posibles agregados de células. A continuación se midió el número y tamaño de las células presentes en la alícuota con el contador Particle Coulter Counter y Size Analyzer Z2, de Coulter. El modo de funcionamiento de este aparato se basa en los cambios medibles de resistencia eléctrica que producen las partículas no conductoras en suspensión en un electrolito. Las partículas pasan a través de un sensor entre dos electrodos desplazando un volumen de electrolito igual al suyo propio. El volumen desplazado puede medirse en forma de un impulso eléctrico que es proporcional al volumen de la partícula.

4. Plásmidos empleados

La cepa DH5 α de *Escherichia coli* se empleó como vehículo de propagación y aislamiento de los plásmidos listados en la tabla 4. Las células de bacteria se incubaron a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) que contenía 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 necesario, se añadió antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) para la correcta selección de los plásmidos.

Nombre	Características	Procedencia
pUG6	AmpR, loxp-KANMX-loxp	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)
pU6H3xHA	AmpR, 3HA-loxp-KANMX-loxp	(De Antoni y Gallwitz, 2000)
pU6H2xmyc	AmpR, 2myc-loxp-KANMX-loxp	(De Antoni y Gallwitz, 2000)
pUG72	AmpR, loxP-URA3(<i>K. lactis</i>)-loxP	(Guldener <i>et al.</i> , 2002)
pUG27	AmpR, loxP-his5+(<i>S. pombe</i>)-loxP	(Guldener <i>et al.</i> , 2002)

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados

Los anticuerpos utilizados, el organismo huésped del cual proceden y su afinidad por la proteína A/G se describen a continuación.

Anticuerpo primario	Organismo	Inmuno-globulina	Afinidad por proteína A	Afinidad por proteína G	Anticuerpo secundario
Anti-PAP (Sigma)	Policlonal Conejo	IgG	+++	++	Anti-conejo igG
Anti-HA (12CA5) (Roche)	Monoclonal ratón	IgG2b	++	++	Anti-ratón igG
Anti-HA (3F10) (Roche)	Monoclonal rata	IgG1	-	+	Anti-ratón igG
Anti-c-myc (9E10) (Roche)	Monoclonal ratón	IgG1	+	+++	Anti-ratón igG

Tabla 5. Descripción de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

6. Ensayos de sensibilidad en medio sólido y líquido

Técnica *drop test* en medio sólido

Para los ensayos de crecimiento en medio sólido (*drop test* o goteos) se emplearon cultivos celulares de levadura saturados en YPD y se inocularon 3 diluciones seriadas (1:100; 1:1000; 1:10000) de cada cepa. Se transfirió aproximadamente 3 μ l de cada dilución con la ayuda de un replicador manual (Sigma) a placas de medio sólido con las condiciones de crecimiento a estudiar. Posteriormente se incubaron las placas a 28 °C hasta que fueron visibles las colonias. En el análisis del crecimiento se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de la colonia.

Ensayos de crecimiento continuo en medio líquido

Respecto a los ensayos en medio líquido, se utilizaron cultivos celulares saturados en YPD que fueron diluidos doscientas veces en el mismo medio (junto a la concentración requerida de estrés o droga, en su caso).

Los cultivos fueron crecidos por triplicado en microplacas de 100 pocillos y se cuantificaron midiendo la densidad óptica con la ayuda de la estación microbiológica Bioscreen C (Thermo LabSystems). Dicha densidad óptica se midió utilizando un filtro de banda ancha (420-580 nm) para reducir la contribución del medio a la lectura de la absorbancia. La temperatura de crecimiento fue de 28 °C y los cultivos fueron sometidos a una agitación fuerte y vigorosa durante los 30 segundos previos a la lectura. Las respectivas lecturas se realizaron cada 30 minutos durante al menos 48 horas.

A continuación se describe todos aquellos métodos comunes o técnicas estándar necesarios para llevar a cabo los experimentos que componen este trabajo de investigación.

7. Técnicas estándar de laboratorio empleadas

Precipitación de ácidos nucleicos con alcoholes

En primer lugar se llevó a cabo un tratamiento con fenol-cloroformo. Al mezclar una solución acuosa de DNA 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 DNA en un tubo eppendorf. Se agitó brevemente en vortex y se centrifugó un minuto a 10.000 rpm para separar las fases. Tras recuperar la fase superior en otro tubo eppendorf, se eliminó el fenol mediante extracción con un volumen de cloroformo-isoamílico. Se agitó la mezcla y centrifugó un minuto y se procedió a recoger la fase superior.

La precipitación se realizó con 2.5 volúmenes de etanol 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 0.3M 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.

Purificación de DNA cromosómico

Para obtener DNA genómico se incubaron toda la noche a 28 °C cultivos de 3-5 ml de YPD hasta fase estacionaria y las células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 30 segundos. A continuación se lavaron las células una vez con agua estéril y seguidamente se resuspendieron en 200 µl de tampón de protoplastos (100mM Tris/HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 10µl/ml β-mercaptoetanol, 0.2mg/ml zimoliasa). La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora y se añadió 200µl de tampón de lisis (0.2M NaOH, 1% SDS; preparado en el momento). Después de agitar sin vortex, se incubó a 65 °C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se añadió 200µl de acetato de potasio 5M a pH5.5, se mezcló sin vortex, se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, donde se precipitó el DNA cromosómico mediante la adición de 600µl de isopropanol. El precipitado de DNA 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 50µl de tampón TE. Como molde para la PCR, se usó 1µl de muestra.

Extracción de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

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

Las bandas de agarosa fueron previamente equilibradas con tampón Tris 10mM a pH 8 durante 15 minutos y congeladas durante al menos 2 horas para destruir la estructura del gel. Tras cortarlas en pequeñas rodajas, se insertaron en un cartucho con filtro (0.45 µm Durapore®) obtenido del DNA 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, sin dejar descongelar los trozos de gel, durante 10 minutos a 12000 rpm. De esta manera se retuvo la agarosa en el filtro y se recuperó el líquido en

el fondo del tubo eppendorf, procediéndose a continuación a la purificación del DNA que contenía. Para ello se midió el volumen y se añadió una décima parte de volumen de acetato de sodio 3M y después 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA. Tras conservar las muestras a -20 °C durante toda la noche, se procedió a la centrifugación de las mismas durante 10 minutos a 13000 rpm, precipitando de este modo el DNA, seguido de un lavado con 70% etanol y finalmente se resuspendió el precipitado en 50 µl de tampón Tris 10mM pH 8 o tampón TE, según su posterior uso.

Obtención de extractos proteicos de toda la célula de levadura

Método de rotura de la célula mediante agitación vigorosa

Para la obtención de extractos de proteínas se cultivaron durante toda la noche a 28 °C cultivos de levadura en 50-100 ml YPD. Al día siguiente, cuando las células estaban en fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos y el precipitado se lavó con 30 ml de agua fría, centrifugando de nuevo. A continuación se lavó el precipitado con 10 ml de tampón de extracción frío (50mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 15mM EDTA, 0.1% Triton X-100 y añadidos en el momento, 2mM DTE y 1mM PMSF). El precipitado se lavó después con 10 ml de tampón de extracción frío y se volvió a centrifugar, resuspendiéndolo luego en 500µl de tampón de extracción con inhibidor de proteasas (Complete Mini, EDTA-free™, Roche).

Las muestras se transfirieron a un tubo eppendorf junto al mismo volumen de bolas de vidrio y se procedió a romper las células con MiniBeadbeater-8™ (Biospec), realizando 4 rondas de agitación vigorosa de 1 minuto de duración cada una y guardando las células en hielo durante al menos 2 minutos entre agitaciones. Tras centrifugar las células durante 5 minutos a 10000 rpm, se transfirió el sobrenadante – lisado- a un nuevo tubo eppendorf en hielo.

Para la separación electroforética de las proteínas y análisis western posterior, se mezclaron 4 volúmenes de las muestras obtenidas con 1 volumen de tampón Laemmli

5x (0.3M Tris/HCl pH 6.8, 7.5% SDS, 0.1M DTE, 10mM EDTA, 30% Sacarosa, 0.25mg/ml Azul de bromofenol). La concentración de lisado obtenida varía entre 1 y 5 mg/ml.

Método de rotura de la célula mediante hervido en tampón Laemmli

En los casos donde la degradación de proteínas es un problema, se puede liberar las proteínas directamente en tampón Laemmli en un proceso más rápido, si bien podría no funcionar con proteínas poco abundantes. El método se describe a continuación:

Para la preparación de las muestras se incubó levadura en 5 ml de YPD durante toda la noche y a la mañana siguiente se transfirió 1 ml del cultivo en un tubo eppendorf, donde se centrifugó durante 1 minuto a 5000 rpm. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 75 μ l de tampón Laemmli 5x. A continuación se hirvieron las muestras durante 10 minutos a 95 °C. Para su uso en geles SDS PAGE, se centrifugó de nuevo las muestras durante 5 minutos a 10000 rpm y se inyectó 5-15 μ l del sobrenadante de cada muestra.

Purificación de núcleos de células de levadura

En primer lugar se incubaron cultivos de levadura en 200 ml de YPD durante toda la noche y al día siguiente, se centrifugaron a 3000g durante 10 minutos. Tras lavarlos en 50 ml de agua fría, se resuspendió el precipitado en 2 volúmenes de solución de preincubación (10 μ l/ml de β -mercaptoetanol, 10mM Tris pH 7.5, 2.8mM EDTA) para ablandar la pared de las células. A continuación se incubaron las muestras a 28 °C durante 30 minutos en agitación y pasado este tiempo se lavaron en 50 ml de sorbitol 1M. Después se resuspendieron en 5 volúmenes de solución de lisis (1M sorbitol, 1 μ l/ml β -mercaptoetanol, 2.8mM EDTA, 10mM Tris pH 7.5) más 10 μ l/50 ml de liticasa (200U/ μ l). Con este tampón obtenemos protoplastos y el sorbitol se utiliza como osmolito para evitar la explosión de la célula. Los protoplastos se incuban a 28 °C durante 1 hora en agitación y después se lavaron las células con sorbitol 1M. El precipitado obtenido fue resuspendido en tampón de aislamiento de núcleos (0.25M

sucrosa, 60mM KCl, 14mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 15mM MES pH 6.6, 1mM PMSF, 0.8% TritonX-100). El detergente utilizado en este tampón ayuda a romper los núcleos.

Tras conservar las muestras en hielo durante 20 minutos, se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm, se lavaron dos veces y después se realizaron 3 lavados más con tampón de lavado A (10mM Tris pH 8, 0.5% NP40, 0.65M NaCl, 1mM PMSF). Después se conservaron en hielo durante 1 hora y tras centrifugar, se lavó el precipitado con acetona más 0.1M HCl, se dejó secar al aire la acetona y por último las muestras se resuspendieron en 200µl de tampón TE (10mM Tris/HCl pH 8, 1mM EDTA).

Inmunoprecipitación de proteínas fusión –myc o -HA

Se crecieron la noche anterior cultivos de levadura con las proteínas de interés etiquetadas en 50 ml de medio YPD y una cepa control sin etiquetar. Al día siguiente se centrifugaron las células durante 3 minutos a 3000 rpm y se lavó el precipitado obtenido con agua fría. Se centrifugó de nuevo y se lavó con un pequeño volumen de tampón A (50mM Tris/HCl pH 7.5, 15mM EDTA, 15mM EGTA, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 2mM DTE y 1mM PMSF –los dos últimos añadidos en el momento-). Tras centrifugar, se resuspendió el precipitado en 500µl de tampón A e inhibidor de proteasas (Complete Mini, EDTA-free™, Roche) y se añadió aproximadamente 0.5ml de bolas de vidrio a la mezcla. Se agitó en vortex a la máxima velocidad 1 minuto durante 5 veces, incubando 2 minutos en hielo entre cada agitación y se centrifugó las bolas de vidrio y el debris de células durante 5 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se mezcló toda la proteína obtenida con anticuerpo monoclonal anti-HA o anti-myc. Por cada inmunoprecipitación se añadió 10µl de anticuerpo. Por otra parte, las bolas de Sefarosa CL-4B fueron lavadas 2 veces con tampón A frío y después centrifugadas a baja velocidad en minicentrífuga (2000 rpm). Finalmente, se resuspendieron en el mismo volumen de tampón A más inhibidores de proteasas y se añadió 25µl de bolas de proteína A sefarosa CL-4B a cada

muestra, incubándolas en un rotor a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron las bolas 5 veces con 1 ml de tampón A frío con inhibidores de proteasas. Dado que las bolas iban a ser simplemente cargadas en un gel de SDS, se resuspendieron directamente en 50µl de tampón Laemmli 2x.

Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Se trata de un método rápido y sensible para la cuantificación de proteína utilizando el principio de unión de las proteínas a un colorante hidrofóbico, de manera que en presencia de ácido fosfórico diluciones acuosas del colorante con un color pardo se tornan de color azul intenso fácilmente medible al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína. El reactivo utilizado fue 5X Bio-Rad Assay Kit, de BioRad, diluido en 4 volúmenes de agua para su utilización. La cantidad aplicada a cada pocillo fue de 150-200µl. Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra dada se requirió la construcción de una curva de calibrado empleando un patrón de proteína, en nuestro caso seroalbúmina bovina (BSA). Se disolvió 10 mg de BSA en 10 ml de agua destilada para obtener una concentración de 1mg/ml del patrón. Por último, se midió la absorbancia en un lector multipocillo multiSKAN (Thermo Scientific) y a través de la curva patrón obtenida, se determinaron las concentraciones de proteína presentes en nuestras muestras.

Purificación de RNA total de levadura con fenol ácido

El día anterior se incubaron cultivos en 20 ml de medio YPD que se dejaron crecer hasta fase exponencial de crecimiento. Se lavaron con agua y los precipitados fueron resuspendidos en 400µl de tampón TES (10mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS). Se añadió 400µl de fenol ácido (equilibrado a pH 4) y se mezcló bien. La mezcla se incubó durante 45 minutos a 65 °C y después las muestras se colocaron en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo se centrifugó las muestras para separar las fases durante 1 minuto a 10000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se extrajo de nuevo con 400µl de fenol ácido. Tras pasar la fase acuosa a

otro tubo eppendorf, se añadió 40µl de acetato de sodio 3M 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 100µl de tampón TE. Por último, se midió el contenido de RNA con la ayuda de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y se congelaron las muestras a -20 °C.

8. Análisis *Western Blot*

Electroforesis de proteínas en gel SDS-poliacrilamida y transferencia a membrana

El detergente aniónico SDS se une inespecíficamente a todas las proteínas y las desnaturaliza, convirtiéndolas en estructuras uniformes, independientes de la estructura nativa de las proteínas de partida. Estos complejos contienen del orden de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos y tienen forma elongada. Pero lo más importante de los complejos es su densidad de carga eléctrica, constante para diferentes proteínas e independiente de su composición de aminoácidos, ya que la gran cantidad de moléculas negativas de SDS enmascara las cargas eléctricas de los aminoácidos. Por tanto la movilidad electroforética de los complejos depende sólo del peso molecular de las proteínas y no de su composición.

Otro aspecto importante de la técnica es conseguir concentrar la muestra en una capa muy fina mediante la utilización de un gel de empaquetamiento sobre el gel de separación, donde los complejos SDS-proteína empiezan a separarse de acuerdo con su tamaño.

Los geles de separación se prepararon según el rango de peso molecular de las proteínas de acuerdo a la tabla 6.

Gel de separación	6%	8%	10%	15%
Peso molecular	40-400 kDa	30-300 kDa	20-200 kDa	10-100 kDa
Tampón de separación 2x	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml
Acrilamida-Bis 38:2	1.35 ml	1.8 ml	2.25 ml	3.37 ml
H ₂ O	3.15 ml	2.7 ml	2.25 ml	1.125 ml
APDS 10%	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl

Tabla 6. Modo de preparación del gel de separación.

La composición de los tampones es de 0.75 Tris/HCl pH 8.8, 0.2% SDS para el tampón de separación 2X y de 0.25M Tris/HCl pH 6.8, 0.2% SDS para el tampón de empaquetamiento 2X.

Una vez mezclado, se colocó el gel dentro del casete (Mini Protean 3 System, BioRad) e inmediatamente se añadió 500 µl de isobutanol para crear una capa estanca y permitir polimerizar el gel. Después de la polimerización se descartó el isobutanol, se lavó generosamente con agua y se preparó el gel de empaquetamiento al 3% (1.8 ml de tampón de empaquetamiento 2x, 0.3ml de acrilamida-Bis 38:2, 1.5 ml de agua, 30 µl de APDS y 3 µl de TEMED).

Se mezcló bien y se colocó arriba del gel de separación ya polimerizado. Tras añadir el peine, se dejó polimerizar y la matriz de geles obtenida se insertó en la celda de electroforesis, se colocó ésta en el tanque y se rellenó con tampón SDS PAGE (SDS PAGE 10X: 1.92M glicina, 1% SDS, pH 8.8 ajustado con Tris). Las muestras preparadas en tampón Laemmli 1x (5X: 0.3M Tris/HCl pH 6.8, 7.5% SDS, 0.1M DTE, 10mM EDTA, 30% sacarosa, 0.25 mg/ml Azul de Bromofenol) se inyectaron junto a un marcador de peso molecular y se comenzó la electroforesis a 100V usando el Mini Protean 3 System.

Tras la separación de proteínas en geles de poliacrilamida, las reacciones de detección basadas en la unión de proteínas a anticuerpos se ven obstaculizadas, por lo que las proteínas deben ser transferidas electroforéticamente a papeles de filtro de membrana especiales para que sean más accesibles a los anticuerpos. La unión de las proteínas a los filtros ocurre en gran parte por interacciones hidrofóbicas y por tanto el SDS dificulta dicha unión. El tampón de transferencia contiene metanol para separar el SDS de las proteínas y permitir su unión al filtro.

Tras separar el gel del casete de electroforesis y eliminar el gel de empaquetamiento, se preparó la transferencia de las proteínas a través de una corriente eléctrica (figura 10). En primer lugar se humedeció en el tampón de transferencia (100 ml 10X DUNN, 150 ml metanol, 1 ml 10% SDS y agua hasta un litro) los papeles de filtro y la membrana de PVDF previamente activada en metanol -pues es altamente hidrofóbica-, así como las esponjas. El tampón 10X DUNN se preparó con 8.4 g/l bicarbonato sódico, 3.2 g/l carbonato sódico y a pH 9.5-10. Una vez preparado el sándwich, se eliminaron las posibles burbujas antes de proceder a la transferencia de las proteínas a una diferencia de potencial constante de 100V durante 2 horas a 4 °C o a 20V durante toda la noche.

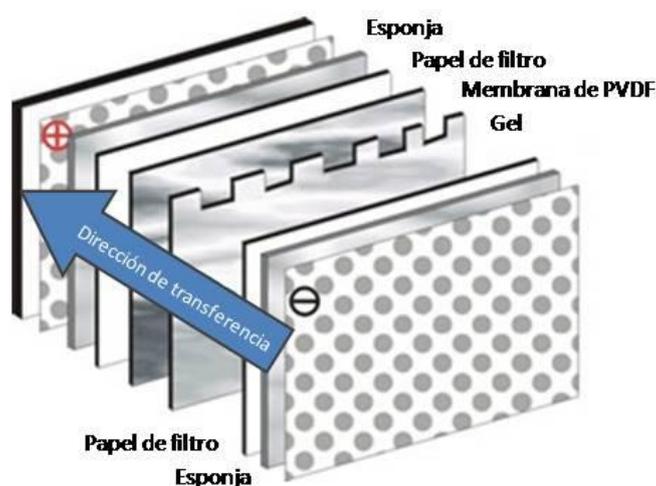


Figura 10. Representación del modo utilizado de transferencia de proteínas de gel a membrana.

Tinción de proteínas transferidas a membrana con Direct Blue 71

Para comprobar la eficiencia de la transferencia a membrana y como control interno de carga se utilizó el método de tinción DB71, más sensible y rápido que el método con Ponceau S (Hong *et al.*, 2000).

Se preparó la disolución de reserva (0.1g del tinte DB71 de Aldrich en 100 ml de agua destilada). Después se sumergió la membrana de PVDF -previamente lavada en etanol y agua destilada- en la disolución de teñido (4ml de disolución de reserva hasta 50 ml de agua) durante 5 minutos y se eliminó el exceso de colorante con disolución de lavado (para 1 litro de disolución, se mezcla 500 ml de agua destilada con 400 ml de etanol absoluto y 100 ml de ácido acético glacial) durante unos segundos. La membrana se envolvió en el plástico Saran Wrap para su escaneo y después se destiñó incubando la membrana unos 5 minutos en disolución de desteñido (para 1 litro de disolución, se mezcla 350 ml de agua destilada con 500 ml de etanol absoluto y 150 ml de bicarbonato de sodio 1M). Por último, previo a su uso en la inmunodetección, se lavó la membrana con agua destilada.

Detección inmunológica de proteínas

Dada la capacidad del filtro de membrana de unir proteínas, se bloquearon en primer lugar todos los sitios de unión no específicos utilizando una disolución compuesta de TBS (a partir de TBS 10X: 1.5M NaCl, 0.2M Tris/HCl pH 7.6) y 2% de leche desnatada en polvo durante 30 minutos. Seguidamente se retiró la disolución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico durante al menos 3 horas en agitación. La concentración del anticuerpo empleada fue de 1:10000 y éste fue diluido directamente en 15ml de TBS más 2% leche en polvo. Pasado el tiempo de incubación, se procedió al lavado de la membrana 3 veces durante 5 minutos con la disolución de bloqueo. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario al menos una hora más en agitación, siendo la dilución empleada de 1:15000 en TBS. Después se realizaron otros 3 lavados de 5

minutos con TBS para retirar el exceso de anticuerpo secundario y se procedió a la detección de las proteínas mediante quimioluminiscencia.

Para la detección se utilizó el sistema ECL plus Western Blotting Detection System, de Amersham Biosciences, kit que permite detectar por fluorescencia antígenos específicos conjugados con anticuerpos marcados con peroxidasa. Se siguieron las recomendaciones del fabricante y la señal se analizó empleando películas de rayos X (Biomax Light-1, Kodak).

9. Análisis de expresión de RNA mensajeros (Northern Blot)

Electroforesis de RNAs

Mediante electroforesis en gel de agarosa se comprobó la calidad y cantidad de las muestras de RNA obtenidas con antelación. Para permitir la separación de las diferentes moléculas de RNA, la estructura secundaria de los RNA se destruyó con formaldehído.

El gel (100ml) se preparó mezclando 1 gramo de agarosa, 84 ml de agua y 10 ml de tampón MAE 10X (0.2M MOPS, pH 7 ajustado con NaOH, 50 mM acetato de sodio, 10mM EDTA) esterilizado por filtración y guardado a 4 °C protegido de la luz. Una vez la agarosa se calentó, disolvió y enfrió a 60 °C, se añadió en campana de gases 6 ml de formaldehído 37% (2.2% final), se mezcló y vertió la disolución en una cubeta hasta que gelificó.

Las muestras a cargar se prepararon mezclando unos 10-30 µg de RNA total (5-10 µl de muestra), 20µl de tampón de carga 1.25x (2.2ml de formamida desionizada, 0.8ml de formaldehído 37%, 0.5ml 10x MAE, 0.4ml glicerol 80%, 0.1 ml azul de bromofenol 2%) y 1µl de bromuro de etidio 0.1%.

Tras calentar las muestras 10 minutos a 56 °C, se llevó a cabo la electroforesis unas 2-3 horas a 120V. Pasado este tiempo se comprobó la presencia de los RNA ribosomales del citoplasma de levadura (3.5 kb y 1.8 kb), que sirven como patrones

internos de peso molecular y como control de carga de las muestras, mediante luz ultravioleta.

Transferencia de RNA por capilaridad y fijación a filtros de nailon

Los RNA desnaturalizados tienen la capacidad de unirse covalentemente a membranas de nailon al iluminarse brevemente con luz ultravioleta. La transferencia desde el gel a la membrana se llevó a cabo por el método tradicional de capilaridad. Para ello, el gel de RNA se incubó previamente 2 veces durante 20 minutos con un exceso de 10X SSC (1.5M NaCl, 0.15M Tri-Na-Citrato, ajustado a pH 7 con HCl 1M) para eliminar el formaldehído. Después el gel se colocó encima de papel de filtro Whatman 3MM empapado en el líquido de transferencia (10X SSC, con gran cantidad de sales para unir los ácidos nucleicos). Se eliminaron las burbujas atrapadas entre el papel de filtro y el gel rodando un tubo horizontal y se pusieron tiras de parafilm en los bordes del gel para evitar que el líquido circulara por la periferia. Se colocó encima el filtro de membrana cortado del mismo tamaño que el gel y previamente mojado en 10X SSC. Se volvió a eliminar las burbujas atrapadas entre el gel y filtro y se colocó encima 3 trozos de papel de filtro cortados al mismo tamaño que el gel. Seguidamente se puso encima servilletas de papel secas cortadas del mismo tamaño del gel y formando una pila de unos 7 cm. Encima del todo se colocó una placa de vidrio de alrededor de 250g y se dejó transfiriendo toda la noche. Al día siguiente se comprobó la transferencia observando el RNA del filtro de membrana a la luz ultravioleta.

Dado que los RNAs tienen cargas negativas y el filtro de membrana está cargado positivamente, 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 RNA al nailon utilizando UV Stratalinker, de Stratagene, que dosifica la luz ultravioleta adecuada. Utilizando el botón de “auto cross-link”, se determinó una dosis óptima de 0.12 julios de luz de 254 nm. Por último, los filtros de membrana se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Obtención, purificación y marcaje radiactivo de fragmentos (sondas) de DNA

Mediante PCR se amplificaron fragmentos de DNA que cubrían casi la totalidad del ORF de los genes a estudiar. La lista completa de cebadores empleados, su secuencia y posición dentro del gen correspondiente puede consultarse en la sección Material Suplementario. Las condiciones de la PCR fueron 3 minutos iniciales a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 2.5 minutos a 72 °C y un último paso de extensión de 10 minutos a 72 °C. Cada reacción de PCR de 100 µl contenía 10 µl de tampón 10x, 10 µl de dNTPs 2mM, 1 µl de cada oligonucleótido a 100 µM, 1 µl de DNA genómico como molde y 1 µl de DNA polimerasa a 5U/ µl.

La correcta amplificación y tamaño de los fragmentos de DNA se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y se procedió a su aislamiento mediante una modificación del método estándar “*freeze-squeeze*”, descrita en el apartado 7. Una vez purificado el DNA sonda, se resuspendió en tampón Tris 10 mM pH 8, se cuantificó su concentración y se procedió a su marcaje radiactivo con dCTP³².

Las sondas radiactivas fueron generadas con una disolución llamada *High Prime* (Roche), de acuerdo a la técnica de marcaje con oligonucleótidos al azar como cebadores (Feinberg y Vogelstein, 1983; Feinberg y Vogelstein, 1984). La mezcla *High Prime* contiene oligonucleótidos al azar, el fragmento Klenow de la DNA Polimerasa, dATP, dGTP y dTTP en un tampón concentrado con glicerol 50%.

EL protocolo consistió en añadir 25-100 ng de molde de DNA (sondas obtenidas en el paso anterior) en agua destilada estéril hasta un volumen final de 11 µl por vial y desnaturalizar el DNA 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 añadió 4 µl al DNA desnaturalizado y a continuación 2 µl de 250µCi [α^{32} P]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 ácidos nucleicos fijados a filtros de membrana, lavados y exposición

Antes de comenzar la hibridación, los filtros de membrana se trataron con una disolución de hibridación llamada tampón PSE (3ml de fosfato sódico 1M a pH 7.2, 7 ml de 10% SDS y 20 µl 0.5M EDTA) durante 10 minutos a 65 °C. Este tampón tiene fuerza iónica alta y previene la unión inespecífica de DNA al filtro. Después se hibridó el filtro, bañado en un tubo con 10 ml de PSE, con la sonda recién marcada durante toda la noche a 65 °C. A la mañana siguiente se procedió a lavar los filtros dos veces durante 10 minutos a 65 °C con 4x SSC/0.1% SDS y una vez con 0.4X SSC/0.1% SDS y se sellaron con plástico Saran Wrap para proceder a la exposición en un Hypercassette™, de Amersham Biosciences, con pantalla intensificadora. La duración de la exposición de los filtros por autorradiografía en los casetes dependió de la intensidad de hibridación obtenida y estuvo comprendida entre 1 hora y varios días a -80 °C. Los híbridos radioactivos se detectaron con una película Fuji RX.

Cuantificación y reutilización de los filtros

La señal detectada se cuantificó exponiendo los filtros en una pantalla Fujifilm BAS-1500 Phosphoimager (fue 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 y 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 puso a hervir 1 litro de agua con 0.1% SDS y se metió el filtro dentro, dejando enfriar la solución hasta alcanzar la temperatura ambiente.

10. Cuantificación de ergosterol total de células de levadura

Para la determinación rápida del contenido en ergosterol se procedió a la saponificación de las muestras de levadura con un álcali alcohólico, extracción de la

materia insaponificable con un solvente inmiscible y medida de ergosterol mediante espectrofotometría según el método descrito previamente (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999).

Los esteroides totales fueron extraídos de la siguiente manera: se crecieron cultivos de levadura sometidas a estrés osmótico, salino u oxidativo a diferentes concentraciones (50 ml de YPD por condición y por triplicado) hasta una OD₆₆₀ de 0.8 y las células fueron centrifugadas (3 minutos a 3000 rpm) y lavadas dos veces con agua destilada. A continuación se digirieron las muestras en hidróxido de potasio alcohólico al 25% (preparado disolviendo 28.4 gr de KOH al 88% en 100 ml de etanol 60%) durante 3 horas en un baño de agua a 95 °C. A cada precipitado de células se la añadió 6 ml de KOH alcohólico en un tubo de vidrio de borosilicato. Después de la incubación, se dejó que las muestras alcanzaran temperatura ambiente y los esteroides fueron extraídos a continuación añadiendo 5 ml de n-heptano. Como control, se preparó un blanco mezclando 6 ml de hidróxido de potasio alcohólico y 5 ml de n-heptano, sin muestra. Se agitaron vigorosamente las muestras y se dejaron reposar unos minutos hasta que se separaron perfectamente las fases. Después, todas las muestras, incluido el control, fueron diluidas en etanol absoluto (3 ml del sobrenadante en n-heptano en 3ml de etanol) y por último se midió la absorbancia a 281.5 nm en un espectrofotómetro SP8001 de Dinko. La presencia de ergosterol y de un intermediario de los pasos finales de la ruta (24(28)-dehidroergosterol) en los extractos resultó en una característica curva con 4 picos (Arthington-Skaggs *et al.*, 1999) al observar el espectro de absorción entre 240 y 300 nm. La ausencia de ergosterol se indicó por una línea a un valor de absorbancia próximo a cero. Por último, los datos se corrigieron por el número de células de cada muestra. Dado que ergosterol (más del 80%) y 24(28)-dehidroergosterol son los esteroides principales de la levadura y el resto de esteroides conocidos son sólo constituyentes menores, se anotó los datos como “concentración de ergosterol total”.

11. Disrupción génica con el sistema *loxP-CRE* y rescate con gen marcador

Para conseguir eliminar uno o varios genes se utilizó la técnica descrita con anterioridad (Guldener *et al.*, 1996) pero haciendo uso de nuevos casetes de disrupción, pUG27 y pUG72 (Gueldener *et al.*, 2002).

Generación del casete de disrupción *loxP*-gen marcador-*loxP* mediante PCR

Los casetes de disrupción creados en este trabajo fueron generados mediante PCR usando oligonucleótidos de 45 nucleótidos homólogos a las secuencias aguas arriba del codón de iniciación y aguas abajo del codón de terminación del gen que quería ser eliminado, seguido de segmentos de 19 nucleótidos homólogos a las secuencias a la izquierda del sitio *loxP* y de 22 nucleótidos que anillan a la derecha del sitio *loxP* del casete de disrupción (ver lista de los oligonucleótidos utilizados en la sección 1 de Datos Suplementarios).

Para cada casete de disrupción (mostrados en el apartado 4) se preparó una mezcla de PCR que contenía 2 μ l del molde (plásmido), 80 μ l de tampón de PCR 10x, 80 μ l de dNTPs 2mM, 8 μ l de cada oligonucleótido, 24 μ l de Taq Polimerasa (1 U/ μ l) y agua hasta un volumen de 400 μ l. Las condiciones de la PCR fueron 95 $^{\circ}$ C durante 3 minutos; 40 ciclos de 95 $^{\circ}$ C durante 1 minuto, 55 $^{\circ}$ C durante 1 minuto y 72 $^{\circ}$ C durante 2.5 minutos; un último paso de extensión a 72 $^{\circ}$ C durante 10 minutos. Una alícuota de 5 μ l se utilizó para comprobar la presencia de los casetes en un gel de agarosa y el resto del producto de PCR fue purificado con fenol, precipitado en etanol y resuspendido en 15 μ l de agua (descrito detalladamente en el apartado 7 de técnicas estándar).

Integración en el genoma de levadura y comprobación por PCR

Los casetes obtenidos se utilizaron para transformar levadura por el método de acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995), detallado más adelante. Se seleccionó algunos de los transformantes obtenidos en placas SD y se purificó DNA cromosómico de las colonias (apartado 7) para comprobar mediante PCR la correcta integración. Para ello

se utilizó un oligonucleótido específico del promotor del gen eliminado y otro oligonucleótido correspondiente al casete específico.

12. Medición de la concentración intracelular de iones

En primer lugar se procedió a la preparación de extractos celulares para la determinación de las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ (Mulet *et al.*, 1999).

Los cultivos de células de levadura fueron crecidos en el medio correspondiente según el experimento hasta una OD_{600} de 0.8. Para cada condición se tomaron 5 muestras independientes de 20 ml de células. Se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 3000 rpm y se lavaron dos veces con 20 ml de tampón Mg/Sorb frío (20mM MgCl_2 , 1.8 M Sorbitol) cada vez. Se resuspendieron las células en 1ml de 20mM MgCl_2 frío sin sorbitol y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Tras centrifugar las células durante 1 minuto a 4 °C y 5000 rpm, se resuspendieron en 0.5 ml de 20mM MgCl_2 frío sin sorbitol y se midió el número de células de todas las muestras. Los iones fueron extraídos incubando las muestras durante 15 minutos a 95 °C. Después del calentamiento, se pusieron en hielo durante 2 minutos y se centrifugaron a continuación durante 2 minutos a 5000 rpm. El sobrenadante (400 μl), fue transferido a un nuevo tubo y se preparó diluciones de las alícuotas para ser analizadas en un espectrofotómetro de emisión óptica ICP sobre estándares de Na^+ y K^+ .

13. Etiquetado de proteínas con epitopos myc o HA

El método consiste en la amplificación mediante PCR de un módulo seleccionado usando dos oligonucleótidos con secuencias homólogas a la secuencia deseada en la que se quiere integrar el casete, seguido de transformación y recombinación homóloga en el genoma de levadura (De Antoni y Gallwitz, 2000).

PCR

Los casetes presentes en los plásmidos pU6H2MYC y pU6H3HA fueron amplificados utilizando dos oligonucleótidos: el Tag-forward, compuesto de 42-45 nucleótidos derivados del extremo 3' del gen de interés (excluyendo el codón de parada) seguidos de 21 nucleótidos (5'-... .. TCC CAC CAC CAT CAT CAT CAC -3'), anillando con el extremo 5' del casete; el Tag-reverse está compuesto de 42-45 nucleótidos derivados de la secuencia aguas abajo del gen de interés (empezando en el codón de parada o 50-100 nucleótidos después de dicho codón) más 22 nucleótidos (5'-... .. ACT ATA GGG AGA CCG GCA GAT C-3'), anillando con la secuencia aguas abajo del casete. La longitud de los casetes amplificados es de 1711 pares de bases para pU6H2MYC y 1735 pares de bases para pU6H3HA. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR se encuentran listados y descritos en la sección 1 de Datos Suplementarios.

Se prepararon 100 μ l para la reacción que contenían unos 10 ng de ADN molde (pU6H2MYC o pU6H3HA), 30 pmol de cada oligonucleótido, 10 μ l de dNTP a 2mM, 3 μ l de Taq polimerasa a 0.3U/ μ l y 10 μ l de tampón de PCR 10x con MgCl₂. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos (desnaturalización 95 °C 1min, alineamiento 50 °C 1 min, extensión 72 °C 1min/kb producto de PCR) y un paso final de elongación de 4 min a 72 °C.

La correcta amplificación se comprobó corriendo una alícuota (5 μ l) en un gel de agarosa con tampón TAE y el resto de producto de PCR se purificó con un tratamiento con fenol-cloroformo para separar los ácidos nucleicos de las proteínas desnaturalizadas, seguido de precipitación de los primeros con 2 volúmenes de etanol.

Transformación de levadura

Para la transformación de levadura se recurrió al método del acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995). El procedimiento se describe a continuación.

Se creció un cultivo líquido de levadura (100 ml YPD) hasta una densidad óptica de 0.8 a 660nm y se centrifugaron las células en tubos *falcon* de 50 ml durante 3 minutos

a 3000 rpm, siendo a continuación lavadas con agua estéril, vueltas a centrifugar y lavadas con LiTE estéril. Los pellet se resuspendieron en 200µl de LiTE y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. Para integrar los fragmentos de PCR para el etiquetado, se usaron directamente células competentes; se añadió entre 1-10 µg DNA (el producto de PCR purificado y resuspendido en agua) a 60 µl de células competentes. A continuación se preparó LiTE/40% PEG4000 (mezclando 9 volúmenes de PEG4000 a 45% con 1 volumen de LiTE 10X) y se añadió 300 µl, mezclando bien con vortex. La mezcla se incubó a 30 °C durante 30 minutos y después a 42 °C durante exactamente 20 minutos para que el DNA penetre dentro de la célula. Después se centrifugó a 5000 rpm durante 20 segundos, se resuspendió el pellet en 1ml de YPD y se incubó entre 1 y 3 horas a 30°C, permitiendo así la integración del marcador KAN. Pasado ese tiempo se centrifugaron las células y se lavaron con 500 µl de agua. Después de haberlas centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el resto del líquido sobrante y se plaquearon directamente en placas YPD con geneticina. Las colonias aparecieron en un par de días tras haberlas dejado incubar a 30 °C.

Verificación de la transformación

Las colonias que crecieron fueron vueltas a incubar en placas con YPD y geneticina. La correcta integración fue verificada mediante PCR utilizando un oligonucleótido dentro del ORF y otro oligonucleótido dentro del casete, en el marcador para kanamicina. Por último, la expresión de las proteínas etiquetadas fue verificada mediante inmunodetección usando un anticuerpo monoclonal anti-c-myc o anti-HA, según el caso (ver sección 4 de Datos Suplementarios).

14. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

El protocolo de inmunoprecipitación de cromatina llevado a cabo es una versión modificada del método original (Kuras y Struhl, 1999).

Preparación de fragmentos de cromatina unidos a proteína

El día anterior se incubaron cultivos de 100 ml en YPD hasta fase exponencial de crecimiento y se aplicó la concentración requerida de agente tóxico para provocar estrés osmótico/salino u oxidativo. Concluida la cinética de tiempo deseada, se procedió a fijar las células con 10 ml de formaldehído 11% (preparado en el momento a partir de un stock comercial a 37%) en tampón A (50mM Hepes/KOH pH 7.5, 1mM EDTA, 100mM NaCl). Se dejaron los cultivos a temperatura ambiente durante 20 minutos, moviendo ocasionalmente, y después se añadió 15ml de glicina 3M, dejando incubar otros 5 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 3 minutos a 3500 rpm y las células se lavaron dos veces con 100 ml de TBS (20mM Tris/HCl pH 7.5, 150mM NaCl) frío y una vez con 5ml de tampón de lisis FA frío (50mM Hepes/KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% TritonX-100, 1mM 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 0.5ml de bolas de vidrio. Las células se rompieron con ayuda de MiniBeadbeater-8™ (Biospec) durante 1 minuto y repitiendo la agitación 4 veces (dejando las muestras en hielo durante 2 minutos entre cada ronda de agitación) y después se recogió el lisado en un nuevo tubo eppendorf frío, centrifugándolo durante 1 minuto a 13000 rpm. El sobrenadante se desechó y el precipitado, que contenía la cromatina insoluble, se solubilizó en 1ml de tampón de lisis FA con 0.1% SDS. Se centrifugó de nuevo 1 minuto a 13000 rpm y se resuspendió en 1ml de tampón de lisis FA con 0.1% SDS. A continuación se llevó a cabo la sonicación de las muestras con el fin de obtener fragmentos de DNA de aproximadamente 400 pares de bases. Para ello se utilizó un sonicador UP200S (Hielscher Ultrasonics GmbH), de manera que se realizaron 3-4 veces rondas de ultrasonidos durante 30 segundos. Por último, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos en una minicentrífuga fría a 13000 rpm y el sobrenadante, que contenía los fragmentos de cromatina solubles, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso.

Inmunoprecipitación, reversión del entrecruzamiento y purificación de cromatina

La inmunoprecipitación de 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 un ligando, proteína G o A, con afinidad por el anticuerpo α -myc o α -HA, respectivamente (figura 11). Las bolas se suministran 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 1ml de tampón PBS suplementado con 5mg/ml de BSA. Para ello, se sometió a las bolas a un campo magnético en un concentrador de partículas magnéticas DynaMag™-2 (Invitrogen), de modo que el material se separó rápidamente del sobrenadante, que fue eliminando simplemente por aspiración. Después de los lavados se añadió a las bolas magnéticas 1 ml de PBS suplementado con BSA y 5 μ l [5mg/ml] de anti-HA o anti-myc por IP. Por último se incubó la mezcla toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se lavaron de nuevo las bolas 3 veces con 1 ml de tampón PBS suplementado con 5mg/ml de BSA, se resuspendieron en el volumen original usando tampón de lisis FA con 0.1 % SDS y se incubaron junto a 500 μ l de muestra (fragmentos de cromatina) durante al menos 90 minutos. Pasado este tiempo, se procedió a lavar las muestras. En primer lugar se realizaron dos lavados con 1 ml de tampón de lisis FA con 0.1% SDS. A continuación se realizaron otros dos lavados con 1 ml de tampón de lisis FA con 0.1% SDS y 0.5M NaCl. Después se llevó a cabo otro lavado con 1 ml de tampón B (10 mM Tris/HCl pH 8, 0.25M LiCl, 1mM 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 aislaron del sobrenadante sometiéndola a un campo magnético. El siguiente paso consistió en resuspender las bolitas en 250 μ l de tampón C (50mM Tris/HCl pH 7.5, 1% SDS, 10 mM EDTA) y se eluyeron las muestras incubándolas durante exactamente 10 minutos a 65 °C, agitando cada 2 minutos. Opcionalmente se realizaron varias rondas de elución. Después de separarlas en el concentrador magnético, se transfirió el sobrenadante en

un tubo eppendorf nuevo con 250µl de tampón TE y 20µl de pronasa (20 mg/ml, Roche).

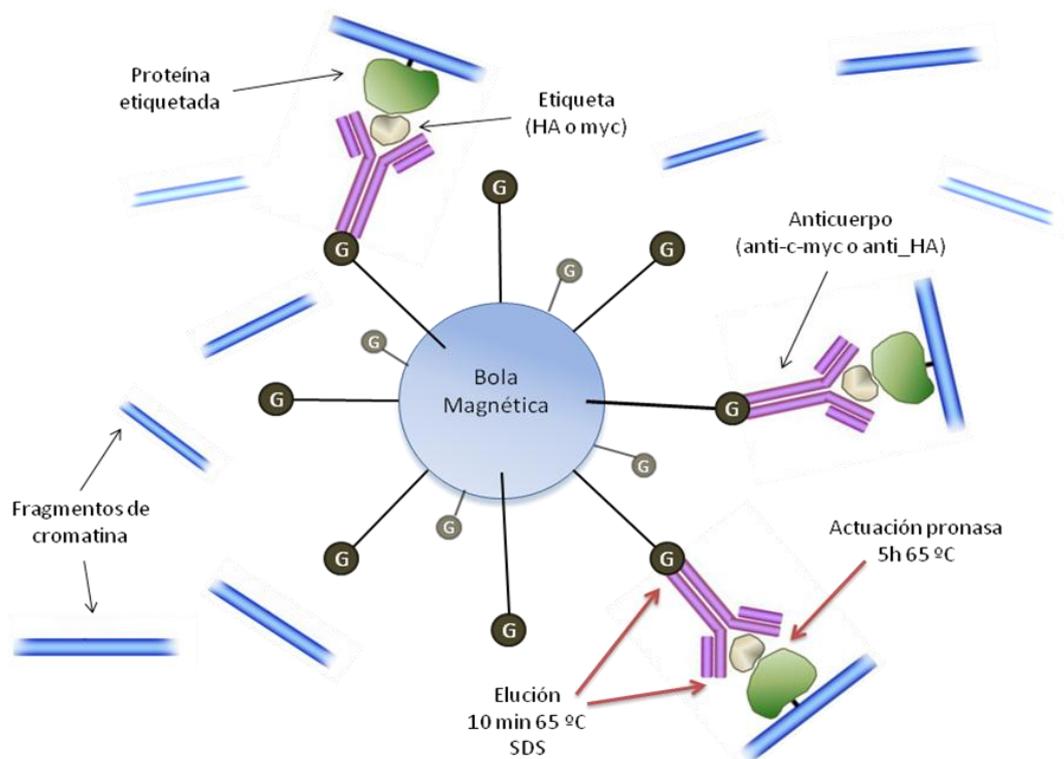


Figura 11. Representación figurada del proceso de inmunoprecipitación de cromatina. Se muestran los fragmentos de cromatina previamente obtenidos por sonicación, algunos de ellos con la proteína a estudiar fijada al DNA con formaldehído, así como los epitopos fusionados y el anticuerpo que los reconoce. La proteína G pegada a la bola magnética permite por afinidad la inmunoprecipitación selectiva de los fragmentos de interés.

Por otra parte, se prepararon muestras de cromatina total, sin inmunoprecipitar (muestras CT). Para ello se empleó 50µl de cromatina fragmentada a la cual se añadió 450µl de tampón TE y 20µl de pronasa para obtener un volumen similar al de las muestras inmunoprecipitadas.

La desligación de las proteínas de la cromatina tuvo lugar mediante la incubación de las muestras durante 1 hora a 42 °C seguida de incubación a 5 horas o incluso toda la noche a 65 °C. Después se añadió 50µl de CILi 4M 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). El DNA se precipitó con 1 ml de etanol más 20µg de glucógeno (20µg/µl, Roche), mediante incubación toda la noche a -20 °C. Al día

siguiente se centrifugaron 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%, siendo por último resuspendidas en 100µl de tampón TE.

15. Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real con EVA Green™

Los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo para cuantificar moléculas de DNA, ya que una secuencia abundante puede ser identificada sobre otra menos abundante por el menor número de ciclos de PCR 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 de este colorante fluorescente durante su síntesis.

Las reacciones de PCR estándar, de 10 µl cada una, contenían 2 µl de DNA molde (fragmentos de Cromatina Total o Inmunoprecipitada obtenida mediante CHIP), 3 µl de la mezcla de cebadores 5' y 3' a 3,3 µM -se puede consultar la lista completa de oligonucleótidos utilizados en Datos Suplementarios- y 5 µl del cóctel compuesto por una mezcla Eva Green™ qPCR Basic HS Mix (Biotium) que contiene el fluoróforo, el tampón de reacción, dNTPs y 5 U/µl TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polimerasa (Fermentas) y el fluoróforo de referencia 5(6)-carboxy-X-rodamina (ROX™, Molecular Probes) diluido a 0.1µM.

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. Seguidamente 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). Este análisis permitió la caracterización del fragmento amplificado y la discriminación de productos inespecíficos.

Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos es común elegir regiones intergénicas o teloméricas donde no se espera o es muy improbable una

unión específica de los factores de transcripción como controles negativos. En este trabajo se diseñaron oligonucleótidos específicos de la región codificante del gen POL1 (apartado 1, Datos Suplementarios). Comparando los Ct (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:

$$\text{Grado de ocupación} = 2^{[(IP - CT)_{POL1} - (IP - CT)_{\text{Gen problema}}]}$$

Los experimentos fueron llevados cabo al menos sobre dos muestras de cromatina independientes para cada cepa y condición y las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en una placa óptica de 96 pocillos (código #4306737, Applied Biosystems), sellada con plástico adhesivo.

16. Ensayo de localización genómica en micromatrices con sondas solapantes (*ChIP-on-Chip on Tiling Microarrays*)

La técnica ChIP-Chip combina la inmunoprecipitación de cromatina (detallada en el apartado 10 de materiales y métodos) con los ensayos en chips de DNA o *microarrays* (Ren *et al.*, 2000). Para el análisis mediante esta técnica de los sitios de unión de los factores de transcripción estudiados en este trabajo, se obtuvieron previamente tres muestras independientes de DNA inmunoprecipitado (IP) y DNA total (CT). Los fragmentos de DNA cromosómico obtenidos fueron amplificados por PCR, marcados respectivamente con los fluoróforos Cy5 y Cy3, mezclados e hibridados en micromatrices gracias a la colaboración con el doctor Xiaochun Fan, miembro del laboratorio del profesor Kevin Struhl, en el Harvard Medical School de Boston (EEUU). Además en el laboratorio de Kevin Struhl se generaron los datos crudos de las uniones de cada factor, se analizaron estadísticamente y se cuantificó con un valor de

probabilidad la interacción de los factores de transcripción con cada región en el genoma.

