



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Programa de doctorado en Biotecnología

**Estrategias de defensa a estrés químico en
Saccharomyces cerevisiae: regulación genética del
transporte multidroga y mecanismos de
detoxificación.**

M^a Elena Vanacloig Pedrós

TESIS DOCTORAL

Directores

Dr. Markus Proft

Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner

Valencia, junio 2018

La **Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner**, Doctora en Biología y, Profesora titular y Directora del Departamento de Biotecnología de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia, y el **Dr. Markus Proft**, Doctor en Biología y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biomedicina de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la licenciada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Valencia, **M^a Elena Vanacloig Pedrós**, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado **“Estrategias de defensa a estrés químico en *Saccharomyces cerevisiae*: regulación genética del transporte multidroga y mecanismos de detoxificación”** y autorizan su presentación para optar al grado de Doctora en Biotecnología.

Para que así conste, firman el presente documento en Valencia, a X de julio de 2018.

Amparo Pacual-Ahuir Giner

Markus Proft



RESUMEN

En la presente tesis se han estudiado los distintos mecanismos de toxicidad de las micotoxinas citrinina y ocratoxina A y la respuesta adaptativa a xenobióticos en el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, concretamente la regulación de los transportadores multidrogas del sistema PDR y sus factores de transcripción.

La respuesta a xenobióticos permite a las células eucariotas adaptarse y sobrevivir a la exposición de gran variedad de compuestos exógenos, como toxinas o fármacos. En esta respuesta participan distintos tipos de proteínas, principalmente transportadores de membrana y factores de transcripción. Para estudiar esta respuesta adaptativa sometimos las células de levadura a distintos tratamientos con las micotoxinas citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA), y los oxidantes menadiona (MEN), y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Las micotoxinas citrinina y ocratoxina A son metabolitos secundarios producidos por varios hongos filamentosos, principalmente de las familias *Aspergillus* y *Penicillium*, que contaminan alimentos básicos como maíz, trigo y arroz, y que son tóxicas para el ser humano. Aquí, estudiamos los mecanismos de toxicidad de ambas toxinas a través de experimentos de expresión génica con reporteros luciferasa, ensayos transcriptómicos, y ensayos fenotípicos con mutantes de pérdida de función para determinadas proteínas involucradas en la defensa antioxidante y de transporte multidroga. Los resultados muestran diferencia de los mecanismos de toxicidad entre ambas micotoxinas. CIT induce la expresión de numerosos genes involucrados en el transporte de drogas y la respuesta a estrés oxidativo, mientras que OTA activa, principalmente, la expresión de genes implicados en el desarrollo, como meiosis o esporulación, y en menor medida, genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo y al transporte multidroga.

En levadura, los transportadores multidroga de la membrana plasmática que eliminan compuestos tóxicos de la célula forman parte del denominado sistema PDR (*pleiotropic drug resistance*). Este sistema está compuesto por proteínas conservadas de bacterias a humanos, entre ellos, transportadores multidroga, pero también otro tipo de proteínas como factores de transcripción que se encargan de regular su expresión. En ocasiones, estos transportadores se encuentran sobreexpresados, lo que da lugar a un fenómeno conocido como resistencia pleiotrópica a drogas (PDR) o resistencia a múltiples drogas (MDR). Este proceso de resistencia es de gran importancia en diversos tratamientos médicos, como quimioterapia en cáncer, o antifúngicos, ya que disminuyen su eficiencia. Aquí, hemos estudiado el funcionamiento del sistema PDR en levadura de varios transportadores multidroga (Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1) y factores de transcripción (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5) mediante cuantificación de expresión luciferasa en promotores o sitios de reconocimiento concretos. Además, desarrollamos un sistema binario de plásmidos que nos permitiera estudiar las distintas sensibilidades de estos factores de transcripción a los xenobióticos de forma individualizada.

Los resultados muestran que, de entre los transportadores multidroga estudiados, Pdr5 y Snq2 son los principales en la respuesta de adaptación frente a CIT, OTA y MEN, mientras que Pdr15 parece actuar como un transportador secundario. Además, la regulación de estos tres transportadores ante la exposición de citrinina está dirigida por el factor de transcripción Pdr1, porque el mutante de delección $\Delta pdr1$ no muestra actividad ante esta toxina. *SNQ2* es el único de los cuatro transportadores que se induce al tratar las células con H_2O_2 . Pdr1 no sólo aparece como el principal factor de transcripción con CIT, sino que participa en la respuesta de todas las moléculas estudiadas, en mayor o menor medida. Este regulador activa la transcripción de genes en respuesta a CIT y OTA a través de los sitios específicos PDRE, al contrario que Pdr8 e Yrm1, que parecen actuar como reguladores negativos en respuesta a CIT a través de estos mismos elementos. Por último, empleamos un sistema binario de plásmidos que nos permite definir las distintas sensibilidades y especificidad a drogas por parte de los factores de transcripción de forma individual. Pdr1 es capaz de reconocer e inducir la activación de la expresión génica en todos los tratamientos, aunque muy levemente con H_2O_2 . Yrr1 presenta inducción de la expresión génica ante CIT y, especialmente, OTA, indicando su capacidad de discriminación entre estas moléculas. Además, la activación se produce a través de elementos distintos a PDRE. Por último, Stb5 reconoce e induce la expresión génica en el tratamiento con H_2O_2 en mayor nivel que Pdr1. Los resultados muestran un importante nivel de regulación del sistema PDR, con Pdr1 como factor de transcripción principal, pero con la cooperación de otros reguladores más específicos.

SUMMARY

In the present thesis, we have studied the different toxicity mechanisms of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A and the adaptive response to xenobiotics in the yeast model of *Saccharomyces cerevisiae*, specifically the regulation of the multidrug transporters of the PDR network and its transcription factors.

The response to xenobiotics allows eukaryotic cells to adapt and survive the exposure to a wide variety of exogenous compounds, such as toxins or drugs. Different types of proteins participate in this response, mainly membrane transporters and transcription factors. To study this adaptive response we subjected the yeast cells to different treatments with the mycotoxins citrinin (CIT) and ochratoxin A (OTA), and oxidants menadione (MEN), and hydrogen peroxide (H₂O₂).

The mycotoxins citrinin and ochratoxin A are secondary metabolites produced by several filamentous fungi, mainly from the families *Aspergillus* and *Penicillium*, which contaminate staple foods such as corn, wheat and rice, and which are toxic to humans. Here, we studied the toxicity mechanisms of both toxins through gene expression experiments with luciferase reporters, transcriptomic assays, and phenotypic assays with loss-of-function mutants for certain proteins involved in antioxidant defense and multidrug transport. The results show differences in the mechanisms of toxicity between both mycotoxins. CIT induces the expression of numerous genes involved in drug transport and the response to oxidative stress, whereas OTA activates, mainly, the expression of genes involved in development, such as meiosis or sporulation, and to a lesser extent, genes related to response to oxidative stress and multidrug transport.

In yeast, multidrug transporters of the plasma membrane that remove toxic compounds from the cell are part of the so-called PDR (pleiotropic drug resistance) network. This system is composed of proteins conserved from bacteria to humans, including multidrug transporters, but also other proteins such as transcription factors that regulate their expression. Occasionally, these transporters are overexpressed, which leads to a phenomenon known as pleiotropic drug resistance (PDR) or multidrug resistance (MDR). This resistance process is very important in various medical treatments, such as chemotherapy in cancer, or antifungals, since they reduce their efficiency. Here, we have studied the function of the PDR multidrug transporters (Pdr5, Pdr15, Snq2, and Yor1) and transcription factors (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, and Stb5) by quantifying luciferase expression in promoters or specific recognition sites. In addition, we developed a binary plasmid system that allowed us to study the different sensitivities to xenobiotics of these transcription factors individually.

The results show that, among the studied multidrug transporters, Pdr5 and Snq2 have major roles in the adaptation response to CIT, OTA and MEN, while Pdr15 seems to act as a secondary transporter. Moreover, the regulation of these three transporters upon exposure to citrinin is directed by the transcription factor Pdr1, because the deletion mutant *Apdr1* shows no activity upon CIT exposure. *SNQ2* is the only one of the four

transporters that is induced by treating cells with H₂O₂. Pdr1 not only appears as the main transcription factor upon CIT treatment, but also participates, to a greater or lesser extent, in the response to all studied molecules. This regulator activates the transcription of genes in response to CIT and OTA through specific PDRE sites, in contrast to Pdr8 and Yrm1, which appear to act as negative regulators in response to CIT through these same elements. Finally, we use a binary plasmid system that allows us to define the different sensitivities and specificity to drugs by the transcription factors individually. Pdr1 is able to recognize and induce the activation of gene expression in all treatments, albeit very slightly with H₂O₂. Yrr1 shows induction of gene expression with CIT and, especially, OTA, indicating its ability to discriminate between these molecules. Furthermore, activation occurs through elements other than PDRE. Finally, Stb5 recognizes and induces gene expression in H₂O₂ treatment at a higher level than Pdr1. These results show an important level of regulation of the PDR network, with Pdr1 as the main transcription factor, but with the cooperation of more specific regulators.

RESUM

En la present tesi s'han estudiat els diferents mecanismes de toxicitat de les micotoxines citrinina i ocratoxina A i la resposta adaptativa a xenobiòtics en el model de llevat *Saccharomyces cerevisiae*, concretament la regulació dels transportadors multidroga del sistema PDR i els seus factors de transcripció.

La resposta a xenobiòtics permet a les cèl·lules eucariotes adaptar-se i sobreviure a l'exposició de gran varietat de compostos exògens, com toxines o fàrmacs. En aquesta resposta participen diferents tipus de proteïnes, principalment transportadors de membrana i factors de transcripció. Per estudiar aquesta resposta adaptativa vam sotmetre les cèl·lules de llevat a diferents tractaments amb les micotoxines citrinina (CIT) i ocratoxina A (OTA), i els oxidants menadiona (MEN), i peròxid d'hidrogen (H₂O₂).

Les micotoxines citrinina i ocratoxina A són metabòlits secundaris produïts per diversos fongs filamentosos, principalment de les famílies *Aspergillus* i *Penicillium*, que contaminen aliments bàsics com dacsà, blat i arròs, i que són tòxiques per a l'ésser humà. Ací, estudiem els mecanismes de toxicitat de les dues toxines a través d'experiments d'expressió gènica amb reporters luciferasa, assaigs transcriptòmics, i assajos fenotípics amb mutants de pèrdua de funció per a determinades proteïnes involucrades en la defensa antioxidant i de transport multidroga. Els resultats mostren diferència dels mecanismes de toxicitat entre les dues micotoxines. CIT indueix l'expressió de nombrosos gens involucrats en el transport de drogues i la resposta a estrès oxidatiu, mentre que OTA activa, principalment, l'expressió de gens implicats en el desenvolupament, com meiosi o esporulació, i en menor mesura, gens relacionats amb la resposta a estrès oxidatiu i al transport multidroga.

En llevat, els transportadors multidroga de la membrana plasmàtica que eliminen compostos tòxics de la cèl·lula formen part de l'anomenat sistema PDR (*pleiotropic drug resistance*). Aquest sistema està compost per proteïnes conservades de bacteri a humans, entre ells, transportadors multidroga, però també per un altre tipus de proteïnes com factors de transcripció que s'encarreguen de regular la seua expressió. De vegades, aquests transportadors es troben sobreexpressats, el que dóna lloc a un fenomen conegut com a resistència pleiotròpica a drogues (PDR) o resistència a múltiples drogues (MDR). Aquest procés de resistència és de gran importància en diversos tractaments mèdics, com quimioteràpia en càncer, o antifúngics, ja que disminueixen la seua eficiència. Ací hem estudiat el funcionament del sistema PDR en llevat de diversos transportadors multidroga (Pdr5, Pdr15, Snq2, i Yor1) i factors de transcripció (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, i Stb5) mitjançant quantificació d'expressió luciferasa en promotors o llocs de reconeixement concrets. A més d'això, vam desenvolupar un sistema binari de plasmidis que ens permetera estudiar les diferents sensibilitats d'aquests factors de transcripció als xenobiòtics de forma individualitzada.

Els resultats mostren que, d'entre els transportadors multidroga estudiats, Pdr5 i Snq2 són els principals en la resposta d'adaptació davant de CIT, OTA i MEN, mentre que Pdr15 sembla actuar com un transportador secundari. A més d'això, la regulació d'aquests tres transportadors davant l'exposició de citrinina està dirigida pel factor de transcripció Pdr1, perquè el mutant de deleció *Δpdr1* no mostra activitat davant d'aquesta toxina. *SNQ2* és l'únic dels quatre transportadors que s'indueix en tractar les cèl·lules amb H₂O₂. Pdr1 no només apareix com el principal factor de transcripció amb CIT, sinó que participa en la resposta de totes les molècules estudiades, en major o menor mesura. Aquest regulador activa la transcripció de gens en resposta a CIT i OTA a través dels llocs específics PDRE, al contrari que Pdr8 i Yrm1, que semblen actuar com a reguladors negatius en resposta a CIT a través d'aquests mateixos elements. Finalment, fem servir un sistema binari de plasmidis que ens permet definir les diferents sensibilitats i especificitat a drogues per part dels factors de transcripció de forma individual. Pdr1 és capaç de reconèixer i induir l'activació de l'expressió gènica en tots els tractaments, encara que molt lleument amb H₂O₂. Yrr1 presenta inducció de l'expressió gènica davant CIT i, especialment, OTA, indicant la seua capacitat de discriminació entre aquestes molècules. A més d'això, l'activació es produeix a través d'elements diferents a PDRE. Finalment, Stb5 reconeix i indueix l'expressió gènica en el tractament amb H₂O₂ en major nivell que Pdr1. Els resultats mostren un important nivell de regulació del sistema PDR, amb Pdr1 com a factor de transcripció principal, però amb la cooperació d'altres reguladors més específics.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	XV
Índice de tablas.....	XVIII
Abreviaturas.....	XIX
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Respuesta celular a estrés.....	3
1.1. Estrés oxidativo.....	5
2. Resistencia pleiotrópica a drogas (PDR).....	6
2.1. Resistencia a múltiples drogas: Definición y consecuencias biomédicas.....	6
2.2. Proteínas ABC	8
2.3. Sistema PDR en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
2.3.1. Transportadores ABC del sistema de resistencia pleiotrópica a drogas (PDR).....	11
2.3.2. Regulación genética del sistema PDR de levadura.....	13
3. Micotoxinas	16
4. Antecedentes.....	17
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias.....	27
2. Cepas y condiciones de cultivo de levaduras.....	27
2.1. Disrupción génica	28
2.1.1. Construcción del cassette de disrupción génica.....	28
2.1.2. Transformación de levadura con construcción de disrupción.....	29
2.1.3. Verificación de la delección.....	29
3. Plásmidos y construcciones.....	30
3.1. Construcción 1: Fusión de los promotores <i>PDR5</i> , <i>PDR15</i> , <i>SNQ2</i> , y <i>YOR1</i> con lucCP ⁺ en el genoma.....	30
3.2. Construcción 2: pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	31
3.3. Construcción 3: Sistema binario GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺ y Gal4 _{DBD} -Pdr.....	32
4. Oligonucleótidos.....	35
5. Técnicas de manipulación de ADN.....	35
5.1. Técnicas de transferencia génica.....	35

5.1.1.	Transformación de bacterias.....	35
5.1.2.	Transformación de levaduras.....	36
5.2.	Técnicas de extracción de ADN.....	36
5.3.	Amplificación y purificación de fragmentos de ADN.....	37
5.4.	Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.....	37
6.	Análisis de expresión de levadura: RT-PCR y microarray	38
6.1.	Toma de muestras	38
6.2.	Extracción de ARN con el método del “fenol ácido” (pH = 4.3).....	38
6.3.	Purificación del ARN total	39
6.4.	Análisis mediante microarray.....	39
6.4.1.	Hibridación en cristales.....	39
6.4.2.	Análisis bioinformático y estadístico.....	40
6.5.	RT-PCR.....	40
6.5.1.	Síntesis de ADNc por transcripción reversa.....	40
6.5.2.	Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	41
7.	Técnicas de manipulación de proteínas	41
7.1.	Obtención de extractos proteicos totales	41
7.1.1.	Obtención de extractos proteicos totales por hervido en tampón Laemmli.....	41
7.1.2.	Obtención de extractos proteicos totales por agitación con bolas.....	42
7.2.	Electroforesis de proteínas	42
7.3.	Transferencia a membrana de proteínas (<i>Western Blot</i>).....	43
7.4.	Detección inmunológica de proteínas	43
8.	Sistema luciferasa.....	44
9.	Ensayos de sensibilidad: crecimiento en medio sólido (Goteo).....	44
	RESULTADOS	47
	CAPÍTULO 1: MECANISMOS DE TOXICIDAD DE CITRININA (CIT) Y OCRATOXINA A (OTA)	49
1.	Perfiles de expresión génica de los promotores <i>GRE2</i> y <i>SOD2</i> ante CIT y OTA.....	49
1.1.	Respuesta dosis-dependiente de la cepa <i>wild type</i>	49

1.2. Comparación de <i>wild type</i> y mutante <i>Δpdr5</i>	50
1.3. Respuesta de reporteros luciferasa GRE2-lucCP ⁺ y SOD2-lucCP ⁺ frente a la combinación de citrinina y ocratoxina A.....	51
2. Estudio transcriptómico del mutante <i>Δpdr5</i> sometido a distintas condiciones de citrinina y ocratoxina A.....	52
2.1. Análisis de expresión genómica mediante microarray.....	52
3. Estudio de la posible relación del estrés oxidativo con los efectos causados por citrinina y ocratoxina A.....	62
3.1. Estudio de reporteros luciferasa GRE2-lucCP ⁺ , 3xAP1-lucCP ⁺ , y PDR5-lucCP ⁺ sometidos a CIT y OTA.....	62
3.2. CIT causa estrés oxidativo que se agrava en mutantes con defectos en la respuesta antioxidante	65
CAPÍTULO 2: ANÁLISIS EN TIEMPO REAL DE LA RESPUESTA MULTIDROGA EN LEVADURA: REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LOS TRANSPORTADORES PDR Y SELECTIVIDAD DE LOS ACTIVADORES TRANSCRIPCIONALES INVOLUCRADOS.....	67
1. Estudio transcripcional de los transportadores Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 tratados con varios xenobióticos.....	67
1.1. Respuesta diferencial de transportadores multidroga a las micotoxinas CIT y OTA.....	67
1.2. Respuesta diferencial de transportadores multidroga a menadiona y H ₂ O ₂	69
2. Función de los activadores Pdr1 y Pdr3 en la regulación transcripcional de transportadores multidroga por CIT.....	71
3. Estudio de los factores de transcripción Pdr en la respuesta adaptativa celular a micotoxinas y otros compuestos.....	74
3.1. Respuesta adaptativa a citrinina y ocratoxina A a través de los elementos PDRE.....	74
4. Reconocimiento de xenobióticos por parte de los factores de transcripción Pdr.....	77
4.1. Análisis bioinformático.....	79
4.2. Estudio del reconocimiento y activación por compuestos químicos de los factores Pdr.....	82

DISCUSIÓN	91
CONCLUSIONES	101
BIBLIOGRAFÍA	105
TABLAS SUPLEMENTARIAS	119
ANEXOS	127
Anexo 1. Pascual-Ahuir, A.; Vanacloig-Pedros, E.; Proft, M. Toxicity Mechanisms of the Food Contaminant Citrinin: Application of a Quantitative Yeast Model. <i>Nutrients</i> 2014, 6, 2077-2087.....	129
Anexo 2. Vanacloig-Pedros, E.; Proft, M.; Pascual-Ahuir, A. Different Toxicity Mechanisms for Citrinin and Ochratoxin A Revealed by Transcriptomic Analysis in Yeast. <i>Toxins</i> 2016, 8, 273.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Localización celular de los transportadores de membrana ABC de <i>S. cerevisiae</i>	9
Figura 2. Topología y organización de dominios de las subfamilias de proteínas ABC de levadura.....	10
Figura 3. Esquema del sistema PDR (<i>Pleiotropic Drug Resistance</i>)	11
Figura 4. Esquema de la regulación del sistema PDR de levadura.....	15

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 5. Deleción de genes de levadura con el marcador kan^r	28
Figura 6. Detalle del gen de luciferasa desestabilizada ($lucCP^+$).....	30
Figura 7. Esquema de la construcción1	31
Figura 8. Cassette de integración.....	31
Figura 9. Esquema construcción 2 ($pAG413-3xPDRE-lucCP^+$).....	32
Figura 10. Esquema $pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP^+$	33
Figura 11. Esquema de $pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr$	34
Figura 12. Esquema del sistema luciferasa	44

RESULTADOS

Figura 13. Perfiles dosis-respuesta de la expresión luciferasa de los promotores <i>GRE2</i> y <i>SOD2</i>	50
Figura 14. Comparación de perfiles dosis-respuesta de la expresión luciferasa de los promotores <i>GRE2</i> y <i>SOD2</i> de <i>wild type</i> y $\Delta pdr5$	51
Figura 15. Efecto sinérgico de citrinina y ocratoxina A.....	52
Figura 16. Comparación de genes inducidos en tratamientos con CIT y OTA con un diagrama de Venn	62
Figura 17. OTA y CIT inducen reporteros de estrés de forma diferencial.....	63
Figura 18. Actividad máxima (A_{max}) de los reporteros <i>GRE2</i> , <i>3xAP1</i> , y $PDR5-lucCP^+$	64
Figura 19. La toxicidad de CIT, pero no de OTA, aumenta en mutantes con defectos en la respuesta adaptativa a estrés oxidativo o el transporte multidroga.....	65

Figura 20. Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 responden de forma diferencial a las micotoxinas CIT y OTA	68
Figura 21. Comparación de la activación de <i>PDR5</i> , <i>PDR15</i> , <i>SNQ2</i> y <i>YOR1</i> por CIT y OTA	69
Figura 22. Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 responden de forma diferencial a menadiona y H ₂ O ₂	70
Figura 23. Actividad máxima (Amax) de los reporteros PDR5-, PDR15-, SNQ2- y YOR1-lucCP+.....	71
Figura 24. Función de Pdr1 y Pdr3 en la activación de Pdr5, Pdr15 y Snq2 por CIT.....	72
Figura 25. Comparación de las funciones de Pdr1 y Pdr3 en la activación de transportadores multidroga por CIT	73
Figura 26. Función de los activadores transcripcionales Pdr en la regulación génica a través de elementos PDRE por CIT.....	75
Figura 27. Función de los activadores transcripcionales Pdr en la regulación génica a través de elementos PDRE por OTA.....	76
Figura 28. Comparación de las funciones de Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, e Yrr1 en la activación génica a través de PDRE por CIT y OTA.....	77
Figura 29. Representación del sistema de doble plásmido UAS-Pdr.....	78
Figura 30. Comprobación de la expresión constitutiva de proteínas de fusión Gal4 ^{DBD} -Pdr ^{LBD} con <i>western Blot</i>	79
Figura 31. Comparación de la secuencia aminoacídica de la región XBD de Pdr1 y Pdr3.....	80
Figura 32. Comparación de la secuencia aminoacídica de la región DBD de Pdr1 y Pdr3.....	80
Figura 33. Comparación de las secuencias proteicas de factores de transcripción Pdr.....	81
Figura 34. Representación filogenética de factores de transcripción Pdr.....	82
Figura 35. Comparación de perfiles de activación por citrinina de los factores de transcripción Pdr	83
Figura 36. Comparación de perfiles de activación por ocratoxina A de los factores de transcripción Pdr.....	84

Figura 37. Comparación de perfiles de activación por menadiona de los factores de transcripción Pdr85

Figura 38. Comparación de perfiles de activación por H₂O₂ de los factores de transcripción Pdr.....86

Figura 39. Comparación de los perfiles dosis-respuesta entre los factores transcripcionales Pdr en respuesta a diferentes xenobióticos.....87

Figura 40. Comparación de los valores de inducción máxima entre los factores transcripcionales Pdr en respuesta a diferentes xenobióticos.....88

DISCUSIÓN

Figura 41. Estructura molecular de peróxido de hidrógeno, menadiona, citrinina, y ocratoxina A.....93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes sobreexpresados con FC>5 en tratamiento con 200ppm de CIT.....	53
Tabla 2. Genes sobreexpresados con FC>5 en tratamiento con 200ppm de OTA.....	55
Tabla 3. Genes sobreexpresados con FC>5 en tratamiento combinado de CIT/OTA....	58
Tabla 4. Grupos funcionales de genes inducidos por tratamientos con CIT, OTA, y CIT/OTA	61

ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

ABC: dominio de unión a ATP (*ATP-Binding Domain*)

AD: Dominio de activación

ade: adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.

ADP: Adenosín difosfato

Amax: Actividad máxima

Amp: Ampicilina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

BSA: Albúmina de suero bovino

CIT: citrinina

Ct: (*Threshold Cycle*) número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base

DBD: Dominio de unión a ADN

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: *deoxyribonucleic acid*

dNTP: Deoxiribonucleótido

DTT: Ditiotritol

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

FC: *Fold change* (número de veces de cambio de un valor con respecto al control)

FI: *Fold Induction* (valores de inducción)

h: hora

his: histidina

IE: Eficiencia de la inmunoprecipitación

IP: muestras inmunoprecipitadas

kan: kanamicina

LB: Luria Bertani (medio)

LBD: dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain*)

leu: leucina

lucCP⁺: gen reportero de la luciferasa desestabilizada

MDR: resistencia multidroga (*Multidrug Resistance*)

MEN: menadiona
met: metionina
min: minuto
mRNA: RNA mensajero
OD: Densidad Óptica
OTA: ocratoxina A
pb: pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDR: resistencia pleiotrópica a drogas (*Pleiotropic Drug Resistance*)
PDRE: elementos de resistencia pleiotrópica a drogas
PMSF: fenilmetilsulfonilo
ppm: partes por millón
PVDF: Polivinilideno de difluorido
qPCR: PCR cuantitativa
RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*Reactive Oxygen Species*).
rpm: revoluciones por minuto
rRNA: RNA ribosomal
RT: retrotranscripción
RT-PCR: PCR asociada a retrotranscripción
RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
SD: Medio Sintético Definido (*Synthetic Defined*)
SDS: Dodecil Sulfato Sódico
trp: triptófano
UAS: secuencia de activación aguas arriba (*Upstream Activation Sequence*)
ura: uracilo
WT: *wild type* (cepa silvestre)
XBD: dominio de unión a xenobióticos (*Xenobiotic Binding Domain*)
YPD: Extracto de levadura-Peptona-Dextrosa (*Yeast extract-Peptone-Dextrose*)

INTRODUCCIÓN

Las células, para mantener su supervivencia y tener un buen funcionamiento necesitan encontrarse en un estado de equilibrio u homeostasis. Esta situación se ve afectada continuamente no sólo por cambios fisiológicos propios de las células, sino también por las diversas condiciones ambientales a las que son sometidas. Estas situaciones externas pueden ser variaciones en temperatura, pH, concentración de iones, presencia de tóxicos, etc., y causan un estrés en la célula que produce una respuesta adaptativa inmediata y finamente regulada para recuperar de nuevo el estado de equilibrio.

A lo largo de su vida, todas las células se ven sometidas a distintos estreses químicos. En estas situaciones de estrés, la respuesta de adaptación celular se basa, mayormente, en el bombeo del compuesto tóxico fuera de la célula, o a determinados orgánulos, mediante diversos transportadores, así como la activación de enzimas detoxificadoras que permitan la degradación de dichas moléculas.

Los transportadores PDR (*pleiotropic drug resistance*), pertenecientes a la superfamilia *ATP-binding cassette* (ABC) son los responsables de la expulsión, o almacenamiento en orgánulos, de numerosas moléculas tóxicas para la célula, normalmente de origen exógeno, aunque algunas también generadas por la propia célula. Esta familia de proteínas se encuentra conservada en la mayoría de organismos por su importante labor.

Para estudiar este fenómeno de adaptación a estrés químico empleamos como sistema modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este organismo unicelular eucariota es empleado en el estudio de la respuesta adaptativa a estrés por su facilidad de utilización y manipulación genética, bajo coste y rapidez de crecimiento, y permite extrapolar, en gran medida, los resultados obtenidos al resto de células eucariotas, pudiendo servir como primera aproximación para el estudio de la resistencia multidroga en células eucariotas.

1. Respuesta celular a estrés.

Las células, a lo largo de su existencia, se encuentran con una amplia variedad de condiciones externas e internas que pueden llegar a inducir estrés en ellas. Este estrés se puede definir como una disrupción de la homeostasis o estado de equilibrio de la célula. Este desequilibrio puede llegar a amenazar su buen funcionamiento, e incluso, su supervivencia, ya que puede causar una acumulación de daños en el ADN, y otras moléculas, como proteínas y lípidos. De esta forma, podemos decir que la respuesta

celular a estrés es una reacción defensiva ante los cambios de las condiciones ambientales, como pH, temperatura, concentración de iones, o compuestos tóxicos, que causan un desequilibrio en las condiciones internas de la célula y un posible daño a su correcto funcionamiento y estructuras, y cuyo objetivo es permitir a la célula volver a un estado de equilibrio igual al anterior o distinto de adaptación al nuevo entorno.

Estos cambios suceden de forma continua y son sobrellevados por la célula habitualmente sin grandes problemas mediante mecanismos muy bien regulados, por ejemplo, a nivel génico. Los procesos implicados en las respuestas de adaptación dependen del tipo de estrés, y consisten tanto en acciones de protección y adaptación inmediata como de larga duración, pudiendo llevar a desarrollar nuevas variaciones fenotípicas en las células como adaptación evolutiva (López-Maury *et al.*, 2008)

La respuesta celular ante un estrés consiste, en primer lugar, en el reconocimiento específico del estrés, para, a continuación, desencadenar una serie de acciones que permitan a la célula volver a un estado de equilibrio. Estas acciones se basan en la generación y transducción de señales que pueden iniciar una remodelación de cromatina y reprogramación génica que active mecanismos efectores de adaptación a dicho estrés (de Nadal *et al.*, 2011; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2016; Vihervaara *et al.*, 2018). Varios estudios mostraron que la reorganización a nivel genómico en levadura ante distintos estreses llega a implicar, aproximadamente, el 10% de su genoma. Estos grupos de genes incluyen tanto los que son activados de forma específica a determinados estreses como los que lo hacen de forma inespecífica, e intervienen en distintos procesos celulares, como defensa a especies reactivas de oxígeno (ROS), síntesis de compuestos protectores, o reparación de ADN y proteínas (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). Por otra parte, también se ha visto, que hay una coordinación entre la activación de genes de respuesta a estrés y la represión de genes constitutivos y de desarrollo de las células para permitir la supervivencia de la célula (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Vanacloig-Pedrós *et al.*, 2015; López-Maury *et al.*, 2008; Vihervaara *et al.*, 2018).

Esta reprogramación transcripcional se encuentra muy altamente regulada para no producir daños mayores a la célula, ya que implica la activación y represión simultánea de múltiples genes y los procesos celulares que conllevan (Ni *et al.*, 2009; Vihervaara *et al.*, 2018).

1.1. Estrés oxidativo.

El **estrés oxidativo** se ha descrito como un desequilibrio entre la producción de oxidantes (especies reactivas de oxígeno (ROS)) y los mecanismos antioxidantes de un organismo, en favor de los oxidantes (Sies, 1985). Al producirse una disrupción del equilibrio redox, ésto puede ocasionar daño a distintos componentes celulares y dar lugar a peroxidación lipídica, y oxidación proteica o del ADN, pudiendo producir roturas en las cadenas de ácidos nucleicos, bloqueo de la replicación, o mutagénesis. (Sies, 2015).

Las **especies reactivas de oxígeno (ROS)** se generan por la reducción parcial del O_2 , incluyendo el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o el radical hidroxilo (OH^-), y son inestables y altamente reactivas. La aportación de ROS a la célula proviene tanto del entorno (radiación, luz, xenobióticos) como de procesos metabólicos internos (respiración mitocondrial, β -oxidación de ácidos grasos), pero de entre todos, se considera que la respiración mitocondrial es la principal fuente de ROS en células eucariotas a través del proceso de fosforilación oxidativa (Cadenas *and* Davies, 2000; Murphy, 2009).

El estrés oxidativo ocasionado por la acumulación de ROS ha sido ligado a múltiples patologías, entre ellas enfermedades neurodegenerativas, diabetes, cáncer y envejecimiento prematuro, donde el equilibrio redox se encuentra alterado (Halliwell, 2006; Ye *et al.*, 2015). Pero, a pesar que ROS pueden ocasionar grandes daños e incluso llevar a la muerte celular, cada vez hay más estudios que indican que, en los niveles adecuados, son fundamentales como moléculas señalizadoras de distintos procesos fisiológicos (Schieber *and* Chandel, 2014; Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017; Sena *and* Chandel, 2012).

Todos los organismos con procesos metabólicos aeróbicos están expuestos a estrés oxidativo, por lo que han desarrollado mecanismos para proteger sus componentes celulares del posible daño producido por ROS y mantener su estado redox. Las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tienen diversos **sistemas de defensa** frente a estrés oxidativo, tanto a nivel enzimático como no enzimático. Los mecanismos no enzimáticos consisten en pequeñas moléculas que actúan como *scavengers* o secuestradores de radicales libres, y entre ellos encontramos los antioxidantes glutatión, poliaminas y ácido ascórbico o vitamina C. Entre las enzimas que catalizan reacciones

para la eliminación o reducción de ROS encontramos superóxido dismutasas (SOD), catalasas, peroxidasas y reductasas (Jamieson, 1998; Morano *et al.* 2012)

La **respuesta a estrés oxidativo a nivel transcripcional** sucede de forma específica de ROS pero también hay una activación de genes más **inespecíficos**, activos con distintos estreses, generalmente implicados en la detoxificación, reparación del daño y recuperación de la célula, y cuya regulación está mayormente controlada por los factores de transcripción a estrés general **Msn2** y **Msn4** (Gasch *et al.*, 2000; Thorpe *et al.*, 2004). La respuesta **específica** a estrés oxidativo se encuentra regulada principalmente a través de los factores de transcripción **Yap1** y **Skn7**. A pesar de que la regulación transcripcional depende del tipo de oxidante, estos dos factores, especialmente Yap1, participan en la activación de un amplio número de genes implicados en los mecanismos de defensa antioxidante específico de ROS y bajo distintos oxidantes (Thorpe *et al.*, 2004; Morano *et al.*, 2012).

Anteriormente hemos indicado que la mitocondria, durante la respiración mitocondrial, es la principal fuente de ROS en la célula, pero no es la única. Entre las fuentes de estrés oxidativo se encuentran los xenobióticos. La exposición de las células a **xenobióticos** (compuestos externos al organismo procedentes del ambiente como toxinas o fármacos) produce la activación de la respuesta de adaptación a dichos compuestos. Parte de esta adaptación consiste en la metabolización y biotransformación de estos compuestos, pudiendo generarse especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dar lugar a estrés oxidativo (Pagano *et al.*, 2003; Klotz and Steinbrenner, 2017).

2. Resistencia pleiotrópica a drogas (PDR):

2.1. Resistencia a múltiples drogas: Definición y consecuencias biomédicas.

Las células eucariotas tienen mecanismos en respuesta a xenobióticos que las capacita para tolerar y resistir, simultáneamente, la toxicidad de gran variedad de compuestos no relacionados ni funcional ni estructuralmente, como toxinas o fármacos. Esta habilidad se conoce como **resistencia pleiotrópica a drogas** (*pleiotropic drug resistance* o **PDR**) o, también, **resistencia multidroga** (*multidrug resistance* o **MDR**), y se encuentra en gran cantidad de organismos, desde bacterias a mamíferos. El principal mecanismo causante de esta resistencia multidroga es la sobreexpresión de transportadores de membrana. Hay dos tipos de familias de transportadores responsables de MDR que se

encargan de eliminar los xenobióticos con distintas estrategias: *ATP-binding cassette (ABC)* y *Major facilitator superfamily (MFS)*. Las proteínas ABC son transportadores activos primarios que emplean la energía de la hidrólisis del ATP para transportar los compuestos, mientras que las MFS son transportadores activos secundarios que utilizan el gradiente electroquímico de los protones y tienen un menor número de sustratos (Sa-Correia *et al.*, 2009; Cannon *et al.*, 2009).

Estos transportadores se encargan de expulsar los compuestos dañinos (exógenos como drogas y toxinas, y otros generados durante algunos procesos celulares) o los acumulan en orgánulos como la vacuola (Jungwirth *and* Kuchler, 2006; Prasad *and* Goffeau, 2012). Este fenómeno permite a la célula sobrevivir ante la exposición a tóxicos, pero también es uno de los principales problemas que aparecen en tratamientos de quimioterapia en cáncer, infecciones fúngicas, o patologías neurológicas como epilepsia o depresión, entre otros, ya que disminuyen su eficiencia (Holohan *et al.*, 2013; Prasad *and* Rawal, 2014; Paul *and* Moye-Rowley, 2014; Löscher *and* Potschka, 2005). Debido a la importancia que la MDR supone en los tratamientos médicos se ha investigado cómo revertir o minimizar los efectos de este fenómeno. Para ello se ha intentado desarrollar técnicas y estrategias enfocadas en el control de los transportadores implicados. En los tratamientos frente a cáncer las investigaciones se han centrado mayormente en las proteínas de la familia ABC, P-glicoproteína (P-gp codificada por MDR1/ABCB1), la proteína 2 asociada a resistencia multidroga (MRP2/ABCC2), y la proteína de resistencia de cáncer de pecho (BCRP/ABCG2) (Fletcher *et al.*, 2016). Los métodos empleados para evitar el fenómeno MDR consisten en distintas estrategias, como inhibidores de P-gp, RNA de interferencia o moduladores epigenéticos, aunque todavía se están desarrollando (Robey *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Lo que parece observarse en todos los casos es que un mayor conocimiento de la regulación de estas proteínas es un paso necesario para poder controlar más específica y eficientemente su sobreexpresión y de esta forma el proceso MDR.

Además de su importancia en biomedicina este fenómeno de resistencia a compuestos químicos también afecta a otros sectores como la agricultura. Por un lado, supone una posible ventaja para desarrollar plantas acumuladoras de compuestos tóxicos en fitorremediación (Conte *and* Lloyd, 2011), pero por otro lado, este fenómeno reduce la efectividad de los tratamientos con herbicidas para eliminar las malas hierbas, con el

consiguiente problema para el medioambiente y económico en el sector agroalimentario (Teixeira *et al.*, 2007; Cabrito *et al.*, 2011).

2.2. Proteínas ABC

En el apartado anterior hemos comentado que entre los distintos mecanismos que contribuyen a la resistencia multidroga causantes de resistencia a tratamientos antifúngicos, de quimioterapia en cáncer, herbicidas, etc., la sobreexpresión de los transportadores de la familia ABC parece ser el más importante.

La superfamilia de proteínas *ATP-binding cassette* (ABC) son proteínas, muchas de las cuales, están conservadas de bacteria a eucariota superior (van Veen *and* Koning, 1997). Esta familia de proteínas está compuesta por más de 3000 miembros, de los que muchos comparten estructura y dominios similares (Jungwirth *and* Kuchler, 2006; Dean *and* Annilo, 2005). Estas proteínas están implicadas en muchos fenómenos biológicos, con gran variedad de funciones, desde el transporte transmembrana, a la regulación de distintos procesos celulares. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* encontramos 30 genes codificantes de proteínas ABC (Jungwirth *and* Kuchler, 2006), mientras que en humanos hay 51 según la *Human Genome Organization* (HUGO). Estos genes se encuentran divididos según la clasificación de la HUGO en siete subfamilias (ABCA a ABCG) en función de la similitud de sus secuencias aminoacídicas y filogenia, y estas subfamilias están representadas en el genoma de todos los organismos eucariotas (Dean *and* Annilo, 2005; Paumi *et al.*, 2009). Además de esta clasificación, en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, estas proteínas ABC se pueden encontrar clasificadas en 5 subfamilias: PDR, MRP/CFTR, MDR, ALDp, y YEF3/RLI (Jungwirth *and* Kuchler, 2006; Paumi *et al.*, 2009). En este trabajo nos centraremos en algunos transportadores de membrana plasmática pertenecientes a la subfamilia PDR (Pdr5, Pdr15, y Snq2), así como en Yor1, perteneciente a la subfamilia MRP. En la Figura 1 se muestran los transportadores ABC en *S. cerevisiae*.

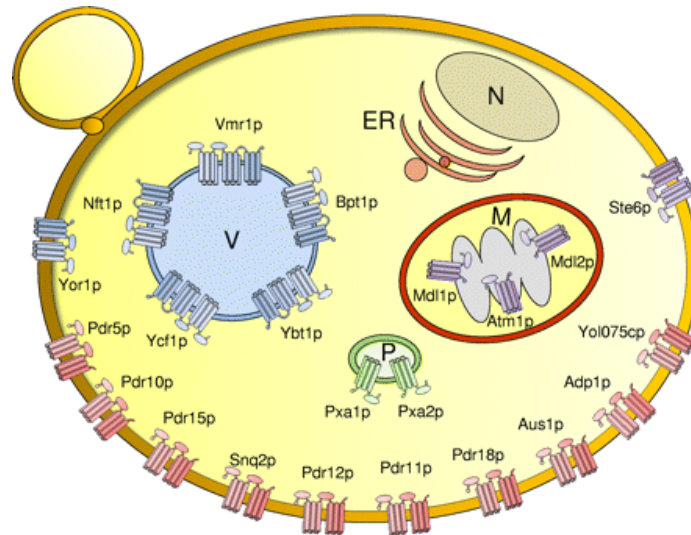


Figura 1. Localización celular de los transportadores de membrana ABC de *S. cerevisiae*. Las distintas subfamilias de transportadores se muestran en distintos colores: MDR (morado), MRP /CFTR (azul), ADLP (verde), y PDR (rojo). N: núcleo, ER: retículo endoplasmático, M: mitocondria, P: peroxisoma, V: vacuola. (Paumi *et al.*, 2009)

La característica común más destacada de los transportadores de esta superfamilia es que comparten un dominio ATPasa altamente conservado (ABC), que se encarga de tomar e hidrolizar el ATP (Jungwirth *and* Kuchler, 2006; Paumi *et al.*, 2009). Los transportadores ABC, en general, se componen de dos tipos de dominios: un **dominio de unión a nucleótido (NBD o nucleotide-binding domain)** y un **dominio transmembrana (TMD o transmembrane domain)**. La región transmembrana (TMD) contiene varios segmentos α -hélice transmembrana (TMS), normalmente 6, y es la parte más variable de los transportadores, que podría implicar la especificidad de sustrato y la gran variedad de compuestos reconocidos. Por el contrario, NBD se encuentra altamente conservado y se encarga de la hidrólisis del ATP a través de su ATPasa (Prasad *and* Goffeau, 2012; Jungwirth *and* Kuchler, 2006). Es decir, TMD reconoce y moviliza los sustratos a través de la membrana, mientras que NBD produce la energía necesaria para ello. Generalmente, estas proteínas contienen dos NBD citosólicos y dos (o incluso 3) regiones TMD en tandem ((TMD₆-NBD)₂) para formar lo que se considera un transportador completo o “full-size”, aunque también se pueden encontrar “medias” proteínas (*Half-size*) con sólo un NBD y un TMD, que funcionan como homo- o heterodímeros. Además, algunas de ellas pueden no contener dominio transmembrana (Prasad *and* Goffeau, 2012; Jungwirth *and* Kuchler, 2006). En las proteínas PDR encontramos una organización estructural reversa, es decir, el NBD precede a la región transmembrana ((NBD-TMD₆)₂) (Figura 2).

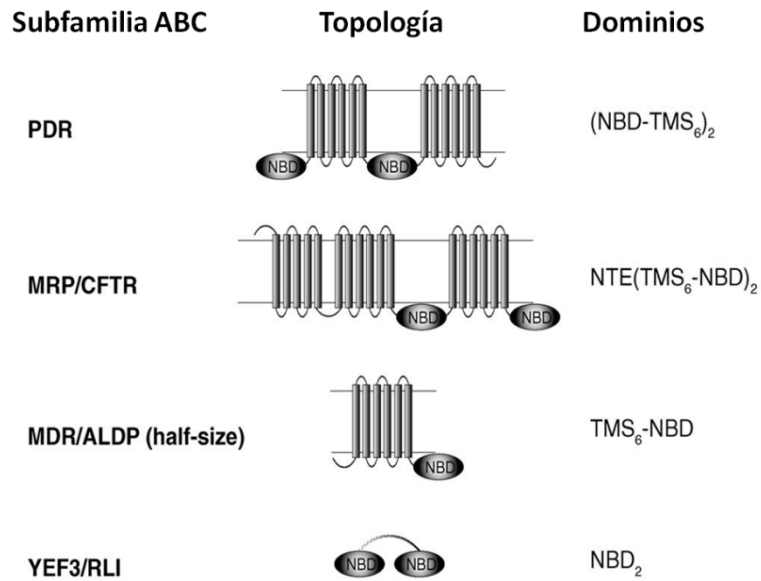


Figura 2. Topología y organización de dominios de las subfamilias de proteínas ABC de levadura. NBD: dominio de unión a nucleótidos; NTE: extensión N-terminal; TMS: segmento transmembrana. (Modificado de Jungwirth and Kuchler, 2006).

Conocer la estructura molecular de los sitios de unión al sustrato de los transportadores es importante tanto para entender la interacción proteína-sustrato como para desarrollar inhibidores específicos. A pesar de lo anterior, algunos estudios indican que la selección de sustrato en transportadores multidroga ABC eucarióticos no viene determinada únicamente por las características estructurales de los dominios transmembrana, sino también por su comportamiento dinámico (Ernst *et al.*, 2010). Además, otro factor que hace variar la actividad de estos transportadores es la fina regulación a la que son sometidos por los factores de transcripción del sistema PDR. A continuación, describiremos en más detalle el sistema de resistencia pleiotrópica a drogas (PDR) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3. Sistema PDR en *Saccharomyces cerevisiae*.

El **sistema de resistencia pleiotrópica a drogas (PDR)** de *Saccharomyces cerevisiae* confiere a la célula gran tolerancia a una amplia variedad de compuestos exógenos o xenobióticos así como de metabolitos tóxicos endógenos mediante su detoxificación. De esta forma, la célula es capaz de mantener un equilibrio apropiado para su correcto funcionamiento en condiciones fisiológicas normales como de sobrevivir a condiciones adversas. Pero esta capacidad protectora de la célula puede dar lugar al fenómeno de

resistencia a múltiples drogas (MDR) o resistencia pleiotrópica a drogas (PDR) anteriormente comentado.

El sistema PDR está compuesto por transportadores ABC y MFS que se encargan de movilizar los compuestos a eliminar, así como de los factores de transcripción que se encargan de regularlos, y otras proteínas mediadoras (Figura 3). En este trabajo nos vamos a centrar en varios transportadores ABC y los factores de transcripción que parecen tener un papel en su regulación.

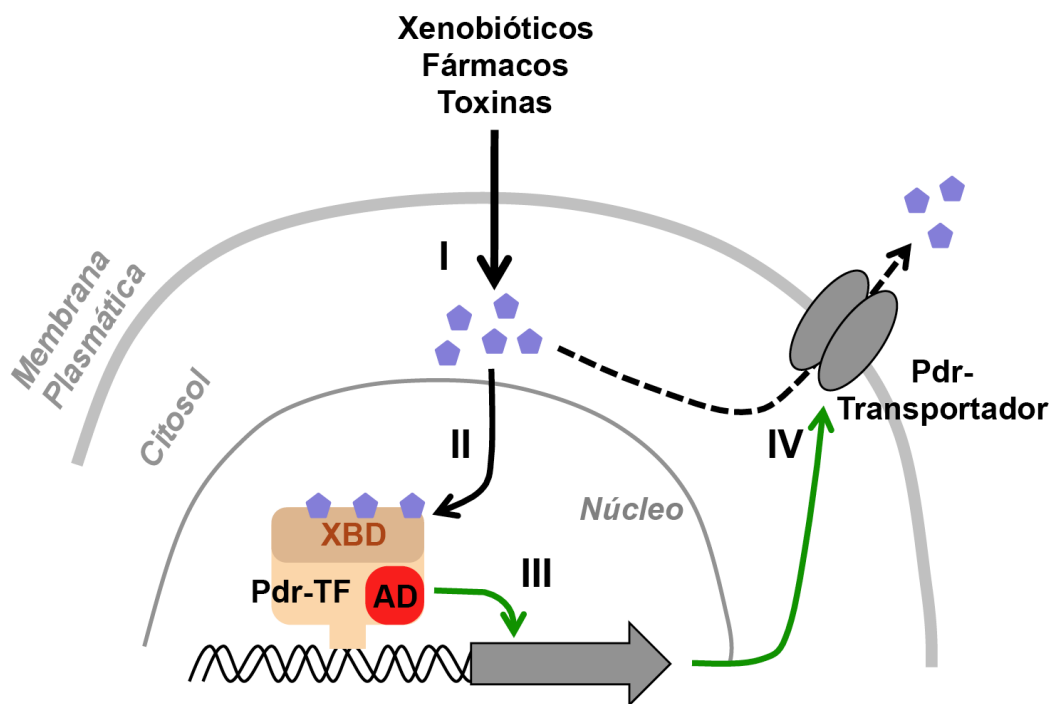


Figura 3. Esquema del sistema PDR (Pleiotropic Drug Resistance). (I) Diferentes compuestos con actividad xenobiótica entran al interior de la célula. (II) Los compuestos químicos son reconocidos de forma directa por unos factores de transcripción especializados (Pdr-TF = Factores de transcripción específicos para la respuesta PDR). Estos factores de transcripción contienen dominios especializados para el reconocimiento de xenobióticos (XBD = *Xenobiotic Binding Domain*) o para la activación de la transcripción (AD = *Activation domain*). (III) La unión del xenobiótico activa al factor Pdr-TF y se produce un incremento de la expresión de genes para transportadores específicos del sistema PDR (Pdr-Transportador). (IV) La actividad de estos transportadores en la membrana plasmática lleva a la expulsión del xenobiótico al exterior de la célula.