La metodología que se llevó a cabo está basada en los protocolos de Oscar M. Aparicio (S. Bell Lab, University of Southern California) y de Richard A. Young (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge) con revisiones posteriores. Dado que la cantidad de DNA en las muestras IP es pequeña normalmente, se requirió la amplificación por PCR para la detección de DNA en el microensayo:

Corte del DNA y ligación a los adaptadores

La llamada PCR mediada por ligación (LM-PCR) requiere que el DNA inmunoprecipitado sea cortado para que tenga extremos romos y a continuación se liga a una pareja de fragmentos de DNA o adaptadores:

En primer lugar se transfirió 40 μ l de cada muestra de DNA inmunoprecipitado y 1-2 μ l de cada extracto de DNA total más 39 μ l de agua destilada en tubos separados y se mantuvieron en hielo (el resto del DNA se guardó a -20°C). Seguidamente se añadió 70 μ l de: 11 μ l de tampón(10X) T4 DNA pol (NE2 Biolabs cat #B7002S), 0.5 μ l de BSA 10 mg/ml (NE Biolabs cat #007-BSA), 0.5 μ l de una mezcla de dNTP a 20 mM cada uno, 0.2 μ l de DNA polimerasa T4 a 3U/ μ l (NE Biolabs cat #203S) y finalmente 57.8 μ l de agua estéril para llegar al volumen deseado. Se mezcló bien y se incubó 20 minutos a 12°C . A continuación se colocaron las muestras en hielo y se añadió 11.5 μ l de 3M NaOAc (Sigma cat #S-7899) y 0.5 μ l de glucógeno a 20 mg/ml (Roche Diagnostics cat #901393). Se mezcló mediante vortex y se añadió 120 μ l de fenol-cloroformo/isoamil alcohol (Fluka 77617). De nuevo se agitó con vortex y se centrifugó durante 5 minutos a la máxima velocidad del rotor. Después se transfirió 110 μ l de la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadió 230 μ l de etanol puro frío. Se agitó la mezcla en vortex y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó con 500 μ l de etanol 80% frío. Seguidamente se desechó de nuevo el sobrenadante, se centrifugó suavemente y se eliminó el líquido remanente. El siguiente paso consistió en dejar secar al aire las muestras y por último

se resuspendió el precipitado en 25 μ l de agua estéril, manteniéndolo en hielo.

A continuación se procedió a la ligación del DNA cortado con los adaptadores. Para ello, se añadió 25 μ l de una mezcla fría de: 8 μ l de agua destilada, 10 μ l de tampón 5X DNA ligasa (GibcoBRL cat #46300-018), 6.7 μ l de adaptadores* a 15 μ M y 0.5 μ l de DNA ligasa T4 (NEB cat #202L). Por último se mezcló bien con la pipeta y se incubó la mezcla durante toda la noche a 16°C.

*La preparación de los adaptadores unidireccionales se realizó mezclando los siguientes componentes: 250 μ l de Tris-HCl 1M a pH 7.9, 375 μ l de oligo oJW102 GCGGTGACCCGGAGATCTGAATTC (stock a 40 μ M), 375 μ l de oligo oJW103 GAATTCAGATC (stock a 40 μ M). Después se realizaron alícuotas de 50-100 μ l en tubos Eppendorf y se incubaron en bloque térmico durante 5 minutos a 95 °C. Se transfirieron después las muestras a un bloque térmico a 70°C y a continuación se dejaron enfriar el bloque a temperatura ambiente hasta alcanzar 25 °C. Por último se transfirió el bloque a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se guardaron a -20°C.

Amplificación mediada por ligación

Se añadió 6 μ l de NaOAc 3M a pH 5.2 (Sigma cat #S-7899) al DNA ligado a adaptadores. Se mezcló bien mediante vortex y se añadió 130 μ l de etanol frío. A continuación se mezcló de nuevo con vortex y se centrifugó durante 15 minutos a 4°C. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se lavó el DNA precipitado con 500 μ l de etanol al 80%. Después se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante, se centrifugó y se eliminó el líquido residual con una pipeta. El siguiente paso consistió en resuspender las muestras en 25 μ l de agua destilada y ubicarlas en hielo. Después se añadió 15 μ l de una mezcla de marcaje para PCR que contenía: 4 μ l de tampón de reacción 10X ThermoPol (NEB cat #007-TDP), 5.75 μ l de agua doblemente destilada, 2 μ l mezcla low T (5 mM cada dATP, dCTP, dGTP; 2 mM dTTP), 2 μ l de Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (se usó Cy5 para las muestras de DNA IP y Cy3 para las muestras de CT) y finalmente 1.25 μ l de oligo oJW102 (stock a 40 μ M).

Tras transferir las muestras a tubos de PCR en hielo, se comenzó el proceso de amplificación en la máquina de PCR con el siguiente programa:

<u>Paso</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Ciclos</u>
1	4 minutos	55 °C	1
2	5 minutos	72 °C	1
3	2 minutos	95 °C	1
4	30 segundos	95 °C	Paso 4 al 6:
5	30 segundos	55 °C	32 ciclos para Cy5
6	1 minuto	72 °C	34 ciclos para Cy3
7	4 minutos	72 °C	1
8	Hasta el final	4 °C	

Durante el paso 1 de la PCR se añadió 10 µl de la siguiente mezcla: 8 µl de agua estéril, 1 µl de tampón de reacción 10X ThermoPol (NEB cat #007-TDP), 1 µ de Taq polimersa a 5 U/µl (Perkin Elmer: Use Cat. #N801-0060) y 0.01 µl PFU Turbo a 2.5 U/µl (Stratagene Cat #600250-51). Después se corrió 5 µl en un gel de agarosa al 1.5% para comprobar que el producto de PCR mostraba un mancha o “smear” entre 200 pb y 600 pb con un tamaño medio de 400 pb.

El siguiente paso consistió en purificar las muestras con el kit Qiaquick PCR Purification y después se eluyeron en 80-100 µl del tampón Qiagen buffer EB. A continuación, con ayuda de un espectrofotómetro, se tomó lectura de cada muestra a densidad óptica de 260 y 650 para Cy5 y 260 y 550 para Cy3. Tras verificar que en cada canal se había incorporado al menos 15-20 pmol de cada fluoróforo se continuó con el escaneo de las muestras. Para cada blanco se mezcló los eluidos de Cy3 y Cy5, usando los mismos pmol de cada fluoróforo para cada canal. Después se añadió NaOAc 3M (Sigma cat #S-7899) hasta una concentración final de 0.36M (12 µl de NaOAc 3M por cada 100 µl de eluido). Se mezcló bien y se añadió 2.5 volúmenes de etanol frío (260 µl por cada 100 µl de eluido). Después se mezclaron de nuevo y se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C. Tras desechar el sobrenadante, se lavaron con 500 µl de

etanol al 80%. Se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 4 °C y se volvió a eliminar el sobrenadante, desechando también el líquido remanente con una pipeta. Por último, se guardaron los productos de PCR a -20°C en una caja opaca a la luz.

Preparación de la sonda, hibridación y escaneo

En primer lugar se resuspendió cada pellet en 2 µl de agua estéril, tratando de mantener las muestras en la mayor oscuridad posible con ayuda de papel de aluminio.

Por cada hibridación, se preparó 500 µl de una mezcla que contenía:

<u>Concent. Final</u>	<u>Stock</u>	<u>Mezcla 1x</u>
50 mM	Na-Mes pH 6.9 (500mM)	50 µl
500 mM	NaCl 5M	50 µl
6 mM	EDTA 500 mM	6 µl
0.5%	Sarcosina 5%	50 µl
30%	Formamida	150 µl
250 ng	DNA esperma de salmón (250 ng/ µl)	1 µl
80 µg	tRNA de levadura (8 µg/µl)	10 µl
	ddH ₂ O	179 µl

Después se añadió 248 µl de mezcla de reacción a cada precipitado resuspendido y se combinaron ambos. A continuación se calentaron las muestras durante 3 minutos a 95°C. Se transfirieron los tubos a 40 °C y se incubaron otros 15 minutos. Inmediatamente después se centrifugaron a 13000 g durante 45 segundos a temperatura ambiente.

El siguiente paso consistió en ensamblar las matrices tal y como describe el fabricante (Affymetrix). Del modo más rápido posible, los cristales sellados con goma fueron colocados hacia arriba en la cámara de hibridación y se añadió la solución de hibridación, siendo después colocado el chip de DNA boca abajo en la solución. Se

ensambló la cámara y se chequeó la correcta rotación de la solución de hibridación. Seguidamente se incubó a 40 °C en rotación durante 12-18 horas.

Pasado este tiempo se procedió al lavado de las matrices. Para ello se desensamblaron las cámaras de hibridación y se transfirieron los cristales a un reservorio con 1 litro de solución de lavado I (300 ml de 20x SSPE, 1 ml de 0.005% N-lauroilsarcosina, agua estéril hasta 1 litro). Tras sumergirlos, inmediatamente se separaron los vidrios de la micromatriz y se lavó esta última durante 2 segundos en agitación. La micromatriz se depositó a continuación en un nuevo soporte sumergido en un segundo contenedor con solución de lavado. Se lavó durante 5 minutos colocándola en un plato en un agitador orbital a 60 rpm y mientras tanto se preparó un segundo contenedor con solución de lavado II (3 ml de 20X SSPE y agua hasta 1 litro).

Después del paso anterior, con cuidado y rápidamente se quitó el soporte del vidrio y se secó con papel absorbente. Se transfirió al contenedor con la solución de lavado II y se lavó durante 5 minutos en agitación. A continuación, despacio y uniformemente se quitó el soporte y los vidrios de la solución de lavado II y el líquido remanente se eliminó mediante centrifugación a 1000 rpm.

El DNA marcado fluorescentemente se unió complementariamente a las sondas de DNA en los chips, generando luz fluorescente que se grabó gracias a un escáner GenePix 4100 de Axon Instruments. Las señales para los DNA inmunoprecipitados se normalizaron por el DNA control, concluyendo el proceso con el análisis de los datos obtenidos.

Tratamiento informático de los datos generados por CHIP-Chip

MAT (Model-based Analysis of Tiling-arrays)

Se trata de un rápido y fiable algoritmo para detectar regiones enriquecidas por un factor de transcripción mediante CHIP-Chip (Johnson *et al.*, 2006). Usando un modelo simple lineal, MAT estima la línea base de los picos que muestran las sondas basándose en las características de las secuencias y el número de copias en el genoma. Utilizando este modelo base para estandarizar las sondas, MAT es capaz de filtrar mucho ruido en los datos y distinguir señales biológicas verdaderas de las medidas por hibridaciones no específicas. Además, permite al usuario obtener regiones enriquecidas significativamente mediante los valores *P-value*, FDR (cociente entre regiones positivas y negativas) o MATscore y establecer un nivel de corte adecuado. En este trabajo de investigación se establecieron las regiones enriquecidas por los factores de transcripción estudiados en base al nivel de corte y valor MATscore, seguido del valor *P-value* y de la tasa de falsos positivos.

El programa MAT está disponible gratuitamente en la dirección electrónica liulab.dfci.harvard.edu/MAT/. Requiere cuatro tipos de archivos para comenzar. Los tres primeros son el archivo “.cel” que contiene los valores de señal de cada sonda, los archivos “.bpmmap” que contienen la secuencia, localización (en la matriz y en el genoma) y el número de copias de cada sonda; y por último el archivo “.lib” que contiene las coordenadas cromosómicas de las repeticiones y los segmentos con duplicaciones. Los parámetros MAT, incluyendo los del archivo “.cel” y “.bpmmap”, se organizan en un archivo “.tag”. MAT devuelve dos tipos de archivos finales: “.bar”, que contiene el valor MATscore para cada sonda y que puede ser importado en el programa Integrated Genome Browser (Nicol *et al.*, 2009), de acceso libre (www.bioviz.org/igb) y un archivo “.bed” con las coordenadas cromosómicas de cada región inmunoprecipitada y que pueden ser analizadas con la ayuda del programa UCSC Genome Browser (genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway).

En la figura 12 se muestra dos imágenes ejemplo de la visualización de ambos archivos con los programas mencionados.

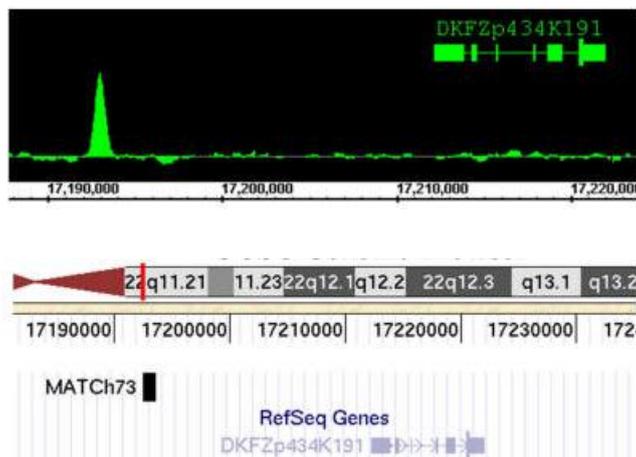


Figura 12. Ejemplos de visualización de archivos .bar y .bed tras la detección de una región enriquecida por ChIP-Chip. Se muestra a la izquierda la visualización de un pico de unión en un archivo .bar con el programa IGB y a la derecha las coordenadas cromosómicas en un archivo .bed visualizado con UCSC Genome Browser. Adaptado de (Johnson *et al.*, 2006).

17. Secuenciación masiva de cromatina inmunoprecipitada (ChIP-Seq)

El proceso llamado ChIP-Seq es un novedoso método alternativo para mapear las interacciones entre DNA y proteínas. La estrategia es similar al método ChIP-chip pero en lugar de marcar el material inmunoprecipitado e hibridarlo en una micromatriz, el material IP de partida, que consta de una mezcla heterogénea de millones de fragmentos de DNA, se amplifica y es directamente secuenciado en paralelo (figura 13). Existe una variedad de plataformas que ofrecen la posibilidad de secuenciación masiva. En este trabajo se ha empleado la tecnología de Solexa (Illumina), descrita a continuación.

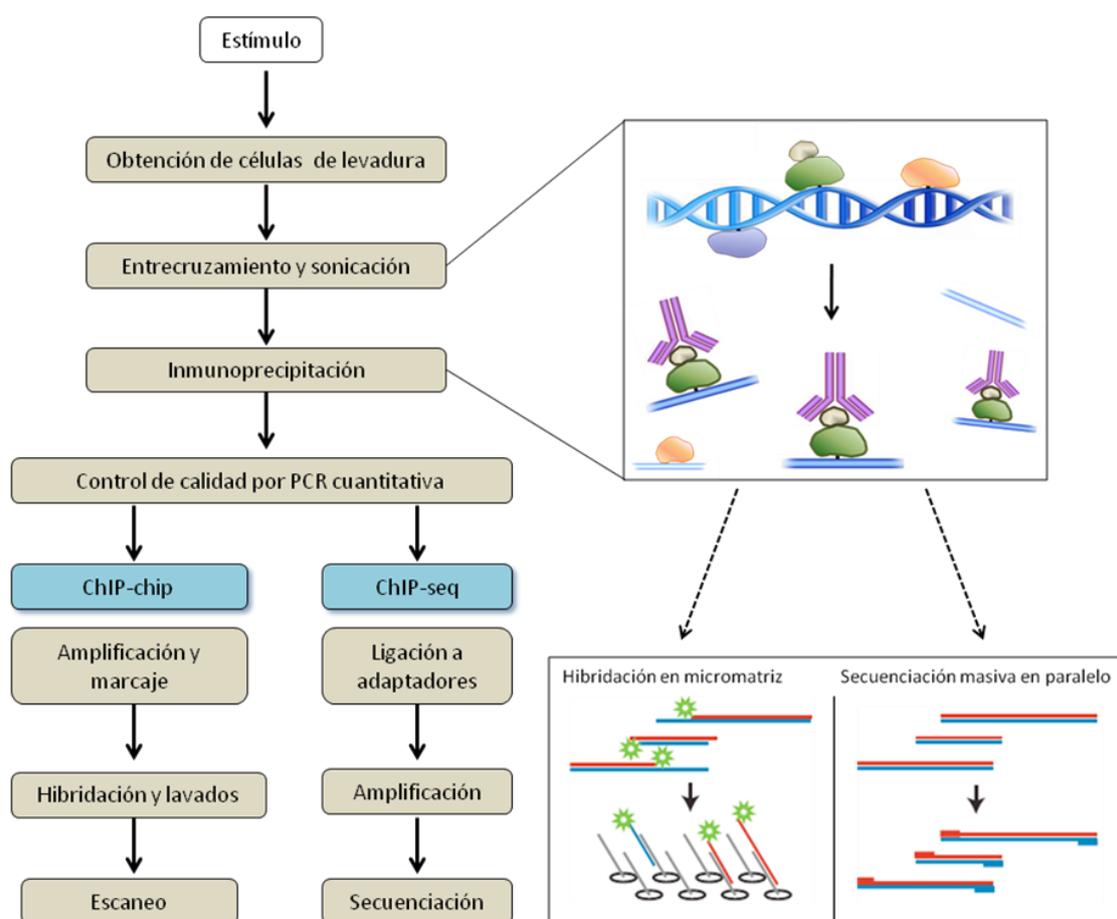


Figura 13. Flujo de trabajo de los experimentos ChIP-chip y ChIP-seq. Tras la manipulación de las células, éstas son fijadas con formaldehído, sonicadas y los fragmentos de cromatina entre los que hay complejos DNA-proteína se inmunoprecipitan con anticuerpos que reconocen el epitopo fusionado. Después de un control por qPCR para verificar una señal de enriquecimiento esperada en regiones conocidas, el DNA IP se procesa específicamente según el método. ChIP-chip proporciona información sobre aquellas secuencias de DNA IP complementarias a las sondas solapantes del chip. ChIP-seq proporciona información sobre todas las secuencias localizadas en los extremos 5' de los DNA inmunoprecipitados.

El protocolo de preparación de DNA inmunoprecipitado para secuenciación con adaptadores con código de barras (Illumina/Solexa) consistió en los siguientes pasos.

En primer lugar se procedió a reparar los extremos de los fragmentos de DNA. Para ello se partió de 1-10 ng de DNA y se mezcló en un tubo de microcentrífuga hasta 50 µl de: entre 1 y 40.8 µl de DNA, 5 µl de tampón 10X T4 DNA Ligasa, 2 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 µl T4 DNA Polimerasa, 1 µl T4 PNK (NEB), 0.2 µl DNA Polimerasa I, fragmento grande Klenow (NEB). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Después tuvo lugar la purificación en una columna con el kit QIAquick PCR Purification y se eluyó en 35 µl de tampón con 5 min de incubación.

El segundo paso consistió en la adición de la base adenina en los extremos 3'. Para ello se prepararon stocks de 1 mM dATP a partir de 100 mM dATP (NEB) en agua libre de RNasas y DNasas (GIBCO) y se prepararon alícuotas de 50 µl que fueron congeladas a -20 °C. Después se combinaron los siguientes componentes hasta un volumen de 50 µl: 1-34 µl de DNA del primer paso, 5 µl de tampón Klenow (NEB2), 10 µl de 1 mM dATP y 1 µl de Klenow (3'-5'). Tras mezclar e incubar durante 30 minutos a 37 °C, se procedió a purificar la muestra con el kit de purificación de PCR QIAquick MinElute. Finalmente se eluyó en 10 µl de tampón de elución EB y se incubó 5 minutos.

En tercer lugar se llevó a cabo la ligación a los adaptadores. Para ello se diluyó los adaptadores de código de barras 50 veces en agua y se mezcló los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga hasta un volumen total de 30 µl: 10 µl de DNA purificado en el paso anterior, 15 µl de tampón 2x DNA ligasa, 1 µl de Adapter oligo mix (1:50 o 1:10) y 4 µl de DNA ligasa. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se separó el DNA ligado a adaptadores en un gel de agarosa 2% durante 30 minutos a 120V, dejando separar suficientemente las muestras para evitar contaminación cruzada. A continuación se cortó las bandas en un rango de 200 a 500 pares de bases con un escalpelo limpio y se purificó el DNA de los trozos de gel usando el kit QIAGEN Gel Extraction. Finalmente se eluyó en 60 µl de tampón de elución.

A continuación se llevó a cabo la amplificación por PCR y la selección de tamaños. Para ello se mezclaron los siguientes componentes: 20 µl de DNA del paso anterior, 10 µl de tampón 5x HF, 2.5 µl de mezcla de oligos para PCR a 10 µM (21543/21544), 0.4 µl de dNTPs a 25 mM, 0.5 µl de Phusion DNA polimerasa y finalmente agua hasta un volumen de 50 µl. La amplificación se realizó con el siguiente programa de PCR:

<u>Paso</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Ciclos</u>
1	30 segundos	98 °C	1
2	10 segundos	98 °C	
	30 segundos	65 °C	
	30 segundos	72 °C	Repetición 18 ciclos
3	5 minutos	72 °C	1
4	Hasta el final	4 °C	

Tras la amplificación se redujo el volumen usando la columna QIAGEN PCR clean up y se eluyó en 25 μ l de tampón de elución EB. Seguidamente se separó en un gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 120V la biblioteca de fragmentos de DNA amplificados. Las muestras se dejaron separar lo suficiente para evitar contaminación cruzada. El tampón utilizado fue 1xTAE y no se utilizó bromuro de etidio ni en el gel ni el tampón. Se cortó el marcador de tamaños (señalando 200 y 500 pb) y se incubó el gel en 1x TAE + 5 μ l SYBR Gold durante 30 minutos. El teñido con bromuro de etidio funciona bien con 1-1.5 μ g de marcador de 100pb. Después se escindió el DNA con un tamaño entre 200 y 500pb del gel con la ayuda de un escalpelo limpio y se purificó de los trozos de gel de agarosa usando el kit de extracción de QIAGEN, eluyendo finalmente en 15 μ l de tampón de elución e incubando 5 minutos.

Por último, se midió la concentración de DNA (ng/ μ l) con Nanodrop y se tomó 1 μ l, que se diluyó entre 50 y 200 veces, dependiendo de la concentración de la biblioteca y se comprobó la calidad de la misma mediante PCR cuantitativa, antes de proceder a la secuenciación con Genome Analyzer (Solexa) y posterior análisis de los datos de forma similar a como se haría con un experimento CHIP-chip (figura 14).

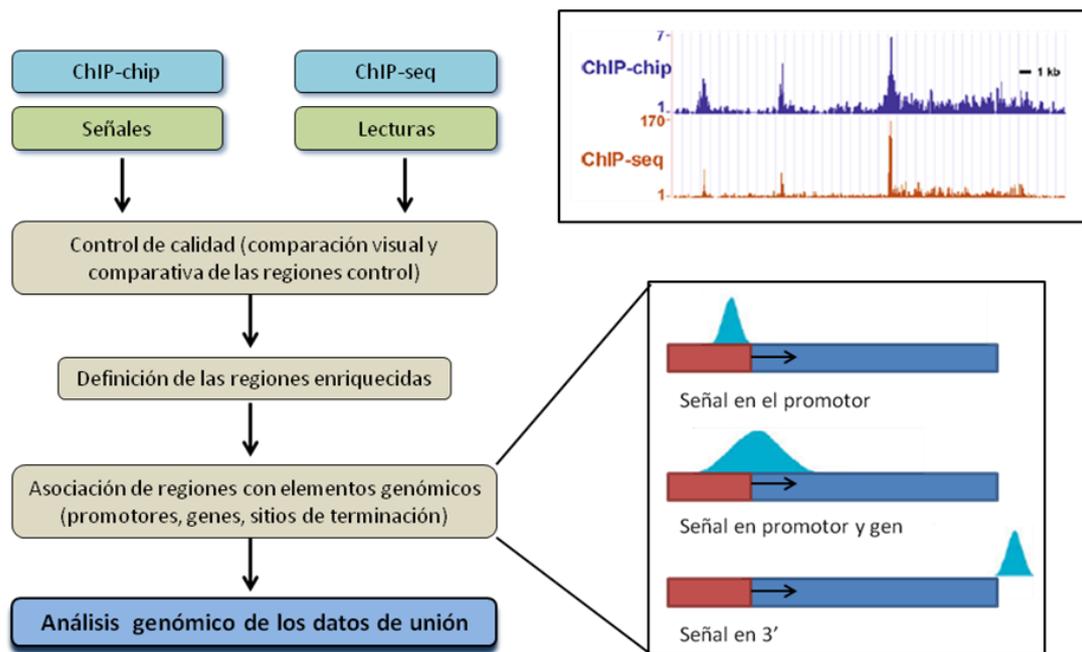


Figura 14. Comparación del flujo de trabajo del análisis de datos ChIP-chip y ChIP-seq. Los datos ChIP-chip (nivel de enriquecimiento del material IP sobre el DNA genómico) y/o ChIP-seq se mapean en el genoma de levadura. Mediante ChIP estándar y qPCR se validan las regiones unidas y control. Las regiones “unidas” son aquellas en las que la señal es significativamente mayor de lo esperado por azar. Estas regiones son asociadas a elementos genómicos de interés, por ejemplo promotores de genes de interés, que serán finalmente analizados.

Tratamiento informático de los datos generados por ChIP-Seq

Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS)

MACS estima empíricamente la tasa de falsos positivos (FDR) para cada pico detectado usando el mismo procedimiento empleado con la herramienta MAT para encontrar picos en experimentos ChIP-Chip.

La aplicación MACS está disponible libremente en la dirección electrónica liulab.dfci.harvard.edu/MACS/ y los datos que proporciona incluyen un archivo BED que contiene las coordenadas de los picos obtenidos y un WIG convertible a archivo XLS que contiene las coordenadas genómicas, *Summit*, *p-value*, *fold-enrichment* y FDR de cada pico (Zhang *et al.*, 2008). Los datos obtenidos se muestran como número de marcas en ventanas de un cierto tamaño y el número de estas lecturas se puede promediar a lo largo de ciertos elementos genómicos (promotores, regiones codificantes, etc) para obtener perfiles de densidad. En este trabajo de investigación,

se calcularon los valores promedio de las lecturas en ventanas de 100 pares de bases desde el codón de inicio de la transcripción (de -500 a +500pb) y se estudió los genes con las mayores puntuaciones.

18. Estudio de interacciones regulatorias mediante herramientas informáticas

El estudio de las redes de regulación transcripcional con métodos informáticos se basó en la búsqueda de sitios de unión consenso de factores de transcripción y en las asociaciones combinatorias de éstos en el genoma de levadura mediante las siguientes herramientas.

Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT)

RSAT es un paquete de aplicaciones disponible gratuitamente en la dirección electrónica rsat.ulb.ac.be/rsat que integra herramientas para detectar elementos regulatorios en cis en secuencias genómicas. El paquete incluye programas para la búsqueda de secuencias, descubrimiento de patrones, detección de huellas filogenéticas, concordancia de pautas, escaneo de genomas y para el dibujo de representaciones gráficas en secuencias, como los sitios de unión predichos o anotados para factores de transcripción (Defrance *et al.*, 2008; Thomas-Chollier *et al.*, 2008; Turatsinze *et al.*, 2008).

Concretamente en este trabajo, se utilizó la herramienta “*Retrieve Sequence*”, que permitió buscar secuencias no codificantes en la región aguas arriba del codón de iniciación de los genes de interés. La longitud de las secuencias pudo especificarse como un valor fijo o determinarse según el gen específico, dependiendo de la distancia a genes vecinos. A continuación, la herramienta “*consensus*”, basada en el algoritmo Greedy (Hertz *et al.*, 1990), permitió la búsqueda de un nuevo sitio consenso en los genes listados en la herramienta anterior y que son co-regulados por un mismo factor de transcripción. Por otra parte, “*Pattern matching: DNA-pattern*” permitió buscar el

motivo sugerido bien en las secuencias problema o en todo el genoma de levadura para así obtener un mapa de la localización del sitio consenso putativo.

Como control, se utilizó la herramienta “*random gene selection*”, que permite seleccionar al azar un número deseado de genes dentro de un mismo organismo. A continuación se buscó en el promotor de estos genes la secuencia consenso para descartar la posibilidad de encontrarla al azar y de obtener por tanto un número elevado de falsos positivos.

Los métodos descritos permitieron predecir motivos y buscar su localización en el genoma de un organismo concreto. Sin embargo, dado el número creciente de genomas secuenciados, también permitieron aplicar la herramientas anteriormente descritas con otro fin: en primer lugar, partiendo de la lista de genes a estudiar, se utilizó “*get orthologs*” dentro del taxón *Saccharomyces* para obtener posteriormente con la herramienta “*retrieve sequence*” la secuencia de las especies *sensu stricto* más estrechamente relacionadas con *Saccharomyces cerevisiae* (*S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. kluyveri*, *S. kudriavzevii* y *S. castellii*). A continuación se realizó la búsqueda con “*DNA-pattern*” del motivo en cuestión en las especies relacionadas con el fin de averiguar si está conservado evolutivamente.

Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking (YEATRACT)

YEATRACT (www.yeastract.com) es una base de datos con más de 48333 asociaciones regulatorias entre factores de transcripción y genes blanco en *Saccharomyces cerevisiae*, basada en más de 1200 referencias bibliográficas (Monteiro *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2006). Incluye además la descripción de 298 sitios específicos de unión al DNA de más de 100 factores de transcripción caracterizados. La información de cada gen de levadura se extrae de la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*), concretamente de la última versión 1.1503, del 26 de junio de 2010. Para cada gen, los términos GO (*Gene Ontology*) y su jerarquía se obtienen a través del consorcio GO del 25 de junio de 2010. Actualmente, YEATRACT mantiene un total de 7130 términos de GO. Las secuencias nucleotídicas de los

promotores y regiones codificantes se obtienen de *RSA Tools*. Toda la información en YEASTRACT se actualiza regularmente de los últimos datos de *SGD*, *GO consortium*, *RSAT* y de reciente literatura sobre redes de regulación en levadura.

En este trabajo, se realizó la búsqueda de factores de transcripción incluidos en la base de datos de YEASTRACT que están involucrados en la regulación de una lista dada de genes de interés y la posible asociación combinatoria con otros factores conocidos. Únicamente se seleccionaron aquellos cuya regulación ha sido demostrada experimentalmente (asociaciones documentadas) por métodos directos o indirectos, descartándose las asociaciones potenciales -aquellas debidas al encuentro de sitios consenso de unión de factores de transcripción en los promotores por métodos informáticos. Las evidencias directas son aquellas proporcionadas a través de experimentos como ChIP, ChiP-on-chip y ensayos de cambios de movilidad electroforética (EMSA), que prueban la unión directa del factor de transcripción a la región promotora de los genes blanco o como el análisis del efecto en la expresión génica de la eliminación del sitio de unión en el promotor mediante una mutación dirigida, lo cual sugiere fuertemente que el factor de transcripción interacciona con este promotor específico. La clasificación de evidencia indirecta se atribuye a experimentos como el análisis comparativo de los cambios en la expresión génica que ocurren como respuesta a la delección, mutación o sobre-expresión de un factor de transcripción dado.

RESULTADOS

- I. La represión de la biosíntesis de ergosterol es esencial para la resistencia a estrés osmótico y oxidativo.
- II. Organización genómica de la respuesta transcripcional a estrés osmótico en levadura.

PARTE I

La represión de la biosíntesis de ergosterol es esencial para la resistencia a estrés osmótico y oxidativo

1. Mot3 y Rox1 son importantes para el crecimiento y la modulación de los niveles de ergosterol bajo estrés salino
2. La represión de la expresión de algunos genes *ERG* depende de Mot3, Rox1 y de la MAP quinasa Hog1
3. Hog1 controla el reclutamiento de la RNA Pol II en respuesta a estrés osmótico de forma positiva y negativa
4. El represor Mot3 ocupa el promotor de *ERG2* bajo estrés salino dependientemente de Hog1
5. La regulación de la biosíntesis de ergosterol bajo estrés salino implica la represión transcripcional de *ECM22*
6. La adaptación a estrés oxidativo también implica la represión de los genes *ERG* y la regulación de la biosíntesis de ergosterol
7. La mutación *upc2-1* provoca la pérdida de regulación de los niveles de ergosterol y de la expresión de los genes *ERG*
8. Los mutantes *mot3rox1* y *upc2-1* son hipersensibles a estrés causado por cationes tóxicos
9. La reducción de los niveles de ergosterol es fisiológicamente relevante para la adaptación a estrés en levadura

1. Mot3p y Rox1p son importantes para el crecimiento y la modulación de los niveles de ergosterol bajo estrés salino

En las células de levadura, el correcto contenido en ergosterol es crucial para la fluidez y permeabilidad de las membranas y éstas son propiedades importantes para la adaptación a estrés osmótico y salino. Por esta razón nos preguntamos al comienzo de esta investigación si la adaptación de las células de levadura a estrés hiperosmótico y salino implica la modulación del contenido en ergosterol. Para ello se midió la concentración total de ergosterol en células de una cepa silvestre de levadura antes y después de adaptarse a tratamientos hiperosmóticos con sorbitol y salinos con cloruro de sodio. Como se muestra en la figura 15, las células de levadura reducen significativamente su contenido total en ergosterol cuando se enfrentan a concentraciones iguales o superiores a 0.7M de NaCl o 1M de sorbitol.

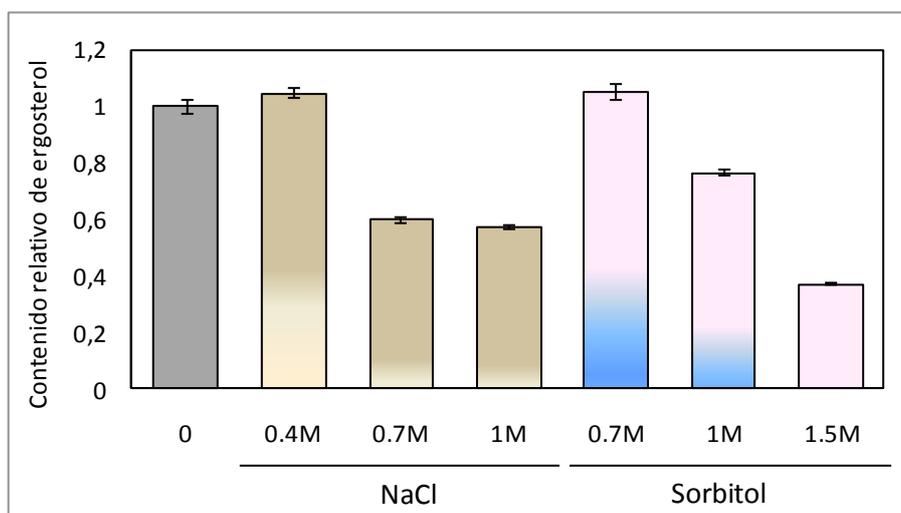


Figura 15. Las células de levadura reducen drásticamente su contenido en ergosterol en respuesta a estrés osmótico y salino. Las células de la cepa silvestre BY4741 fueron crecidas hasta fase exponencial ($DO_{660} < 0.8$) en medio YPD que contenía o no las concentraciones mostradas de NaCl o sorbitol. La concentración de ergosterol total se determinó por duplicado en tres cultivos independientes. Las barras sobre cada valor representan la desviación estándar.

Los cambios observados en los niveles de esteroides bajo estrés sugieren que existen en levadura rutas de señalización que permiten regular la biosíntesis de ergosterol en respuesta a estrés salino. En el trabajo previo de nuestro grupo, se

identificaron los promotores de los genes *MOT3* y *ROX1* como blancos directos del factor de transcripción Sko1, clave en la respuesta a estrés osmótico en levadura (Proft *et al.*, 2005). Mot3p es un represor directo de algunos genes *ERG* que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de ergosterol, como *ERG2* y *ERG6* (Davies y Rine, 2006; Hongay *et al.*, 2002) y Rox1p ha sido descrito como un represor que actúa de forma sinérgica con Mot3p (Sertil *et al.*, 2003). Por lo tanto, se decidió investigar la posible función de Mot3p y Rox1p en la adaptación a estrés hiperosmótico y si estos dos factores son necesarios para un crecimiento eficiente en medio con alto contenido en sal.

Para ello se comparó la cinética de crecimiento de una cepa silvestre con la de los mutantes simples *mot3* y *rox1* (apartado 2, Datos Suplementarios) y con la del doble mutante *mot3rox1* en presencia de 1M NaCl. Como se observa en la figura 16, la doble delección *mot3rox1* causa una reducción significativa en el rendimiento del crecimiento bajo estrés salino.

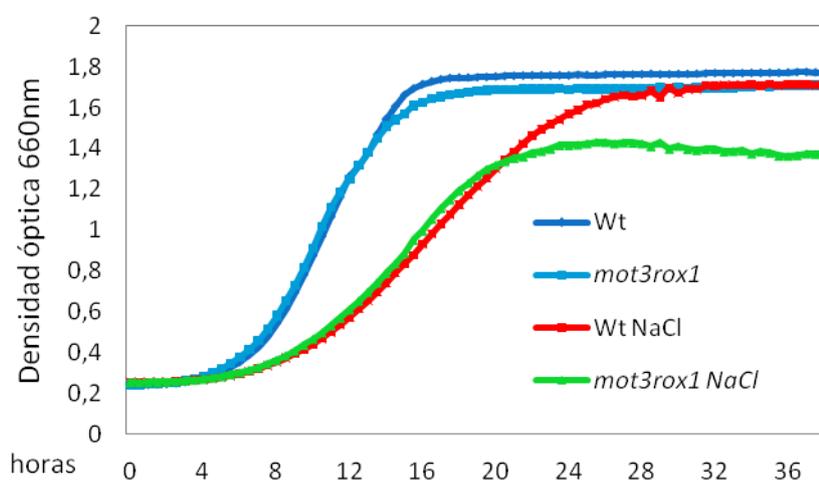


Figura 16. Importancia de Mot3p y Rox1p para la adaptación a estrés por NaCl. El crecimiento de la cepa silvestre (BY4741; Wt) y del doble mutante *mot3rox1* fue monitorizado continuamente en medio YPD o medio YPD con 1M NaCl. Las curvas de crecimiento derivan del promedio de tres cultivos independientes para cada tiempo. La varianza entre triplicados es menor del 10%. Cada experimento fue repetido tres veces con resultados muy similares.

A la vista de este resultado, se cuestionó si Mot3p y Rox1p son necesarios para reducir los niveles de ergosterol bajo estrés salino, tal y como se había observado previamente. Para ello se comparó el contenido en ergosterol de una cepa silvestre y

de las cepas mutantes *mot3* y *rox1* antes y después de la adaptación a altas concentraciones de sal. Como puede apreciarse en la figura 17, todos los mutantes que afectan a la función de Mot3p y/o Rox1p no pueden reducir eficientemente los niveles de ergosterol en respuesta a estrés salino.

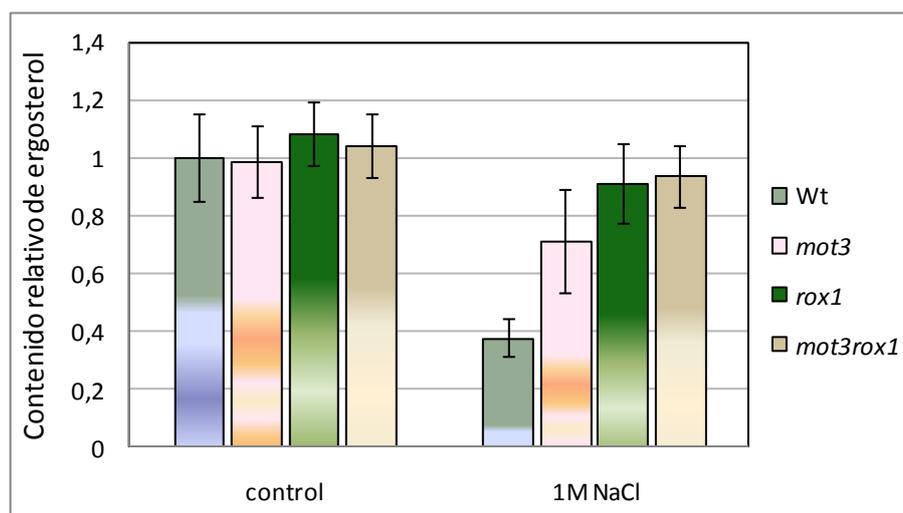


Figura 17. Mot3p y Rox1p son necesarios para la reducción de los niveles de ergosterol bajo estrés osmótico. Las cepas de levadura indicadas fueron crecidas hasta fase exponencial en YPD (control) o YPD con 1M NaCl. Los niveles de ergosterol se determinaron como en la figura 10. Las barras de error representan la desviación estándar entre 3 cultivos independientes, cuantificados cada uno de ellos por duplicado.

La siguiente cuestión fue si la pérdida de represión de la ruta de biosíntesis de ergosterol bajo estrés provocaba una mayor acumulación de iones Na^+ tras la exposición a estrés salino, lo cual explicaría la mayor sensibilidad a estrés de los mutantes *mot3* y *rox1*. Por lo tanto se cuantificaron los niveles de sodio intracelular de células de la cepa silvestre y de los mutantes *mot3* y/o *rox1* en presencia o ausencia de 1M NaCl.

Como se muestra en la figura 18A, células silvestres acumularon aproximadamente 50mM Na^+ bajo estas condiciones de estrés salino mientras que *mot3*, *rox1* y el doble mutante *mot3rox1* mostraron más del doble de la concentración de sodio intracelular.

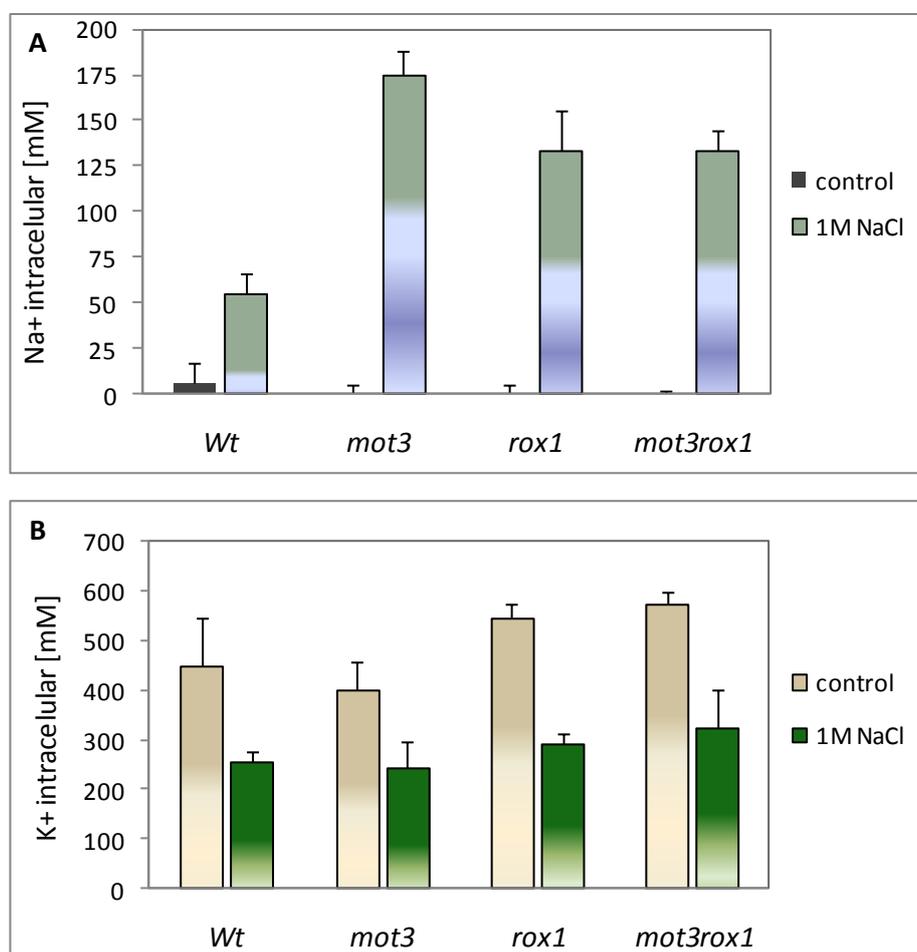


Figura 18. Los mutantes *mot3* y *rox1* acumulan excesivamente Na⁺ bajo estrés salino. La cepa silvestre y las cepas mutantes fueron crecidas en medio YPD con o sin 1M NaCl. Las concentraciones intracelulares de Na⁺ (A) y K⁺ (B) se cuantificaron como se describe en Material y Métodos para 5 cultivos independientes. Se muestra los valores promedio junto a su desviación estándar.

Finalmente se midió la concentración de iones potasio en las mismas cepas y condiciones de estrés. Como era de esperar, la exposición a un estrés salino severo reduce el contenido intracelular de K⁺ en la cepa silvestre. Esta pérdida de K⁺ no fue significativamente alterada en las cepas mutantes (figura 18B).

2. La represión de la expresión de algunos genes *ERG* depende de Mot3p, Rox1p y de la MAP quinasa Hog1p

Tras elucidar que los factores de transcripción Mot3p y Rox1p son necesarios para disminuir los niveles de ergosterol en respuesta al estrés producido por NaCl, se procedió a medir la expresión mediante análisis *Northern* de la mayoría de los genes que codifican enzimas de los pasos finales de la ruta de biosíntesis de ergosterol en condiciones normales y a los 20 minutos de aplicar estrés salino. Como puede apreciarse claramente en la figura 19, al analizar los valores de represión se descubrió que los distintos genes *ERG* responden de forma diferente a estrés por cloruro de sodio. Por ejemplo, mientras que *ERG2* y *ERG11* son fuertemente reprimidos bajo estrés osmótico, *ERG5* y *ERG6* son constitutivos y no responden al estrés. A la vista de este resultado, se decidió investigar con más detalle la represión de *ERG2* y *ERG11*, así como la expresión constitutiva de *ERG6* como control y su posible dependencia de los factores de transcripción Rox1p, Mot3p y de la quinasa Hog1p.

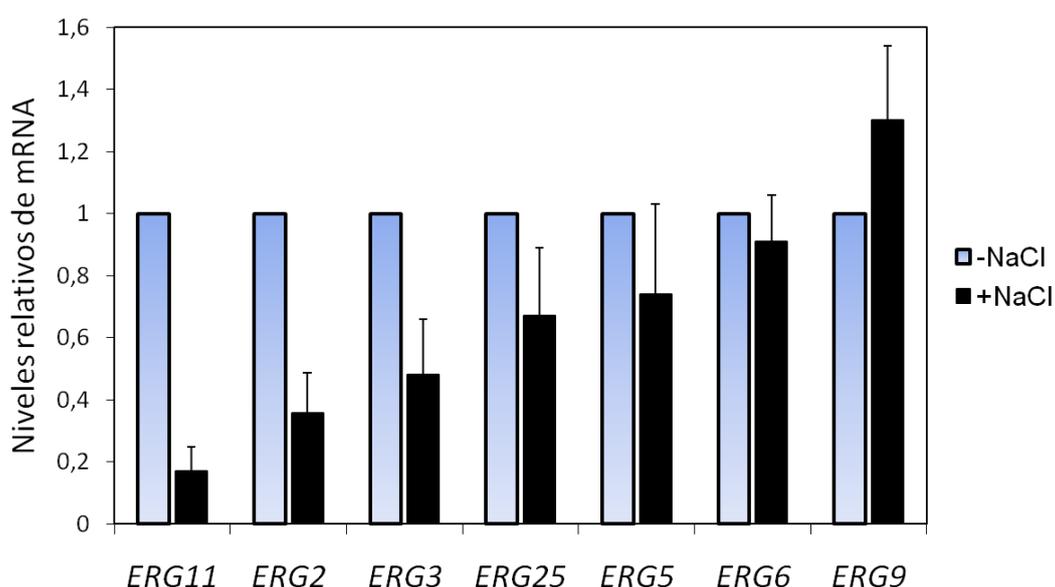


Figura 19. Los genes *ERG* responden de forma diferente a estrés por NaCl. Células de la cepa silvestre fueron crecidas en medio YPD hasta fase exponencial y a continuación sometidas a un moderado estrés osmótico (0.4M NaCl) durante 20 minutos. Se cuantificaron los niveles de mRNA de los genes *ERG* (y de *ACT1* como control) mediante análisis *Northern*. El nivel de represión de los transcritos de los genes *ERG* mostrados en las gráficas se calculó como el cociente entre el mRNA normalizado por el mensajero de *ACT1* a tiempo 0 y a 20 minutos de estrés osmótico. El experimento se repitió al menos tres veces con resultado similar.

Mediante análisis *Northern*, se confirmó que la expresión de *ERG2* y *ERG11* se reprime entre 3 y 6 veces en la cepa silvestre dentro de los primeros 20 minutos de exposición a 0.4M NaCl (figura 20). La delección de Mot3p causó la pérdida parcial de represión de *ERG2* y *ERG11* bajo estrés osmótico. Por su parte, la delección de Rox1p llevó a un incremento en la expresión basal de *ERG2* y *ERG11*, pero solo pareció afectar a la regulación de la represión de *ERG11*. Sin embargo, un doble mutante *mot3rox1* mostró una pérdida sustancial de regulación negativa de *ERG2* y *ERG11*, similar a la del mutante simple *mot3*.

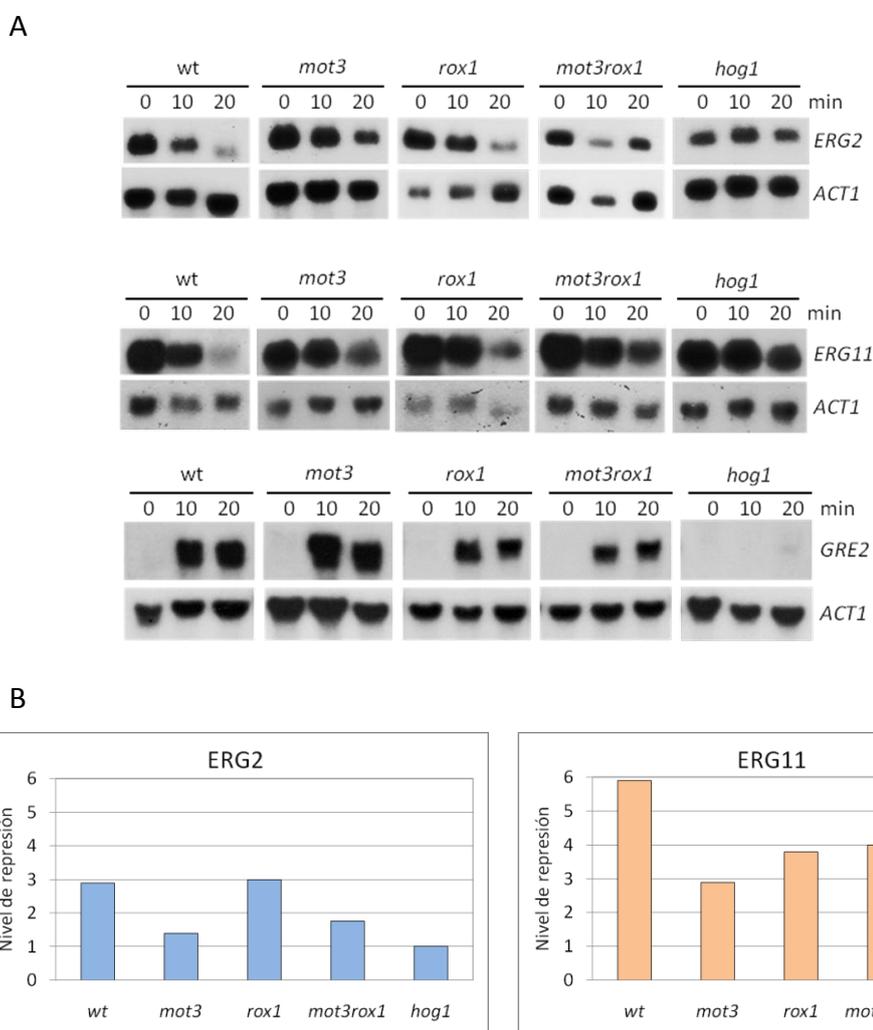


Figura 20. Mot3p, Rox1p y Hog1p controlan la represión de *ERG2* y *ERG11* bajo estrés osmótico. La cepa silvestre y los mutantes indicados fueron crecidos en medio YPD y después sometidos a un moderado estrés osmótico (0.4M NaCl) durante los tiempos indicados. A) Análisis *Northern* de la expresión de *ERG2*, *ERG11*, *GRE2* y *ACT1*. B) El nivel de represión de los transcritos de *ERG2* y *ERG11* mostrados en las gráficas se calcularon como el cociente entre el mRNA normalizado por el mensajero

de *ACT1* a tiempo 0 y a tiempo 20 minutos de estrés osmótico. El experimento se repitió dos veces con resultado similar.

Dado que la MAP quinasa Hog1p es el principal regulador transcripcional bajo estrés hiperosmótico, se decidió estudiar su posible función en la observada represión de los genes *ERG*. Como se muestra en la figura 20, una cepa *hog1* no pudo reprimir la transcripción de *ERG2* y *ERG11* durante el choque osmótico. La cepa mutante *hog1* mostró una reducción del 40% en los niveles iniciales de mRNA de *ERG2*, lo que conduce a un exceso de *ERG2* de aproximadamente 2 veces bajo estrés salino. Además, como control interno de regulación positiva se midió la expresión del gen inducible por estrés osmótico *GRE2* en los respectivos mutantes. Como era de esperar, se observó que *GRE2* se regula normalmente en los mutantes *mot3* y *rox1* (figura 20).

En el caso de *ERG6*, elegido como control constitutivo tras el estudio inicial descrito, no ocurrió lo mismo. Como se observa en la figura 21, la transcripción de *ERG6* no cambia bajo las mismas condiciones de estrés en ninguna de las cepas.

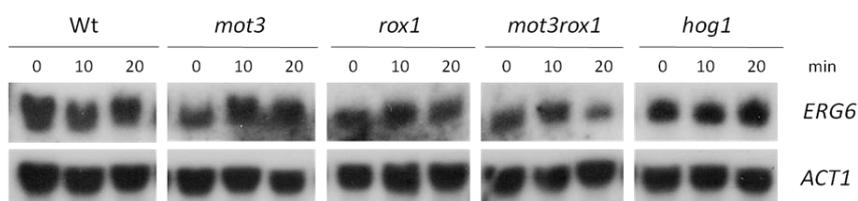


Figura 21. La expresión de *ERG6* no se ve afectada bajo estrés osmótico. La cepa silvestre y mutantes fueron crecidas en medio YPD y después sometidas a un moderado estrés osmótico (0.4M NaCl) durante los tiempos indicados. Los niveles de mRNA de *ERG6* y *ACT1* fueron determinados por *Northern Blot*. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

La siguiente cuestión que abordamos fue si la regulación negativa de la expresión de los genes *ERG* es una adaptación transitoria al estrés osmótico o una adaptación a largo plazo. Por lo tanto repetimos el análisis *Northern* comparando células crecidas en medio normal con células adaptadas a estrés salino. Como se muestra en la figura 22, la reducción masiva de mRNAs observada en *ERG2* y *ERG11* a los primeros minutos del choque osmótico no se detecta en células adaptadas a un ambiente hiperosmótico.

Todos estos resultados nos indican que el estrés hiperosmótico desencadena una rápida y transitoria represión transcripcional de algunos genes de la ruta de biosíntesis

de ergosterol a través de los factores transcripcionales Mot3p y Rox1p, siendo esta regulación completamente dependiente de Hog1p.

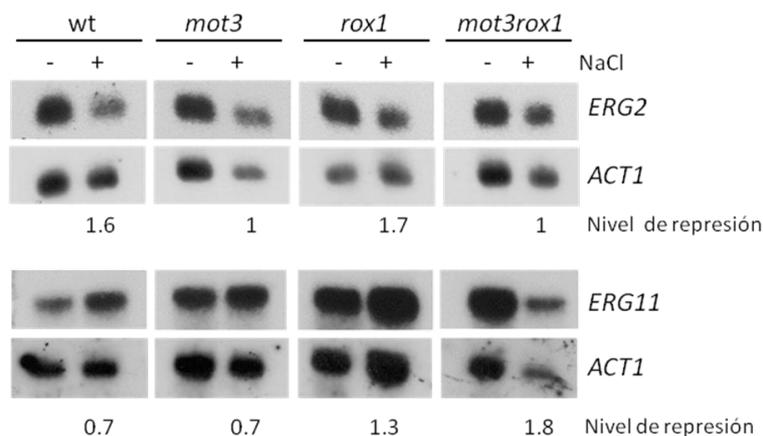


Figura 22. La expresión de *ERG2* y *ERG11* apenas se ve afectada en células adaptadas a sal. La cepa silvestre y mutantes fueron crecidas hasta fase exponencial en medio YPD sin y con 1M NaCl. La expresión de *ERG2*, *ERG11* y *ACT1* (control) se cuantificó mediante análisis Northern. El nivel de represión de *ERG2* y *ERG11* se calculó como en la figura 14 y es mostrado debajo de las exposiciones de los filtros de membrana.

3. Hog1p controla el reclutamiento de la RNA Pol II en respuesta a estrés osmótico de forma positiva y negativa

En el apartado anterior se ha descrito una regulación negativa de la expresión génica dependiente de estrés y de Hog1p. Dado que la MAP quinasa Hog1 es la responsable mayoritaria de la activación transcripcional bajo estrés osmótico, nuestra siguiente pregunta fue si Hog1p podría, a la vez que estimula la transcripción, reprimirla dependiendo del promotor específico.

Con el fin de elucidar si Hog1p puede controlar la densidad de la RNA polimerasa II (Pol II), medimos el reclutamiento de Pol II *in vivo* mediante inmunoprecipitación de cromatina. Para ello se empleó la subunidad Rpb3 fusionada con tres epitopos HA y se cuantificó por CHIP su presencia en dos genes inducibles por estrés osmótico (*GRE2*, *STL1*) y en los genes *ERG2* y *ERG11* reprimidos por estrés osmótico.

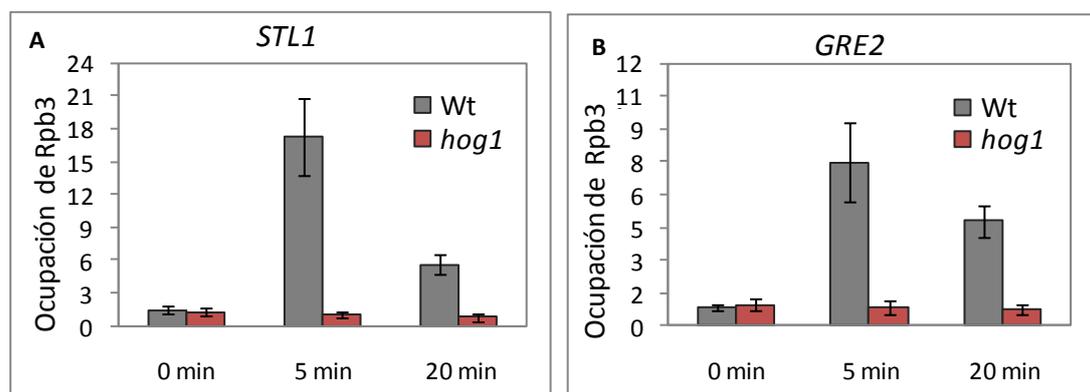


Figura 23. Hog1p estimula la ocupación de la RNA Pol II en genes inducibles por estrés osmótico. La ocupación de Rpb3-HA fue determinada por ChIP *in vivo* en células silvestres y en el mutante *hog1*. Las células fueron crecidas en YPD y sometidas a un breve estrés choque osmótico (0.4M NaCl) de hasta 20 minutos. La presencia de Rpb3p se determinó: (A) en *STL1* (+100/+212) y (B) en *GRE2* (+280/+452). Los experimentos fueron llevados a cabo a partir de al menos dos muestras de cromatina independientes y el error estándar se muestra en los gráficos. Los números en paréntesis detrás de cada gen se refieren a la localización de los oligonucleótidos usados para la PCR cuantitativa.

De modo esperable, se encontró que la densidad de Pol II se ve aumentada dentro de los primeros minutos de estrés dependiendo de la función de Hog1p (figura 23). Por el contrario, Pol II se perdió rápidamente de los promotores de *ERG2* y *ERG11* bajo estrés en un proceso dependiente de la MAP quinasa Hog1p (figura 24).

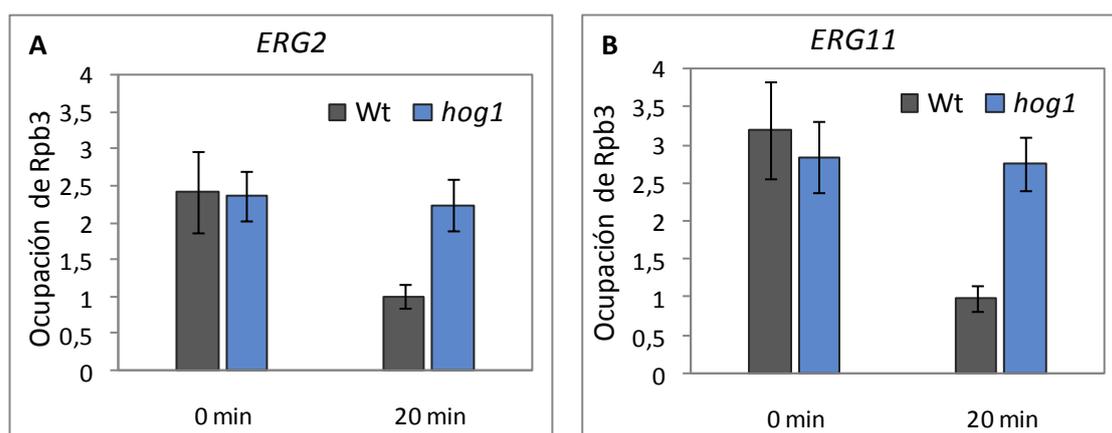


Figura 24. Hog1p reduce la densidad de RNA Pol II en los genes *ERG2* y *ERG11* bajo estrés osmótico. Bajo estrés salino (20 min; 0.4M NaCl), la ocupación de Rpb3p disminuye en los promotores de los genes reprimidos *ERG2* (-160/-64) y *ERG11* (-129/-38), lo cual depende de la función de Hog1p. Los experimentos fueron llevados a cabo a partir de al menos dos muestras de cromatina independientes y el error estándar se muestra en los gráficos

Como se sabe que Hog1p se asocia físicamente a las regiones promotoras de genes que se activan por estrés, nuestra pregunta fue si la quinasa podía también interactuar con los promotores de los genes *ERG* reprimidos. Por lo tanto llevamos a cabo un análisis ChIP de Hog1-HA comparando los loci inducibles de *CTT1* y *GRE2* con los reprimidos *ERG2* y *ERG11*.

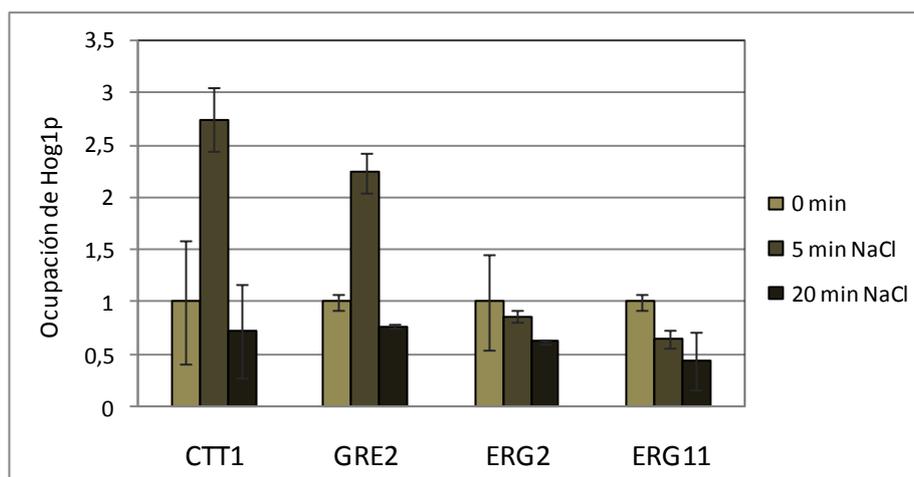


Figura 25. Hog1p no es reclutada de forma estable a los promotores de los genes *ERG2* y *ERG11*. La ocupación de Hog1-HA se determinó por ChIP in vivo en los promotores de *CTT1* (-486/-329), *GRE2* (-301/-121), *ERG2* (-492/-226) y *ERG11* (-251/-114) en YPD sólo o en el mismo medio con 0.4M NaCl en los tiempos de estrés indicados. El experimento fue llevado a cabo a partir de al menos dos muestras de cromatina independientes y el error estándar se muestra en los gráficos.

Como se muestra en la figura 25, el reclutamiento de Hog1p fue estimulado de manera transitoria bajo estrés osmótico en *CTT1* y *GRE2* pero no se detectó unión de Hog1p en el caso de los genes *ERG*. Concluimos pues que la proteína activada por estrés Hog1p estimula la transcripción de genes inducibles donde la propia quinasa se recluta de manera estable, mientras que en los loci *ERG*, Hog1 reprime la transcripción sin un reclutamiento estable.

4. El represor Mot3p ocupa el promotor de *ERG2* bajo estrés salino dependientemente de Hog1

Tras comprobar que la represión de algunos genes *ERG* está regulada por estrés nos preguntamos si este hecho es efecto de una unión directa de Mot3p a los promotores de los genes *ERG*. Para responder a esta cuestión se utilizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina y se determinó el grado de ocupación de Mot3p en el promotor del gen regulado por estrés *ERG2* y también en el promotor constitutivo de *ERG6* a lo largo del choque osmótico con NaCl.

Como se muestra en la figura 26A, la unión de Mot3p en el promotor de *ERG2* se vio aumentada de forma transitoria tras el choque con sal. En ausencia de Hog1p, la unión de Mot3p se redujo significativamente, lo cual indica que la MAP quinasa regula negativamente la expresión de *ERG2* estimulando la unión de Mot3p al promotor. Como era de esperar, tras el choque osmótico no se observó un aumento de unión de Mot3p en el promotor de *ERG6* (figura 26B), el cual no responde a estrés ni es regulado por Mot3p, como se ha mostrado anteriormente (figuras 19 y 21).

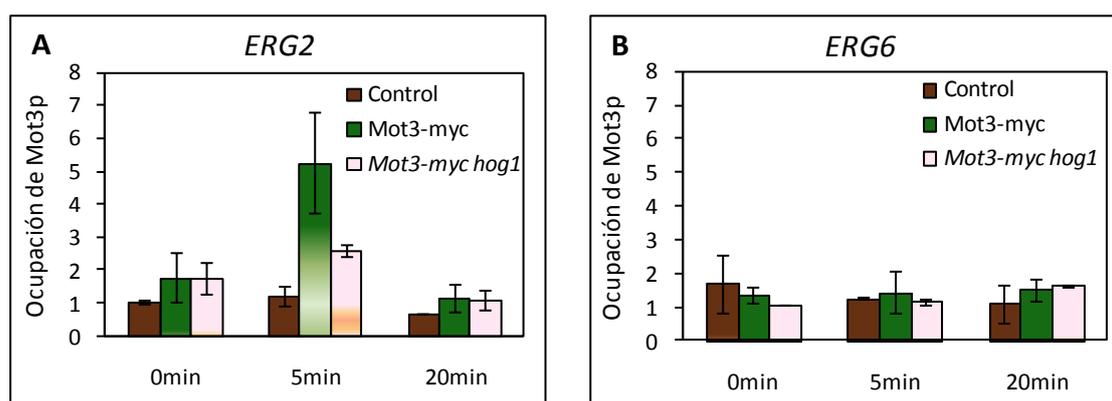


Figura 26. Hog1 estimula la unión del represor Mot3 al promotor de *ERG2* y no de *ERG6* bajo estrés salino. La ocupación de Mot3-myc se determinó por ChIP *in vivo* en células de levadura silvestre y del mutante *hog1*. Las células fueron crecidas en medio YPD hasta fase exponencial y después sometidas a estrés salino (5 y 20 min, 0.4M NaCl). La unión de Mot3p se determinó en el promotor de (A) *ERG2* y de (B) *ERG6* mediante PCR cuantitativa cubriendo las regiones -492/-226 y -498/-305 respectivamente. La ocupación relativa se calculó como el nivel de eficiencia de las muestras IP sobre la región control de *POL1*. El ChIP se llevó a cabo sobre tres muestras de cromatina independientes para cada cepa y

condición. Se muestra la desviación estándar en los gráficos. La unión de Mot3p a *ERG2* fue diferente en la cepa silvestre y en el mutante *hog1* con una $p < 0.04$ según el Student's T-test.

El aumento de unión de Mot3p a *ERG2* no está causado por unos niveles de proteína alterados ya que en un análisis *Western* se observó que la abundancia de Mot3p no cambia durante los primeros 20 min del choque osmótico. Los niveles del represor Rox1p, así como del activador Ecm22p, tampoco se vieron afectados en las mismas condiciones de estrés salino (figura 27).

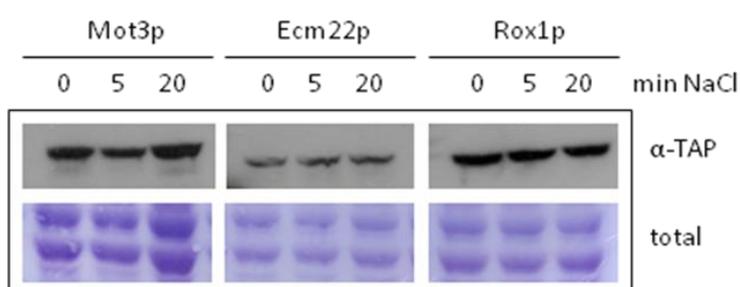


Figura 27. La abundancia de proteína de los represores Mot3p y Rox1p y del activador Ecm22p no se ve alterada en los primeros minutos de estrés salino. Células de levadura silvestre expresando las proteínas Mot3p, Ecm22p y Rox1p etiquetadas con TAP en sus loci cromosómicos fueron analizadas en ausencia de estrés y durante un choque osmótico con 0.4M NaCl en los tiempos indicados. Las proteínas se visualizaron mediante inmunodetección usando anticuerpo anti-PAP. Las membranas fueron teñidas con DB71 para verificar una carga equilibrada (total).

Sin embargo, se decidió ampliar el estudio de los niveles de proteína de Mot3p y Rox1p durante la adaptación a estrés. Como se muestra en la figura 28, la abundancia de la proteína Mot3p se vio aumentada de manera transitoria durante los primeros 40 minutos de estrés por NaCl. Este aumento no se observó en el mutante *hog1*. De forma inesperada, los niveles de Rox1p disminuyeron bajo las mismas condiciones de modo similar en la cepa silvestre y en el mutante *hog1*.

Estos datos sugieren que la represión de los genes *ERG* bajo estrés salino implica el aumento transitorio de los niveles de proteína de Mot3p y la estimulación de la unión de Mot3p al promotor de *ERG2* de forma dependiente de Hog1p.

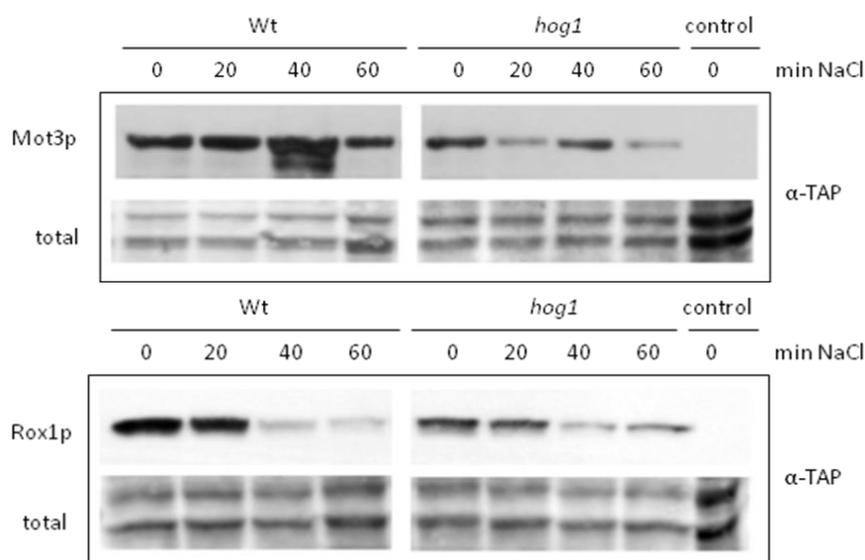


Figura 28. Los niveles de proteína de Mot3p se ven aumentados transitoriamente bajo estrés salino de modo dependiente de Hog1p. Células de levadura silvestre o del mutante *hog1* expresando las proteínas Mot3p y Rox1p etiquetadas con TAP en sus loci cromosómicos fueron analizadas en ausencia de estrés y durante un choque osmótico con 0.4M NaCl en los tiempos indicados. Las proteínas se visualizaron mediante inmunodetección usando anticuerpo anti-PAP. Las membranas fueron teñidas con DB71 para verificar una carga equilibrada (total).

5. La regulación de la biosíntesis de ergosterol bajo estrés implica la represión transcripcional de *ECM22*

La expresión de los genes de la biosíntesis de ergosterol se activa por los factores de transcripción Ecm22p y Upc2p, siendo Ecm22p el principal activador bajo condiciones de crecimiento favorables (Shianna *et al.*, 2001; Vik *et al.*, 2001).

Dado que encontramos que la adaptación a estrés osmótico conlleva la represión transcripcional de *ERG2* y *ERG11*, nos planteamos si Ecm22p es también blanco de la ruta de respuesta a estrés osmótico. Para ello cuantificamos la expresión de *ECM22* mediante análisis *Northern* durante un choque osmótico.

Como se muestra en la figura 29, la transcripción de *ECM22* fue rápidamente reprimida en células de una cepa silvestre durante el choque osmótico. Esta represión no fue significativamente alterada en los mutantes simples *mot3* y *rox1*. Sin embargo, la regulación negativa de *ECM22* bajo estrés fue completamente reprimida en el doble mutante *mot3rox1* y en el mutante *hog1*, lo cual nos conduce a concluir que la

expresión de *ECM22* se apaga en respuesta a estrés salino a través de los factores transcripcionales Mot3p y Rox1p y de la MAP quinasa Hog1p.

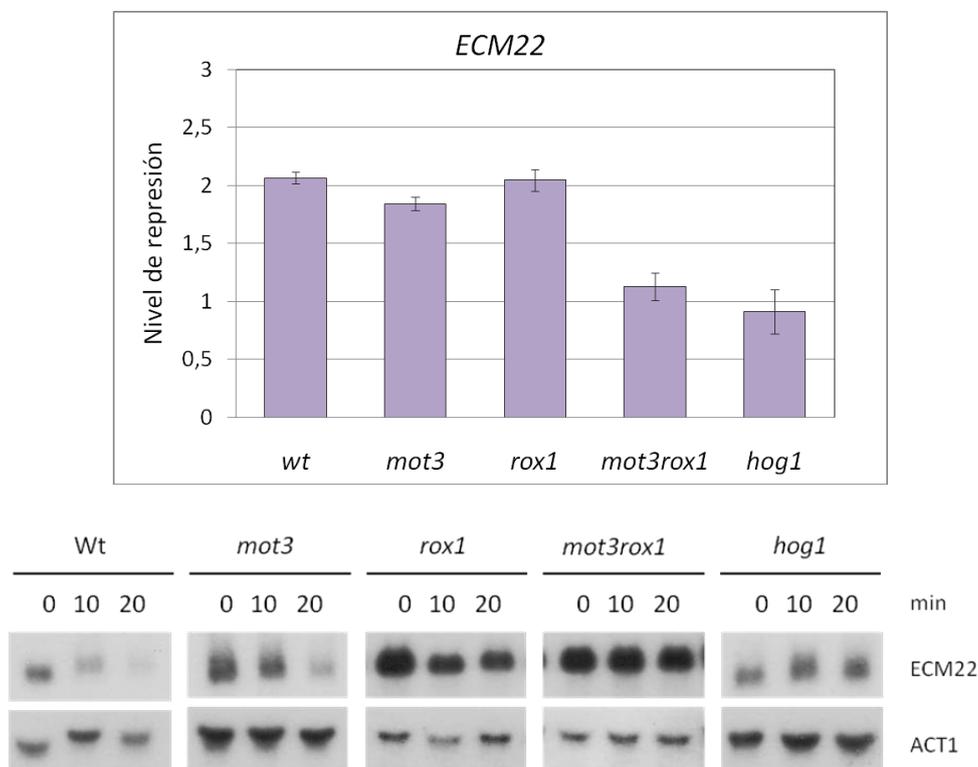


Figura 29. La expresión de *ECM22* se reprime bajo estrés de manera dependiente de Mot3p, Rox1p y Hog1p. La expresión de *ECM22* y *ACT1* (control) se cuantificó mediante análisis *Northern*. Las cepas silvestre y mutantes fueron crecidas en medio YPD y después sometidas a estrés osmótico (0.4M NaCl) en los tiempos indicados. El nivel de represión del transcrito de *ECM22* mostrado en el gráfico se calculó como el *ratio* entre el mRNA normalizado por el mensajero de *ACT1* a tiempo 0 y el de tiempo 20 min de estrés osmótico. Se llevaron a cabo 3 experimentos independientes y el error estándar se muestra en el gráfico. La figura mostrada es representativa de una de las repeticiones llevadas a cabo.

6. La adaptación a estrés oxidativo también implica la represión de genes *ERG* y la regulación de la biosíntesis de ergosterol

La siguiente cuestión planteada y que se decidió investigar fue si otros estímulos distintos al estrés hiperosmótico podían causar la adaptación de la biosíntesis de ergosterol. Por ello decidimos, dada su estrecha relación con estrés osmótico, estudiar el impacto del estrés oxidativo en los niveles de ergosterol total y en la expresión de los genes *ERG*.

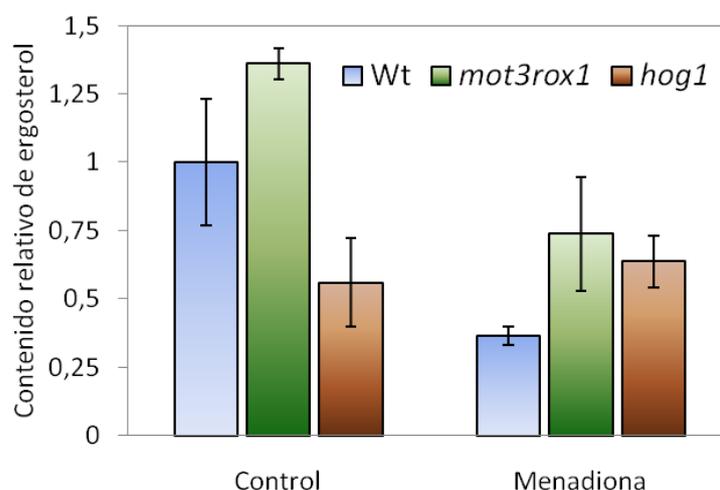


Figura 30. Impacto del tratamiento con menadiona en el contenido celular de ergosterol. Células de levadura silvestres (Wt; BY4741) y de los mutantes indicados fueron crecidas hasta fase exponencial en YPD conteniendo o no 75 μ M de menadiona. Los niveles totales de ergosterol se determinaron en duplicado para 3 cultivos independientes. La concentración de ergosterol de la cepa silvestre en medio normal de crecimiento fue ajustada a 1.

Como se muestra en la figura 30, células silvestres de levadura reducen drásticamente su contenido en ergosterol al adaptarse a estrés oxidativo causado por menadiona. Un tratamiento con 75 μ M de menadiona causó una reducción de ergosterol comparable a la observada con un estrés por NaCl severo. En la ausencia de los represores Mot3p y Rox1p, la reducción en los niveles de ergosterol todavía se observó, aunque el contenido de ergosterol de los mutantes *mot3rox1* adaptados a menadiona fue mayor comparado con la cepa silvestre. Por último, la mutación de la MAP quinasa Hog1p provocó que el contenido en ergosterol no respondiera a menadiona.

A continuación se cuantificó el efecto del tratamiento con menadiona en la expresión de los genes *ERG2* y *ERG11*. Como se ilustra en la figura 31, la expresión de ambos genes se reprimió rápida y fuertemente en los primeros 20 minutos de exposición al agente oxidativo. En el doble mutante *mot3rox1*, así como en el mutante simple *hog1*, la represión por estrés oxidativo de *ERG2* y *ERG11* disminuyó ligeramente según los datos de cuantificación, pero seguía siendo muy evidente. Por otra parte, utilizamos como control positivo de regulación la expresión del gen *CCP1*, inducible por estrés oxidativo, que se indujo de manera normal en todas las cepas mutantes.

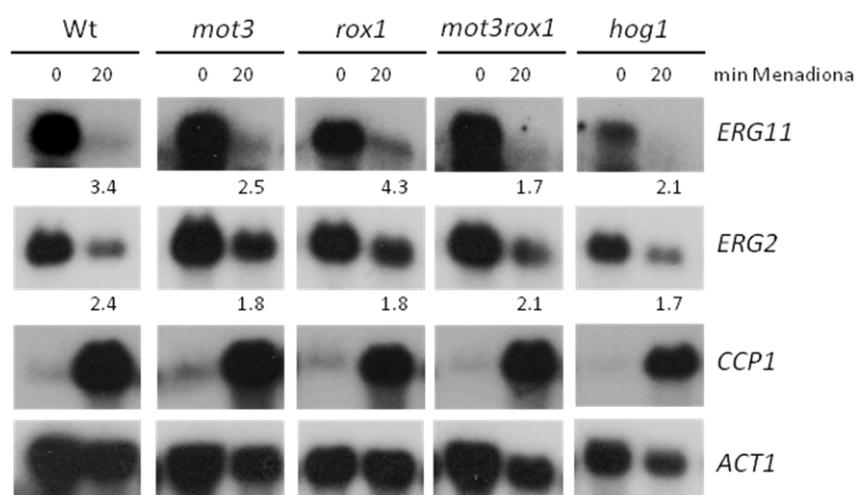


Figura 31. La expresión de *ERG2* y *ERG11* es rápidamente reprimida después del tratamiento con menadiona. La expresión de *ERG2*, *ERG11*, *CCP1* y *ACT1* (control) se cuantificó mediante análisis *Northern*. Las células de las cepas silvestre y mutantes fueron crecidas en YPD y después sometidas a estrés oxidativo (50 μ M menadiona, 20 minutos). El nivel de represión de los transcritos de *ERG2* y *ERG11* mostrados debajo de las exposiciones de los filtros se calcularon como el cociente entre el mRNA normalizado por el mensajero de *ACT1* entre el tiempo 0 y a los 20 min del estrés oxidativo.

Finalmente, se quiso probar si las alteraciones observadas en la biosíntesis de ergosterol causaban sensibilidad a estrés oxidativo. Como se muestra en la figura 32A, las células de la cepa mutante *mot3* sí muestran un crecimiento retrasado en presencia de menadiona comparado con la cepa silvestre. Esta sensibilidad es similar a la medida para la cepa mutante *hog1* y para el doble mutante *mot3rox1* (figura 32B).

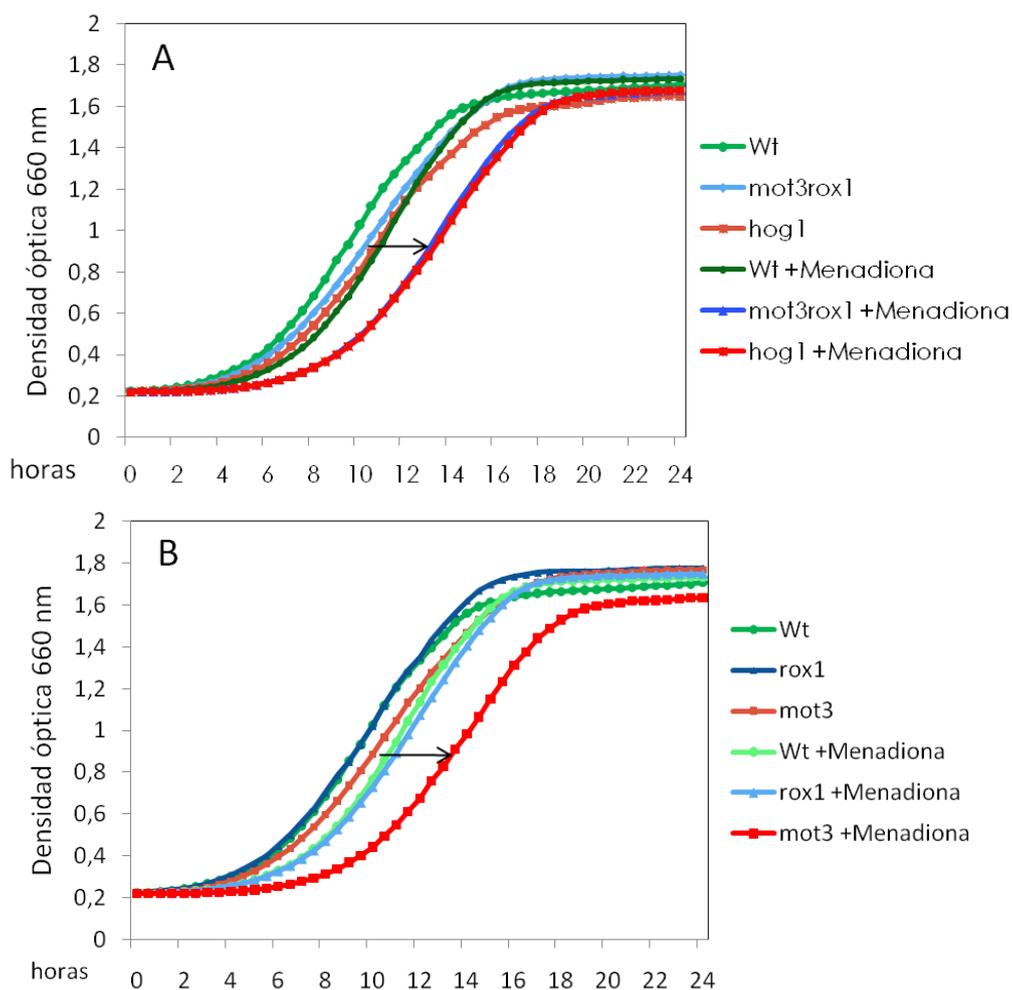


Figura 32. Los mutantes *mot3* y *hog1* son sensibles a estrés oxidativo causado por menadiona. El crecimiento de la cepa silvestre (Wt; BY4741) y de los respectivos mutantes (A y B) fue monitorizada en medio YPD sólo o con 25 μ M de menadiona. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de 3 cultivos independientes para cada tiempo medido.

En resumen, el tratamiento con menadiona causa una reducción severa en los niveles de ergosterol y en la expresión de los genes *ERG2* y *ERG11*, la cual es sólo parcialmente dependiente de Hog1p y de los factores transcripcionales Mot3p y Rox1p, atendiendo por tanto a otros reguladores hasta el momento desconocidos.

7. La mutación *upc2-1* provoca la pérdida de regulación de los niveles de ergosterol y de la expresión de los genes *ERG*.

En los apartados anteriores se ha visto que la represión de la biosíntesis de ergosterol acompaña la adecuada adaptación a estrés salino y oxidativo. Como se ha

descrito, la regulación negativa de la expresión de los genes *ERG* puede ser interrumpida bien eliminando los represores transcripcionales Mot3p y Rox1p o bien la MAP quinasa Hog1p.

Con el fin de conocer si la pérdida de represión de la biosíntesis de ergosterol interfiere con la adaptación a estrés, se propuso estudiar la sobreactivación de la ruta. Para ello se aprovechó un alelo mutante del activador transcripcional Upc2p previamente descrito. Esta mutación puntual, *upc2-1*, hace al factor de transcripción Upc2p constitutivamente activo, de modo que evita la represión normal por oxígeno de la toma de ergosterol (Crowley *et al.*, 1998; Leak, Jr. *et al.*, 1999).

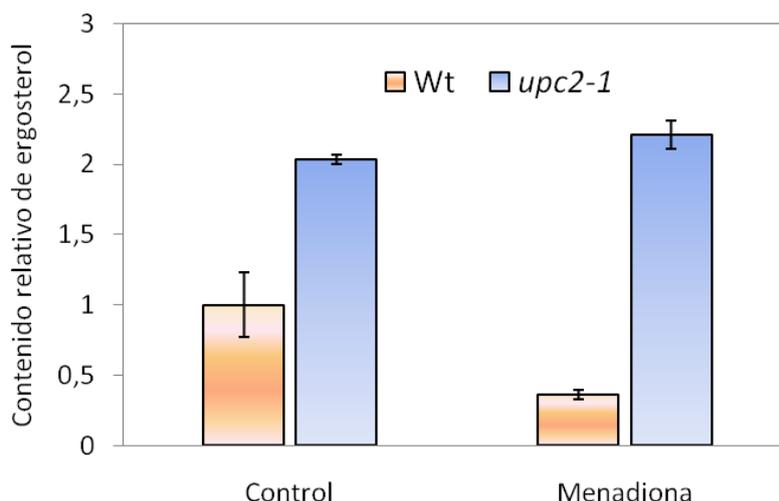


Figura 33. El mutante *upc2-1* acumula ergosterol excesivamente y de manera independiente de estrés oxidativo. Las células de levadura silvestre y del mutante *upc2-1* fueron crecidas continuamente en medio YPD sólo o suplementado con 75 μ M de menadiona. Los niveles totales de ergosterol se determinaron por duplicado de 3 cultivos independientes. La concentración de ergosterol de la cepa silvestre en medio normal de crecimiento fue ajustada a 1.

En primer lugar se midieron los niveles de ergosterol en el mutante *upc2-1* bajo condiciones normales y con estrés oxidativo y se compararon con la cepa silvestre. Como se muestra en la figura 33, células de *upc2-1* acumulan mucho más ergosterol en condiciones normales y, al contrario que las células silvestres, no pueden disminuir el contenido en ergosterol en respuesta al tratamiento con menadiona.

Después se comparó la sensibilidad de este mutante puntual con la cepa silvestre al tratar las células con menadiona y se pudo observar que el crecimiento de *upc2-1* es fuertemente inhibido en presencia del agente oxidativo (figura 34).

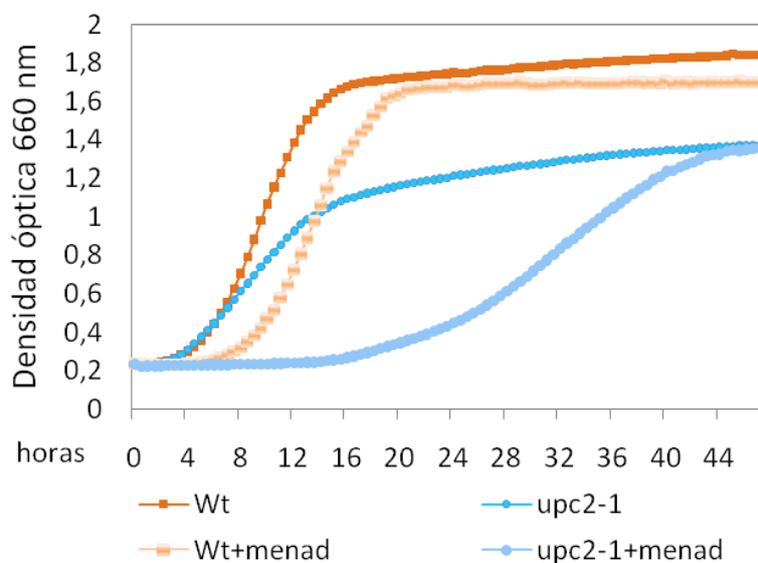


Figura 34. El mutante *upc2-1* es hipersensible a estrés oxidativo causado por menadiona. El crecimiento de la cepa silvestre y del mutante *upc2-1* fue monitorizada continuamente en medio YPD sólo o suplementado con 50 μ M de menadiona. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de 3 cultivos independientes para cada tiempo medido.

Además, el mutante *upc2-1* mostró una extrema sensibilidad a estrés osmótico y salino, siendo prácticamente incapaz de crecer en medio con concentraciones moderadas de NaCl o KCl (figura 35).

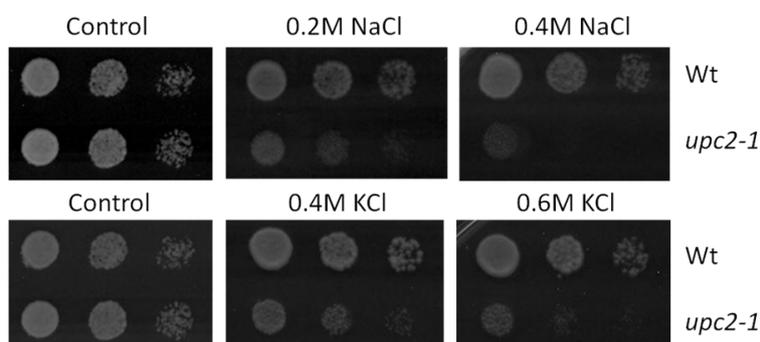


Figura 35. El mutante *upc2-1* es hipersensible a estrés salino y osmótico. El crecimiento de la cepa silvestre y del mutante *upc2-1* fue estudiado en placas con YPD sólo (control) o con la adición de las concentraciones de NaCl o KCl indicadas.

Por otra parte, se cuantificó la expresión de *ERG2* y *ERG11* en el mutante *upc2-1* y se observó que, en las células con el alelo mutante, ambos genes están expresados excesivamente de manera constitutiva e independiente del estrés salino (figura 36). El mismo experimento se llevó a cabo con estrés oxidativo, obteniendo un resultado muy similar.

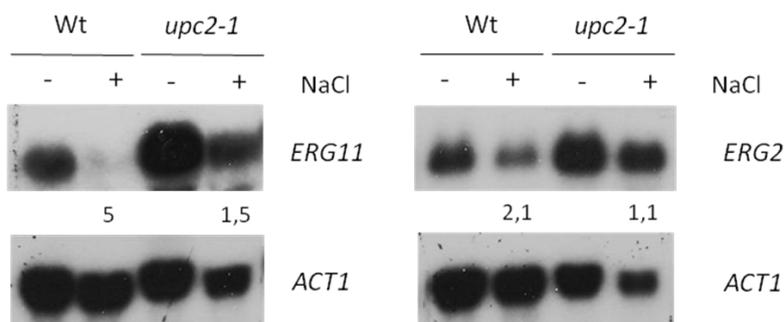


Figura 36. La expresión de *ERG2* y *ERG11* no responde a estrés salino en el mutante *upc2-1*. La expresión de *ERG2*, *ERG11* y *ACT1* se cuantificó mediante análisis Northern. La cepa silvestre y la cepa mutante *upc2-1* fueron crecidas en medio YPD y después sometidas a un choque osmótico (0.4M NaCl, 20 min). Los niveles de represión de los transcritos de *ERG2* y *ERG11* mostrados debajo de las exposiciones de los filtros fueron calculados como el cociente entre el mRNA normalizado por el mensajero de *ACT1* a tiempo 0 min y el mRNA normalizado a tiempo 20 min de estrés por sal.

Estos resultados muestran por tanto que la mutación *upc2-1* confiere una sobreexpresión de los genes *ERG* de manera constitutiva e independiente de estrés, lo cual resulta en una mayor acumulación de ergosterol y una severa susceptibilidad a estrés osmótico y oxidativo.

Para concluir este apartado, se incluyó un análisis de crecimiento de células mutantes *upc2-1*, capaces de tomar esteroides del medio en condiciones aeróbicas. De esta manera se puso en evidencia de forma directa que el contenido en ergosterol es clave para la resistencia a estrés. Como se observa en la figura 37, en condiciones de estrés osmótico y oxidativo (gráficos B y C), la susceptibilidad del mutante *upc2-1* se ve agravada por la adición exógena de ergosterol en medio mínimo.

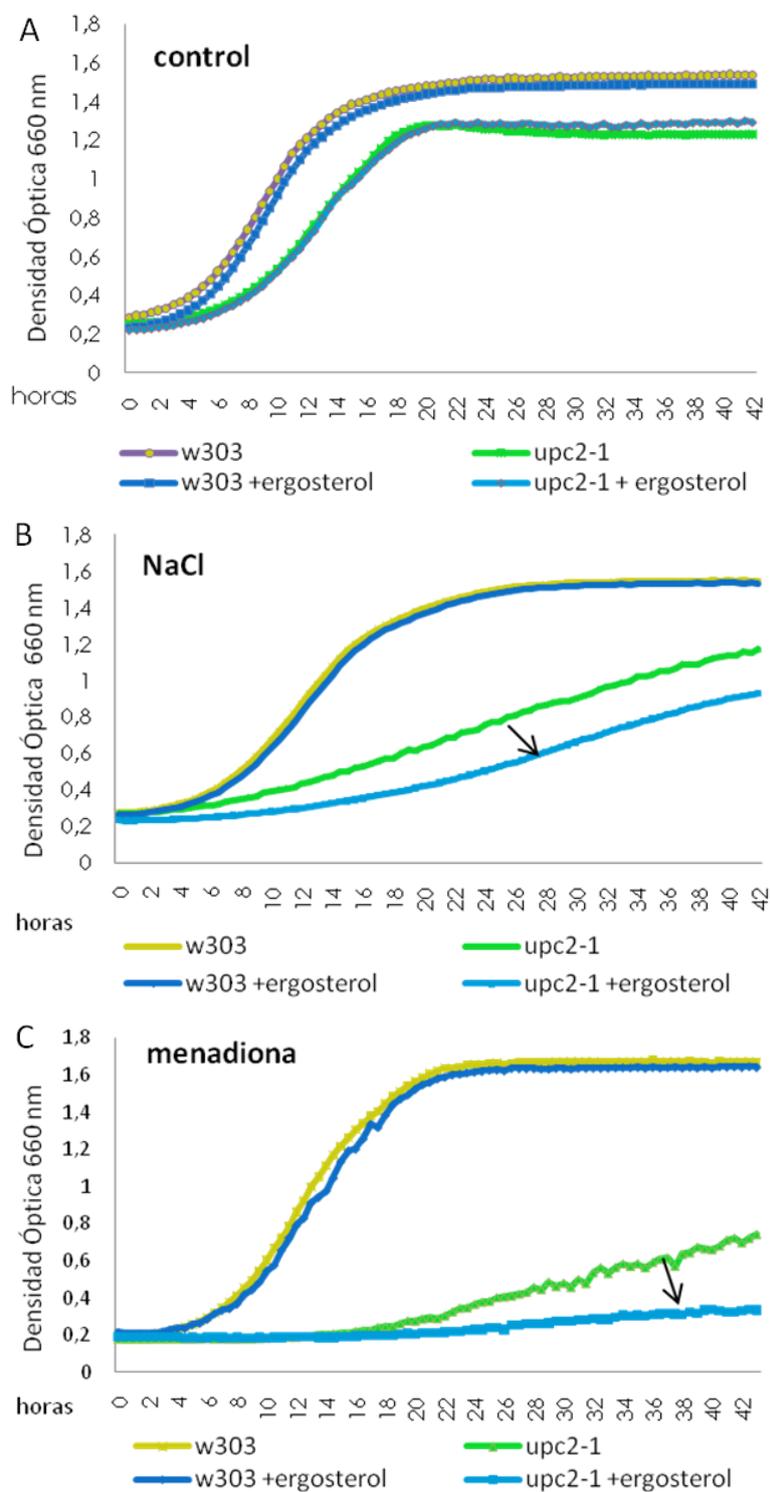


Figura 37. La adición exógena de ergosterol agrava la susceptibilidad de *upc2-1* a NaCl y menadiona. El crecimiento de la cepa silvestre W303-1A y del mutante *upc2-1* fue monitorizado continuamente en medio mínimo SD (A), SD con 0.8M NaCl (B) o SD con 50 μ M de menadiona (C). Las curvas de crecimiento reflejan los valores promedio de 3 cultivos independientes en cada condición.