2.3.1. Transportadores ABC del sistema de resistencia pleiotrópica a drogas (PDR).

Los transportadores ABC de las células de levadura se encuentran repartidos en las distintas membranas de la célula, desde la membrana plasmática a los distintos orgánulos, como vacuola o mitocondria (Figura 1). Entre ellas se encuentran los

transportadores de la subfamilia PDR, localizados en la membrana plasmática y que participan principalmente, como su nombre indica, en la resistencia pleiotrópica a drogas (PDR). También en la membrana plasmática se encuentra localizado el transportador Yor1, perteneciente a la subfamilia MPR y componente del sistema PDR.

Los **transportadores PDR** mejor caracterizados son **Pdr5** (Balzi *et al.*, 1994) y **Snq2** (Servos *et al.*, 1993). Ambos transportadores se encuentran en la membrana plasmática y movilizan cientos de compuestos distintos, como antibióticos, fungicidas, esteroides y fármacos (Mahé *et al.*, 1996; Kolaczowski *et al.*, 1998; Rogers *et al.*, 2001; Ernst *et al.*, 2005). Pdr5 y Snq2 tienen otras funciones importantes para la fisiología y mantenimiento de la célula además de participar en el proceso de resistencia multidroga, como la exportación de cationes (Miyahara *et al.*, 1996) y mediar en el proceso de percepción de cuorum (*quorum sensing*) en poblaciones de levadura en cultivos de medio líquido (Hlaváček *et al.*, 2009), mecanismo que permite la regulación de la expresión génica en respuesta a la densidad de población celular. Además, Pdr5 también participa en la translocación de fosfolípidos de la membrana plasmática (Kihara and Igarashi, 2004). Pdr5 funciona como homodímero, y sus niveles son más elevados durante la fase de crecimiento exponencial, y se reducen cuando las células entran en crecimiento diáuxico o hay falta de nutrientes (Mamnun *et al.*, 2004).

Otros componentes PDR son los transportadores de la membrana plasmática **Pdr10** y **Pdr15** (Wolfger *et al.*, 1997), homólogos de Pdr5 con una similitud del 66 y 74% respectivamente (Wolfger *et al.*, 2004). Pdr15 media el transporte de cloramfenicol y detergentes, y de forma opuesta a Pdr5, es más abundante cuando las células salen de la fase de crecimiento exponencial (Wolfger *et al.*, 2004). Esto podría indicar una función relacionada pero no solapante en la detoxificación celular en diferentes fases de crecimiento o bajo ciertas condiciones metabólicas. Por su parte, Pdr10 se encarga de la correcta distribución y funcionamiento de algunas proteínas, como Chs3 (chitin sintasa) o del transportador Pdr12, de forma que, según se muestra en Rockwell *et al.*(2009) la disrupción de *PDR10* aumenta los niveles de Pdr12 convirtiendo al mutante en resistente a sorbitol. El transportador **Pdr12** también se encuentra en la membrana plasmática y está implicado en la resistencia a ácidos orgánicos débiles, y algunos de sus sustratos son benzoato, sorbato, ácido propiónico, y otros ácidos orgánicos producidos por la célula (Piper *et al.*, 1998; Hatzixanthis *et al.*, 2003). El resto de proteínas PDR están muy poco descritas. **Pdr18** se ha relacionado con la resistencia a

algunos herbicidas y tiene un papel fisiológico en la homeostasis de lípidos (Cabrito *et al.*, 2011). Por su parte, **Pdr11** y **Aus1** parecen estar implicadas en la toma de esterol en levadura (Wilcox *et al.*, 2002).

Por último, entre los transportadores responsables de la respuesta PDR se encuentra **Yor1**. Esta proteína forma parte de la subfamilia MPR y se encuentra localizada en la membrana plasmática. Yor1 está implicado en la tolerancia a oligomicina, cadmio, y un rango de xenobióticos tóxicos con grupos carboxilo (Cui *et al.*, 1996; Decottignies *et al.*, 1998). Pdr5 y Yor1 median la translocación de drogas similares en muchas ocasiones a pesar de sus diferencias topológicas, pero estudios *in vitro* han mostrado una actividad ATPasa 15 veces mayor en Pdr5 que en Yor1, indicando diferencias entre ambos transportadores a nivel regulatorio o de mecanismos (Decottignies *et al.*, 1998). Ensayos posteriores con mutantes de delección mostraron solapamiento en la especificidad del sustrato y actividad compensatoria entre Pdr5, Snq2 y Yor1, de forma que en los mutantes carentes de actividad de alguno de ellos y sometidos a sustratos específicos de estos transportadores los niveles de expresión de los otros se elevaban (Kolaczowska *et al.*, 2008). Estos estudios indicarían un elevado nivel de regulación en este proceso de respuesta a xenobióticos.

2.3.2. Regulación genética del sistema PDR de levadura.

La expresión de los transportadores PDR está controlada por varios **factores de transcripción** entre los que destacan **Pdr1** (Balzi *et al.*, 1987) y **Pdr3** (Delaveau *et al.*, 1994). Estos reguladores forman parte de la familia de factores de transcripción GAL4 que contiene un *cluster* de Zinc del tipo Zn_2Cys_6 de **unión a ADN (DBD)** (Kolaczowska and Goffeau, 1999). Este DBD se encuentra en N-terminal, mientras que el **dominio de activación (AD)** se localiza en C-terminal. Entre ambos encontramos el **dominio de unión a xenobióticos (XBD)** y de reconocimiento por algunos reguladores de estos factores de transcripción. La región que incluye desde XBD a AD se conoce como **dominio de transactivación en respuesta a xenobióticos (X-TAD)** (Thakur *et al.*, 2008; Paul and Moye-Rowley, 2014). A través de este dominio X-TAD, Pdr1/Pdr3 son capaces de reconocer y unirse directamente a xenobióticos específicos, y a continuación activar la transcripción de los genes diana. Es decir, estos factores de transcripción Pdr activarían la transcripción de transportadores de drogas por unión directa al xenobiótico de forma similar a su ortólogo en mamíferos que son los

receptores nucleares, incluyendo CAR (*constitutive androstane receptor*) y PXR (*pregnane X receptor*) (Thakur *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Yan and Xie, 2016).

Además, en estudios con diversos azoles se comprobó que la activación transcripcional de los genes diana de Pdr1/Pdr3 era mediada por la subunidad **Gal11/Med15** del complejo coactivador Mediador que interactúa con la RNA polimerasa II. El AD del factor de transcripción se une directamente al dominio KIX de Gal11, altamente conservado (Thakur *et al.*, 2008; Nishikawa *et al.*, 2016). El uso de inhibidores de esta interacción bloqueando el dominio KIX se ha visto que vuelve a las células de levadura sensibles a estos azoles. Por lo tanto esta estrategia podría servir para aumentar la eficacia de los tratamientos en enfermedades infecciosas de hongos (Nishikawa *et al.*, 2016).

Pdr1 y Pdr3 regulan la transcripción de los genes diana a través de sitios de unión en el promotor del gen diana, con secuencia 5'-CCGCGG-3', y que se conocen como **elementos de resistencia pleiotrópica a drogas (PDRE – pleiotropic drug resistance elements)** (Hellauer *et al.*, 1996). Pdr1/Pdr3 pueden unirse a un solo sitio PDRE, pero para la activación del promotor es necesario al menos tres sitios PDRE (Kaltzmann *et al.*, 1996). Pdr1 y Pdr3 pueden regular la expresión de los genes dianas tanto positiva como negativamente a través de los sitios PDRE y formar homo- o heterodímeros, lo que podría implicar la intervención de otros factores de transcripción en el proceso (Mamnun *et al.*, 2002).

Pdr1 y Pdr3 regulan gran número de genes, como los codificantes de Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1. Pero además de estos factores de transcripción, hay otros que también forman parte de su regulación. Entre los reguladores que participan en la respuesta PDR junto con Pdr1 y Pdr3, se encuentran **Stb5** (Akache and Turcotte, 2002), **Yrr1** (Cui *et al.*, 1998), y dos homólogos parálogos de éste, **Yrm1** (Lucau-Danila *et al.*, 2003) y **Pdr8** (Hikkel *et al.*, 2003). En la Figura 4 se muestra un esquema de este sistema de regulación PDR.

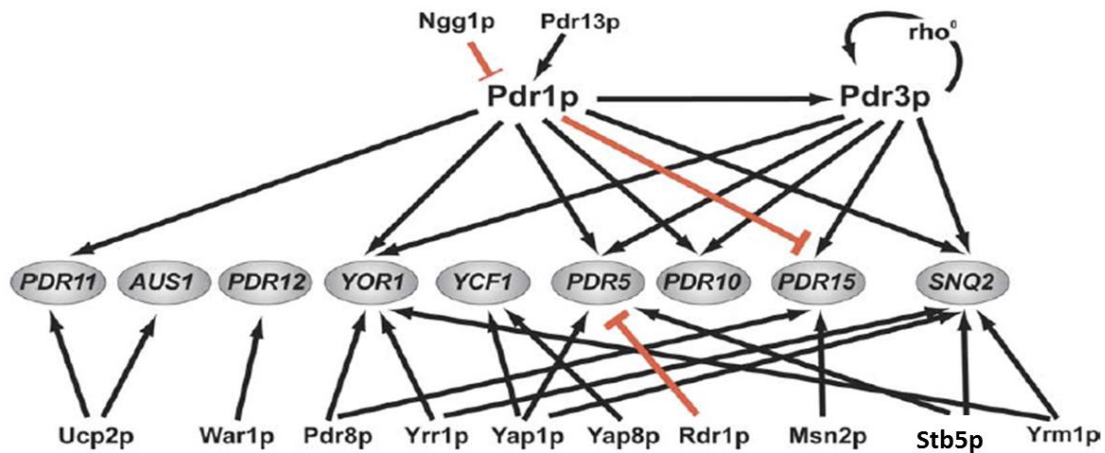


Figura 4. Esquema de la regulación del sistema PDR de levadura. Los genes en la línea central representan los genes diana de los reguladores transcripcionales. Las líneas muestran la regulación negativa (rojo) y positiva (negro). (Jungwirth *and* Kuchler, 2006)

PDR5 está regulado positivamente por Pdr1 y Pdr3 y negativamente por el factor de transcripción Rdr1, que forma heterodímeros con Pdr1 o Pdr3 compitiendo para unirse a los elementos PDRE (Hellauer *et al.*, 2002).

PDR15 está regulado por Pdr1, Pdr3 y Pdr8 (Hikkel *et al.*, 2003), pero además, su expresión está asociada a la respuesta general a estrés, por lo que se induce ante shock osmótico y térmico, falta de nutrientes y ácidos débiles, bajo el control de Msn2, ya que en el promotor de *PDR15* se encuentran elementos de respuesta general a estrés (STRE) (Wolfger *et al.*, 2004).

SNQ2 y ***YOR1*** están regulados por Pdr1, Pdr3 e Yrr1, que sólo forma homodímeros (Cui *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001) y reconoce elementos muy similares pero distintos de PDRE (Le Crom *et al.*, 2002). En el caso de *SNQ2*, también puede ser regulado por el factor Stb5, que forma un heterodímero con Pdr1, y está implicado en la respuesta a estrés oxidativo (Akache *and* Turcotte, 2002; Larochelle *et al.*, 2006).

Anteriormente hemos comentado que los factores de transcripción Pdr activan la transcripción de los genes de los transportadores tras unión directa con los xenobióticos, pero además, están regulados por otros factores de transcripción. Pdr1 es regulado positivamente por las proteínas Ssz1 y Zuo1 (Prunuske *et al.*, 2012). Pdr3 es regulado por Pdr1, pero al igual que Yrr1 es capaz de autorregularse a través de los sitios PDRE de sus propios promotores (Delahodde *et al.*, 1995). Además, Yrr1 puede ser inducido

por la actividad de Pdr1/Pdr3 (Zhang *et al.*, 2001) e inhibido por el factor de transcripción Yrm1, aunque, en ausencia de Yrr1, Yrm1 activa la transcripción de genes regulados por éste (Lucau-Danila *et al.*, 2003). Por último, se ha sugerido que Stb5 podría autorregularse, ya que se une a su propio promotor (Akache *et al.*, 2004).

Yap1 también ha sido relacionado con la respuesta multidroga por participar en la resistencia a cicloheximida (Leppert *et al.*, 1990), aunque estos efectos suceden mayormente con su sobreexpresión o cuando las drogas actúan a través de mecanismos de oxidación (Teixeira *et al.*, 2008)

3. Micotoxinas.

Las **micotoxinas** son pequeñas moléculas tóxicas producidas por una gran variedad de hongos filamentosos y que abarcan varias clases de metabolitos secundarios sin una estructura química o modo de acción común (Bennett *and* Klich, 2003). Estos productos naturales dañinos de los mohos contaminan los alimentos y los piensos en todo el mundo con terribles consecuencias económicas, ya que afectan a la mayoría de los cultivos de alimentos básicos como maíz, trigo y arroz (Marroquin-Cardona *et al.*, 2014; Moretti *et al.*, 2013). Más allá de las pérdidas económicas, las micotoxinas tienen un impacto severo en el bienestar humano (Wu *et al.*, 2014). Sus propiedades toxicológicas y sus posibles efectos sobre la salud han sido ampliamente estudiados y relacionados con algunas enfermedades, aunque es muy difícil demostrar el vínculo entre la exposición a la toxina y el inicio de los síntomas en la mayoría de los casos.

Las micotoxinas son liberadas por algunos hongos en la naturaleza por razones poco conocidas, y aunque se ha aceptado que la síntesis y secreción de toxinas median la virulencia patógena de los microorganismos en las plantas, las dianas moleculares y las estrategias para lograrlo aún no se han determinado en el caso de las micotoxinas (Mobius *and* Hertweck, 2009). Se han hecho considerables esfuerzos para comprender los mecanismos moleculares de las micotoxinas que causan daño celular y toxicidad (Doi *and* Uetsuka, 2014; Escriva *et al.*, 2015; Vettorazzi *et al.*, 2014). Aunque es importante comprender la base molecular de la acción de las micotoxinas en animales, estos enfoques son a menudo difíciles de llevar a cabo porque la relación dosis-efecto depende de muchos parámetros diferentes (Escriva *et al.*, 2015). Como alternativa, los mecanismos fundamentales de toxicidad para cada micotoxina se pueden revelar de manera eficiente en cultivos celulares de células eucariotas inferiores como levadura.

Las ocratoxinas son un pequeño grupo de micotoxinas producidas por las especies *Aspergillus* y *Penicillium*, con **ocratoxina A (OTA)** como compuesto principal, que se encuentra en una amplia gama de materias primas y alimentos procesados (Wang *et al.*, 2016). La OTA es nefrotóxica, carcinogénica y un teratógeno potente cuando se prueba en diferentes modelos de mamífero, y por lo tanto, es un riesgo potencial para la salud humana (Koszegi *and* Poor, 2016). Varios autores respaldan que el modo de acción de OTA implica la formación de aductos de ADN covalentes (Faucet *et al.*, 2004; Mantle *et al.*, 2010; Pfohl-leszkowicz *and* Manderville, 2012) y el aumento de especies reactivas de oxígeno (Rahimtula *et al.*, 1988; Sorrenti *et al.*, 2013), y por lo tanto, estas actividades podrían explicar la actividad genotóxica y mutagénica de la OTA.

La co-ocurrencia de OTA con **citrinina (CIT)**, otra micotoxina, ha sido frecuentemente reportada (Bragulat *et al.*, 2008; Vrabcheva *et al.*, 2000). CIT es producida por hongos filamentosos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Monascus*, y contamina los mismos alimentos básicos que OTA (Ostry *et al.*, 2013). Los hongos como *Penicillium verrucosum* son capaces de producir tanto OTA como CIT, sin embargo, diferentes condiciones ambientales podrían favorecer la producción de una micotoxina sobre la otra (Schmidt-Heydt *et al.*, 2012; Schmidt-Heydt *et al.*, 2015; Stoll *et al.*, 2013). Mucho menos se sabe sobre los mecanismos de toxicidad de CIT, sin embargo, se ha demostrado que también es una eficiente nefrotoxina (Flajs *and* Peraica, 2009). Varios grupos han contribuido a la identificación de posibles mecanismos moleculares de la toxicidad de CIT, encontrando, entre otras consecuencias, el aumento de estrés oxidativo relacionado con alteraciones de la función mitocondrial, y la inducción de la apoptosis (Bouslimi *et al.*, 2008; Chan, 2007; Kumar *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2011; Pascual-Ahuir *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2006). Se ha propuesto que la concurrencia de ambas toxinas da lugar a efectos sinérgicos, sin embargo, no se han llegado a conclusiones claras (Follmann *et al.*, 2014; Klaric *et al.*, 2013).

4. Antecedentes.

Las **células de levadura** son un modelo excelente para estudiar la respuesta adaptativa a distintos estreses, como la exposición a distintos químicos y xenobióticos. Esto es debido a que los organismos unicelulares tienen la necesidad de desarrollar sistemas de defensa para la detoxificación muy eficientes y que se activen de forma rápida, ya que están totalmente expuestas al entorno (Dos Santos *et al.*, 2012). El análisis de expresión

génica se ha convertido en una herramienta valiosa para tratar de comprender los mecanismos moleculares en respuesta a agentes tóxicos, incluidas micotoxinas (Afshari *et al.*, 2011), y el modelo de levadura es particularmente importante en estudios en toxigenómica (Yasokawa *and* Iwahashi, 2010).

En estudios anteriores, cuantificamos la respuesta de adaptación transcripcional inmediata a CIT en levadura empleando reporteros del **sistema luciferasa** (Pascual-Ahuir *et al.*, 2014). El sistema de luciferasa desestabilizada nos permite cuantificar la expresión génica inducida por un estrés de forma sensible y en tiempo real en células vivas de levadura (Rienzo *et al.*, 2012). Además, podemos estudiar simultáneamente distintas condiciones de uno o varios compuestos al obtener sus perfiles dosis-respuesta (Dolz-Edo *et al.*, 2013).

Una forma de estudiar la respuesta de adaptación transcripcional a xenobióticos en conjunto son los **análisis transcriptómicos**. Se han realizado distintos enfoques transcriptómicos con OTA usando diferentes líneas celulares y sistemas de modelos de mamíferos (Arbillaga *et al.*, 2007; Hibi *et al.*, 2013; Hundhausen *et al.*, 2008; Marin-Kuan *et al.*, 2006). La comparación de los datos genómicos no produce un patrón uniforme de genes desregulados, por lo que parece que la variabilidad de la respuesta transcriptómica inducida por OTA podría ser una consecuencia del rango de condiciones experimentales así como el contexto celular (Vettorazzi *et al.*, 2013). A diferencia de OTA, los datos de perfil genómico para el tratamiento de CIT son escasos, sin embargo, la aplicación de enfoques de microarrays de levadura ha identificado la defensa antioxidante como uno de los modos primordiales de detoxificación en exposición a CIT (Iwahashi *et al.*, 2007). Una parte primordial de la planificación del ensayo transcriptómico es la selección de las condiciones de inducción óptimas ya que la respuesta transcripcional a las micotoxinas parece ser transitoria y dependiente de la dosis, como se observó previamente con CIT (Pascual-Ahuir *et al.*, 2014).

En la respuesta adaptativa a xenobióticos en levadura participa un grupo de proteínas que forman el denominado **sistema PDR** (*pleiotropic drug resistance*). Aunque existe mucha literatura sobre los distintos factores de transcripción y transportadores multidroga que componen este sistema, todavía no está claro como se produce la especificidad en la respuesta a tan variado número de moléculas. Una estructura regulatoria muy bien definida parece ser fundamental, por lo que los factores de

transcripción Pdr podrían ser clave, ya que parece que son capaces de detectar directamente las moléculas a eliminar (Thakur *et al.*, 2008). Por ello, desarrollar herramientas para describir las distintas sensibilidades del sistema PDR en levadura puede ser de gran utilidad.

En este trabajo, vamos a estudiar cuáles son los mecanismos de toxicidad de las micotoxinas CIT y OTA, y tratar de comprender en más profundidad la red de regulación del sistema PDR.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es estudiar la implicación de las proteínas pertenecientes al sistema PDR de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta adaptativa a xenobióticos, como las micotoxinas citrinina y ocratoxina A. Para lograr este objetivo general desarrollamos varios **objetivos específicos**:

1. Identificar y comparar los mecanismos de toxicidad de las micotoxinas citrinina y ocratoxina A.
2. Caracterizar la activación transcripcional dosis-dependiente de transportadores multidroga en respuesta a diferentes xenobióticos.
3. Comparar de forma cuantitativa las sensibilidades y selectividades de los factores de transcripción involucrados en la respuesta multidroga.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas y condiciones de cultivo de bacterias.

En este trabajo se utilizó la cepa DH5 α (*F'* Φ 80*dlacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*) *deoR**recA1* *endA1* *hdsR17*(*rKmK*⁺)*phoA* *supE44* λ -*thi*¹) de *Escherichia coli* para la propagación y posterior aislamiento de los plásmidos.

El medio de cultivo empleado para su crecimiento fue el **medio LB (Luria Bertani)**, cuya composición es 0,5% extracto de levadura, 1% triptona y 1% NaCl, disuelto en agua MiliQ y autoclavado a 121°C durante 20 minutos. En el caso de los medios sólidos de LB se adicionó un 2% de agar bacteriológico. Además, se utilizaron medios selectivos LB con adición de ampicilina (50 μ g/ml) o kanamicina (100 μ g/ml) para la selección de plásmidos.

Los cultivos de bacterias se incubaron durante toda la noche a 37°C, manteniendo una agitación constante (200 rpm) en el caso de los cultivos en medio líquido.

2. Cepas y condiciones de cultivo de levaduras.

Las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en este trabajo se muestran en las tablas suplementarias 1 a 4. Los medios utilizados para crecer las cepas de levadura fueron el medio completo **YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)** y el medio mínimo **SD (Synthetic Dextrose)**, suplementados con aminoácidos o antibiótico en función de las necesidades.

El medio **YPD** está compuesto de 1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica y 2% glucosa, diluido en agua MiliQ y autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Se suplementó con 200 μ g/ml de geneticina (G418) para seleccionar mutantes de delección a los que se integró el marcador de resistencia a kanamicina.

El medio de cultivo **SD** está compuesto por 0,7% *yeast nitrogen base* (YNB), 2% glucosa, y 50mM ácido succínico pH=5,5 ó 3 (ajustado con Tris base), diluido en agua MiliQ y autoclavado a 121°C durante 20 minutos. Además, a este medio se le adicionaron aminoácidos y bases nitrogenadas (25 μ g/ml adenina, 100 μ g/ml histidina, 100 μ g/ml leucina, 100 μ g/ml metionina, 50 μ g/ml triptófano y 25 μ g/ml uracilo) en función de la selección por auxotrofia a utilizar.

En los medios sólidos, en todos los casos, se suplementó 2% agar bacteriológico. Las células se incubaron a 28°C, y en el caso de los cultivos líquidos, en agitación constante a 200rpm.

2.1. Disrupción génica.

Los mutantes de delección $\Delta gal4$ ($gal4::kan$), $\Delta pdr1$ ($pdr1::his3$) y $\Delta pdr3$ ($pdr3::his3$) se obtuvieron a partir de las cepas W303-1A, $\Delta pdr1$ ($pdr1::kan$) y $\Delta pdr3$ ($pdr3::kan$), respectivamente, mediante la adaptación del sistema loxP de disrupción de genes descrito por Güldener *et al.* (1996). A continuación se muestra un esquema de trabajo de esta técnica (Figura 5).

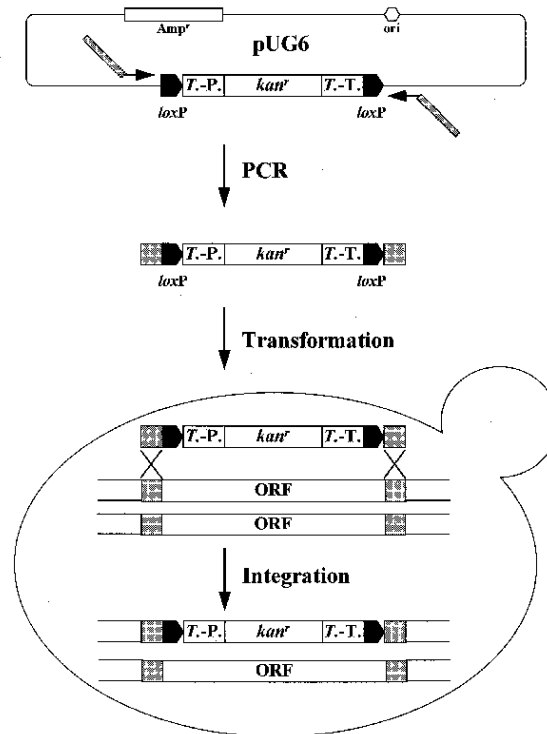


Figura 5. Delección de genes de levadura con el marcador kan^r . A partir del plásmido pUG6 se obtiene y amplifica mediante la técnica PCR el cassette de disrupción génica. Para ello se utilizan cebadores con 45pb complementarias a la secuencia diana del gen a deleccionar y 19-22pb complementarias a la región contigua a los sitios loxP del módulo de disrupción. El producto de PCR es utilizado para transformar las células de levadura, dónde, por recombinación homóloga, el cassette se integra en el genoma, produciéndose la delección del gen a estudio. (Güldener *et al.*, 1996)

2.1.1. Construcción del cassette de disrupción génica.

En el mutante $\Delta gal4$ ($gal4::kan$) se utilizó el plásmido pUG6 como ADN molde para la obtención del cassette de disrupción TS-loxP-kanMX-loxP-TS, el cual se compone, en los extremos, de dos secuencias complementarias al gen diana a deleccionar (TS) junto a los sitios loxP, los cuales flanquean el gen kan^r que confiere resistencia al antibiótico G418, con su correspondiente promotor y terminador (TEF2). En el caso de $\Delta pdr1$ ($pdr1::his3$) y $\Delta pdr3$ ($pdr3::his3$) se utilizó el plásmido pAG413 como *template* para la obtención del fragmento de ADN a integrar (TS(kan)-HIS3-TS(kan)), el cual contiene, en los extremos, secuencias complementarias al marcador de resistencia a kanamicina ($kanMX$), junto al gen de histidina (HIS3).

La amplificación del fragmento de ADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos utilizados tienen una secuencia de 19-22 nucleótidos en 3' complementaria a la región del plásmido flanqueante a los sitios loxP/HIS3 y unos 45 nucleótidos en 5' complementarios a los sitios *upstream* o *downstream* correspondientes a la secuencia del gen diana. Cada reacción se realizó por duplicado, con un volumen final de 100 μ l, se añadió 1 μ l de cada uno de los cebadores (*primers*) a 10 pmol/ μ l, 10 μ l de dNTPs a 2 mM, 1 μ l (10 ng) de ADN molde, 10 μ l de tampón de PCR 10x comercial (Thermo Scientific), 10 μ l de MgCl₂ a 25 mM (Thermo Scientific), 1 μ l de enzima *TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase* a 1U/ μ l (Thermo Scientific) y 66 μ l de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización, de 5 minutos a 94° C; 35 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 seg a 94° C, alineamiento durante 30 seg a 53° C, y extensión durante 2 min a 72° C); y un paso final de elongación de 10 min a 72° C.

Para comprobar la correcta formación y amplificación del cassette de disrupción se corrió un gel de agarosa al 1%.

2.1.2. Transformación de levadura con construcción de disrupción.

Los amplicones obtenidos fueron purificados con el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) y utilizados para la transformación de las células de levadura con las técnicas descritas en los apartados correspondientes, aunque en la transformación se emplearon ~1-2 μ g de ADN y, para permitir la recombinación homóloga, las células se incubaron durante 3 h a 28°C en medio no selectivo (YPD) previamente a la inoculación en placa con medio selectivo YPD+G418 ($\Delta gal4$)/SD-his ($\Delta pdr1$ y $\Delta pdr3$).

2.1.3. Verificación de la delección.

Las colonias obtenidas fueron aisladas y se extrajo su ADN genómico para utilizarlo como molde en una nueva PCR de verificación. En este caso, los cebadores empleados eran específicos del promotor del gen deleccionado y del cassette. Obteniendo un producto de 400-500 pb. Además, se utilizó un control positivo para comprobar que el ADN genómico se encontraba en buen estado. En este caso la reacción tenía un volumen final de 50 μ l, se añadió 1 μ l de cada uno de los primers a 100 pmol/ μ l, 5 μ l de dNTPs a 2 mM, 1 μ l de ADN molde, 5 μ l de tampón de PCR 10x comercial (Biotools) con MgCl₂, 1 μ l de Taq polimerasa a 1U/ μ l (Biotools) y 36 μ l de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización, de 5 minutos a 94° C; 30 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 seg a 94° C, alineamiento durante 30

sega 53° C, y extensión durante 1 min y 30 seg a 72° C); y un paso final de elongación de 7 min a 72° C.

De nuevo se comprobó si la integración había sido correcta mediante un gel de agarosa al 1%.

En el caso de $\Delta pdr1$ y $\Delta pdr3$, al tratarse de un cambio de marcador de selección, kanMX a HIS3, se verificó este intercambio por selección de las colonias que crecieron en el medio selectivo SD-his pero no lo hicieron en placas de YPD+G418.

3. Plásmidos y construcciones.

Los plásmidos empleados en este trabajo fueron pUG6, pAG413 y pGBKT7 con diversas construcciones, mostradas en la tabla suplementaria 5. A partir de estos tres plásmidos se realizaron tres tipos de construcciones, descritas más adelante.

El plásmido **pUG6-lucCP⁺-Cyc1T-KAN** fue empleado para obtener las cepas con las construcciones luciferasa integrativas (construcción 1). El plásmido **pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺** se utilizó tanto para la construcción 2 (**pAG413-3xPDRE-lucCP⁺**) como en la construcción 3 (**pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺**). Por último, **pGBKT7-ADH1p-Gal4_{DBD}-myc** se empleó en la construcción 3 (**pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr**).

Todas las construcciones desarrolladas en este trabajo están basadas en el sistema de luciferasa desestabilizada (Rienzo *et al.*, 2012), explicada en el apartado 8, y cuyo detalle del gen de luciferasa desestabilizada se muestra en la Figura 6.

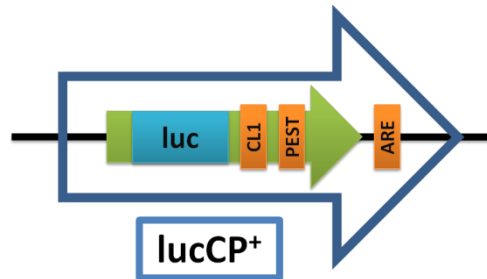


Figura 6. Detalle del gen de luciferasa desestabilizada (lucCP⁺). El gen de luciferasa desestabilizada (lucCP⁺) contiene, junto al gen de luciferasa de luciérnaga (luc), dos motivos de degradación proteica (CL1 y PEST) y de ARNm (ARE), de forma que no hay acumulación.

3.1. Construcción 1: Fusión de los promotores *PDR5*, *PDR15*, *SNQ2*, y *YOR1* con lucCP⁺ en el genoma.

La construcción 1 se obtuvo al integrar en el genoma de levadura un fragmento de ADN con el gen de luciferasa desestabilizada (lucCP⁺) y el marcador de resistencia a geneticina G418 (Kan^r), con su correspondiente promotor y terminador (TEF2), en lugar del correspondiente gen de interés. Este fragmento se fusionó al promotor de los

transportadores multidroga *PDR5*, *PDR15*, *SNQ2* y *YOR1*. En la Figura 7 se muestra un esquema de esta construcción.



Figura 7. Esquema de la construcción 1. La construcción 1 se compone de un fragmento de ADN con el gen de luciferasa desestabilizada ($lucCP^+$), el terminador artificial Cyc1 y el marcador de resistencia a geneticina G418 (KanMX). Este fragmento, al integrarse en el genoma, queda fusionado al promotor del gen diana.

Se empleó el plásmido **pUG6- $lucCP^+$ -Cyc1T-KAN** como *template* para obtener el fragmento de ADN con la construcción a integrar en el genoma. Para ello, se utilizó la misma técnica que se describe en el apartado anterior. En este caso, al tratarse de fragmentos mayores, el tiempo de extensión durante la amplificación fue de 4 minutos. Se muestra una representación del fragmento amplificado en la Figura 8.

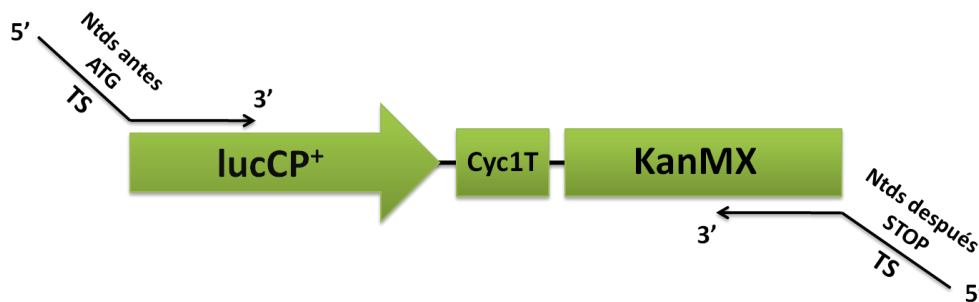


Figura 8. Cassette de integración. El fragmento de ADN con el gen de luciferasa desestabilizada ($lucCP^+$), el terminador artificial Cyc1 y el marcador de resistencia a geneticina G418 (Kan^r) se amplifica utilizando cebadores complementarios en 3' a los extremos de la región del plásmido que queremos integrar y en 5' a la secuencia del gen diana (TS).

Una vez obtenido el fragmento de ADN se procedió a su purificación y transformación de las células de levadura según el procedimiento descrito anteriormente. Las colonias obtenidas se aislaron y se extrajo su ADN genómico para verificar la integración mediante PCR y gel de agarosa al 1%, como en el apartado anterior.

3.2. Construcción 2: pAG413-3xPDRE- $lucCP^+$.

La construcción 2 (3xPDRE- $lucCP^+$) se obtuvo al fusionar 3 repeticiones del elemento PDR (PDRE), con secuencia 5'-CCGCGG-3', al gen de luciferasa desestabilizada en el plásmido **pAG413-CYC1Δ- $lucCP^+$** . En la Figura 9 se muestra un esquema de esta construcción.

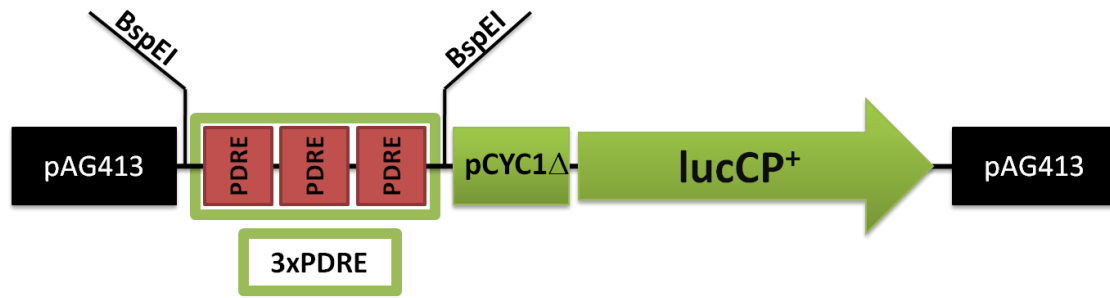


Figura 9. Esquema construcción 2 (pAG413-3xPDRE-lucCP⁺). La construcción 2 contiene, en el plásmido pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺, 3 repeticiones del elemento PDR (3xPDRE), el promotor CYC1Δ, y el gen de luciferasa desestabilizada (lucCP⁺). En la figura se muestra el sitio de corte de la enzima de restricción empleada (BspEI).

En primer lugar, se obtuvo el fragmento de ADN con las 3 repeticiones PDRE (3xPDRE) mediante hibridación (5 minutos a 95°C) de oligonucleótidos sintéticos fosforilados (BspEI-EcoRV-3xPdr1-1 y BspEI-EcoRV-3xPdr1-2). El plásmido pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺ se digirió con la enzima de restricción BspEI (Kpn2) durante 2 horas a 55°C y tratado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C para evitar la recircularización del plásmido. A continuación, se purificó el vector digerido y desfosforilado con el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen). La ligación entre vector e inserto se realizó empleando el kit *Quick Ligation kit* (New England Biolabs). El producto de ligación fue empleado en la transformación de bacterias DH5α según el protocolo habitual. Las colonias obtenidas fueron cultivadas en tubos de precultivo con LB líquido suplementado con ampicilina, y se les extrajo y purificó el ADN plasmídico (minipreps) empleando el kit *Nucleospin Plasmid* (Macherey Nagel). A continuación, se verificó la inserción mediante digestión con EcoRV (1h a 37°C), ya que tenemos sitio de corte en inserto y vector, y visualización en gel de electroforesis al 1%.

Las cepas de levadura se transformaron con el plásmido portador de la construcción 3xPDRE-lucCP⁺ según la técnica habitual y se seleccionaron las colonias positivas en medio sólido SD-his.

3.3. Construcción 3: Sistema binario GAL1_{UAS}-lucCP⁺ y Gal4_{DBD}-Pdr.

La construcción 3 se compone de dos plásmidos (pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺ y pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr).

El vector pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺ se obtuvo fusionando la parte del promotor GAL1 que contiene las secuencias UAS (*Upstream Activation Sequence*), específicas para

unión de Gal4, al gen de luciferasa desestabilizada ($lucCP^+$) en el plásmido **pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺**. Las secuencias UAS son potenciadores o *enhancers* en la activación de la transcripción del gen. En este caso, encontramos 4 regiones UAS con secuencia CGG(11N)CCG. En la Figura 10 se muestra un esquema de este vector.

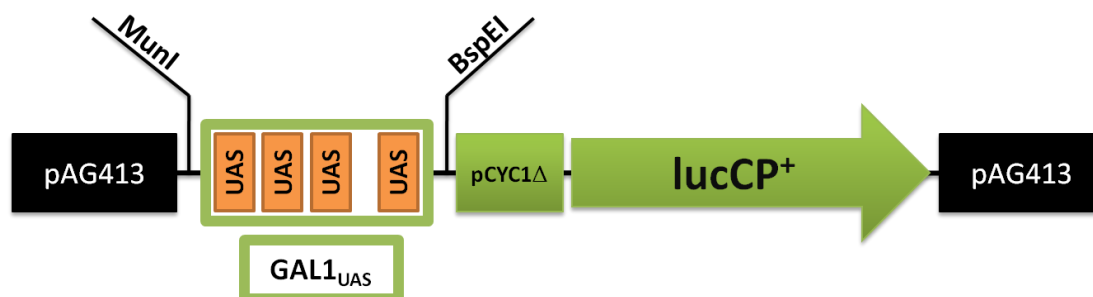


Figura 10. Esquema **pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺**. El vector **pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺** contiene, en el plásmido **pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺**, un inserto con la región del promotor GAL1 donde se encuentran las 4 secuencias UAS específicas de unión de Gal4 (GAL1_{UAS}), el promotor CYC1Δ, y el gen de luciferasa desestabilizada ($lucCP^+$). En la figura se muestra los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas (MunI y BspEI).

El fragmento de ADN con las secuencias UAS se obtuvo a partir de ADN genómico de la cepa de levadura W303-1A. Para ello, se amplificó el inserto empleando cebadores que incorporaban en sus extremos 5' sitios de corte para las endonucleasas MunI (Gal1UAS-MunI) y BspEI (Gal1UAS-Kpn2I). La reacción de amplificación tenía un volumen final de 100 μ l, se añadió 1 μ l de cada uno de los primers a 100 pmol/ μ l, 10 μ l de dNTPs a 2 mM, 1 μ l de ADN molde, 10 μ l de tampón de PCR 10x comercial (Biotools) con MgCl₂, 1 μ l de Taq polimerasa a 1U/ μ l (Biotools) y 76 μ l de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un paso de desnaturalización, de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 seg a 94°C, alineamiento durante 30 seg a 53°C, y extensión durante 1 min a 72°C); y un paso final de elongación de 7 min a 72° C. Se comprobó si la amplificación había sido correcta mediante un gel de agarosa al 1% y se purificó el amplicón con el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen).

El inserto y el plásmido **pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺** se digirieron con las enzimas de restricción MunI y BspEI (Kpn2) durante 2 horas a 55°C (BspEI) y *overnight* (o/n) a 37°C (ambas). A continuación, se purificaron inserto y vector con *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) y *GeneClean® Turbo Kit* (QBiogene, Inc), respectivamente. La ligación entre vector e inserto se realizó empleando *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo

Scientific). El producto de ligación fue empleado en la transformación de bacterias DH5 α competentes según el protocolo habitual. Las colonias obtenidas fueron cultivadas en tubos de precultivo con LB líquido suplementado con ampicilina, y se les extrajo y purificó el ADN plasmídico empleando el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey Nagel). A continuación, se verificó la inserción mediante digestión con *MunI* y *BspEI*, y por PCR empleando el cebador Gal1UAS correspondienteal inserto y un cebador interno del gen luciferasa (LucSeqRev) con el extremo 3' hacia el inicio del gen. De nuevo, se visualizó con gel de electroforesis al 1%.

Por su parte, el vector **pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr** se consiguió al clonar los distintos factores de transcripción PDR, sin el extremo N-terminal con el dominio de unión a ADN, en el plásmido **pGBKT7-ADH1p-Gal4_{DBD}-myc**, fusionándolos al dominio de unión a ADN de Gal4 (Gal4_{DBD}), como se muestra en la Figura 11.

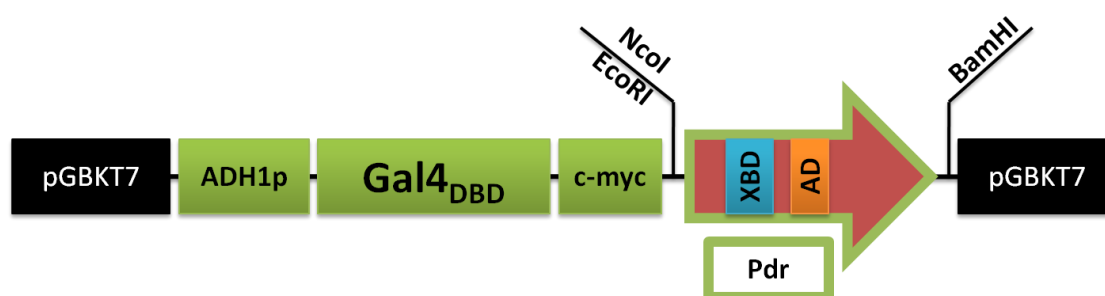


Figura 11. Esquema de pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr. El vector **pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr** contiene, en el plásmido **pGBKT7-ADH1p-Gal4_{DBD}-myc**, un inserto con la secuencia del factor de transcripción Pdr correspondiente con las regiones de unión a xenobióticos (XBD) y de activación (AD), pero sin el dominio de unión a ADN (DBD). El inserto Pdr se clona junto al dominio de unión a ADN de Gal4 (Gal4_{DBD}), sustituyendo al propio. Además, se encuentra el promotor constitutivo *ADH1*, y un epítipo *c-myc* que permite la detección de la proteína fusión por métodos inmunológicos. En la figura se muestra los sitios de corte de las enzimas de restricción empleadas (*NcoI/EcoRI* y *BamHI*).

En primer lugar, se obtuvieron los insertos con los factores de transcripción Pdr a partir de ADN genómico de la cepa de levadura BY4741 mediante PCR. Para la amplificación del inserto se emplearon cebadores que incorporaban en sus extremos 5' sitios de corte para las endonucleasas *NcoI/EcoRI* y *BamHI*. Cada reacción de amplificación se realizó por duplicado, con un volumen final de 100 μ l, se añadió 1 μ l de cada uno de los cebadores (*primers*) a 10 pmol/ μ l, 10 μ l de dNTPs a 2 mM, 1 μ l (10 ng) de ADN molde, 10 μ l de tampón de PCR 10x comercial (Thermo Scientific), 10 μ l de MgCl₂ a 25 mM (Thermo Scientific), 1 μ l de enzima *TrueStart Hot Start Taq DNA Polymerase* a 1U/ μ l(Thermo Scientific) y 66 μ l de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un

paso de desnaturalización, de 5 minutos a 94° C; 35 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 30 seg a 94° C, alineamiento durante 30 seg a 53° C, y extensión durante 4 min a 72° C); y un paso final de elongación de 10 min a 72° C. Se comprobó si la amplificación había sido correcta mediante un gel de agarosa al 1% y se purificó el amplicón con el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen).

El inserto y el plásmido **pGBKT7-ADH1p-Gal4_{DBD}-myc** se digirieron con las enzimas de restricción NcoI/EcoRI y BamHI toda la noche (o/n) a 37°C. A continuación, se purificaron inserto y vector con *QIAquick PCR Purification* (Qiagen) y *GeneClean® Turbo Kit* (QBiogene, Inc), respectivamente. La ligación entre vector e inserto se realizó empleando *Rapid DNA Ligation Kit* (Thermo Scientific). El producto de ligación fue empleado en la transformación de bacterias DH5α competentes según el protocolo habitual. Las colonias obtenidas fueron cultivadas en tubos de precultivo con LB líquido suplementado con kanamicina, y se les extrajo y purificó el ADN plasmídico empleando el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey Nagel). A continuación, se verificó la inserción mediante digestión con NcoI/EcoRI y BamHI, y por PCR empleando los cebadores correspondientes a los insertos. De nuevo, se visualizó con gel de electroforesis al 1%.

La cepa de levadura $\Delta gal4$ se transformó con ambos plásmidos (**pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺** y **pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr**) según la técnica habitual y se seleccionaron las colonias positivas en medio sólido SD-his-trp.

4. Oligonucleótidos.

En la tabla suplementaria 6 se muestran los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

5. Técnicas de manipulación de ADN.

5.1. Técnicas de transferencia génica.

5.1.1. Transformación de bacterias.

La transformación se realizó a partir de alícuotas de un stock de células competentes de *E. coli*. A cada tubo, se añadieron aproximadamente 100 ng de DNA plasmídico, y se incubó durante 30 minutos en hielo. Se sometió a las células a un shock térmico durante 45 segundos a 42° C, e, inmediatamente, se depositaron de nuevo en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37° C. Los tubos fueron centrifugados (10000 rpm, 1 min), el sobrenadante se desechó y

las células se cultivaron en medio sólido selectivo (LB con ampicilina/kanamicina) a 37° C durante 1-2 días hasta la aparición de colonias de transformantes.

5.1.2. Transformación de levaduras.

La transformación de levadura se realizó mediante el **método del acetato de litio** (Gietz *et al.*, 1995), descrito a continuación.

Se creció un cultivo líquido de levadura en 50 ml YPD hasta una densidad óptica de 0,7-1,2 a 600 nm, en el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Plus y se centrifugaron las células en un tubo Falcon de 50 ml (3 min, 3000rpm). Se lavaron con agua estéril y con **LiTE 1x** estéril (0.1M acetato de litio en **1xTE** (10mM Tris/HCl pH 7.6; 1mM EDTA)), y el *pellet* se resuspendió en 500 µl de LiTE 1x. Se incubó las células durante 15 minutos a 30° C para hacerlas competentes y, a continuación, se añadieron 0,5-5 µg de ADN a 60 µl de células competentes, y se añadió 5µl de una solución de ADN monocatenario de salmón al 0,1% y 300 µl de **LiTE/40% PEG4000** (9 volúmenes de PEG4000 45% y 1 volumen de LiTE 10x), y se mezcló bien con el vórtex. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 30° C, y después durante 20 minutos a 42° C, para permitir la entrada del ADN en la célula. Finalmente, se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto, se lavó con agua estéril y se resuspendió el pellet en el líquido remanente. Las células se sembraron en placas con medio selectivo. Las colonias de levadura transformadas aparecieron 2-3 días después de la incubación de las placas a 28° C.

5.2. Técnicas de extracción de ADN.

Para la **extracción de ADN genómico** se empleó un **protocolo de aislamiento rápido del ADN genómico**. En primer lugar se creció un cultivo de levadura en 3 ml de medio YPD líquido hasta saturación en agitación a 28°C durante toda la noche. Las células se precipitaron por centrifugación (10000 rpm, 1 min) en un microtubo eppendorf de 1,5 ml, y el *pellet* se lavó con agua MiliQ, se resuspendió en 200 µl de **tampón PP** (100mM Tris/HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 10µl/ml β-mercaptoetanol, 0.2mg/ml zymolyasa) y se incubó a 37°C durante 1h para obtener los protoplastos de las células. A continuación se añadió 200 µl de **tampón de lisis** (0.2M NaOH, 1% SDS), mezclando por inversión, y se incubó a 65°C durante 20 minutos. Tras la lisis celular, se añadió 200 µl de acetato potásico 5M pH 5.5 y se mezcló por inversión. Se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad (13000 rpm) y se pasó el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf a los que se añadió 600 µl de isopropanol para precipitar el ADN cromosómico, y se

centrifugó de nuevo (1 min, 13000rpm). Por último, se lavó el *pellet* con etanol (70%), se secó bien y se resuspendió en 50 µl de agua.

Para la **extracción de ADN plasmídico** se empleó el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel). De forma resumida, este protocolo consiste en lisar y eliminar los residuos celulares del cultivo bacteriano con el ADN plasmídico de interés, pasar este lisado por las columnas del kit para que el ADN sea adsorbido en su membrana, y tras ser lavado, eluirlo.

5.3. Amplificación y purificación de fragmentos de ADN

La amplificación de fragmentos de ADN específicos se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la enzima ADN polimerasa (1 U/µL) de Biotools o con la *TrueStart Hot Start Taq DNA polimerase* (Thermo Scientific) y adaptando las condiciones de amplificación a los cebadores utilizados y el tamaño del amplicón. La cuantificación del ADN obtenido se llevó a cabo con el aparato *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (ThermoScientific), y su calidad y tamaño se comprobó en un gel de agarosa al 1%. Para purificar los productos de PCR se utilizó el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen), el cual utiliza columnas para adsorber el ADN y posteriormente, eluirlo. Para purificar fragmentos de ADN de geles, se utilizó el *GeneClean® Turbo Kit* (QBiogene, Inc), también basado en la purificación de ADN por columnas.

5.4. Digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

El producto de ADN obtenido de extracciones y/o purificaciones fue digerido mediante enzimas de restricción para poder comprobar posteriormente en un gel de agarosa al 1% si estos procesos habían sido satisfactorios.

Las reacciones de digestión contenían 2-5 µl de ADN, 2 µl de tampón de enzima (10x), 1-2 U de enzima (Fermentas) y agua MiliQ hasta un volumen final de 20 µl. Las reacciones de digestión se incubaron a la temperatura óptima de la enzima empleada, durante 1-2 horas, de forma general.

Los productos de digestión obtenidos, así como los productos de PCR fueron comprobados en un gel de agarosa al 1% (0.5g agarosa, 50 ml TAE1x, 1µl de bromuro de etidio (10 mg/ml)) con tampón **1xTAE** (TAE 50x: 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de 0,5M EDTA pH 8,0, y agua destilada hasta 1 L). Las muestras fueron mezcladas con *Loading dye* 6x (Thermo Scientific) para poder ver el avance en el gel, se inyectaron en éste, y se dejó correr a un voltaje de 90-100 V durante

aproximadamente 1 hora. Junto con las muestras se inyectó un marcador de masas (*Massruler*) de Thermo Scientific con el que comparar las bandas obtenidas para conocer su masa aparente.

6. Análisis de expresión de levadura: RT-PCR y microarray

Se llevó a cabo un estudio a nivel transcriptómico en el mutante $\Delta pdr5$ tratado con las micotoxinas citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA). Para ello se empleó la técnica de microarray y PCR de transcripción reversa (RT-PCR) como técnica de confirmación. Al trabajar con ARN se mantuvieron las muestras en hielo durante el experimento y se tuvo especial cuidado en el tratamiento del material utilizado para evitar la degradación y contaminación de las muestras.

6.1. Toma de muestras.

Se crecieron cultivos de levadura $\Delta pdr5$, en matraces con medio SD, hasta una $OD_{600}=2$ y se sometieron a cuatro tratamientos distintos: control (no estrés), citrinina (200 ppm durante 60 min), ocratoxina A (200 ppm durante 30 min), y una combinación de ambas (100 ppm cada una durante 30 min). Se tomaron 4 alícuotas de 10 ml de los cultivos para cada uno de los tratamientos en los tiempos correspondientes. Cada una de estas alícuotas se centrifugaron (3 min, 3000 rpm) para precipitar las células, y posteriormente, se lavó el *pellet* con agua MilliQ fría. Se mantuvieron a -20°C hasta obtener todas.

6.2. Extracción de ARN con el método del “fenol ácido”(pH = 4.3).

Se resuspendieron las muestras en 400 μl de **tampón TES** (10mM Tris / HCl pH = 7.5, 10mM EDTA, 0.5% SDS). A continuación se añadieron 400 μl de fenol ácido y se mezcló bien con vórtex. Se incubaron las muestras a 65°C durante 45 minutos y se pusieron seguidamente en hielo 5 minutos. Para separar el ARN del fenol, se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 10000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf y se volvió a añadir 400 μl de fenol ácido, se mezcló y centrifugó (10000 rpm, 1 min). De nuevo, el sobrenadante se pasó a nuevos microtubos y se añadieron 40 μl de acetato de sodio 3M con pH=5 y 2.5 volúmenes de etanol. A continuación se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 minutos. Tras desechar el sobrenadante se lavó el *pellet* con etanol (70%), centrifugando a 14000 rpm durante 5 minutos. Tras ello, se secó bien el *pellet* y se resuspendió en 100 μl de agua MilliQ.

La cantidad de ARN presente en cada una de las muestras se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para comprobar la calidad del ARN extraído se analizaron las muestras mediante un gel de agarosa al 1% en tampón 1 x MAE (**10x MAE**: 0.2 M MOPS pH=7, ajustando el pH con NaOH, 50 mM Acetato de Sodio, 10 mM EDTA) con formaldehído (2%). El tampón de electroforesis se preparó con 100mL de tampón MAE 10x y 30 mL de formaldehído al 37%, en un volumen final de 1L. Antes de cargarlas en el gel, se mezclaron 10µL de muestra con 40µL de tampón de carga (2,2mL de formamida, 0,8mL de formaldehído, 0,5mL de tampón MAE 10x, 0,4mL de glicerol al 80%, y 0,1mL de azul de bromofenol al 2%) y 2µL de bromuro de etidio al 0,1%. La mezcla se calentó a 56° C durante 10 min y se corrieron en el gel a 150V durante 2-3 horas, para poder comprobar la aparición de los rRNAs a 3,5 y 1,8 kb.

6.3. Purificación del ARN total.

Una vez determinada la calidad del ARN, se eliminó el ADN residual de la muestra con la enzima DNasaI (*DNase I Amplification Grade* (1 U/µL) de Invitrogen) y se empleó un inhibidor de ribonucleasas (*RNase Out*, Invitrogen) para evitar la degradación del ARN. Se incubó 30 min a 37° C una mezcla con 50µg de RNA total, 10µL de tampón 10x, 2µL de enzima DNasa I, 1µL de inhibidor de ribonucleasas y agua, hasta un volumen de 100µL. Tras este tratamiento se empleó *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) para purificar y concentrar el ARN. En resumen, se pasó la muestra por columnas del kit para retener el ARN en su membrana y posteriormente eluirlo purificado. De nuevo, se cuantificó el ARN total con el NanoDrop.

6.4. Análisis mediante microarray.

6.4.1. Hibridación en cristales.

El ARN purificado fue enviado al Servicio de Genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP (Valencia, España)) donde se realizó el resto del proceso experimental del análisis transcriptómico. Resumidamente, las muestras fueron marcadas con el fluoróforo Cianina-3 (Cy3), hibridadas en 4 cristales *Yeast Gene Expression 8*15K Microarray* (Agilent), y escaneadas con el escáner Agilent DNA Microarray Scanner (G2505B). Los datos crudos se obtuvieron empleando *Feature Extraction software 9.5.1*.

6.4.2. Análisis bioinformático y estadístico.

El análisis de los datos crudos se realizó empleando el programa *GeneSpring 12.6* de Agilent. Los datos se normalizaron por el método de cuantiles y se analizaron estadísticamente con el t-Test de Student. Se seleccionaron las diferencias significativas en expresión génica empleando un p-value <0.05. Para evitar la detección de falsos positivos, se aplicó una corrección de test múltiples (Bonferroni FWER) que permitió obtener p-values corregidos. Los grupos funcionales de genes significativos fueron identificados mediante la herramienta *YeastMine Gene Ontology (GO)* de la base de datos *Saccharomyces cerevisiae Genome Database (SGD)*. Este experimento, con los datos obtenidos, se registró en *Gene Expression Omnibus (GEO) Database* con el número de acceso GSE84187.

6.5. RT-PCR.

Para comprobar el resultado del microarray se observó el nivel transcripcional del gen GRE2 mediante la técnica PCR de transcripción reversa (RT-PCR) a partir del ARN purificado previamente (ver apartado 6.3).

6.5.1. Síntesis de ADNc por transcripción reversa.

Se utilizó el kit *Superscript III: cDNA first strand synthesis* de Invitrogen. Las muestras se trataron por duplicado, por un lado en tubos denominados “RT” y que contenían la enzima retrotranscriptasa, y por otro, en tubos denominados “no RT”, a los que no se les adicionó posteriormente la enzima y sirvieron de controles. Los tubos contenían 5 µl de cada una de las muestras de RNA tratadas con DNaseI, 1µl de 50 µM de cebador oligo (dT)₂₀, 1µl de 10 mM de mezcla de dNTPs y 3 µl de agua MilliQ. Las mezclas de reacción obtenidas se incubaron a 65 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las hebras del ARN, y a continuación se pusieron en hielo al menos durante 1 minuto, para así permitir la unión de los cebadores a las colas poli-A del ARN mensajero. A cada una de las muestras se les adicionó en el siguiente orden: 2µl del tampón 10x de la Retrotranscriptasa, 4µl de 25 mM MgCl₂, 2µl de 0.1 M DTT, 1µl de *RNaseOut* 40 U/µl y 1µl de la enzima *SuperScriptIII RT* 200U/µl. Este último componente se sustituyó por agua en el caso de los controles “no RT”. Se mezcló bien e incubamos a 50 °C durante 50 minutos e inmediatamente después se pusieron durante 5 minutos a 85 °C para detener la reacción y luego en hielo. Tras una rápida centrifugación, se les añadió 1µl de RNaseH y se incubaron durante 20 minutos a 37°C.

Una vez transcurridos los 20 minutos, se añadieron 90 µl de agua MilliQ y se almacenaron las muestras a -20°C hasta emplearlas en el análisis de RT-qPCR.

6.5.2. Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).

Una vez obtenido el ADNc se analizaron los niveles de expresión mediante RT-qPCR. El volumen de reacción fue 20 µl, por lo que cada una de ellas contenía 6 µl de la mezcla a 3,3 µM de primers, 4 µl de ADNc molde y 10 µl de *Master Mix* (para 100 reacciones: 1000 µl de *Fast EvaGreen qPCR Master Mix* (Biotium) y 12 µl de 5(6)-carboxy-X-rodamina (ROX, diluido a 0.1 µM en DMSO). Estas reacciones de PCR cuantitativa, se llevaron a cabo mediante un detector de secuencias Applied Biosystem™7500 Fast, siguiendo las condiciones que se muestran a continuación: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, a continuación 40 ciclos de 5 segundos a 95°C, 5 segundos a 53°C y 30 segundos a 72°C (extensión).

A partir de las curvas de amplificación se compararon los Ct (*Threshold Cycle*) correspondientes a las distintas muestras para poder determinar la abundancia de ARN. Para ello, los valores de Ct obtenidos para cada uno de los genes, se compararon relativamente con respecto al gen *ACT1*, gen de referencia empleado, puesto que no varía su expresión. El análisis de la expresión génica normalizada frente al gen de referencia se realizó mediante la siguiente fórmula: $2^{Ct(ACT1-GRE2)}$.

7. Técnicas de manipulación de proteínas.

7.1. Obtención de extractos proteicos totales.

La obtención de extractos proteicos se realizó por dos métodos: hervido en tampón Laemmli y agitación con bolas. En ambos casos, las muestras y extractos se trataron con cuidado y en hielo durante todo el proceso, para evitar su degradación y contaminación.

7.1.1. Obtención de extractos proteicos totales por hervido en tampón Laemmli.

Para la obtención de extractos proteicos totales se empleó el método de hervido en tampón Laemmli. Se crecieron células de levadura en medio SD hasta una $OD_{600} = 0,8-1,2$ y se tomaron alícuotas de 10 ml. A continuación, se centrifugaron 5 minutos a 3.000 rpm y se lavaron con agua fría. La composición del tampón Laemmli 5X es de 0,3M de Tris/HCl pH 6,8, 7,5% de SDS, 0,1M de DTT, 10mM de EDTA, 30% de sacarosa y 0,25 mg/ml de azul de bromofenol. Seguidamente, se añadieron 150 µl de tampón Laemmli 2X (a partir de stock Laemmli 5X: 0,3 M de Tris/HCl pH 6,8, 7,5% de SDS, 0,1 M de DTT, 10 mM de EDTA, 30% de sacarosa y 0,25 mg/ml de azul de

bromofenol) y se hirvió durante 5 minutos a 95°C. Por último, el extracto obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

7.1.2. Obtención de extractos proteicos totales por agitación con bolas.

En primer lugar, se crecieron cada una de las cepas en medio selectivo hasta una $OD_{600}=1$. Se tomaron 10 ml de cultivo y se sedimentaron las células por centrifugación (1500 rpm, 3 min, 4°C). A continuación, se lavaron las células, primero con 1 ml de agua MQ fría y luego con 1 ml de tampón de extracción A (50 mM Tris/HCl pH=7,5; 15 mM EDTA; 2 mM DTT; 0,1% Tritón X-100; 150 mM NaCl) frío. Tras el lavado, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón A con 1 mM de PMSF y un inhibidor de proteasas (*cOmplete™*, *Mini*, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), 1 tableta en 10 ml). Seguidamente, las células resuspendidas se transfirieron a microtubos de 2 ml y se añadieron aproximadamente 500 µl de bolas de vidrio (0,5 mM Glass Beads, Biospec Products, Inc.). Se rompieron las células mediante agitación fuerte, empleando el equipo *Precellys® Evolution* (Bertin Technologies). Para ello, se realizaron dos ciclos de agitación durante 20 segundos a 7.500 rpm, con un descanso de 30 segundos entre éstos. Este protocolo se repitió 3 veces, dejando las muestras en hielo durante un minuto entre agitaciones. Tras la ruptura de las células, se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de 1,5 ml y se añadió 1/5 vol de tampón de carga 5x Laemmli. Por último, se hirvieron las muestras a 95 °C durante 5 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.2. Electroforesis de proteínas.

La electroforesis de proteínas se realizó empleando el sistema *Mini Protean 3* (BioRad), en el que se utilizan geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de forma que la movilidad de las proteínas depende sólo de su peso molecular. Los geles tienen dos capas: de empaquetamiento y de separación en función del tamaño. La **capa de empaquetamiento** se compone de 4% de acrilamida:bisacrilamida 40:0,8, 0,1% de SDS, 125 mM de Tris/HCl, 1% de APS y 0,1% de TEMED a pH 6,8. La **capa de separación** se compone de 12% de acrilamida:bisacrilamida 40:0,8, 0,1% de SDS, 375 mM de Tris/HCl, 1% de APS y 0,1% de TEMED a pH 8,8. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 70-80 V y con el tampón de resolución SDS-PAGE 1X (0,19 M de glicina y 0,1% de SDS ajustado a pH 8,3 con Tris). Las muestras se inyectaron en el gel junto al marcador de pesos moleculares *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

7.3. Transferencia a membrana de proteínas (*Western Blot*).

Tras separar las proteínas en el gel, fueron transferidas a membranas para que mejoraran su accesibilidad en las reacciones de detección mediante anticuerpos. Se emplearon las membranas de *Immunoblot® PVDF* 0,45 μm (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare) y se utilizó el sistema *Mini-Trans Blot* (BioRad) para transferir las proteínas mediante corriente eléctrica. El tampón de transferencia utilizado estaba compuesto por SDS-PAGE 1X y metanol al 20% para permitir la ruptura del complejo SDS-proteína y facilitar su unión a la membrana. La transferencia se realizó a 10V y a 4°C durante toda la noche.

A continuación, se realizó la tinción de las membranas con *DirectBlue 71 (DB71)* al 0,008% para comprobar la eficiencia de la transferencia y como control de carga. Las membranas de PVDF se sumergieron en la solución de tinción durante 5 minutos con agitación y el exceso de colorante se eliminó mediante la solución de lavado (40% de etanol absoluto y 10% de ácido acético glacial). Por último, se escaneó la membrana y se eliminó la tinción con la solución de desteñido (50% de etanol absoluto y 1 M de bicarbonato sódico) durante 10-15 minutos.

7.4. Detección inmunológica de proteínas.

En primer lugar, se bloquearon los sitios de unión no específicos lavando la membrana en solución de bloqueo, compuesta por leche en polvo al 2% en **TBS 1X** (TBS 10X: 1,5M de NaCl y 0,2 M de Tris/HCl a pH 7,6) en agitación durante 30 minutos. A continuación, se incubó la membrana en solución de bloqueo con el anticuerpo primario específico, el anticuerpo monoclonal de ratón α -myc (Roche), en una dilución 1:5000, durante 1 hora en agitación. Tras esta incubación se lavó la membrana 3 veces durante 10 minutos con tampón TBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Posteriormente, se incubó en TBS 1X con el anticuerpo secundario (α -HRP-ratón) en dilución 1:10000 durante 1 hora en agitación. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS 1X.

La detección se realizó mediante el sistema *ECL™ Prime Western Blotting Detection System* (GE Healthcare – Amersham Biosciences). Este sistema permite, gracias a la existencia de peroxidasa en el segundo anticuerpo utilizado, detectar las proteínas de interés. La señal de quimioluminiscencia se obtuvo de forma electrónica mediante la cámara LAS-3000 (Fujifilm).

8. Sistema luciferasa.

El **sistema luciferasa** (Rienzo *et al.*, 2012) es un sistema reportero basado en la cuantificación, en tiempo real, de la expresión de luciferasa en células vivas de levadura, al someterlas a un estrés. La estructura de este sistema se muestra en la Figura 12.

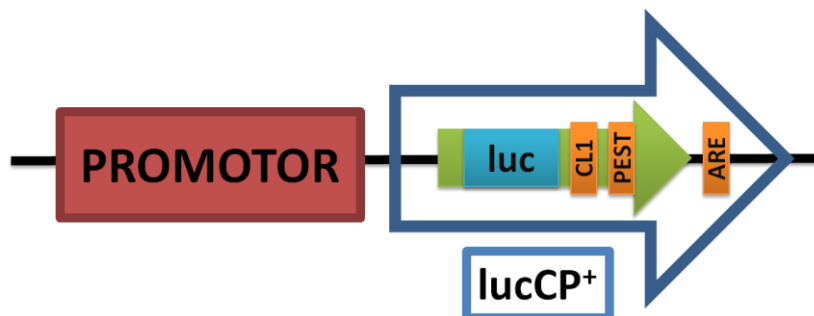


Figura 12. Esquema del sistema luciferasa. El sistema luciferasa contiene la secuencia de un promotor de interés fusionado al gen de luciferasa desestabilizada ($lucCP^+$). El gen $lucCP^+$ contiene, junto al gen de luciferasa de luciérnaga, dos motivos de degradación proteica (hCL1 y hPEST) y de ARNm (ARE), de forma que no hay acumulación y se detecta la expresión de la luciferasa a medida que ésta va sucediendo.

En esta tesis, se emplearon variantes del sistema reportero de luciferasa desestabilizada descrito previamente en Rienzo *et al.*, 2012. Las construcciones empleadas se describen en el apartado 3.

En primer lugar, las cepas de levadura fueron crecidas en medio mínimo SD suplementado con aminoácidos, en función de su auxotrofía, durante toda la noche, hasta una $OD_{600} \sim 2$. A continuación, se incubaron los cultivos con luciferina (Synchem) a 0,5mM (a partir de stock 10mM) durante 60 min a 28°C en agitación, y se cargaron alícuotas de 120 μ l de cultivo por pocillo, en una placa de 96 pocillos (Nunc). Estos pocillos se cargaron con un rango de concentraciones del estrés a estudiar. Cada concentración de estrés y cepa cargada en la placa se hizo por triplicado. Inmediatamente después de cargar la placa, se puso en el luminómetro *GloMax Multidetecion System* (Promega). Para el análisis de los resultados se normalizaron los datos por su OD correspondiente y se procesaron empleando Microsoft Excel.

9. Ensayos de sensibilidad: crecimiento en medio sólido (Goteo).

Se realizó una caracterización fenotípica de distintas cepas de levadura ante diversas drogas mediante crecimiento en medio sólido (goteo o *droptest*). Se crecieron los cultivos de levadura durante la noche hasta $OD_{600}=1$ en medio mínimo SD a 28°C en agitación. A continuación, en una placa multipocillo estéril, se realizaron tres diluciones seriadas (1:10, 1:100, 1:1000) de los cultivos y se les sometió a determinadas condiciones de estrés. Una vez preparada la placa se utilizó un aplicador manual

(Sigma) para poder depositar las gotas correctamente sobre el medio sólido a distintos tiempos, y se incubaron las placas a 28°C durante 2-3 días.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: MECANISMOS DE TOXICIDAD DE CITRININA (CIT) Y OCRATOXINA A (OTA).

Las micotoxinas citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA) son dos importantes contaminantes en alimentos, considerados tóxicos para el ser humano. Estos compuestos suelen aparecer juntos en muchas ocasiones, por lo que se ha sugerido que puedan tener un efecto sinérgico en su toxicidad. La mayoría de estudios sugieren que esta toxicidad proviene del estrés oxidativo producido por estas micotoxinas.

En estudios preliminares realizados en el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* por nuestro laboratorio (Pascual-Ahuir *et al.*, 2014) se observó la activación de los promotores de respuesta a estrés *GRE2* y *SOD2*, así como indicios de la posible implicación de ciertos genes de respuesta a estrés oxidativo y de resistencia multidroga, en células sometidas a la micotoxina citrinina.

En este trabajo se quiso conocer mejor los posibles mecanismos de toxicidad de citrinina y ocratoxina A, así como la posible relación entre estas dos micotoxinas. Para ello, se realizaron varias aproximaciones: análisis a nivel transcriptómico con microarray, de expresión génica a través de reporteros luciferasa, y ensayos de sensibilidad en placa.

1. Perfiles de expresión génica de los promotores *GRE2* y *SOD2* ante CIT y OTA.

1.1. Respuesta dosis-dependiente de la cepa *wild type*.

En primer lugar, se estudiaron los perfiles dosis-respuesta de los promotores inducibles a estrés general (*GRE2*) y a estrés oxidativo (*SOD2*) ante distintas condiciones de citrinina y ocratoxina A. Para ello, empleamos la cepa silvestre BY4741 con plásmidos de fusión del gen de luciferasa desestabilizada a los promotores *GRE2* (*GRE2-lucCP⁺*) (Rienzo *et al.*, 2012) y *SOD2* (*SOD2-lucCP⁺*) (Dolz-Edo *et al.*, 2013). Los valores obtenidos tras su cuantificación en luminómetro representan la expresión luciferasa cuantificada por su actividad y medida como unidades de luz relativas, y fueron normalizados por la OD correspondiente. El resultado se muestra en la Figura 13.

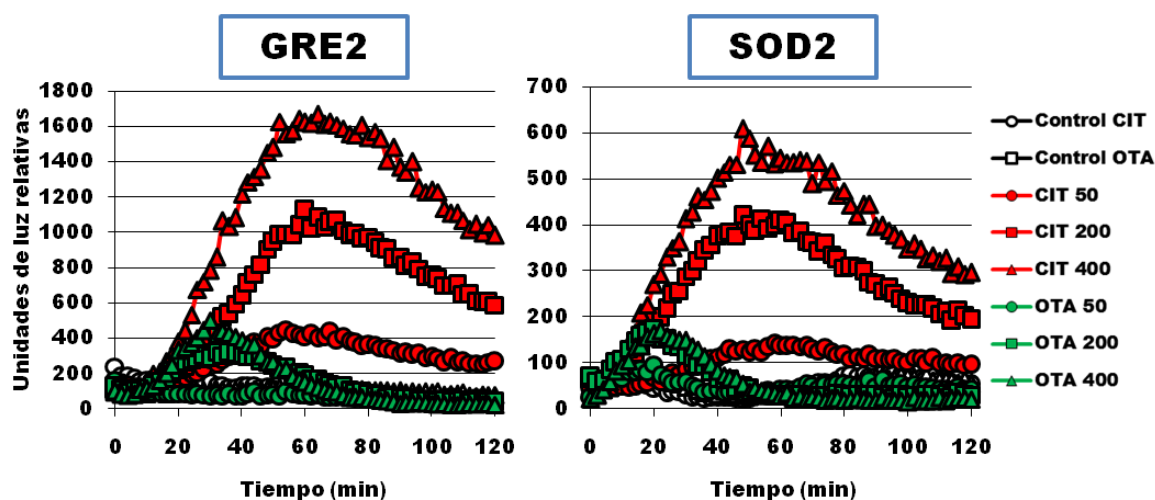


Figura 13. Perfiles dosis-respuesta de la expresión luciferasa de los promotores *GRE2* y *SOD2*. Las células de la cepa BY4741 con las construcciones *GRE2-lucCP⁺* y *SOD2-lucCP⁺* se sometieron a un rango de concentraciones (0, 50, 200 y 400 ppm) de citrinina y ocratoxina A, y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Desviación estándar del ensayo no supera el 15%.

En la Figura 13 se observan resultados similares para ambos promotores. Los perfiles dosis-respuesta muestran una activación transitoria con un aumento progresivo de actividad luciferasa conforme aumenta la concentración de micotoxina. En el caso del tratamiento con OTA parece haber saturación en la actividad luciferasa alrededor de 200 ppm, mientras que en el tratamiento con CIT la inducción observada alcanza los 400 ppm. Además, tanto *GRE2* como *SOD2* presentan niveles de expresión superiores ante CIT que ante OTA, y por otra parte, se observa mayor rapidez en alcanzar los picos de actividad máxima en OTA (aproximadamente 30 min) que en CIT (aproximadamente 60 min). Esto podría indicar que la inducción de estos genes y su participación en la respuesta a OTA es más transitoria y menos importante que en respuesta a CIT.

1.2. Comparación de *wild type* y mutante *Apdr5* .

Una vez caracterizado el perfil dosis-respuesta a citrinina y ocratoxina A en la cepa silvestre, se estudió la respuesta a estas micotoxinas en el mutante *Apdr5*. Pdr5 está considerado como uno de los transportadores de membrana multidroga más importantes en *Saccharomyces cerevisiae*, y en estudios anteriores (Pascual-Ahuir *et al.*, 2014) se comprobó que estaba implicado en la respuesta de defensa ante CIT. Por ello, quisimos analizar el efecto de estas toxinas en una cepa con dificultades en el transporte multidroga y así, poder comparar las posibles diferencias en los perfiles de ambos promotores.

En la Figura 14 se observan los resultados obtenidos en la comparación entre la cepa silvestre y el mutante *Apdr5*. En estos resultados se muestran mayores niveles de inducción en la cepa defectuosa en la función de Pdr5 en ambos promotores. Esto podría implicar problemas en la eliminación de CIT y OTA de la célula al no tener este transportador de membrana, de forma que estas toxinas se acumularían en el interior de ésta durante más tiempo. Estos resultados parecen indicar que Pdr5 tiene un papel

importante en la respuesta de adaptación a estas micotoxinas, como ya se había indicado anteriormente.

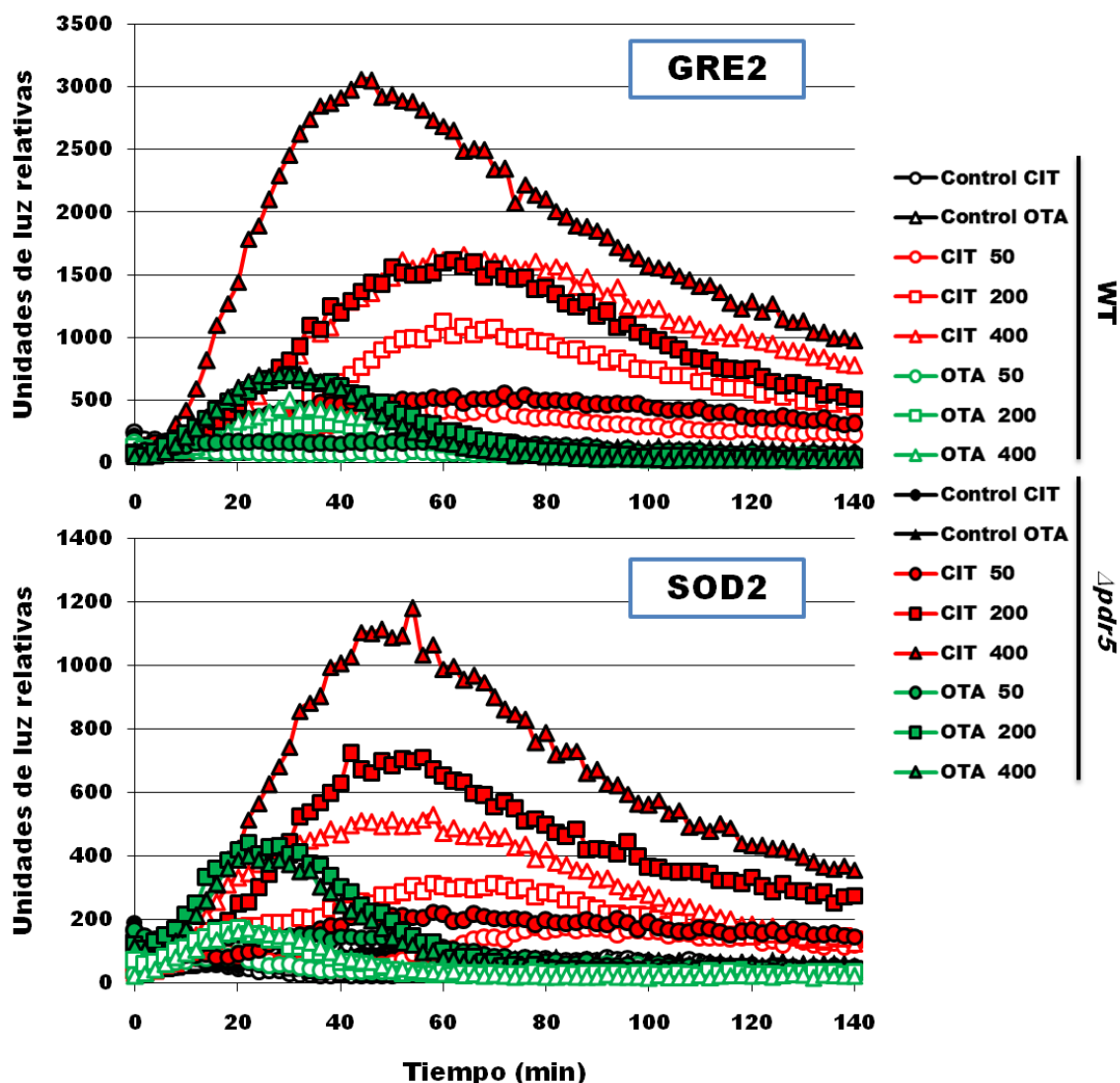


Figura 14. Comparación de perfiles dosis-respuesta de la expresión luciferasa de los promotores *GRE2* y *SOD2* de *wild type* y $\Delta pdr5$. Las células de las cepas BY4741 y $\Delta pdr5$ con las construcciones *GRE2-lucCP⁺* y *SOD2-lucCP⁺* se sometieron a un rango de concentraciones (0, 50, 200 y 400 ppm) de citrinina y ocratoxina A, y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Desviación estándar del ensayo no supera el 15%.

1.3. Respuesta de reporteros luciferasa *GRE2-lucCP⁺* y *SOD2-lucCP⁺* frente a la combinación de citrinina y ocratoxina A.

Estudios anteriores (Klaric *et al.*, 2013; Follmann *et al.*, 2014) han sugerido que CIT y OTA, al aparecer juntas pudieran tener un efecto sinérgico en su toxicidad. Por ello, para terminar con el estudio de los reporteros *GRE2-lucCP⁺* y *SOD2-lucCP⁺*, quisimos estudiar, sobre estas mismas cepas, el posible efecto sinérgico de citrinina y ocratoxina A al combinar ambas micotoxinas en distintas concentraciones. En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos.

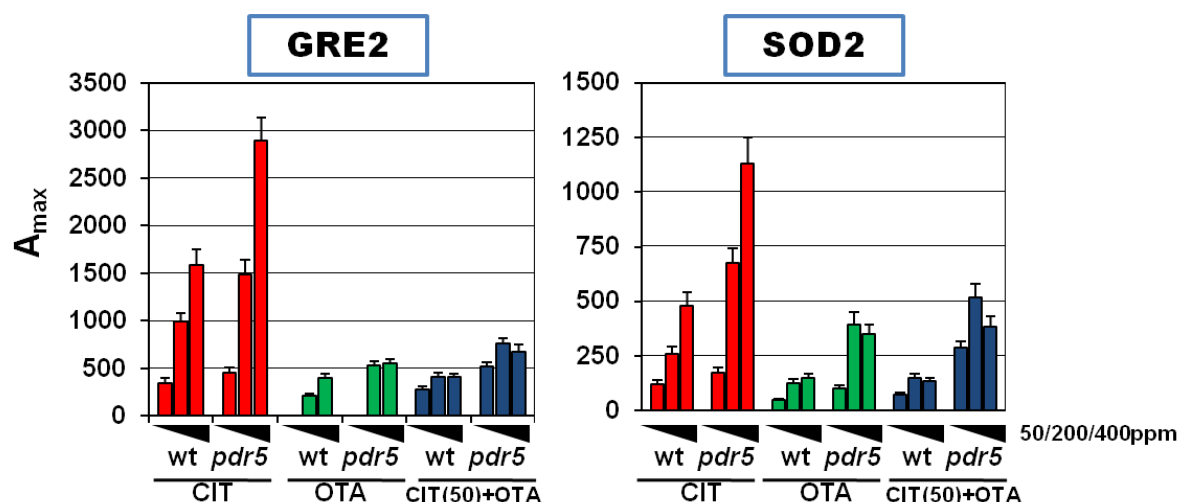


Figura 15. Efecto sinérgico de citrinina y ocratoxina A. Las células de las cepas BY4741 y $\Delta pdr5$ con las construcciones GRE2-lucCP⁺ y SOD2-lucCP⁺ se sometieron a un rango de concentraciones (0, 50, 200 y 400 ppm) de citrinina y ocratoxina A por separado y combinadas (50 ppm citrinina con 50/200/400 ppm de ocratoxina A), y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. En la figura se representan los puntos de actividad máxima para cada uno de los tratamientos con micotoxinas. Desviación estándar del ensayo no supera el 15%.

La Figura 15 muestra nuevamente una mayor inducción de ambos promotores en el mutante $\Delta pdr5$, así como las diferencias entre CIT y OTA. Como en los anteriores ensayos, la actividad luciferasa en el tratamiento con citrinina alcanza valores más elevados que en el tratamiento con ocratoxina A. Por su parte, los tratamientos combinados de micotoxina, al contrario de lo esperado, no mostraron un efecto sinérgico entre ambas, ya que se observa una inducción de los promotores menor que en los tratamientos sólo con citrinina.

Estos primeros resultados parecen indicar que citrinina y ocratoxina A tienen distintos efectos sobre los promotores inducibles por estrés *GRE2* y *SOD2*, tanto en la cepa silvestre como en el mutante de delección $\Delta pdr5$. Además, Pdr5 parece tener un papel importante en la detoxificación de estas micotoxinas, ya que las células defectuosas en la síntesis de este transportador tienen niveles de inducción de los promotores de respuesta mayores, probablemente debido a un mayor efecto de estas drogas al no poder ser eliminadas de la célula eficientemente.

A continuación, para poder estudiar en mayor profundidad las diferencias observadas entre citrinina y ocratoxina A realizamos un análisis a nivel transcriptómico.

2. Estudio transcriptómico del mutante $\Delta pdr5$ sometido a distintas condiciones de citrinina y ocratoxina A.

2.1. Análisis de expresión genómica mediante microarray.

Tras estudiar la respuesta de los promotores *GRE2* y *SOD2* con los reporteros luciferasa al someter las células a distintas condiciones de citrinina y ocratoxina A se observaron diferencias entre ambas drogas. Para conocer en más profundidad las diferencias de expresión en respuesta a estas micotoxinas se realizó un experimento a nivel

transcriptómico en el mutante *Apdr5* bajo cuatro tratamientos distintos: un control sin micotoxina, 200 ppm de CIT, 200 ppm de OTA, y una combinación de ambas (100 ppm de cada una). Tanto la selección de la cepa como de la concentración de micotoxina para cada tratamiento fue escogida tras los resultados de los experimentos con los reporteros luciferasa para tratar de optimizar los resultados del experimento con microarray.

Los resultados obtenidos se exponen a continuación, mostrando los genes sobreexpresados con un valor de corte 5 veces mayor al comparar las células tratadas con las no tratadas ($FC > 5$). Las listas resultantes se muestran en la Tabla 1 para CIT, la Tabla 2 para OTA, y la Tabla 3 para el tratamiento combinado (CIT/OTA).

Tabla 1. Genes sobreexpresados con $FC > 5$ en tratamiento con 200ppm de CIT.

Gen	Nomenclatura Standard	FC	p-value	Descripción
YPL171C	OYE3	473.09	3.00×10^{-08}	NADPH oxidoreductasa con flavina mononucleótido (FMN)
YFL056C	AAD6	252.36	9.60×10^{-07}	Aryl-alcohol deshidrogenasa putativa
YDL243C	AAD4	252.12	1.77×10^{-09}	Aryl-alcohol deshidrogenasa putativa
YCL026C-A	FRM2	177.22	1.77×10^{-05}	Nitroreductasa tipo II
YLL060C	GTT2	142.38	4.50×10^{-05}	Glutación S-transferasa
YBR008C	FLR1	120.60	1.83×10^{-07}	Transportador multidroga de membrana plasmática de la <i>Major Facilitator Superfamily</i> (MFS)
YCL026C-B	HBN1	61.69	1.81×10^{-06}	Proteína de función desconocida
YGR213C	RTA1	57.84	1.77×10^{-08}	Proteína involucrada en resistencia a 7-aminocolesterol
YML116W	ATR1	54.76	1.45×10^{-07}	Bomba de eflujo multidroga de la <i>Major Facilitator Superfamily</i> (MFS)
YKR076W	ECM4	51.60	6.10×10^{-06}	Glutación transferasa clase omega
YML131W		41.24	9.44×10^{-03}	Proteína de función desconocida
YHR139C	SPS100	35.16	4.78×10^{-07}	Proteína requerida en maduración de pared de espora
YFL057C	AAD16	33.52	2.12×10^{-02}	Aryl-alcohol deshidrogenasa putativa
YDR011W	SNQ2	31.05	6.78×10^{-07}	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YOL151W	GRE2	25.82	2.28×10^{-06}	Reductasa 3-metilbutanal y reductasametilglioxal NADPH-dependiente
YKL086W	SRX1	25.63	5.22×10^{-07}	Sulfiredoxina
YDR406W	PDR15	18.06	1.12×10^{-06}	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YLR108C		16.55	5.77×10^{-08}	Proteína de función desconocida
YDL020C	RPN4	15.80	9.41×10^{-08}	Factor de transcripción estimulador de expresión de genes de proteosoma
YNL117W	MLS1	15.05	3.95×10^{-06}	Malato sintasa
YOR328W	PDR10	14.52	2.41×10^{-08}	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YHR199C	AIM46	13.34	1.58×10^{-07}	Proteína de función desconocida
YHR029C	YHI9	12.93	3.86×10^{-07}	Proteína de función desconocida
YGR256W	GND2	10.88	5.58×10^{-07}	6-fosfogluconato deshidrogenasa

Resultados

YBR244W	GPX2	10.49	3.56x10 ⁻⁰⁶	Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa
YFL030W	AGX1	10.29	4.28x10 ⁻⁰⁸	Alanina:glioxylato aminotransferasa (AGT)
YDR453C	TSA2	9.61	2.01x10 ⁻⁰⁷	Tioredoxín peroxidasa citoplasmática estrés-inducible
YER143W	DDI1	9.54	8.66x10 ⁻⁰⁵	Proteína de unión v-SNARE inducible por daño a AND
YNR074C	AIF1	9.15	4.46x10 ⁻⁰⁷	Efecto mitocondrial de muerte celular
YER042W	MXR1	9.01	2.11x10 ⁻⁰⁶	Metionina-S-sulfóxido reductasa
YJL101C	GSH1	8.93	1.30x10 ⁻⁰⁷	Gamma glutamilcisteína sintetasa
YHR138C		8.80	1.42x10 ⁻⁰³	Proteína de función desconocida
YHL036W	MUP3	8.61	1.13x10 ⁻⁰⁵	Permeasa de baja afinidad a metionina
YNL129W	NRK1	8.45	1.61x10 ⁻⁰⁵	Nicotinamida ribósido quinasa
YPR200C	ARR2	8.09	1.57x10 ⁻⁰⁴	Arsenato reductasa
YER103W	SSA4	7.80	2.65x10 ⁻⁰⁵	Proteína de choque térmico de la familia HSP70
YJL045W		7.67	3.32x10 ⁻⁰⁷	Isozima succinato deshidrogenasa
YPL027W	SMA1	7.65	9.86x10 ⁻⁰⁷	Proteína involucrada en ensamblaje de membrana de proespora
YGR010W	NMA2	7.54	1.02x10 ⁻⁰⁷	Ácido nicotínico mononucleótido adenilil transferasa
YMR169C	ALD3	7.38	6.10x10 ⁻⁰⁴	Aldehído deshidrogenasa citoplasmática
YDR132C		7.33	1.74x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida
YOR162C	YRR1	7.23	1.24x10 ⁻⁰⁷	Factor de transcripción
YMR038C	CCS1	6.93	6.96x10 ⁻⁰⁵	Chaperona de cobre para Sod1p
YJL219W	HXT9	6.93	1.67x10 ⁻⁰⁷	Transportador de hexosa putativo
YER142C	MAG1	6.82	5.46x10 ⁻⁰⁷	3-metil-adenina DNA glicosilasa
YBR046C	ZTA1	6.71	1.13x10 ⁻⁰⁵	Quinona reductasa NADPH-dependiente
YNL231C	PDR16	6.61	7.41x10 ⁻⁰³	Proteína de transferencia de Fosfatidilinositol (PITP)
YPL091W	GLR1	6.49	1.49x10 ⁻⁰⁵	Glutatión oxidoreductasa citosólica y mitocondrial
YGR281W	YOR1	6.42	2.16x10 ⁻⁰³	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YGR197C	SNG1	6.29	3.47x10 ⁻⁰⁷	Proteína implicada en resistencia a nitrosoguanidina y 6-azauracil
YNL155W	CUZ1	6.15	5.38x10 ⁻⁰³	Proteína con papel en ruta ubiquitina-proteosoma
YAL054C	ACS1	6.12	3.74x10 ⁻⁰⁷	Acetil-coA sintetasa
YOL119C	MCH4	6.09	1.27x10 ⁻⁰⁵	Proteína similar a monocarboxilato permeasas de mamífero
YDL168W	SFA1	6.05	1.21x10 ⁻⁰⁵	Alcohol y formaldehído deshidrogenasa
YCR021C	HSP30	5.99	5.37x10 ⁻⁰³	Regulador negativo de H ⁺ -ATPasa Pma1p
YBR256C	RIB5	5.93	1.15x10 ⁻⁰³	Riboflavin sintetasa
YOR052C	TMC1	5.85	9.56x10 ⁻⁰³	Proteína de dedo de zinc de tipo AN1 de función desconocida
YOL155C	HPF1	5.82	6.09x10 ⁻⁰⁵	Manoproteína de reducción de turbidez (<i>Haze-protective factor</i>)
YMR318C	ADH6	5.78	7.64x10 ⁻⁰³	Alcohol deshidrogenasa de cadena media dependiente de NADPH
YJL082W	IML2	5.77	4.56x10 ⁻⁰⁴	Proteína de función desconocida
YKL051W	SFK1	5.63	6.62x10 ⁻⁰⁶	Proteína de membrana plasmática para

YER185W	PUG1	5.62	3.14×10^{-05}	normalizar niveles de PI4P Proteína de membrana plasmática implicada en transporte de protoporfirina y hemo
YIR017C	MET28	5.61	3.48×10^{-06}	Activador transcripcional <i>basic leucine zipper</i> (bZIP) en complejo Cbf1p-Met4p-Met28p
YHL024W	RIM4	5.53	4.66×10^{-06}	Proteína de unión a ARN putativa
YGR243W	MPC3	5.40	7.07×10^{-05}	Subunidad altamente conservada de portador de piruvato mitocondrial(MPC)
YGL010W	MPO1	5.35	7.58×10^{-06}	Proteína implicada en el metabolismo de fitoesfingosina
YDR513W	GRX2	5.09	6.09×10^{-03}	Glutaredoxina citoplásmica
YHR179W	OYE2	5.09	1.04×10^{-02}	NADPH oxidorreductasa conservada que contiene mononucleótido de flavina (FMN)
YDR059C	UBC5	5.05	2.39×10^{-04}	Enzima conjugadora de ubiquitina
YMR276W	DSK2	5.02	5.01×10^{-03}	Proteína de unión a poliubiquitina de tipo ubiquitina enriquecida en núcleos

Tabla 2. Genes sobreexpresados con FC>5 en tratamiento con 200ppm de OTA.