8. Los mutantes *mot3rox1* y *upc2-1* también son hipersensibles a estrés causado por otros cationes tóxicos

Teniendo en cuenta que el ergosterol es el principal lípido de la membrana de *Saccharomyces* y su concentración puede afectar a la permeabilidad de ésta a cationes tóxicos y dado que tanto el doble mutante *mot3rox1* como el mutante simple *upc2-1* muestran respectivamente una moderada y severa sensibilidad a cloruro de sodio, se expandió el análisis fenotípico de sensibilidad a una batería de cationes tóxicos (cloruro de litio, cloruro de calcio, tetrametilamonio, norespermidina e higromicina B) con el fin de conocer su efecto en el crecimiento de los mutantes señalados.

En el caso del doble mutante *mot3rox1*, se observó hipersensibilidad a TMA y norespermidina (figura 38A y datos no mostrados) y una pronunciada inhibición del crecimiento producida por higromicina B (figura 38B) en comparación con la cepa silvestre.

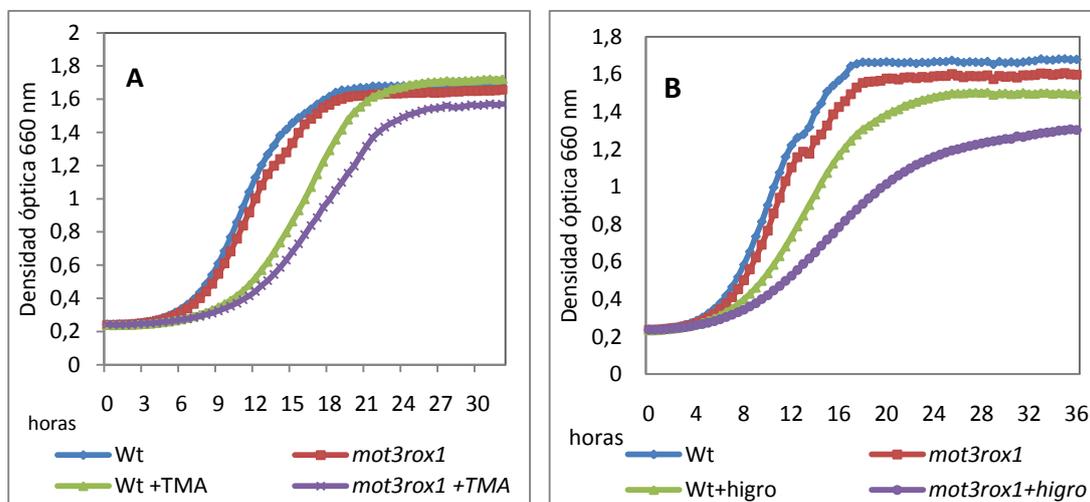


Figura 38. La pérdida de función de Mot3p y Rox1p causa sensibilidad a estrés por cationes tóxicos. El crecimiento de la cepa silvestre BY4741 y del mutante *mot3rox1* fue monitorizado continuamente en medio YPD sólo o en presencia de (A) 0.6M TMA y (B) 40 µg/ml Higromicina B. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de 3 cultivos independientes para cada tiempo medido.

Del mismo modo, se estudió la sensibilidad de *upc2-1* a cationes tóxicos y en concordancia con los resultados previamente obtenidos, se encontró una extrema sensibilidad de la células del mutante *upc2-1* a los cationes tóxicos TMA, Higromicina B, Li^+ y Ca^{2+} (figura 39A-D).

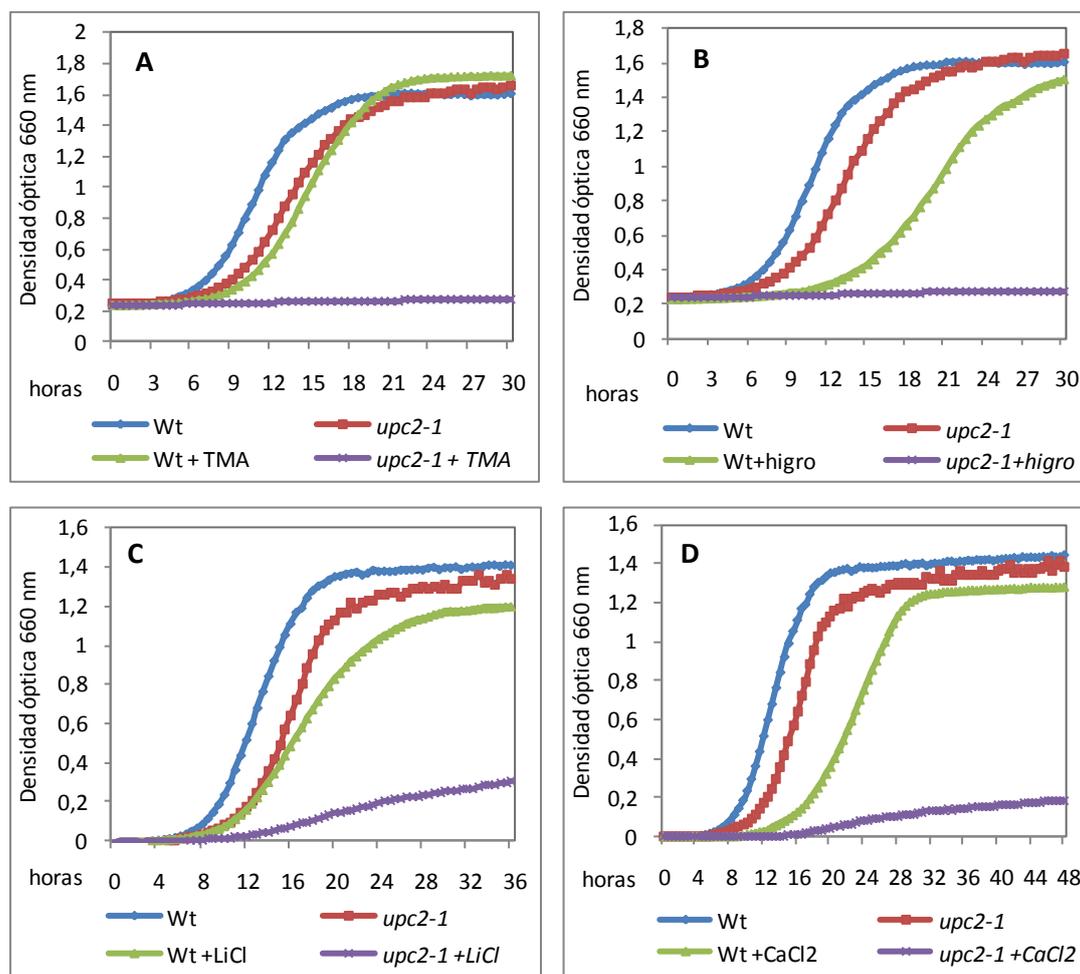


Figura 39. El mutante *upc2-1* es hipersensible a estrés por otros cationes tóxicos. El crecimiento de la cepa silvestre y del mutante *upc2-1* fue monitorizado continuamente en medio YPD sólo o en presencia de diferentes cationes tóxicos. Las concentraciones empleadas fueron: (A) 0.6M TMA, (B) 40 µg/ml Higromicina B, (C) 100 mM LiCl, (D) 200 mM CaCl₂. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de 3 cultivos independientes para cada tiempo medido.

9. La regulación del nivel de ergosterol en células de levadura es fisiológicamente relevante para la adaptación a estrés.

Hasta ahora se ha visto en los resultados presentados que la regulación de la biosíntesis de ergosterol es importante para la adaptación a estrés osmótico, oxidativo y a cationes tóxicos. Con el fin de comprobar definitivamente que las células de levadura deben reducir de manera necesaria su contenido en esteroides y que esta bajada es esencial para la resistencia a estrés se empleó inhibidores específicos de la ruta de biosíntesis de ergosterol -fluconazol y ketoconazol- para lograr, de este modo,

reducir artificialmente los niveles de ergosterol de las células. Se observó que tratamientos entre 2 y 4 horas con concentraciones moderadas de drogas provocan una pronunciada reducción del contenido en esteroides respecto a los niveles iniciales de las células sin tratar (figura 40). Es importante resaltar el hecho de que estos tratamientos no afectan a la tasa de crecimiento de las células de levadura.

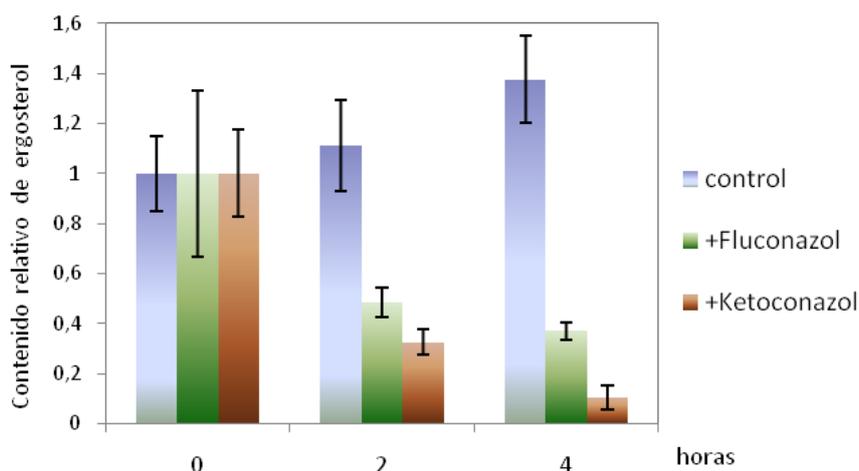


Figura 40. Efecto del tratamiento con fluconazol y ketoconazol sobre los niveles totales de ergosterol. Células de levadura silvestre (BY4741) fueron crecidas en medio YPD (control) y tratadas durante los tiempos indicados en medio YPD con 20 μ M fluconazol o 4 μ M de ketoconazol. El contenido celular de ergosterol fue determinado tal y como está descrito en experimentos anteriores.

La siguiente cuestión planteada fue si la sensibilidad a estrés observada en el mutante *mot3rox1* se debe a su incapacidad por reducir los niveles de ergosterol. Para resolverla, se procedió a averiguar si la inhibición directa de la biosíntesis de ergosterol mediante el empleo de las drogas fluconazol y ketoconazol alivia la inhibición del crecimiento causada por cationes tóxicos. Como se muestra en la figura 41, un tratamiento con ambos inhibidores de la biosíntesis de ergosterol aumenta considerablemente la resistencia de las células *mot3rox1* a higromicina B. Estos datos sugieren que la sensibilidad a estrés del doble mutante *mot3rox1* se debe a su contenido en esteroides elevado y no indirectamente a otros efectos mediados por Mot3p y Rox1p.

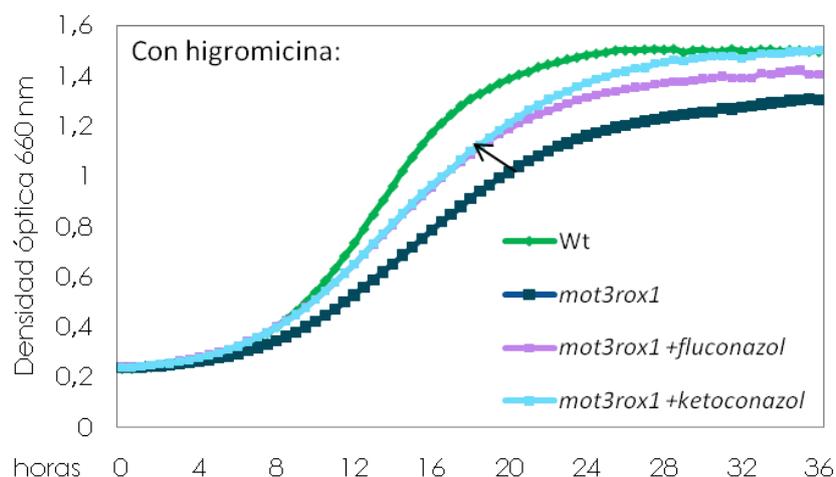


Figura 41. La hipersensibilidad de *mot3rox1* a higromicina B se atenúa con la inhibición de la biosíntesis de ergosterol. El crecimiento de la cepa silvestre BY4741 y el mutante *mot3rox1* fue monitorizado en medio YPD que contenía 40 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B. Justo antes del ensayo se trató las células durante 2 horas con 20 μM de fluconazol o 2 μM ketoconazol. Las curvas de crecimiento derivan del promedio de tres cultivos independientes para cada tiempo. La varianza entre triplicados es menor del 10%. El experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

En concordancia con este resultado, se observó en ensayos de crecimiento en medio sólido que el mutante *upc2-1* también mejora ligeramente su crecimiento en presencia de estrés por cloruro potásico y por los cationes tóxicos higromicina B y norespermidina cuando se trata a las células con dosis bajas de fluconazol (figura 42).

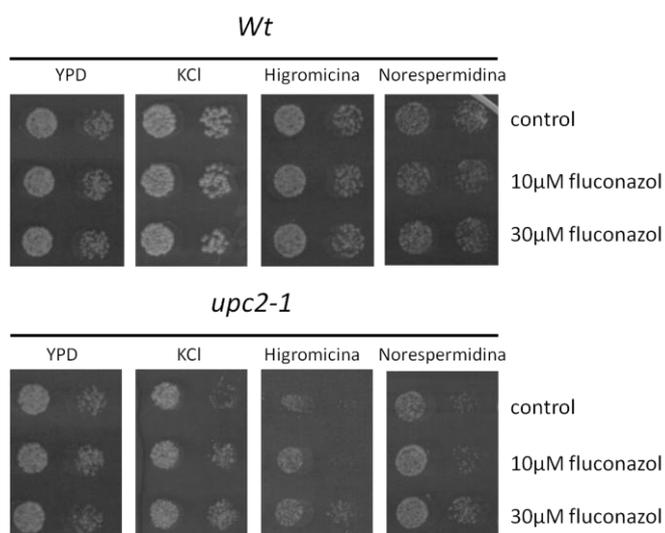


Figura 42. La sensibilidad del mutante *upc2-1* a cationes tóxicos se alivia mediante el tratamiento con fluconazol. Las células de levadura de la cepa silvestre y del mutante *upc2-1* fueron tratadas o no (control) con las concentraciones indicadas de fluconazol durante al menos 2 horas y después goteadas en placas de medio YPD agar con o sin 400mM KCl, 40 $\mu\text{g/ml}$ higromicina B o 1 mM norespermidina.

A continuación se estudió de forma más amplia si la reducción artificial de los niveles de esteroides en las células, provocada por el empleo de inhibidores específicos de la ruta de biosíntesis de ergosterol, afecta al crecimiento en condiciones de estrés osmótico y oxidativo.

En el caso de estrés osmótico, se utilizó una cepa silvestre y una cepa mutante *hog1*. La elección del mutante *hog1* se llevó a cabo para determinar si la inhibición de la ruta *ERG* en condiciones hiperosmóticas provocaba algún efecto en el crecimiento detectable en ausencia de la ruta HOG. Las células de la cepa silvestre, tratadas con fluconazol, se recuperaron más rápidamente del choque por NaCl, indicando que la inhibición de la síntesis de ergosterol confiere una ventaja en el crecimiento bajo alta salinidad. El efecto beneficioso del tratamiento con fluconazol para la tolerancia a NaCl se detectó también en la cepa mutante *hog1*, afectada en la actividad de la MAP quinasa Hog1p, la cual es responsable de la adaptación a estrés hiperosmótico (figura 43). Este resultado nos indicó que la correcta modulación del contenido de esteroides es un factor determinante para la adaptación a estrés en células de levadura.

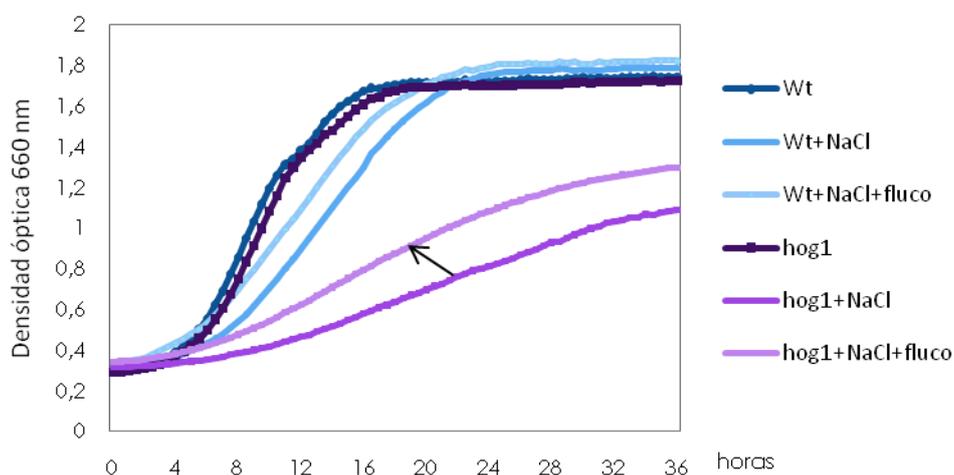


Figura 43. Efecto de la adición del azol fluconazol a la adaptación a estrés salino. La cepa de levadura silvestre BY4741 y la cepa mutante *hog1* fueron pretratadas durante 2 horas en medio YPD solo o con 20 μ M de fluconazol inmediatamente antes del ensayo de crecimiento con estrés salino. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de tres cultivos independientes para cada punto. La varianza entre triplicados es inferior al 10%.

Por ello se decidió emplear el mismo abordaje con estrés oxidativo. En este caso, se convino estudiar el efecto de la inhibición de la biosíntesis de ergosterol en el

crecimiento de los mutantes *yap1* y *skn7*. Los genes *YAP1* y *SKN7* codifican dos de los principales factores responsables de la respuesta transcripcional a estrés oxidativo (Beckhouse *et al.*, 2008; Brombacher *et al.*, 2006; He y Fassler, 2005; Lee *et al.*, 1999).

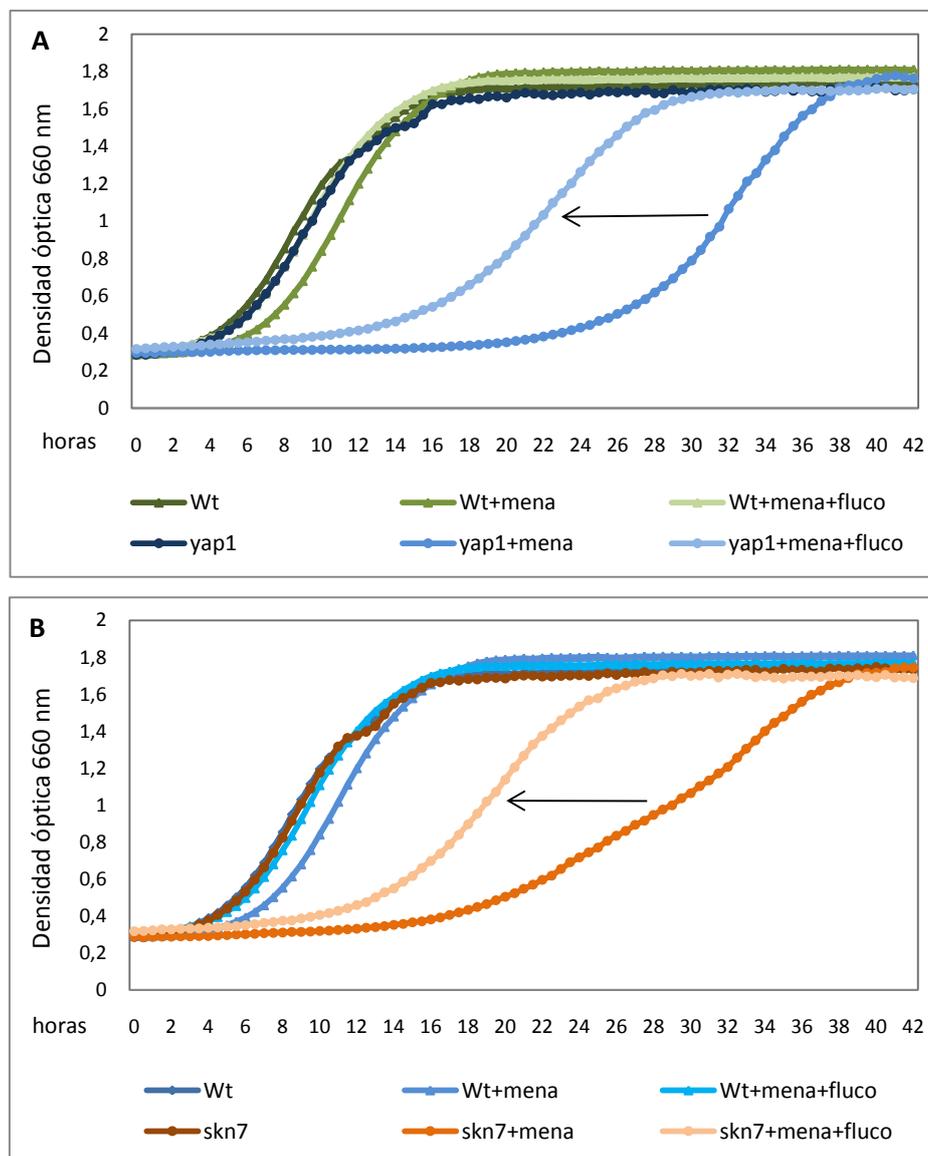
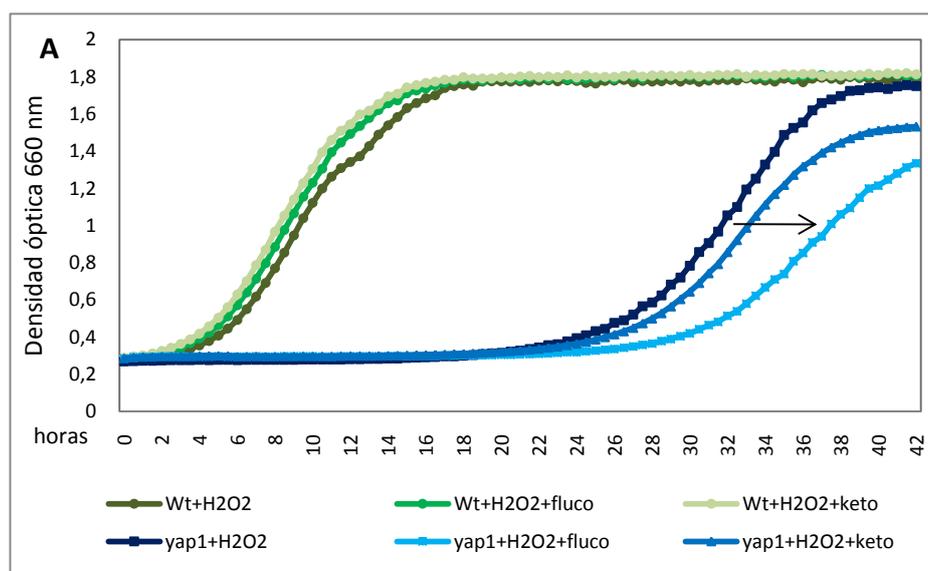


Figura 44. Efecto de la adición de fluconazol a la tolerancia a estrés oxidativo por menadiona. La cepa de levadura silvestre BY4741 y las cepas mutantes *yap1* (A) y *skn7* (B) fueron pretratadas durante 2 horas en medio YPD solo o con 30 μ M de fluconazol inmediatamente antes del ensayo de crecimiento en medio YPD o YPD con 50 μ M de menadiona. Las flechas azules indican la recuperación del crecimiento en las cepas mutantes. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de tres cultivos independientes para cada punto. La varianza entre triplicados es inferior al 10%.

Como se observa en la figura 44, una cepa de levadura silvestre tratada previamente con fluconazol y sometida después a estrés mediante el agente oxidativo menadiona recupera su crecimiento a los valores normales sin estrés. No obstante, el aumento de la tolerancia a menadiona fue extremadamente más visible en las cepas mutantes hipersensibles *yap1* y *skn7*, las cuales se adaptan al estrés mucho antes en presencia de la droga que sin la adición de la misma. Aunque mucho más suave, el mismo efecto positivo se observó en células de las cepas de levadura mutantes en *yap1* y *skn7* tratadas previamente con 2 μ M de ketoconazol, concentración suficiente para inhibir la biosíntesis de ergosterol sin reducir excesivamente sus niveles celulares y con un efecto similar al provocado con 20 μ M de fluconazol (datos no mostrados).

Por último se propuso averiguar si el efecto de los azoles sobre la tolerancia a estrés oxidativo es específico para el agente menadiona. Por tanto, se repitió el mismo experimento empleando como agente oxidativo peróxido de hidrógeno. Sorprendentemente, el pretratamiento de las células de levadura con las drogas fluconazol y ketoconazol no sólo no mejoró el crecimiento en presencia de H₂O₂, sino que al contrario que con menadiona, aumentó la susceptibilidad de las cepas *yap1* y *skn7* al estrés oxidativo (figura 45A-B).



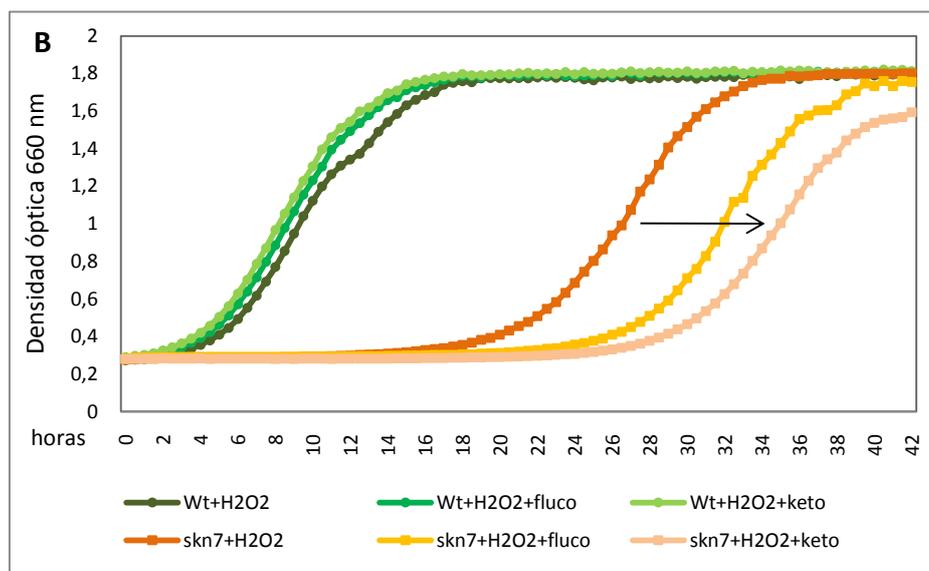


Figura 45. La adición de fluconazol y ketoconazol aumenta la susceptibilidad de las cepas mutantes *yap1* y *skn7* a estrés por H_2O_2 . La cepa silvestre BY4741 y las cepas mutantes *yap1* (A) y *skn7* (B) fueron pretratadas durante 2 horas en medio YPD solo, con $30\mu M$ de fluconazol o con $2\mu M$ de ketoconazol inmediatamente antes del ensayo de crecimiento en YPD o YPD con $2mM$ de H_2O_2 . Las flechas rojas indican el empeoramiento del crecimiento en las cepas mutantes. Las curvas de crecimiento derivan de los valores promedio de tres cultivos independientes para cada punto. La varianza entre triplicados es inferior al 10%.

Organización genómica de la respuesta transcripcional a estrés osmótico en levadura

En *Saccharomyces cerevisiae* existe una red de regulación transcripcional en respuesta a estrés osmótico

Localización genómica de los reguladores Hot1p y Mot3p bajo estrés osmótico (ChIP-Chip)

1. El análisis ChIP-Chip revela muy pocas regiones blanco de Hot1p *in vivo* a lo largo del genoma de levadura
2. La ocupación de regiones intergénicas por Hot1p coincide con una mayor expresión de los genes adyacentes
3. Hot1p regula a un discreto grupo de genes osmoinducibles
4. El análisis de los promotores blanco de Hot1p sugiere un nuevo sitio consenso de unión al DNA
5. Mot3p se une *in vivo* tanto a promotores de genes inducidos como reprimidos por estrés osmótico
6. La unión de Mot3p a promotores podría requerir la presencia de otros factores adicionales

Localización genómica del regulador Smp1p bajo estrés osmótico (ChIP-Seq)

En *Saccharomyces cerevisiae* existe una red de regulación transcripcional en respuesta a estrés osmótico

Para llegar a comprender cómo se organiza a nivel genómico la respuesta transcripcional a un estrés dado es preciso conocer los reguladores que participan en el proceso y su contribución específica. Bajo estrés osmótico, la MAP quinasa Hog1p tiene un papel principal en la adaptación, lo cual se refleja por el hecho de que la mutación del gen *HOG1* resulta en la incapacidad de las células de levadura de montar una respuesta a estrés apropiada, siendo además el mutante *hog1* altamente osmosensible (Hohmann, 2002; Westfall *et al.*, 2004). Sin embargo, si comparamos las cinéticas de crecimiento de una cepa silvestre con aquellas en las que se ha suprimido la función de uno de los factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés osmótico, no se observa generalmente un defecto en el crecimiento en medio hipersalino (apéndice 2, Datos Suplementarios). Además, estos factores de transcripción tienen una limitada contribución a la regulación génica y no pueden por sí solos explicar la totalidad de la regulación génica bajo estrés osmótico, hecho que sugiere la presencia de otros reguladores en los promotores de los genes que responden a estrés. Dicho de otro modo, existe en levadura una red de regulación transcripcional relativamente compleja que opera en respuesta al estrés.

En la primera parte de resultados se ha comprobado el enorme potencial que nos ofrecen las nuevas herramientas genómicas para descifrar las redes de regulación transcripcional. Concretamente, se ha puesto de manifiesto la existencia de una cascada de regulación a través de Hog1p y del factor de transcripción Sko1p que regula la biosíntesis de uno de los componentes de la membrana plasmática, el ergosterol, tras un cambio en las condiciones osmóticas del medio. Sin embargo, actualmente seguimos disponiendo de una visión limitada e incompleta de la estructura y función de la red de regulación transcripcional (figura 46). Por este motivo, se decidió incluir en este trabajo nuevos análisis de localización genómica de otros factores distintos a Sko1p para así trazar una red de regulación más detallada del complejo programa transcripcional frente a estrés osmótico.

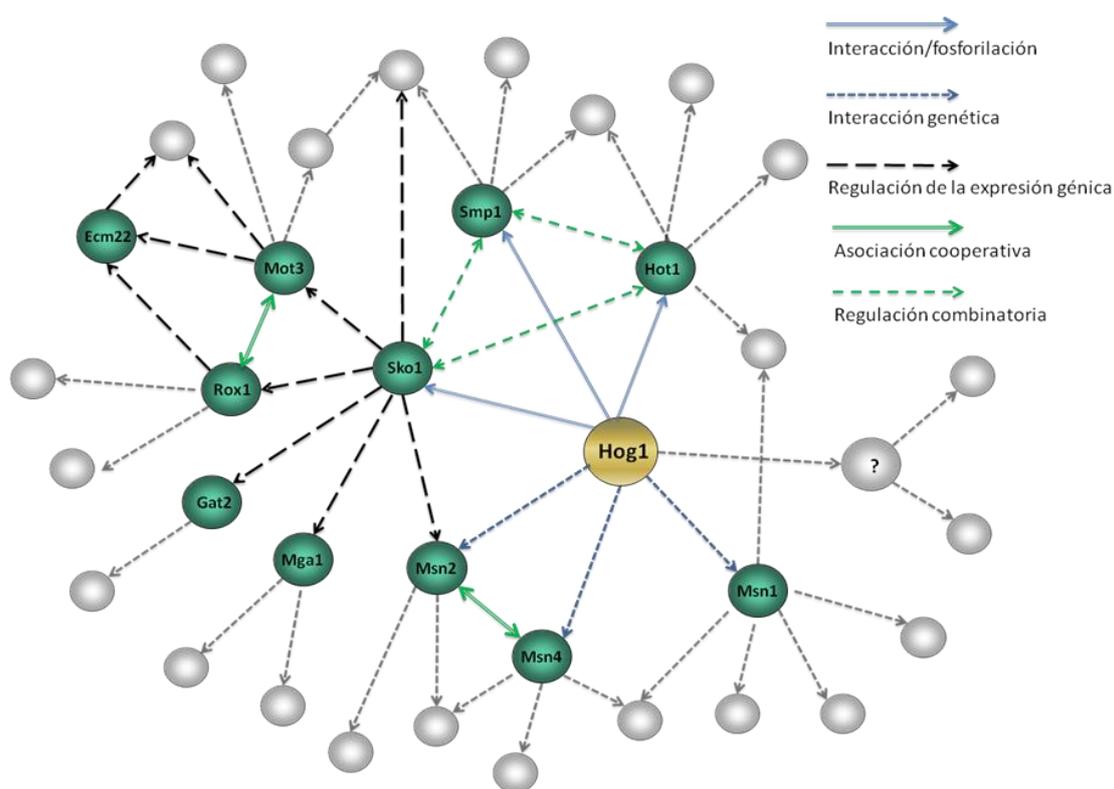


Figura 46. Módulo incompleto dentro de la compleja red de regulación transcripcional bajo estrés osmótico. Figuración simplificada del módulo de respuesta a estrés osmótico centrado en la MAP quinasa Hog1p (círculo ocre) y basado en los datos ChIP-Chip emergentes y otros datos experimentales conocidos hasta el momento. Las flechas que parten de Hog1p muestran interacciones directas y genéticas con factores de transcripción (círculos verdes). Las flechas que parten de los factores de transcripción representan su función como reguladores de la expresión génica, interacciones cooperativas entre ellos o la regulación combinatoria de varios factores de transcripción en un mismo *locus*. Los círculos y flechas grises representan otros blancos en el genoma de los factores de transcripción que operan bajo estrés osmótico. Por último, el círculo gris con un interrogante sugiere la existencia de otros factores de transcripción que podrían actuar bajo el control de HOG y/o Hog1p.

En la figura 47, se detalla mediante un diagrama de flujo, el diseño experimental que debe ser llevado a cabo para cumplir este objetivo. Para investigar la unión de los factores de transcripción a secuencias concretas a lo largo de todo el genoma de levadura, fue necesario construir primero cepas de levadura en las que cada factor de interés estuviera fusionado a un epitopo myc o HA en su extremo carboxilo terminal, permitiendo así la expresión de las proteínas etiquetadas a niveles fisiológicos. La correcta inserción de los epitopos y la expresión de las proteínas fue confirmada mediante PCR y análisis inmunoquímico, tal y como se detalla en la sección Materiales y Métodos. Además, dado que la introducción de un epitopo podría afectar la función de algunos reguladores transcripcionales y que los ensayos de localización genómica

involucran muchos pasos que podrían influenciar la señal final, fue crítico validar el material inmunoprecipitado en regiones genómicas control en aquellos casos en los que se conocía la ocupación de la proteína en cuestión (apéndice 4, Datos Suplementarios).

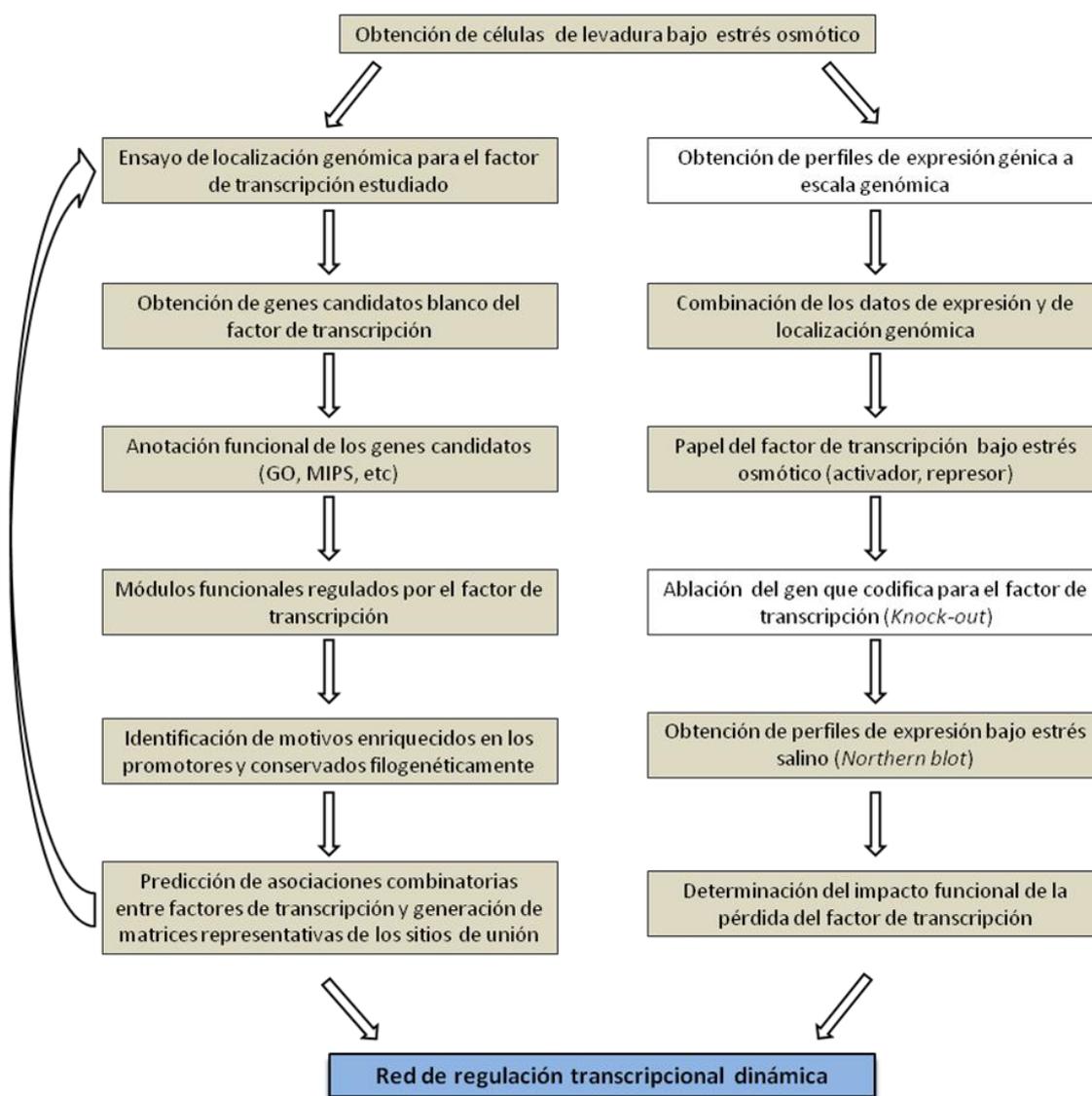


Figura 47. Aproximaciones complementarias para descifrar la compleja red de regulación transcripcional que opera bajo estrés osmótico. Las cajas de color indican las aproximaciones experimentales realizadas en este trabajo para conocer con mayor detalle la red de regulación que opera bajo estrés osmótico. Las cajas sin color indican que la obtención de los datos de expresión (Ni *et al.*, 2009) y de las mutaciones específicas no han sido fruto de este trabajo, aunque sí su análisis posterior. La dirección de las flechas sugiere el orden en el que han sido llevados a cabo los experimentos.

Localización genómica de los reguladores Hot1p y Mot3p bajo estrés osmótico (ChIP-Chip)

Previo a este trabajo de investigación, se llevaron a cabo ensayos de localización genómica mediante ChIP-Chip sobre el factor de transcripción Sko1p y sobre la MAP quinasa Hog1p (Pascual-Ahuir *et al.*, 2006; Proft *et al.*, 2005), hibridando el material inmunoprecipitado sobre chips de DNA que contenían todas las regiones intergénicas del genoma nuclear de levadura. Ambos estudios proporcionaron información valiosa, siendo muchos de los datos presentados validados posteriormente mediante análisis más dirigidos. Sin embargo, la técnica empleada presenta algunas limitaciones (al menos teóricas), dado que sólo es capaz de mostrar un dato para cada región intergénica. Además, los valores de unión positivos se calculan como aquellos con valor más alto al realizar el cociente entre la intensidad de fluorescencia de las muestras IP y CT para cada región intergénica.

En el análisis de localización genómica de Hot1p y de Mot3p, se ha empleado la misma técnica de inmunoprecipitación de cromatina seguida de hibridación de las muestras en una micromatriz de DNA con la peculiaridad de que ésta no contenía sondas que cubren las regiones intergénicas de levadura, sino una alta densidad de oligonucleótidos de 25pb a lo largo de todo el genoma de levadura (*ChIP-Chip on tiling arrays*). Este método permite un aumento considerable del número de datos y la precisión del experimento (figura 48). Además, permitió en nuestro trabajo obtener exactamente la región de unión y posicionar las señales de hibridación IP/CT.

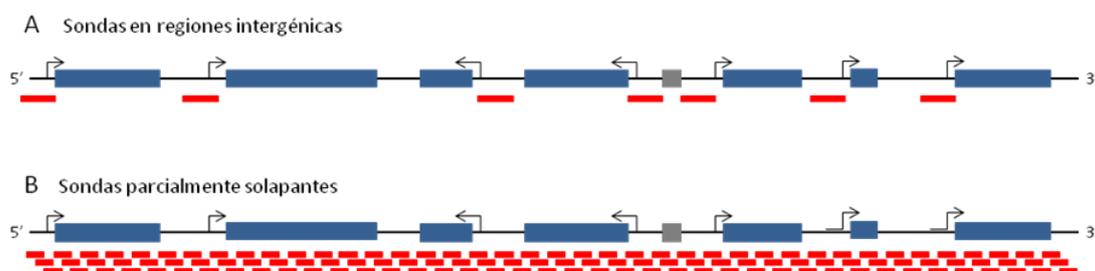


Figura 48. Comparación entre plataformas de hibridación en ensayos ChIP-Chip. Utilización de A) chips con sondas largas intergénicas. B) chips con sondas cortas y solapantes (“tiling arrays”).

1. El análisis ChIP-Chip revela muy pocas regiones blanco de Hot1p *in vivo* a lo largo del genoma de levadura

Para definir los blancos del factor de transcripción Hot1p, se llevó a cabo una inmunoprecipitación de cromatina de una cepa Hot1-(myc)₉ en crecimiento exponencial en medio rico con 0.4M NaCl durante 5 minutos. Las muestras de cromatina fragmentada total e inmunoprecipitada de 2 experimentos independientes fueron amplificadas e hibridadas en micromatrices, se calculó el ratio de fluorescencia entre las muestras IP y CT y se comparó con los valores de la cepa silvestre sin etiquetar. Aunque se observó enriquecimiento tanto en regiones intergénicas como en los ORF adyacentes, la proporción fue del 70% frente a sólo el 30%, por lo que se decidió estudiar las señales en los promotores. De este modo se realizó un listado preliminar de las regiones intergénicas a las que posiblemente se une Hot1p (figura 49).

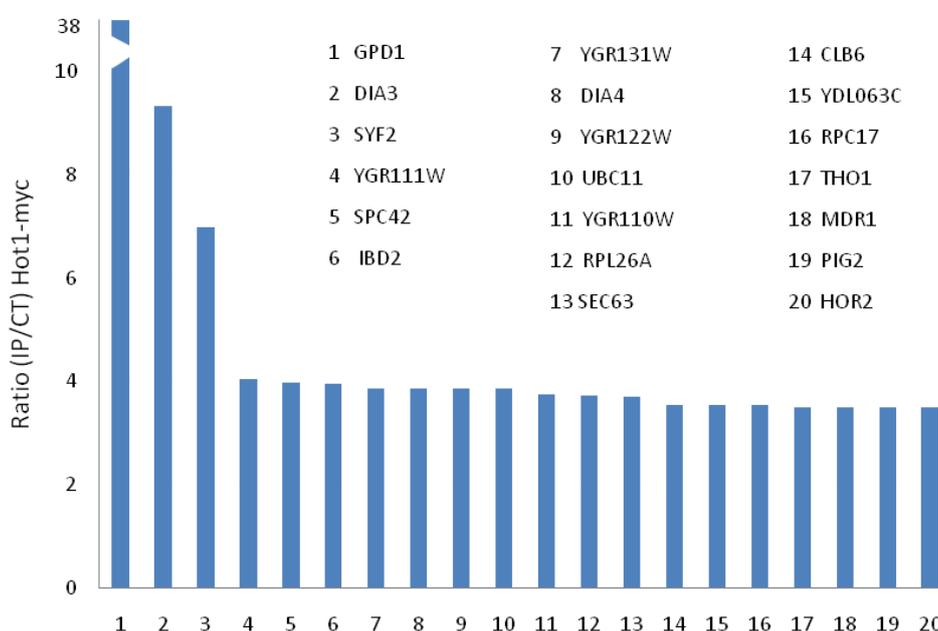


Figura 49. Ocupación *in vivo* de Hot1p en varias regiones intergénicas. Los datos de enriquecimiento fueron medidos como el cociente entre los ratios IP/CT de 2 muestras independientes de la cepa Hot1-myc y los ratios de la cepa control W303 sin etiquetar. Se muestran las 20 regiones con mayor ocupación.

El análisis de los datos reveló que Hot1p se une fuertemente a muy pocas regiones intergénicas, siendo con diferencia el promotor de *GPD1* la región más enriquecida.

Localización Cromosoma	Inicio señal	Final Señal	MAT Score	Tasa cambio	Tasa FDR(%)	-10log10 Pvalue	Gen Candidato
chr4	410918	411447	18,47	38,4	0	753,96	<i>GPD1</i>
chr4	410420	410894	9,32	9,32	23,08	202,75	<i>DIA3</i>
chr7	749644	749875	8,16	6,98	23,08	158,46	<i>SYF2</i>
chr7	750075	750223	5,97	3,46	78,95	90,04	<i>UTP8</i>
chr7	713556	713684	5,94	3,74	78,95	89,16	<i>YGR110W</i>
chr5	281205	281336	5,66	3,5	90,48	81,84	<i>THO1</i>
chr4	1412041	1412202	5,44	2,75	66,67	76,4	<i>SNF1</i>
chr12	677160	677284	5,41	3,36	57,14	75,86	<i>BOP2</i>
chr7	754572	754704	5,32	3,87	57,14	73,63	<i>FHN1</i>
chr4	1507009	1507129	5,23	3,07	58,14	71,53	<i>STL1</i>
chr5	281001	281204	5,09	3,49	64	68,11	<i>HOR2</i>
chr11	357600	357705	4,87	3,98	48,48	63,35	<i>SPC42</i>
chr7	689961	690191	4,81	3,5	46,48	61,96	<i>MDR1</i>
chr4	413221	413353	4,8	3,36	46,48	61,75	<i>GPM2</i>
chr7	715706	715826	4,78	4,03	44,74	61,3	<i>YGR111W</i>
chr12	772590	772710	4,75	2,73	37,63	60,64	<i>BUD6</i>
chr7	707109	707236	4,74	3,55	37,63	60,46	<i>CLB6</i>
chr12	1001813	1001938	4,74	3,04	37,63	60,54	<i>IMD3</i>
chr12	1001813	1001938	4,74	3,04	37,63	60,54	<i>ATG23</i>
chr8	502120	502231	4,73	2,74	37,63	60,23	<i>YHR202W</i>

Tabla 7. Genes candidatos a ser blanco del factor de transcripción Hot1p bajo estrés osmótico.

Se muestran las 20 regiones más enriquecidas según valor MATScore. El color verde hace referencia a aquellos genes adyacentes cuya expresión aumenta bajo estrés osmótico (Ni *et al.*, 2009), siendo la intensidad del color indicativa de un valor de osmoinducibilidad creciente (>2, >3, >10 veces).

A continuación se analizaron estadísticamente los datos mediante el algoritmo MAT, lo cual proporcionó información adicional acerca de las regiones con mayor valor MATscore, así como el porcentaje de falsos positivos y los valores p-value. En base a este análisis se agruparon de nuevo los datos, llegando así a obtener una nueva lista de promotores candidatos del factor de transcripción Hot1p. Entre ellos, se seleccionaron

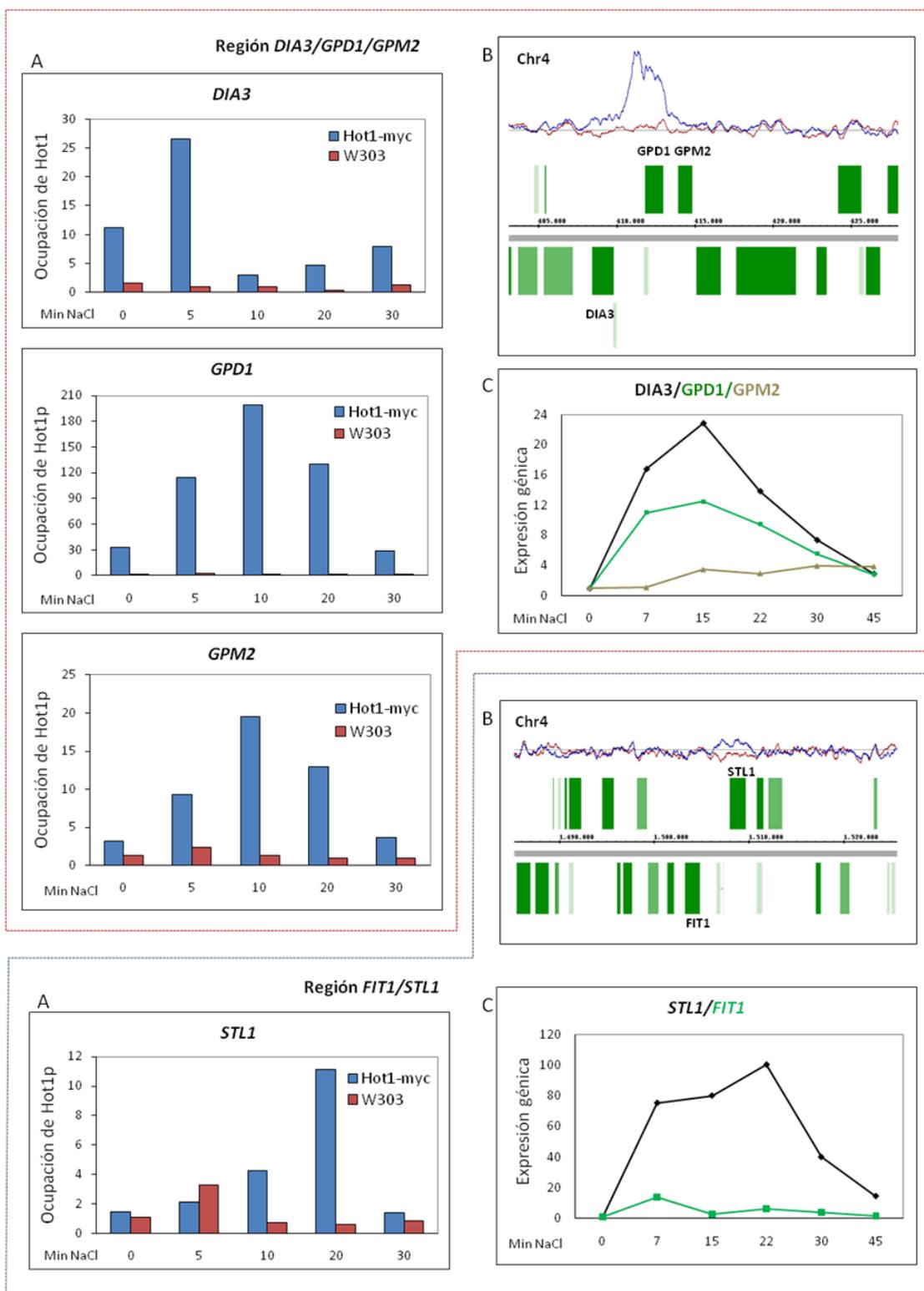
las 20 regiones con mayor valor MATscore para ser analizadas mediante ensayos ChIP directos (tabla 7). La lista completa de regiones putativas a ser blanco del activador Hot1p puede revisarse en el apéndice 5 de la sección de Datos Suplementarios.

Entre los posibles blancos de Hot1p se encuentran *GPD1*, *HOR2 (GPP2)*, *GPM2* y *STL1*, involucrados en la biosíntesis y transporte de glicerol durante el estrés osmótico. *GPD1/DIA3* o *STL1/FIT1* son ejemplos de genes osmoinducibles que se transcriben divergentemente. Por último, otro grupo de genes no responden a estrés osmótico. Por ello, se propuso verificar mediante análisis ChIP la unión de Hot1p a estos promotores de genes tanto inducibles como de expresión constitutiva y su posible papel en ellos.

2. La ocupación de regiones intergénicas por Hot1p coincide con una mayor expresión de los genes adyacentes

El análisis directo mediante ChIP *in vivo* de las 20 regiones enriquecidas con MAT Score más alto confirmó la ocupación del factor Hot1p en los promotores con mayor señal según el análisis genómico mediante ChIP-Chip. Los niveles de ocupación en cada región se compararon con los de una región interna del gen *POL1*, a la que Hot1p no se une.

Como puede observarse en la figura 50, el estudio no se limitó a una medida de tiempo concreta, sino que se comparó las cinéticas de unión a lo largo de un choque osmótico de 30 minutos. La razón se debe a que la unión de factores de transcripción puede ser muy transitoria en condiciones de estrés. Dichas cinéticas se llevaron a cabo tanto en células con Hot1p etiquetada con epitopos myc como en la cepa control W303-1A sin etiquetar. De esta forma, se descartó la posible presencia de regiones enriquecidas no específicamente.



.../...

.../...

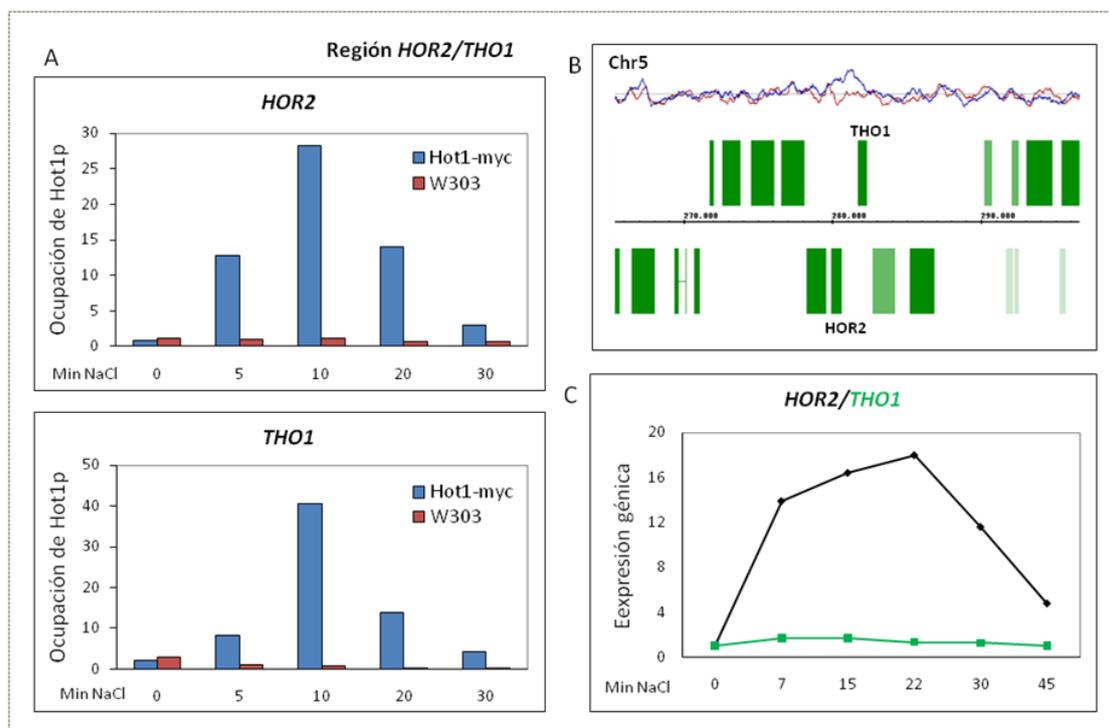


Figura 50. Regiones confirmadas blanco del factor de transcripción Hot1p. A) Para cada región intergénica se muestra la cinética de unión de Hot1p bajo estrés osmótico (0.4M NaCl). Los datos fueron obtenidos mediante ChIP y PCR cuantitativa en tiempo real en una cepa con el factor fusionado a epitopos myc y en la cepa control sin etiquetar. Las posiciones de los oligonucleótidos diseñados puede consultarse en el apéndice 1 de Datos Suplementarios. A la derecha se muestran los perfiles de expresión génica de los genes adyacentes (Ni *et al.*, 2009) tras un choque osmótico con 0.6M NaCl (B) y la visualización de los señales de unión del ensayo ChIP-Chip con el programa Integrated Genome Browser junto con la organización cromosómica de la región estudiada(C).

Además, se incluyó en el análisis la comparación con los perfiles de expresión de los genes candidatos en condiciones similares de estrés osmótico (0.6M NaCl) publicadas recientemente (Ni *et al.*, 2009). De este modo se discriminó los candidatos dudosos (aquellos que mostraron un enriquecimiento muy débil) y falsos positivos de aquellos en los que sí se demostró un elevado grado de ocupación de Hot1p. Este grupo de verdaderos blancos de Hot1p está compuesto por los promotores de *GPD1/DIA3*, *HOR2/THO1*, *STL1*, *GPM2* y las regiones dudosas corresponden a las de *YGR110W* y *CLB6* (apéndice 5, sección Datos Suplementarios). La mayoría de blancos mostraron una estrecha correlación entre la información de unión y la inducción génica de los genes adyacentes. Así, un rápido y transitorio aumento en la unión coincidió con un

patrón de inducción génica muy similar (figura 50), a excepción de *THO1*, donde la unión de Hot1p en sus promotores no coincide con una mayor expresión bajo estrés osmótico.

Por otra parte, en otro grupo de regiones no se pudo comprobar una unión significativa de Hot1p mediante PCR cuantitativa. Entre ellas se encuentran los promotores de los genes *FHN1*, *YGR111W* y *BOP2*, que por el contrario sí muestran una cierta inducción bajo estrés osmótico (entre 3 y 5 veces) y cuya regulación podría ser explicada por la presencia en los promotores de otros factores de transcripción no identificados. No obstante, no se descarta la posibilidad de que no se estudiara la región exacta donde se une Hot1p o que simplemente los datos de inducción, no muy elevados, sean un artefacto del experimento. El resto de las regiones analizadas fueron directamente anotadas como falsos positivos, ya que no se detectó unión de Hot1p y los genes adyacentes tampoco se inducen por estrés osmótico. El análisis completo de los candidatos anotados como dudosos y de los falsos positivos puede revisarse en el apéndice 5 de la sección Datos Suplementarios.

3. Hot1p regula a un discreto grupo de genes osmoinducibles

Los experimentos ChIP-Chip muestran la unión física de un factor de transcripción al DNA, pero no determinan el papel que tiene el factor en la regulación de la expresión génica. Esto es problemático en promotores compartidos por genes divergentes, como en el caso de Hot1p lo son los genes *DIA3/GPD1* y *HOR2/THO1*, comprobados por ChIP en el apartado anterior. En el análisis se excluyó a *FIT1*, ya que su sitio de inicio de la traducción dista más de 3 kb del correspondiente para *STL1* y la señal obtenida por ChIP está a menos de 1 kb desde el codón de iniciación de este último.

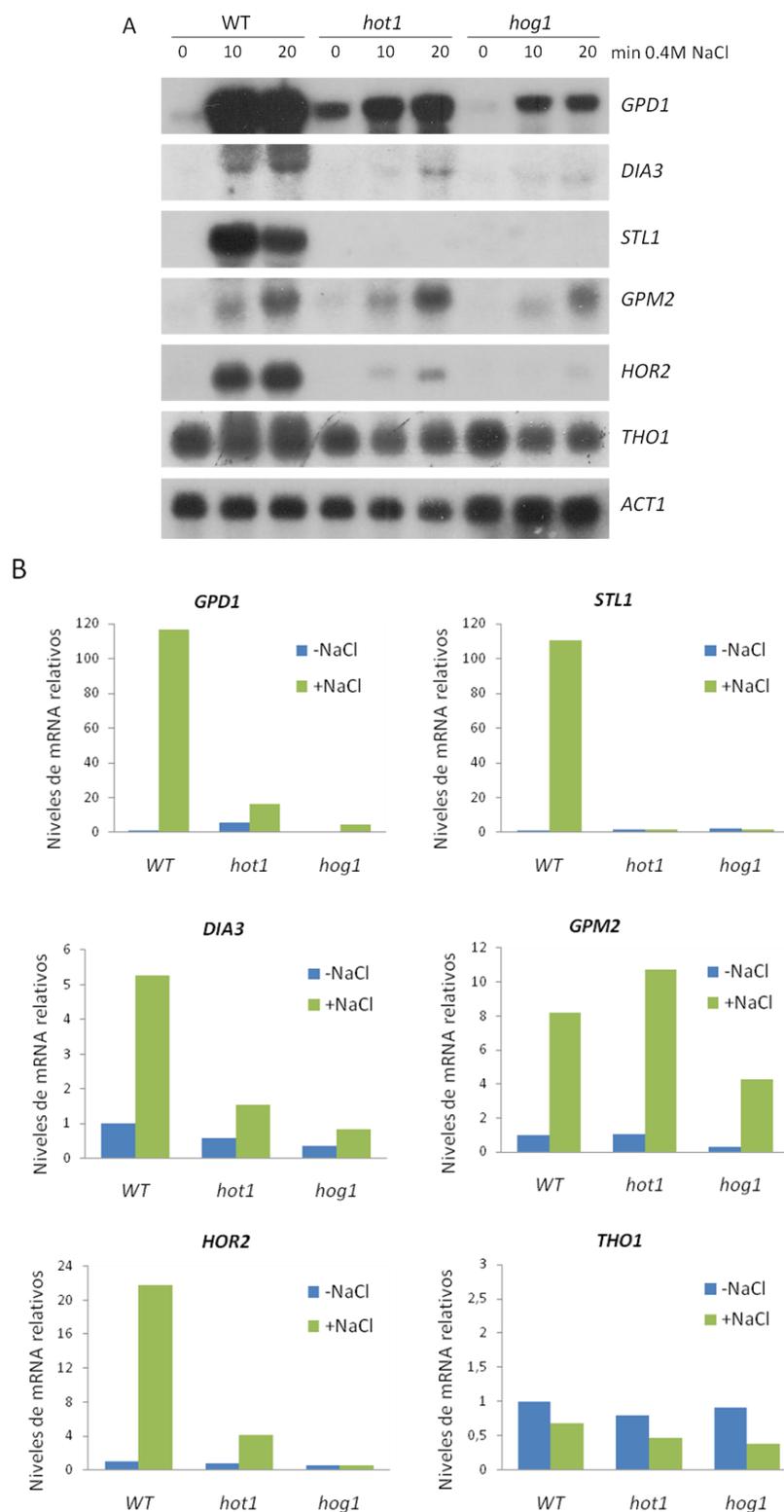


Figura 51. Hot1p regula la expresión osmoinducible de *GPD1*, *DIA3*, *STL1* y *HOR2*. A) Análisis Northern de los niveles de mRNA bajo condiciones normales de crecimiento y con estrés osmótico (0.4M NaCl durante 10 y 20 minutos) en la cepa silvestre BY4741 y en las cepas mutantes $\Delta hot1$ y $\Delta hog1$. B) Los niveles de transcrito de los 6 blancos confirmados del factor de transcripción Hot1p se compararon con los del control *ACT1* antes y después del choque osmótico.

Tras la detección de sólo 4 regiones intergénicas en todo el genoma de levadura a las cuales se une significativamente Hot1p, se decidió determinar por *Northern* el papel regulador de Hot1p y estudiar cómo afecta la pérdida de función del regulador a la expresión de los genes adyacentes tras el choque osmótico. Como se muestra en la figura 51, la pérdida del regulador Hot1p, así como la de Hog1p, afectó a la inducción de los genes *GPD1*, *DIA3* y *HOR2*. Sin embargo, la inducción de *GPM2* apenas se vio afectada en la cepa mutante *hot1*, lo cual sugiere que otros factores contribuyen a la regulación de su expresión. Por último, se comprobó que aunque Hot1p se une a la región intergénica compartida por *HOR2* y *THO1*, sólo afecta a la expresión del primero, siendo los niveles de transcrito de *THO1* prácticamente inalterados antes y después del choque osmótico.

4. El análisis de los promotores blanco de Hot1p sugiere un nuevo sitio consenso de unión al DNA.

Hasta el momento no se ha identificado la secuencia consenso a la cual se asocia el factor de transcripción Hot1p para regular sus pocos blancos en el genoma. Con este fin, se buscó dicho motivo entre las regiones intergénicas confirmadas mediante la herramienta “consensus” del paquete RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>), obteniéndose un motivo de 10 nucleótidos CG(T/C)(A/C)TTGGC, así como su localización en los promotores (figura 52).

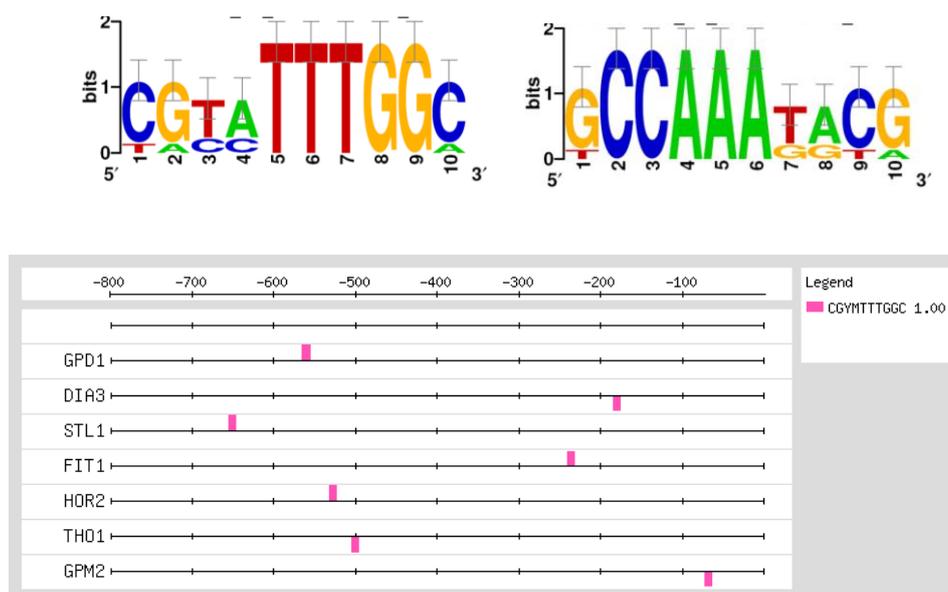


Figura 52. Motivo consenso para el sitio de unión de Hot1p y localización en los promotores de los blancos más robustos. Aunque la búsqueda se realizó en los promotores de 7 genes, el sitio encontrado en la región compartida por HOR2/THO1 es el mismo.

Además, se buscó el motivo en las regiones intergénicas (1000 nucleótidos antes del codón de iniciación) a lo largo de todo el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. La búsqueda exacta del motivo encontró tan sólo 23 regiones entre las aproximadamente 6000 regiones intergénicas, cifra que probablemente no resultaría si la distribución del motivo fuera simplemente al azar. Por otra parte, la distancia media de los motivos al codón ATG es de 449 pares de bases, posición que sí es esperada al azar pero que no está considerablemente alejada de los sitios de unión típicos en levadura. Además, no se encontró el motivo ni antes de los 100 nucleótidos anteriores al ATG, cerca de la caja TATA, ni después de los 700 nucleótidos, en regiones más alejadas (figura 53).



Figura 53. Presencia del motivo CGYMTTGGC en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestra el resultado de la búsqueda del motivo consenso en la totalidad de las regiones intergénicas de levadura. 6 de los 23 genes adyacentes encontrados comparten promotor (*SFT2/RTG3*, *HOR2/THO1*, *GAT1/FRS2*). La distribución de las distancias desde el codón de iniciación ATG muestra un enriquecimiento del motivo en las regiones comprendidas entre -121 y -656pb. La inclusión de una sustitución en la secuencia consenso sólo afectó al número de motivos encontrados en el promotor compartido por *GAT1/FRS2* (de 1 a 3 motivos).

Aunque se desconoce si los motivos encontrados tienen un significado funcional, se estudió si están conservados filogenéticamente. Para ello se tomó *Saccharomyces* como taxón de referencia y se estudiaron 7 organismos estrechamente relacionados (*S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* y *S. castellii*). La mayoría de los motivos resultaron estar conservados evolutivamente, a excepción de los situados en los promotores de *FIT1* y *GPM2* (figura 54).



Figura 54. Alineamiento de los sitios de unión putativos para Hot1p conservados en especies de *Saccharomyces* relacionadas. La búsqueda del motivo consenso se realizó en los promotores de los genes *GPD1*, *STL1*, *FIT1*, *HOR2*, *THO1* y *GPM2*. El gen *DIA3*, que comparte promotor con *GPD1*, no está conservado en otras especies de *Saccharomyces*. Las líneas truncadas corresponden a regiones codificantes adyacentes y no a los promotores.

En resumen, los experimentos ChIP-Chip y ChIP dirigidos sobre Hot1p han revelado que el factor de transcripción se une a las regiones compartidas por *GPD1/DIA3* y *HOR2/THO1*, así como a los promotores de *GPM2* y *STL1*. Análisis de expresión al nivel de mRNAs han confirmado que Hot1p regula la expresión de *GPD1*, *DIA3*, *STL1* y *HOR2*, genes que además contienen sitios consenso conservados.

5. Mot3p se une *in vivo* tanto a promotores de genes inducidos como reprimidos por estrés osmótico

Aunque Hot1p se une a muy pocas regiones en el genoma de levadura, no sucede lo mismo con todos los factores de transcripción que actúan bajo la ruta HOG. Concretamente, Sko1p tiene más de 40 promotores blanco (Ni *et al.*, 2009; Proft *et al.*, 2005), entre los que se encuentran genes que codifican otros factores de transcripción, como Mot3p y Rox1p, que como se ha comprobado en la primera parte de resultados, tienen un papel importante en la respuesta a estrés osmótico. Por ello el siguiente análisis de localización genómica se realizó sobre el factor de transcripción Mot3p, tal y como se ha descrito para Hot1p. En la tabla 8 se muestra la lista de promotores candidatos más robustos a ser blanco de este regulador.

Un primer análisis de las regiones candidatas a ser blanco de Hot1p mostró que más de la mitad de los genes adyacentes responden a estrés osmótico. Sin embargo, Mot3p se une presumiblemente tanto a genes inducidos como reprimidos, indicando que podría tener un papel tanto positivo como negativo en la expresión génica. Aunque Mot3p ha sido comúnmente descrito como un represor (Hongay *et al.*, 2002; Kastaniotis *et al.*, 2000; Klinkenberg *et al.*, 2005), también ha sido propuesto como activador de algunos genes involucrados en atenuar la actividad de la ruta de respuesta a feromonas o de *CWP2*, que codifica una de las principales proteínas que estabilizan la pared celular (Abramova *et al.*, 2001; Grishin *et al.*, 1998). Este tipo de regulación de la expresión génica en sentidos opuestos por un mismo factor de transcripción se ha observado previamente, tanto en células de levadura como en humanos (Larochelle *et al.*, 2006; Martone *et al.*, 2003; Theodorou *et al.*, 2009).

Entre los promotores candidatos, se encuentra el del gen *ECM22*, regulado bajo estrés osmótico por Mot3p, como se ha comprobado en la primera parte de la sección Resultados. Otros genes candidatos y que pueden estar relacionados con la regulación de la biosíntesis y transporte de ergosterol de modo dependiente de Mot3p son *GRE2*, *PAU11*, *YGR131W* y *TOS6* (Bammert y Fostel, 2000; Luo y van Vuuren, 2009; Warringer y Blomberg, 2006; Wilcox *et al.*, 2002).

Localización Cromosoma	MAT Score	Tasa Cambio	Tasa FDR(%)	-10log10 Pvalue	Gen Candidato	Expresión
Chr8 (511,721-511,881)	19,41	53,47	0	840,16	SKN7	x0.5
Chr12 (602,988-603,381)	10,7	11,31	25	264,26	ECM22	x0.3
Chr2 (265,885-266,245)	10,35	9,47	13,33	248,15	YBR013C	x2.0
Chr7 (323,563-324,043)	9,62	7,37	13,33	215,74	TOS8	x2.2
Chr15 (42,953-43,097)	8,92	6,4	13,33	187,2	GRE2	x17
Chr13 (922,378-922,547)	8,91	6,28	13,33	186,59	PAU19	x3.1
Chr13 (306,870-307,029)	8,56	6,38	13,83	173,08	PAU3	x0.4
Chr4 (386,323-386-563)	8,23	7,25	13,83	160,86	BSC1	x0.1
Chr4 (384,152-384,641)	8,14	5,83	13,83	157,48	PRM7	x0.1
Chr7 (987,869-988,032)	8,13	5,84	13,83	157,3	MGA1	x2.0
Chr11 (152,039-152,183)	7,93	5,14	13,83	150,26	ELF1	x1.7
Chr13 (570,961-571,235)	7,51	5,1	16,96	135,66	MRPS8	x0.2
Chr11(489,765-490,034)	7,51	4,67	16,96	135,85	GCN3	x0.6
Chr7 (994,612-994,958)	7,35	4,85	13,24	130,63	YGR251W	x0.3
Chr7 (6647-6820)	7,32	4,18	13,24	129,53	PAU11	x3.3
Chr14 (64,970-65,162)	7,21	4,49	13,24	126,01	TOS6	x0.1
Chr13 (919,620-919,772)	7,14	5,06	13,24	123,82	SNO4	x8.6
Chr8 (85,022-85,165)	7,07	5,01	13,24	121,53	YAP3	x1.0
Chr11 (179,252-179,402)	6,96	4,9	13,01	118	SDH3	x2.2
Chr6 (194,217-194,349)	6,73	4,04	14,65	111,11	ATG18	x1.8
Chr14 (738,563-738,911)	6,71	4,35	14,04	110,55	FRE4	x3.7
Chr7 (754,568-754,724)	6,65	4,01	14,04	108,62	YGR131W	x4.5
Chr14 (746,171-746,439)	6,58	3,97	13,74	106,7	YNRO63W	x0.2
Chr14 (746,171-746,439)	6,58	3,97	13,74	106,7	YNRO62C	x1.8
Chr14 (258,508-259,004)	6,4	4,19	13,5	101,3	SPS19	x2.4
Chr13 (797,300-797,621)	6,36	3,75	13,5	100,12	RSN1	x0.4
Chr7 (979,298-979,478)	6,29	4,92	13,5	98,32	LSC2	x2.4
Chr5 (408,884-409,001)	6,09	3,94	13,18	92,63	DSE1	x0.7
Chr8 (35,975-36,103)	6,05	3,53	12,4	91,56	RPL18A	x0.3
chr12 (633,071-633,197)	5,54	3,83	14,01	78,36	RCK2	x3.0

Tabla 8. Genes identificados por CHIP-Chip candidatos a ser blanco del factor de transcripción Mot3p bajo estrés osmótico.

Se muestran las 30 regiones más enriquecidas según valor MATScore. El color verde hace referencia a aquellos genes adyacentes cuya expresión aumenta bajo estrés osmótico y el color rosado a aquellos en los que decrece (Ni *et al.*, 2009), siendo los colores intensos indicativos de un grado de inducibilidad o represión igual o superior a 10 veces.

Por último, a falta de confirmación mediante análisis directos, Mot3p podría unirse a otros reguladores, concretamente, el análisis CHIP-Chip ha revelado 6 promotores de genes que codifican factores de transcripción (*SKN7*, *ECM22*, *TOS8*, *MGA1*, *YAP3* y *YNR063W*) y que tienen o podrían tener un papel importante en la respuesta y adaptación a estrés osmótico.

6. La unión de Mot3p a promotores *in vivo* podría requerir otros factores adicionales

Mot3p es un factor de transcripción localizado en el núcleo con dos dedos de zinc Cys2-His2 que se une presumiblemente al motivo (A/T/G)AGG(C/A)A (Grishin *et al.*, 1998). Por ello se decidió buscar esta secuencia consenso exacta en los promotores candidatos obtenidos mediante el análisis CHIP-Chip. Prácticamente la totalidad de las regiones intergénicas estudiadas (30 promotores) contienen al menos un motivo consenso entre los 1000 nucleótidos anteriores al codón de iniciación ATG con un total de 67 sitios. Sin embargo este resultado es esperado al azar, tal y como se observa al realizar la misma búsqueda a lo largo de todas las regiones intergénicas de levadura. Además, la localización y distancia media al codón de iniciación también es esperada al azar, como puede observarse claramente en el gráfico de la figura 55.

Estos resultados sugieren que la unión de Mot3p a sus regiones blanco *in vivo* podría requerir otros factores además del reconocimiento directo de los motivos consenso. Una posibilidad es que Mot3p interactúe con otras proteínas que se asocian a promotores mediante sus motivos de unión, como Rox1p, u otras proteínas como las que forman el complejo represor Cyc8p-Tup1p (Klinkenberg *et al.*, 2005; Sertil *et al.*, 2003). Alternativamente, Mot3p podría requerir en algunos casos la presencia de otros complejos, como Rpd3 (deNadal *et al.*, 2004; Sertil *et al.*, 2007). Por último, la posición y densidad de los nucleosomas también podría tener un papel importante en dónde se une Mot3p *in vivo*.

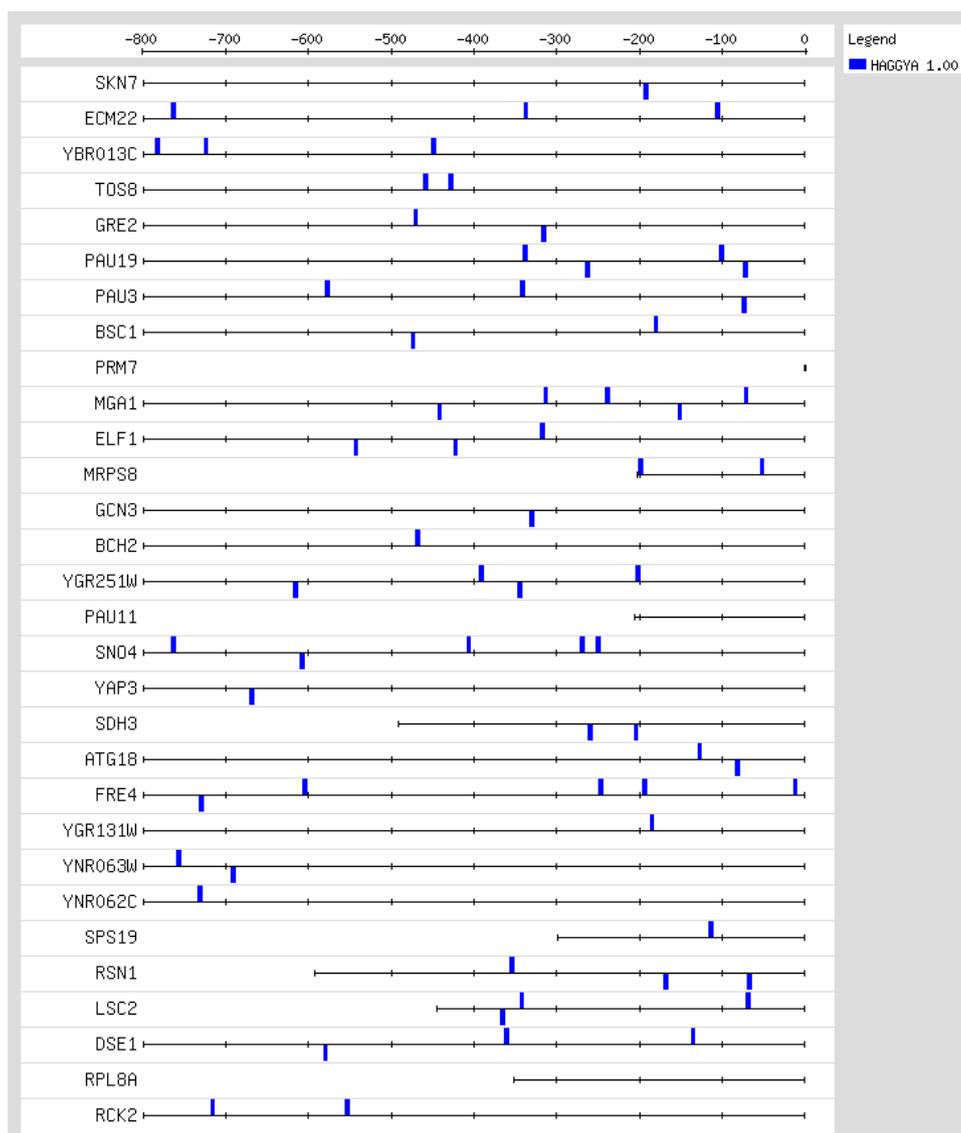


Figura 55. Presencia del motivo HAGGYA en las regiones intergénicas identificadas por CHIP-Chip de Mot3. Se muestra el resultado de la búsqueda del motivo consenso en una región de 1000 pb en los promotores candidatos a ser blanco de Mot3p. 4 de los 30 genes adyacentes encontrados comparten promotor. Las zonas donde se desaparecen las líneas indican las regiones codificantes del gen contiguo y no el promotor en estudio.

El análisis informático de secuencias para descubrir nuevos sitios de unión de un factor de transcripción en el genoma es una herramienta simple; sin embargo las secuencias consenso o motivos son a menudo cortas y pueden ser encontradas demasiado a menudo por todo el genoma, lo cual proporciona un bajo significado estadístico y una alta tasa de falsos positivos. Además, muchos de los sitios identificados podrían no ser blanco del factor de transcripción de interés en las células

vivas o por el contrario, el factor de transcripción sí podría unirse *in vivo* a sitios que muestran una baja probabilidad.

La tecnología ChIP-Chip ha demostrado ser una herramienta muy útil para localizar en el genoma los sitios de unión de factores de transcripción. El análisis, mejorado con la utilización de pequeños fragmentos de DNA espaciados regularmente y que cubren casi la totalidad del genoma de levadura salva algunas de las limitaciones de los análisis anteriores -donde se utilizaban sondas que cubrían sólo promotores de hasta 1 kb-, proporcionando una mayor resolución y reduciendo el sesgo de enfocar sólo ciertas áreas genómicas.

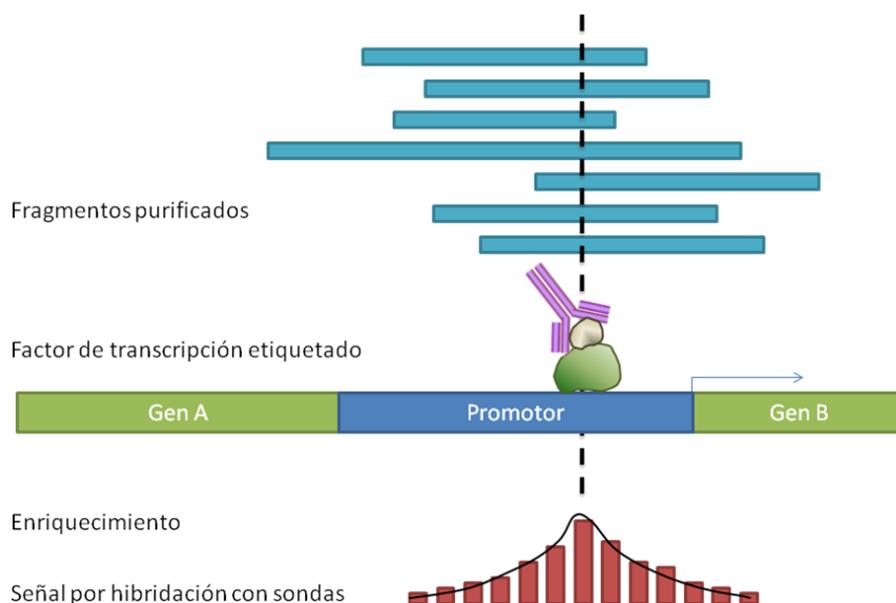


Figura 56. Representación esquemática de la localización de un factor de transcripción mediante ChIP-Chip. Un factor de transcripción dado (verde), se une a un lugar específico en el promotor de su gen blanco. Tras sonicar, el DNA se rompe en fragmentos de unas 500 pb y es inmunoprecipitado. Las sondas más cercanas al fragmento donde se une el regulador en cuestión hibridan con el material de partida inmunoprecipitado, obteniendo una señal en forma de pico.

Sin embargo, el método comparte el mismo principio, obteniéndose las señales por hibridación en una micromatriz. Como hemos visto en los apartados anteriores, a menudo se obtiene una gran cantidad de señales pequeñas que hacen problemática su detección y cuantificación. Además, numerosas variables pueden influir en la calidad de los datos. La resolución de las posiciones de los picos dependen en parte del

tamaño de los fragmentos obtenidos por sonicación, que suele estar en torno a unas 500 pares de bases, de la eficiencia de la purificación de los mismos y de la hibridación con las sondas en el chip (figura 56). Además, la posibilidad de hibridaciones cruzadas y no específicas puede influir en la calidad de los datos, sobre todo en genomas complejos.

A la vista de estos hechos, se decidió emplear una alternativa novedosa a la hibridación en micromatrices de fragmentos de cromatina inmunoprecipitados: la secuenciación directa de estos fragmentos (ChIP-Seq).

Localización genómica del regulador Smp1p bajo estrés osmótico (ChIP-Seq)

La tecnología ChIP-Seq ha sido aplicada con éxito tanto en levadura como en eucariotas superiores, donde los genomas mayores y con una mayor naturaleza repetitiva suponen un desafío al diseño de micromatrices con sondas solapantes. ChIP-Seq 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). Por este motivo se estudió la localización genómica de otro de los blancos directos de la MAP quinasa Hog1p bajo estrés osmótico, el factor de transcripción Smp1p.

El resultado de la secuenciación masiva en paralelo de los fragmentos de DNA inmunoprecipitados en las muestras Smp1-HA proporcionó un gran número –entre 5 y 10 millones- de lecturas correspondientes a secuencias pequeñas individuales que fueron alineadas con la secuencia completa del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. La longitud de estas secuencias de DNA es de sólo 25 pares de bases, suficiente para alinear con precisión e identificar millones de fragmentos. El siguiente análisis consistió en encontrar regiones genómicas con un número significativamente mayor de etiquetas o *tags*. Para ello, se determinó la distribución relativa de los picos en torno a un elemento genómico de interés, el sitio de iniciación de la traducción. En primer lugar, se estableció una ventana de 500 pares de bases y se listó las regiones en el promotor con mayor número de etiquetas. Al mismo tiempo, se estudió la densidad de etiquetas en una ventana de 500 pares de bases dentro de las regiones codificantes. Este análisis preliminar mostró un mayor enriquecimiento de secuencias en los ORF respecto a las regiones promotoras, por lo que a continuación se llevó a cabo un análisis más detallado de ambas regiones genómicas. Así, se estudió la distribución de etiquetas en las 20 regiones intergénicas con mayor número de las mismas, en ventanas de 25 pares de bases hasta cubrir 1 kb antes y después del codón de iniciación ATG. Se obtuvo un pico en torno a 325 pares de bases antes del sitio de iniciación de la traducción con un máximo de 375 lecturas (figura 57A). Siguiendo el

mismo procedimiento, se obtuvo a partir de las 20 regiones codificantes con mayor señal en todo el genoma de levadura una distribución parecida, con un pico de 505 lecturas en una región 300 pares de bases distante del codón ATG (figura 57B).

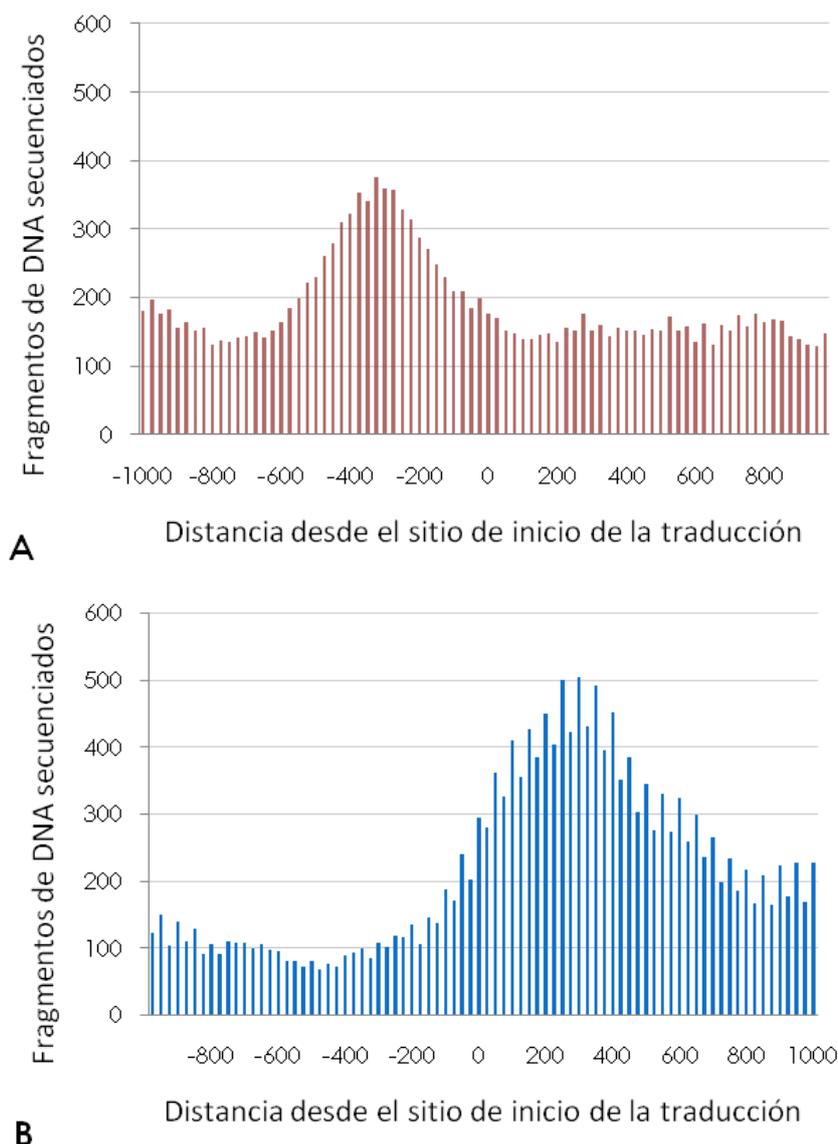


Figura 57. Distribución de lecturas obtenidas por ChIP-Seq en regiones intergénicas y codificantes del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Número y distribución de lecturas en las 20 regiones intergénicas más enriquecidas según análisis de localización genómica (ChIP-Seq) sobre el factor de transcripción Smp1p. B) Número y distribución de lecturas en las 20 regiones codificantes más enriquecidas a lo largo del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

A la vista de este resultado, se comenzó el estudio de las regiones intergénicas candidatas a ser blanco de Smp1p, para continuar después con el de aquellas regiones

codificantes que mostraban a su vez un enriquecimiento significativo e inesperado (tablas 9 y 10).

Región	Nombre	Nº tags (-500 a 0)	Nº tags (0 a +500)	Expresión*	Unión en promotor confirmada por ChIP
YFR036W/ YFR035C ^(a)	CDC26/	375	156	x2.0	-
	YFR036W	375	191	x0.6	-
YFL013W-A ^(b)	YFL013W-A	346	185	¿?	-
YOL149W ^(c)	DCP1	343	110	x0.5	-
YPL056C	YPL056C	319	103	x1.3	-
YFR034W-A ^(a)	YFR034W-A	318	209	x0.6	-
YHL036W/ YHL038C ^(d)	THP2/	313	147	x0.3	-
	YHL038C	284	121	x0.9	-
YHR167W	MUP3	313	178	x0.9	-
YKR047W ^(e)	YKR047W	307	182	¿?	-
YMR129W	POM152	298	185	x0.5	-
YGR165W	MRPS35	297	172	x1.4	-
YLR345W	YLR345W	294	188	x3.8	-
YHR005C-A	TIM10	290	106	x0.4	-
YBL007C	SLA1	288	208	x2.0	-
YCR025C	YCR025C	287	45	x0.7	-
YHR095W ^(f)	YHR095W	284	30	¿?	-
YMR079W	SEC14	282	82	x0.5	-
YDL016C	UBA2	281	203	x1.4	-
YFR016C	YFR016C	280	179	x1.7	-
YLR077W ^(g)	FMP25	279	181	x1.3	-
YMR276W	YMR276W	276	192	x1.9	-

Tabla 9. Regiones intergénicas de *Saccharomyces cerevisiae* con mayor número de lecturas tras el análisis ChIP-Seq de muestras Smp1-HA inmunoprecipitadas.

Se muestran las 20 regiones intergénicas más enriquecidas tras el análisis ChIP-Seq de Smp1-HA (5 min; 0.4M NaCl). * Expresión regulada por estrés osmótico (Ni *et al.*, 2009). El color verde hace referencia a un cambio en el nivel de expresión de más de tres veces. La última columna muestra la ausencia de factores de transcripción bajo la ruta HOG que se unan a las regiones estudiadas.

(a) genes anotados como dudosos; el pico coincide con una fuerte señal en el ORF de *PHO4* en la hebra complementaria

(b) gen dudoso; coincide con una fuerte señal en el ORF del gen osmoinducible *HSP12* en la hebra complementaria

(c) gen dudoso; coincide con una fuerte señal en el ORF del gen contiguo osmoinducible *GRE2*

(d) gen dudoso; coincide con una fuerte señal en el ORF del gen *YHR037C*, en la hebra complementaria

(e) gen dudoso, coincide con una fuerte señal en el ORF del gen osmoinducible *PET10*, en la hebra complementaria

(f) gen dudoso; coincide con una fuerte señal en el ORF del gen osmoinducible *HXT1*, en la hebra complementaria

(g) gen dudoso; coincide con una fuerte señal en el ORF del gen *YLR077W*, en la hebra complementaria.

Región	Nombre	Nº tags (-500/0)	Nº tags (0/+500)	Expresión	Unión en promotor (ChIP-ChIP)
YER062C	HOR2	199	586	x18	Hot1p ¹ , Msn2p ¹ , Sko1p ¹
YIL053W	GPP1	34	560	x4.6	Hot1p ¹ , Msn2p ¹ , Sko1p ¹
YPL061W	ALD6	142	534	x11.2	Hot1p ³ , Msn2p ¹ , Sko1p ^{1,2}
YOL150C	GRE2*	142	486	x17.4	Hot1p ³ , Sko1p ^{1,3}
YHR094C	HXT1	165	470	x8.3	Hot1p ³ , Sko1p ^{1,3}
YPL119C	DBP1	140	382	x3.2	
YOR348C	PUT4	207	381	x43.6	Sko1p ^{2,3}
YLR174W	IDP2	88	364	x1.7	
YOR230W	WTM1	99	359	x2.2	
YLR076C	YLR076C*	195	358	x1.7	
YGL008C	PMA1	111	356	x0.4	
YMR295C	IBI2	133	356	x1.3	
YCR013C	YCR013C*	144	356	x2.9	
YGR243W	FMP43	70	354	x36.9	Hot1p ³ , Sko1p ^{1,2,3}
YDR155C	CPR1	113	351	x2.3	Msn2p ¹ , Sko1p ¹
YFL014W	HSP12	160	349	x47.1	Hot1p ³ , Msn1p ¹ ; Msn2p ¹ , Sko1p ^{1,3}
YLR304C	ACO1	88	348	x6.6	
YLR108C	YLR108C	162	346	x4.8	Msn2p ¹ , Sko1p ¹
YHR087W	RTC3	103	345	x31.8	Hot1p ³ , Sko1p ³
YEL055C	POL5	152	343	x0.25	

Tabla 10. Regiones codificantes a lo largo del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* más enriquecidas tras el análisis ChIP-Seq del factor de transcripción Smp1p.

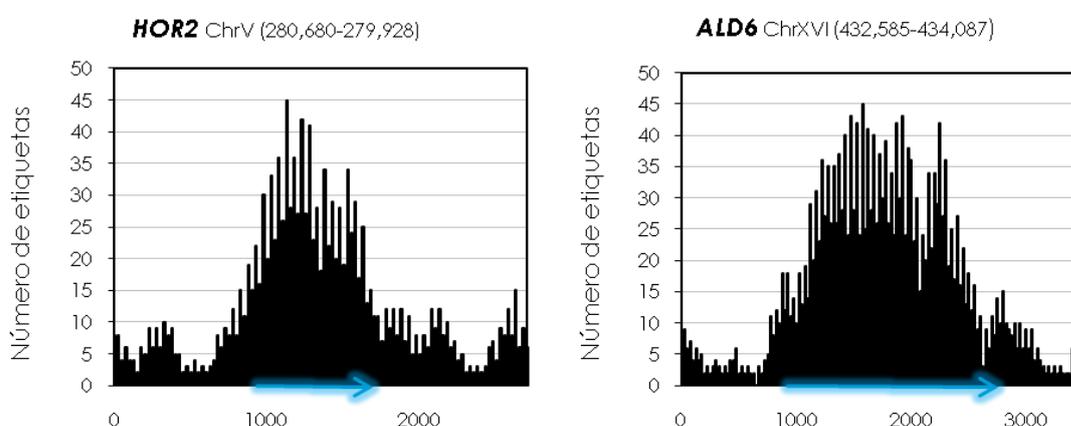
Se muestran los 20 ORF con mayor número de etiquetas en las condiciones estudiadas (5 min; 0.4M NaCl). El color verde hace referencia a aquellos genes adyacentes cuya expresión aumenta bajo estrés osmótico (Ni *et al.*, 2009), siendo la intensidad del color indicativa del mayor aumento de expresión. El asterisco indica que el mayor número de secuencias detectadas se encuentra en el ORF de genes dudosos que solapan parcial o totalmente con el mostrado en la tabla.