Gen	Nomenclatura Standard	FC	p-value	Descripción
YER106W	MAM1	60.19	2.77×10^{-08}	Monopolin
YGR225W	AMA1	57.40	9.19×10^{-10}	Activador del complejo promotor de anafase meiótica (APC/C)
YER179W	DMC1	40.52	5.34×10^{-07}	Recombinasa específica de meiosis
YOR298W	MUM3	33.53	9.62×10^{-04}	Proteína de función desconocida implicada en la organización de la pared externa de esporas
YFL011W	HXT10	33.21	1.38×10^{-07}	Transportador de hexosa putativo
YLL046C	RNP1	27.33	1.08×10^{-07}	Ribonucleoproteína
YER104W	RTT105	25.99	3.22×10^{-08}	Proteína con papel en regulación de la transposición de Ty1
YLR377C	FBP1	23.34	1.62×10^{-07}	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
YDR523C	SPS1	22.72	6.27×10^{-06}	Kinasa serina/treonina
YHR176W	FMO1	20.24	1.11×10^{-05}	Monooxigenasa que contiene flavina
YBR040W	FIG1	19.70	1.16×10^{-07}	Proteína integral de membrana
YGR059W	SPR3	18.63	4.74×10^{-05}	Septina involucrada en esporulación
YEL039C	CYC7	16.86	6.54×10^{-07}	Citocromo c isoforma 2
YMR101C	SRT1	16.73	3.73×10^{-07}	Forma complejo dehidrodolicil difosfato syntasa (DDS) con NUS1
YDR218C	SPR28	14.07	1.11×10^{-06}	Septina meiótica
YDR256C	CTA1	13.47	7.51×10^{-08}	Catalasa A
YIL113W	SDP1	13.28	2.62×10^{-07}	MAP kinasa fosfatasa de especificidad dual estrés-inducible
YOL123W	HRP1	12.89	1.98×10^{-06}	Subunidad del complejo del factor de escisión I
YGL254W	FZF1	12.55	2.03×10^{-07}	Factor de transcripción implicado en el metabolismo del sulfito
YPL201C	YIG1	12.44	3.23×10^{-05}	Proteína que interactúa con glicerol 3-fosfatasa

Resultados

Q0275	COX3	12.31	1.01x10 ⁻⁰⁴	Subunidad III de citocromo c oxidasa (Complejo IV)
YFL055W	AGP3	12.31	2.34x10 ⁻⁰⁶	Permeasa de aminoácidos de baja afinidad
YDR259C	YAP6	11.37	1.88x10 ⁻⁰⁵	Factor de transcripción <i>basic leucine zipper</i> (bZIP)
YPR193C	HPA2	11.29	2.74x10 ⁻⁰⁵	Histona tetramérica acetiltransferasa
YOR378W	AMF1	11.28	2.33x10 ⁻⁰⁶	Transportador NH4+ de baja afinidad
YLL042C	ATG10	11.26	3.47x10 ⁻⁰⁶	Enzima de conjugación tipo E2 conservada
YIL101C	XBP1	11.07	3.43x10 ⁻⁰⁴	Represor transcripcional
YBR018C	GAL7	10.98	2.12x10 ⁻⁰⁵	Galactosa-1-fosfato uridil transferasa
YEL019C	MMS21	10.92	6.11x10 ⁻⁰⁶	SUMO ligasa y componente del complejo SMC5-SMC6
YPR040W	TIP41	10.90	3.19x10 ⁻⁰⁵	Proteína que interactúa con Tap42p
YPL033C	SRL4	10.70	1.75x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida
YLL057C	JLP1	10.48	1.82x10 ⁻⁰⁶	Sulfonato/alfa-ketoglutarato dioxigenasa Fe(II)-dependiente
YGR142W	BTN2	10.34	2.34x10 ⁻⁰⁵	Proteína de unión v-SNARE
YPL279C	FEX2	10.33	2.64x10 ⁻⁰⁷	Proteína implicada en exportación de flúor
YHL022C	SPO11	10.16	2.70x10 ⁻⁰⁷	Proteína específica de meiosis
YKL055C	OAR1	10.00	2.10x10 ⁻⁰⁶	3-oxoacil-[proteína transportadora de acil] reductasa mitocondrial
YNL009W	IDP3	9.97	1.42x10 ⁻⁰²	NADP-dependiente isocitrato deshidrogenasa peroxisomal
YOR297C	TIM18	9.86	3.75x10 ⁻⁰⁵	Componente del complejo mitocondrial TIM22
YER053C-A		9.82	7.45x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida
YPL027W	SMA1	9.67	1.50x10 ⁻⁰⁷	Proteína de función desconocida
YBR074W	PFF1	9.60	5.70x10 ⁻⁰⁶	Proteasa de membrana vacuolar <i>multi-spanning</i>
YEL048C	TCA17	9.59	2.14x10 ⁻⁰⁷	Componente del complejo de partículas de transporte de proteínas (TRAPP) II
YGR197C	SNG1	9.23	7.32x10 ⁻⁰⁸	Proteína implicada en resistencia a nitrosoguanidina y 6-azauracil
YJR047C	ANB1	9.17	1.29x10 ⁻⁰⁶	Factor de elongación de traducción eIF-5A
YKL093W	MBR1	9.05	3.41x10 ⁻⁰⁵	Proteína involucrada en funciones mitocondriales y respuesta al estrés
YGR212W	SLI1	9.01	2.03x10 ⁻⁰⁵	N-acetiltransferasa
YCL026C-A	FRM2	8.77	1.66x10 ⁻⁰⁶	Nitroreductasa tipo II
YEL072W	RMD6	8.73	6.39x10 ⁻⁰⁷	Proteína requerida para la esporulación
YML054C	CYB2	8.51	2.74x10 ⁻⁰⁶	Citocromo b2 (L-lactato citocromo-c oxidoreductasa)
YNL187W	SWT21	8.48	6.08x10 ⁻⁰⁶	Proteína implicada en el ajuste (<i>splicing</i>) de ARNm
YNR064C		8.46	1.99x10 ⁻⁰⁵	Epóxido hidrolasa
YBR065C	ECM2	8.43	9.49x10 ⁻⁰⁶	Factor de <i>splicing</i> pre-ARNm
YPL171C	OYE3	8.39	6.43x10 ⁻⁰⁶	NADPH oxidoreductasa con flavina mononucleótido (FMN)
YGL212W	VAM7	8.37	1.02x10 ⁻⁰⁴	Proteína vacuolar SNARE
YOR390W	FEX1	8.17	3.59x10 ⁻⁰⁶	Proteína implicada en exportación de flúor
YMR069W	NAT4	8.05	1.76x10 ⁻⁰⁴	N-alfa-acetil-transferasa
YDL020C	RPN4	8.04	3.51x10 ⁻⁰⁷	Factor de transcripción estimulador de expresión de genes del proteosoma

YDR171W	HSP42	8.02	6.87×10^{-06}	Proteína de choque térmico pequeña (sHSP) con actividad chaperona
YER054C	GIP2	7.89	2.59×10^{-06}	Subunidad reguladora putativa de la proteína fosfatasa Glc7p
YPR151C	SUE1	7.89	9.84×10^{-07}	Proteína requerida para la degradación de formas inestables de citocromo c
YGR131W	FHN1	7.66	1.62×10^{-06}	Proteína de función desconocida
YEL061C	CIN8	7.64	1.15×10^{-05}	Proteína motora kinesina
YDR079W	PET100	7.63	4.29×10^{-06}	Chaperona que facilita específicamente el ensamblaje de citocromo c oxidasa
YKL051W	SFK1	7.56	1.38×10^{-04}	Proteína de membrana plasmática para normalizar niveles de PI4P
YMR017W	SPO20	7.52	1.72×10^{-03}	Subunidad específica de meiosis del complejo t-SNARE
YDR011W	SNQ2	7.49	4.53×10^{-07}	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YOR152C	ATG40	7.43	4.01×10^{-05}	Receptor de autofagia con un papel en la degradación del RE
YLR312C	ATG39	7.41	2.53×10^{-07}	Receptor de autofagia con un papel en la degradación de la RE y el núcleo
YBL078C	ATG8	7.33	7.40×10^{-07}	Componente de autofagosomas y vesículas Cvt
YPL186C	UIP4	7.19	4.47×10^{-04}	Proteína que interactúa con Ulp1p
YLR142W	PUT1	7.08	2.11×10^{-06}	Prolina oxidasa
YOR065W	CYT1	7.03	4.71×10^{-05}	Citocromo c1
YOL149W	DCP1	6.99	1.35×10^{-03}	Subunidad del complejo enzimático de <i>decapping</i> Dcp1p-Dcp2p
Q0250	COX2	6.68	3.78×10^{-02}	Subunidad II de citocromo c oxidasa (Complejo IV)
YDR402C	DIT2	6.62	1.08×10^{-03}	N-formiltirosina oxidasa
YGR243W	MPC3	6.60	1.70×10^{-05}	Subunidad altamente conservada del transportador de piruvato mitocondrial (MPC)
YOR005C	DNL4	6.56	5.57×10^{-06}	ADN ligasa
YJR010W	MET3	6.56	9.83×10^{-07}	ATP sulfurilasa
YLR151C	PCD1	6.52	2.79×10^{-06}	8-oxo-dGTP difosfatasa
YNL158W	PGA1	6.33	4.04×10^{-04}	Componente esencial de GPI-manosiltransferasa II
YDR524C	AGE1	6.32	8.02×10^{-07}	Proteína activadora de GTPasa (GAP) para los factores de ribosilación de ADP (ARF)
YNL012W	SPO1	6.31	4.68×10^{-06}	Proteína proespora específica de meiosis
YGL240W	DOC1	6.30	6.44×10^{-05}	Factor de procesividad
YDR076W	RAD55	6.29	1.32×10^{-04}	Proteína que estimula el intercambio de cadena
YOR192C	THI72	6.29	7.85×10^{-06}	Transportador de tiamina o compuesto relacionado
YMR251W	GTO3	6.26	2.35×10^{-05}	Glutación transferasa de clase omega
YDR185C	UPS3	6.19	4.77×10^{-06}	Proteína mitocondrial de función desconocida
YNL014W	HEF3	6.19	1.32×10^{-04}	Factor de elongación de traducción EF-3
YML087C	AIM33	6.17	1.01×10^{-04}	Proteína de función desconocida
YNR034W	SOL1	6.16	7.19×10^{-07}	Proteína con posible papel en exportación de ARNt

Resultados

YDR070C	FMP16	6.13	3.24x10 ⁻⁰⁴	Proteína de función desconocida
YJR129C	EFM3	6.08	4.06x10 ⁻⁰²	Metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
Q0045	COX1	6.04	176x10 ⁻⁰²	Subunidad I de citocromo c oxidasa (Complejo IV)
YNL036W	NCE103	5.90	4.88x10 ⁻⁰⁵	Anhidrasa carbónica
YOR178C	GAC1	5.86	6.08x10 ⁻⁰⁴	Subunidad reguladora para la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) Glc7p
YGR088W	CTT1	5.85	8.13x10 ⁻⁰⁵	Catalasa T citosólica
YDL247W	MPH2	5.83	2.28x10 ⁻⁰⁵	Alfa-glucósido permeasa
YCL066W	HMLALPHA1	5.74	6.90x10 ⁻⁰⁴	Copia silenciada de ALPHA1 en HML
YNL077W	APJ1	5.64	3.33x10 ⁻⁰⁶	Chaperona con papel en degradación de proteínas mediada por SUMO
YKL095W	YJU2	5.61	1.29x10 ⁻⁰³	Proteína esencial requerida para <i>splicing</i> pre-ARNm
YJL030W	MAD2	5.61	1.64x10 ⁻⁰⁴	Componente del complejo de control de ensamblaje del huso
YHL016C	DUR3	5.58	9.87x10 ⁻⁰⁷	Transportador de membrana plasmática para urea y poliaminas
YNL188W	KAR1	5.57	1.64x10 ⁻⁰⁴	Proteína implicada en cariogamia y duplicación del cuerpo del polo del huso
YGR234W	YHB1	5.56	1.02x10 ⁻⁰⁵	Oxidoreductasa de óxido nítrico
YCR040W	MATALPHA1	5.54	6.76x10 ⁻⁰⁴	Coactivador transcripcional que regula genes específicos de apareamiento
YFL016C	MDJ1	5.48	2.05x10 ⁻⁰⁴	Co-chaperona que estimula la actividad Ssc1p ATPasa de la proteína HSP70
YNL194C		5.39	4.89x10 ⁻⁰⁴	Proteína integral de membrana requerida para esporulación y contenido de esfingolípidos en la membrana plasmática
YDR475C	JIP4	5.30	2.01x10 ⁻⁰³	Proteína de función desconocida
YJR160C	MPH3	5.29	8.87x10 ⁻⁰⁵	Alfa-glucósido permeasa
YCR104W	PAU3	5.25	1.92x10 ⁻⁰³	Miembro de la familia multigénica seripauperina
YIL084C	SDS3	5.25	6.30x10 ⁻⁰⁶	Componente del complejo de histona deacetilasa Rpd3L
YIL056W	VHR1	5.15	3.53x10 ⁻⁰³	Activador transcripcional
YAR020C	PAU7	5.01	1.56x10 ⁻⁰⁴	Miembro de la familia multigénica seripauperina
YDR227W	SIR4	5.01	1.71x10 ⁻⁰⁵	Regulador de silenciamiento
YLR376C	PSY3	5.00	6.70x10 ⁻⁰⁶	Componente del complejo Shu (complejo PCSS)

Tabla 3. Genes sobreexpresados con FC>5 en tratamiento combinado de CIT/OTA.

Gen	Nomenclatura Standard	FC	p-value	Descripción
YPL171C	OYE3	199.63	1.29x10 ⁻⁰⁴	NADPH oxidoreductasa con flavina mononucleótido (FMN)
YDL243C	AAD4	46.48	1.49x10 ⁻⁰⁹	Aryl-alcohol deshidrogenasa putativa
YFL056C	AAD6	41.25	1.16x10 ⁻⁰⁷	Aryl-alcohol deshidrogenasa putativa
YLL060C	GTT2	34.58	1.44x10 ⁻⁰⁹	Glutación S-transferasa
YBR008C	FLR1	28.03	1.21x10 ⁻⁰⁷	Transportador multidroga de membrana

				plasmática de la <i>Major Facilitator Superfamily</i> (MFS)
YML131W		24.18	2.41x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida
YOL151W	GRE2	21.89	1.17x10 ⁻⁰⁴	Reductasa 3-metilbutanal y reductasametilglioxal NADPH-dependiente
YCL026C-A	FRM2	21.51	1.53x10 ⁻⁰⁸	Nitroreductasa tipo II
YMR101C	SRT1	21.35	2.64x10 ⁻⁰⁸	Forma complejo dehidrodolicil difosfato syntasa (DDS) con NUS1
YGR225W	AMA1	20.53	3.87x10 ⁻⁰⁷	Activador del complejo promotor de anafase meiótica (APC/C)
YDL020C	RPN4	19.49	4.24x10 ⁻⁰⁴	Factor de transcripción estimulador de expresión de genes de proteosoma
YDR256C	CTA1	18.79	4.53x10 ⁻⁰⁹	Catalasa A
YGR197C	SNG1	18.75	5.35x10 ⁻⁰⁹	Proteína implicada en resistencia a nitrosoguanidina y 6-azauracil
YKL051W	SFK1	18.67	6.62x10 ⁻⁰⁸	Proteína de membrana plasmática para normalizar niveles de PI4P
YML116W	ATR1	16.26	9.44x10 ⁻⁰⁶	Bomba de eflujo multidroga de la <i>Major Facilitator Superfamily</i> (MFS)
YGR142W	BTN2	15.23	7.12x10 ⁻⁰⁶	Proteína de unión v-SNARE
YHR087W	RTC3	14.98	1.01x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida implicada en el metabolismo del ARN
YDR406W	PDR15	14.21	3.31x10 ⁻⁰⁶	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YFL057C	AAD16	13.74	1.51x10 ⁻⁰⁵	Aryl-alcohol deshidrogenasa putativa
YOL149W	DCP1	13.54	3.61x10 ⁻⁰⁵	Subunidad del complejo enzimático <i>decapping</i> Dcp1p-Dcp2p
YDR171W	HSP42	13.52	1.19x10 ⁻⁰³	Proteína de choque térmico pequeña (sHSP) con actividad chaperona
YIL101C	XBP1	12.35	3.01x10 ⁻⁰⁵	Represor transcripcional
YHR139C	SPS100	12.29	1.95x10 ⁻⁰⁷	Proteína requerida en maduración de la pared de esporas
YGR213C	RTA1	12.11	1.04x10 ⁻⁰⁸	Proteína involucrada en resistencia a 7-aminocolesterol
YEL039C	CYC7	11.83	4.14x10 ⁻⁰⁸	Citocromo c isoforma 2
YIL056W	VHR1	10.52	4.95x10 ⁻⁰⁷	Activador transcripcional
YCL026C-B	HBN1	10.47	8.33x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida
YOL123W	HRP1	10.36	2.81x10 ⁻⁰⁶	Subunidad del complejo del factor de escisión I
YHL036W	MUP3	9.54	6.44x10 ⁻⁰⁷	Permeasa de baja afinidad a metionina
YKR076W	ECM4	9.40	4.12x10 ⁻⁰⁷	Glutación transferasa clase omega
YLR108C		9.06	3.50x10 ⁻⁰⁷	Proteína de función desconocida
YER054C	GIP2	8.90	1.55x10 ⁻⁰⁷	Subunidad reguladora putativa de la proteína fosfatasa Glc7p
YOR298W	MUM3	8.85	3.49x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida implicada en la organización de la pared externa de esporas
YHL024W	RIM4	8.59	4.31x10 ⁻⁰⁸	Proteína de unión a ARN putativa
YMR169C	ALD3	8.27	6.99x10 ⁻⁰³	Aldehído deshidrogenasa citoplasmática
YOR028C	CIN5	8.23	2.47x10 ⁻⁰⁷	Factor de transcripción <i>basic leucine zipper</i> (bZIP) de la familia yAP-1
YGR088W	CTT1	8.10	3.34x10 ⁻⁰⁶	Catalasa T citosólica
YER103W	SSA4	7.96	1.02x10 ⁻⁰⁵	Proteína de choque térmico de la familia HSP70
YER185W	PUG1	7.45	1.07x10 ⁻⁰⁵	Proteína de membrana plasmática implicada

Resultados

YER053C-A		7.21	1.56x10 ⁻⁰⁴	en transporte de protoporfirina y hemo
YOR152C	ATG40	7.18	3.92x10 ⁻⁰⁵	Proteína de función desconocida
YDL204W	RTN2	6.65	1.74x10 ⁻⁰⁶	Receptor de autofagia con un papel en la degradación del RE
YOR065W	CYT1	6.60	4.43x10 ⁻⁰⁶	Proteína reticulón
YJL051W	IRC8	6.56	5.68x10 ⁻⁰⁵	Citocromo c1
YLR329W	REC102	6.54	4.83x10 ⁻⁰⁶	Proteína de función desconocida localizada en extremo de la yema
YKR077W	MSA2	6.42	6.97x10 ⁻⁰⁶	Proteína implicada en las primeras etapas de la recombinación meiótica
YHR138C		6.09	7.19x10 ⁻⁰³	Activador transcripcional putativo
YPL201C	YIG1	5.99	4.46x10 ⁻⁰⁷	Proteína de función desconocida
YDL025C	RTK1	5.97	3.61x10 ⁻⁰²	Proteína que interactúa con glicerol 3-fosfatasa
YOR178C	GAC1	5.89	9.69x10 ⁻⁰⁴	Proteína kinasa putativa
YFL016C	MDJ1	5.81	4.14x10 ⁻⁰⁵	Subunidad reguladora para la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) Glc7p
YFL030W	AGX1	5.81	1.51x10 ⁻⁰⁶	Co-chaperona que estimula la actividad Ssc1p ATPasa de la proteína HSP70
YKL086W	SRX1	5.78	5.28x10 ⁻⁰⁵	Alanina:glioxylato aminotransferasa (AGT)
YOR328W	PDR10	5.76	1.96x10 ⁻⁰⁶	Sulfiredoxina
YPR151C	SUE1	5.55	1.71x10 ⁻⁰⁷	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
YLL026W	HSP104	5.54	4.85x10 ⁻⁰²	Proteína requerida para la degradación de formas inestables de citocromo c
YGR243W	MPC3	5.53	5.30x10 ⁻⁰⁵	Desagregasa
YKL093W	MBR1	5.53	2.19x10 ⁻⁰⁵	Subunidad altamente conservada de portador de piruvato mitocondrial(MPC)
YNL036W	NCE103	5.51	5.13x10 ⁻⁰⁵	Proteína involucrada en funciones mitocondriales y respuesta al estrés
YNL008C	ASI3	5.46	1.69x10 ⁻⁰⁵	Anhidrasa carbónica
YLR343W	GAS2	5.45	4.37x10 ⁻⁰⁶	Subunidad de la membrana nuclear interna del complejo ubiquitina ligasa Asi
YGR223C	HSV2	5.44	1.69x10 ⁻⁰⁶	1,3-beta-glucanosiltransferasa
YER060W-A	FCY22	5.24	1.17x10 ⁻⁰⁵	Proteína de unión a fosfoinosítido (PI)
YNL155W	CUZ1	5.19	1.90x10 ⁻⁰³	Purina-citosina permeasa putativa
YHL021C	AIM17	5.17	1.36x10 ⁻⁰⁴	Proteína con papel en ruta ubiquitina-proteosoma
YHR199C	AIM46	5.16	1.08x10 ⁻⁰⁵	Proteína de función desconocida
YGR281W	YOR1	5.12	2.18x10 ⁻⁰³	Proteína de función desconocida
YGL010W	MPO1	5.07	3.53x10 ⁻⁰⁶	Transportador de membrana plasmática <i>ATP-binding cassette</i> (ABC)
				Proteína implicada en el metabolismo de fitoesfingosina

En los distintos tratamientos el número de genes sobreexpresados variaron, así como sus grupos funcionales (Tabla 4). En la Tabla 1, donde las células se trataron con citrinina, se encontraron 70 genes sobreexpresados, cuyos grupos funcionales mayoritariamente están relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, el más importante el implicado en el metabolismo del glutatión, conocido antioxidante, y en el transporte de drogas,

mostrando la importancia de la detoxificación de la célula a través de los transportadores, especialmente Snq2, Pdr15, Pdr10, Pdr16, Yor1, Flr1, y Atr1. En la Tabla 2, correspondiente al tratamiento con OTA, se identificaron 115 genes, cuyos grupos funcionales están relacionados mayoritariamente con procesos de desarrollo celular, como esporulación y reproducción. En este caso, el único transportador de xenobióticos moderadamente activo fue Snq2. En la Tabla 3, correspondiente al tratamiento combinado, aparecen 68 genes sobreexpresados, cuyos grupos funcionales son una combinación de los dos tratamientos anteriores.

Tabla 4. Grupos funcionales de genes inducidos por tratamientos con CIT, OTA, y CIT/OTA.

CIT	
Grupos Gene Ontology	p-value
Proceso de oxidación-reducción	1.8×10^{-13}
Respuesta celular al estrés oxidativo	2.2×10^{-9}
Proceso metabólico del glutatión	1.8×10^{-6}
Transporte de drogas	1.3×10^{-5}
Respuesta a especies reactivas de oxígeno	1.3×10^{-4}
OTA	
Grupos Gene Ontology	p-value
Proceso de desarrollo de un organismo	2.2×10^{-8}
Proceso de oxidación-reducción	2.0×10^{-7}
Diferenciación celular	3.0×10^{-6}
Proceso de desarrollo involucrado en la reproducción	5.4×10^{-6}
Esporulación	1.6×10^{-5}
Respuesta celular al estrés oxidativo	5.4×10^{-3}
CIT + OTA	
Grupos Gene Ontology	p-value
Proceso de oxidación-reducción	1.7×10^{-7}
Transporte de drogas	1.3×10^{-5}
Respuesta celular al estrés oxidativo	3.1×10^{-4}
Ensamblaje de la pared de esporas	1.4×10^{-3}
Proceso de desarrollo de un organismo	4.2×10^{-3}

Estos resultados mostraron diferencias significativas en la expresión génica celular en respuesta a los tratamientos con CIT y OTA. En la Figura 16 se observa que apenas 8 genes (menos del 5%) del total de genes inducidos con estas toxinas, son compartidos en ambos tratamientos, y que están relacionados con procesos de oxidación-reducción. El hecho de que estas micotoxinas inducen distintos grupos de genes, parece indicar que podrían tener distintos efectos biológicos en las células.



Figura 16. Comparación de genes inducidos en tratamientos con CIT y OTA con un diagrama de Venn. Se compararon los genes inducidos con FC>5 para los tratamientos por separado de CIT (rojo) y OTA (verde). La lista de genes inducidos, exclusivos y comunes, aparecen indicados en la tabla. Los grupos funcionales representativos de cada conjunto de genes se muestran en el diagrama.

3. Estudio de la posible relación del estrés oxidativo con los efectos causados por citrinina y ocratoxina A.

Los resultados de los experimentos transcriptómicos mostraron diferencias en la inducción de genes entre citrinina y ocratoxina A. En el caso de la exposición a CIT el conjunto mayoritario de genes inducidos estaba relacionado con la respuesta a estrés oxidativo, así como con la eliminación de drogas mediante diversos transportadores, mientras que con OTA esta respuesta se observó de forma más débil.

Para conocer mejor la posible relación entre la respuesta a estrés oxidativo y extrusión de tóxicos con la exposición a CIT y OTA, se realizó, por un lado, un ensayo de sensibilidad con varios mutantes, y por otro lado, un estudio con reporteros luciferasa.

3.1. Estudio de reporteros luciferasa GRE2-lucCP⁺, 3xAP1-lucCP⁺, y PDR5-lucCP⁺ sometidos a CIT y OTA.

En primer lugar, quisimos estudiar los efectos de CIT y OTA en reporteros inducibles por distintos estreses para conocer sus perfiles dosis-respuesta y ver las posibles diferencias entre ellos. Para ello, empleamos el reportero integrativo PDR5-lucCP⁺

como control, ya que anteriormente vimos que Pdr5 se activa y participa en la respuesta a ambas micotoxinas. Además, utilizamos otros dos reporteros: GRE2-lucCP⁺, que también habíamos empleado antes y es inducible a estrés de forma general, y 3xAP1-lucCP⁺ (Dolz-Edo *et al.* 2013), que es un reportero inducible específico de estrés oxidativo. Estos reporteros fueron sometidos a un rango de concentraciones de CIT y OTA y se cuantificó su actividad en luminómetro. Los perfiles dosis-respuesta resultantes se muestran en la Figura 17.

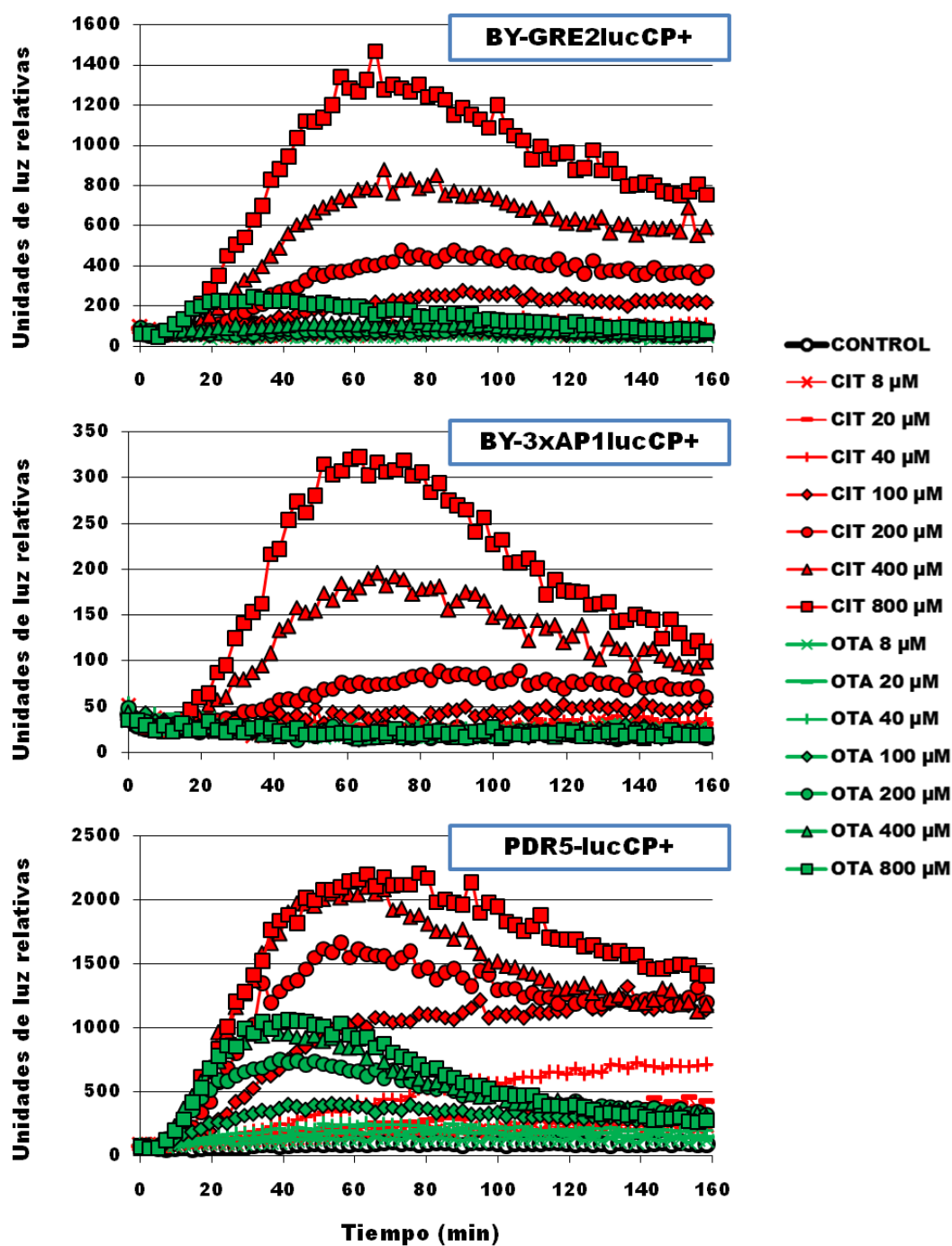


Figura 17. OTA y CIT inducen reporteros de estrés de forma diferencial. Las células con las construcciones GRE2-lucCP⁺, 3xAP1-lucCP⁺ y PDR5-lucCP⁺ se sometieron a un rango de concentraciones (0, 8, 20, 40, 100, 200, 400 y 800 µM) de citrinina y ocratoxina A, y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Desviación estándar del ensayo no supera el 15%.

Los perfiles dosis-respuesta mostraron diferencias en función del reportero y la droga, aunque en todos los casos se observó una mayor actividad luciferasa en los tratamientos con citrinina y a medida que la concentración de micotoxina aumenta. Para poder comparar más fácilmente los tres reporteros representamos la actividad máxima (A_{max}) para cada concentración (Figura 18).

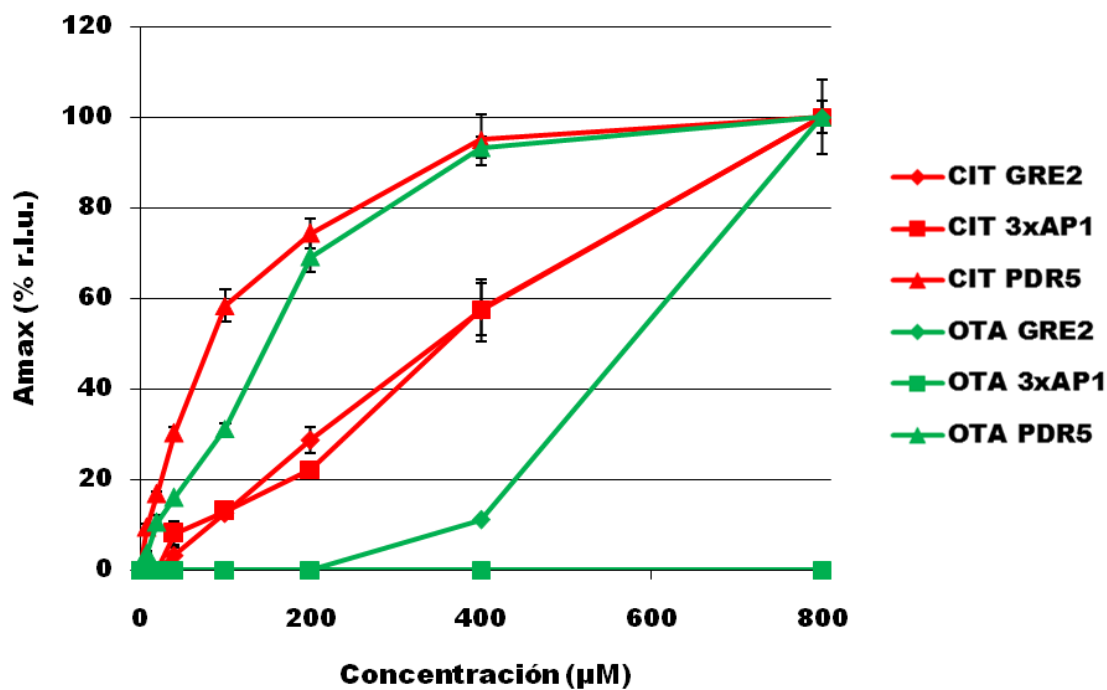


Figura 18. Actividad máxima (A_{max}) de los reporteros GRE2, 3xAP1, y PDR5-lucCP⁺. Representación de la A_{max} de los reporteros GRE2-lucCP⁺, 3xAP1-lucCP⁺ y PDR5-lucCP⁺ tratados con un rango de concentraciones (0, 8, 20, 40, 100, 200, 400 y 800 μM) de citrinina (rojo) y ocratoxina A (verde), y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los valores máximos de actividad se representan frente a la concentración de micotoxina. Los valores A_{max} fueron ajustados sobre 100.

En la Figura 18 se observa que *PDR5* es inducido de forma similar por ambas micotoxinas, sin embargo, los reporteros específicos de estrés se inducen mayoritariamente cuando son tratados con citrinina. Concretamente, en el caso del reportero 3xAP1-lucCP⁺, cuyos elementos AP1 son exclusivos en respuesta a estrés oxidativo, sólo se induce con CIT.

Estos resultados apoyarían los obtenidos en los experimentos anteriores, donde se observaron diferencias entre CIT y OTA respecto a los genes inducidos en la respuesta celular adaptativa a estas micotoxinas, y que indican que CIT causa más específicamente daños oxidativos que OTA, de forma que hay una activación de genes implicados en la respuesta antioxidante. Para comprobar el efecto de esta activación a nivel génico, se decidió analizar estos resultados a nivel fenotípico empleando mutantes defectuosos en la adaptación a estrés oxidativo y transporte multidroga.

3.2. CIT causa estrés oxidativo que se agrava en mutantes con defectos en la respuesta antioxidante.

Para conocer mejor la participación de determinadas proteínas implicadas en la respuesta antioxidante y cómo afecta al crecimiento de las células la exposición a citrinina y ocratoxina A, se estudió el efecto a nivel fenotípico de estas micotoxinas comparando células de la cepa silvestre con varios mutantes. Para ello, se realizó un ensayo de sensibilidad en medio sólido con mutantes defectuosos en la adaptación a estrés oxidativo ($\Delta yap1$, $\Delta skn7$) y en el transporte multidroga ($\Delta snq2$ y $\Delta yor1$).

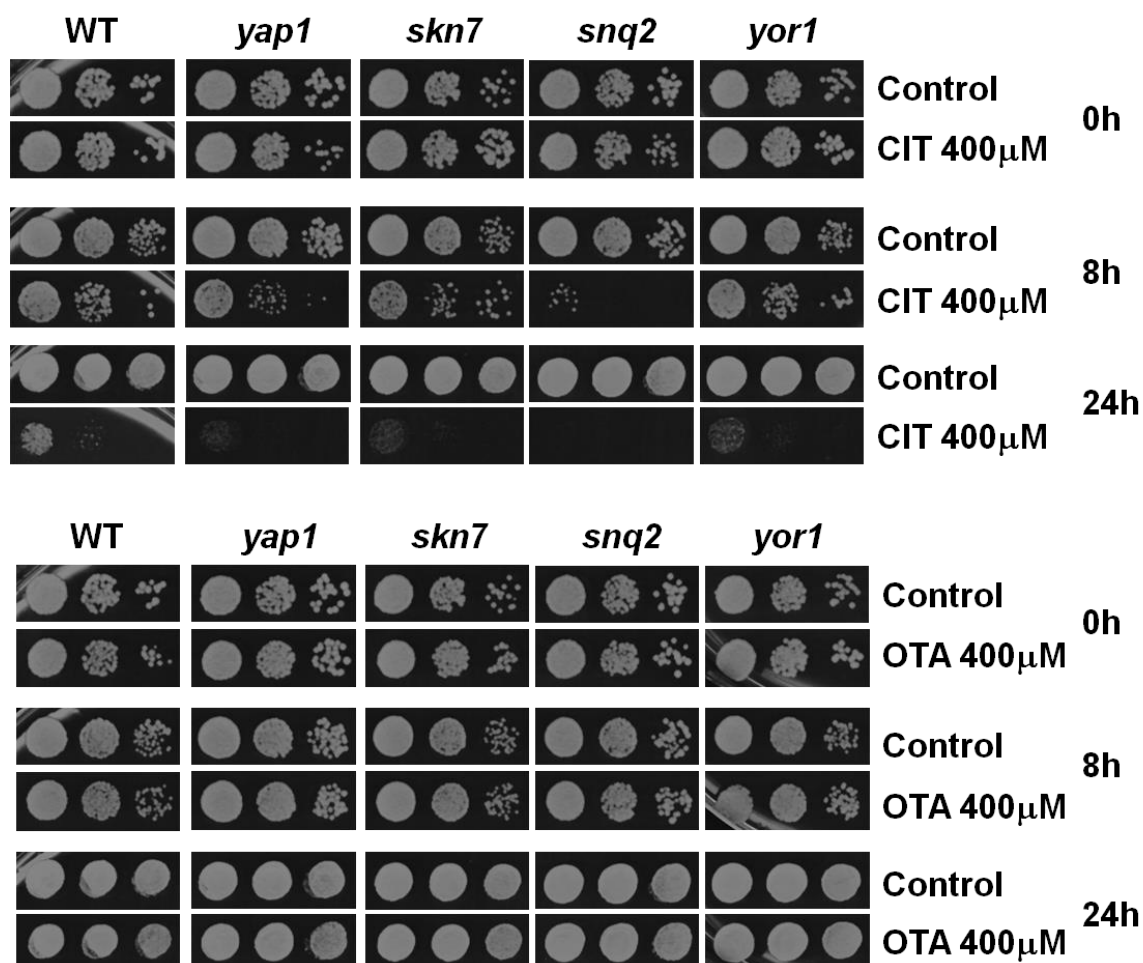


Figura 19. La toxicidad de CIT, pero no de OTA, aumenta en mutantes con defectos en la respuesta adaptativa a estrés oxidativo o el transporte multidroga. Los mutantes indicados fueron tratados o no con 400 μM de CIT (panel superior) o 400 μM de OTA (panel inferior). Se hicieron diluciones seriadas 1:1, 1:10, y 1:100 de los cultivos y plaquearon en los tiempos indicados en medio YPD sólido sin micotoxinas.

En la Figura 19 se observa que la falta del factor de transcripción de defensa a estrés oxidativo Yap1, así como del transportador multidroga Snq2 afecta a la viabilidad de las células frente a CIT a partir de 8h. Además, el efecto de esta toxina es notable en todos los casos a las 24h. Por el contrario, el tratamiento con OTA no parece afectar a ninguno de los mutantes estudiados. Estos resultados se corresponden con los ensayos anteriores,

Resultados

corroborando la diferencia tanto a nivel de activación génica como fenotípica en las células sometidas a estas dos micotoxinas.

En conjunto, estos resultados muestran que la exposición a las micotoxinas citrinina y ocratoxina A tiene efectos biológicos distintos en las células, es decir, los mecanismos de toxicidad son diferentes, desencadenando una respuesta de adaptación distinta frente a cada una de ellas. Los resultados en este trabajo muestran que CIT causa estrés oxidativo lo que da lugar a una respuesta transcripcional antioxidante y la expulsión de los compuestos tóxicos a través de los transportadores específicos de drogas de la membrana. Por su parte, OTA parece producir una desregulación de genes centrados en procesos del desarrollo, algunos habitualmente no expresados, como los genes implicados en la esporulación, y sólo induce levemente una respuesta antioxidante.

CAPÍTULO 2: ANÁLISIS EN TIEMPO REAL DE LA RESPUESTA MULTIDROGA EN LEVADURA: REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LOS TRANSPORTADORES PDR Y SELECTIVIDAD DE LOS ACTIVADORES TRANSCRIPCIONALES INVOLUCRADOS.

Las proteínas pertenecientes al sistema PDR (*Pleiotropic Drug Resistance*) son un grupo de proteínas con distintas funciones en la respuesta celular de adaptación a xenobióticos, y que se encuentran conservadas de bacterias a organismos eucarióticos superiores. Anteriormente, encontramos que diferentes transportadores de membrana están regulados de forma distinta ante la exposición a las micotoxinas citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA). En esta parte del presente trabajo, quisimos ampliar nuestros estudios de expresión génica con reporteros luciferasa al sistema de genes PDR de levadura. Así, estudiamos la expresión de ciertos transportadores de membrana y la contribución individual de varios activadores transcripcionales Pdr a la respuesta adaptativa de las células cuando son tratadas con diversos xenobióticos, entre ellos, las micotoxinas citrinina y ocratoxina A.

1. Estudio transcripcional de los transportadores Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 tratados con varios xenobióticos.

El sistema PDR responde a un amplio rango de moléculas xenobióticas estructural y funcionalmente distintas, en muchos casos hidrofóbicas, pero también otros estreses abióticos (NaCl, H₂O₂, etc.). En primer lugar, quisimos investigar una posible regulación diferencial de distintos transportadores de membrana de la superfamilia de proteínas ABC en respuesta a diferentes tratamientos tóxicos, concretamente, citrinina (CIT), ocratoxina A (OTA), menadiona (MEN) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Estudiamos la expresión de los transportadores de membrana multidroga Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1, que según los resultados transcriptómicos del capítulo 1 se activan ante la presencia de CIT y en algunos casos también OTA. Para ello, empleamos los reporteros luciferasa integrativos PDR5-, PDR15-, SNQ2-, y YOR1-lucCP⁺ y los sometimos a un rango de concentraciones de las micotoxinas CIT, y OTA, y los oxidantes MEN, y H₂O₂.

1.1. Respuesta diferencial de transportadores multidroga a las micotoxinas CIT y OTA.

En primer lugar, sometimos las cepas con los reporteros luciferasa PDR5-, PDR15-, SNQ2-, y YOR1-lucCP⁺ a un rango de concentraciones de CIT y OTA y cuantificamos sus perfiles dosis-respuesta en luminómetro. Como en los experimentos luciferasa del capítulo anterior, los valores obtenidos tras su cuantificación en luminómetro representan la expresión luciferasa cuantificada por su actividad y medida como unidades de luz relativas, y fueron normalizados por la OD correspondiente (Figura 20). Para poder comparar más fácilmente los cuatro reporteros representamos la actividad máxima (A_{max}) para cada concentración (Figura 21).

Resultados

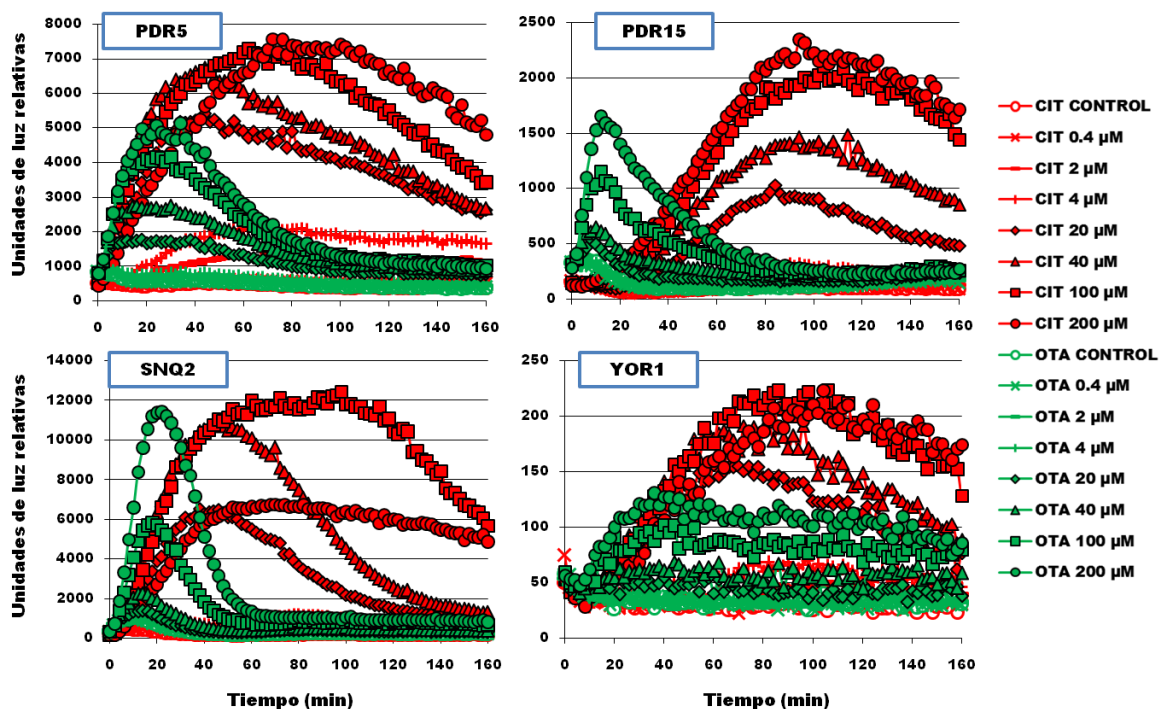


Figura 20. Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 responden de forma diferencial a las micotoxinas CIT y OTA. Las células de la cepa silvestre BY4741 con las construcciones PDR5-, PDR15-, SNQ2- y YOR1-lucCP⁺ se sometieron a un rango de concentraciones (0, 0.4, 2, 4, 20, 40, 100 y 200 μM) de citrinina y ocratoxina A, y se cuantificaron sus perfiles dosis-respuesta de la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Desviación estándar del ensayo no supera el 15%

En la Figura 20 se observan distintos perfiles de respuesta no sólo entre los distintos transportadores, sino también en función de la droga y dosis. Estos resultados indicarían que los cuatro transportadores participarían en la detoxificación de citrinina y ocratoxina A, aunque de forma diferencial. La primera diferencia se observa entre las mismas drogas, con una respuesta inicial más rápida y transitoria para OTA con respecto a CIT, que muestra curvas más amplias en el tiempo, además de niveles de actividad luciferasa más elevados en general. Este retraso en la inducción ante CIT es más notable en el transportador Pdr15, lo que podría significar que tuviera una función de detoxificación de CIT secundaria con respecto al resto de transportadores. Además, como observamos en las Figuras 20 y 21, los transportadores Snq2 y Pdr5 serían los más activos al someter las células a estas micotoxinas, especialmente Snq2, con niveles de expresión luciferasa más elevados y que al ser tratado con CIT presenta saturación alrededor de una concentración de 100 μM. Por el contrario, Yor1 sería el que menos responde a estas toxinas.

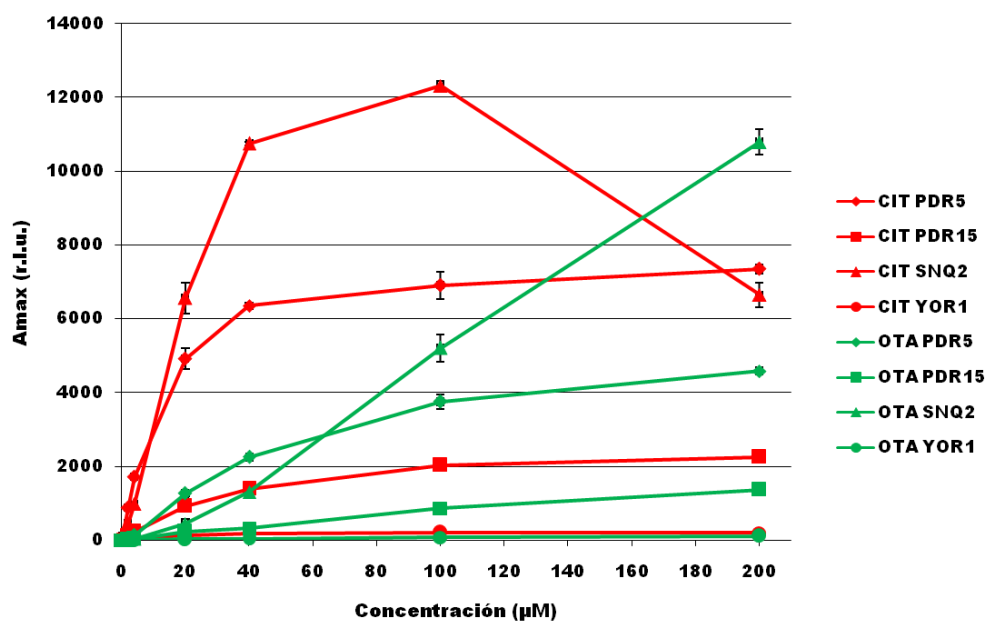


Figura 21. Comparación de la activación de *PDR5*, *PDR15*, *SNQ2* y *YORI* por CIT y OTA. Representación de la Amax de los reporteros PDR5-, PDR15-, SNQ2- y YORI-lucCP⁺ tratados con un rango de concentraciones (0, 0.4, 2, 4, 20, 40, 100 y 200 µM) de citrinina (rojo) y ocratoxina A (verde), y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los valores máximos de actividad se representan frente a la concentración de micotoxina.

Estos resultados se corresponderían en gran parte con los obtenidos en el análisis transcriptómico del capítulo anterior, donde *Snq2* es el transportador con niveles de inducción más elevados de los tres, y está presente en ambos tratamientos, y por otra parte, *YORI* aparece sólo en el tratamiento con citrinina y con la menor inducción de los tres.

1.2. Respuesta diferencial de transportadores multidroga a menadiona y H₂O₂.

Tras estudiar los transportadores Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 al ser sometidos a citrinina y ocratoxina A, quisimos conocer la posible actividad de estos transportadores frente a otros compuestos, como menadiona y peróxido de oxígeno, dos moléculas ligadas a estrés oxidativo. Para ello, de nuevo, sometimos las células de levadura con los mismos reporteros integrativos a un rango de concentraciones de MEN y H₂O₂ y cuantificamos la actividad luciferasa en luminómetro (Figura 22).

Resultados

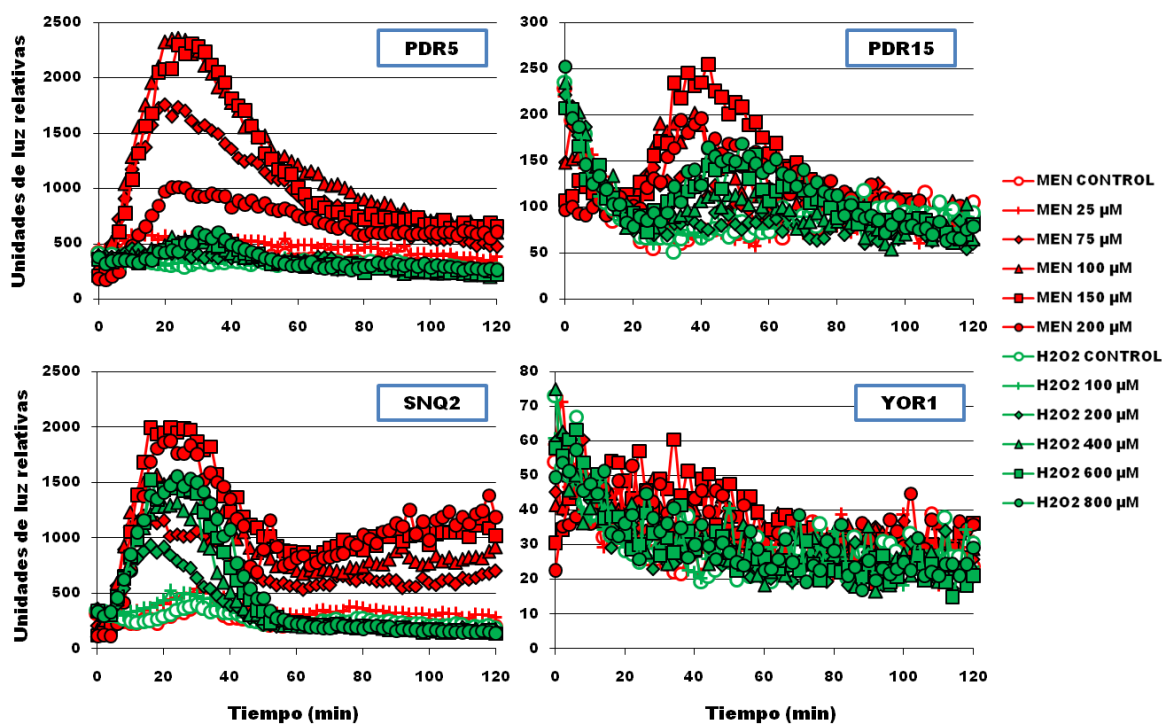


Figura 22. Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1 responden de forma diferencial a menadiona y H₂O₂. Las células de la cepa silvestre BY4741 con las construcciones PDR5-, PDR15-, SNQ2- y YOR1-lucCP+ se sometieron a un rango de concentraciones de menadiona (0, 25, 75, 100, 150 y 200 μM) y peróxido de hidrógeno (0, 100, 200, 400, 600 y 800 μM), y se cuantificaron sus perfiles dosis-respuesta de la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Desviación estándar del ensayo no supera el 15%

Los perfiles dosis-respuesta mostraron diferencias entre los transportadores. Pdr15 mostró una inducción mínima, mientras que Yor1 parece no reaccionar a ninguno de los compuestos. Por el contrario, tanto Pdr5 como Snq2 vuelven a mostrar actividad, aunque en mucha menor medida que frente a CIT y OTA. En el caso de Snq2, este transportador muestra una actividad ligeramente mayor en MEN, pero los perfiles para ambos compuestos es similar. En cuanto a Pdr5, este transportador muestra diferencias claras entre MEN y H₂O₂, observando inducción frente a menadiona, pero mucha menor actividad con peróxido de hidrógeno. Para observar más claramente las diferencias entre los distintos transportadores volvimos a representar la actividad máxima de las curvas frente a las concentraciones (Figura 23).