1. (Ni *et al.*, 2009). Señal obtenida tras 30 min con 0.6M NaCl.
2. (Proft *et al.*, 2005). Señal obtenida tras 5 min con 0.4M NaCl.
3. (Capaldi *et al.*, 2008). Señal obtenida tras 5 min con 0.4M KCl.

En el primer caso, entre las regiones más enriquecidas no se obtuvo ninguna, excepto la correspondiente a *YLR345W*, cuyo gen adyacente fuera inducible por estrés osmótico. Además, ninguno de los promotores es blanco de algún otro factor de transcripción involucrado en la respuesta al estrés osmótico (como Hot1p, Sko1p, Msn1p o Msn2p). Por el contrario, pudo observarse que algunas de las regiones correspondientes a los promotores de genes anotados como dudosos correspondían a los ORF de genes osmoinducibles en la cadena complementaria. Por ello, se analizaron las regiones codificantes con mayor número de "tags" secuenciadas en una ventana de igual tamaño, 500 pares de bases a partir del codón de iniciación de la traducción.

Sorprendentemente, en este caso, entre las 20 regiones con mayor número de anotaciones se obtuvo una alta densidad de ORF correspondientes a genes inducibles por estrés osmótico, algunos de ellos entre 11 y 47 veces, como *HOR2*, *ALD6*, *GRE2*, *PUT4*, *FMP43*, *HSP12* o *RTC3*. Además, muchos de sus promotores son blancos de otros factores de transcripción distintos a Smp1p pero también involucrados en la regulación de la expresión génica bajo estrés osmótico (tabla 10).

En base a este resultado se decidió investigar con mayor detalle los datos obtenidos por ChIP-Seq en las regiones codificantes. Para ello, la primera pregunta planteada fue si la señal obtenida se encontraba en la región 5', 3' o a lo largo de todo el ORF del gen en cuestión. Para ello se examinaron los datos de unión de los candidatos más robustos, *HOR2*, *GPP1*, *ALD6* y *GRE2* (figura 58).



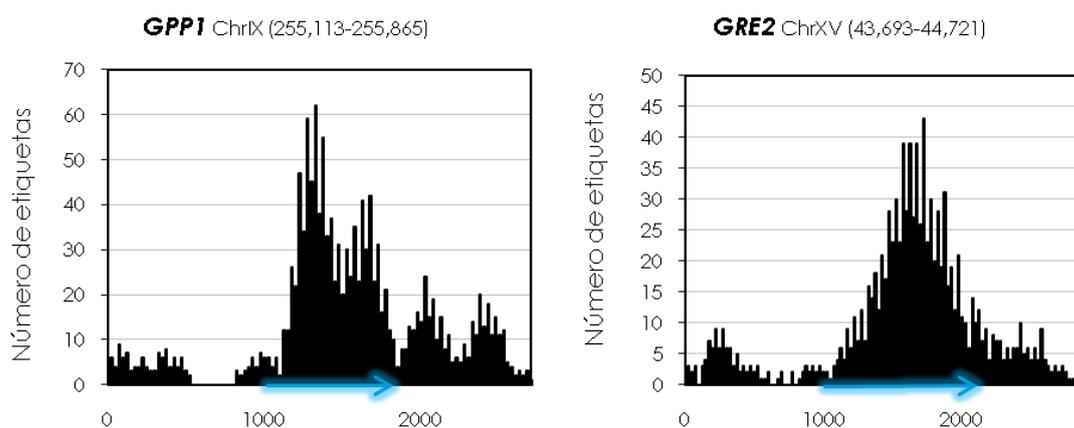


Figura 58. Perfiles de unión de Smp1p a lo largo de las regiones codificantes de genes osmoinducibles. Se muestra el número de etiquetas anotadas por ChIP-Seq en las regiones intergénicas y codificantes de los genes *HOR2*, *GPP1*, *ALD6* y *GRE2*. Las flechas muestran la longitud de la región codificante. 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.

Como puede observarse en los gráficos de la figura 58, las regiones codificantes de *HOR2* y *ALD6* muestran una señal abundante a lo largo de todo el ORF, mientras que en *GPP1* y *GRE2* los picos debidos al mayor número de *tags* secuenciados en dicha zona son más escarpados y se localizan en regiones concretas dentro del ORF.

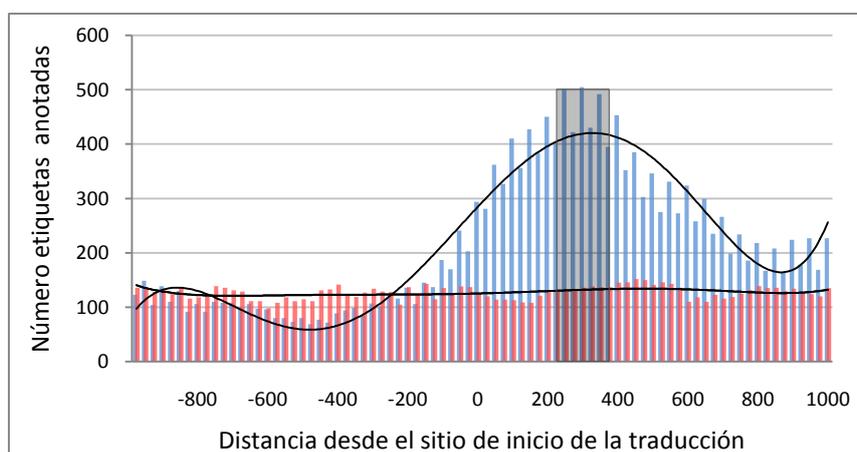


Figura 59. Perfil de la unión de Smp1p en las 20 regiones codificantes más enriquecidas. Las barras azules muestran el número de etiquetas anotadas en la región intergénica (valores negativos) y codificante (1kb después del ATG) de los 20 genes más enriquecidas. Las barras verticales de color rojo muestran los mismos datos en 20 genes escogidos al azar a lo largo del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Cada barra cubre una distancia de 25 pb. La barra vertical grisácea indica el tamaño de la ventana donde se concentran la mayor cantidad de tags.

Al ampliar el estudio a las 20 regiones codificantes más enriquecidas, se observó una distribución similar a una campana de Gauss, donde los valores máximos de secuencias anotadas están comprendidos entre 200 y 400 pares de bases dentro de los ORF, relativamente alejados del sitio de iniciación de la transcripción (figura 59).

Por este motivo y dada la alta resolución que ofrece ChIP-Seq, se decidió disminuir aún más la región a estudiar, hasta llegar a una ventana de un tamaño de 100 pares de bases. Concretamente, se estudió qué regiones a lo largo de todo el genoma de levadura tienen mayor número de etiquetas en una ventana comprendida entre los 200 y 300 pares de bases dentro de los ORF y también en la ventana entre 300 y 400 pares de bases. Este análisis mostró nuevas regiones codificantes de genes que responden a estrés osmótico, como *STL1*, *PNC1*, *TPS2* y *CWP1*, y en cuya regulación, de un modo hasta el momento desconocido y presumiblemente diferente al de otros factores de transcripción “típicos”, podría participar Smp1p (tabla 11).

Nombre	Nº tags (+200 a +300)	Expresión	Nombre	Nº tags (+300 a +400)	Expresión
GPP1	162	x4.6	GPP1	200	x4.6
HOR2	137	x18	GRE2	125	x17
ALD6	121	x11	ALD6	124	x11
DBP1	109	x3.2	HXT1	112	x8
IBI2	101	x1.3	PMA1	105	x0.4
PMA1	98	x0.4	HOR2	103	x18
GRE2	98	x17	ACT1	102	x1.6
HXT1	97	x8	YGR161W-C	100	¿?
YHL037C	96	¿?	HSP12	98	x47
YOR015W	96	¿?	IDP2	94	x1.7
YER158W-A	94	¿?	PRY3	93	x0.6
BUR6	94	x0.5	TPS3	92	x3.7
PHO86	91	x1.1	SOD1	91	x3.0
PAP2	91	x0.5	SFA1	90	x1.8
GET2	90	x0.8	YCR050C	89	¿?
VPS55	90	x1.5	YBR016W	88	x2.2
YOR378W	89	x1.2	STL1	88	x100
YLR108C	88	x4.8	PNC1	88	x11
CAT2	88	x4.4	NMD2	88	x1.1
HCS1	88	x0.6	YMR294W-A	88	x1.3
YGR161W-C	88	¿?	TPS2	87	x14
CKB2	88	x0.7	YML119W	87	x0.7
WTM1	87	x2.2	RPS30B	87	x0.6
STE12	87	x0.3	ADH1	86	x2.0
HSP12	86	x47	CWP1	85	x11
FMP43	86	x37	SSY1	85	x0.3
YCK3	86	x1.3	YHR070C-A	85	x0.3
YLR104W	86	x1.1	DSE2	85	x0.5
YBR016W	85	x2.2	YDR185W	84	x2.4
AVT2	85	x0.3	TAF9	84	x1.0
MBF1	85	x3.8	GFD1	84	x1.2
EGD1	85	x0.7	YOR356W	84	x2.0
BAG7	84	x11	OTU1	83	x1.3

Tabla 11. Regiones codificantes entre 200 y 400 pares de bases después del codón ATG más enriquecidas por Smp1p a lo largo del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se muestra el nombre de los genes con mayor número de etiquetas dentro del ORF (ventanas +200/+300pb y +300/+400pb), así como su cambio de expresión bajo estrés osmótico (Ni *et al*, 2009). El color verde es indicativo del grado de inducción. Los genes en negrita podrían ser blancos de Smp1p no identificados en ventanas de mayor tamaño en las regiones codificantes.

DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento hace ya una década, la tecnología ChIP-Chip ha supuesto un rápido progreso en los estudios a gran escala y ha proporcionado enormes y útiles datos en la regulación de la transcripción en varios organismos, incluidos los humanos. Este tipo de análisis tiene unas propiedades que lo hacen especialmente útil para descifrar las redes de regulación génica: en primer lugar, se trabaja con células que expresan proteínas en sus niveles nativos, sin necesidad de sobreexpresarlas; en segundo lugar, el método se centra en las interacciones directas entre el regulador y su blanco en el genoma. Esta segunda característica permite definir el número de intermediarios entre un factor de transcripción y sus blancos concretos, al contrario que los perfiles de expresión génica o los experimentos genéticos que atribuyen un papel a los reguladores en un proceso pero son incapaces de distinguir los efectos directos de los indirectos. Además, muchos factores de transcripción, particularmente aquellos que pertenecen a una misma familia, podrían reconocer la misma secuencia de DNA, por lo que los métodos puramente informáticos o los ensayos *in vitro* podrían, en algunos casos, no ser fieles a la realidad.

La aplicación del análisis de localización genómica sobre uno de los factores de transcripción regulados por la ruta HOG, Sko1p, puso de manifiesto la existencia de una red de reguladores transcripcionales activados bajo estrés osmótico (Proft *et al*, 2005). En este trabajo de investigación hemos estudiado detalladamente dos de estos factores de transcripción, Mot3p y Rox1p, ya que el hecho de que los genes que los codifican sean inducibles por estrés osmótico apunta a que podrían tener una función fisiológica bajo este tipo de estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En este sentido, hemos identificado una importante adaptación fisiológica a estrés que involucra la represión de una vía metabólica. La biosíntesis de ergosterol se regula negativamente bajo estrés afectando a la expresión de algunos genes que codifican enzimas específicas de la ruta de síntesis de ergosterol. En el caso de estrés hiperosmótico, la modulación de la homeostasis de ergosterol involucra a la MAP quinasa Hog1p y a los represores transcripcionales, Mot3p y Rox1p.

El control transcripcional negativo de la ruta *ERG* es crucial para la correcta adaptación a estrés salino. Esto se ha demostrado mediante dos manipulaciones genéticas que impiden la correcta expresión de los genes *ERG* bien eliminando los represores en el doble mutante *mot3rox1* o bien mediante la estimulación constitutiva de la activación en el mutante *upc2-1*. Ambos mutantes muestran una sobreexpresión de los genes *ERG2* y *ERG11* que no responde a estrés (figuras 20 y 36), una mayor acumulación de ergosterol en la célula bajo estrés (figuras 17 y 33) y sensibilidad a estrés salino y oxidativo (figuras 16, 32, 34 y 35).

Además, la inhibición de la ruta de biosíntesis de ergosterol mediante el empleo de concentraciones moderadas de drogas, como los azoles fluconazol o ketoconazol es generalmente beneficiosa para la tolerancia a estrés salino (figuras 42 y 43). Es importante resaltar que ambas drogas causan la disminución de ergosterol mediante la inhibición específica de la enzima Erg11p y en este trabajo se ha mostrado que la expresión de *ERG11* es reprimida bajo estrés salino y oxidativo.

Estos resultados identifican claramente el contenido de ergosterol como un parámetro fisiológico crucial para la tolerancia a estrés. Postulamos que la eliminación artificial de esteroides en las cepas mutantes que de otra manera no son capaces de ajustar su contenido en ergosterol, es beneficiosa para su tolerancia a estrés.

El suministro de ergosterol bajo condiciones normales de crecimiento es esencial y la levadura utiliza dos activadores transcripcionales relacionados, Ecm22p y Upc2p, para activar de forma continuada la transcripción de los genes *ERG* (Vik *et al.*, 2001). El análisis detallado de ambas proteínas reveló que Ecm22p es más abundante y se une preferentemente a los promotores de los genes *ERG* bajo condiciones normales, mientras Upc2p es el activador dominante en condiciones que causan el agotamiento de esteroides (Davies *et al.*, 2005).

Las situaciones de estrés utilizadas en nuestro trabajo requieren la regulación negativa de genes *ERG* y por lo tanto de algún modo tienen que interferir con la transcripción activada y mantenida principalmente por Ecm22p. Nosotros hemos encontrado que la expresión de *ECM22* se reprime rápidamente durante el estrés

salino por Mot3p/Rox1p y Hog1p (figura 29). Por lo tanto un mecanismo para regular la expresión de los genes *ERG* incluye la represión transcripcional de su principal activador Ecm22p. Otra vía de control es estimulando la unión de Mot3p a los promotores de los genes *ERG*, un mecanismo que se ha demostrado experimentalmente en nuestro trabajo para *ERG2*. La unión de Mot3p a *ERG2* es estimulada transitoriamente por estrés osmótico dependiendo de la quinasa Hog1p (figura 26).

Además, los niveles de proteína Mot3p se incrementan transitoriamente durante el estrés salino de forma dependiente de la ruta HOG. Este dato está de acuerdo con estudios previos sobre *MOT3* que muestran que su expresión se induce bajo estrés osmótico a través de Hog1p y del factor de transcripción Sko1p (Proft *et al.*, 2005). Aunque el aumento en la expresión de *MOT3* y la estimulación de la asociación del represor con ciertos promotores podría explicar como la ruta HOG desencadena la represión génica bajo estrés salino, somos conscientes que la unión de Mot3p al promotor de *ERG2* es más rápida que el aumento de los niveles de proteína de Mot3p. Además, la asociación de Mot3p con sus promotores blanco puede que no sea simplemente resultado de una mayor concentración de proteína y además, Mot3p podría unirse a diferentes genes bajo estrés con cinéticas distintas.

Por tanto, a la vista de nuestros resultados, parece que la bajada de la expresión de los genes *ERG* se consigue impidiendo la función de activación de Ecm22p a nivel transcripcional y estimulando la presencia del represor Mot3p en los promotores de los genes *ERG*. Nuestros resultados coinciden con la observación de que Mot3p reprime directamente a *ERG2* y *ERG6* en condiciones de falta de oxígeno (Hongay *et al.*, 2002).

Pero, ¿cómo reprime Mot3p la transcripción una vez unido al promotor de los genes *ERG*? Aunque nosotros no hemos abordado experimentalmente esta cuestión, un modelo tentador es el reclutamiento de correpresor Tup1-Ssn6, ya que se ha descrito previamente que en condiciones normales, Mot3p y Rox1p contribuyen a la represión de genes que se expresan en anaerobiosis reclutando este complejo (Klinkenberg *et al.*, 2005; Mennella *et al.*, 2003; Sertil *et al.*, 2003b). Alternativamente, Mot3p podría

actuar directamente sobre la proteína Ecm22p, lo cual parece ser respaldado por el hecho de que Mot3p y Ecm22p interactúan físicamente y los niveles de proteína Ecm22p aumentan en ausencia de Mot3p (Davies y Rine, 2006). Actualmente no sabemos si Rox1p también reprime a los genes *ERG* directamente uniéndose a sus promotores, ya que no hemos sido capaces de detectar una unión de Rox1p estimulada por estrés a *ERG2* y *ERG11* mediante ChIP.

Por otra parte, hemos visto que el papel de Rox1p difiere del de Mot3p en la respuesta a estrés osmótico. Al contrario que Mot3p, los niveles de proteína de Rox1p disminuyen después del choque salino (figura 28) y, con la excepción de la expresión de *ECM22*, la pérdida de función de Rox1p tiene menos impacto en la expresión génica comparada con Mot3p. Hay que tener en cuenta también que puede haber otros represores adicionales que actúen en los genes *ERG* bajo estrés osmótico y oxidativo. De hecho, sigue habiendo una represión residual en *ERG11* en un mutante *mot3rox1* bajo estrés osmótico y bajo estrés oxidativo la regulación de la expresión de los genes *ERG* es independiente de Mot3p y Rox1p (figura 31).

Hemos mostrado que algunos genes *ERG* son inmediatamente reprimidos por la ruta de señalización HOG en respuesta a estrés osmótico. Aunque esta represión es transitoria, conduce a un ajuste a largo término de los niveles de ergosterol bajo estrés. La respuesta inmediata que hemos descrito aquí podría reflejar un ajuste inicial de la expresión de ciertos genes *ERG* bajo estrés. Sin embargo, en la adaptación a largo plazo al estrés podría haber otros mecanismos postranscripcionales involucrados en la regulación de los niveles de esteroides.

También queremos resaltar que aunque hemos identificado la ruta *ERG* como un importante blanco de la respuesta a estrés, no todos los genes *ERG* son regulados de la misma manera bajo estrés salino (figura 19). Genes como *ERG2* y *ERG11* parece que son específicamente reprimidos bajo estas condiciones. Los experimentos de perfiles transcripcionales apoyan nuestro hallazgo e identifican algunos genes *ERG*, entre los que se incluyen *ERG2*, *ERG3* y *ERG11*, como reprimidos más de dos veces por estrés con NaCl (Krantz *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2009; Rep *et al.*, 2000). Sin embargo, el hecho de que células ya adaptadas a estrés osmótico muestren un perfil de regulación de la

expresión de los genes *ERG* diferente en comparación con las células recién sometidas a estrés (figura 22) añade una complejidad adicional. Además, se ha descrito que cuando se aplica estrés osmótico en condiciones de anaerobiosis, puede inducirse un subgrupo de genes *ERG* (Krantz et al, 2004).

Teniendo en cuenta todo esto, el diferente grado de regulación de los genes *ERG* bajo estrés podría indicar que no es sólo la inhibición de la biosíntesis de ergosterol sino más bien la modulación de especies específicas de esteroides lo que es realmente importante para la adaptación a estrés. Un estudio detallado de la composición de esteroides y sus cambios bajo estrés osmótico podría revelar nuevos datos para comprender la homeostasis de esteroides y sus efectos de protección frente al estrés.

Es importante resaltar la importancia de que la ruta *ERG* sea activamente reprimida a través de la acción de la MAP quinasa Hog1p, ya que la función de Hog1p en la expresión génica ha sido casi exclusivamente estudiada con respecto a la activación transcripcional. Nosotros centramos nuestro estudio en elucidar la función de Hog1p en la represión transcripcional de la ruta de síntesis de ergosterol. Nuestros resultados muestran que la MAP quinasa es esencial para la represión regulada por estrés de algunos de los genes *ERG*. El efecto de esta represión se refleja directamente por la pérdida de la RNA Pol II de los promotores de *ERG2* y *ERG11*, lo cual se evita en ausencia de Hog1p (figura 24). Esto demuestra que la quinasa Hog1p, una vez activada, estimula el reclutamiento a genes osmoinducibles de la RNA Pol II mientras que bloquea activamente el reclutamiento de la RNA Pol II a los genes que se reprimen por estrés osmótico. Esta represión no parece ser fruto del contacto físico de la MAP quinasa con la cromatina normalmente visto en el caso de activación transcripcional (figura 23). Esto podría ser explicado por el hecho que Hog1p juega un papel activo en el reclutamiento de complejos remodeladores de la cromatina y elongación transcripcional en genes activados por estrés (Alepuz *et al.*, 2001; Pokholok *et al.*, 2006b; Proft *et al.*, 2006), mientras que la represión de *ERG2* y *ERG11* podría ser simplemente el resultado de un aumento de la unión de los represores sin un mayor compromiso de la MAP quinasa a nivel de la cromatina.

Es relevante señalar que aunque el control transcripcional mediado por Hog1p de los genes *ERG* representa la mayoría, sino toda, la regulación negativa de los niveles de ergosterol bajo estrés osmótico, no es el mismo caso con estrés oxidativo. La expresión de *ERG2* y *ERG11* todavía es regulada significativamente bajo estrés oxidativo en los mutantes *hog1* y *mot3rox1*, lo cual podría ser explicado por la contribución a la represión de otros factores de transcripción distintos de Mot3p y Rox1p bajo estrés oxidativo. Además, mecanismos no transcripcionales podrían operar bajo estas condiciones. De hecho, estudios recientes en *Schizosaccharomyces pombe* revelaron que *ERG9* se inhibe al nivel postraducciona l por estrés oxidativo (Tafforeau *et al.*, 2006).

Llegados a este punto, debemos preguntarnos cuál es el significado fisiológico de la regulación de la homeostasis del ergosterol en respuesta a estrés salino y oxidativo. Nosotros hemos mostrado que la bajada del contenido en ergosterol es una respuesta fisiológicamente importante como respuesta a estrés. La ruta *ERG* y su importancia para la tolerancia a estrés ha sido tradicionalmente investigada usando mutantes de pérdida de función en genes no esenciales de los últimos pasos de la biosíntesis de esteroides. Estos mutantes son viables porque, aunque son incapaces de sintetizar ergosterol, acumulan diferentes precursores de la ruta *ERG*. La mayoría de estos mutantes muestran sensibilidades pleiotrópicas a diferentes drogas, sodio, litio o peróxido de hidrógeno (Abe y Hiraki, 2009; Branco *et al.*, 2004; Emter *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Welihinda *et al.*, 1994). Sin embargo, los estudios que utilizan los mutantes *erg* no pueden revelar los mecanismos de homeostasis de ergosterol bajo los estímulos que ocurren naturalmente. Nosotros hemos mostrado que los mutantes de los reguladores *mot3* y *rox1* con un defecto en la represión de los genes *ERG* acumulan Na^+ de manera excesiva en el interior celular bajo estrés salino (figura 18). Esto podría ser debido a un aumento en la toma de sodio y/o una disminución en la expulsión del sodio en el entorno de la membrana plasmática con altos niveles de ergosterol. En este escenario, los sistemas de transporte más importantes son la ATPasa de membrana Pma1 de expulsión de protones y el sistema de toma de potasio Trk como generador y consumidor del potencial de membrana

Cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés osmótico, se activa la ruta de MAP quinasas HOG, hecho que desencadena la represión de ciertos genes *ERG* que codifican enzimas de los pasos finales de la biosíntesis de ergosterol mediante varios mecanismos:

- A) La MAP quinasa Hog1p actúa sobre la expresión de *MOT3* y *ROX1* a través del factor de transcripción Sko1p (Proft *et al*, 2005).
- B) Mot3p y Rox1p regulan la expresión de genes *ERG* en respuesta a estrés osmótico (figura 20).
- C) Mot3p y Rox1p apagan además la expresión de *ECM22* bajo estrés osmótico (figura 29).

En la segunda parte de este trabajo se ha realizado el análisis de localización genómica de los factores de transcripción Hot1p y Smp1p, fosforilados ambos junto a Sko1p por la MAP quinasa Hog1p e implicados directamente en la respuesta a estrés osmótico, así como del factor de transcripción Mot3p.

En el caso de Hot1p y Mot3p, se ha aplicado la tecnología ChIP-Chip utilizando sondas solapantes de tamaño muy reducido, consiguiendo mejorar así la precisión en la identificación de los sitios de unión de estos factores de transcripción. Inicialmente, este tipo de análisis se llevaba a cabo utilizando micromatrices que consistían en productos de PCR que representaban los promotores o regiones intergénicas de levadura, ajustadas específicamente para las regiones cercanas a los sitios de iniciación de la transcripción. Este diseño experimental causa una baja resolución, la cual no es mayor de 1 kb si el promotor está sólo representado por un producto de PCR de ese tamaño.

Hemos comprobado que el activador Hot1p se une y regula de forma rápida y masiva a los promotores de *GPD1* y *HOR2* que codifican las dos enzimas principales osmoinducibles de la biosíntesis de glicerol: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y glicerol-3-fosfato fosfatasa. Además, Hot1p se une y regula a *STL1*, que codifica un simportador de glicerol/H⁺ de la membrana plasmática.

Más discretamente, Hot1p se une al promotor de *GPM2* (involucrado en la conversión de 3-fosfoglicerato en 2-fosfoglicerato en la glucólisis) en un pequeño clúster que incluye a los genes divergentes *GPD1* y *DIA3* (figura 50). La función de la proteína Dia3p no se conoce, aunque parece que está involucrada en la formación de pseudohifas y crecimiento invasivo (Palecek *et al.*, 2000), fenómeno que podría ser inducido en condiciones de estrés osmótico como se ha propuesto en trabajos anteriores (Proft *et al.*, 2005).

El hecho de que Hot1p se una a tan pocas regiones en el genoma nos ha hecho plantearnos las limitaciones de la tecnología ChIP-Chip. Por un lado, los datos de unión que resultan negativos son difíciles de interpretar. Además, el conocimiento de la localización de un factor de transcripción en un promotor dado no nos proporciona información acerca de su función. Hay muchos ejemplos en los que el reclutamiento de un factor de transcripción no se correlaciona con una inducción o expresión transcripcional de los genes próximos (Blais y Dynlacht, 2005; Martone *et al.*, 2003). Esto podría explicarse mediante la regulación combinada de otros factores de transcripción o mediante el reclutamiento de proteínas coactivadoras o correpressoras, según el caso.

No obstante, experimentos ChIP-Chip paralelos a nuestro trabajo señalan, de igual modo a lo observado en éste, muy pocos blancos de Hot1p (Ni *et al.*, 2009). Concretamente, este grupo de investigación identifica 7 regiones intergénicas entre los blancos de Hot1p en el genoma de levadura tras 30 minutos de choque osmótico (0.6M NaCl). Entre las regiones con más señal se encuentran, como hemos visto nosotros a los 5 minutos de estrés por 0.4M NaCl, las correspondientes a *GPD1*, *STL1* y *HOR2/THO1*. El conjunto de los resultados obtenidos por ChIP-Chip indica que Hot1p es un factor de transcripción muy especializado que regula de forma directa a un número muy limitado de genes en condiciones de estrés osmótico.

El análisis de expresión a nivel de mRNA de *GPD1* nos ha confirmado que la inducción bajo estrés osmótico depende de Hot1p y Hog1p. Sin embargo, la delección de *HOT1* y *HOG1* sólo tiene un efecto moderado en la disminución de la inducción de *GPD1* (figura 51), lo cual sugiere que otros reguladores y rutas de señalización podrían

estar implicadas en la regulación de su expresión. En este sentido, el factor de transcripción multifuncional Rap1p, dada su importancia en la inducción mediada por Gcr1p de genes glicolíticos, podría interactuar directa o indirectamente con Hot1p y/o Msn1p, facilitando así su unión y la subsecuente activación del promotor de *GPD1*. Concretamente, se ha evidenciado tres sitios funcionales de unión para Rap1p en la región comprendida entre -478 y -324 nucleótidos antes del sitio de inicio de la traducción cuyas mutaciones disminuyen enormemente la inducción osmótica de *GPD1* (Eriksson *et al.*, 2000). Rap1p podría tener la habilidad de unirse, perturbar la estructura de la cromatina y hacerla así accesible a otros factores de transcripción (Yu y Morse, 1999; Yu *et al.*, 2001). Esto podría ocurrir también en el contexto del promotor de *GPM2*, ya que hay ejemplos de promotores de genes que codifican enzimas glicolíticas, donde se requiere el complejo heteromérico formado por el regulador Gcr1p y Rap1p para mediar una eficiente activación transcripcional (Baker, 1991; Tornow *et al.*, 1993).

Por otra parte, la activación por estrés osmótico del gen *STL1* también despierta interés, ya que su inducción depende totalmente del factor de transcripción Hot1p (figura 51) pero también se ha descrito la unión y/o regulación de otros factores bajo la ruta HOG, como Sko1p (Ni *et al.*, 2009; Proft *et al.*, 2005) y Smp1p (de Nadal *et al.*, 2003 y este trabajo). Un estudio más detallado nos revelará la posible contribución de estos y otros factores en la regulación de este gen altamente inducible por estrés osmótico.

El análisis de localización genómica de Hot1p también nos ha revelado un nuevo y hasta ahora desconocido sitio de unión que podría ser responsable de la activación transcripcional de los genes blanco de este factor de transcripción (figura 52). Es notable el hecho que el sitio consenso definido está localizado justo en las regiones promotoras de *GPD1* y *HOR2* donde se observan la máxima señal de unión identificados por CHIP-Chip. Además, la búsqueda de este motivo a lo largo del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 53) presenta un nuevo candidato que podría estar implicado en la respuesta a estrés osmótico y ha sido hasta ahora inadvertido: Rgc1p, un regulador positivo de Fps1 (Beese *et al.*, 2009), un componente

clave en el control de la concentración citoplasmática de glicerol. Aunque este canal de glicerol se cierra en respuesta a estrés osmótico, el mecanismo mediante el cual su función es modulada se desconoce. Una posibilidad es que Hog1p inhiba la actividad de Fps1p bien directamente, a través de su fosforilación (Mollapour y Piper, 2007), bien indirectamente, a través de la fosforilación de Rgc1/2p. De esta manera, habría una ruta reguladora desde Hog1p a Rgc1/2p a Fps1p, en la cual Rgc1p y Rgc2p son reguladores positivos de la actividad del canal Fps1 y Hog1p inhibe a Fps1p a través de la inhibición de Rgc1/2p (Beese *et al.*, 2009). El papel de Hot1p en la regulación de Rgc1p es aún más confuso. En caso de que análisis directos en el futuro confirmen a *RGC1* como un blanco de Hot1p, podríamos especular que Hot1p se une a la región promotora en una cinética de tiempo más tardía tras el choque osmótico, tal vez permitiendo así la apertura del canal de glicerol a través de Rgc1p una vez las células de levadura se han adaptado al estrés. Sin embargo, la función de Hot1p en la regulación de Rgc1 queda por determinar.

Otros experimentos futuros que ayudarán a obtener una visión más completa de la regulación de la expresión génica mediada por Hot1p incluye el análisis directo mediante inmunoprecipitación de cromatina seguida de PCR cuantitativa de otros blancos del factor de transcripción identificados recientemente mediante ChIP-Chip bajo estrés osmótico (Ni *et al.*, 2009). De verificarse algún nuevo blanco, se incluirá en la búsqueda de sitios consenso para completar nuestro conocimiento sobre la unión de Hot1p a sus promotores blancos. También será interesante analizar las regiones promotoras que contienen un sitio consenso pero no fueron identificadas por ChIP-Chip. Estos estudios pueden revelar si la presencia de la secuencia consenso es suficiente o no para su unión con Hot1p.

En este trabajo de investigación hemos aplicado la técnica ChIP-Chip sobre otro factor de transcripción regulado por la ruta HOG, Mot3p. El análisis preliminar de los blancos de Mot3p nos ha mostrado una función diferente a la de Hot1p, indicando que Mot3p se une y probablemente regula tanto a genes inducidos como reprimidos por estrés osmótico (tabla 7).

En la primera parte de resultados hemos demostrado el papel de Mot3p –junto a Rox1p- en la regulación de la biosíntesis de ergosterol bajo estrés osmótico. En base a este descubrimiento, es obvia la pregunta de si Mot3p se une a promotores de genes involucrados en el metabolismo de este lípido de membrana. La limitación más desafiante de los ensayos ChIP-Chip es que frecuentemente hay factores de transcripción que están presentes a niveles muy bajos en las células y a tiempos específicos. Además, muchas interacciones que pueden ser críticas son transitorias y pueden ser difíciles de detectar por ChIP. Aunque hemos sido incapaces de detectar por ChIP-Chip los promotores de *ERG2* o *ERG11* como blancos directos de Mot3p, sí hemos obtenido un enriquecimiento significativo de Mot3p en el principal activador de la ruta, *ECM22*, demostrando así una cascada de regulación en respuesta a estrés osmótico desde Hog1p, activando a Sko1p y éste a su vez a Mot3p, para que finalmente este último reprima la función del factor de transcripción Ecm22p. Además, como hemos apuntado en la sección de resultados, Mot3p podría unirse a otros reguladores, añadiendo complejidad a este módulo de la red de regulación transcripcional. Por ello, será de gran importancia, en análisis futuros, validar mediante ensayos ChIP dirigidos los candidatos de Mot3p obtenidos en nuestro estudio con el fin de descifrar este complejo programa genético.

Llevar a cabo un experimento ChIP-Chip no es trivial; conlleva muchos procedimientos experimentales y requiere optimización en cada paso. Aunque el análisis MAT es una excelente herramienta para la identificación positiva de regiones de DNA enriquecidas, sigue siendo un reto analizar los datos después de obtener las señales de unión y extraer información con significado biológico, así como construir a partir de la masiva información de interacciones entre proteínas y DNA, redes de regulación transcripcional y conectar los datos de los experimentos ChIP-Chip con los análisis de perfiles de expresión génica.

Por otra parte, el enfoque dirigido a descubrir sitios de unión de Mot3p o de cualquier otro factor de transcripción mediante herramientas informáticas ignora la redundancia existente entre factores que reconocen el mismo sitio, la estructura de la cromatina o la contribución sinérgica o antagónica de otros factores. Es importante

recalcar por tanto que el contexto de los sitios de unión es muy importante para realizar predicciones precisas. Un análisis detallado de los promotores a los que se une un factor de transcripción dado podría revelar la presencia de sitios de unión para otros factores de transcripción adicionales, sugiriendo de este modo acciones de regulación combinadas que expliquen los patrones de expresión específicos.

Precisamente, el análisis de localización genómica de Smp1p nos ha permitido intuir estas asociaciones combinatorias de factores de transcripción en la regulación de la expresión génica (tabla 9). A medida que se ha hecho accesible la secuenciación masiva, la tecnología ChIP-Seq va encaminada a sustituir a los análisis ChIP-Chip, ya que permite una mayor cobertura del genoma, resolución y es más eficiente en revelar los sitios de unión. Sin embargo, una de las partes más exigentes de un experimento ChIP-Seq es el análisis exhaustivo de los datos. Es relativamente sencillo encontrar las señales con las herramientas informáticas existentes, pero la simple creación de largas listas de posibles blancos no es un gran mérito por sí misma, sino lo que es realmente importante es entender cómo usar esa gran cantidad de datos.

En el trabajo presentado aquí, hemos mostrado que el factor de transcripción Smp1p puede ser detectado aguas abajo de algunas regiones intergénicas de levadura, en el ORF de genes inducibles por estrés osmótico. Esta observación 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. Este reclutamiento inesperado en regiones codificantes ha sido observado en otros factores de transcripción, como los activadores Gln3p y Gat1p (Georis, I., comunicación en *“EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast”*, 2010). Análisis ChIP dirigidos en algunos de estos genes osmoinducibles están siendo llevados ya a cabo en el laboratorio, confirmando la presencia de Smp1p en algunas regiones codificantes de genes osmoinducibles. Será muy interesante en el futuro desvelar qué papel regulador tiene este factor, hasta ahora desconocido.

Entre los genes inducibles por estrés osmótico identificados por ChIP-Seq, existen datos obtenidos por éste y otros estudios a escala genómica que confirman la unión – en el promotor- de otros factores de transcripción bajo la ruta HOG, como Hot1p,

Msn1p, Msn2p y Sko1p (Ni *et al.*, 2009; Capaldi *et al.*, 2008; Proft *et al.*, 2005), poniendo de manifiesto que la red de regulación transcripcional en levadura es altamente modular y depende de la acción combinatoria de múltiples factores de transcripción, ya que módulos relacionados funcionalmente comparten algunos de sus elementos reguladores, como se ha descrito anteriormente (Segal *et al.*, 2003).

La biología de sistemas ofrece herramientas poderosas para manejar y analizar la gran cantidad de datos que resultan de la acumulación de estudios detallados así como de los experimentos a gran escala. Sin embargo, los modelos sobre redes biológicas no son capaces de capturar todos los parámetros o particularidades de un sistema; sin embargo, si integramos módulos locales funcionalmente distintos en lugar de predecir modelos estadísticos o distribuciones globales cada vez más complejas podríamos analizar en mayor detalle las redes biológicas y tratar de entender los enlaces entre moléculas y también entre módulos. Así, las redes serán más interpretables a medida que aumente el estudio de las estructuras locales y las interacciones entre las moléculas participantes.

Este trabajo de investigación ha permitido, gracias a los datos de unión obtenidos, hacer una distinción entre Hot1p y Mot3p como componentes de la red de regulación bajo estrés osmótico. Así, las subredes en las cuales actúan cada uno de ellos presentan una tipología claramente diferenciada, pudiéndolas separar en dos grupos: Hot1p pertenece a una subred exógena, que incluye genes que responden a estímulos ambientales. Estos genes tienden a ser regulados por pocos factores de transcripción y los blancos de éstos no son típicamente otros factores de transcripción, de modo que la red tiene un diámetro más pequeño y de esta manera permite a las células responder rápidamente a cambios repentinos en las condiciones del medio. Por su parte, Mot3p pertenece a una subred endógena, en la que prevalecen conexiones más intrincadas y en la que diferentes grupos de factores de transcripción pueden ser centros de la red a diferentes tiempos. Este tipo de red es característica para genes cuya expresión es fundamental para la función básica de la célula, como hemos visto en este trabajo para los genes *ERG*. Como regla, los genes que pertenecen a este tipo de red tienden a ser regulados por muchos factores de transcripción, cada uno con

unos pocos blancos. Además, estos factores son a su vez regulados por otros factores de transcripción, siendo la expresión génica coordinada bajo condiciones específicas (Blais *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2007).

En resumen, podríamos decir que los genes que se necesitan para el normal funcionamiento y organización de la célula, como son los implicados en la biosíntesis de ergosterol, pueden ser descritos como miembros de una red endógena, mientras que los genes que se necesitan en la respuesta a situaciones impredecibles, como puede ser un cambio en la osmolaridad del medio, se describen por una red exógena, en la que unos pocos factores, como Hot1p, responden rápidamente y contactan directamente otros genes, permitiendo así una respuesta rápida, como la síntesis y acumulación del osmolito compatible glicerol.

El estudio de las redes de regulación aporta interesantes datos sobre la evolución de los organismos. En general, los componentes centrales de una red poseen numerosas interacciones y esto hace que su eliminación provoque profundas consecuencias para la estabilidad de la red o para la supervivencia de un organismo. Otra propiedad de estos centros de la red es que son genes que tienden a estar conservados evolutivamente, (como Hog1p en la red de regulación transcripcional que opera bajo estrés osmótico), mientras que los componentes de la periferia o las falsas interacciones no lo están. Esto revela otra característica de las redes: los genes que están conectados en un organismo –como levadura-, tienden a estarlo en otro organismo –como humanos-.

Cada interacción entre proteínas o proteína-DNA que es importante para la supervivencia de la célula impone una presión selectiva. En otras palabras, los componentes en un sistema complejo que interactúan con otros muchos componentes son necesariamente resistentes a cambios. Esto hace que las redes de regulación sean robustas o resistentes a cambios aleatorios en sus componentes individuales, de modo que la pérdida de un nudo de la red al azar es más fácil que afecte a uno con pocos enlaces que a un nudo central.

El origen de la robustez puede encontrarse en la redundancia de un nudo y/o en rutas alternativas entre nudos (rutas y genes duplicados). Una de las razones por tanto es que muchos genes son miembros de familias de genes con miembros redundantes funcionalmente. Por eso los fenotipos mutantes sólo se consiguen ver cuando se elimina dos o tres genes. Ejemplos de esta redundancia son los genes implicados en la biosíntesis de glicerol, como *GPD1/GPD2* o *GPP1/GPP2*. Una segunda explicación puede estar en la existencia de múltiples rutas que conectan dos nudos, es decir, cuando hay un solapamiento funcional en la red que surge de caminos alternativos entre dos nudos, como puede ser la represión de los genes *ERG* bien a través de la represión directa por parte de Mot3p o bien a través de la represión del activador principal de la ruta, Ecm22p.

Esta propiedad, la robustez, podría proteger a la célula y a un organismo frente a fluctuaciones aleatorias a nivel del producto de los genes, que de otro modo tendrían graves consecuencias. Además, evita que muchas mutaciones sean letales para el organismo. Por último, como las mutaciones persisten, es posible la creación de nuevas conexiones y por tanto nuevas redes de interacciones, lo que permite la acumulación de variación genética en una población, la cual es un ingrediente necesario para los cambios evolutivos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La reducción de los niveles de ergosterol es una respuesta fisiológicamente importante para la adaptación a estrés osmótico y oxidativo.
2. El estrés osmótico desencadena una compleja respuesta adaptativa regulada principalmente por la MAP quinasa Hog1p que implica la represión transcripcional de ciertos genes de la ruta de biosíntesis de ergosterol.
3. Los factores de transcripción Mot3p y Rox1p son esenciales para esta regulación negativa bajo estrés osmótico.
4. La represión de la biosíntesis de ergosterol en respuesta a estrés osmótico requiere la activación de una cascada de regulación a través de Hog1p, que activa a Sko1p, éste a Mot3p y a su vez éste reprime directamente *ERG2* y *ERG11*, así como al gen que codifica al activador transcripcional de la ruta, *Ecm22p*.
5. Mot3p podría actuar en el proceso de adaptación a estrés osmótico como activador y represor simultáneamente, dependiendo del contexto del promotor. Además, se une a genes que codifican otros factores de transcripción, formando parte de una compleja red de regulación transcripcional.
6. Al contrario que Sko1p y otros factores de transcripción, Hot1p tiene muy pocos blancos en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y está involucrado en una rápida respuesta adaptativa de la biosíntesis y transporte del osmolito glicerol.
7. El regulador Smp1p podría no unirse a regiones promotoras sino a las regiones codificantes de genes inducibles por estrés osmótico, lo cual apunta a una posible e inesperada función en pasos posteriores a la iniciación de la transcripción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abe F and Hiraki T (2009) Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 743-752.
2. Abramova N, Sertil O, Mehta S, and Lowry CV (2001) Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **183**, 2881-2887.
3. 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.
4. Alepuz PM, de NE, 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.
5. 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.
6. Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, and Morrison CJ (1999) Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, **37**, 3332-3337.
7. Baker HV (1991) GCR1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a DNA binding protein whose binding is abolished by mutations in the CTTCC sequence motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9443-9447.
8. Bammert GF and Fostel JM (2000) Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1255-1265.
9. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones 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.
10. Barski A and Zhao K (2009) Genomic location analysis by ChIP-Seq. *J Cell Biochem*, **107**, 11-18.
11. Beckhouse AG, Grant CM, Rogers PJ, Dawes IW, and Higgins VJ (2008) The adaptive response of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide is mediated by the Yap1 and Skn7 transcription factors. *FEMS Yeast Res*, **8**, 1214-1222.
13. Beese SE, Negishi T, and Levin DE (2009) Identification of positive regulators of the yeast *fps1* glycerol channel. *PLoS Genet*, **5**, e1000738.

14. 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.
15. Blais A and Dynlacht BD (2005) Constructing transcriptional regulatory networks. *Genes Dev*, **19**, 1499-1511.
16. 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.
17. Borneman AR, Leigh-Bell JA, Yu H, Bertone P, Gerstein M, and Snyder M (2006) Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. *Genes Dev*, **20**, 435-448.
18. Bouquin N, Johnson AL, Morgan BA, and Johnston LH (1999) Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 3389-3400.
19. Branco MR, Marinho HS, Cyrne L, and Antunes F (2004) Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 6501-6506.
20. Brewster JL, de VT, Dwyer ND, Winter E, and Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.
22. Brombacher K, Fischer BB, Rufenacht K, and 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.
23. Brown JL, North S, and Bussey H (1993) SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol*, **175**, 6908-6915.
24. Brown MS and Goldstein JL (2009) Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res*, **50 Suppl**, S15-S27.
25. Carlson M (1999) Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 202-207.
26. Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, and Quindos G (2006) Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*, **19**, 130-139.
27. 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.
28. 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.

29. Clotet J, Escote X, Adrover MA, Yaakov G, Gari E, Aldea M, de NE, 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.
30. Clotet J and Posas F (2007) Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol*, **428**, 63-76.
31. Cooper JA (1994) MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr Biol*, **4**, 1118-1121.
32. Crauwels M, Donaton MC, Pernambuco MB, Winderickx J, de Winde JH, and Thevelein JM (1997) The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology*, **143 (Pt 8)**, 2627-2637.
33. Crowley JH, Leak FW, Jr., Shianna KV, Tove S, and Parks LW (1998) A mutation in a purported regulatory gene affects control of sterol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **180**, 4177-4183.
34. Davenport KD, Williams KE, Ullmann BD, and Gustin MC (1999) Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics*, **153**, 1091-1103.
35. Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, and Gustin MC (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem*, **270**, 30157-30161.
36. Davies BS and Rine J (2006) A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **174**, 191-201.
38. Davies BS, Wang HS, and Rine J (2005) Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol*, **25**, 7375-7385.
39. De Antoni A and Gallwitz D (2000) A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **246**, 179-185.
40. 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.
41. De Nadal E, Zapater M, Alepuz PM, Sumoy L, Mas G, and Posas F (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*, **427**, 370-374.
43. Defrance M, Janky R, Sand O, and van HJ (2008) Using RSAT oligo-analysis and dyad-analysis tools to discover regulatory signals in nucleic sequences. *Nat Protoc*, **3**, 1589-1603.
44. Dihazi H, Kessler R, and Eschrich K (2004) High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for

- glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, **279**, 23961-23968.
45. 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**, 1848-1859.
 46. Emter R, Heese-Peck A, and Kralli A (2002) ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms. *FEBS Lett*, **521**, 57-61.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Espenshade PJ and Hughes AL (2007) Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **41**, 401-427.
 50. Fabrizio P, Pletcher SD, Minois N, Vaupel JW, and Longo VD (2004) Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **557**, 136-142.
 51. Fassler JS, Gray WM, Malone CL, Tao W, Lin H, and Deschenes RJ (1997) Activated alleles of yeast SLN1 increase Mcm1-dependent reporter gene expression and diminish signaling through the Hog1 osmosensing pathway. *J Biol Chem*, **272**, 13365-13371.
 52. Feinberg AP and Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
 53. Feinberg AP and Vogelstein B (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem*, **137**, 266-267.
 54. Ferreira C, van VF, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt MC, Lucas C, and Brandt A (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **16**, 2068-2076.
 55. Ferrigno P, Posas F, Koepf 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.
 56. Gagiano M, van DD, Bauer FF, Lambrechts MG, and Pretorius IS (1999) Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **31**, 103-116.
 57. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, and Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, **11**, 4241-4257.

58. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, and Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
59. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, and Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.
60. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, and Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, **124**, 35-46.
61. 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.
62. Grishin AV, Rothenberg M, Downs MA, and Blumer KJ (1998) Mot3, a Zn finger transcription factor that modulates gene expression and attenuates mating pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **149**, 879-892.
63. Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, and Hegemann JH (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **30**, e23.
64. Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, and Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2519-2524.
65. Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, and Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1264-1300.
66. Hall JP, Cherkasova V, Elion E, Gustin MC, and Winter E (1996) The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a FUS3 mutant that is insensitive to the repression mechanism. *Mol Cell Biol*, **16**, 6715-6723.
67. Harbison CT, Gordon DB, Lee TI, Rinaldi NJ, Macisaac KD, Danford TW, Hannett NM, Tagne JB, Reynolds DB, Yoo J, Jennings EG, Zeitlinger J, Pokholok DK, Kellis M, Rolfe PA, Takusagawa KT, Lander ES, Gifford DK, Fraenkel E, and Young RA (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature*, **431**, 99-104.
68. He XJ and Fassler JS (2005) Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **58**, 1454-1467.
69. Heinisch JJ, Lorberg A, Schmitz HP, and Jacoby JJ (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **32**, 671-680.
70. Henneberry AL and Sturley SL (2005) Sterol homeostasis in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin Cell Dev Biol*, **16**, 155-161.