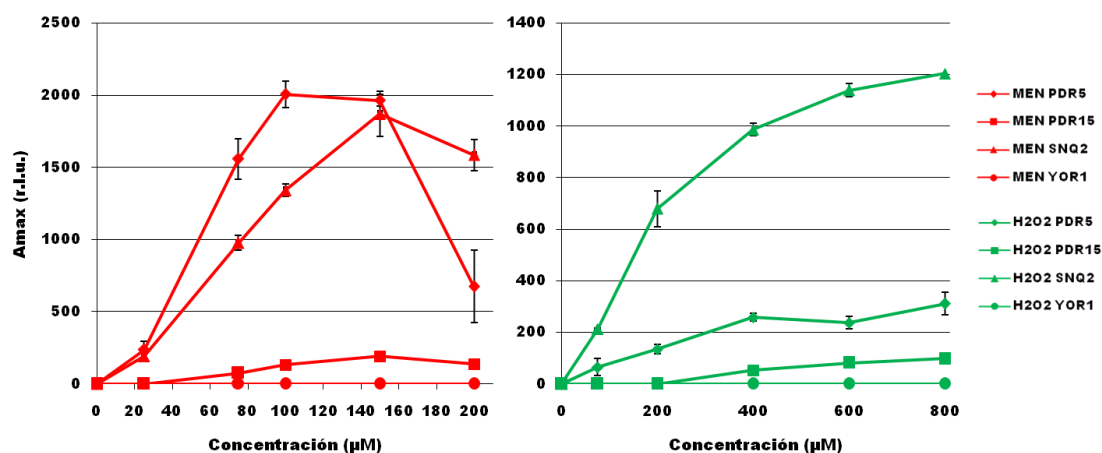


Figura 23. Actividad máxima (Amax) de los reporteros PDR5-, PDR15-, SNQ2- y YOR1-lucCP+. Representación de la Amax de los reporteros PDR5-, PDR15-, SNQ2- y YOR1-lucCP+ tratados con un rango de concentraciones de menadiona (0, 25, 75, 100, 150 y 200 μM) (rojo) y peróxido de hidrógeno (0, 100, 200, 400, 600 y 800 μM) (verde), y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los valores máximos de actividad se representan frente a la concentración de micotoxina.

Pdr5 y Snq2 vuelven a aparecer como los transportadores más activos de los cuatro, aunque en este caso, además, Snq2 sobresale del resto al ser el único que se induce de forma significativa en el tratamiento con peróxido de hidrógeno. Esta respuesta podría estar relacionada con la regulación de Snq2 por parte del factor de transcripción Stb5, implicado en la respuesta a estrés oxidativo (Akache *and* Turcotte, 2002).

2. Función de los activadores Pdr1 y Pdr3 en la regulación transcripcional de transportadores multidroga por CIT.

Tras estudiar los transportadores anteriores en cepas silvestres, quisimos conocer la respuesta de estos mismos transportadores, a excepción de Yor1 por su leve inducción, en cepas defectuosas para los reguladores principales en la respuesta multidroga, *Apdr1* y *Apdr3*, y así tratar de estudiar en más profundidad la posible función diferencial de estos activadores transcripcionales en la respuesta a citrinina. Los resultados de actividad luciferasa en unidades relativas de luz fueron tratados dividiendo cada uno de los puntos por su valor inicial, obteniendo los valores de inducción (*Fold Induction*) para cada tratamiento y cepa (Figura 24). De esta forma, pudimos comparar y analizar mejor las diferencias entre las cepas y transportadores.

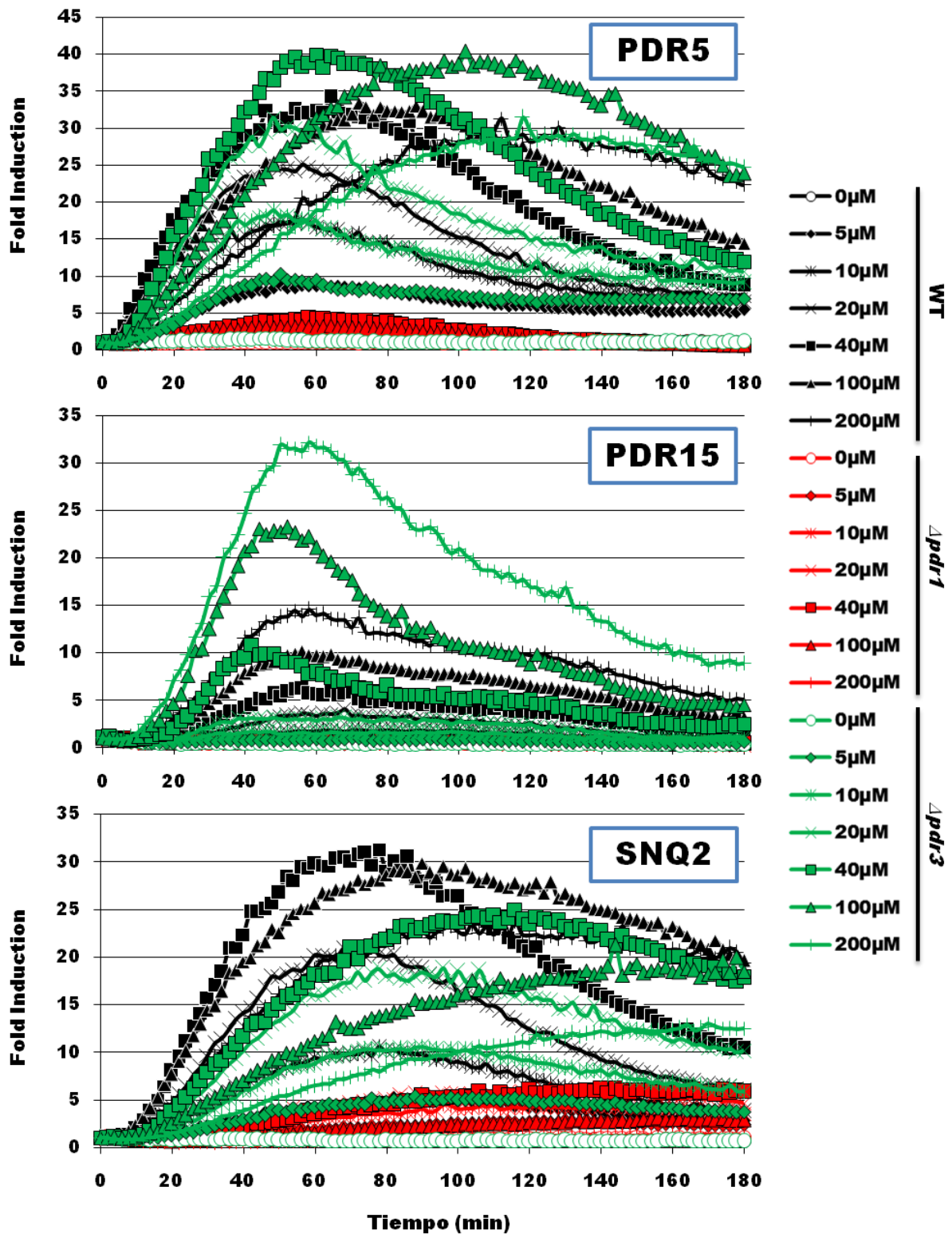


Figura 24. Función de Pdr1 y Pdr3 en la activación de Pdr5, Pdr15 y Snq2 por CIT. Las células de *wild type* (WT), $\Delta pdr1$ y $\Delta pdr3$ con las construcciones PDR5-, PDR15-, y SNQ2-lucCP⁺ se sometieron a un rango de concentraciones de citrinina (0, 5, 10, 20, 40, 100 y 200 μM) y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

En todos los transportadores estudiados se observó un defecto importante en la inducción por CIT en ausencia de la función de Pdr1. En el caso de los mutantes $\Delta pdr3$ se observaron ligeras diferencias entre transportadores. En la cepa con el reportero SNQ2-lucCP⁺ hay retraso y menor inducción comparado con la cepa silvestre, mientras que en los otros dos reporteros estudiados la respuesta es mayor en el mutante, más discreta en el caso de PDR5-lucCP⁺, pero evidente en PDR15-lucCP⁺. En la Figura 25 se representan las inducciones máximas de las curvas frente a las distintas concentraciones de citrinina para ver mejor estas diferencias.

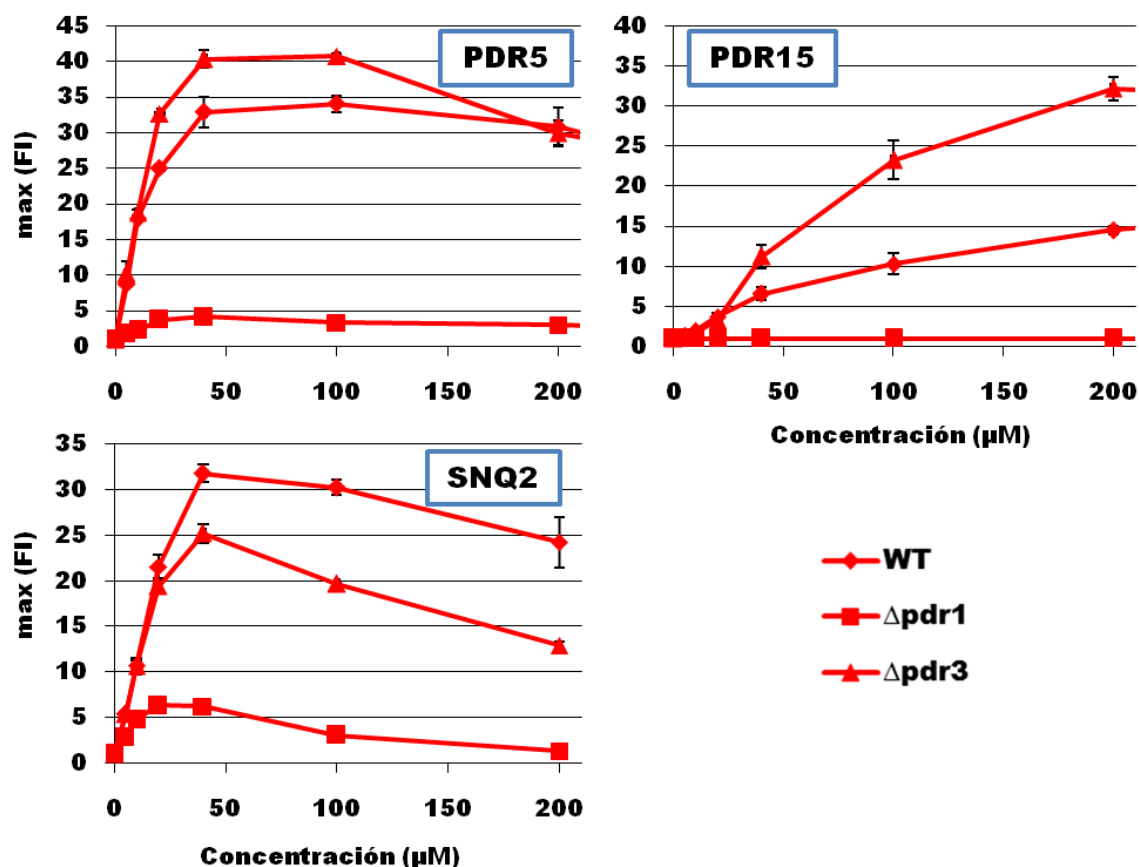


Figura 25. Comparación de las funciones de Pdr1 y Pdr3 en la activación de transportadores multidroga por CIT. Representación de los valores máximos de inducción de los reporteros PDR5-, PDR15-, y SNQ2-lucCP⁺ en las células de *wild type* (WT), $\Delta pdr1$ y $\Delta pdr3$ tratados con a un rango de concentraciones de citrinina (0, 5, 10, 20, 40, 100 y 200 μM) y cuantificando la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (Fold induction). Los valores máximos de inducción (FI) se representan frente a la concentración de micotoxina.

Los resultados parecen mostrar que Pdr1 es el principal factor implicado en la regulación de estos transportadores multidroga durante la adaptación celular a citrinina al no observarse apenas inducción cuando éste no está presente. Por el contrario, Pdr3 parece no estar tan involucrado en esta respuesta adaptativa, y además lo hace de forma dispar en función del transportador. Esto podría indicar que su participación en la regulación de estos transportadores fuera secundaria o incluso que actuara como un regulador negativo en los casos de *PDR5* y, especialmente, *PDR15*, y como ayudante en la activación de *SNQ2*.

Además, en la Figura 25 podemos apreciar diferencias en la sensibilidad y capacidad de saturación de los transportadores, en este caso, independiente de la cepa. Snq2 parece ser el transportador que antes se satura, alcanzando su máximo a una concentración de citrinina de 40 μ M, mientras que en Pdr5 estaría a 100 μ M, y en el caso de Pdr15, llega a una concentración de \geq 200 μ M. Si nos centramos en la cepa silvestre, parece que, como ya se observó en anteriores experimentos, Pdr5 y Snq2 serían los transportadores principales frente a citrinina, mientras que Pdr15, con unos niveles de inducción menores y menor sensibilidad, podría actuar como un transportador secundario.

A continuación, quisimos profundizar más en la posible implicación de varios reguladores Pdr, no sólo de Pdr1 y Pdr3, en la respuesta de adaptación celular a citrinina y ocratoxina A.

3. Estudio de los factores de transcripción Pdr en la respuesta adaptativa celular a micotoxinas y otros compuestos.

Los transportadores multidroga están regulados por distintos factores de transcripción. De ellos, Pdr1 y Pdr3, son considerados los mayores reguladores, especialmente Pdr1. En el apartado anterior, comprobamos que éste era el caso al someter las células a varias concentraciones de citrinina.

Aunque Pdr1 es el factor de transcripción principal de los reguladores Pdr conocidos en levadura, no es el único. Además, se ha visto que en muchas ocasiones estos factores reguladores trabajan conjuntamente, e incluso se regulan entre ellos (Mamnun *et al.*, 2002; Akache *and* Turcotte, 2002). En este trabajo, junto con Pdr1 y Pdr3, nos centramos en estudiar los factores de transcripción Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5. Estos factores de transcripción regulan la actividad de los transportadores multidroga reconociendo secuencias denominadas PDRE que se encuentran en los promotores de los genes codificantes de las proteínas diana.

3.1. Respuesta adaptativa a citrinina y ocratoxina A a través de los elementos PDRE.

En primer lugar, estudiamos qué factores de transcripción respondían a CIT y OTA por medio de la activación de los elementos PDRE. Para ello se emplearon, junto con la cepa silvestre, cepas de levadura defectuosas para dichos factores (*Δ pdr1*, *Δ pdr3*, *Δ pdr8*, *Δ yrm1*, *Δ yrr1*) que portaban las construcciones 3xPDRE-lucCP⁺. Sometimos estas células a un rango de concentraciones de citrinina y ocratoxina A, y cuantificamos sus respuestas de activación dependientes de dosis con el luminómetro (Figura 26).

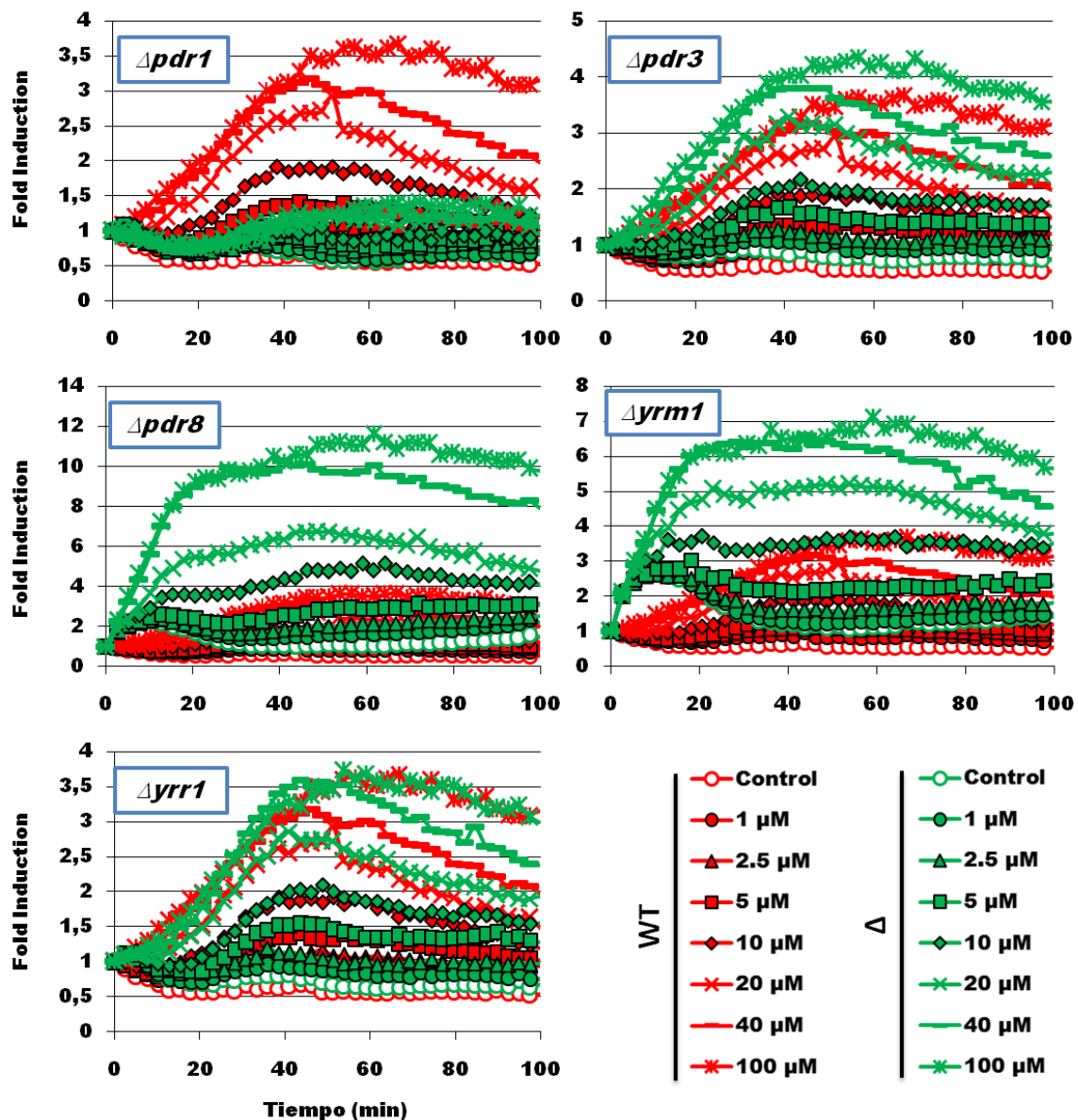


Figura 26. Función de los activadores transcripcionales Pdr en la regulación génica a través de elementos PDRE por CIT. Las células de *wild type* (WT), $\Delta pdr1$, $\Delta pdr3$, $\Delta pdr8$, $\Delta yrm1$ y $\Delta yrr1$ con el reportero 3xPDRE-lucCP⁺ se sometieron a un rango de concentraciones de citrinina (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 100 μ M) y se cuantificaron sus perfiles dosis-respuesta de la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

En la Figura 26 se representan los perfiles dosis-respuesta a varias concentraciones de citrinina en cada uno de los mutantes (verde) con respecto a la cepa silvestre (rojo). Como se observó anteriormente en el caso de la regulación de los transportadores, de nuevo, las células de mutantes defectuosos para el factor de transcripción Pdr1, no muestran actividad. Esta inactividad en el mutante $\Delta pdr1$ también se observó en el tratamiento con OTA (Figura 27), lo que podría indicar el papel fundamental de Pdr1. Por el contrario, $\Delta pdr8$ e $\Delta yrm1$, en tratamientos con CIT presentaron mayores niveles de inducción que la cepa silvestre, aunque no mostraron grandes diferencias cuando se trataron con OTA.

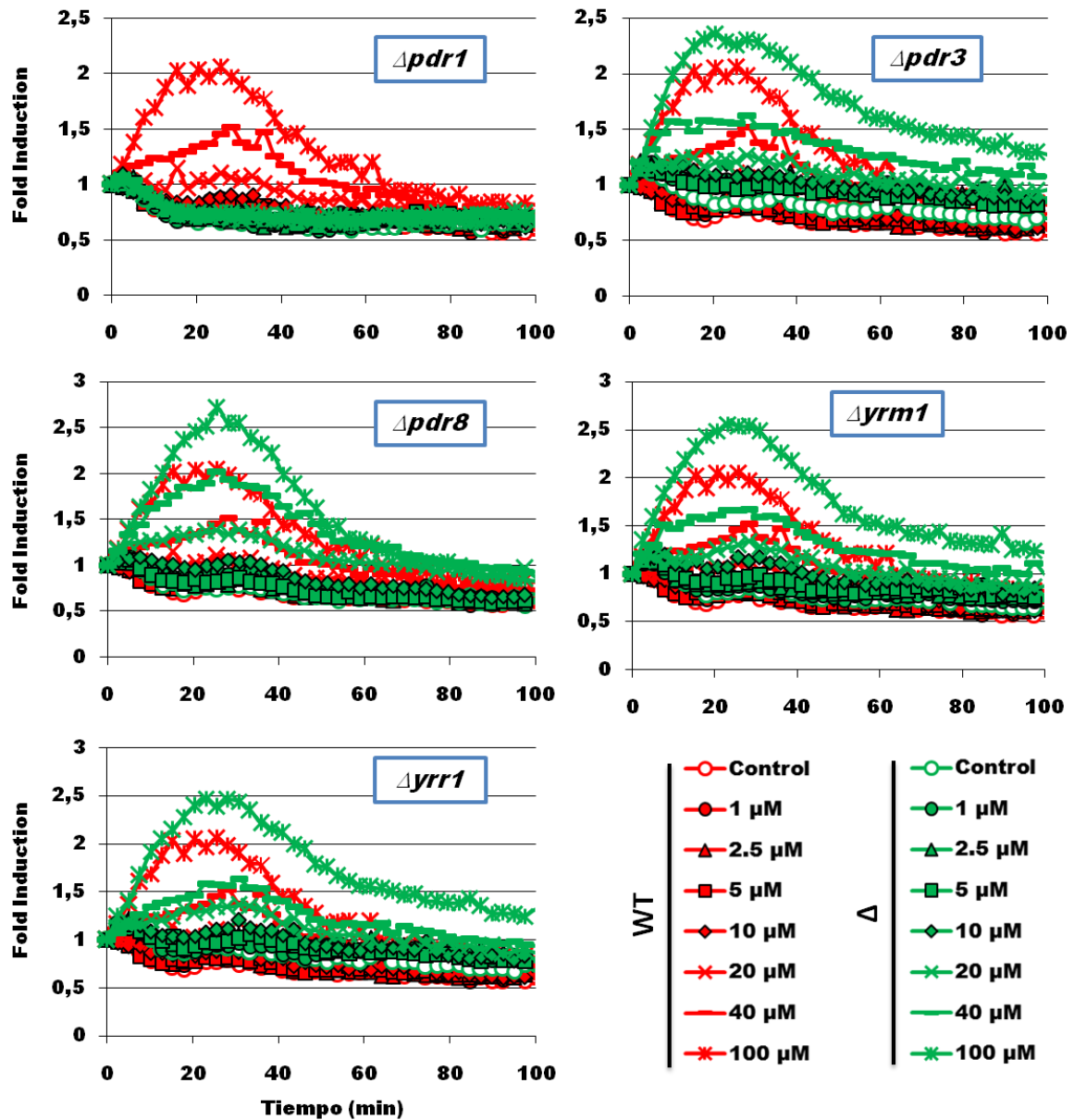


Figura 27. Función de los activadores transcripcionales Pdr en la regulación génica a través de elementos PDRE por OTA. Las células de *wild type* (WT), $\Delta pdr1$, $\Delta pdr3$, $\Delta pdr8$, $\Delta yrm1$ y $\Delta yrr1$ con el reportero 3xPDRE-lucCP+ se sometieron a un rango de concentraciones de ocratoxina A (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 100 μM) y se cuantificaron sus perfiles dosis-respuesta de la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

Para estudiar y poder comparar más fácilmente ambas condiciones en los distintos mutantes, representamos los valores máximos de inducción frente a las concentraciones (Figura 28).

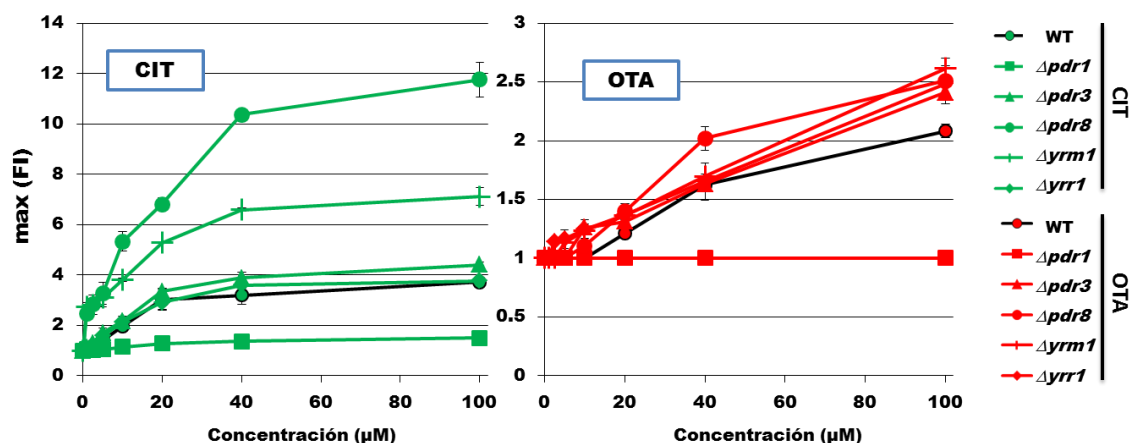


Figura 28. Comparación de las funciones de Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, e Yrr1 en la activación génica a través de PDRE por CIT y OTA. Representación de los valores máximos de inducción del reportero 3xPDRE-lucCP⁺ en las células de *wild type* (WT), *Δpdr1*, *Δpdr3*, *Δpdr8*, *Δyrm1* y *Δyrr1* tratadas con un rango de concentraciones de citrinina y ocratoxina A (0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, y 100μM) y cuantificando la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*). Los valores máximos de inducción (FI) se representan frente a la concentración de micotoxina.

Los resultados parecen mostrar que Pdr1 es el principal regulador, a través de los elementos PDRE entre estos factores en la respuesta adaptativa a citrinina y ocratoxina A, al no observarse actividad en el mutante defectuoso para Pdr1 cuando es tratado con ambas micotoxinas. Por otro lado, también se observó que tanto *Δpdr8* como *Δyrm1* presentaban mayor inducción con respecto a la cepa silvestre en el tratamiento con CIT, pudiendo implicar que Pdr8 e Yrm1 tengan algún tipo de papel como reguladores negativos en la respuesta de adaptación a esta toxina a través de los elementos PDRE. Por su parte, ni Pdr3, ni Yrr1, parecen tener un efecto importante en la adaptación celular a CIT y OTA a través de los elementos PDRE en levadura.

4. Reconocimiento de xenobióticos por parte de los factores de transcripción Pdr.

Hasta ahora hemos visto que, por un lado, los transportadores estudiados, Pdr5, Pdr15, Snq2 y Yor1, responden con sensibilidad diferente a distintos compuestos químicos, y por otro lado, que la eliminación de los factores de transcripción Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, e Yrr1, tiene efectos diferenciales en la activación a través de los PDRE en respuesta a las micotoxinas CIT y OTA. Por lo tanto, para estudiar en mayor profundidad la posibilidad de que los factores de transcripción Pdr reconocen sustratos de forma diferencial, desarrollamos un sistema experimental que nos permitiera investigar la interacción/activación de estos factores individualmente.

Para ello, empleamos una modificación del sistema luciferasa general. Las células contienen dos plásmidos: uno (**pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr**) con el dominio de unión a ADN (DBD) de Gal4 fusionado al dominio de unión a ligando (LBD) de factores de transcripción Pdr concretos (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5), y otro plásmido (**pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺**) con las secuencias de activación UAS de GAL1 (a la que se une el DBD Gal4) fusionado al gen de luciferasa desestabilizada. De esta forma, si hay reconocimiento por parte del factor de transcripción, podemos cuantificarlo con la

actividad luciferasa. En la Figura 29 se muestra una representación del funcionamiento de este sistema experimental.

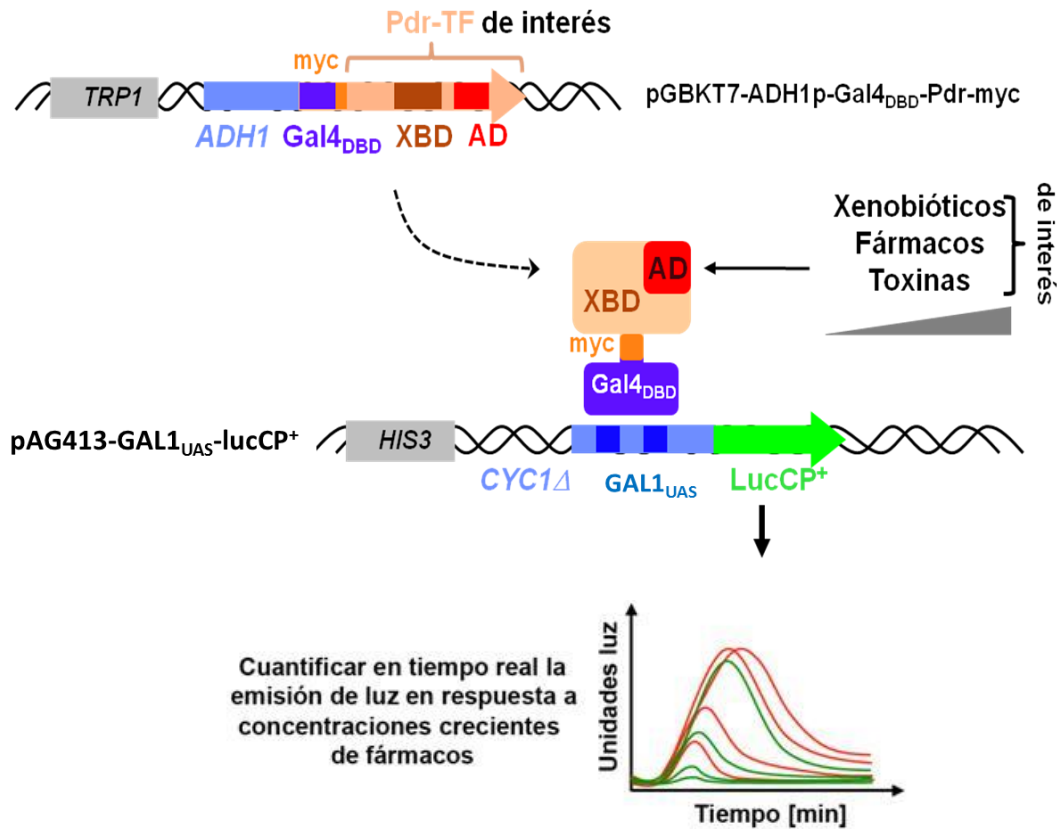


Figura 29. Representación del sistema de doble plásmido UAS-Pdr. El plásmido pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr expresa de forma constitutiva proteínas con el dominio de unión a ADN (DBD) de Gal4 fusionado al dominio de unión a ligando (LBD) de los factores Pdr, representado aquí con el dominio de unión a xenobióticos (XBD) y el dominio de activación (AD). El plásmido pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺ contiene las secuencias de activación UAS de GAL1 fusionadas al gen de luciferasa desestabilizada (lucCP⁺). Las proteínas fusión GAL4_{DBD}-Pdr_{LBD} reconocen las secuencias UAS de GAL1_{UAS}-lucCP⁺. Cuando los compuestos xenobióticos entran en la célula y son reconocidos por el dominio Pdr_{LBD} se produce la activación, y se observa actividad luciferasa, cuantificándola en luminómetro.

Para comprobar la expresión de las proteínas fusión Gal4_{DBD}-Pdr_{LBD} codificadas por el plásmido pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr realizamos un ensayo *Western Blot* (Figura 30), ya que este plásmido contiene un epítipo c-myc que permitía detectar la proteína con un ensayo de inmunoprecipitación. En este experimento se emplearon cepas de levadura con fondo genético W303-1A con el gen *GAL4* deletado (*Δgal4*) para aumentar la actividad luciferasa evitando que la proteína endógena Gal4 compita con nuestra proteína de fusión. Estas células de levadura fueron transformadas con los plásmidos pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr y se verificó que la expresión de nuestras proteínas era correcta en todos los casos.

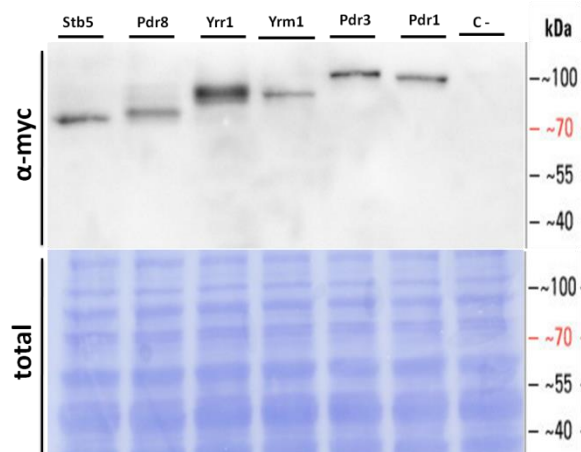


Figura 30. Comprobación de la expresión constitutiva de proteínas de fusión Gal4^{DBD}-Pdr^{LBD} con *western Blot*. Se utilizó la cepa de levadura *Δgal4* expresando con la proteína fusión del factor de transcripción Pdr indicado. Se detectaron las proteínas mediante *western blot* con anticuerpo monoclonal anti-myc (α -myc) y se comparó con la respectiva carga total de proteínas (total).

4.1. Análisis bioinformático.

En primer lugar quisimos estudiar a nivel de secuencia proteica la relación entre los factores de transcripción Pdr de la familia GAL4 que participan en la respuesta multidroga (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5). Se conoce que esta familia de factores de transcripción contiene un *cluster* de Zinc del tipo Zn₂Cys₆ de unión a ADN (DBD) que se encuentra conservado (Kolaczowska *and* Goffeau, 1999), pero apenas hay información sobre la similitud entre dominios de reconocimiento de los xenobióticos (XBD). A pesar de ello, la mayoría de estudios y revisiones sugieren que estos dominios pueden variar y estar menos conservados entre los factores de transcripción, de forma que se aumente la especificidad y el número de compuestos reconocidos.

En primer lugar, se realizó un alineamiento entre las secuencias proteicas de los factores de transcripción más estudiados, Pdr1 y Pdr3. Para ello se empleó la herramienta *Blast* para proteínas de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se obtuvo un alineamiento con un 34% de similitud de secuencia. A continuación, quisimos comparar ambos factores a nivel de los dominios descritos. Como hemos dicho anteriormente, el DBD está conservado y descrito, pero no así el XBD. Thakur *et al.*, 2008, realizaron un estudio de estos dos factores en respuesta a azoles, y describieron experimentalmente una región de reconocimiento a estos compuestos. Por ello, decidimos realizar un alineamiento entre las regiones XBD descritas en este estudio para Pdr1 (aa352-543) y Pdr3 (aa290-420) (Figura 31). Además, también comparamos las regiones DBD conservadas de estos factores (Figura 32). El resultado obtenido fue una similitud de secuencia del 37% en el dominio XBD, mientras que la similitud en la región DBD fue del 69%. Esto corrobora la suposición de que las regiones XBD no se encuentran muy conservadas para poder permitir la promiscuidad y diferencias de especificidad entre los factores de transcripción.

Resultados

```

Pdr1 362 VALVINHLPPQPFVRNITGISNSELLSEMNDISMFGILLKMLDMHKNSYQNFLMEITSNP 421
      V VI+ LPQPF+++ITG + ++L+ +++ SMF I+ +M H+ + FL + S P
Pdr3 331 VISVIHQLPQPFIQSITGFTTQLIENLHDSFSMFRIVTQMYAQHRKRFAEFLNQAFSLP 390

Pdr1 422 SVAKNTQSIDVLQEFIHQCAGEALIALCYSYYNSTL 458
      K+ VL F +C + L LCY+YYN TL
Pdr3 391 HQEKS----VL--FSSFCSSSEYLLSTLCYAYYNTL 420
    
```

Figura 31. Comparación de la secuencia aminoacídica de la región XBD de Pdr1 y Pdr3. Alineamiento de las secuencias proteicas de la región XBD de Pdr1 (aa352-543) y Pdr3 (aa290-420) con la herramienta *Blast* del NCBI.

```

Pdr1 40 SKVSKACDNCRRKRIKCNKGKFPKASCEIYSCECTF 74
      SKVS AC NCRKRRIK GK+PC +C Y C C F
Pdr3 9 SKVSTACVNCRRKRIKCTGKYPCTNCISYDCTCVF 43
    
```

Figura 32. Comparación de la secuencia aminoacídica de la región DBD de Pdr1 y Pdr3. Alineamiento de las secuencias proteicas de la región DBD de Pdr1 (aa40-77) y Pdr3 (aa9-49) con la herramienta *Blast* del NCBI.

No hay mucha información detallada sobre los dominios XBD del resto de factores de transcripción implicados en la respuesta multidroga, pero quisimos conocer un poco mejor la relación filogenética entre ellos previamente a su estudio. Para ello, realizamos un alineamiento de secuencia proteica empleando la herramienta web CLUSTALW (Figura 33) y posterior representación del árbol filogenético (Figura 34).

```

PDR1 1 -----MRGLTPKNGVHIETGPDTESSADSS-----NFSTGFSKIRKPSKIVSKAID
PDR3 1 -----MVKKSTRSKIVSTAGV
PDR8 1 -----MDGSHPMKSTTGEPVSGKKGKRKVIKSGA
YRM1 1 -----MSKRGS-LQDRASPSEE-TKKAQKRKPIKSGA
YRR1 1 MKRRSDALLGSF--QATNVTPPSDMSNSTAGG-AN-GSNSGTP-TSTGKKRNLKISGG
STB5 1 -----MDGP-----NFAH-----GGRSQRTTELYSGA

PDR1 48 NCRKRRIKCNKGKFPKASCEIYSCECTGTRGGARINLHKTSLEGTTVQVKEETDSS
PDR3 17 NCRKRRIKCTGKYPCTNCISYDCTGVFLKHLKPKQKESQ--SLPTTAVAPPS----S
PDR8 33 FCRRKRLKESQARPMQEQVIRKLPQCVYTEFNYPPLSNIT----ELFEQVPI-----
YRM1 33 FCRRKRLKESQARPMQEQVIRKLPQCVYTEFNYPPLSNIT----ELFGSTPI-----
YRR1 56 FCRRKRLKESQARPMQEQVIRKLPQCVYTEFNYPPLSNIT----ATYGPYPPI-----
STB5 24 RCRRLKIKGKQIPTCANMDKNGA-HCSVPGHAPRRTKKELADAMLRGEVYVYKRNKKVGG

PDR1 106 STSFSNPQRCTDGPQCAVE-----QPTKFF----ENFKLGGRSSGDNSGSDG--KNDDVV
PDR3 69 HANVEASADVQLHDTAIK-----LDNQYFKLMDLIQTVPVSPATHAPDT--SNMPTN
PDR8 81 ---VALVQKIEIENLQTLKEN----DMNNAKPV---YCRSS-----
YRM1 81 ---IELLKRIEDELKRLDDKELTEKDV-----
YRR1 104 ---ADLLKVEELENKIRILEAEKNTNSSASSM---YTSNFPPLGTSVGRG-----
STB5 83 KSPLSTKS---MP-----NSSSPLSANGAITPGFSPYENDDAHKHKQLKPSD

PDR1 154 NRNGFYEDDESQATLTSQTTLKHLKEMA---HLGTHVTSIAIESIELQI----SOLLK
PDR3 121 DMNLFKDDSKYQNLVTVQHILTNLYALP---PCD-DTQLLIDKTKSQL---HILIN
PDR8 111 -----EIIPLRSLRTSV-----LG-----DINGSRY
YRM1 105 -----ALSTSPFRINPYANFYLLQ----CK-----GSGRRI
YRR1 150 -----STETSPLPDGVINPYADRYLLQ----SK-----HSGRST
STB5 127 PINLVMGASPNSSSEGVSSLSVLTSLNDNSNPSHLSNENSMIPSRSLPASVQSSSTTS

PDR1 206 RIEPKVRTKELATTIFYPNKSIEYQLIKNKYCVVHLTRYAA--WSNKKD----QDTS
PDR3 172 SHNPEINVPKLSFSFPRPQRSIETYLITNKYRIKIHMTFRFSF--WTDQNKVQSQSPDSFLA
PDR8 130 VEGP-----TSWKTLSLFEQNKIQTEFQNLKWLKPLP-----ECTKSQNL
YRM1 131 VYGP-----TSLRTHLSNDDNREVNTYNQLWSVKIERNRHKARHKWTHKPEIQLL
YRR1 181 LYGP-----TSMRTQIANSNMGFEIKYKQLWAKVKVERNKKQNNQKTHCRELGLL
STB5 187 SEGG-YNTPSPLISHPANAQAVP-LQNNRNTSNGDNGSNVNDNNGSTNT--PQLS

PDR1 259 SQPLIDE--IFGLYS--PF--QFLSLQIGKCFQNYRSKSKCEIFPRTAKETIYIMLRF
PDR3 230 TPLVDE--VFGLFS--PI--QAFSLRGIYGLIKKNIENIGSS-MLIDTKETIYLILRFL
PDR8 171 E-----N--DIVADLPSFPQMESCEK-----SFF
YRM1 182 EGPPLKKT-GSDILO--QVGNVLPSEFQSSKIIT-----DFF
YRR1 232 DESDN--Q--PDPLIK--QICRFLPSYKALSIID-----DFF
STB5 243 LTPYANNAPNGKFDSPVVDASSIEFETMSCEKGGRTTSWVREDGFSKSIDRSLLDRE
    
```



Figura 33. Comparación de las secuencias proteicas de factores de transcripción Pdr. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas de los factores de transcripción Pdr mediante programa CLUSTALW. En rojo se indica la región Zn-cluster DBD, y en verde se indica la principal región XBD. Los aminoácidos conservados están marcados en gris.

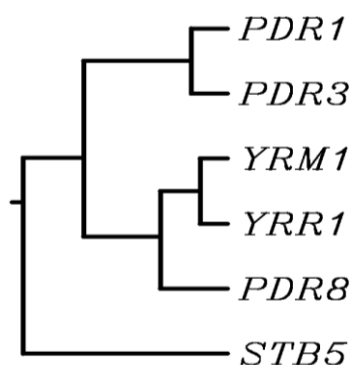


Figura 34. Representación filogenética de factores de transcripción Pdr.

En la representación del árbol de similitud de secuencia proteica entre los factores de transcripción Pdr (Figura 34), se observa cómo estos factores se agrupan entre sí formando tres “grupos”: 1) Pdr1 y Pdr3, 2) Yrm1, Yrr1, y Pdr8, y 3) Stb5.

Tras hacer este estudio previo a nivel de secuencia de los factores de transcripción pasamos a analizar experimentalmente la capacidad de reconocimiento de estos factores a determinados compuestos.

4.2. Estudio del reconocimiento y activación por compuestos químicos de los factores Pdr.

Estudios previos han mostrado la capacidad de los factores de transcripción Pdr para reconocer y unirse directamente a diversos azoles (Thakur *et al.*, 2008). En este trabajo, quisimos desarrollar un sistema experimental que nos permitiese determinar las sensibilidades y selectividades de la familia Pdr ante diversos xenobióticos. Las células del mutante $\Delta gal4$ transformadas con ambos plásmidos (pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr y pAG413-GAL1_{UAS}-lucCP⁺) fueron sometidas a distintos rangos de concentraciones de citrinina (Figura 35), ocratoxina A (Figura 36), menadiona (Figura 37), y peróxido de hidrógeno (Figura 38).

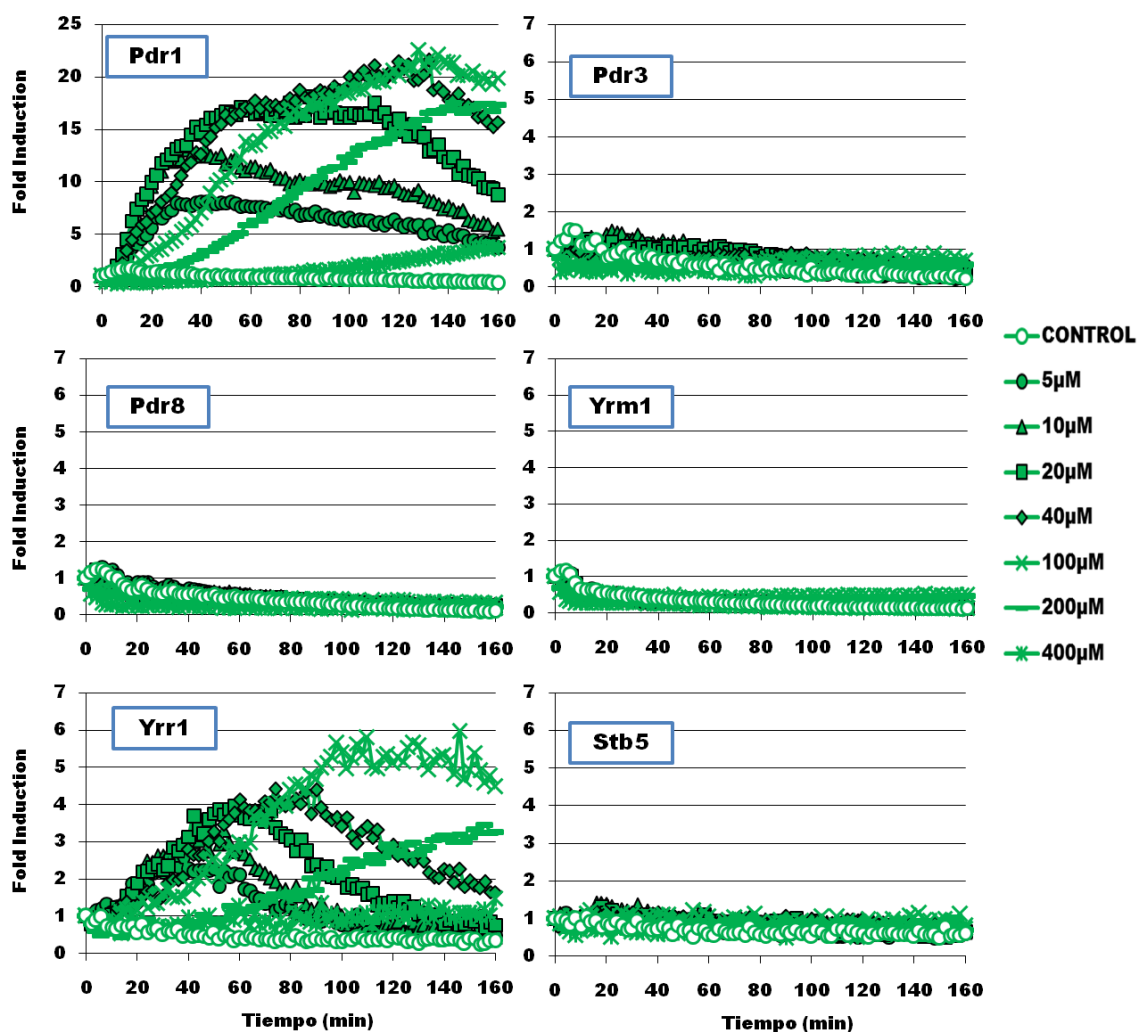


Figura 35. Comparación de perfiles de activación por citrinina de los factores de transcripción Pdr. Las células *Δgal4* con los plásmidos pAG413-GAL_{UAS}-lucCP⁺ y pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr específico para cada factor Pdr (*Pdr1*, *Pdr3*, *Pdr8*, *Yrm1*, *Yrr1* y *Stb5*) se sometieron a un rango de concentraciones de citrinina (0, 5, 10, 20, 40, 100, 200, y 400μM) y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

Los resultados en el tratamiento con citrinina (Figura 35) mostraron que dos factores de transcripción Pdr, *Pdr1* e *Yrr1*, participarían en el reconocimiento de la toxina y activación del proceso de adaptación celular a ésta, siendo *Pdr1* el regulador con mayor inducción de los dos.

Resultados

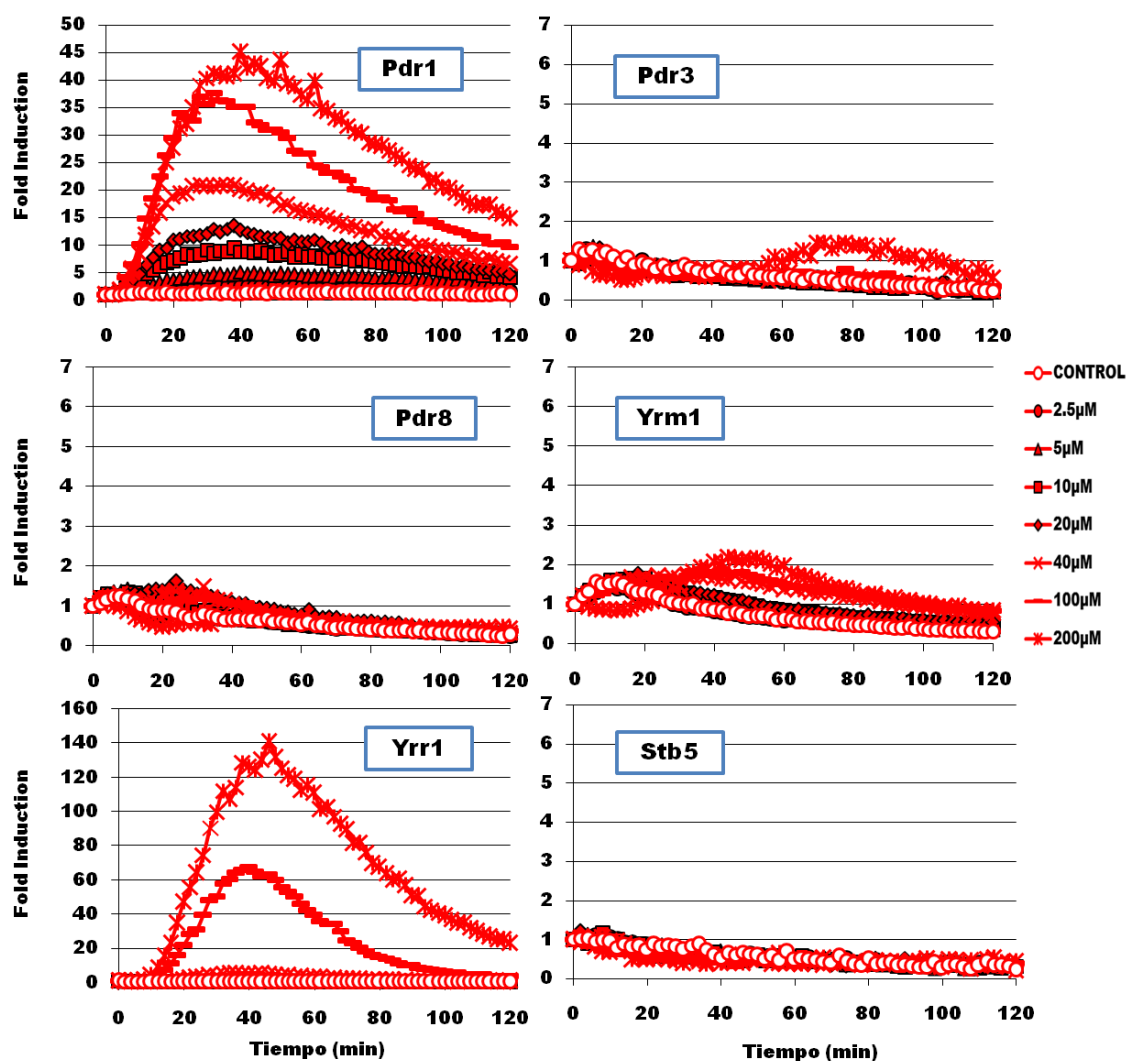


Figura 36. Comparación de perfiles de activación por ocratoxina A de los factores de transcripción Pdr. Las células *Δgal4* con los plásmidos pAG413-GA1_{L_{UAS}}-lucCP⁺ y pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr específico para cada factor Pdr (*Pdr1*, *Pdr3*, *Pdr8*, *Yrm1*, *Yrr1* y *Stb5*) se sometieron a un rango de concentraciones de ocratoxina A (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100, y 200µM) y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

En el caso del tratamiento con OTA (Figura 36), de nuevo, Pdr1 e Yrr1 mostraron los niveles de inducción más altos, pero, mientras que Pdr1 parece presentar una sensibilidad similar tanto para citrinina como ocratoxina A, Yrr1 parece ser capaz de discriminar entre ambas toxinas, presentando mayor sensibilidad a OTA, especialmente en las concentraciones más elevadas. Pero además de estudiar si estos factores Pdr eran capaces de activarse al tratar las células con micotoxinas, quisimos comprobar su capacidad de reconocimiento y activación por otros compuestos químicos relacionados con estrés oxidativo: menadiona y peróxido de hidrógeno.

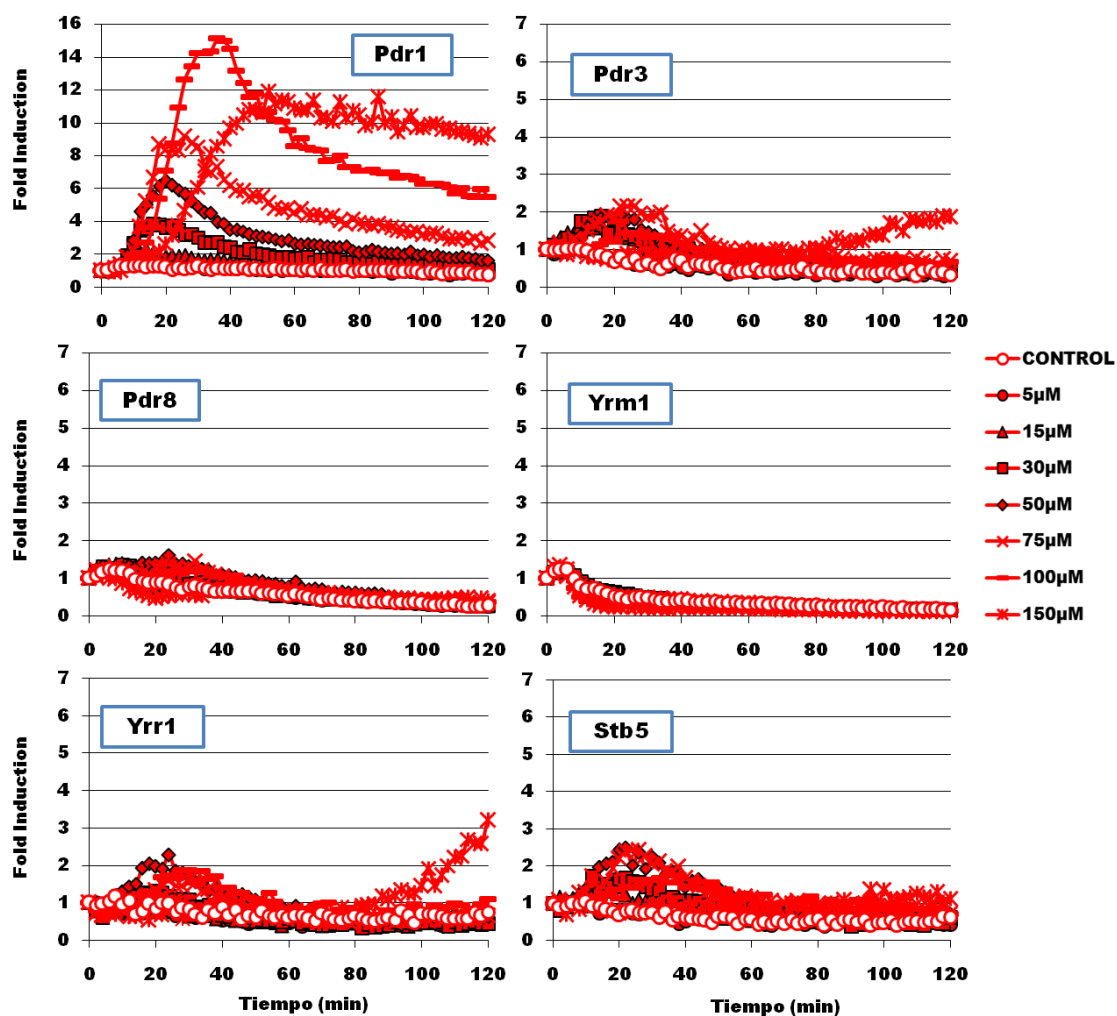


Figura 37. Comparación de perfiles de activación por menadiona de los factores de transcripción Pdr. Las células *Δgal4* con los plásmidos pAG413-GAL_{UAS}-lucCP⁺ y pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr específico para cada factor Pdr (*Pdr1*, *Pdr3*, *Pdr8*, *Yrm1*, *Yrr1* y *Stb5*) se sometieron a un rango de concentraciones de menadiona (0, 5, 15, 30, 50, 75, 100, y 150 μM) y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

Los resultados para el tratamiento con menadiona (Figura 37) mostraron inducción en *Pdr1*, saturándose a una concentración de 100 μM, mientras que en el caso del tratamiento con H₂O₂ (Figura 38) apenas muestra inducción. Por su parte, *Stb5* muestra una inducción leve con menadiona, pero sí observamos actividad con peróxido de hidrógeno.

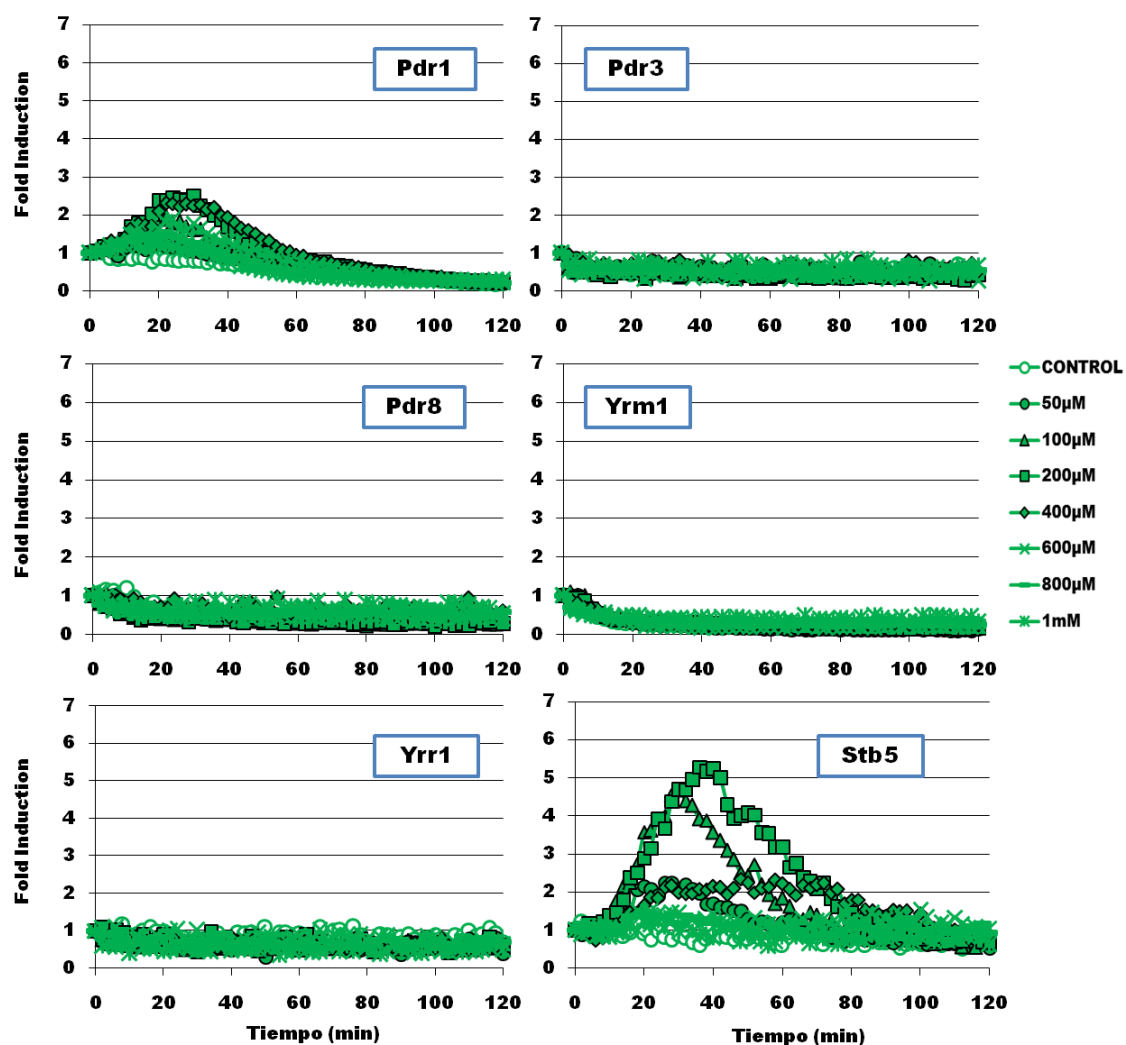


Figura 38. Comparación de perfiles de activación por H_2O_2 de los factores de transcripción Pdr. Las células *Δgal4* con los plásmidos pAG413-GAL_{UAS}-lucCP⁺ y pGBKT7-Gal4_{DBD}-Pdr específico para cada factor Pdr (*Pdr1*, *Pdr3*, *Pdr8*, *Yrm1*, *Yrr1* y *Stb5*) se sometieron a un rango de concentraciones de H_2O_2 (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 μ M, y 1mM) y se cuantificó la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*).

Los resultados de los cuatro tratamientos mostraron cómo *Pdr1*, aunque en menor proporción cuando las células son sometidas a H_2O_2 , es capaz de reconocer y activar la expresión de proteínas en respuesta a todos los tratamientos, demostrando un alto grado de promiscuidad. A continuación, y para analizar los perfiles dosis-respuesta obtenidos de forma más detallada representamos los máximos de inducción de los distintos factores y tratamientos frente a la concentración (Figura 39).

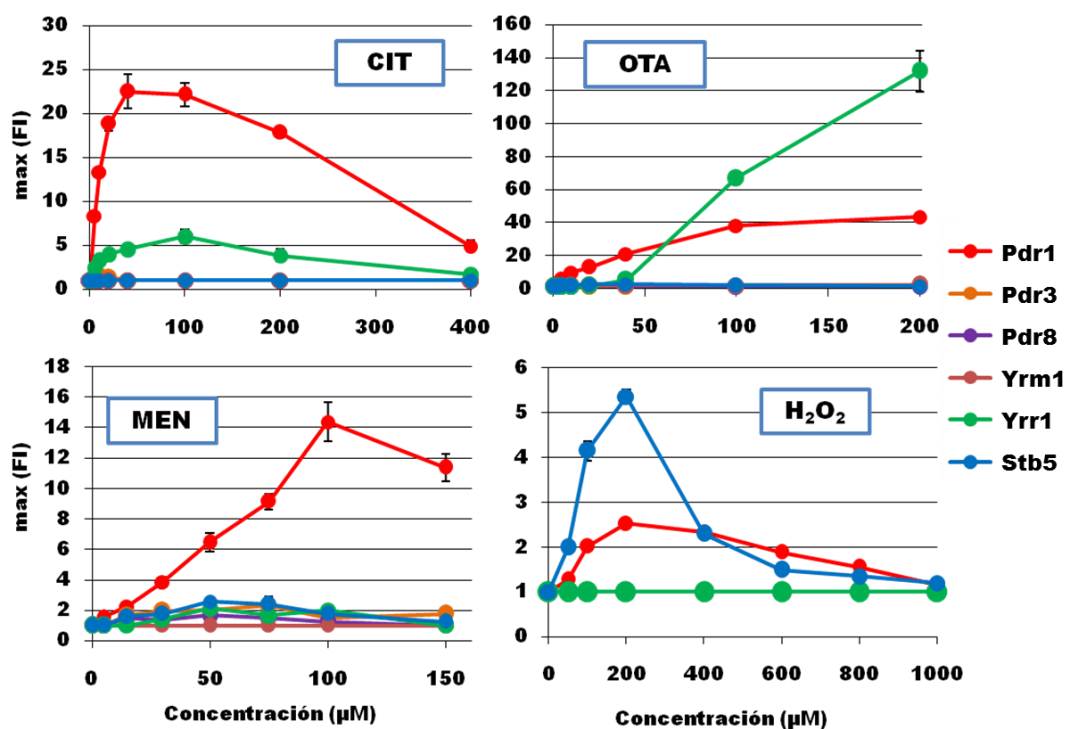


Figura 39. Comparación de los perfiles dosis-respuesta entre los factores transcripcionales Pdr en respuesta a diferentes xenobióticos. Representación de los valores máximos de inducción de los factores Pdr indicados en las células de levadura *Δgal4* tratados con un rango de concentraciones de citrinina (CIT) (0, 5, 10, 20, 40, 100, 200, y 400µM), ocratoxina A (OTA) (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100, y 200µM), menadiona (MEN) (0, 5, 15, 30, 50, 75, 100, y 150µM), y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800µM, y 1mM) y cuantificando la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*). Los valores máximos de inducción (FI) se representan frente a la concentración.

Al estudiar en conjunto los resultados de los experimentos luciferasa con los seis factores Pdr utilizados (Figura 39 y Figura 40) se observó que Pdr1 parece ser el factor principal, participando en mayor o menor medida en todos los tratamientos empleados. Pdr1 se activó de forma similar con citrinina y ocratoxina A, y de la misma forma parece ser el principal factor al someter las células a distintas condiciones de menadiona. Por el contrario, aunque se observó inducción en el tratamiento con peróxido de hidrógeno, ésta era muy leve. Entre el resto de factores Pdr, Yrr1 y Stb5 parecen ser los únicos con algún papel en la activación transcripcional de genes de defensa para alguno de los tratamientos estudiados. Yrr1 parece participar, junto con Pdr1, en la activación de la respuesta adaptativa a citrinina y ocratoxina A, aunque discriminando entre ambas drogas. Este factor presenta una inducción menor con CIT que con OTA, y además, se satura antes con la primera. De hecho, se observaron niveles de inducción bastantes elevados en el tratamiento con OTA a mayores concentraciones. Por su parte, Stb5 mostró actividad principalmente, aunque no muy elevada, en el tratamiento con peróxido de hidrogeno, y una inducción muy leve con menadiona.

Resultados

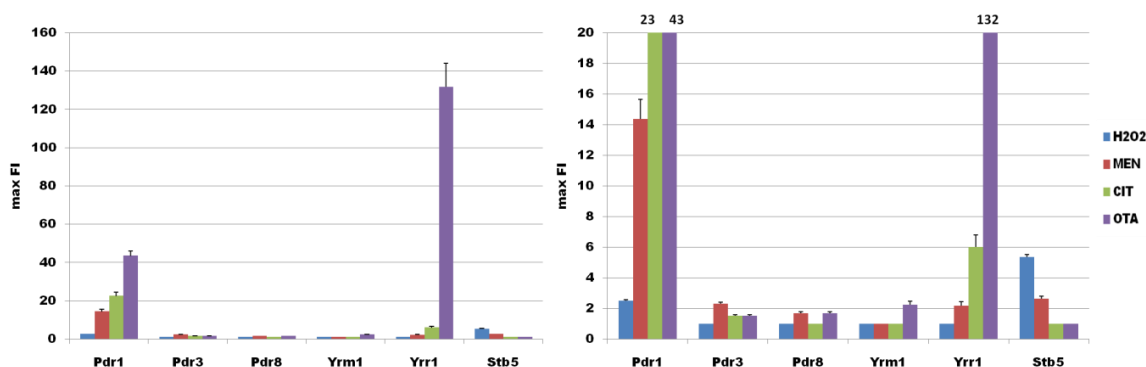


Figura 40. Comparación de los valores de inducción máxima entre los factores transcripcionales Pdr en respuesta a diferentes xenobióticos. Representación de los valores máximos de inducción de los factores Pdr indicados en las células de levadura *Agal4* tratados con un rango de concentraciones de citrinina (CIT) (0, 5, 10, 20, 40, 100, 200, y 400 μ M), ocratoxina A (OTA) (0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100, y 200 μ M), menadiona (MEN) (0, 5, 15, 30, 50, 75, 100, y 150 μ M), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 μ M, y 1mM) y cuantificando la actividad luciferasa con luminómetro por triplicado. Los resultados se muestran en niveles de inducción (*Fold induction*). Los valores máximos de inducción (FI) se representan frente a los distintos factores de transcripción.

Por tanto, en esta parte de la presente tesis, se analizaron, por un lado los transportadores multidroga Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1, y por otro, los factores de transcripción Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5, en respuesta a diversos tratamientos xenobióticos.

Los transportadores multidroga estudiados tienen una respuesta diferencial en función del compuesto estudiado y el transportador. Pudimos comprobar que Pdr5 y Snq2, son los más activos de los cuatro y suelen tener una respuesta rápida en los primeros instantes. Por el contrario, *PDR15* también parece inducirse ante los xenobióticos estudiados, pero en niveles menores y como un actor secundario. Por su parte, *YOR1* se induce muy poco ante CIT y OTA, y nada con menadiona y peróxido de hidrógeno. Además, cabe destacar, que sólo Snq2 muestra actividad en el tratamiento con H_2O_2 , lo que pudiera tener relación con ser regulado con el factor de transcripción Stb5. De hecho, este factor de transcripción, ha sido el único que ha mostrado una activación significativa ante dicho compuesto, corroborando que participa en la respuesta ante estrés oxidativo.

Entre los factores de transcripción estudiados cabe destacar la importancia y promiscuidad de Pdr1. Este regulador participa en todos los tratamientos estudiados, aunque en menor medida ante peróxido de hidrógeno. Además, hemos comprobado que se encarga de la regulación de Pdr5, Pdr15, y Snq2 en tratamiento con CIT. De la misma manera, se ha podido observar que es el regulador principal en la respuesta ante CIT y OTA a través de los elementos PDRE. A pesar de ser considerado uno de los factores de transcripción principales en respuesta a xenobióticos, Pdr3 no parece tener una participación muy activa en la defensa ante las micotoxinas CIT y OTA, ni los oxidantes menadiona y peróxido de hidrógeno. Del resto de factores de transcripción estudiados, destacan Yrr1 en la respuesta a CIT y OTA, y Stb5 en la respuesta a H_2O_2 . Yrr1 ha mostrado actividad en ambas toxinas, pero parece ser capaz de discriminar entre

ambas, e inducir una gran activación ante OTA. Por su parte, Stb5, como se ha comentado anteriormente reconoce e induce la activación transcripcional ante H₂O₂. Pdr8 e Yrm1 no parecen tener gran participación en la respuesta de adaptación a estos compuestos, excepto como posibles reguladores negativos en respuesta al tratamiento con citrina a través de los elementos PDRE.

Por último, además de estudiar el papel de estos componentes del sistema PDR, también hemos desarrollado un sistema binario que nos ha permitido revelar las sensibilidades de los factores de transcripción Pdr específicamente, a distintas condiciones de estreses. Esta técnica nos puede servir para conocer más ampliamente y de forma rápida y sencilla, la participación a nivel individual de cada factor ante un amplio número de compuestos xenobióticos, como otras toxinas o fármacos.

DISCUSIÓN

La respuesta a xenobióticos permite a la célula a adaptarse y sobrevivir a la exposición ante gran variedad de compuestos exógenos, como toxinas o fármacos. En esta respuesta participan distintos tipos de proteínas, como transportadores de membrana, enzimas detoxificadoras, o factores de transcripción. En este trabajo nos hemos centrado en el papel de un conjunto de proteínas de las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que participan en la respuesta multidroga (MDR) o respuesta pleiotrópica a drogas (PDR). Los compuestos químicos estudiados fueron toxinas, concretamente las micotoxinas citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA), y otros dos compuestos químicos relacionados con la producción de estrés oxidativo, específicamente menadiona (MEN) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 41).

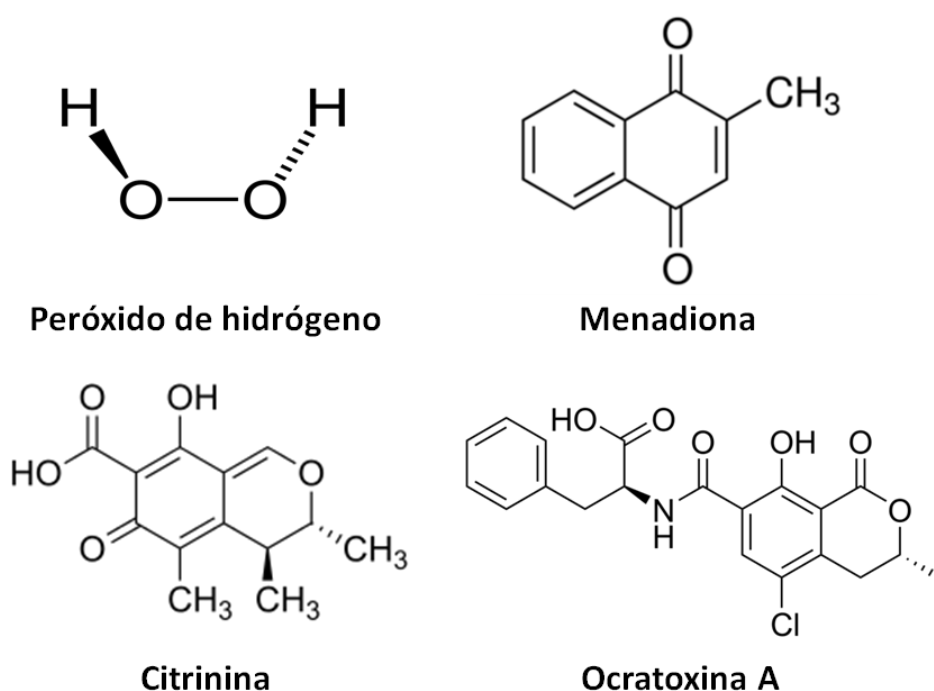


Figura 41. Estructura molecular de peróxido de hidrógeno, menadiona, citrinina, y ocratoxina A.

En la primera parte de este trabajo nos hemos centrado en tratar de comprender mejor cuales son los mecanismos de toxicidad de las micotoxinas citrinina y ocratoxina A. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos, muy diversas entre ellas y que pueden ser dañinas para el ser humano (Bennet *and* Klich, 2003). Entre este grupo tan variable de moléculas tóxicas se encuentran citrinina (CIT) y ocratoxina A (OTA). Para conocer mejor sus mecanismos de toxicidad empleamos la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Las células de levadura son un modelo excelente para estudiar la respuesta adaptativa a xenobióticos ya que han desarrollado sistemas de adaptación a estrés ambiental muy eficientes que activan rápidamente la transcripción de genes de defensa. CIT y OTA producen cambios importantes y rápidos en la expresión génica de levadura, por lo que la respuesta transcripcional de las células ante estas toxinas puede compararse de forma cuantitativa a tiempo real con distintos reporteros específicos, y también a nivel genómico.

En estudios anteriores (Pascual-Ahuir *et al.*, 2014) observamos cómo CIT era capaz de inducir rápidamente y de forma transitoria la activación de ciertos promotores de respuesta a estrés, y la posible implicación de proteínas de respuesta a estrés oxidativo y resistencia multidroga. Continuando con lo observado anteriormente, estudiamos la respuesta no sólo a CIT sino también a OTA en estos mismos promotores, puesto que ambas suelen presentarse juntas y en distintas ocasiones se ha indicado que pudieran tener un efecto sinérgico (Klaric *et al.*, 2013) y sus mecanismos de toxicidad podrían estar ligados a la producción de estrés oxidativo (Sorrenti *et al.*, 2013). Los resultados mostraron que ambas toxinas inducían una respuesta en los promotores estudiados, pero de forma diferencial, mucho menor en OTA. Aunque no tenemos datos cuantitativos, podemos suponer que esto es debido a la diferente implicación de estos promotores ante las micotoxinas y no a una menor acumulación en el interior de la célula de OTA, ya que observamos una rápida inducción y niveles de saturación a menores concentraciones. Por tanto, esto indicaría que los mecanismos de la activación génica de CIT y OTA no son los mismos. Además, contrariamente a lo esperado, no observamos efectos sinérgicos entre las dos micotoxinas, al no producirse aumento en la expresión génica ante la presencia de ambas.

Una estrategia de defensa en la detoxificación celular ante xenobióticos y otros compuestos tóxicos es la activación de transportadores de la membrana plasmática (Jungwirth *and* Kuchler, 2006). Pdr5 es uno de los transportadores de membrana en respuesta a xenobióticos más importante. Al estudiar y comparar los reporteros anteriormente empleados en mutantes defectuosos en la producción de este transportador, se comprobó que tenía un papel en la detoxificación celular de CIT y OTA, ya que estos mutantes respondían de forma más sensible ante ellas, con una clara inducción incluso en concentraciones menores. Esto podría ser debido a la acumulación de la toxina en el interior de la célula, ya que no podría eliminarla eficientemente.

Tras comprobar la alta sensibilidad de las células defectuosas para Pdr5, se empleó este mutante para realizar un experimento a nivel transcriptómico. Los tiempos y concentraciones fueron seleccionados a partir de los experimentos previos para tratar de optimizar el experimento, ya que son puntos críticos para la obtención de buenos resultados. Esto nos permitió identificar gran número de genes que respondían positivamente a la exposición a CIT y OTA, pero distintos en función del tratamiento. Este resultado indicaría que la reprogramación transcripcional que sucede tras exponer las células a estas toxinas es distinta en función de la micotoxina, es decir, que posiblemente la forma en que dañan a la célula sea diferente, ya que desencadenan la activación de estrategias de defensa distintas.

Citrinina induce la expresión de muchos genes, entre los cuales sobresalen los incluidos en los grupos funcionales de “transporte de drogas” y “respuesta a estrés oxidativo”. Algunos de los genes más inducidos son codificantes de transportadores multidroga (*FLR1*, *ATR1*, *SNQ2*, *PDR15*, *PDR10*, *PDR16*, y *YOR1*), mayoritariamente localizados en la membrana plasmática. Lo que podría significar que gran parte del mecanismo de detoxificación celular de CIT, al menos en los primeros instantes, está basado en la

eliminación de esta toxina de la célula. Estos datos se corresponderían con lo observado en los otros experimentos realizados con mutantes con pérdida de función, donde se detectó sensibilidad por parte de Pdr5, Snq2, y en menor medida, Yor1, al ser tratados con CIT. Además, habría que recordar que en el ensayo transcriptómico empleamos un mutante *Δpdr5*, por lo que algunos genes, de forma compensatoria podrían inducirse en mayor medida, mostrando un fenotipo menor en otros experimentos con CIT. Éste podría ser el caso con Yor1, puesto que se ha visto anteriormente que este transportador, junto con Pdr5 y Snq2, presentan actividad compensatoria en la defensa a drogas cuando alguno de ellos no es funcional (Kolaczowska *et al.*, 2008). Por su parte, OTA no parece producir un gran impacto en el transporte multidroga, ya que sólo se induce *SNQ2* y en menor intensidad que con CIT.

Ocratoxina A induce la activación de genes de grupos funcionales ligados a procesos de desarrollo del organismo, como la meiosis y la esporulación. Estos procesos, normales en células diploides de levadura bajo condiciones adecuadas (Govin *and* Berger, 2009; Winter, 2012), se encuentran reprimidos en células haploides como las empleadas en este trabajo. Esta represión génica es controlada epigenéticamente por factores específicos de unión a ADN que reclutan histona-desacetilasas como la sirtuina Hst1 en los genes de meiosis y esporulación (Grunstein *and* Gasser, 2013). Se desconoce cómo es el proceso de interferencia en este silenciamiento génico por parte de OTA, pero este mecanismo parece formar parte de la reprogramación génica en células cancerígenas (Chalkiadaki *and* Guarente, 2015), por lo que podría estar implicado en el posible efecto carcinogénico de ocratoxina A.

Citrinina y ocratoxina A han sido relacionadas con la producción de estrés oxidativo, especialmente en mamíferos (Sorrenti *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2011; Pascual-Ahuir *et al.*, 2014). Los resultados de este trabajo mostraron que el mecanismo de toxicidad más predominante en los tratamientos con CIT era la inducción de estrés oxidativo. Tanto los reporteros luciferasa específicos de estrés como los mutantes defectuosos en la defensa antioxidante estudiados demostraron gran sensibilidad a esta micotoxina. Además, en el ensayo transcriptómico, como hemos comentado anteriormente, se activaron genes incluidos en grupos funcionales de respuesta a estrés oxidativo, y también, más concretamente, a especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que sugiere que la producción de ROS es la principal causa de estrés oxidativo en los tratamientos con CIT. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otro estudio transcriptómico realizado previamente con citrinina en levadura (Iwahashi *et al.*, 2007). Por su parte, OTA parece depender menos de la producción de estrés oxidativo para producir daño a las células. Tanto en el ensayo transcriptómico como en los experimentos con los reporteros luciferasa se observó una menor activación de genes implicados en esta respuesta, y con menor sensibilidad que con CIT. Por tanto, no parece que el estrés oxidativo sea el mecanismo de toxicidad primario, coincidiendo con algunos estudios en mamíferos donde se indica que el daño producido por OTA no podría ser explicado por daño oxidativo (Gayathri *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2014). Aún así, OTA, al igual que CIT, produce la inducción de diversos genes implicados en la defensa antioxidante, aunque

éstos son distintos. OTA, por ejemplo, activa la expresión de catalasas mitocondriales/peroxisomales (Ctt1 y Cta1), mientras que CIT estimula las funciones enzimáticas implicadas en el metabolismo del glutatión (Ecm4, Glr1, Gtt2, y Grx2). Las diferencias observadas podrían significar que estas micotoxinas producen distintos tipos de especies ROS, de forma que la respuesta adaptativa celular es diferente.

Los resultados de este trabajo muestran que citrinina y ocratoxina A inducen distintas estrategias de defensa en las células, lo que sugiere mecanismos de toxicidad distintos. CIT parece causar estrés oxidativo como principal estrategia, mientras que OTA parece activar genes que normalmente se encuentran silenciados, como la esporulación.

Como hemos visto, los genes codificantes de transportadores multidroga se inducen rápidamente cuando son expuestos a CIT y, en menor medida, OTA. Estas proteínas de membrana están consideradas una primera estrategia de detoxificación de la célula al expulsar los compuestos dañinos, principalmente exógenos, de ésta (Jungwirth *and* Kuchler, 2006). En levadura, los transportadores multidroga de la membrana plasmática que eliminan estos compuestos de la célula forman parte del denominado sistema PDR (*pleiotropic drug resistance*).

El sistema PDR de levadura confiere a las células tolerancia a un amplio número de compuestos químicos exógenos así como a algunos compuestos tóxicos endógenos al expulsarlos fuera de éstas. Este sistema está compuesto por proteínas conservadas de bacterias a humanos, entre ellos, transportadores multidroga, pero también otro tipo de proteínas como factores de transcripción que se encargan de regular su expresión. En ocasiones, estos transportadores se encuentran sobreexpresados, lo que da lugar a un fenómeno conocido como resistencia pleiotrópica a drogas (PDR) o resistencia a múltiples drogas (MDR), de donde procede el nombre para este conjunto de proteínas. Este proceso de resistencia es de gran importancia en diversos tratamientos médicos, como quimioterapia en cáncer, o antifúngicos, ya que disminuyen su eficiencia (Holohan *et al.*, 2013; Paul *and* Moye-Rowley, 2014). Por esto, estudiar el funcionamiento de este sistema es necesario para desarrollar estrategias que permitan reducir el fenómeno de resistencia. En este trabajo quisimos conocer mejor el funcionamiento del sistema PDR en levadura, concretamente de varios transportadores multidroga (Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1) y factores de transcripción (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, y Stb5).

En primer lugar, se quiso conocer la participación de los transportadores Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1 en la respuesta a citrinina, ocratoxina A, menadiona y peróxido de hidrógeno. Anteriormente, se comprobó que estos transportadores tenían un papel, en mayor o menor medida, en el proceso de adaptación celular frente a CIT y OTA, así que decidimos conocer mejor su perfil de respuesta empleando reporteros luciferasa integrativos. Los resultados mostraron comportamientos diferenciales entre transportadores y xenobióticos. Pdr5 y Snq2 parecen ser los transportadores principales en respuesta a las moléculas estudiadas, mientras que Pdr15 y Yor1 no parecen tener una participación tan importante, con valores de actividad mucho menores o casi

inexistentes. Concretamente, al tratar las células con CIT, se observó una activación más rápida de *PDR5* y *SNQ2*, que de *PDR15* y *YOR1*. Estos datos indicarían que Pdr5 y Snq2 actúan como transportadores primarios, mientras que Pdr15 y Yor1 serían transportadores secundarios en la respuesta a CIT. Varios estudios sugieren que Pdr5 y Pdr15 actúan de forma complementaria y no solapante en la detoxificación celular bajo distintas condiciones metabólicas o fases de crecimiento (Mamnun *et al.*, 2004; Wolfger *et al.*, 2004). Los resultados en CIT parecen indicar una posible actividad complementaria, al menos entre los dos grupos de transportadores, primarios y secundarios. Por otra parte, también se observa cierto solapamiento en reconocimiento de sustrato, especialmente entre Pdr5 y Snq2, aunque con distintas sensibilidades. Estos dos transportadores reconocen multitud de xenobióticos, en muchos casos, como se ha visto en otros estudios (Kolaczowska *et al.*, 2008) solapándose y compensando defectos de función. Esta capacidad de reconocimiento cooperativa podría permitir una mayor eficiencia en la detoxificación de las moléculas tóxicas durante los primeros instantes de exposición.

La capacidad para reconocer gran número de sustratos viene dada por la especificidad de los dominios transmembrana (TMD) (Prasad *and* Goffeau, 2012), pero estudios entre transportadores con funciones similares y estructura distinta, como P-glicoproteína y Pdr5, indicaban que el comportamiento dinámico de estas proteínas, es también importante (Ernst *et al.*, 2010). Además, en tratamientos antifúngicos, la capacidad de compensación de función y solapamiento de reconocimiento de sustrato entre transportadores supone un gran obstáculo (Kolaczowska *et al.*, 2008). Esto coincide con los actuales estudios para desarrollar nuevas terapias frente a la resistencia multidroga. Estas investigaciones, al no obtener el resultado esperado con inhibidores directos de transportadores, se están centrando en disminuir la resistencia multidroga a través del control de la regulación de los transportadores, con RNA de interferencia o moduladores epigenéticos (Robey *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Por ello, conocer cómo está regulada la respuesta en MDR parece un paso fundamental.

En las células de levadura, como en otros hongos y células humanas, las moléculas tóxicas son directamente detectadas por ciertos factores de transcripción, que a su vez, activan la expresión de genes de transportadores de membrana para tratar de eliminar los agentes tóxicos del interior de la célula (Thakur *et al.*, 2008). En este trabajo, junto con el análisis y cuantificación de expresión luciferasa en promotores o sitios de reconocimiento concretos, desarrollamos un sistema binario de plásmidos que nos permitiera estudiar la respuesta a xenobióticos de varios factores de transcripción de forma individualizada. Este es posible al combinar un plásmido con las regiones de reconocimiento de sustrato (XBD) y activación (AD) (X-TAD), que se activa específicamente tras el reconocimiento del sustrato, con otro plásmido que contiene el gen de la luciferasa desestabilizada. De esta forma pudimos estudiar más concretamente la especificidad de dichos reguladores.

La expresión de los transportadores PDR está controlada por varios factores de transcripción entre los que destacan Pdr1 y Pdr3. Pdr1 y Pdr3 regulan la transcripción

de los genes diana a través de sitios de unión en el promotor del gen y que se denominan elementos PDRE. Nuestros resultados muestran que Pdr1 participa en la respuesta de todas las moléculas estudiadas, en mayor o menor medida. Este regulador transcripcional parece ser un factor imprescindible en la activación de los transportadores Pdr5, Pdr15 y Snq2 en la respuesta a CIT, ya que en el ensayo con mutantes defectuosos de función de Pdr1 no había inducción de los genes codificantes para estos transportadores. Por su parte, Pdr3 parece interactuar de forma diferencial en función del transportador, como regulador positivo en el caso de *SNQ2*, o negativo en el caso de *PDR5* y *PDR15*. De todas formas, excepto con *PDR15*, al que parece reprimir de forma más llamativa no parece tener una presencia fundamental en los otros dos transportadores. Esta capacidad de modulación de la regulación, positiva y negativa, coincide con lo descrito para estos dos factores de transcripción por Mamnun *et al.*, 2002, dónde se comprobó que Pdr1 y Pdr3 eran muy versátiles en la regulación de Pdr5, Snq2 y Yor1 a través de los sitios PDRE, formando homo- y heterodímeros. Nuestros resultados parecen coincidir con este estudio, además de incluir el transportador Pdr15. En general, podemos pensar que el mecanismo más directo de regulación negativa entre los factores de transcripción Pdr sería la competición por la unión al elemento PDRE entre un Pdr que no reconoce el xenobiótico (como Pdr3 o Yrm1) con uno que realmente lo hace.

Pdr1 también mostró un papel fundamental en la respuesta a CIT y OTA a través de los elementos PDRE en el ensayo comparativo con mutantes defectuosos de función para distintos factores de transcripción Pdr con reporteros luciferasa. De nuevo, en los mutantes $\Delta pdr1$ no había inducción de expresión luciferasa. Contrariamente, otros dos mutantes de delección presentaron altos niveles de inducción: $\Delta pdr8$ e $\Delta yrm1$. Pdr8 e Yrm1 están poco descritos. Son dos factores de transcripción Pdr, homólogos del factor de transcripción Yrr1. Además, Pdr8 parece formar parte de la regulación del transportador multidroga Yor1 (Hikkel *et al.*, 2003). Estos datos podrían sugerir una regulación negativa de Pdr8 sobre Yor1 en el tratamiento con CIT, explicando el nivel inferior de expresión con respecto al resto de transportadores.

La última aproximación experimental con los factores de transcripción del sistema PDR la realizamos desarrollando un sistema binario de plásmidos que nos permitiera analizar su respuesta a distintas moléculas tóxicas de forma individual a través de la región XBD. Esta variación con respecto a los otros ensayos luciferasa nos permite aumentar la sensibilidad y especificidad del experimento. Los resultados volvieron a mostrar la importancia de Pdr1. Este factor de transcripción volvió a aparecer activo en todos los tratamientos realizados, aunque con niveles distintos, lo que indicaría diferencias en la capacidad de reconocimiento de las distintas moléculas estudiadas. Entre el resto de factores de transcripción estudiados, cabe destacar a Yrr1 y Stb5. Yrr1 mostró inducción tanto en CIT como en OTA, pero los perfiles de la respuesta fueron distintos, indicando que es capaz de discriminar entre ambas moléculas. Hemos visto que tanto Pdr1 como Yrr1 reconocen y activan la expresión génica en respuesta a CIT y OTA, pero, sin embargo, en el estudio de los elementos PDRE, el mutante con falta de función de Yrr1

no presentó diferencias con la cepa silvestre, mientras que en *Apdr1* no había inducción. Por ello, podemos inferir que Yrr1 activa la respuesta a estas micotoxinas a través de otros sitios de reconocimiento, lo que coincidiría con estudios anteriores (Le Crom S, *et al.*, 2002). Por su parte, Stb5 fue el factor de transcripción más activo ante la presencia de peróxido de hidrógeno. Esto coincide con lo conocido hasta ahora de este factor, y es que es importante para la respuesta antioxidante de la levadura de forma aparentemente independiente del factor de transcripción Yap1 (Akache *and* Turcotte, 2002). De hecho, datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que Stb5 responde a H₂O₂ de forma más sensible que Yap1 y activa la transcripción a través de elementos PDRE independientemente de Pdr1.

Yrr1 y Stb5 son reguladores de algunos transportadores multidroga. Yrr1 está implicado en el control de Snq2 y Yor1, mientras que Stb5 se encarga de Snq2. Esto parece coincidir, parcialmente, con lo visto en la respuesta a los distintos tratamientos por parte de los transportadores. Si nos centramos en Snq2, podemos decir que se activa de forma similar a Pdr1 e Yrr1 en los tratamientos de CIT y OTA, y a Stb5 en el tratamiento con H₂O₂. Sin embargo, en el caso de Yor1, regulado también por Pdr1 e Yrr1, la respuesta es muy diferente. Estos resultados muestran, una vez más, la complejidad de los circuitos regulatorios en la respuesta multidroga. Podemos hacer varias suposiciones de porqué obtenemos estos perfiles de activación distintos. Por un lado, podría ser que algunos promotores tengan más elementos PDRE, de forma que se produzca un mayor número de interacciones entre los factores de transcripción y el promotor, pero, por otro lado, parece más probable que la afinidad por los diferentes PDRE varíe en función del factor de transcripción. Por ejemplo, si comparamos los resultados de los experimentos de los transportadores con los obtenidos empleando el sistema binario, vemos similitud en la respuesta entre ciertos transportadores y factores de transcripción, como *PDR5* y Pdr1 o *SNQ2* e Yrr1 en los tratamientos con CIT y OTA, y *SNQ2* y Stb5, con H₂O₂.

Otro dato a tener en cuenta en la regulación de la respuesta multidroga es la capacidad de algunos de estos factores a formar homo- y heterodímeros. Pdr1 y Pdr3 forman heterodímeros en muchas ocasiones (Mamnun *et al.*, 2002), y también se sabe que Stb5 está activo formando heterodímero con Pdr1 (Akache *and* Turcotte, 2002; Larochelle *et al.*, 2006). ¿Pero cuál es la función biológica? Esta conformación podría tener una función moduladora de la expresión, y de especificidad. Por un lado, se reprime la expresión, como en el caso del factor Rdr1 que forma heterodímeros con Pdr1 o Pdr3 compitiendo para unirse a los elementos PDRE (Hellauer *et al.*, 2002). Por otro lado, y siempre como una suposición, ya que no tenemos datos experimentales que lo corroboren, la formación de heterodímeros podría aumentar la especificidad y eficiencia de algunos factores de transcripción. Pdr1 es el factor de transcripción del sistema PDR más abundante, encontrándose de forma constitutiva en el núcleo alrededor de 1300 moléculas/celula, mientras que de Pdr3 y Stb5 encontramos 166 y 279 moléculas/célula, respectivamente (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Los datos presentados en este trabajo muestran que Pdr1 presenta una gran promiscuidad en reconocimiento y respuesta a distintos xenobióticos, por lo que, capaz de formar tanto homo- como

heterodímeros, podría actuar de primera respuesta, y además, aumentar la eficiencia de la respuesta celular al formar heterodímeros con factores de transcripción menos abundantes y más específicos.

Otro punto a destacar en este trabajo, fue el desarrollo de una variante del sistema luciferasa desestabilizada que nos permitiera estudiar de forma individual la activación de los factores de transcripción Pdr. Una característica importante de este sistema es que todos los factores Pdr estudiados tienen la misma afinidad de unión a ADN debido a su fusión con Gal4_{DBD}, ya que de esta forma podemos ver si hay activación sin depender de qué elementos de unión a ADN reconocen ni las diferencias de afinidad. Este sistema binario nos permitió determinar en tiempo real la sensibilidad de respuesta del sistema multidroga a diferentes moléculas, concretamente, citrinina, ocratoxina A, menadiona y peróxido de hidrógeno, y la posibilidad de ampliar el estudio a otras, como fármacos. La aplicación de gradientes complejos de fármacos de interés permitiría determinar de forma cuantitativa la sensibilidad con la cual interacciona cada fármaco con los diferentes factores Pdr del sistema multidroga. Este conocimiento forma la base para estudiar tratamientos que evitan la respuesta pleiotrópica a fármacos por potenciales inhibidores del sistema multidroga. El sistema binario se podría aplicar por tanto a estudios más biomédicos de la inhibición del sistema PDR para determinar de forma rápida y cuantitativa el grado de eficiencia de estos inhibidores.

En resumen, la resistencia multidroga supone un grave problema en el desarrollo de terapias farmacológicas a distintas patologías, ya sea cáncer, infecciones bacterianas, o enfermedades neurológicas. Aquí, hemos tratado de comprender un poco mejor el funcionamiento del sistema PDR de *Saccharomyces cerevisiae* desde los transportadores multidroga a los factores de transcripción que los regulan empleando varios xenobióticos. Pdr5 y Snq2 se han presentado como los transportadores multidroga más activos, seguidos de Pdr15. Por otra parte, los resultados mostraron el papel de Pdr1 como factor de transcripción principal en esta respuesta. Además, otros factores parecen participar de forma más específica en función del sustrato, como reguladores negativos en el caso de Pdr8, e Yrm1, como reguladores positivos, como Pdr1, Yrr1, y Stb5, o en el caso de Pdr3, como ambos. Aunque el control de Pdr1 sobre la respuesta de los transportadores a xenobióticos parece clara, todavía quedan preguntas sobre el modo en que este factor es capaz de reconocer tantas moléculas distintas y generar respuestas de defensa específicas. Por ello, pudiera ser que la cooperación con otros factores de transcripción, como los antes mencionados permitan un aumento en la especificidad de la respuesta. Lo que está claro, es que es necesario continuar estudiando esta red de regulación tan compleja que permita desarrollar nuevas estrategias más eficientes en tratamientos farmacológicos.

CONCLUSIONES

Las **conclusiones** obtenidas a partir de los resultados del presente trabajo son las siguientes:

1. Las micotoxinas citrinina y ocratoxina A inducen la expresión de genes para la defensa a estrés de forma dosis-dependiente.
2. Citrinina y ocratoxina A provocan respuestas transcriptómicas diferentes en levadura indicando mecanismos de toxicidad distintos para estas micotoxinas.
3. Citrinina induce fuertemente la expresión de sistemas antioxidantes y de transporte de drogas, y su toxicidad incrementa en mutantes con defectos en la defensa a estrés oxidativo y el transporte multidroga, como *Δyap1* y *Δsnq2*.
4. Ocratoxina A parece desreprimir genes del desarrollo, concretamente de la meiosis y esporulación, y sólo activa ligeramente la defensa antioxidante.
5. Los xenobióticos citrinina, ocratoxina A, menadiona, y peróxido de hidrógeno, activan la expresión génica de los transportadores multidroga Pdr5, Pdr15, Snq2, y Yor1 con sensibilidades distinguibles.
6. Pdr5 y Snq2 son los transportadores multidroga más expresados en presencia de citrinina, ocratoxina A y menadiona, y sólo *SNQ2* se induce en respuesta a peróxido de hidrógeno.
7. Pdr1, pero no Pdr3, es el factor de transcripción con mayor importancia para la activación de genes multidroga en respuesta a citrinina.
8. Los activadores transcripcionales del sistema PDR responden de forma diferencial a peróxido de hidrógeno, menadiona, citrinina y ocratoxina A.
9. Pdr1 es fundamental en la respuesta a citrinina y ocratoxina A a través de los elementos PDRE, y participa en la activación transcripcional en respuesta a los cuatro xenobióticos estudiados, pero en menor medida frente a peróxido de hidrógeno.
10. Yrr1 participa en la activación transcripcional de genes en respuesta a citrinina y a ocratoxina A de forma diferencial, y Stb5 produce la activación de la expresión génica ante peróxido de hidrógeno.

Conclusiones

11. El empleo de reporteros luciferasa in vivo permite describir de forma cuantitativa vías de toxicidad y selectividades de activadores del sistema multidroga en respuesta a diferentes clases de xenobióticos.