71. Herskowitz I (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, **80**, 187-197.
72. Hertz GZ, Hartzell GW, III, and Stormo GD (1990) Identification of consensus patterns in unaligned DNA sequences known to be functionally related. *Comput Appl Biosci*, **6**, 81-92.
73. Hickman MJ and Winston F (2007) Heme levels switch the function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between transcriptional activator and transcriptional repressor. *Mol Cell Biol*, **27**, 7414-7424.
74. Hirt H (2000) MAP kinases in plant signal transduction. *Results Probl Cell Differ*, **27**, 1-9.
75. Hohmann S (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 300-372.
77. Hohmann S, Krantz M, and Nordlander B (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol*, **428**, 29-45.
78. Hong HY, Yoo GS, and Choi JK (2000) Direct Blue 71 staining of proteins bound to blotting membranes. *Electrophoresis*, **21**, 841-845.
79. Hongay C, Jia N, Bard M, and Winston F (2002) Mot3 is a transcriptional repressor of ergosterol biosynthetic genes and is required for normal vacuolar function in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **21**, 4114-4124.
80. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, and Wang X (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11603-11607.
81. Ishtar Snoek IS and Yde SH (2007) Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **24**, 1-10.
82. Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 1511-1527.
83. Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, and Wold B (2007) Genome-wide mapping of *in vivo* protein-DNA interactions. *Science*, **316**, 1497-1502.
84. Johnson WE, Li W, Meyer CA, Gottardo R, Carroll JS, Brown M, and Liu XS (2006) Model-based analysis of tiling-arrays for ChIP-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12457-12462.
85. Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, Schneper L, Broach JR, and Tyers M (2004) A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev*, **18**, 2491-2505.
86. Jung US and Levin DE (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol*, **34**, 1049-1057.

87. Kaeberlein M, Powers RW, III, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, and Kennedy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science*, **310**, 1193-1196.
88. Karlgren S, Pettersson N, Nordlander B, Mathai JC, Brodsky JL, Zeidel ML, Bill RM, and Hohmann S (2005) Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmostress signaling. *J Biol Chem*, **280**, 7186-7193.
89. Kastaniotis AJ, Mennella TA, Konrad C, Torres AM, and Zitomer RS (2000) Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene ANB1 in yeast. *Mol Cell Biol*, **20**, 7088-7098.
90. Kent NA, Tsang JS, Crowther DJ, and Mellor J (1994) Chromatin structure modulation in *Saccharomyces cerevisiae* by centromere and promoter factor 1. *Mol Cell Biol*, **14**, 5229-5241.
91. Ketela T, Brown JL, Stewart RC, and Bussey H (1998) Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol Gen Genet*, **259**, 372-378.
92. Klinkenberg LG, Mennella TA, Luetkenhaus K, and Zitomer RS (2005) Combinatorial repression of the hypoxic genes of *Saccharomyces cerevisiae* by DNA binding proteins Rox1 and Mot3. *Eukaryot Cell*, **4**, 649-660.
93. Krantz M, Nordlander B, Valadi H, Johansson M, Gustafsson L, and Hohmann S (2004) Anaerobicity prepares *Saccharomyces cerevisiae* cells for faster adaptation to osmotic shock. *Eukaryot Cell*, **3**, 1381-1390.
95. Krems B, Charizanis C, and Entian KD (1996) The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr Genet*, **29**, 327-334.
96. Kuras L and Struhl K (1999) Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature*, **399**, 609-613.
97. Kyriakis JM and Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, **81**, 807-869.
98. Laroche M, Drouin S, Robert F, and Turcotte B (2006) Oxidative stress-activated zinc cluster protein Stb5 has dual activator/repressor functions required for pentose phosphate pathway regulation and NADPH production. *Mol Cell Biol*, **26**, 6690-6701.
99. Leak FW, Jr., Tove S, and Parks LW (1999) In yeast, upc2-1 confers a decrease in tolerance to LiCl and NaCl, which can be suppressed by the P-type ATPase encoded by ENA2. *DNA Cell Biol*, **18**, 133-139.
100. Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, and Toledano MB (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*, **274**, 16040-16046.

101. Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, Hannett NM, Harbison CT, Thompson CM, Simon I, Zeitlinger J, Jennings EG, Murray HL, Gordon DB, Ren B, Wyrick JJ, Tagne JB, Volkert TL, Fraenkel E, Gifford DK, and Young RA (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **298**, 799-804.
102. Li S, Ault A, Malone CL, Raitt D, Dean S, Johnston LH, Deschenes RJ, and Fassler JS (1998) The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J*, **17**, 6952-6962.
103. Li S, Dean S, Li Z, Horecka J, Deschenes RJ, and Fassler JS (2002) The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor, Skn7p. *Mol Biol Cell*, **13**, 412-424.
104. Lorenz MC and Heitman J (1998) Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics*, **150**, 1443-1457.
105. Lorenz RT and Parks LW (1991) Involvement of heme components in sterol metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids*, **26**, 598-603.
106. Los DA and Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 142-157.
107. Luo Z and van Vuuren HJ (2009) Functional analyses of PAU genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **155**, 4036-4049.
108. Lussier M, White AM, Sheraton J, di PT, Treadwell J, Southard SB, Horenstein CI, Chen-Weiner J, Ram AF, Kapteyn JC, Roemer TW, Vo DH, Bondoc DC, Hall J, Zhong WW, Sdicu AM, Davies J, Klis FM, Robbins PW, and Bussey H (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**, 435-450.
109. 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.
110. Marquez JA, Pascual-Ahuir A, Proft M, and Serrano R (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J*, **17**, 2543-2553.
111. Marquez JA and Serrano R (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett*, **382**, 89-92.
112. Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 82-89.
113. 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.

115. Martone R, Euskirchen G, Bertone P, Hartman S, Royce TE, Luscombe NM, Rinn JL, Nelson FK, Miller P, Gerstein M, Weissman S, and Snyder M (2003) Distribution of NF-kappaB-binding sites across human chromosome 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12247-12252.
117. Mas G, de NE, Dechant R, Rodriguez de la Concepcion ML, Logie C, Jimeno-Gonzalez S, Chavez 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.
118. McKinsey TA, Zhang CL, and Olson EN (2002) MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci*, **27**, 40-47.
119. Mendizabal I, Rios G, Mulet JM, Serrano R, and de Larrinoa IF (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett*, **425**, 323-328.
120. Mennella TA, Klinkenberg LG, and Zitomer RS (2003) Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot Cell*, **2**, 1288-1303.
121. Monteiro PT, Mendes ND, Teixeira MC, d'Orey S, Tenreiro S, Mira NP, Pais H, Francisco AP, Carvalho AM, Lourenco AB, Sa-Correia I, Oliveira AL, and Freitas AT (2008) YEASTRACT-DISCOVERER: new tools to improve the analysis of transcriptional regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **36**, D132-D136.
122. Morgan BA, Banks GR, Toone WM, Raitt D, Kuge S, and Johnston LH (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **16**, 1035-1044.
123. Morgan BA, Bouquin N, Merrill GF, and Johnston LH (1995) A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J*, **14**, 5679-5689.
124. Mukhopadhyay K, Kohli A, and Prasad R (2002) Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 3695-3705.
125. Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR, and Serrano R (1999) A novel mechanism of ion homeostasis and salt tolerance in yeast: the Hal4 and Hal5 protein kinases modulate the Trk1-Trk2 potassium transporter. *Mol Cell Biol*, **19**, 3328-3337.
126. Nal B, Mohr E, and Ferrier P (2001) Location analysis of DNA-bound proteins at the whole-genome level: untangling transcriptional regulatory networks. *Bioessays*, **23**, 473-476.
127. Nevitt T, Pereira J, and Rodrigues-Pousada C (2004) YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **21**, 1365-1374.
128. Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D, Umansky L, Gerstein MB, and Snyder M (2009a) Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev*, **23**, 1351-1363.

130. Nicol JW, Helt GA, Blanchard SG, Jr., Raja A, and Loraine AE (2009) The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics*, **25**, 2730-2731.
131. O'Rourke SM and Herskowitz I (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **12**, 2874-2886.
132. Palecek SP, Parikh AS, and Kron SJ (2000) Genetic analysis reveals that FLO11 upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **156**, 1005-1023.
133. Pascual-Ahuir A, Posas F, Serrano R, and Proft M (2001a) Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem*, **276**, 37373-37378.
134. Pascual-Ahuir A and Proft M (2007a) The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *EMBO J*, **26**, 3098-3108.
136. Pascual-Ahuir A, Serrano R, and Proft M (2001b) The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21**, 16-25.
137. 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.
139. Pedruzzi I, Dubouloz F, Cameroni E, Wanke V, Roosen J, Winderickx J, and De VC (2003) TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell*, **12**, 1607-1613.
140. Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB, and Young RA (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science*, **313**, 533-536.
142. Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de NE, and Arino J (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem*, **275**, 17249-17255.
143. Posas F, Takekawa M, and Saito H (1998) Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 175-182.
144. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, and Saito H (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, **86**, 865-875.
145. Proft M, Gibbons FD, Copeland M, Roth FP, and Struhl K (2005) Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **4**, 1343-1352.
146. Proft M, Mas G, de NE, 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.

147. Proft M, Pascual-Ahuir A, de NE, Arino 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*, **20**, 1123-1133.
148. 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.
149. 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. *Mol Cell*, **9**, 1307-1317.
150. Proft M and Struhl K (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*, **118**, 351-361.
151. Qi M and Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci*, **118**, 3569-3572.
152. Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, and Johnston LH (2000) The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell*, **11**, 2335-2347.
153. 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.
154. Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, Zeitlinger J, Schreiber J, Hannett N, Kanin E, Volkert TL, Wilson CJ, Bell SP, and Young RA (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, **290**, 2306-2309.
155. Rep M, Albertyn J, Thevelein JM, Prior BA, and Hohmann S (1999a) Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **145 (Pt 3)**, 715-727.
156. Rep M, Krantz M, Thevelein JM, and 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.
158. 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.
159. Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G, and Ruis H (1999b) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol*, **19**, 5474-5485.
161. Rios G, Ferrando A, and Serrano R (1997) Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 515-528.

162. Rodriguez-Navarro A (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, **1469**, 1-30.
163. Schmidt D, Stark R, Wilson MD, Brown GD, and Odom DT (2008) Genome-scale validation of deep-sequencing libraries. *PLoS One*, **3**, e3713.
164. Schmitt AP and 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.
165. Schuller 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*, **13**, 4382-4389.
166. Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, Koller D, and Friedman N (2003) Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genet*, **34**, 166-176.
167. Serrano R (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol*, **165**, 1-52.
168. Serrano R and Rodriguez-Navarro A (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 399-404.
170. Sertil O, Kapoor R, Cohen BD, Abramova N, and Lowry CV (2003) Synergistic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5831-5837.
172. Sertil O, Vemula A, Salmon SL, Morse RH, and Lowry CV (2007) Direct role for the Rpd3 complex in transcriptional induction of the anaerobic DAN/TIR genes in yeast. *Mol Cell Biol*, **27**, 2037-2047.
173. Shianna KV, Dotson WD, Tove S, and Parks LW (2001) Identification of a UPC2 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* and its involvement in aerobic sterol uptake. *J Bacteriol*, **183**, 830-834.
174. Simon I, Barnett J, Hannett N, Harbison CT, Rinaldi NJ, Volkert TL, Wyrick JJ, Zeitlinger J, Gifford DK, Jaakkola TS, and Young RA (2001) Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*, **106**, 697-708.
175. Smith RL and Johnson AD (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, **25**, 325-330.
176. Sturley SL (2000) Conservation of eukaryotic sterol homeostasis: new insights from studies in budding yeast. *Biochim Biophys Acta*, **1529**, 155-163.
177. Tafforeau L, Le BS, Bamps S, Dewez M, Vandenhoute J, and Hermand D (2006) Repression of ergosterol level during oxidative stress by fission yeast F-box protein Pof14 independently of SCF. *EMBO J*, **25**, 4547-4556.

-
178. Tamas MJ, Luyten K, Sutherland FC, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior BA, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, and Hohmann S (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol*, **31**, 1087-1104.
 179. 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.
 181. Tautz D and Renz M (1983) An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem*, **132**, 14-19.
 182. 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.
 183. Teixeira MC, Monteiro P, Jain P, Tenreiro S, Fernandes AR, Mira NP, Alenquer M, Freitas AT, Oliveira AL, and Sa-Correia I (2006) The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **34**, D446-D451.
 184. Theodorou E, Dalembert G, Heffelfinger C, White E, Weissman S, Corcoran L, and Snyder M (2009) A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as a bifunctional regulator of neuronal differentiation. *Genes Dev*, **23**, 575-588.
 185. Thomas-Chollier M, Sand O, Turatsinze JV, Janky R, Defrance M, Vervisch E, Brohee S, and van HJ (2008) RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **36**, W119-W127.
 186. Thorsen M, Di Y, Tangemo C, Morillas M, Ahmadpour D, Van der Does C, Wagner A, Johansson E, Boman J, Posas F, Wysocki R, and Tamas MJ (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol Biol Cell*, **17**, 4400-4410.
 187. Toda T, Cameron S, Sass P, and Wigler M (1988) SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev*, **2**, 517-527.
 188. Tornow J, Zeng X, Gao W, and Santangelo GM (1993) GCR1, a transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*, complexes with RAP1 and can function without its DNA binding domain. *EMBO J*, **12**, 2431-2437.
 189. Treger JM, Schmitt AP, Simon JR, and McEntee K (1998) Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 26875-26879.
 190. Turatsinze JV, Thomas-Chollier M, Defrance M, and van HJ (2008) Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc*, **3**, 1578-1588.

191. Uesono Y and Toh E (2002) Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J Biol Chem*, **277**, 13848-13855.
192. 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.
193. van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, and Konings WN (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*, **59**, 304-322.
194. Vik A and Rine J (2001) Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **21**, 6395-6405.
195. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, and Goldstein JL (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, **77**, 53-62.
196. Warringer J and Blomberg A (2006) Involvement of yeast YOL151W/GRE2 in ergosterol metabolism. *Yeast*, **23**, 389-398.
197. Watson AD, Edmondson DG, Bone JR, Mukai Y, Yu Y, Du W, Stillman DJ, and Roth SY (2000) Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev*, **14**, 2737-2744.
198. Welihinda AA, Beavis AD, and Trumbly RJ (1994) Mutations in LIS1 (ERG6) gene confer increased sodium and lithium uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1193**, 107-117.
199. Westfall PJ, Ballon DR, and Thorner J (2004) When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science*, **306**, 1511-1512.
200. Wilcox LJ, Balderes DA, Wharton B, Tinkelenberg AH, Rao G, and Sturley SL (2002) Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J Biol Chem*, **277**, 32466-32472.
201. Wood JM (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 230-262.
202. Yale J and Bohnert HJ (2001) Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *J Biol Chem*, **276**, 15996-16007.
203. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, and Brown MS (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, **75**, 187-197.
204. Yu L and Morse RH (1999) Chromatin opening and transactivator potentiation by RAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 5279-5288.

-
205. Yu L, Sabet N, Chambers A, and Morse RH (2001) The N-terminal and C-terminal domains of RAP1 are dispensable for chromatin opening and GCN4-mediated HIS4 activation in budding yeast. *J Biol Chem*, **276**, 33257-33264.
 206. 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.
 207. Zapater M, Sohrmann M, Peter M, Posas F, and de NE (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.
 208. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, and Liu XS (2008) Model-based analysis of CHIP-Seq (MACS). *Genome Biol*, **9**, R137.
 209. Zhu X, Gerstein M, and Snyder M (2007) Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes Dev*, **21**, 1010-1024.

Comunicaciones en congresos:

210. Georis I, (2010) "Gene and inducer-specific recruitment profiles of GATA factors at nitrogen catabolite sensitive gene loci". En: EMBO Conference on Gene Transcription in Yeast 2010, (San Feliu de Guixols 19-24 junio 2010).

Tesis Doctorales:

211. Noriega N, (2009). The Rtg1 and Rtg3 proteins are novel transcription factors regulated by the yeast hog1 mapk upon osmotic stress. (Tesis doctoral - Universidad Pompeu Fabra), [En línea]. Disponible en: <http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0714109-102158/index.html>. [Consulta: 2 noviembre 2010].

DATOS SUPLEMENTARIOS

1. Listas de oligonucleótidos empleados en este trabajo

- A. Etiquetado de proteínas con epitopos myc o HA
- B. PCR cuantitativa en tiempo real
- C. Diseño de sondas de DNA para Northern Blot
- D. Técnicas de interrupción génica

2. Análisis fenotípico de factores de transcripción

3. Perfiles de expresión de genes *ERG* bajo estrés salino

4. Análisis de proteínas fusionadas con epitopos

5. Localización genómica de Hot1p (ChIP-Chip)

- A. Lista de regiones intergénicas más enriquecidas
- B. Análisis de falsos positivos

6. Localización genómica de Mot3p (ChIP-Chip)

1. Listas de oligonucleótidos empleados en este trabajo

A. Etiquetado de proteínas con epítopos myc o HA

Los factores de transcripción Ecm22p, Gat2p, Mga1p, Msn1p, Msn2p, Msn4p, Rtg1p, Rox1p y Smp1p han sido etiquetados con epítopos y verificados al menos por PCR gracias al diseño de los oligonucleótidos mostrados en la tabla siguiente. Los factores de transcripción Hot1p, Mot3p y Rtg3p no pudieron ser etiquetados y verificados correctamente en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición	Descripción
MSN1TAG1	ATTGGTTGGTTATGCCACAGTTC TCATATTCCAGAGACTTTGAAGT <u>CCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MSN1</i>
MSN1TAG2	CACTTTAAAGGAAAGTCCAATTA TTAATTTATTAAGAAAAGCATAA <u>CTATAGGGGAGACCGGCAGATC</u>	52 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MSN1</i>
MSN1TAG3	CACACTCTGTGATGGAGGTT	870 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>MSN1</i>
MSN4TAG1	AATTTATCACAACATCTAAAAAC TCACAAAAAGCACGGTGATTTT <u>CCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MSN4</i>
MSN4TAG2	TGTTTTGTAAACTGAGGAAGAA AGAATATTATTTCTCCGAAAAC <u>ACTATAGGGGAGACCGGCAGATC</u>	51 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MSN4</i>
MSN4TAG3	CAATGGTAAGGTTCTGTCC	1654 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>MSN4</i>
MSN2TAG1	AATTTGTCGCAACACATCAAGAC TCATAAAAAACATGGAGACATT <u>CCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MSN2</i>
MSN2TAG2	CATGATAATAATAACAATAAGCC GTAAGCTTCATAAGTCATTGAAA <u>CTATAGGGGAGACCGGCAGATC</u>	51 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MSN2</i>
MSN2TAG3	TGGCAATGGTGCTGGGGTTA	1840 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>MSN2</i>
HOT1TAG1	AAGAAAAGAACCATTGGCTGGT TGCAAGAGAGCCTTGCTGGAAT <u>ATCCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>HOT1</i>
HOT1TAG2	TAACGATTTTTGTAGATTTACAG AATGTATTTATGTTACACTTGTA <u>C</u>	51 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>HOT1</i>

Datos suplementarios

	<u>TATAGGGAGACCGGCAGATC</u>		
HOT1TAG3	GGATATTGAAGGCTCCCACT	1872 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>HOT1</i>
SMP1TAG1	GCTAGTTCAACTTTGAAATCCAC GAGTTCGACAACTCTCCAGATI <u>CCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>SMP1</i>
SMP1TAG2	CCTAATTTAGAAGACGTTTGCCT AAATGCGCCAACATACACTCTTA <u>CTATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	52 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>SMP1</i>
SMP1TAG3	GAACCGCATCACCGAAAACG	1080 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>SMP1</i>
RTG1TAG1	AGCTCCTTCGAGTACGGAGGGT ATGGTGAGTACGGTAATGGTAG <u>CTCCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>RTG1</i>
RTG1TAG2	GAAGAGAAGTGTTTCGTACTACT ACCAACGAGGGTTATCACAACAT <u>ACTATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	27 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>RTG1</i>
RTG1TAG3	CACACAGAACAGAGAGGAGG	302 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>RTG1</i>
MOT3TAG1	GACGTAACACGTGTTTTGAATAA CCTTATTGTTAGTCACAACAAAT <u>CCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MOT3</i>
MOT3TAG2	TATATGCATAATTACTTTCTAAAT TTGTCATTACTATTATCTACT <u>ATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	50 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MOT3</i>
MOT3TAG3	GTCACACTCGAACAAGAC	1096 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>MOT3</i>
MGA1TAG1	CCTATAATCACGAAAGGTGAAG TCGCCACTAAACCAGCATCTTAC <u>TCCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MGA1</i>
MGA1TAG2	TGTTTCGTTCTTCCCTACGTTCACT GAATGTTCTTGGTATCAACAAC <u>TATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	49 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>MGA1</i>
MGA1TAG3	CCTTCGAACAAGCTTATCCC	1151 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>MGA1</i>
GAT2TAG1	GATAATGATCAAACGTTGGACTION TGAGTATAATACGATATTGCAAT <u>CCCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>GAT2</i>
GAT2TAG2	GGGGGTAAAAATGTGTTATGTA AGATGTACGTACGTAATGGATAT <u>ACTATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	21 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>GAT2</i>
GAT2TAG3	GACCGAGACTCCAGAATGGA	1430 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>GAT2</i>
ROX1TAG1	AGCAACACTGAGGTCACCGCTA AAACTAGCCTAGTTTCCCACCAC	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>ROX1</i>

	<u>CATCATCATCAC</u>		
ROX1TAG2	ATTAAACAGGAGCCAAATGCAT AAATTTTATAGTTAAAGGGAATAT <u>ACTATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	43 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>ROX1</i>
ROX1TAG3	CAACGTCGCTCAAGCTCAAC	650 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>ROX1</i>
ECM22TAG1	GGTGGGTTACCTTCTATGACCAC TACAAACTTTTCAGCTTTTATGTC <u>CCACCACCATCATCATCAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>ECM22</i>
ECM22TAG2	GTATAAGTATCCATTTCTTTTGT GGATTCTCAAATGGCCAGACT <u>ATAGGGAGACCGGCAGATC</u>	96 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>ECM22</i>
ECM22TAG3	TCCTGCTCTTTGGATAGGA	2180 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>ECM22</i>
RTG3TAG1	GACAACTCTAATCCAGCTGACTA TCTTTTAGAATTTGGTTTCGGGC <u>GTACGCTGCAGGTCGAC</u>	Justo antes del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>RTG3</i>
RTG3TAG2	TGACCTTTTCAAATTTAATTTT TCCCGCTAATAAGACCATAAAAT <u>CGATGAATTCGAGCTCC</u>	47 nucleótidos después del codón de parada	Etiquetado del extremo C terminal de <i>RTG3</i>
RTG3TAG3	ATTGCACAATTGGGAGCCAC	1250 nucleótidos después del codón de iniciación	Confirmación del marcaje del extremo C terminal de <i>RTG3</i>
KAN1	GTTGGAATTTAATCGCGCCTC	Región 5' del marcador KAN	Confirmación de la inserción KAN

Tabla 12. Oligonucleótidos empleados para el etiquetado de factores de transcripción con myc o HA y posterior confirmación de la fusión.

B. PCR cuantitativa en tiempo real

A continuación se muestra las listas completas de las parejas de oligonucleótidos diseñadas para determinar por PCR la posible unión de factores de transcripción a sitios específicos del genoma. Los oligonucleótidos fueron diseñados en la región del promotor de los genes problema (el símbolo negativo indica que están diseñados en la región promotora). Como control interno se utilizó oligonucleótidos específicos de la región codificante del gen *POL1* (+1796,+1996).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Posición
GRE2-850	TCGGACCAGATAAGAATGAGCAGCC	-850 pb en el promotor de <i>GRE2</i>
GRE2-671	TTGGAAGAAACAAGCTGCAGAACAAG	-671 pb en el promotor de <i>GRE2</i>
GRE2-177	CGGAATTTTCTCGCGGAAGTAGATC	-177 pb en el promotor de <i>GRE2</i>
GRE2-42	GTACACGTTATATCAACGCTACAGAG	-42 pb en el promotor de <i>GRE2</i>
CTT1-ChIP1	AGACCGCGGACGGCCCTCTTTTCA	-345 pb, en el promotor de <i>CTT1</i>
CTT1-ChIP2	GGCATTATCGGCTAGGCTAGCCTGC	-170 pb, en el promotor de <i>CTT1</i>
DDR2-ChIP1	GCTCAAAGTTTATGCCCGATGTC	-255 pb, en el promotor de <i>DDR2</i>
DDR2-ChIP2	CGTGCTTGCTGGAGGGCTTTTCAG	-22 pb, en el promotor de <i>DDR2</i>
STL1-ChIP1	GCTTGGCTGCTTCGCGATAGTAGTA	-316 pb, en el promotor de <i>STL1</i>
STL1-ChIP2	CTCCTGAACTGCAATTCTGACCCCTC	-126 pb, en el promotor de <i>STL1</i>
BGL2-ChIP1	TGCAATTCCTGCTCCGTACCCCA	-357 pb, en el promotor de <i>BGL2</i>
BGL2-ChIP2	CGTGACATTTTTCTTTTTTCAGGGCG	-148 pb, en el promotor de <i>BGL2</i>
CWP1-ChIP1	GTGTGCTCGACCTTCTATCCCGTTA	-485 pb, en el promotor de <i>CWP1</i>
CWP1-ChIP2	TTCGAGATGGCTCTCCTGGAGTAAG	-255 pb, en el promotor de <i>CWP1</i>
GRE2-310	CATTTCAACAATTGGCCCTCACCTC	-310 pb promotor <i>GRE2</i> , sitio CRE
GRE2-153	GATCTACTTCCGCGAGAAAATCCG	-153 pb promotor <i>GRE2</i> , sitio CRE
STL1-678	TGCCGTTGTCCCACTATTCCACCGC	-678 pb promotor <i>STL1</i> , sitio CRE
STL1-485	AGAGCCGCTCGAACAGGCGACGTAG	-485 pb promotor <i>STL1</i> , sitio CRE
STL1-703	ATAACGGACGTACGGACGAA	-703 pb promotor <i>STL1</i> , sitio CRE
STL1-423	GACGTAGTGGATGGCTGGAC	-423 pb promotor <i>STL1</i> , sitio CRE
GRE2-301	AATTGGCCCTCACCTCTTTT	-301 pb promotor <i>GRE2</i> , sitio CRE
GRE2-121	TTGATCGGACTTTTTCTTTTTT	-121 pb promotor <i>GRE2</i> , sitio CRE
CTT1-486	GAGGCACATGGCGATAGAAC	-486 pb promotor <i>CTT1</i> , sitio STRE
CTT1-329	GAGGAAACAATACGCAATTTAC	-329 pb promotor <i>CTT1</i> , sitio STRE
GPD1CHIP1	CCCACCCACACCAATACGTAAA	-363 pb en el promotor <i>GPD1</i>
GPD1CHIP2	CTGCCAATACCAAGCCAGTCTACGT	-165 pb en el promotor <i>GPD1</i>

ERG2CHIP2	CGGTTACGTTTCGATACCTTCACTAC	-492 en el promotor de <i>ERG2</i>
ERG2CHIP1	GCTTATACGAGGGCCGTGGTTCGAT	-226 en el promotor de <i>ERG2</i>
ERG6CHIP1	GGGCCCAAATTGTTACCCGCACCCA	-575 en el promotor de <i>ERG6</i>
ERG6CHIP2	CTCCTCACTTACTCTCGCTTCTCGA	-326 en el promotor de <i>ERG6</i>
BGL2-538	CAAAGCTACCATACATCGCAA	-538 pb en el promotor de <i>BGL2</i>
BGL2-375	GAATTGCAGTTGACCAGAAAAG	-375 pb en el promotor de <i>BGL2</i>
ERG6-401	AAAATTTAGGGCCGAACAAAG	-401 pb en el promotor de <i>ERG6</i>
ERG6-276	GTACCATTGAGACGAAGTGGAG	-276 pb en el promotor de <i>ERG6</i>
ERG6-498	CGCACCCAGAAAAAGAAAAG	-498 en el promotor de <i>ERG6</i>
ERG6-305	TTATCGGAAACGGCAGTAAA	-305 pb en el promotor de <i>ERG6</i>
CTT1-1118	CCAATGGACATAA(AG)GCAACAA	-1118 pb en el promotor de <i>CTT1</i>
CTT1-948	TCTTCCAAGCATCTCATAAACCC	-948 pb en el promotor de <i>CTT1</i>
GRE2-900	GGCAAACGAACAAAAGTACAAA	-900 pb en el promotor de <i>GRE2</i>
GRE2-701	TTCCAGGAAGTGCAAAGAG	-701 pb en el promotor de <i>GRE2</i>
CWP1-515	ACATTGTGTGCTCGACCTTCT	-701 pb en el promotor de <i>CWP1</i>
CWP1-362	GAGCTGTGGCTAACGCTATTTT	-362 pb en el promotor de <i>CWP1</i>
DDR2-275	AAGGTTTATGCCCGATGTTCTT	-275 pb en el promotor de <i>DDR2</i>
DDR2-78	AACCAAAGAATGGAGTTATGTG	-78 pb en el promotor de <i>DDR2</i>
STL1-485	GAGCGGCTCTGTTCGTTG	-485 pb en el promotor de <i>STL1</i>
STL1-292	TACCGGGATCTGCACTTCT	-292 pb en el promotor de <i>STL1</i>
ERG9-400	GCTATTGGAATCGGCAGAGA	-400 pb en el promotor de <i>ERG9</i>
ERG9-197	AGGGCAAAGCAAATAGGATG	-197 pb en el promotor de <i>ERG9</i>
GPD1-411	TGTCCTCAGAAACAAATCAAA	-411 pb en el promotor de <i>GPD1</i>
GPD1-238	GCGGAAAAAGGGACAAAATAG	-238 pb en el promotor de <i>GPD1</i>
CIT2-423	GGTATCTCAAAAGAGCGCAA	-423 pb en el promotor de <i>CIT2</i>
CIT2-207	CGAATGTAACGCTCAAAGG	-207 pb en el promotor de <i>CIT2</i>
CIT1-429	TTTTTACGTTACATTGCCTTT	-429 pb en el promotor de <i>CIT1</i>
CIT1-279	TTGCGATCCTCAATAACAC	-279 pb en el promotor de <i>CIT1</i>
ACO1-470	GGCTTTAATGAATGACGCCG	-470 pb en el promotor de <i>ACO1</i>
ACO1-291	TCAGGACCTTTGCCGATTC	-291 pb en el promotor de <i>ACO1</i>
ECM22-314	GTCGTAATCATTGTTCTTCGACTT	-314 pb en el promotor de <i>ECM22</i>
ECM22-107	CTTTGAAAAGTGGAGGTCTGGT	-107 pb en el promotor de <i>ECM22</i>
ERG11-251	TCCCTTAGTTTTCTTATCCCTCTT	-251 pb en el promotor de <i>ERG11</i>
ERG11-114	GAAAATACACACGCTGAACGATAC	-114 pb en el promotor de <i>ERG11</i>
ECM22-226	TTTTGTTACGATTGGGGAAAAG	-226 pb en el promotor de <i>ECM22</i>
ECM22-253	TCTAATAGTTTATTTCCCTTGTTTT	-253 pb en el promotor de <i>ECM22</i>
GPD1-296	CTTGCTTCTCTCCCTTCTCT	-296 pb en el promotor de <i>GPD1</i>
GPD1 -213	TGAACCCATTCTGATACTTGTTG	-213 pb en el promotor de <i>GPD1</i>

CTT1-158	CCTGGACACATTGTGCATT	-158 pb en el promotor de <i>CTT1</i>
CTT1-61	GGCAAGTAACGACAAGATTGAG	-61 pb en el promotor de <i>CTT1</i>
STL1-249	GGGCATTTCGTAACAAAAAGG	-249 pb en el promotor de <i>STL1</i>
STL1-162	AGCGTTGAAGGGGACAAAA	-162 pb en el promotor de <i>STL1</i>
ERG2-160	CGGTGCTATCGTTCTCGTTT	-160 pb promotor <i>ERG2</i> , caja TATA
ERG2-64	CAAACGTTACCGTCTCTTCTC	-64 pb promotor <i>ERG2</i> , caja TATA
ERG11-129	CAGCGTGTGTATTTTCGATAGG	-129 pb promotor <i>ERG11</i> , caja TATA
ERG11-38	TGCTGCAATTGTGAAGGAAA	-38 pb promotor <i>ERG11</i> , caja TATA
ERG11-672	ATGAGGCCAGCCTTTATTC	-672 pb promotor <i>ERG11</i> , sitio SRE
ERG11-482	TCTTAGTTTCGTTTCGTTTC	-482 pb promotor <i>ERG11</i> , sitio SRE
ERG3 -367	TTATTTTCGTCGTTTAGTTG	-367 pb promotor <i>ERG3</i> , sitio SRE
ERG3 -217	ATCGCTGCTGAACCTCTT	-217 pb promotor <i>ERG3</i> , sitio SRE
ERG2 -289	TCTGCTATGTTGATTCTGCT	-289 pb promotor <i>ERG2</i> , sitio SRE
ERG2 -104	CAGATCTATCCAAATCTTCC	-104 pb promotor <i>ERG2</i> , sitio SRE
ERG2-231	GCACATTCCTGCCCTTAC	-231 pb promotor <i>ERG2</i> , sitio SRE
ERG3-329	GTGTATACGAGGCCGATG	-329 pb promotor <i>ERG3</i> , sitio SRE
ERG11-533	GTCTCGTTTTTCGTGGATT	-533 pb promotor <i>ERG11</i> , sitio SRE
POL1+1796	CTGCACTGGCAAACAGAAA	+1796 pb en el ORF de <i>POL1</i>
POL1+1996	GACGGCCAATAGAGCTGAAC	+1996 pb en el ORF de <i>POL1</i>

Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para verificar promotores blanco de factores de transcripción bajo la ruta HOG.

THO1-474	GGGAGAGGGTATAACATTGA	-475 pb en el promotor de <i>THO1</i>
THO1-357	CGTTCITTAAGGACAGAG	-357 pb en el promotor de <i>THO1</i>
YGR131W-189	ACAGGCAAGTGGGAAGTAG	-189 pb en el promotor de <i>YGR131W</i>
YGR131W-89	ATCGCAAGAAGGATTTACT	-89 pb en el promotor de <i>YGR131W</i>
STL1-993	TCTGAAATACTCCTTTTACAACC	-993 pb en el promotor de <i>STL1</i>
STL1-855	GTATATGATTGTGGGGCATTG	-855 pb en el promotor de <i>STL1</i>
HOR2-544	TACCGTAGCGTACGATTTG	-544 pb en el promotor de <i>HOR2</i>
HOR2-424	CGATATTAGAGAGAAGAGTTTGG	-424 pb en el promotor de <i>HOR2</i>
DIA3-687	GACGAAAATTCAAATCA	-687 pb en el promotor de <i>DIA3</i>
DIA3-551	CCTTAGCATGGGAGAGGT	-551 pb en el promotor de <i>DIA3</i>
SPC42-540	TTTACGGTCGAACCTCTGT	-540 pb en el promotor de <i>SPC42</i>
SPC42-392	CGTGGTGAAAAGACTCTAA	-392 pb en el promotor de <i>SPC42</i>
BUD6-984	CTTTTGCAACGACTTTTCC	-984 pb en el promotor de <i>BUD6</i>
BUD6-876	ACAGAATACTCAAATGACGAAG	-876 pb en el promotor de <i>BUD6</i>
UTP8-171	TTCTACACGGAAATGTCTGTATTTT	-171 en el promotor de <i>UTP8</i>
UTP8-73	ATTTAACAGTGACCTCATCTCATC	-73 pb en el promotor de <i>UTP8</i>

ATG23-240	GTAAGCTCTGGCGTTTAGGT	-240 pb en el promotor de <i>ATG23</i>
ATG23-104	CACTTTTCCATTCTTAGGC	-104 pb en el promotor de <i>ATG23</i>
CLB6-746	ACGTTTCAGGGTGACGTATT	-746 pb en el promotor de <i>CLB6</i>
CLB6-621	ATCGAACTAAGGACCAACAG	-621 pb en el promotor de <i>CLB6</i>
YHR202W-289	GCACTAACTTGAAAGCAGGA	-289 en el promotor de <i>YHR202W</i>
YHR202W-176	AGAAATGTTTCATTATGCTTGT	-176 pb en el promotor de <i>YHR202W</i>
YGR111W-143	AACACTAGCACTTGAAAGAAC	-143 pb en el promotor de <i>YGR111W</i>
YGR111W-43	AGTAGCTAACAGAAGAAGTATAAAG	-43 pb en el promotor de <i>YGR111W</i>
GPM2-712	GTACACCTTCCGCATT	-712 pb en el promotor de <i>GPM2</i>
GPM2-581	AAGGTGTGGCACTTTGTTT	-518 pb en el promotor de <i>GPM2</i>
MDR1-221	CTGTCAGCGTCGTTAGTATTT	-221 pb en el promotor de <i>MDR1</i>
MDR1-118	ATTTGTTTCAGGCCTTTTCTT	-118 pb en el promotor de <i>MDR1</i>
BOP2-983	TAGTGCATTTCAGGAAGTGGT	-983 pb en el promotor de <i>BOP2</i>
BOP2-844	TCGGTTTTAGGTGATAATGG	-844 pb en el promotor de <i>BOP2</i>
SNF1-281	GGGCTTAGTACTGTAGGCTTG	-281 pb en el promotor de <i>SNF1</i>
SNF1-176	CTTCCTGAATGACTGTTTGG	-176 pb en el promotor de <i>SNF1</i>
YGR110W-142	GATAATCCCCGAAATATGCT	-142 pb en el promotor de <i>YGR110W</i>
YGR110W-39	GTACCTTCCGTTATCCTTGT	-39 pb en el promotor de <i>YGR110W</i>
SYF2-630	GGGTGTTGATAGTCTTCTCGT	-630 pb en el promotor de <i>SYF2</i>
SYF2-451	TCGATTACCCAATACCCTCT	-451 pb en el promotor de <i>SYF2</i>

Tabla 14. Oligonucleótidos empleados para verificar por PCR cuantitativa la unión de Hot1p en regiones intergénicas de levadura.

C. sondas de DNA para análisis *Northern*

Con el fin de dilucidar la contribución de los factores de transcripción estudiados en este trabajo a la expresión a nivel de los mRNA de diversos genes, se diseñó sondas de DNA dentro de las regiones codificantes de éstos. Los oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos de interés se describen en la tabla siguiente. El gen *ACT1* se utilizó como control constitutivo.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
GRE2-1	GAGGCCTTTGGTAACAACCC	+115 pb en el ORF de <i>GRE2</i>
GRE2-2	GTAATCTGGCCTCCGATACG	+812 pb en el ORF de <i>GRE2</i>
STL1-1	GGCGATCATGACAGACACGCAAC	+205 pb en el ORF de <i>STL1</i>
STL1-2	CCATGGTAATGATAGCAAAGAC	+1227 pb en el ORF de <i>STL1</i>
CTT1-1	GGTACACCAGACTGCAAGAG	+361 pb en el ORF de <i>CTT1</i>
CTT1-2	GGCATCAACAATATGCTCGTTTC	+1431 pb en el ORF de <i>CTT1</i>
RTG1Nor1	TTCCGCTGGCACTGATCCT	+10 pb en el ORF de <i>RTG1</i>
RTG1Nor2	TGCTGGCGGTCTTACTGAGT	+457 pb en el ORF de <i>RTG1</i>
RTG3Nor1	GAGGCTGAGAACCAACGTCT	+19 pb en el ORF de <i>RTG3</i>
RTG3Nor2	CGGCTTCAATCAAATCGCCT	+1364 pb en el ORF de <i>RTG3</i>
ERG2Nor1	CACTACCTGGTTGCCAACCA	+62 pb en el ORF de <i>ERG2</i>
ERG2Nor2	TCTTACCCATGTCCTGGCA	+623 pb en el ORF de <i>ERG2</i>
ERG6Nor1	GACAGGCCCAATTCCTAGG	+25 pb en el ORF de <i>ERG6</i>
ERG6Nor2	TTTCTGGCTTCTAGCGACG	+1088 pb en el ORF de <i>ERG6</i>
ERG9Nor1	GGCATTGCATCCGGTCGAGA	+20 pb en el ORF de <i>ERG9</i>
ERG9Nor2	CTTCTGTTGGGTTGGAACC	+1229 pb en el ORF de <i>ERG9</i>
ERG11nor1	TTGAGAAAGGACCGTCCACC	+150 pb en el ORF de <i>ERG11</i>
ERG11nor2	CTGACACCCTTAGAAATGGC	+1360 pb en el ORF de <i>ERG11</i>
ECM22NOR1	GCCACATGTTGGTACTGATG	+410 pb en el ORF de <i>ECM22</i>
ECM22NOR2	CTAGACAGCCCAGCTAATTC	+1470 pb en el ORF de <i>ECM22</i>
CCP1Nor1	TCTACCTGTTCTCCGCTGC	+61 pb en el ORF de <i>CCP1</i>
CCP1Nor2	ACTTGTCTGGCTATTAGCG	+953 pb en el ORF de <i>CCP1</i>
ERG3Nor1	GTCTTAGACGACTTGACGC	+33 pb en el ORF de <i>ERG3</i>
ERG3Nor2	ATCATCACCTTCGACCTCCT	+1030 pb en el ORF de <i>ERG3</i>
ERG5Nor1	GGTTTGGGACCAACTGCAT	+170 pb en el ORF de <i>ERG5</i>
ERG5Nor2	AAGCAAACGTGTGGACCACA	+1410 pb en el ORF de <i>ERG5</i>
ERG25Nor1	GCCGCATGGTACAGTTACAT	+130 pb en el ORF de <i>ERG25</i>

ERG25Nor2	TCTGGACCAGATTCAGTGTC	+840 pb en el ORF de <i>ERG25</i>
GPD1+38	GCCACTTGAATGCTGGTAGA	+38 pb en el ORF de <i>GPD1</i>
GPD1+1020	ACCTTGAGCGGATTGGCCAT	+1020 pb en el ORF de <i>GPD1</i>
DIA3+62	TCCCACTCAGAAGTTTTGCG	+62 pb en el ORF de <i>DIA3</i>
DIA3+1310	TCATAGAAGCTCACACCTCG	+1310 pb en el ORF de <i>DIA3</i>
HOR2+45	TTTGTTGACGTCGACGGTA	+45 pb en el ORF de <i>HOR2</i>
HOR2+750	CCATTTCAACAGATCGTGCT	+750 pb en el ORF de <i>HOR2</i>
THO1+17	CCCTTACTGTTGTTCAATTG	+17 pb en el ORF de <i>THO1</i>
THO1+633	TTCTGTAACCAGAGCGGTTG	+633 pb en el ORF de <i>THO1</i>
GPM2+11	GCACACGATCCAATGTCATG	+11 pb en el ORF de <i>GPM2</i>
GPM2+881	CTCAGCATTGATCTTAGCAG	+881 pb en el ORF de <i>GPM2</i>
ACT1-1	ATTGAACACGGTATTGTCACCAAC	+518 pb en el ORF de <i>ACT1</i>
ACT1-2	CCTTACGGACATCGACATCACAC	+1182 pb en el ORF de <i>ACT1</i>

Tabla 15. Oligonucleótidos empleados en el diseño de sondas de DNA para análisis *Northern*.

D. Técnicas de disrupción génica

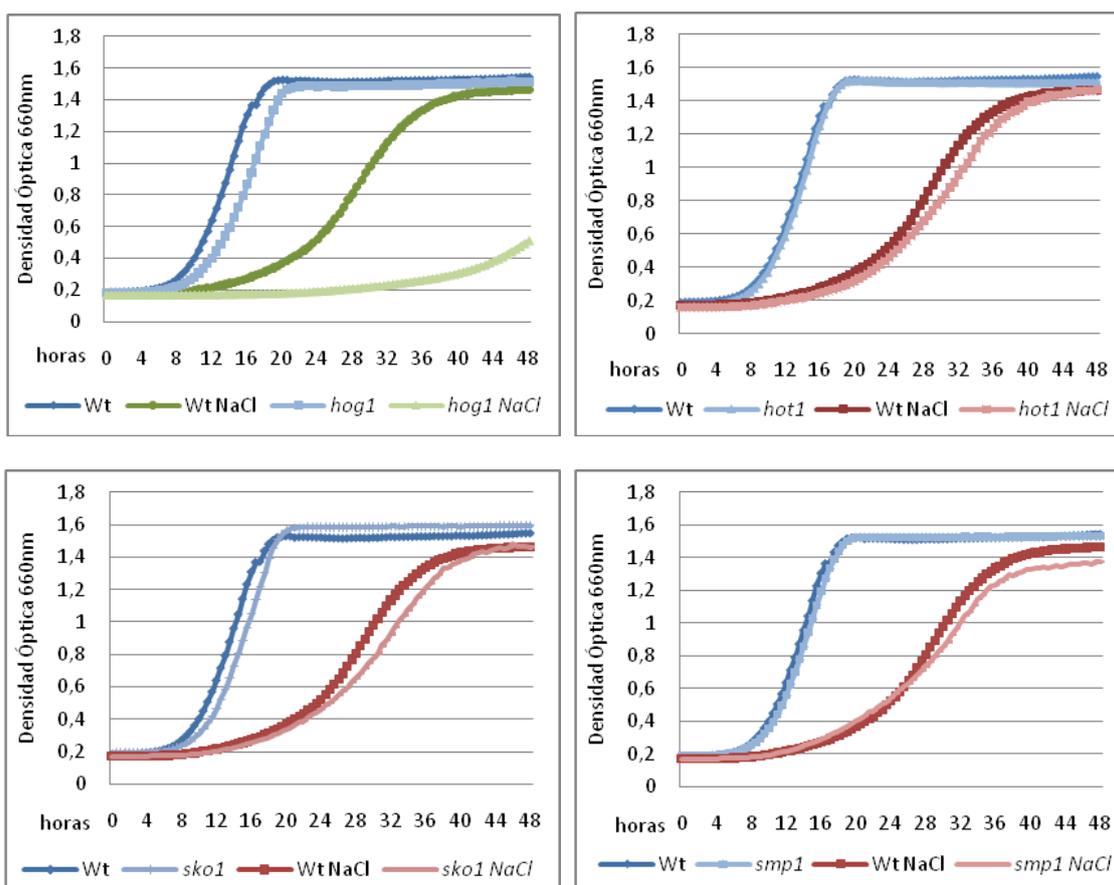
Los oligonucleótidos empleados para eliminar *HOG1* y *MOT3* se describen a continuación, así como los utilizados para comprobar la inserción del casete de disrupción (diseñados en el promotor del gen eliminado y en regiones dentro del casete específico).

Nombre	Secuencia 5'-3'	Descripción
HOG1DISR1	GGAACAAAGGGAAAACAGGGAAA CAACTATCGTATATAATACAGCTGAAGCT <u>TCGTACGC</u>	45 nucleótidos justo antes del codón de iniciación ATG del gen <i>HOG1</i> más la secuencia subrayada
HOG1DISR2	AAAAGAAGTAAGAATGAGTGGTTAGG GACATTAACAAAAACACGTGCATAGGCCA <u>CTAGTGGATCTG</u>	45 nucleótidos justo después del codón de terminación TAA del gen <i>HOG1</i> más la secuencia subrayada
HOG1CHECKDISR	GGGAGGATCTTGAAGGGAA	260 oligonucleótidos antes del codón de iniciación ATG del gen <i>HOG1</i>
Ura-B	CAGACCGATCTTCTACCC	Región 5' de los casetes de disrupción URA
Leu-B	AGTTATCCTTGGATTTGG	Región 5' de los casetes de disrupción LEU
Kan-B	GGATGTATGGGCTAAATG	Región 5' de los casetes de disrupción KAN, HIS, ble
Kan-C	CCTCGACATCATCTGCCC	Región 3' de los casetes de disrupción KAN, HIS, ble
MOT3DISR1	AGGCAACAGTAGGCAAATAGTAAAGGG ACATATCATATTTGAGCACAGCTGAAGC <u>TTCGTACGC</u>	45 nucleótidos justo antes del codón de iniciación ATG del gen <i>MOT3</i> más la secuencia subrayada
MOT3DISR2	TTGTAAATGAGTGGGAAGGGATATTTT GTGTGTCTATAAAGTCTGCATAGGCCAC <u>TAGTGGATCTG</u>	45 nucleótidos justo después del codón de terminación TAA del gen <i>MOT3</i> más la secuencia subrayada
MOT3CHECKDISR	CTACTCCGTCTGGATTTACT	270 oligonucleótidos antes del codón de iniciación ATG del gen <i>MOT3</i>

Tabla 16. Oligonucleótidos empleados en la disrupción de los genes *MOT3* y *HOG1*.

2. Análisis fenotípico de factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión génica bajo estrés salino

Una vez activada por la ruta HOG, la MAP quinasa Hog1p lleva a cabo múltiples funciones tanto en el núcleo como en el citoplasma de células de *Saccharomyces cerevisiae* que resultan en la resistencia y adaptación al estrés osmótico. Su importancia se ve reflejada por la extrema sensibilidad de una cepa de levadura con la deleción del gen *HOG1* en presencia de sal en el medio de crecimiento. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los mutantes simples *hot1*, *sko1*, *smp1*, *msn2* y *msn4* al comparar el crecimiento de estas células con las de la cepa silvestre (figura 61).