BIBLIOGRAFÍA

- Afshari CA, Hamadeh HK, Bushel PR (2011). The evolution of bioinformatics in toxicology: Advancing toxicogenomics. *Toxicol. Sci.*, **120** (Suppl. 1), S225–S237
- Akache B, MacPherson S, Sylvain MA, Turcotte B (2004) Complex interplay among regulators of drug resistance genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**(27):27855-60
- Akache B, Turcotte B (2002) New regulators of drug sensitivity in the family of yeast zinc cluster proteins. *J Biol Chem* **277**(24):21254-60
- Arbillaga L, Azqueta A, van Delft JH, Lopez de Cerain A (2007). In vitro gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **220**: 216–224
- Balzi, E., Chen,W., Ulaszewski,S., Capieaux,E., and Goffeau,A. (1987). The multidrug resistance gene *PDR1* from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 262, 16871–16879.
- Balzi E, Wang M, Leterme S, Van Dyck L, Goffeau A (1994). PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J Biol Chem.* **269**(3):2206-14.
- Bennett, JW, Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497–516
- Bouslimi A, Ouannes Z, Golli EE, Bouaziz C, Hassen W, Bacha H (2008). Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin a and citrinin: Individual and combined effects. *Toxicol. Mech. Methods* **18**, 341–349
- Bragulat MR, Martinez E, Castella G, Cabanes FJ (2008). Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *Int. J. Food. Microbiol.* **126**, 43–48.
- Cabrito T, Remy E, Teixeira M, Duque P and Sá-correia I (2011). Resistance to Herbicides in the Model Organisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana*: the Involvement of Multidrug Resistance Transporters. *Herbicides and Environment. IntechOpen*, DOI: 10.5772/13057.
- Cabrito T, Teixeira M, Singh A, Prasad R, Sá-Correia I (2011). The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multidrug resistance. *Biochem J.* **440**(2):195-202.
- Cadenas E, Davies KJA (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radical Biology & Medicine* **29** (3/4): 222-230
- Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk BC (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **22**(2):291-321

Bibliografia

Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the Cell* **12**: 323-337

Chalkiadaki, A, Guarente, L (2015).The multifaceted functions of sirtuins in cancer.*Nat. Rev. Cancer***15**:608–624

Chan WH (2007). Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem. J.* **404**, 317–326.

Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade.*Cancer Lett.***370**(1):153-64

Conte SS, Lloyd AM (2011). Exploring multiple drug and herbicide resistance in plants--spotlight on transporter proteins.*Plant Sci.* **180**(2):196-203.

Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H, Miyakawa T (1996). The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions.*J Biol Chem.* **271**(25):14712-6.

Cui Z, Shiraki T, Hirata D, Miyakawa T (1998) Yeast gene YRR1, which is required for resistance to 4-nitroquinoline N-oxide, mediates transcriptional activation of the multidrug resistance transporter gene SNQ2. *Mol Microbiol***29**(5):1307-15

de Nadal E, Ammerer G, Posas F. (2011) Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics***12**, 833-845

Dean M, Annilo T (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates.*Annu Rev Genomics Hum Genet.***6**:123-42.

Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, Goffeau A (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem***273**(20):12612-22

Delahodde A, Delaveau T, Jacq C (1995) Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol***15**(8):4043-51

Delaveau,T.,Delahodde,A.,Carvajal,E.,Subik,J.,andJacq,C.(1994). *PDR3*, a new yeast regulatory gene, is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol.Gen.Genet.* 244, 501–511.

Doi K, Uetsuka K (2014). Mechanisms of Mycotoxin-induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis through Oxidative Stress-related Pathways.*J. Toxicol. Pathol.***27**, 1–10.

- Dolz-Edo L, Rienzo A, Poveda-Huertes D, Pascual-Ahuir A, Proft M (2013) Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol Cell Biol***33**(11):2228-40
- Dos Santos SC, Teixeira MC, Cabrito TR, Sá-Correia I (2012) Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Front Genet***3**:63
- Ernst R, Klemm R, Schmitt L, Kuchler K (2005) Yeast ATP-binding cassette transporters: cellular cleaning pumps. *Methods Enzymol* **400**:460-84
- Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, Schmitt L (2010) Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps--first come, first served? *FEBS J.* **277**(3):540-9.
- Escriva L, Font G, Manyes L (2015). In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food. Chem. Toxicol.* **78**, 185–206
- Faucet V, Pfohl-Leszkowicz A, Dai J, Castegnaro M, Manderville RA (2004). Evidence for covalent DNA adduction by Ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 1289–1296.
- Flajs D, Peraica M (2009). Toxicological properties of citrinin. *Arh.Hig. Rada Toksikol.* **60**, 457–464.
- Fletcher JI, Williams RT, Henderson MJ, Norris MD, Haber M (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resist Updat.***26**:1-9
- Follmann W, Behm C, Degen GH (2014). Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro. *Arch. Toxicol.* **88**, 1097–1107
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 4241-4257
- Gayathri, L.; Dhivya, R.; Dhanasekaran, D.; Periasamy, V.S.; Alshatwi, A.A.; Akbarsha, M.A. (2015) Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. *Food Chem. Toxicol.***83**, 151–163.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature***425**(6959):737-41
- Govin J, Berger SL (2009) Genome reprogramming during sporulation. *Int J Dev Biol* **53**(2-3):425-32

Grunstein M, Gasser SM (2013) Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(7)

Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**(13):2519-24

Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, **97**: 1634-1658.

Hatzixanthis K, Mollapour M, Seymour I, Bauer BE, Krapf G, Schüller C, Kuchler K, Piper PW (2003). Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter. *Yeast*. **20**(7):575-85.

Hellauer, K., Akache, B., MacPherson, S., Sirard, E. and Turcotte, B. Zinc cluster protein Rdr1p is a transcriptional repressor of the *PDR5* gene encoding a multidrug transporter. *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 17671-17676.

Hellauer K, Rochon MH, Turcotte B (1996) A novel DNA binding motif for yeast zinc cluster proteins: the Leu3p and Pdr3p transcriptional activators recognize everted repeats. *Mol Cell Biol* **16**(11):6096-102

Hibi D, Kijima A, Kuroda K, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Nakajima M, Sugita-Konishi Y, Yanai T, Nohmi T, et al.(2013). Molecular mechanisms underlying ochratoxin A-induced genotoxicity: Global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression. *J. Toxicol. Sci.*, **38**: 57–69

Hikkel I, Lucau-Danila A, Delaveau T, Marc P, Devaux F, Jacq C (2003) A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast. *J Biol Chem* **278**(13):11427-32

Hlaváček O, Kucerová H, Harant K, Palková Z, Váchová L (2009) Putative role for ABC multidrug exporters in yeast quorum sensing. *FEBS Lett* **583**(7):1107-13

Holohan C, Schaeuble SV, Longley DB, Johnston PG (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer* **13**: 714–726

Hundhausen C, Boesch-Saadatmandi C, Matzner N, Lang F, Blank R, Wolfram S, Blaschek W, Rimbach G (2008). Ochratoxin A lowers mRNA levels of genes encoding for key proteins of liver cell metabolism. *Cancer Genom. Proteom.*, **5**: 319–332.

Iwahashi H, Kitagawa E, Suzuki Y, Ueda Y, Ishizawa YH, Nobumasa H, Kuboki Y, Hosoda H, Iwahashi Y (2007). Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. *BMC Genomics*, **8**: 95

Jamieson DJ (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1511-1527

- Jungwirth H, Kuchler K. (2006) Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett*, **580**(4):1131-8
- Katzmann DJ, Hallstrom TC, Mahé Y, Moye-Rowley WS (1996) Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene PDR5. *J Biol Chem***271**(38):23049-54
- Kihara A, Igarashi Y (2004) Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Mol Biol Cell* **15**(11):4949-59
- Klaric MS, Rasic D, Peraica M (2013). Deleterious effects of mycotoxin combinations involving ochratoxin A. *Toxins***5**, 1965–1987
- Klotz LO, Steinbrenner H (2017). Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biology***13**: 646-654
- Kolaczowska A, Goffeau A (1999) Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist Updat***2**(6):403-414
- Kolaczowska A, Kolaczowski M, Goffeau A, Moye-Rowley WS (2008) Compensatory activation of the multidrug transporters Pdr5p, Snq2p, and Yor1p by Pdr1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett***582**(6):977-83
- Kolaczowski M., Kolaczowska A., Luczynski J., Witek S. and Goffeau A. (1998) In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **4**, 143–158.
- Koszegi T, Poor M (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, **8**.
- Kumar M, Dwivedi P, Sharma AK, Sankar M, Patil RD, Singh ND (2014). Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Toxicol. Ind. Health***30**, 90–98.
- Kumar R, Dwivedi PD, Dhawan A, Das M, Ansari KM (2011). Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. *Toxicol. Sci.* **122**, 557–566.
- Larochelle M, Drouin S, Robert F, 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**(17):6690-701
- Le Crom S, et al. (2002) New insights into the pleiotropic drug resistance network from genome-wide characterization of the YRR1 transcription factor regulation system. *Mol Cell Biol***22**(8):2642-9

- Leppert G, McDevitt R, Falco SC, Van Dyk TK, Ficke MB, Golin J (1990) Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* **125**(1):13-20
- Li W, Zhang H, Assaraf YG, Zhao K, Xu X, Xie J, Yang DH, Chen ZS (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat.* **27**:14-29
- López-Maury L, Marguerat S, Bähler J. (2008) Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics* **9**, 583-893
- Löscher W, Potschka H (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* **6**(8):591-602
- Lucau-Danila A, Delaveau T, Lelandais G, Devaux F, Jacq C (2003) Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J Biol Chem* **278**(52):52641-50
- Mahé Y, Lemoine Y, Kuchler K (1996). The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. *J Biol Chem.* **271**(41):25167-72.
- Mamnun YM, Pandjaitan R, Mahé Y, Delahodde A, Kuchler K (2002) The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. *Mol Microbiol* **46**(5):1429-40
- Mamnun YM, Schüller C, Kuchler K (2004) Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett* **559**(1-3):111-7
- Mantle PG, Faucet-Marquis V, Manderville RA, Squillaci B, Pfohl-Leszkowicz A (2010). Structures of covalent adducts between DNA and Ochratoxin A: A new factor in debate about genotoxicity and human risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 89–98.
- Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezencon C, Piguet D, Mansourian R, Holzwarth J, Grigorov M, Delatour T, Mantle P, et al. (2006) A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. *Toxicol. Sci.*, **89**: 120–134
- Marroquin-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD, Hayes AW (2014). Mycotoxins in a changing global environment-A review. *Food Chem. Toxicol.* **69**, 220–230
- Miyahara K, Mizunuma M, Hirata D, Tsuchiya E, Miyakawa T (1996) The involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance. *FEBS Lett* **399**(3):317-20

- Mobius N, Hertweck C (2009). Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **12**, 390–398.
- Morano KA, Grant CM, Moye-Rowley WS (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **190**: 1157-1195
- Moretti A, Susca A, Mule G, Logrieco AF, Proctor RH (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **167**, 57–66.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* **417**: 1-13
- Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D, Umansky L, Gerstein MB, Snyder M (2009) Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes & Development* **23**: 1351–1363
- Nishikawa JL, Boeszoermyeni A, Vale-Silva LA, Torelli R, Posteraro B, Sohn YJ, Ji F, Gelev V, Sanglard D, Sanguinetti M, Sadreyev RI, Mukherjee G, Bhyravabhotla J, Buhrlage SJ, Gray NS, Wagner G, Näär AM, Arthanari H (2016) Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator-Mediator interaction. *Nature* **530**(7591):485-9
- Ostry V, Malir F, Ruprich J (2013). Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins* **5**, 1574–1586
- Pagano G, Manini P, Bagchi D (2003). Oxidative stress-related mechanisms are associated with xenobiotics exerting excess toxicity to Fanconi Anemia cells. *Environmental Health Perspectives*, **111**(14): 1699-1703
- Pascual-Ahuir A, Vanacloig-Pedros E, Proft M (2014). Toxicity mechanisms of the food contaminant citrinin: Application of a quantitative yeast model. *Nutrients* **6**, 2077–2087
- Paul S, Moye-Rowley WS (2014) Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front. Physiol.* **5**:143.
- Paumi CM, Chuk M, Snider J, Stagljar I, Michaelis S (2009). ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* **73**(4):577-93
- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville R.A (2012). An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 252–262.
- Piper P, Mahé Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mühlbauer M, Coote P, Kuchler K (1998). The pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* **17**(15):4257-65.

Bibliografia

Prasad R, Goffeau A (2012). Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol.***66**:39-63

Prasad R, Rawal MK (2014) Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front. Pharmacol.* **5**:202

Prunuske AJ, Waltner JK, Kuhn P, Gu B, Craig EA (2012) Role for the molecular chaperones Zuo1 and Ssz1 in quorum sensing via activation of the transcription factor Pdr1. *Proc Natl Acad Sci U S A***109**(2):472-7

Qi, X.; Yu, T.; Zhu, L.; Gao, J.; He, X.; Huang, K.; Luo, Y.; Xu, W. (2014) Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **280**, 543–549.

Rahimtula AD, Bereziat JC, Bussacchini-Griot V, Bartsch H (1988). Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.***37**, 4469–4477

Ribeiro SM, Chagas GM, Campello AP, Kluppel ML (1997). Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell. Biochem. Funct.***15**, 203–209

Rienzo A, Pascual-Ahuir A, Proft M (2012) The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast***29**(6):219-31

Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM (2018) Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer*.doi: 10.1038/s41568-018-0005-8.

Rockwell NC, Wolfger H, Kuchler K, Thorner J (2009). ABC transporter Pdr10 regulates the membrane microenvironment of Pdr12 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Membr Biol.* **229**(1):27-52.

Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Caravajal E, Balzi E, Goffeau A. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol.*2001; 3:207–214.

Sá-Correia I, dos Santos SC, Teixeira MC, Cabrito TR, Mira NP (2009) Drug:H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends in Microbiology*, **17** (1): 22 - 31

Schieber M, Chandel NS (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology***24**: R453-R462

Schmidt-Heydt M, Graf E, Stoll D, Geisen R (2012). The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiol.***29**, 233–241

Schmidt-Heydt M, Stoll D, Schutz P, Geisen R (2015). Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *Int. J. Food Microbiol.***192**, 1–6.

- Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular Cell***48**
- Servos J, Haase E, Brendel M (1993). Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol Gen Genet.***236**(2-3):214-8.
- Sies H, Oxidative stress: introductory remarks, in: H.Sies (Ed.), *Oxidative Stress*, Academic Press, London (1985), pp.1–8.
- Sies H (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology***4**: 180-183
- Sorrenti V, di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F (2013). Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: A review. *Toxins* **5**, 1742–1766
- Stoll D, Schmidt-Heydt M, Geisen R (2013). Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. *Toxins***5**, 1282–1298
- Taymaz-Nikerel H, Cankorur-Cetinkaya A, Kirdar B. (2016) Genome-Wide transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress-induced perturbations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology***4**: 17
- Teixeira MC, Dias PJ, Simões T, Sá-Correia I (2008) Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem Biophys Res Commun***367**(2):249-55
- Teixeira MC, Duque P, Sá-Correia I (2007). Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends Biotechnol.* **25**(8):363-70
- Thakur JK, Arthanari H, Yang F, Pan SJ, Fan X, Breger J, Frueh DP, Gulshan K, Li DK, Mylonakis E, Struhl K, Moye-Rowley WS, Cormack BP, Wagner G, Näär AM (2008) A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature***452**(7187):604-9
- Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J., & Dawes, I. W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: Oxidative-stress-response genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(17), 6564–6569.
- Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **482**: 426-431

Bibliografia

- van Veen HW, Konings WN (1997). Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. *Semin Cancer Biol.* **8**(3):183-91.
- Vanacloig-Pedros, E., Bets-Plasencia, C., Pascual-Ahuir, A., Proft, M. (2015). Coordinated Gene Regulation in the Initial Phase of Salt Stress Adaptation. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(16), 10163–10175
- Vettorazzi A, Gonzalez-Penas E, de Cerain AL (2014). Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model. *Food Chem. Toxicol.* **72**, 273–288.
- Vettorazzi A, van Delft J, Lopez de Cerain A (2013). A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food Chem. Toxicol.*, **59**: 766–783.
- Vihervaara A, Duarte FM, Lis JT. (2018) Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nature Reviews Genetics* doi:10.1038/s41576-018-0001-6
- Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Martlbauer E (2000). Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 2483–2488.
- Wang YM, Ong SS, Chai SC, Chen T (2012). Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **8**(7):803-17
- Wang Y, Wang L, Liu F, Wang Q, Selvaraj JN, Xing F, Zhao Y, Liu Y (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, **8**.
- Wilcox LJ, Balderes DA, Wharton B, Tinkelenberg AH, Rao G, 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**(36):32466-72
- Winter E (2012) The Sum1/Ndt80 transcriptional switch and commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**(1):1-15
- Wolfger H, Mahé Y, Parle-McDermott A, Delahodde A, Kuchler K (1997). The yeast ATP binding cassette (ABC) protein genes PDR10 and PDR15 are novel targets for the Pdr1 and Pdr3 transcriptional regulators. *FEBS Lett.* **418**(3):269-74.
- Wolfger H, Mamnun YM, Kuchler K (2004). The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *J Biol Chem.* **279**(12):11593-9.
- Wu F, Groopman JD, Pestka JJ (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **5**, 351–372.
- Yan J, Xie W (2016) A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors. *Acta Pharm Sin B.* **6**(5):450-452

Yasokawa D, Iwahashi H (2010). Toxicogenomics using yeast DNA microarrays. *J. Biosci. Bioeng.*,**110**: 511–522.

Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD (2015) Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1850**: 1607-1621

Yu FY, Lia, YC, Chang CH, Liu BH (2006). Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol.Lett.***161**, 143–151

Zhang X, Cui Z, Miyakawa T, Moye-Rowley WS (2001) Cross-talk between transcriptional regulators of multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem***276**(12):8812-9

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Cepas silvestres y mutantes de delección.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	EUROSCARF
<i>Δpdr1</i>	BY4741 with <i>pdr1::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δpdr3</i>	BY4741 with <i>pdr3::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δpdr1</i>	BY4741 with <i>pdr1::HIS3</i>	Este trabajo
<i>Δpdr3</i>	BY4741 with <i>pdr3::HIS3</i>	Este trabajo
<i>Δpdr5</i>	BY4741 with <i>pdr5::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δpdr8</i>	BY4741 with <i>pdr8::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δskn7</i>	BY4741 with <i>skn7::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δsnq2</i>	BY4741 with <i>snq2::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δyap1</i>	BY4741 with <i>yap1::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δyor1</i>	BY4741 with <i>yor1::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δyrm1</i>	BY4741 with <i>yrm1::KANMX4</i>	EUROSCARF
<i>Δyrr1</i>	BY4741 with <i>yrr1::KANMX4</i>	EUROSCARF
W303-1A	<i>MATa; can1-100, his3-11'15, leu2-3'112, trp1-1, ura3-1, ade2-1</i>	Ramón Serrano
<i>Δgal4</i>	W303-1A with <i>gal4::KANMX4</i>	Este trabajo

Tabla suplementaria 2. Cepas con construcción plasmídica lucCP⁺.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741-3xAPI-lucCP⁺	BY4741 with plasmid pAG413-3xAPI-LucCP ⁺	MarkusProft / Amparo Pascual
BY4741-GRE2-lucCP⁺	BY4741 with plasmid pAG413-GRE2-LucCP ⁺	MarkusProft / Amparo Pascual
<i>Δpdr5-GRE2-lucCP⁺</i>	BY4741 with <i>pdr5::KAN</i> with plasmid pAG413-GRE2-lucCP ⁺	Este trabajo
BY4741-SOD2-lucCP⁺	BY4741 with plasmid pAG413-SOD2-LucCP ⁺	MarkusProft / Amparo Pascual
<i>Δpdr5-SOD2-lucCP⁺</i>	BY4741 with <i>pdr5::KAN</i> with plasmid pAG413-SOD2-lucCP ⁺	Este trabajo
BY4741-3xPDRE-lucCP⁺	BY4741 with plasmid pAG413-3xPDRE-LucCP ⁺	Este trabajo
<i>Δpdr1-3xPDRE-lucCP⁺</i>	BY4741 with <i>pdr1::KAN</i> with plasmid pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	Este trabajo
<i>Δpdr3-3xPDRE-lucCP⁺</i>	BY4741 with <i>pdr3::KAN</i> with plasmid pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	Este trabajo

Tablas suplementarias

$\Delta pdr8$ -3xPDRE-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr8::KAN</i> with plasmid pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	Este trabajo
$\Delta yrm1$ -3xPDRE-lucCP ⁺	BY4741 with <i>yrm1::KAN</i> with plasmid pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	Este trabajo
$\Delta yrr1$ -3xPDRE-lucCP ⁺	BY4741 with <i>yrr1::KAN</i> with plasmid pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	Este trabajo

Tabla suplementaria 3. Cepas con construcción integrativa lucCP⁺.

Cepa	Genotipo	Procedencia
PDR5-lucCP ⁺	BY4741 with pPDR5-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	MarkusProft/Amparo Pascual
PDR15-lucCP ⁺	BY4741 with pPDR15-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	MarkusProft/Amparo Pascual
SNQ2-lucCP ⁺	BY4741 with pSNQ2-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	MarkusProft/Amparo Pascual
YOR1-lucCP ⁺	BY4741 with pYOR1-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	MarkusProft/Amparo Pascual
$\Delta pdr1$ -PDR5-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr1::HIS3</i> with pPDR5-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	Este trabajo
$\Delta pdr1$ -PDR15-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr1::HIS3</i> with pPDR15-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	Este trabajo
$\Delta pdr1$ -SNQ2-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr1::HIS3</i> with pSNQ2-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	Este trabajo
$\Delta pdr3$ -PDR5-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr3::HIS3</i> with pPDR5-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	Este trabajo
$\Delta pdr3$ -PDR15-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr3::HIS3</i> with pPDR15-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	Este trabajo
$\Delta pdr3$ -SNQ2-lucCP ⁺	BY4741 with <i>pdr3::HIS3</i> with pSNQ2-lucCP ⁺ -CYC1T-KANMX4	Este trabajo

Tabla suplementaria 4. Cepas con construcción de sistema binario.

Cepa	Genotipo	Procedencia
$\Delta gal4$ -Pdr1- GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A <i>gal4::KANMX4</i> con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr1-myc y pAG413-GAL _{UAS} -lucCP ⁺	Este trabajo
$\Delta gal4$ -Pdr3- GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A <i>gal4::KANMX4</i> con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr3-myc y pAG413-GAL _{UAS} -lucCP ⁺	Este trabajo
$\Delta gal4$ -Pdr8- GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A <i>gal4::KANMX4</i> con pGBKT7-ADH1p-	Este trabajo

lucCP ⁺	Gal4 _{DBD} -Pdr8-myc y pAG413-GAL _{UAS} -lucCP ⁺	
$\Delta gal4$ -Yrm1- GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A <i>gal4::KANMX4</i> con pGBKT7-ADH1p-	Este trabajo
	Gal4 _{DBD} -Yrm1-myc y pAG413-GAL _{UAS} -lucCP ⁺	
$\Delta gal4$ -Yrr1- GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A <i>gal4::KANMX4</i> con pGBKT7-ADH1p-	Este trabajo
	Gal4 _{DBD} -Yrr1-myc y pAG413-GAL _{UAS} -lucCP ⁺	
$\Delta gal4$ -Stb5- GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A <i>gal4::KANMX4</i> con pGBKT7-ADH1p-	Este trabajo
	Gal4 _{DBD} -Stb5-myc y pAG413-GAL _{UAS} -lucCP ⁺	

Tabla suplementaria 5. Plásmidos y construcciones.

Plásmidos	Descripción	Procedencia
pUG6-lucCP ⁺ -CYC1T-KAN	AmpR, loxp-KANMX-loxp	TFG Sandra Saiz
pAG413-CYC1 Δ -lucCP ⁺	AmpR, centromérico, <i>HIS3</i>	Rienzo et al., 2012
pAG413-GRE2-lucCP ⁺	pAG413 con promotor GRE2	Rienzo et al., 2012
pAG413-SOD2-lucCP ⁺	pAG413 con promotor SOD2	Dolz-Edo et al., 2013
pAG413-3xAP1-lucCP ⁺	pAG413 con 3 repeticiones del elemento AP1	Dolz-Edo et al., 2013
pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺	pAG413 con 3 repeticiones del elemento PDRE	Este trabajo
pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	pAG413 con secuencia GAL1 _{UAS}	Este trabajo
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -myc	KanR, TRP1,	Clontech cedido por Pascual Sanz
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr1-myc	pGBKT7 con XBD de Pdr1	Este trabajo
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr3-myc	pGBKT7 con XBD de Pdr3	Este trabajo
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr8-myc	pGBKT7 con XBD de Pdr8	Este trabajo
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Yrm1-myc	pGBKT7 con XBD de Yrm1	Este trabajo
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Yrr1-myc	pGBKT7 con XBD de Yrr1	Este trabajo
pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Stb5-myc	pGBKT7 con XBD de Stb5	Este trabajo

Tabla suplementaria 6. Oligonucleótidos empleados.

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Descripción
LucSeqRev	GGTGATGTCCACCTCAATG	Comprobación gen luciferasa
PDR5-luc-KAN1	CTTTAAGTTTTCGTATCCGCTCGTTTCGAAAGACTTTAG	Inserción lucCP+

Tablas suplementarias

	ACAAAACCATGGCCGATGCTAAGAAC	en PDR5
PDR5-luc-KAN2	GTCCATCTTGGAAGTTTCTTTTCTTAACCAAATTCAA ATTCTAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Inserción lucCP+ en PDR5
PDR5-292	GTGGTACGATATCTGTTGAACG	Comprobación inserción
SNQ2-luc-KAN1	AGTGGATAGAATAACACAGCTACCAAAATACGTAAAGA GAATTCACCATGGCCGATGCTAAGAAC	Inserción lucCP+ en SNQ2
SNQ2-luc-KAN2	AAAGGCAGATGAATGCACAAAATGTTAAGTTATCTGAA GCCACAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Inserción lucCP+ en SNQ2
SNQ2-273	CAAGTTGAAGTGTTCGCGAGTC	Comprobación inserción
PDR15-luc-KAN1	ACACACACACACAAGCAAACACACTTATAATTATCA AAAACCTCCATGGCCGATGCTAAGAAC	Inserción lucCP+ en PDR15
PDR15-luc-KAN2	TATAATAAAAAGATAATATAACTAAAAAAGGAAAAT AACGTCAGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Inserción lucCP+ en PDR15
PDR15-278	CTGCTACTGCTGTGCGAGAC	Comprobación inserción
Kan-B	GGATGTATGGGCTAAATG	Comprobación gen kanamicina
SwitchKanHis FW	CTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAA ACAACCAGATGACAGAGCAGAAAGCCC	Cambio Kan/His
SwitchKanHis RV	ATGACAAGTTCTTGAAAACAAGAATCTTTTTATTGTCAG TACTGACACTACATAAGAACACCTTTGG	Cambio Kan /His
BspEI-EcoRV-3xPdr1T-1	CCGGCGATATCTCCGTGGATAGAATACATCCGTGGATC GCGATCATCCGTGGAT	Oligos de hibridación; 5' fosforilado
BspEI-EcoRV-3xPdr1T-2	CCGGATCCACGGATGATCGCGATCCACGGATGTATTCTA TCCACGGAGATATCG	Oligos de hibridación; 5' fosforilado
Gal4D1	ACGCCATCATTTTTAAGAGAGGACAGAGAAGCAAGCCTC CTGAAAGCAGCTGAAGCTTCGTACGC	GAL4 Deletion
Gal4D2	CAGTTGAAGTGAACCTGCGGGTTTTTTCAGTATCTACGA TTCATTGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	GAL4 Deletion
Gal4Chk	TTGAGACAGCATTCGCCAG	Check GAL4 Deletion
Gal4i1	TTAGCCATTGGAGCCTGGTG	Check GAL4 Deletion
Gal4i2	GCGATAGTTGCAGAACCGAC	Check GAL4 Deletion
T7fw	TAATACGACTCACTATAGGGC	Secuenciar pGBKT7
T7rev	CTCAAGACCCGTTAGAGGC	Secuenciar pGBKT7
Gal1UAS-MunI	CCGGCAATTGTGGAAATGTAAAGAGCCCC	Obtención fragmento UAS
Gal1UAS-Kpn2I	ATCGTCCGGAGCAGTGCGGCGCGAG	Obtención fragmento UAS
PDR1-NcoI-N	CATGCCATGGGTGGCGCTCGAATAAAAAACC	Fusionar Pdr1 con Gal4DBD (pGBKT7)

PDR1-BamHI-N	CATGGATCCAAACGTATACGTTTAACTATCTGG	Fusionar Pdr1 con Gal4DBD (pGBKT7)
PDR3-NcoI	CATGCCATGGATAGTTCCCAGTCTTTGCC	Fusionar Pdr3 con Gal4DBD (pGBKT7)
PDR3-BamHI	CATGGATCCGTTTTTCATAAGAAGGGATATG	Fusionar Pdr3 con Gal4DBD (pGBKT7)
YRM1-NcoI	CATGCCATGGAGTTATTTGGCAGTACTCCG	Fusionar Yrm1 con Gal4DBD (pGBKT7)
YRM1-BamHI	CATGGATCCTCTACTGCGTATCAAATAA	Fusionar Yrm1 con Gal4DBD (pGBKT7)
YRR1-NcoI	CATGCCATGGAAAAGAAAGCTACCTATGGTCC	Fusionar Yrr1 con Gal4DBD (pGBKT7)
YRR1-BamHI	CATGGATCCTCGACTTAGCATTAAATTGTC	Fusionar Yrr1 con Gal4DBD (pGBKT7)
PDR8-EcoRI	CATGAATTCGAGCAAGTGCCCAATGTAG	Fusionar Pdr8 con Gal4DBD (pGBKT7)
PDR8-BamHI	CATGGATCCATGTAAAAAATACATCAATC	Fusionar Pdr8 con Gal4DBD (pGBKT7)
STB5-EcoRI	CATGAATTCAAGAAGGAGTTAGCGGATGC	Fusionar Stb5 con Gal4DBD (pGBKT7)
STB5-BamHI	CATGGATCCTCGGTGAACATATGTCATAC	Fusionar Stb5 con Gal4DBD (pGBKT7)

ANEXOS

Article

Toxicity Mechanisms of the Food Contaminant Citrinin: Application of a Quantitative Yeast Model

Amparo Pascual-Ahuir ^{1,*}, Elena Vanacloig-Pedros ¹ and Markus Proft ^{2,*}

¹ Department of Biotechnology, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain; E-Mail: mevaped@etsia.upv.es

² Department of Mechanisms of Plant Stress Responses, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: apascual@ibmcp.upv.es (A.P.-A.); mproft@ibmcp.upv.es (M.P.); Tel.: +34-96-387-9932 (A.P.-A. & M.P.); Fax: +34-96-387-7859 (A.P.-A. & M.P.).

Received: 31 March 2014; in revised form: 5 May 2014 / Accepted: 15 May 2014 /

Published: 22 May 2014

Abstract: Mycotoxins are important food contaminants and a serious threat for human nutrition. However, in many cases the mechanisms of toxicity for this diverse group of metabolites are poorly understood. Here we apply live cell gene expression reporters in yeast as a quantitative model to unravel the cellular defense mechanisms in response to the mycotoxin citrinin. We find that citrinin triggers a fast and dose dependent activation of stress responsive promoters such as *GRE2* or *SOD2*. More specifically, oxidative stress responsive pathways via the transcription factors Yap1 and Skn7 are critically implied in the response to citrinin. Additionally, genes in various multidrug resistance transport systems are functionally involved in the resistance to citrinin. Our study identifies the antioxidant defense as a major physiological response in the case of citrinin. In general, our results show that the use of live cell gene expression reporters in yeast are a powerful tool to identify toxicity targets and detoxification mechanisms of a broad range of food contaminants relevant for human nutrition.

Keywords: citrinin; oxidative stress; yeast; mycotoxins

1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by many fungi, which represent a major group of hazardous food contaminants [1,2]. Citrinin, (3*R*,4*S*)-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-4,6-dihydro-3*H*-isochromene-7-carboxylic acid, is a well-known mycotoxin, which was first isolated from *Penicillium citrinum*, but can be produced by many other fungal species belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus* [3]. Citrinin is an important contaminant of human foods, such as cereals, cheese or sake. It is also found in red yeast rice, widely used in Asia as a food additive or in the elaboration of wine. Citrinin might be even a more common contaminant all over the world since it can be synthesized by the same molds which produce the globally found mycotoxin ochratoxin A. Although the actual mechanism of citrinin toxicity is not entirely understood, in many toxicological models it has been found to cause nephrotoxicity [4]. Several studies in different cell systems seem to confirm that citrinin can generally cause the production of reactive oxygen species (ROS) [5–9]. Moreover, antioxidants have been shown to alleviate the citrinin toxicity [10,11]. Furthermore, several oxidative stress related genes are up-regulated in response to citrinin in yeast according to transcriptomic experiments [12]. However, it is not clear whether this antioxidant defense in yeast is general or restricted to specific enzymatic functions. A recent study from the European Food Safety Authority [13] preliminarily set the maximal citrinin dose of no concern for nephrotoxicity in humans at an exposure level of 0.2 µg/kg body weight per day. For high consuming individuals, especially children, the critical citrinin concentration ranges between 9 and 53 µg/kg grain-based products and for average consumers between 19 and 100 µg/kg grain-based products. However, the same study concluded that the impact of uncertainties on the risk assessment of citrinin is large, and that more data regarding both the occurrence of citrinin in food and feed in Europe and the toxicity mechanisms of this mycotoxin are needed.

Here, we use a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) model to study the toxicology of citrinin. A large body of experimental data confirm that yeast cells respond to many different environmental stresses, including toxins, with the transcriptional activation of so called defense genes in order to survive, adapt and eventually resume growth [14]. The basic idea of the system employed here is that measuring the immediate gene expression response can be indicative of the actual toxicity mechanisms of a particular chemical compound. The use of destabilized luciferase as a reporter allows to quantify stress-induced gene expression in a very sensitive and time resolved manner in living yeast cells [15]. The luciferase assay has the additional advantage that many different environmental conditions, such as different toxin concentrations, *etc.*, can be monitored simultaneously. In this way, true dose response patterns are obtained for any toxic compound of interest. The *in vivo* luciferase assay has been very recently applied to decipher dynamic responses of yeast cells to oxidative and saline stress [16]. In the present study we apply specific luciferase reporter fusions to gain insights into the mode of toxicity of citrinin. We find that citrinin triggers an immediate response to oxidative stress characterized by a strong and dose-dependent induction of natural genes. Furthermore, the oxidative stress responsive transcription factors Yap1 and Skn7 are critically involved in the adaptive gene expression triggered by citrinin. More specifically, Yap1 dependent artificial luciferase reporters are highly responsive to citrinin. Genetic manipulations which eliminate specific multidrug export systems

of yeast increase the citrinin toxicity. Altogether the results presented here strongly suggest that oxidative damage might be the prevalent and immediate toxicity mechanism of the mycotoxin citrinin.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains and Growth Conditions

Saccharomyces cerevisiae strains used in this study were: wild type BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) and the mutant alleles *yap1::KanMX4*; *skn7::KanMX4*; *pdr1::KanMX4*; *pdr5::KanMX4*; *snq2::KanMX4*. For luciferase assays the cells were transformed with the respective lucCP⁺ fusion plasmids and grown in Synthetic Dextrose (SD) medium which contained 0.67% Yeast Nitrogen Base, 50mM succinic acid pH 5.5, 2% dextrose, 100 mg/L methionine, 100 mg/L leucine and 25 mg/L uracil. For citrinin sensitivity assays on agar plates, the respective yeast strains were grown in yeast extract-peptone liquid medium containing 2% dextrose (YPD) to exponential growth phase and then incubated with the indicated concentrations of citrinin.

2.2. Plasmid Constructions

The destabilized luciferase reporter fusions with the natural *GRE2* or *SOD2* promoter are described elsewhere [15,16]. Briefly, the *GRE2*-lucCP⁺ fusion contains the upstream 940 nucleotides of the *GRE2* gene fused with the destabilized luciferase lucCP⁺ gene in a centromeric *HIS3* containing yeast expression plasmid. The *SOD2*-lucCP⁺ fusion contains the upstream 977 nucleotides of the *SOD2* gene in the same vector backbone. The destabilized luciferase reporters with the specific promoter elements STRE, CRE or AP-1 are described in [16]. Briefly, they contain triple insertions of each cis-element in the *CYCI* core promoter fused to lucCP⁺ in centromeric *HIS3* containing yeast expression plasmids.

2.3. Live Cell Luciferase Assays

Yeast strains transformed with the respective luciferase reporter plasmids were grown at 28 °C overnight in SD medium to OD = 2 at 600 nm. The culture volume necessary for the entire luciferase assay was incubated on a roller at 28 °C for 90 min with 0.5 mM luciferin (Sigma, St. Louis, MO, USA) from a 10 mM stock solution in DMSO. The culture was then distributed in 120 μL aliquots in white 96-well plates (Nunc, Penfield, NY, USA) and the indicated concentrations of citrinin were added from a stock solution in DMSO. The mock treated samples contained the same concentration of solvent without the mycotoxin. The light emission from the culture aliquots was continuously recorded in a GloMax Multidetector System (Promega, Madison, WI, USA) in the luminometer mode. Data were normalized for the absolute number of cells used in the assay and processed in Microsoft Excel. For each condition, three independent culture aliquots were analyzed.

2.4. Yeast Sensitivity Assays

For plate assays, the yeast strains under study were grown in YPD liquid medium to exponential growth phase. Culture aliquots were then distributed in multiwell plates and exposed for 3 h to the

indicated concentrations of citrinin added from a stock solution in DMSO. Equal amounts of cells were then plated on fresh YPD agar plates, which were incubated at 28 °C for 2 days.

For the Fluorescein Diacetate (FDA) quantification of live cells after acute citrinin exposure, the respective yeast strains were pregrown in liquid YPD medium to exponential growth phase. The amount of cells necessary for the complete assay was washed and resuspended in potassium phosphate (KP) buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7.4). The indicated doses of citrinin were applied to 120 μL cell aliquots in black 96 well plates (Nunc) for 1 h. FDA (Sigma) was added from a 5 mg/mL stock solution in acetone to a final concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. After 10 min the fluorescence was quantified in a GloMax Multidetector System (Promega) in the fluorescence mode with excitation at 490 nm and emission at 510–570 nm. Three independent culture aliquots were measured for each condition. Fluorescence levels were corrected by subtracting the fluorescence produced by the same amount of dead cells, which were obtained by incubation at 80 °C for 60 min.

2.5. Statistics

The luciferase reporter assays were performed with three independent yeast culture aliquots. The standard deviation (SD) in this assay is <15%; however, error bars are not indicated in the graphs to make the figures clearly visible. For citrinin sensitivity assays, three independent culture aliquots were analyzed. The significance of the differences in the viability among different mutant strains was assessed by the application of the Student's *t*-test.

3. Results

We tested whether exposure to the mycotoxin citrinin caused a rapid adaptation of gene expression in yeast. An immediate and transient activation of defense gene expression is a common adaptive response of this organism to a great variety of environmental threats or stresses. Live cell reporters based on the expression of a destabilized luciferase enzyme represent a sensitive method to monitor this adaptive response in real time and upon a gradual range of stress conditions. We first examined a reporter based on a natural yeast promoter (*GRE2*), which is responsive to different types of stress such as hyperosmotic stress or oxidative stress [17]. As shown in Figure 1, the *GRE2*-luciferase reporter is readily activated upon acute exposure to citrinin. Robust reporter activation was observed for citrinin doses equal or greater than 100 ppm. Importantly the citrinin response of *GRE2* was comparable to the activation of the same reporter by salt stress (Figure 1), which is known to trigger a very strong increase of *GRE2* expression [16,18]. A dose dependent increase in the luciferase reporter activity was observed in a citrinin concentration range from 100 to 400 ppm. Further increases in the toxin dose did not yield a significantly enhanced gene expression response. These results made us confident that the citrinin response of the *GRE2*-luciferase reporter reflected a biologically meaningful adaptation of yeast to its toxicity, which was further investigated with refined reporter systems.

We next used yeast wild type cells, which were transformed with more specific luciferase reporters, for further citrinin studies. The insertion of multiple copies of just one type of transcription factor binding motif into luciferase expression plasmids, has been shown to create very specific reporters which respond to stimuli via just one or few signal transduction pathways [15,16]. Here, we investigated

three types of cis elements: STRE (bound by the Msn2/4 factors in response to general stress), CRE (bound by the Sko1 factor in response to osmotic stress and by unknown factors in response to oxidative stress), AP-1 (bound by Yap1 in response to oxidative stress) [16]. As depicted in Figure 2, we found that citrinin exposure activated gene expression from AP-1 and CRE sites, but not from STRE elements. Since yeast AP-1 promoter elements are exclusively activated by oxidative damage, this was a clear indication that citrinin provoked intracellular oxidation, which then activated adaptive gene expression via oxidative stress responsive transcription factors such as Yap1. We further confirmed this by showing that activation of AP1-driven luciferase expression by citrinin was completely absent in a *yap1* mutant strain (data not shown).

Figure 1. Citrinin activates gene expression from stress responsive yeast promoters in a dose dependent fashion. A fusion of the stress inducible *GRE2* promoter with destabilized luciferase was used as a real time reporter for gene expression. Citrinin doses from 100–800 ppm were applied to the yeast cultures. Alternatively the *GRE2*-luciferase reporter was activated by the indicated concentrations of NaCl. Data shown are mean values from three independent biological samples. SD < 15%.

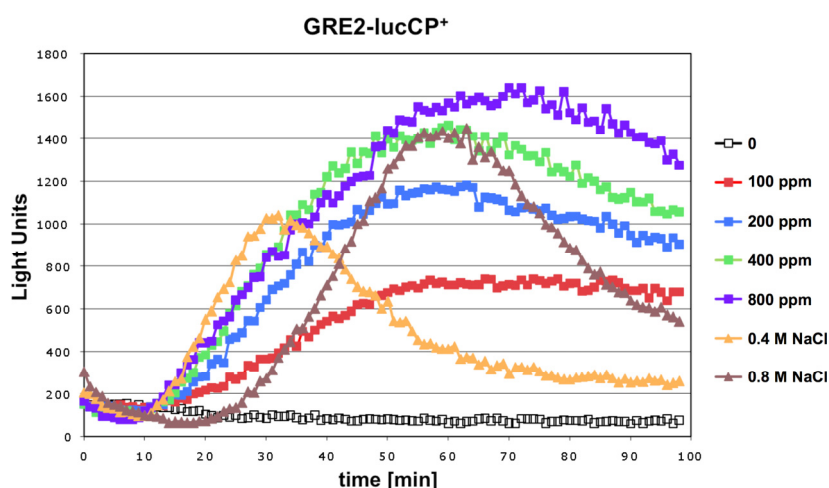
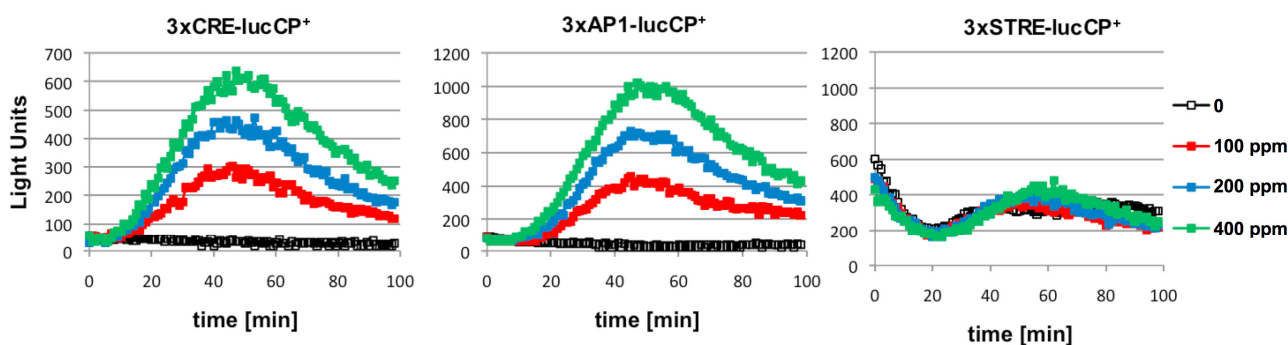
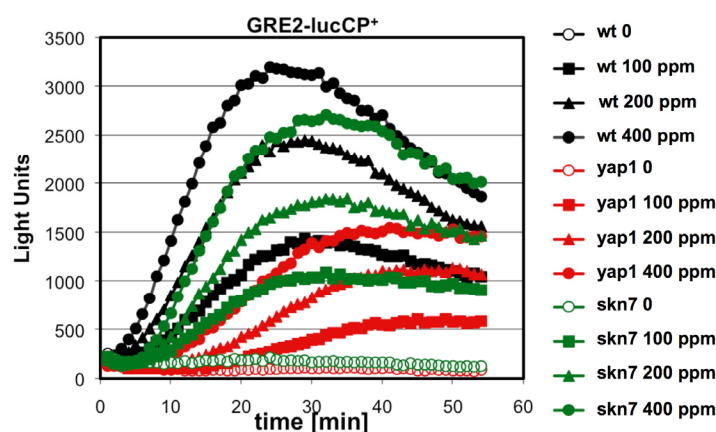


Figure 2. Citrinin activates gene expression from CRE and AP-1 promoter elements in a dose dependent fashion. Artificial promoter-luciferase constructs were used, which contained multiple repetitions of the same cis-element: CRE, AP-1 or STRE as indicated. The indicated citrinin doses were applied at time point 0 to the yeast cultures and the light emission continuously monitored. Data shown are mean values from three independent biological samples. SD < 15%.



To further investigate the relation between citrinin toxicity and oxidative stress signaling, we monitored the toxin induced gene expression in yeast strains which lacked the activity of the two main transcriptional activators operating upon oxidative stress: Yap1 and Skn7. We used the *GRE2*-luciferase reporter system to compare the immediate transcriptional upregulation upon citrinin exposure in wild type compared to *yap1* or *skn7* knockout mutants. As shown in Figure 3, in the absence of Yap1 the citrinin induced reporter activity was severely reduced. Yap1 might therefore be one of the main transcriptional regulators which is activated in response to citrinin stress. Skn7 seemed to be additionally involved in the citrinin response; however, its contribution was clearly less important as compared to Yap1 (Figure 3).

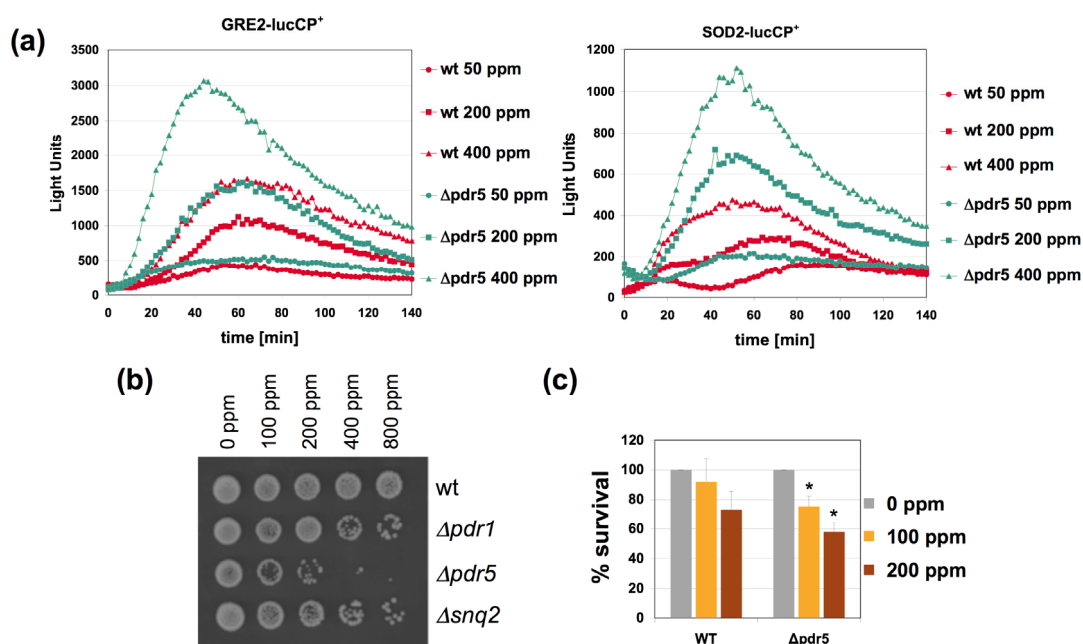
Figure 3. Citrinin activates gene expression via the oxidative stress responsive transcription factors Yap1 and Skn7. A fusion of the stress inducible *GRE2* promoter with destabilized luciferase was used as a real time reporter for gene expression. The reporter activity was measured in yeast wild type and *yap1* or *skn7* mutants upon addition of the indicated concentrations of citrinin. Data shown are mean values from three independent biological samples. SD < 15%.