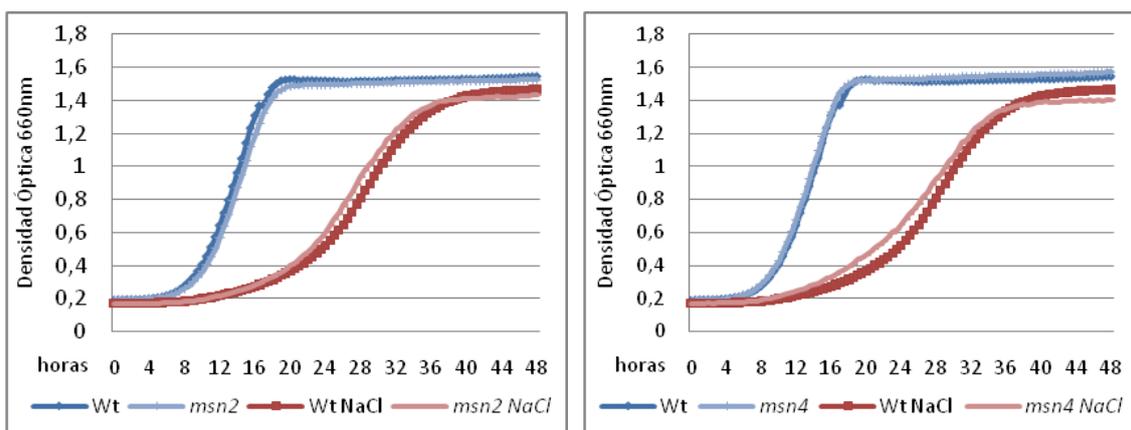
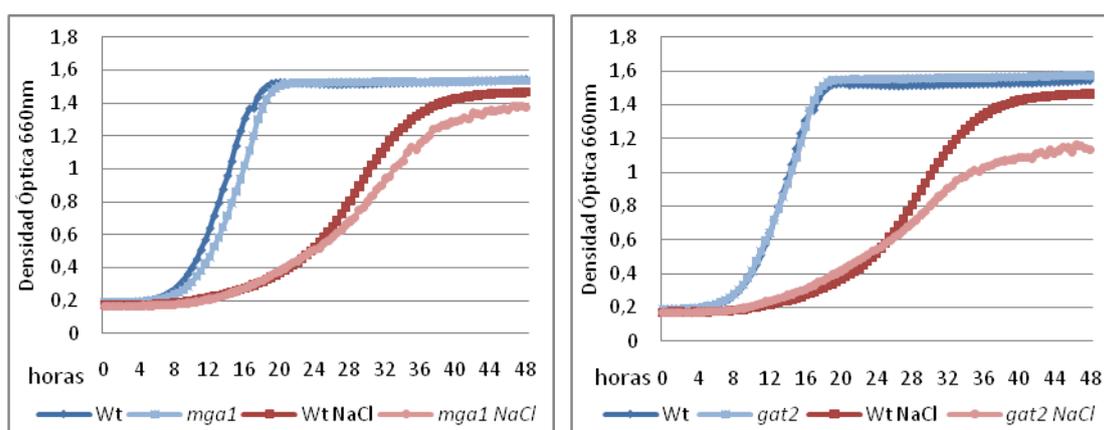


Figura 61. Cinéticas de crecimiento de mutantes de los factores de transcripción conocidos de la ruta HOG en condiciones de estrés salino. El crecimiento de la cepa silvestre (BY4741; Wt) y las respectivas cepas mutantes fue monitorizada continuamente en medio YPD o medio YPD con 1M NaCl. Las curvas de crecimiento derivan del promedio de tres cultivos independientes para cada tiempo. La varianza entre triplicados es menor del 10%. Cada experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

Como se ha explicado en el apartado introductorio de este trabajo, uno de los factores de transcripción que actúa en la respuesta a estrés osmótico en levadura, Sko1p, se une a los promotores de otros factores de transcripción formando parte de una red de reguladores que actúan en condiciones de estrés (Proft *et al.*, 2005). Para estudiar la posible contribución de estos nuevos factores -Mga1p, Gat2p, Mot3p y Rox1p- a la resistencia a estrés osmótico, se llevó a cabo el estudio de su cinética de crecimiento bajo condiciones de alta salinidad.



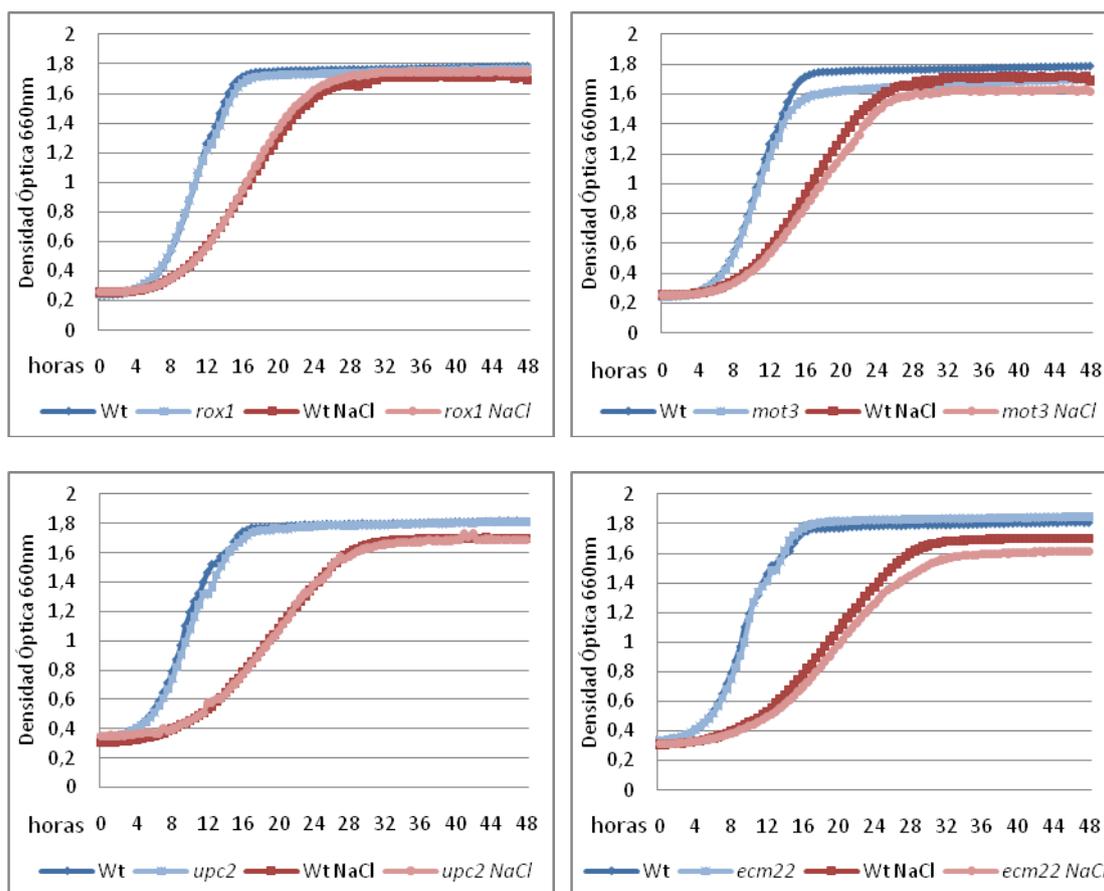


Figura 62. Ensayos de sensibilidad a estrés salino de nuevos factores de transcripción posiblemente involucrados en la respuesta adaptativa. El crecimiento de la cepa silvestre (BY4741; Wt) y de los mutantes simples *mga1*, *gat2*, *mot3*, *rox1*, *upc2* y *ecm22* fue monitorizado continuamente en medio YPD o medio YPD con 1M NaCl. Las curvas de crecimiento derivan del promedio de tres cultivos independientes para cada tiempo. La varianza entre triplicados es menor del 10%. Cada experimento fue repetido tres veces con resultados similares.

Por una parte, los mutantes simples *mga1* y *gat2* sí mostraron una moderada sensibilidad a estrés por NaCl, lo cual apunta a un posible papel en la respuesta adaptativa. Por otra parte, células con la mutación de los genes *MOT3* y *ROX1*, respectivamente, no mostraron un fenotipo de sensibilidad en su crecimiento en medio salino. En el estudio se incluyó a *UPC2* y *ECM22*, principales activadores de la ruta de biosíntesis de ergosterol, regulada por estrés osmótico de forma dependiente de Mot3p, Rox1p y Hog1p. La pérdida de función de estos factores de transcripción no afectó al crecimiento con sal.

3. Perfiles de expresión de genes ERG bajo estrés salino.

Recientemente se ha llevado a cabo un estudio de las cinéticas de los perfiles de expresión en el genoma de levadura que muestra que más de 1300 genes son reprimidos bajo estrés salino (Ni *et al.*, 2009). Una de las cuestiones planteadas en este trabajo fue si entre los genes cuyos niveles de transcrito disminuyen, están los genes *ERG*.

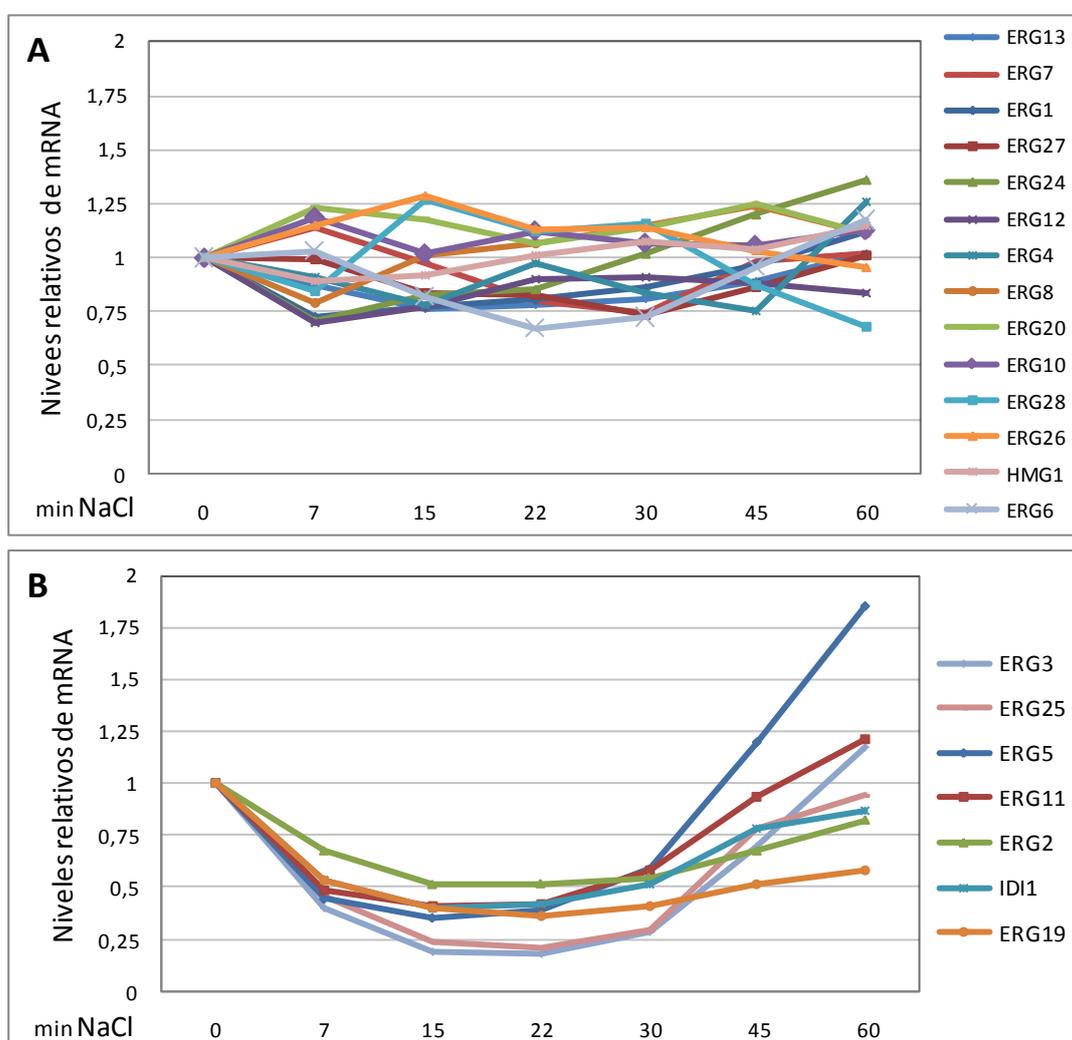


Figura 63. Represión transcripcional de algunos genes *ERG* bajo estrés osmótico. A) Genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de ergosterol que se expresan constitutivamente bajo condiciones de estrés salino (0.4M NaCl). B) Genes *ERG* que son reprimidos bajo las mismas condiciones. Los perfiles mostrados en la figura se obtuvieron a partir de los estudios globales de expresión génica publicados en (Ni *et al.*, 2009).

Se observó que 14 de los 23 genes involucrados en la biosíntesis de ergosterol se expresan constitutivamente y no son regulados bajo estrés salino (figura 63A). Curiosamente, la expresión de 7 genes *ERG* decrece entre los 15 y 30 minutos después de aplicar el estrés, volviendo a los niveles de las células sin estrés entre los 45 y 60 minutos. La mayoría de genes reprimidos forman parte de los últimos pasos de la biosíntesis de ergosterol, encontrándose entre ellos los genes *ERG2* y *ERG11* (figura 63B).

4. Análisis de proteínas fusionadas con epitopos myc o HA

En este trabajo se ha conseguido etiquetar las proteínas Msn1p, Msn2p, Msn4p, Smp1p, Rtg1p, Mga1p, Gat2p, Rox1p y Ecm22p mediante la fusión con epitopos myc o HA. Tras la amplificación por PCR de los módulos que contienen los plásmidos empleados y la transformación y recombinación homóloga en el genoma de levadura, se procedió a la verificación de la correcta integración de los epitopos por PCR en todas las cepas etiquetadas. Para ello se utilizó un oligonucleótido dentro del ORF del gen cuyo producto se etiquetó y otro oligonucleótido dentro del casete correspondiente, en el módulo utilizado como marcador. Además, en la mayoría de los casos, se verificó la expresión de la proteína etiquetada mediante análisis western usando anticuerpos policlonal anti-c-myc o monoclonal anti-HA (tabla 17).

Proteína etiquetada	Peso Mol. (sin myc/HA)	Moléculas/célula*	PCR	Western
Msn1-3HA	43,1 kDA	491	Sí	Sí
Msn2-3HA	77,9 kDA	125	Sí	Sí
Msn4-3HA	69,7 kDA	sin señal	Sí	Sí
Smp1-3HA	49,4 kDA	sin señal	Sí	No
Rtg1-3HA	19 kDA	2190	Sí	Sí
Mga1-3HA	50,7 kDA	sin señal	Sí	Sí
Gat2-3HA	63,1 kDA	sin señal	Sí	Sí
Rox1-2myc	41,8 kDA	238	Sí	Sí
Ecm22-2myc	89,2 kDA	sin señal	Sí	Sí
Hot1-9myc	79,4 kDA	149	F. Posas	F. Posas
Mot3-18myc	54,4 kDA	1690	F. Winston	F. Winston

Tabla 17. Comprobación de la integración de los casetes en el genoma de levadura y expresión de las proteínas etiquetadas.

El tamaño de las proteínas fue obtenido de la base de datos de *Saccharomyces cerevisiae* (www.yeastgenome.org) y el número de moléculas por célula de los datos publicados en (Ghaemmaghami *et al.*, 2003).

La técnica de etiquetado utilizada consiste en la adición a la secuencia que codifica para un factor de transcripción, de cortas secuencias peptídicas que codifican para un epitopo. La unión de estas pequeñas secuencias en general no afecta a la función de la proteína etiquetada, permitiendo el estudio de la función original de la proteína en el interior de la célula. Las etiquetas se suelen situar en los extremos amino o carboxilo a fin de no interferir con la función de la proteína. En este trabajo, la inclusión en el extremo carboxilo fue conveniente pues la detección de la etiqueta *in vivo* es demostración de que la proteína se ha sintetizado completa.

Previo al análisis ChIP-Chip, los factores de transcripción Hot1p, Mot3p y Rtg1p fueron motivo de estudio mediante PCR cuantitativa en tiempo real para validar su unión a genes cuya regulación está documentada para dichos factores. De este modo, tras 5 minutos de estrés osmótico con 0.4M de NaCl, se verificó un cambio de más de 100 veces en la unión de Hot1 en el promotor de *GPD1*(-363/-165), de 7 veces en la unión de Mot3p al promotor de *ERG2* (-492/-226) y de 7.5 y 7 veces en la unión de Rtg1p a los promotores de *ACO1* (-470/-291) y *CIT2* (-423/-207).

5. Localización genómica del regulador Hot1p (ChIP-Chip)

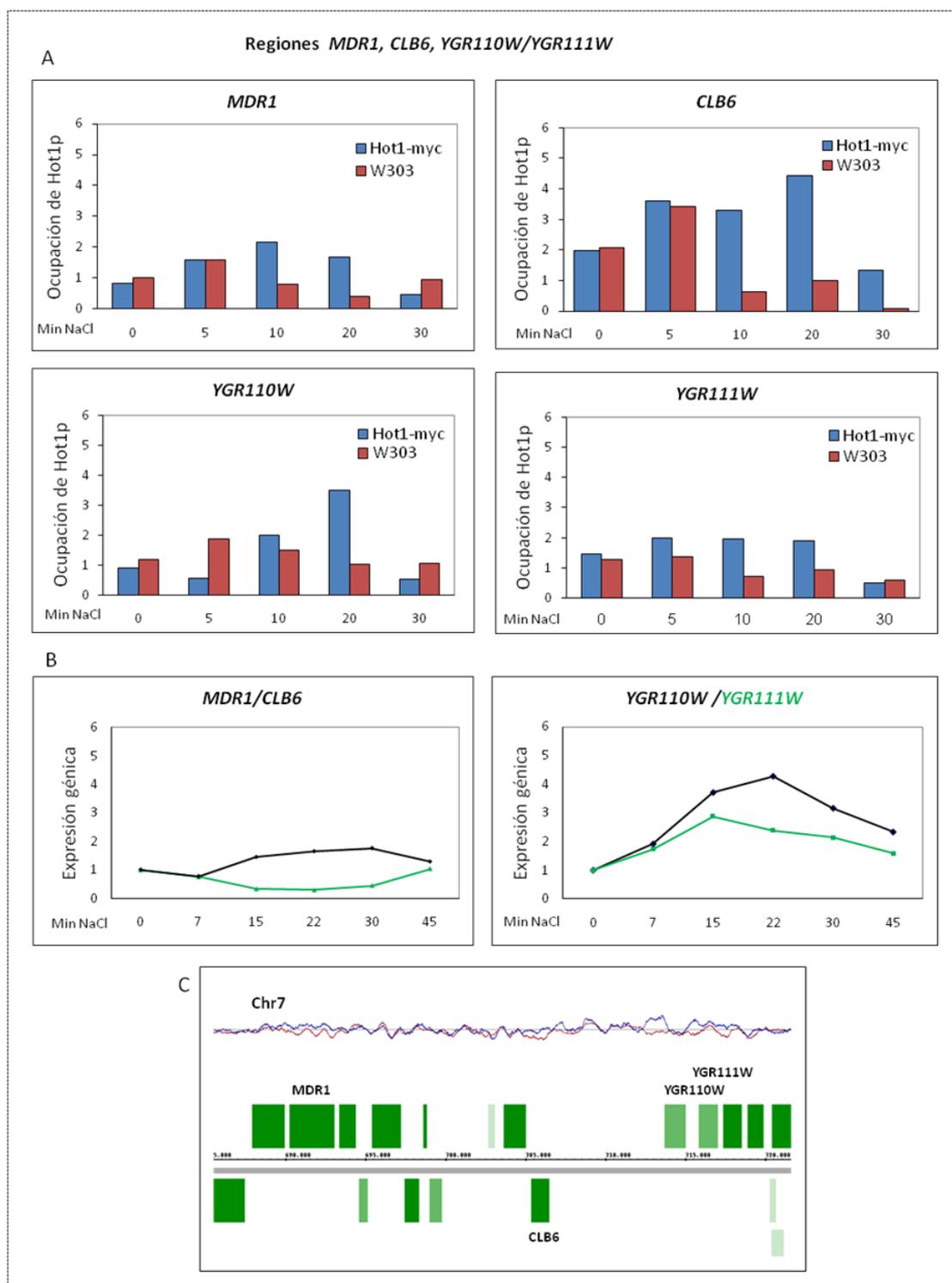
A. Lista de regiones intergénicas más enriquecidas por Hot1p bajo estrés osmótico

Localización	MATScore	Tasa cambio	FDR(%)	-10log10 Pvalue	Gen
chr4 (410918, 411447)	18,47	38,4	0	753,96	GPD1
chr4 (410420, 410894)	9,32	9,32	23,08	202,75	DIA3
chr7 (749644, 749875)	8,16	6,98	23,08	158,46	SYF2
chr7 (750075, 750223)	5,97	3,46	78,95	90,04	UTP8
chr7 (713556, 713684)	5,94	3,74	78,95	89,16	YGR110W
chr5 (281205, 281336)	5,66	3,5	90,48	81,84	THO1
chr4 (1412041, 1412202)	5,44	2,75	66,67	76,4	SNF1
chr12 (677160, 677284)	5,41	3,36	57,14	75,86	BOP2
chr7 (754572, 754704)	5,32	3,87	57,14	73,63	FHN1
chr4 (1507009, 1507129)	5,23	3,07	58,14	71,53	STL1
chr5 (281001, 281204)	5,09	3,49	64	68,11	HOR2
chr11 (357600, 357705)	4,87	3,98	48,48	63,35	SPC42
chr7 (689961, 690191)	4,81	3,5	46,48	61,96	MDR1
chr4 (413221, 413353)	4,8	3,36	46,48	61,75	GPM2
chr7 (715706, 715826)	4,78	4,03	44,74	61,3	YGR111W
chr12 (772590, 772710)	4,75	2,73	37,63	60,64	BUD6
chr7 (707109, 707236)	4,74	3,55	37,63	60,46	CLB6
chr12 (1001813,1001938)	4,74	3,04	37,63	60,54	IMD3
chr12 (1001813,1001938)	4,74	3,04	37,63	60,54	ATG23
chr8 (502120,502231)	4,73	2,74	37,63	60,23	YHR202W
chr14 (326622,326738)	4,71	3,94	37,63	59,9	IBD2
chr16 (221874, 221986)	4,7	3,28	37,63	59,71	MRPL40
chr16 (348950,349063)	4,59	2,84	35,45	57,3	YPL107W
chr7 (717228,717324)	4,59	2,83	35,45	57,3	SHY1
chr15 (959077,959173)	4,51	3,85	36,89	55,67	UBC11
chr8 (127469,127581)	4,49	3,87	37,3	55,26	DIA4
chr4 (670999,671096)	4,46	3,34	36,76	54,69	YDR107C
chr4 (670099,671096)	4,46	3,34	36,76	54,69	GSG1
chr12 (927755,927851)	4,44	3,38	35,14	54,2	FLD1
chr7 (236125,236231)	4,4	3,17	33,54	53,4	MRF1
chr5 (382504,382613)	4,39	2,75	33,54	53,27	KAP123
chr5 (468280,468385)	4,35	2,98	33,73	52,43	SPI1
chr16 (930071,930178)	4,3	3,13	32,22	51,46	YPR196W
chr12 (818426,818514)	4,29	3,72	30	51,17	RPL26A
chr12 (626349,626437)	4,29	3,1	30	51,24	MAP1

chr12 (626349,626437)	4,29	3,1	30	51,24	ERF2
chr11 (404250,404376)	4,28	3,21	30	50,97	YKL018C-A
chr9 (270605,270689)	4,26	3,5	30	50,72	PIG2
chr3 (206072,206172)	4,26	3,21	30	50,57	TAF2
chr10 (416477,416583)	4,24	3,54	29,95	50,22	RPC17
chr12 (432749,432837)	4,24	3,21	29,95	50,22	ACF2
chr7 (1017814,1017914)	4,23	2,84	30,29	50	BUD32
chr7 (72632,72720)	4,21	3,16	31,46	49,75	MTC3
chr7 (733596,733692)	4,19	3,87	30,53	49,26	YGR122W
chr15 (807715,807807)	4,19	3,71	30,53	49,24	SEC63
chr16 (780577, 780669)	4,19	2,8	30,53	49,25	AXL1
chr12 (636129,636217)	4,19	2,78	30,53	49,32	YEF3
chr8 (74195,74287)	4,14	3,27	32,07	48,38	YHL015W-A
chr11 (335954,336038)	4,14	3,21	32,35	48,26	OAR1
chr4 (1196272,1196368)	4,13	2,84	33,47	48,05	BCP1
chr9 (362904,362988)	4,12	2,9	34,15	47,88	DJP1
chr14 (222590,222678)	4,08	3,3	33,72	47,18	JJJ1
chr2 (460603,460691)	4,08	2,71	33,72	47,15	SUS1
chr11(589499,589583)	4,06	2,92	34,09	46,83	MTD1
chr11(589499,589583)	4,06	2,92	34,09	46,83	TRZ1
chr5 (246566,246654)	4,03	2,79	33,81	46,22	SAP1
chr4 (340473,340557)	4,02	3,55	34,16	46,06	YDL063C
chr7 (656342,656434)	4,02	3,19	34,16	45,99	NNF2
chr11 (175733,175817)	3,99	3,25	33,9	45,49	LTV1
chr4 (945736,945824)	3,98	2,9	35,1	45,26	SNU56
chr16 (933547,933640)	3,97	3,3	35,37	45,07	SGE1
chr7 (62000,62092)	3,93	3,31	33,52	44,51	TAN1
chr5 (128491,128584)	3,93	2,91	33,52	44,38	VAC8
chr2 (420056,420144)	3,89	3,09	34,16	43,73	ARS215
chr2 (586418,586502)	3,87	2,75	32,99	43,3	EHT1
chr15 (667468,667565)	3,86	3,18	33,33	43,13	MPC54
chr7 (6145,6229)	3,86	2,98	32,99	43,24	YGL260W
chr8 (66099,66183)	3,86	2,86	32,51	43,09	AIM17
chr11 (605189,605281)	3,85	2,87	32,51	43,01	TVP38
chr10 (177631,177719)	3,85	2,85	32,51	43,06	TRK1

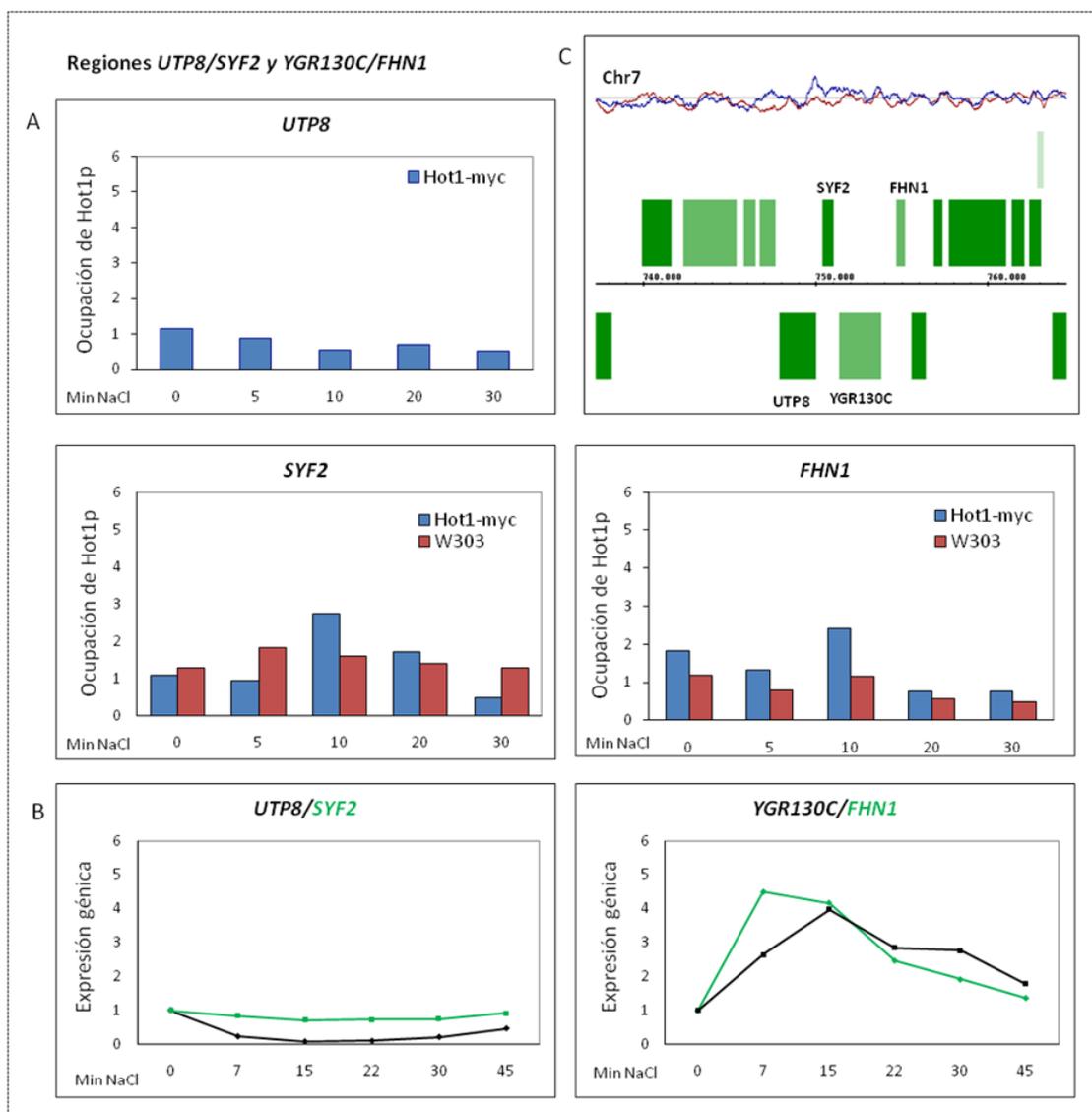
Tabla 18. Lista completa de regiones enriquecidas por Hot1p bajo estrés osmótico. Datos de unión obtenidos por ChIP-Chip del factor de transcripción Hot1p a 5 minutos de aplicar un estrés osmótico con 0.4M NaCl. Se muestran las regiones más enriquecidas por encima del valor MATscore de 3.85.

B. Análisis de regiones dudosas y falsos positivos



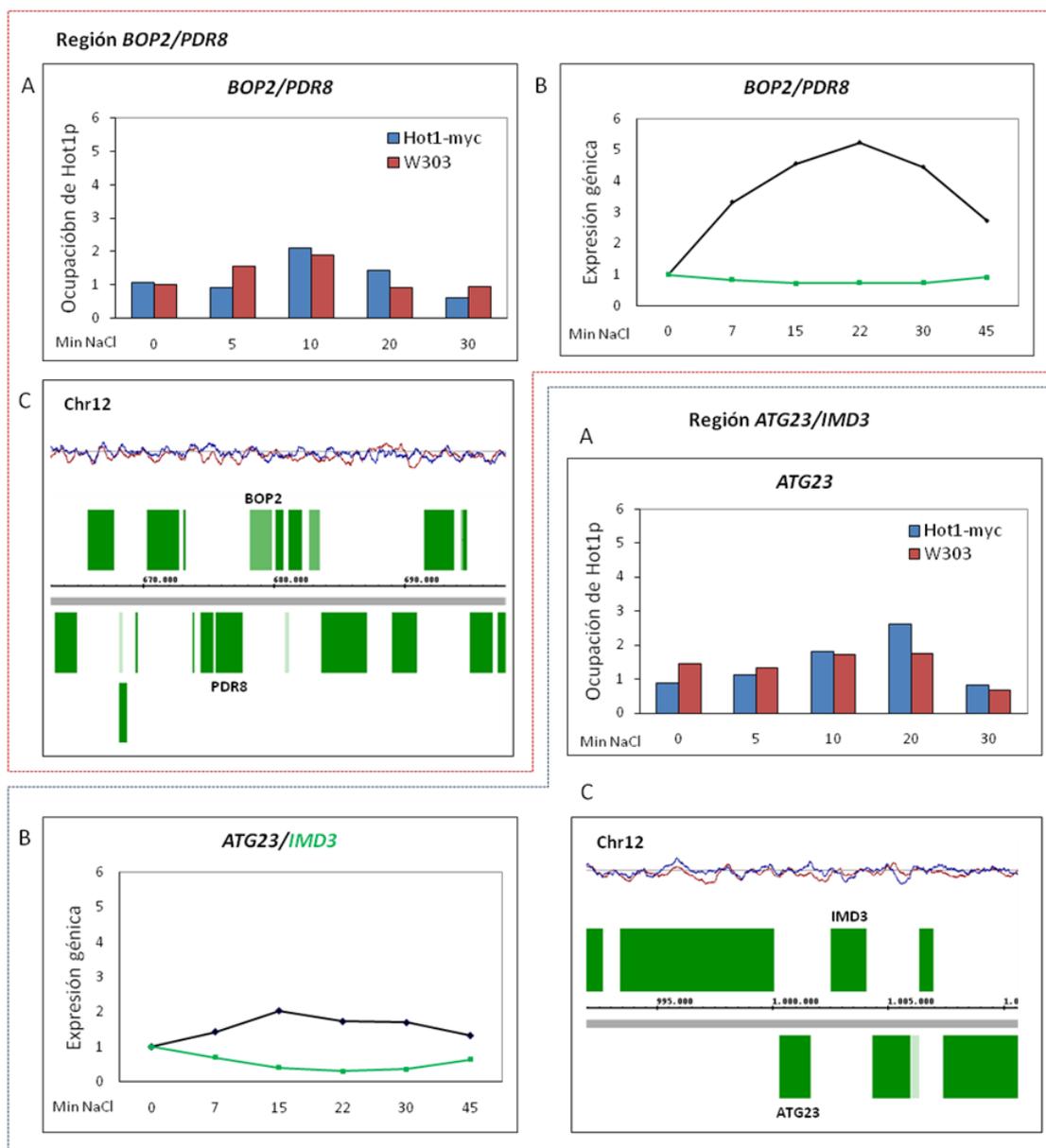
.../...

.../...



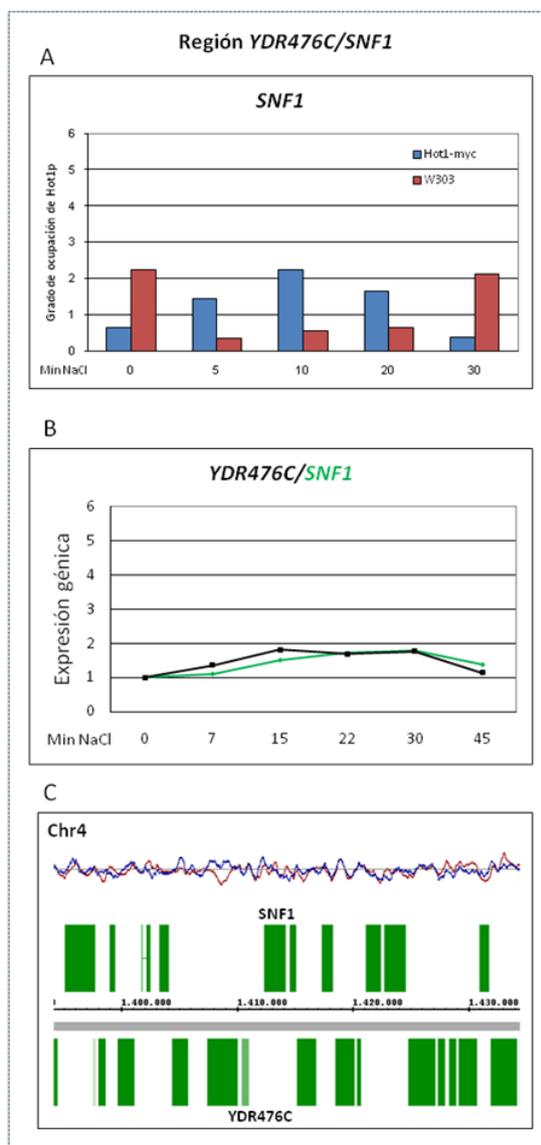
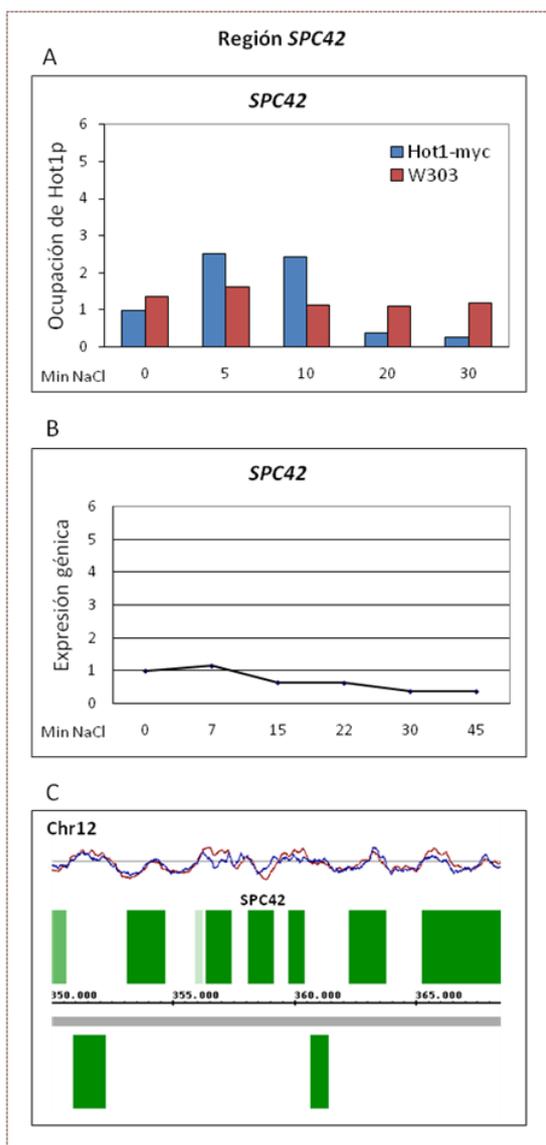
.../...

.../...



.../...

.../...



.../...

.../...

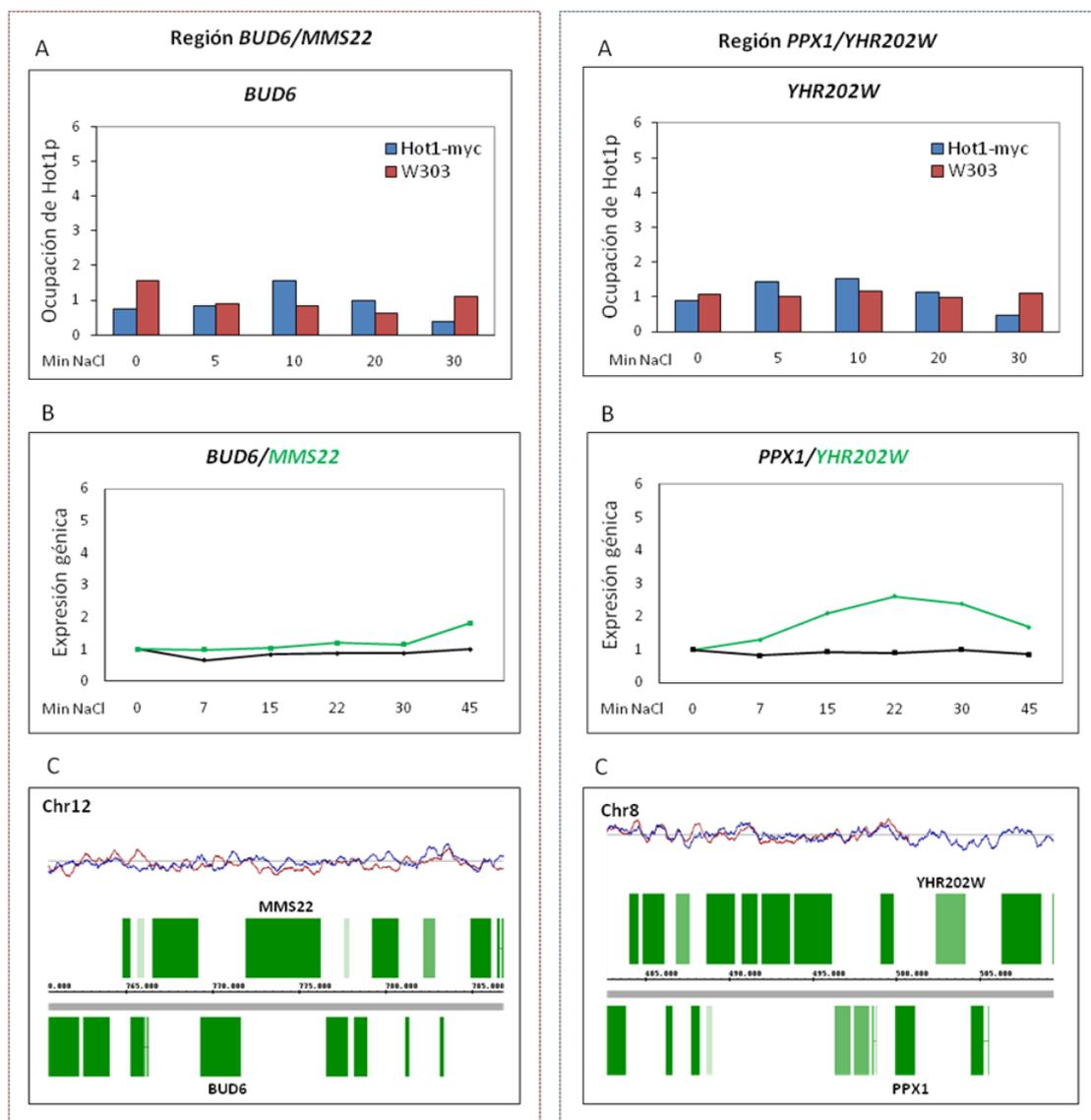


Figura 64. Regiones anotadas como falsos positivos del análisis ChIP-Chip de Hot1p. A) Para cada región intergénica se muestra la cinética de unión de Hot1p bajo estrés osmótico (0.4M NaCl). Los datos fueron obtenidos mediante ChIP y PCR cuantitativa en tiempo real en una cepa con el factor fusionado a epitopos myc y en la cepa control sin etiquetar. Las posiciones de los oligonucleótidos diseñados puede consultarse en el apéndice 1 de Datos Suplementarios. B) perfiles de expresión génica de los genes adyacentes (Ni *et al.*, 2009) tras un choque osmótico con 0.6M NaCl. C) visualización de los señales de unión del ensayo ChIP-ChIP con el programa Integrated Genome Browser junto con la organización cromosómica de la región estudiada.

6. Datos de localización genómica de Mot3p (ChIP-Chip)

A. Lista de regiones intergénicas más enriquecidas por Mot3p bajo estrés osmótico

A continuación se muestra aquellas regiones con una tasa de cambio comprendida entre 53,47 y 3,7. La tasa de falsos positivos, en la gran mayoría de regiones, inferior al 15%.

Localización genómica de la señal	MAT Score	Tasa Cambio	Tasa FDR(%)	-10log10 Pvalue	Gen adyacente	Expresión (0.4M NaCl)
Chr8(511,721-511,881)	19,41	53,47	0	840,16	<i>SKN7</i>	x0.5
Chr1(226,880-227,417)	12,74	13,96	21,05	369,2	<i>IMD1</i>	x0.3
Chr12(602,998-603,381)	10,7	11,31	25	264,26	<i>ECM22</i>	x0.3
Chr7(1032-1350)	10,6	9,99	13,33	259,57	<i>COS12</i>	x0.2
Chr2(265,885-266,245)	10,35	9,47	13,33	248,15	<i>YBR013C</i>	x2.0
Chr7(749,648-749,879)	10,27	8,4	13,33	244,42	<i>SYF2</i>	x0.8
Chr7(323,563-324,043)	9,62	7,37	13,33	215,74	<i>TOS8</i>	x2.2
Chr14(778,723-779,089)	8,97	6,49	13,33	189,04	<i>AIF1</i>	x0.8
Chr8(556,786-556,996)	8,93	5,79	13,33	187,57	<i>YHR218W</i>	x1.5
Chr15(42,953-43,097)	8,92	6,4	13,33	187,2	<i>GRE2</i>	x17
Chr13(922,378-922,547)	8,91	6,28	13,33	186,59	<i>PAU19</i>	x3.1
Chr11(182,859-183,003)	8,88	6,1	13,33	185,35	<i>CTK1</i>	x1.0
Chr3(306,870-307,029)	8,56	6,38	13,83	173,08	<i>YCR102C</i> <i>PAU3</i>	x0.4
Chr15(569,705-569,855)	8,24	8,12	13,83	161,27	<i>AFI1</i>	x0.4
Chr4(386,323-386,563)	8,23	7,25	13,83	160,86	<i>BSC1</i>	x0.1
Chr7(713,540-713,689)	8,19	5,39	13,83	159,58	<i>YGR110W</i>	x4.3
Chr4(384,152-384,641)	8,14	5,83	13,83	157,48	<i>PRM7</i>	x0.1
Chr7(987,869-988,032)	8,13	5,84	13,83	157,3	<i>MGA1</i>	x2.0
Chr14(771,899-772,087)	7,93	5,26	13,83	150,26	<i>HXT17</i> <i>YNR071C</i>	x2.8
Chr11(152,039-152,183)	7,93	5,14	14,5	148,58	<i>YKL161C</i> <i>ELF1</i>	x1.7

Datos suplementarios

Chr14(479,693-479,825)	7,88	6,52	16,49	147,14	<i>NIS1/TPM1</i>	x0.6
Chr12(1.064,983-1.065,155)	7,84	4,63	16,67	145,2	<i>YLR462W</i>	x1.0
Chr15(47,685-47,860)	7,79	5,85	16,96	135,66	<i>SPT20</i>	x1.2
Chr4(1.525,321-1.525,469)	7,72	4,89	16,96	135,85	<i>YDR545W</i>	x2.0
Chr13(570,961-571,235)	7,51	5,1	13,24	130,63	<i>MRPS8</i> <i>TPP1</i>	x0.2
Chr11(489,765-490,034)	7,51	4,67	13,24	129,53	<i>GCN3</i>	x0.6
Chr7(994,612-994,958)	7,35	4,85	13,24	126,01	<i>YGR251W</i>	x0.3
Chr7(6,647-6,820)	7,32	4,18	13,24	129,53	<i>PAU11</i>	x3.3
Chr14(649,970-651,622)	7,21	4,49	13,24	126,01	<i>TOS6</i>	x0.1
Chr13(919,620-919,722)	7,14	5,06	13,24	123,82	<i>SNO4</i>	x8.6
Chr13(8,808-9,013)	7,14	4,41	13,24	123,69	<i>YML131W</i>	x18
Chr8(85,022-85-165)	7,07	5,01	13,24	121,53	<i>YAP3</i>	x1.0
Chr11(578,245-578,381)	6,99	4,32	13,0	119	<i>SIS2</i> <i>AIM29</i>	x1.5
Chr11(179,252-179,402)	6,96	4,9	13,01	118	<i>SDH3</i>	x2.2
Chr13(916,045-916,310)	6,89	4,23	14,19	116,03	<i>FET4</i>	x0.3
Chr14(779,097-779,245)	6,84	4,12	14,19	114,41	<i>COS10</i>	x0.5
Chr13(558,791-558,932)	6,84	4,12	14,19	114,28	<i>TIF34</i>	x0.4
Chr6(194,217-194,349)	6,73	4,04	14,65	111,11	<i>ATG18</i>	x1.8
Chr14(738,563-738,911)	6,71	4,35	14,04	110,55	<i>FRE4</i>	x3.7
Chr11(552,496-552,640)	6,68	4,00	14,04	109,67	<i>GLG1</i>	x3.8
Chr7(754,568-754,724)	6,65	4,01	14,04	108,62	<i>FHN1</i>	x4.5
Chr14(746,171-746439)	6,58	3,97	13,74	106,7	<i>YNR063W</i> <i>YNR062C</i>	x0.2
Chr5(196,449-196,581)	6,57	4,83	13,74	106,38	<i>RPN3</i>	x2.4
Chr2(653,142-653,258)	6,41	3,7	13,5	101,8	<i>HPC2</i>	
Chr14(258,508-259,004)	6,4	4,19	13,5	101,3	<i>SPS19</i>	x2.4
Chr10(353,423-353,667)	6,37	4,28	13,5	100,6	<i>RTT101</i>	x1.1
Chr13(797,300-797,621)	6,36	3,75	13,5	100,12	<i>RSN1</i>	x0.4
Chr7(979,298-979,478)	6,29	4,92	13,5	98,32	<i>LSC2</i>	x2.4
Chr12(627,297-627,417)	6,11	4,3	13,18	98,38	<i>CDD1</i>	x0.9
Chr5(408,884-409,001)	6,09	3,94	13,18	92,63	<i>RSP5</i>	x2.0
Chr8(123,567-123,691)	6,07	4,68	13,18	92,27	<i>SOD2</i>	x3.4
Chr2(623,298-623,414)	6,07	3,95	13,18	92,24	<i>DER1</i>	x0.6
Chr14(763,464-763,598)	5,96	4,16	12,4	89,27	<i>BSC5</i>	x2.3

Chr7(733,592-733,712)	5,54	4,14	14,01	78,28	<i>YGR122W</i>	x2.0
Chr12(633,071-633,197)	5,54	3,83	14,01	78,36	<i>RCK2</i>	x3.0
Chr2(760,925-761,102)	5,28	3,86	72,06		<i>PAF1</i>	x1.2

Tabla 19. Lista completa de regiones enriquecidas por Mot3p bajo estrés osmótico. Datos de unión obtenidos por CHIP-Chip del factor de transcripción Mot3p a 5 minutos de aplicar un estrés osmótico con 0.4M NaCl. Se muestran las regiones más enriquecidas por encima del valor MATscore de 5,28. Los colores verdes muestran los genes adyacentes que se inducen bajo estrés osmótico y los colores rosados los que se reprimen en las mismas condiciones (Ni *et al.*, 2009), siendo la intensidad del color indicativa de una mayor o menor inducibilidad/represión.