We next wanted to gain insights into the molecular mechanisms of citrinin extrusion and its effect on its toxicity. The yeast genome encodes a large family of multidrug transporters which are pleiotropically involved in the export of many xenobiotic chemicals from the cytosol. Two genes of this transporter family, *PDR5* and *SNQ2*, have been identified in yeast as up-regulated upon citrinin exposure [12]. Additionally we included a yeast strain, $\Delta pdr1$, in the citrinin study, which lacks one of the principal transcriptional activators of the multidrug resistance gene family [19]. As shown in Figure 4, the *pdr5* mutant strain showed the highest degree of sensitivity to citrinin in a growth assay in rich medium (Figure 4B). The enhanced toxicity of citrinin in a *pdr5* mutant was further confirmed by an independent assay using FDA as a live cell stain upon acute citrinin stress in potassium phosphate buffer (Figure 4C). These results indicated that Pdr5 was a major citrinin export activity in yeast and we postulated that *pdr5* mutant cells were more sensitive to the mycotoxin because of greater accumulation of citrinin in the cell interior. We therefore measured the adaptive response to citrinin in *pdr5* mutants and compared it to wild type. As shown in Figure 4A, the dose dependent response of two citrinin inducible luciferase reporters, *GRE2* and *SOD2*, was largely enhanced in the *pdr5* mutant strain. Therefore we can confirm that the lack of the Pdr5 multidrug transporter leads to hypersensitivity

to citrinin and a more sensitive adaptive response to the toxin, presumably caused by overaccumulation of citrinin inside the cell.

Figure 4. The yeast Pdr5 multidrug transporter is important for the citrinin dose response and sensitivity. **(a)** Fusions of the stress inducible *GRE2* (left panel) or *SOD2* (right panel) promoters with destabilized luciferase were used as a real time reporter for gene expression. The reporter activity was measured in yeast wild type and *pdr5* mutants upon addition of the indicated concentrations of citrinin. Data shown are mean values from three independent biological samples. SD < 15%; **(b)** *pdr5* mutants show increased sensitivity to citrinin. The indicated citrinin doses were applied to yeast wild type, *pdr1*, *pdr5* and *snq2* mutants for three hours in YPD culture medium. Surviving cells were then assayed on a fresh YPD plate; **(c)** Yeast wild type and *pdr5* mutant cells were incubated for one hour with the indicated amounts of citrinin in KP buffer. The amount of living cells was then quantified by staining with FDA. Data are mean values from three independent biological replicas. Error bars are SD. The asterisks refer to $p < 0.05$ different from wt in the same condition according to the Student's *t*-test. The value for mock treated cells was arbitrarily set to 100 for both yeast strains.



4. Discussion

Citrinin is an important food contaminant produced by *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus* species. Although it is generally classified as a nephrotoxic compound, its principle mechanisms of toxicity are not entirely clear. Various *in vitro* studies have determined different possible pathways and sources of cellular damage including lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction or the induction of apoptotic cell death [5,20–22]. Additionally, genotoxic effects of citrinin have been confirmed by the enhanced formation of micronuclei in different animal and human cell lines [23–26]. However, the primary mechanisms of citrinin toxicity remain elusive. In the present study we use a yeast based reporter system to gain insights into the immediate cellular response to the exposure to citrinin. Yeast

cells are an excellent cellular model to study the adaptive response to diverse chemical threats, since these unicellular organisms have evolved efficient detoxification paths, which assure cell survival and are often triggered by rapid transcriptional activation of defense systems. Moreover, the application of live cell reporter assays enables to monitor the dose sensitive stress response in a small aliquot of living yeast cells in real time [15,16]. Application of this monitoring method clearly shows that citrinin triggers an immediate adaptive response related to the oxidative stress defense. Citrinin provokes the rapid up-regulation of oxidative stress responsive genes such as *GRE2* or *SOD2*. Of note, the mitochondrial enzyme superoxide dismutase encoded by *SOD2* has a well defined antioxidant function upon sudden bursts of reactive oxygen species (ROS) [27]. Therefore, one of the primary and immediate toxic effects of citrinin is very likely the generation of high ROS levels, which are targeted by the yeast cell by the activation of enzymatic antioxidants. Several lines of evidence indicate that citrinin induced ROS levels must be a critical determinant of the toxicity of this mycotoxin: a- citrinin induces the expression of the *GRE2* or *SOD2* genes to levels which are comparable to their most potent natural inducers such as NaCl or hydrogen peroxide [16]; b- transcriptional regulators specifically involved in the yeast antioxidant response, such as Yap1 or Skn7, are important for the efficient activation of gene expression upon citrinin treatment; c- the dose sensitive transcriptional activation triggered by citrinin (50–400 ppm; 0.2–1.6 mM) occurs in a similar concentration range as compared to hydrogen peroxide (0.1–1.0 mM) [16].

Our data are in agreement with transcriptomic surveys performed in yeast upon citrinin stress, which identified some antioxidant functions to be up-regulated in response to the mycotoxin [12]. Iwahashi and coworkers identified a limited number of genes with a confirmed or presumed function in the oxidative stress response including some *AAD* genes (hypothetical aryl-alcohol dehydrogenases), *OYE3* (NADPH oxidoreductase), *GRE2* (methylglyoxal reductase), and *TRX2* (thioredoxin) [12]. However, it was important to prove whether citrinin triggers a general antioxidant response in cells. This is confirmed by our study here by the use of oxidative stress specific reporter genes. The most direct proof that citrinin primarily causes intracellular oxidation is the robust activation of a reporter gene controlled by the AP-1 promoter element, which is known to be selectively and exclusively activated by increases in intracellular ROS via the Yap1 transcription factor [16,28,29]. Of note, citrinin causes an immediate activation of oxidative stress specific reporter genes very similar to well known and potent pro-oxidants such as hydrogen peroxide or menadione [8]. Additionally the antioxidant response is observed here in glucose containing growth medium, which is a fermentative condition repressing mitochondrial energy metabolism in yeast. These facts indicate that citrinin directly damages cellular components different from mitochondria. Our data obtained in the yeast model confirm previous reports in higher cell lines demonstrating that citrinin is able to trigger oxidative stress [5–9]. This is important because a possible antioxidant function has been proposed for citrinin, which does not seem to be relevant *in vivo* and might be attributable to specific chemical derivatives of this mycotoxin [30].

Yeast cells seem to be inherently more resistant to citrinin as compared to higher eukaryotic cell lines. In our hands, a yeast wild type begins to mount a measurable gene expression response at citrinin doses around 50 ppm (200 μ M) and easily survives treatments as high as 200 ppm (800 μ M). Mammalian cell cultures show significant genotoxic damage and loss of viability already at citrinin concentrations of approximately 50 μ M [24]. An important part of the observed citrinin

tolerance is likely the efficient extrusion of the toxin from the interior of the yeast cell. Iwahashi and coworkers identified two multidrug resistance transporter encoding genes to be up-regulated upon citrinin exposure [12]. According to our results, one of them (Pdr5), is especially important for citrinin tolerance. Yeast cells lacking Pdr5 are hypersensitive to citrinin and trigger a greater adaptive response to the toxin presumably because this strain accumulates citrinin to higher intracellular levels. An additional barrier for citrinin toxicity might also be the yeast cell wall. The outer envelope together with efficient efflux systems might therefore make yeast cells more resistant to citrinin and shift their transcriptional response to doses which are higher than normally found in contaminated food. Taken together, our study demonstrates that yeast serves as an efficient model to unravel toxicity mechanisms and detoxification strategies upon exposure to human food contaminants such as mycotoxins.

5. Conclusions

The mycotoxin citrinin triggers an immediate and general antioxidant response in yeast cells. Induction of harmful ROS levels might therefore be the prevalent toxicity mechanism of this toxin. In yeast cells, citrinin activates the expression of antioxidant encoding genes and oxidative stress specific reporters. The ROS activated transcription factor Yap1 is critically involved in the adaptive response to citrinin. Additionally, the mutation of specific toxin exporters such as Pdr5, identifies physiologically important citrinin defense systems. Yeast is an efficient model to unravel toxicity and detoxification mechanisms of mycotoxins.

Acknowledgments

This work was supported by Ministerio de Economía y Competitividad grant BFU2011-23326. We thank the Fond for Open Access Publication from Consejo Superior de Investigaciones Científicas for supporting publication costs of this article.

Author Contributions

A.P.-A. and E.V.-P. performed the experimental work; all authors analysed data or performed statistical analysis; A.P.-A. and M.P. wrote the manuscript; all authors had responsibility for the final content.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Moretti, A.; Susca, A.; Mule, G.; Logrieco, A.F.; Proctor, R.H. Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 57–66.
2. Wu, F.; Groopman, J.D.; Pestka, J.J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, *5*, 351–372.
3. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516.

4. Flajs, D.; Peraica, M. Toxicological properties of citrinin. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **2009**, *60*, 457–464.
5. Bouslimi, A.; Ouannes, Z.; Golli, E.E.; Bouaziz, C.; Hassen, W.; Bacha, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin a and citrinin: Individual and combined effects. *Toxicol. Mech. Methods* **2008**, *18*, 341–349.
6. El Golli, E.; Hassen, W.; Bouslimi, A.; Bouaziz, C.; Ladjimi, M.M.; Bacha, H. Induction of Hsp 70 in Vero cells in response to mycotoxins cytoprotection by sub-lethal heat shock and by vitamin E. *Toxicol. Lett.* **2006**, *166*, 122–130.
7. Kumar, R.; Dwivedi, P.D.; Dhawan, A.; Das, M.; Ansari, K.M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. *Toxicol. Sci.* **2011**, *122*, 557–566.
8. Ribeiro, S.M.; Chagas, G.M.; Campello, A.P.; Kluppel, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem. Funct.* **1997**, *15*, 203–209.
9. Singh, N.D.; Sharma, A.K.; Dwivedi, P.; Leishangthem, G.D.; Rahman, S.; Reddy, J.; Kumar, M. Effect on feeding graded doses of citrinin on apoptosis and oxidative stress in male Wistar rats till F1 generation. *Toxicol. Ind. Health* 2013, in press.
10. Chen, C.C.; Chan, W.H. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3338–3357.
11. Hsu, L.C.; Hsu, Y.W.; Liang, Y.H.; Lin, Z.H.; Kuo, Y.H.; Pan, T.M. Protective effect of deferricoprogen isolated from *Monascus purpureus* NTU 568 on citrinin-induced apoptosis in HEK-293 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7880–7885.
12. Iwahashi, H.; Kitagawa, E.; Suzuki, Y.; Ueda, Y.; Ishizawa, Y.H.; Nobumasa, H.; Kuboki, Y.; Hosoda, H.; Iwahashi, Y. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. *BMC Genomics* **2007**, *8*, doi:10.1186/1471-2164-8-95.
13. European Food Safety Authority (EFSA); Panel on contaminants in the food chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J.* **2012**, *10*, doi:10.2903/j.efsa.2012.2605.
14. Dos Santos, S.C.; Teixeira, M.C.; Cabrito, T.R.; Sa-Correia, I. Yeast toxicogenomics: Genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Front. Genet.* **2012**, *3*, doi:10.3389/fgene.2012.00063.
15. Rienzo, A.; Pascual-Ahuir, A.; Proft, M. The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast* **2012**, *29*, 219–231.
16. Dolz-Edo, L.; Rienzo, A.; Poveda-Huertes, D.; Pascual-Ahuir, A.; Proft, M. Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 2228–2240.
17. Garay-Arroyo, A.; Covarrubias, A.A. Three genes whose expression is induced by stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1999**, *15*, 879–892.
18. Proft, M.; Pascual-Ahuir, A.; de Nadal, E.; Arino, J.; Serrano, R.; Posas, F. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* **2001**, *20*, 1123–1133.

19. Mammun, Y.M.; Pandjaitan, R.; Mahe, Y.; Delahodde, A.; Kuchler, K. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 1429–1440.
20. Chagas, G.M.; Campello, A.P.; Kluppel, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *J. Appl. Toxicol.* **1992**, *12*, 123–129.
21. Klaric, M.S.; Zeljezic, D.; Rumora, L.; Peraica, M.; Pepeljnjak, S.; Domijan, A.M. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 97–107.
22. Yu, F.Y.; Liao, Y.C.; Chang, C.H.; Liu, B.H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.* **2006**, *161*, 143–151.
23. Donmez-Altuntas, H.; Dumlupinar, G.; Imamoglu, N.; Hamurcu, Z.; Liman, B.C. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. *J. Appl. Toxicol.* **2007**, *27*, 337–341.
24. Follmann, W.; Behm, C.; Degen, G.H. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A *in vitro*. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1097–1107.
25. Knasmuller, S.; Cavin, C.; Chakraborty, A.; Darroudi, F.; Majer, B.J.; Huber, W.W.; Ehrlich, V.A. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: Implications for risk assessment. *Nutr. Cancer* **2004**, *50*, 190–197.
26. Thust, R.; Kneist, S. Activity of citrinin metabolized by rat and human microsome fractions in clastogenicity and SCE assays on Chinese hamster V79-E cells. *Mutat. Res.* **1979**, *67*, 321–330.
27. Van Loon, A.P.; Pesold-Hurt, B.; Schatz, G. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 3820–3824.
28. Delaunay, A.; Isnard, A.D.; Toledano, M.B. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **2000**, *19*, 5157–5166.
29. Toone, W.M.; Morgan, B.A.; Jones, N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* **2001**, *20*, 2336–2346.
30. Heider, E.M.; Harper, J.K.; Grant, D.M.; Hoffman, A.; Dugan, F.; Tomer, D.P.; O'Neill, K.L. Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivative: A proposed mechanism for citrinin. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1199–1208.

Article

Different Toxicity Mechanisms for Citrinin and Ochratoxin A Revealed by Transcriptomic Analysis in Yeast

Elena Vanacloig-Pedros ¹, Markus Proft ^{2,*} and Amparo Pascual-Ahuir ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia, Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia, Spain; mevaped@etsia.upv.es

² Department of Molecular and Cellular Pathology and Therapy, Instituto de Biomedicina de Valencia IBV-CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: mproft@ibv.csic.es (M.P.); apascual@ibmcp.upv.es (A.P.-A.); Tel.: +34-96-3391760 (M.P.); +34-96-3877770 (A.P.-A.)

Academic Editor: Paola Battilani

Received: 27 July 2016; Accepted: 17 September 2016; Published: 22 September 2016

Abstract: Citrinin (CIT) and ochratoxin A (OTA) are important mycotoxins, which frequently co-contaminate foodstuff. In order to assess the toxicologic threat posed by the two mycotoxins separately or in combination, their biological effects were studied here using genomic transcription profiling and specific live cell gene expression reporters in yeast cells. Both CIT and OTA cause highly transient transcriptional activation of different stress genes, which is greatly enhanced by the disruption of the multidrug exporter Pdr5. Therefore, we performed genome-wide transcription profiling experiments with the *pdr5* mutant in response to acute CIT, OTA, or combined CIT/OTA exposure. We found that CIT and OTA activate divergent and largely nonoverlapping gene sets in yeast. CIT mainly caused the rapid induction of antioxidant and drug extrusion-related gene functions, while OTA mainly deregulated developmental genes related with yeast sporulation and sexual reproduction, having only a minor effect on the antioxidant response. The simultaneous exposure to CIT and OTA gave rise to a genomic response, which combined the specific features of the separated mycotoxin treatments. The application of stress-specific mutants and reporter gene fusions further confirmed that both mycotoxins have divergent biological effects in cells. Our results indicate that CIT exposure causes a strong oxidative stress, which triggers a massive transcriptional antioxidant and drug extrusion response, while OTA mainly deregulates developmental genes and only marginally induces the antioxidant defense.

Keywords: Ochratoxin A; Citrinin; Transcriptome; *Saccharomyces cerevisiae*; mycotoxins; oxidative stress; dose response

1. Introduction

Mycotoxins are small toxic molecules produced by a great variety of microorganism, which encompass several classes of secondary metabolites with no common chemical structure or mode of action [1]. These harmful natural products of molds contaminate food and feed worldwide with appalling economic consequences, since they affect most of the staple food crops such as maize, wheat and rice [2,3]. Beyond the economic losses, mycotoxins have a severe impact on human wellbeing [4]. Their toxicological properties and possible health effects have been extensively studied and related to some diseases, although it is certainly difficult to demonstrate the link between toxin exposure and the onset of symptoms in most cases. Mycotoxins are released by some fungi in nature for unclear reasons, and although it is widely accepted that the synthesis and secretion of toxins mediate pathogen virulence of microorganisms in plants, the molecular targets and strategies to achieve it remain to be

determined in the case of mycotoxins [5]. Considerable efforts have been made to comprehend the molecular mechanisms of mycotoxins to cause cell damage and toxicity [6–8]. Although it is desirable to understand the molecular basis of mycotoxin action in whole animals, these approaches are often difficult because the dose-effect relation depends on many different parameters [7]. As an alternative, the fundamental modes of toxicity for individual mycotoxins can be efficiently revealed in cell cultures of lower eukaryotic cells such as yeast.

Ochratoxins are a small group of mycotoxins produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species, with ochratoxin A (OTA) as the principal compound, found in a very wide range of raw and processed food [9]. OTA is nephrotoxic, carcinogenic, and a potent teratogen when tested in different mammalian models, and thereby is a potential risk to human health [10]. Several authors support that the mode of action of OTA implies the formation of covalent DNA adducts [11–13] and the increase of reactive oxygen species [14,15], hence these activities could explain the genotoxic and mutagenic activity of OTA. The co-occurrence of OTA with citrinin (CIT), another mycotoxin, has been often reported [16,17]. CIT is produced by filamentous fungi of the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Monascus*, and contaminates the same staple foodstuffs as OTA [18]. Fungi such as *Penicillium verrucosum* are able to produce both OTA and CIT, however, different environmental conditions might favor the production of one mycotoxin over the other [19–21]. Much less is known about the toxicity mechanisms of CIT, however, it has been shown to be an efficient nephrotoxin as well [22]. Several groups have contributed to the identification of possible molecular mechanisms of CIT toxicity, finding, among other consequences, the increase of oxidative stress in connection with alterations of mitochondrial function, and induction of apoptosis [23–31]. It has been proposed that the co-occurrence of both toxins results in synergetic effects, however no clear conclusions have been reached [32,33].

Gene expression analysis has become a valuable tool to decipher molecular mechanisms in response to toxic agents, including mycotoxins [34], and the yeast model is particularly important in toxicogenomic studies [35]. Recent transcriptomic approaches with OTA have been performed using different cell lines and mammalian model systems [36–39]. A comparison of the genomic data does not yield a uniform pattern of deregulated genes, and it is striking that DNA damage response genes are not generally highlighted by these omics approaches [40]. It seems that the variability of the OTA-induced transcriptomic response might be a consequence of the range of experimental conditions as well as the cellular context [40]. In contrast to OTA, genomic profiling data for CIT treatment are scarce, however, the application of yeast microarray approaches has identified the antioxidant defense as one of the primordial manners of detoxification upon CIT exposure [41]. The transcriptional response to mycotoxins is likely to be transient and dose dependent, therefore any transcriptomic assay is further complicated by the selection of the optimal induction conditions. Actually, in vivo recording of transcriptional activity in *Saccharomyces cerevisiae* shows a transient dose–time dependent response to CIT treatment [28].

Given that OTA and CIT are co-occurring toxicological threats in the food chain and that both overlapping and divergent mechanisms of toxicity have been proposed for both mycotoxins, we aim here to compare the immediate transcriptomic response to OTA and CIT, applied either separately or simultaneously. We use an optimized yeast system, where the optimal time point and dose for each mycotoxin has been adjusted according to live cell gene expression reporters and where the signal intensity has been largely increased due to the deletion of the principal toxin exporter Pdr5. We identify largely exclusive patterns of gene deregulation for CIT and OTA, with oxidative stress defense genes specifically activated by CIT and cell differentiation and developmental genes specifically activated by OTA.

2. Results

2.1. Gene Expression Profiles of Stress Response Genes upon CIT and OTA Exposure

We have previously shown that live cell reporter fusions in yeast are valuable and quantitative tools to characterize the acute transcriptional adaptation to CIT [28]. Here, we extend these studies to compare the impact of CIT and OTA on the induction of different stress-inducible genes. We used fusions of the oxidative stress-inducible *SOD2* (mitochondrial manganese superoxide dismutase) promoter and the general stress-inducible *GRE2* (methylglyoxal reductase) promoter with destabilized luciferase as sensitive live cell reporters. Dose-dependent analyses revealed a transient gene expression profile for both reporter genes, upon treatment with CIT and OTA (Figure 1A). Both mycotoxins induced gene expression very rapidly within minutes, indicating that CIT and OTA are readily taken up by yeast cells. However, CIT caused a much broader transcriptional induction, which continuously increased with dose even beyond 400 ppm (1600 μ M). OTA, in contrast, induced the stress-responsive reporters in a much more transient manner and to much lower absolute induction levels. Moreover, OTA-induced transcription of *GRE2* or *SOD2* was already maximal at concentrations around 200 ppm (497 μ M). We next tested the effect of the loss of Pdr5 function, which is a plasma membrane multidrug transporter critically involved in CIT extrusion [28]. As shown in Figure 1B, the deletion of Pdr5 provokes an enhanced transcriptional response to both CIT and OTA treatment at different doses. We next wanted to study the level of synergy involved in the response to CIT and OTA using the same live cell gene expression reporters. Surprisingly, no evident synergistic effect on gene expression was revealed when both toxins were combined together, both in the wild type or the sensitized *pdr5* mutant strain (Figure 1C). Taken together, these results indicated that CIT and OTA had differential and independent effects on the induction of stress reporters in yeast. Thus we aimed at studying the differential induction of gene expression upon CIT and OTA exposure at the genomic level.

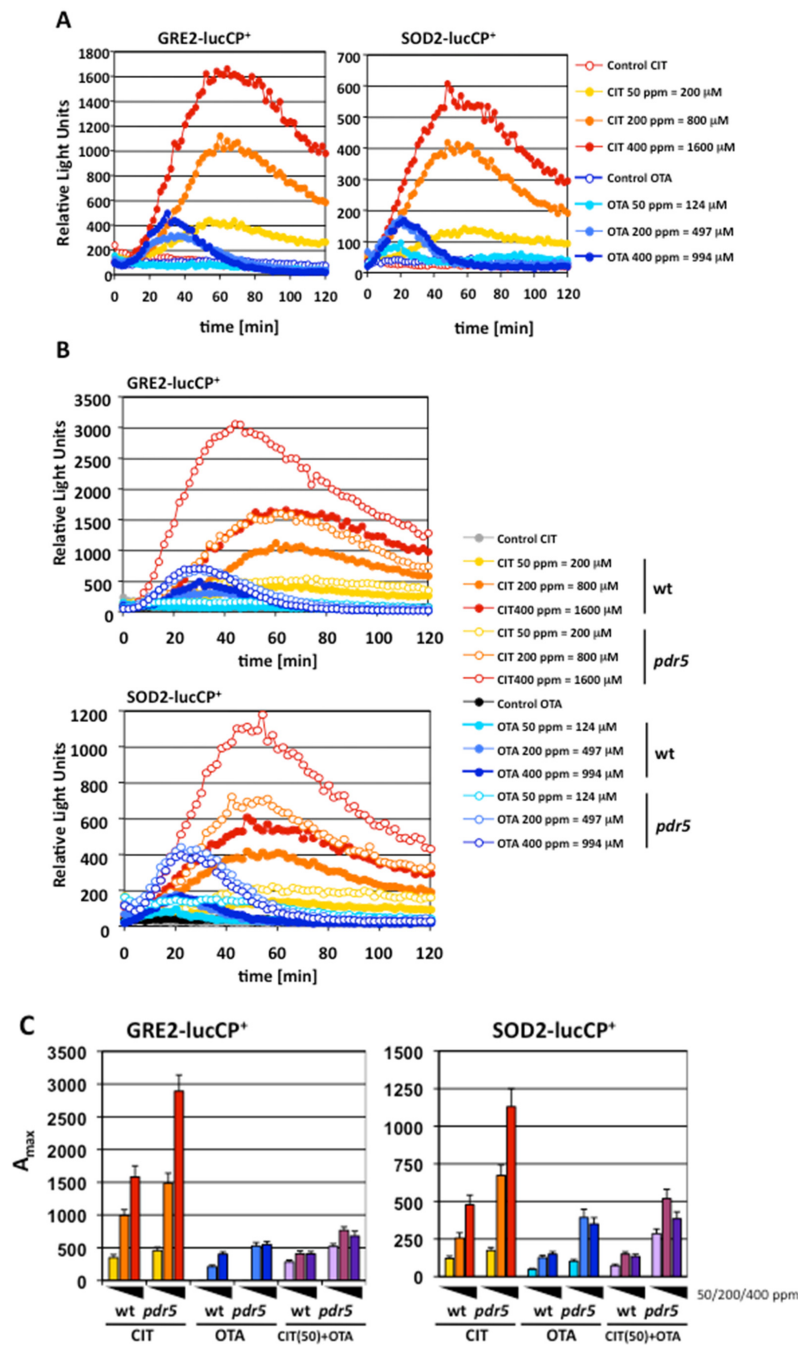


Figure 1. Ochratoxin A (OTA) and citrinin (CIT) activate stress gene expression independently and with different dose response profiles. (A) OTA and CIT induction of the stress-activated genes *GRE2* (methylglyoxal reductase) and *SOD2* (superoxide dismutase). Live cell reporter fusions with destabilized luciferase were used in yeast wild type cells and the induction of both genes was measured in real time upon the indicated mycotoxin doses. (B) The deletion of the Pdr5 multidrug exporter increases the transcriptional response to both OTA and CIT. The expression profiles for the *GRE2* and *SOD2* genes are compared for wild type and the *pdr5* deletion mutant upon the indicated mycotoxin doses. (C) OTA and CIT do not activate stress gene expression in a synergistic manner. The dose response profiles of (A) and (B) are represented here as the maximal activity (A_{max}) for each mycotoxin dose. Additionally (purple columns at the right of each plot), a constant concentration of CIT (50 ppm = 200 μM) was combined with growing concentrations of OTA (50 ppm = 124 μM; 200 ppm = 497 μM; 400 ppm = 994 μM) as indicated. All gene expression experiments were performed on three independent culture aliquots; the Standard Deviation was <15%; error bars are not included in the graphs in order to make the figure clearly visible.

2.2. Genomic Expression Profiles upon Separated and Combined Exposure to CIT and OTA

Our previous study of specific stress promoters suggested that CIT and OTA had a different impact on gene expression. Both mycotoxins, however, activate gene transcription in a very transient manner. We wanted to take advantage of genome-wide transcription analysis in yeast to gain insights into the differential induction of gene expression triggered by the two mycotoxins. The microarray experiments were performed in the sensitized *pdr5* mutant strain and at optimized toxin concentrations and exposure times as revealed by our real time surveys upon acute CIT and OTA exposure. The transcriptomic response of yeast was determined by microarray hybridization upon separated CIT and OTA exposure (200 ppm) as well as upon the combined addition of CIT/OTA (100 ppm each). As a first approach, we identified and ranked the most upregulated genes for each toxin treatment. We applied a very stringent cutoff value and considered only the genes which were expressed more than 5-fold higher in the treated cells as compared to the untreated cells. The resulting gene lists are represented in Table 1 for CIT, in Table 2 for OTA, and in Table 3 for the combined CIT/OTA treatment.

Table 1. Genes > 5-fold upregulated upon CIT (citrinin) exposure.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YPL171C	<i>OYE3</i>	473.1	3.00×10^{-8}	Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN)
YFL056C	<i>AAD6</i>	252.4	9.60×10^{-7}	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YDL243C	<i>AAD4</i>	252.1	1.77×10^{-9}	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YCL026C-A	<i>FRM2</i>	177.2	1.77×10^{-5}	Type II nitroreductase
YLL060C	<i>GTT2</i>	142.4	4.50×10^{-5}	Glutathione S-transferase
YBR008C	<i>FLR1</i>	120.6	1.83×10^{-7}	Plasma membrane multidrug transporter of the major facilitator superfamily
YCL026C-B	<i>HBN1</i>	61.7	1.81×10^{-6}	Protein of unknown function
YGR213C	<i>RTA1</i>	57.8	1.77×10^{-8}	Protein involved in 7-aminosterol resistance
YML116W	<i>ATR1</i>	54.8	1.45×10^{-7}	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily
YKR076W	<i>ECM4</i>	51.6	6.10×10^{-6}	Omega class glutathione transferase
YML131W	-	41.2	9.44×10^{-3}	Protein of unknown function
YHR139C	<i>SPS100</i>	35.2	4.78×10^{-7}	Protein required for spore wall maturation
YFL057C	<i>AAD16</i>	33.5	2.12×10^{-2}	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YDR011W	<i>SNQ2</i>	31.1	6.78×10^{-7}	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter
YOL151W	<i>GRE2</i>	25.8	2.28×10^{-6}	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase
YKL086W	<i>SRX1</i>	25.6	5.22×10^{-7}	Sulfiredoxin
YDR406W	<i>PDR15</i>	18.1	1.12×10^{-6}	Plasma membrane ATP binding cassette (ABC) transporter
YLR108C	-	16.6	5.77×10^{-8}	Protein of unknown function
YDL020C	<i>RPN4</i>	15.8	9.41×10^{-8}	Transcription factor that stimulates expression of proteasome genes
YNL117W	<i>MLS1</i>	15.1	3.95×10^{-6}	Malate synthase
YOR328W	<i>PDR10</i>	14.5	2.41×10^{-8}	ATP-binding cassette (ABC) transporter
YHR199C	<i>AIM46</i>	13.3	1.58×10^{-7}	Putative protein of unknown function
YHR029C	<i>YHI9</i>	12.9	3.86×10^{-7}	Protein of unknown function
YGR256W	<i>GND2</i>	10.9	5.58×10^{-7}	6-phosphogluconate dehydrogenase
YBR244W	<i>GPX2</i>	10.5	3.56×10^{-6}	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
YFL030W	<i>AGX1</i>	10.3	4.28×10^{-8}	Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)
YDR453C	<i>TSA2</i>	9.6	2.01×10^{-7}	Stress inducible cytoplasmic thioredoxin peroxidase
YER143W	<i>DDI1</i>	9.5	8.66×10^{-5}	DNA damage-inducible v-SNARE binding protein
YNR074C	<i>AIF1</i>	9.1	4.46×10^{-7}	Mitochondrial cell death effector
YER042W	<i>MXR1</i>	9.0	2.11×10^{-6}	Methionine-S-sulfoxide reductase
YJL101C	<i>GSH1</i>	8.9	1.30×10^{-7}	Gamma glutamylcysteine synthetase
YHR138C	-	8.8	1.42×10^{-3}	Protein of unknown function
YHL036W	<i>MUP3</i>	8.6	1.13×10^{-5}	Low affinity methionine permease
YNL129W	<i>NRK1</i>	8.5	1.61×10^{-5}	Nicotinamide riboside kinase
YPR200C	<i>ARR2</i>	8.1	1.57×10^{-4}	Arsenate reductase
YER103W	<i>SSA4</i>	7.8	2.65×10^{-5}	Heat shock protein
YJL045W	-	7.7	3.32×10^{-7}	Minor succinate dehydrogenase isozyme
YPL027W	<i>SMA1</i>	7.7	9.86×10^{-7}	Protein of unknown function involved in prospore membrane assembly
YGR010W	<i>NMA2</i>	7.5	1.02×10^{-7}	Nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase
YMR169C	<i>ALD3</i>	7.4	6.10×10^{-4}	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase
YDR132C	-	7.3	1.74×10^{-6}	Protein of unknown function
YOR162C	<i>YRR1</i>	7.2	1.24×10^{-7}	Zn ₂ -Cys ₆ zinc-finger transcription factor

Table 1. Cont.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YMR038C	<i>CCS1</i>	6.9	6.96×10^{-5}	Copper chaperone for superoxide dismutase Sod1p
YJL219W	<i>HXT9</i>	6.9	1.67×10^{-7}	Putative hexose transporter
YER142C	<i>MAG1</i>	6.8	5.46×10^{-7}	3-methyl-adenine DNA glycosylase
YBR046C	<i>ZTA1</i>	6.7	1.13×10^{-5}	NADPH-dependent quinone reductase
YNL231C	<i>PDR16</i>	6.6	7.41×10^{-3}	Phosphatidylinositol transfer protein (PITP)
YPL091W	<i>GLR1</i>	6.5	1.49×10^{-5}	Cytosolic and mitochondrial glutathione oxidoreductase
YGR281W	<i>YOR1</i>	6.4	2.16×10^{-3}	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter
YGR197C	<i>SNG1</i>	6.3	3.47×10^{-7}	Protein involved in resistance to nitrosoguanidine and 6-azauracil
YNL155W	<i>CUZ1</i>	6.1	5.38×10^{-3}	Protein with a role in the ubiquitin-proteasome pathway
YAL054C	<i>ACS1</i>	6.1	3.74×10^{-7}	Acetyl-coA synthetase isoform
YOL119C	<i>MCH4</i>	6.1	1.27×10^{-5}	Protein with similarity to mammalian monocarboxylate permeases
YDL168W	<i>SFA1</i>	6.0	1.21×10^{-5}	Bifunctional alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase
YCR021C	<i>HSP30</i>	6.0	5.37×10^{-3}	Negative regulator of the H(+)-ATPase Pma1p
YBR256C	<i>RIB5</i>	5.9	1.15×10^{-3}	Riboflavin synthase
YOR052C	<i>TMC1</i>	5.8	9.56×10^{-3}	AN1-type zinc finger protein of unknown function
YOL155C	<i>HPF1</i>	5.8	6.09×10^{-5}	Haze-protective mannoprotein
YMR318C	<i>ADH6</i>	5.8	7.64×10^{-3}	NADPH-dependent medium chain alcohol dehydrogenase
YJL082W	<i>IML2</i>	5.8	4.56×10^{-4}	Protein of unknown function
YKL051W	<i>SFK1</i>	5.6	6.62×10^{-6}	Plasma membrane protein that may act to generate normal levels of PI4P
YER185W	<i>PUG1</i>	5.6	3.14×10^{-5}	Plasma membrane protein involved in protoporphyrin and heme transport
YIR017C	<i>MET28</i>	5.6	3.48×10^{-6}	Basic leucine zipper (bZIP) transcriptional activator in the Cbf1p-Met4p-Met28p complex
YHL024W	<i>RIM4</i>	5.5	4.66×10^{-6}	Putative RNA-binding protein
YGR243W	<i>MPC3</i>	5.4	7.07×10^{-5}	Highly conserved subunit of mitochondrial pyruvate carrier
YGL010W	<i>MPO1</i>	5.3	7.58×10^{-6}	Protein involved in metabolism of phytosphingosine
YDR513W	<i>GRX2</i>	5.1	6.09×10^{-3}	Cytoplasmic glutaredoxin
YHR179W	<i>OYE2</i>	5.1	1.04×10^{-2}	Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN)
YDR059C	<i>UBC5</i>	5.1	2.39×10^{-4}	Ubiquitin-conjugating enzyme
YMR276W	<i>DSK2</i>	5.0	5.01×10^{-3}	Nuclear-enriched ubiquitin-like polyubiquitin-binding protein

* Fold change (FC) refers to the fold induction of the genes as compared to the untreated control.

Table 2. Genes > 5-fold upregulated upon OTA (ochratoxin A) exposure.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YER106W	<i>MAM1</i>	60.2	2.77×10^{-8}	Monopolin
YGR225W	<i>AMA1</i>	57.4	9.19×10^{-10}	Activator of meiotic anaphase promoting complex (APC/C)
YER179W	<i>DMC1</i>	40.5	5.34×10^{-7}	Meiosis-specific recombinase
YOR298W	<i>MUM3</i>	33.5	9.62×10^{-4}	Protein of unknown function
YFL011W	<i>HXT10</i>	33.2	1.38×10^{-7}	Putative hexose transporter
YLL046C	<i>RNP1</i>	27.3	1.08×10^{-7}	Ribonucleoprotein
YER104W	<i>RTT105</i>	26.0	3.22×10^{-8}	Protein with a role in regulation of Ty1 transposition
YLR377C	<i>FBP1</i>	23.3	1.62×10^{-7}	Fructose-1,6-bisphosphatase
YDR523C	<i>SPS1</i>	22.7	6.27×10^{-6}	Putative protein serine/threonine kinase
YHR176W	<i>FMO1</i>	20.2	1.11×10^{-5}	Flavin-containing monooxygenase
YBR040W	<i>FIG1</i>	19.7	1.16×10^{-7}	Integral membrane protein
YGR059W	<i>SPR3</i>	18.6	4.74×10^{-5}	septin protein involved in sporulation
YEL039C	<i>CYC7</i>	16.9	6.54×10^{-7}	Cytochrome c isoform 2
YMR101C	<i>SRT1</i>	16.7	3.73×10^{-7}	Forms the dehydrodichyl diphosphate syntase (DDS) complex with NUS1
YDR218C	<i>SPR28</i>	14.1	1.11×10^{-6}	Meiotic septin
YDR256C	<i>CTA1</i>	13.5	7.51×10^{-8}	Catalase A
YIL113W	<i>SDP1</i>	13.3	2.62×10^{-7}	Stress-inducible dual-specificity MAP kinase phosphatase
YOL123W	<i>HRP1</i>	12.9	1.98×10^{-6}	Subunit of cleavage factor I complex
YGL254W	<i>FZF1</i>	12.6	2.03×10^{-7}	Transcription factor involved in sulfite metabolism
YPL201C	<i>YIG1</i>	12.4	3.23×10^{-5}	Protein that interacts with glycerol 3-phosphatase
Q0275	<i>COX3</i>	12.3	1.01×10^{-4}	Subunit III of cytochrome c oxidase (Complex IV)
YFL055W	<i>AGP3</i>	12.3	2.34×10^{-6}	Low-affinity amino acid permease
YDR259C	<i>YAP6</i>	11.4	1.88×10^{-5}	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor
YPR193C	<i>HPA2</i>	11.3	2.74×10^{-5}	Tetrameric histone acetyltransferase

Table 2. Cont.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YOR378W	<i>AMF1</i>	11.3	2.33×10^{-6}	Low affinity NH ₄ ⁺ transporter
YLL042C	<i>ATG10</i>	11.3	3.47×10^{-6}	Conserved E2-like conjugating enzyme
YIL101C	<i>XBP1</i>	11.1	3.43×10^{-4}	Transcriptional repressor
YBR018C	<i>GAL7</i>	11.0	2.12×10^{-5}	Galactose-1-phosphate uridyl transferase
YEL019C	<i>MMS21</i>	10.9	6.11×10^{-6}	SUMO ligase and component of the SMC5-SMC6 complex
YPR040W	<i>TIP41</i>	10.9	3.19×10^{-5}	Protein that interacts with Tap42p
YPL033C	<i>SRL4</i>	10.7	1.75×10^{-6}	Protein of unknown function
YLL057C	<i>JLP1</i>	10.5	1.82×10^{-6}	Fe(II)-dependent sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase
YGR142W	<i>BTN2</i>	10.3	2.34×10^{-5}	v-SNARE binding protein
YPL279C	<i>FEX2</i>	10.3	2.64×10^{-7}	Protein involved in fluoride export
YHL022C	<i>SPO11</i>	10.2	2.70×10^{-7}	Meiosis-specific protein
YKL055C	<i>OAR1</i>	10.0	2.10×10^{-6}	Mitochondrial 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase
YNL009W	<i>IDP3</i>	10.0	1.42×10^{-2}	Peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase
YOR297C	<i>TIM18</i>	9.9	3.75×10^{-5}	Component of the mitochondrial TIM22 complex
YER053C-A	-	9.8	7.45×10^{-6}	Protein of unknown function
YPL027W	<i>SMA1</i>	9.7	1.50×10^{-7}	Protein of unknown function
YBR074W	<i>PFF1</i>	9.6	5.70×10^{-6}	Multi-spanning vacuolar membrane protease
YEL048C	<i>TCA17</i>	9.6	2.14×10^{-7}	Component of transport protein particle (TRAPP) complex II
YGR197C	<i>SNG1</i>	9.2	7.32×10^{-8}	Protein involved in resistance to nitrosoguanidine and 6-azauracil
YJR047C	<i>ANB1</i>	9.2	1.29×10^{-6}	Translation elongation factor eIF-5A
YKL093W	<i>MBR1</i>	9.0	3.41×10^{-5}	Protein involved in mitochondrial functions and stress response
YGR212W	<i>SLI1</i>	9.0	2.03×10^{-5}	N-acetyltransferase
YCL026C-A	<i>FRM2</i>	8.8	1.66×10^{-6}	Type II nitroreductase
YEL072W	<i>RMD6</i>	8.7	6.39×10^{-7}	Protein required for sporulation
YML054C	<i>CYB2</i>	8.5	2.74×10^{-6}	Cytochrome b2 (L-lactate cytochrome-c oxidoreductase)
YNL187W	<i>SWT21</i>	8.5	6.08×10^{-6}	Protein involved in mRNA splicing
YNR064C	-	8.5	1.99×10^{-5}	Epoxide hydrolase
YBR065C	<i>ECM2</i>	8.4	9.49×10^{-6}	Pre-mRNA splicing factor
YPL171C	<i>OYE3</i>	8.4	6.43×10^{-6}	Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN)
YGL212W	<i>VAM7</i>	8.4	1.02×10^{-4}	Vacuolar SNARE protein
YOR390W	<i>FEX1</i>	8.2	3.59×10^{-6}	Protein involved in fluoride export
YMR069W	<i>NAT4</i>	8.1	1.76×10^{-4}	N-alpha-acetyl-transferase
YDL020C	<i>RPN4</i>	8.0	3.51×10^{-7}	Transcription factor that stimulates expression of proteasome genes
YDR171W	<i>HSP42</i>	8.0	6.87×10^{-6}	Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity
YER054C	<i>GIP2</i>	7.9	2.59×10^{-6}	Putative regulatory subunit of protein phosphatase Glc7p
YPR151C	<i>SUE1</i>	7.9	9.84×10^{-7}	Protein required for degradation of unstable forms of cytochrome c
YGR131W	<i>FHN1</i>	7.7	1.62×10^{-6}	Protein of unknown function
YEL061C	<i>CIN8</i>	7.6	1.15×10^{-5}	Kinesin motor protein
YDR079W	<i>PET100</i>	7.6	4.29×10^{-6}	Chaperone that specifically facilitates the assembly of cytochrome c oxidase
YKL051W	<i>SFK1</i>	7.6	1.38×10^{-4}	Plasma membrane protein
YMR017W	<i>SPO20</i>	7.5	1.72×10^{-3}	Meiosis-specific subunit of the t-SNARE complex
YDR011W	<i>SNQ2</i>	7.5	4.53×10^{-7}	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter
YOR152C	<i>ATG40</i>	7.4	4.01×10^{-5}	Autophagy receptor
YLR312C	<i>ATG39</i>	7.4	2.53×10^{-7}	Autophagy receptor
YBL078C	<i>ATG8</i>	7.3	7.40×10^{-7}	Component of autophagosomes and Cvt vesicles
YPL186C	<i>UIP4</i>	7.2	4.47×10^{-4}	Protein that interacts with Ulp1p
YLR142W	<i>PUT1</i>	7.1	2.11×10^{-6}	Proline oxidase
YOR065W	<i>CYT1</i>	7.0	4.71×10^{-5}	Cytochrome c1
YOL149W	<i>DCP1</i>	7.0	1.35×10^{-3}	Subunit of the Dcp1p-Dcp2p decapping enzyme complex
Q0250	<i>COX2</i>	6.7	3.78×10^{-2}	Subunit II of cytochrome c oxidase (Complex IV)
YDR402C	<i>DIT2</i>	6.6	1.08×10^{-3}	N-formyltyrosine oxidase
YGR243W	<i>MPC3</i>	6.6	1.70×10^{-5}	Highly conserved subunit of the mitochondrial pyruvate carrier (MPC)
YOR005C	<i>DNL4</i>	6.6	5.57×10^{-6}	DNA ligase
YJR010W	<i>MET3</i>	6.6	9.83×10^{-7}	ATP sulfurylase
YLR151C	<i>PCD1</i>	6.5	2.79×10^{-6}	8-oxo-dGTP diphosphatase
YNL158W	<i>PGA1</i>	6.3	4.04×10^{-4}	Essential component of GPI-mannosyltransferase II
YDR524C	<i>AGE1</i>	6.3	8.02×10^{-7}	ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating protein (GAP) effector
YNL012W	<i>SPO1</i>	6.3	4.68×10^{-6}	Meiosis-specific prospore protein
YGL240W	<i>DOC1</i>	6.3	6.44×10^{-5}	Processivity factor
YDR076W	<i>RAD55</i>	6.3	1.32×10^{-4}	Protein that stimulates strand exchange
YOR192C	<i>THI72</i>	6.3	7.85×10^{-6}	Transporter of thiamine or related compound
YMR251W	<i>GTO3</i>	6.3	2.35×10^{-5}	Omega class glutathione transferase
YDR185C	<i>UPS3</i>	6.2	4.77×10^{-6}	Mitochondrial protein of unknown function

Table 2. Cont.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YNL014W	<i>HEF3</i>	6.2	1.32×10^{-4}	Translational elongation factor EF-3
YML087C	<i>AIM33</i>	6.2	1.01×10^{-4}	Putative protein of unknown function
YNR034W	<i>SOL1</i>	6.2	7.19×10^{-7}	Protein with a possible role in tRNA export
YDR070C	<i>FMP16</i>	6.1	3.24×10^{-4}	Protein of unknown function
YJR129C	<i>EFM3</i>	6.1	4.06×10^{-2}	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
Q0045	<i>COX1</i>	6.0	1.76×10^{-2}	Subunit I of cytochrome c oxidase (Complex IV)
YNL036W	<i>NCE103</i>	5.9	4.88×10^{-5}	Carbonic anhydrase
YOR178C	<i>GAC1</i>	5.9	6.08×10^{-4}	Regulatory subunit for Glc7p type-1 protein phosphatase (PP1)
YGR088W	<i>CTT1</i>	5.9	8.13×10^{-5}	Cytosolic catalase T
YDL247W	<i>MPH2</i>	5.8	2.28×10^{-5}	Alpha-glucoside permease
YCL066W	<i>HMLALPHA1</i>	5.7	6.90×10^{-4}	Silenced copy of ALPHA1 at HML
YNL077W	<i>API1</i>	5.6	3.33×10^{-6}	Chaperone with a role in SUMO-mediated protein degradation
YKL095W	<i>YJU2</i>	5.6	1.29×10^{-3}	Essential protein required for pre-mRNA splicing
YJL030W	<i>MAD2</i>	5.6	1.64×10^{-4}	Component of the spindle-assembly checkpoint complex
YHL016C	<i>DUR3</i>	5.6	9.87×10^{-7}	Plasma membrane transporter for urea and polyamines
YNL188W	<i>KAR1</i>	5.6	1.64×10^{-4}	Protein involved in karyogamy and spindle pole body duplication
YGR234W	<i>YHB1</i>	5.6	1.02×10^{-5}	Nitric oxide oxidoreductase
YCR040W	<i>MATALPHA1</i>	5.5	6.76×10^{-4}	Transcriptional co-activator that regulates mating-type-specific genes
YFL016C	<i>MDJ1</i>	5.5	2.05×10^{-4}	Co-chaperone that stimulates HSP70 protein Ssc1p ATPase activity
YNL194C	-	5.4	4.89×10^{-4}	Integral membrane protein
YDR475C	<i>JIP4</i>	5.3	2.01×10^{-3}	Protein of unknown function
YJR160C	<i>MPH3</i>	5.3	8.87×10^{-5}	Alpha-glucoside permease
YCR104W	<i>PAU3</i>	5.3	1.92×10^{-3}	Member of the seripauperin multigene family
YIL084C	<i>SDS3</i>	5.3	6.30×10^{-6}	Component of the Rpd3L histone deacetylase complex
YIL056W	<i>VHR1</i>	5.1	3.53×10^{-3}	Transcriptional activator
YAR020C	<i>PAU7</i>	5.0	1.56×10^{-4}	Member of the seripauperin multigene family
YDR227W	<i>SIR4</i>	5.0	1.71×10^{-5}	Silent information regulator
YLR376C	<i>PSY3</i>	5.0	6.70×10^{-6}	Component of Shu complex (aka PCSS complex)

* Fold change (FC) refers to the fold induction of the genes as compared to the untreated control.

Table 3. Genes > 5-fold upregulated upon the combined CIT/OTA exposure.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YPL171C	<i>OYE3</i>	199.6	1.29×10^{-4}	Conserved NADPH oxidoreductase containing flavin mononucleotide (FMN)
YDL243C	<i>AAD4</i>	46.5	1.49×10^{-9}	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YFL056C	<i>AAD6</i>	41.2	1.16×10^{-7}	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YLL060C	<i>GTT2</i>	34.6	1.44×10^{-9}	Glutathione S-transferase capable of homodimerization
YBR008C	<i>FLR1</i>	28.0	1.21×10^{-7}	Plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily
YML131W	-	24.2	2.41×10^{-6}	Protein of unknown function
YOL151W	<i>GRE2</i>	21.9	1.17×10^{-4}	3-methylbutanal reductase and NADPH-dependent methylglyoxal reductase
YCL026C-A	<i>FRM2</i>	21.5	1.53×10^{-8}	Type II nitroreductase
YMR101C	<i>SRT1</i>	21.3	2.64×10^{-8}	Forms the dehydrodolichyl diphosphate syntase (DDS) complex with NUS1
YGR225W	<i>AMA1</i>	20.5	3.87×10^{-7}	Activator of meiotic anaphase promoting complex (APC/C)
YDL020C	<i>RPN4</i>	19.5	4.24×10^{-4}	Transcription factor that stimulates expression of proteasome genes
YDR256C	<i>CTA1</i>	18.8	4.53×10^{-9}	Catalase A
YGR197C	<i>SNG1</i>	18.7	5.35×10^{-9}	Protein involved in resistance to nitrosoguanidine and 6-azauracil
YKL051W	<i>SFK1</i>	18.7	6.62×10^{-8}	Plasma membrane protein that may act to generate normal levels of PI4P
YML116W	<i>ATR1</i>	16.3	9.44×10^{-6}	Multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily
YGR142W	<i>BTN2</i>	15.2	7.12×10^{-6}	v-SNARE binding protein
YHR087W	<i>RTC3</i>	15.0	1.01×10^{-6}	Protein of unknown function involved in RNA metabolism
YDR406W	<i>PDR15</i>	14.2	3.31×10^{-6}	Plasma membrane ATP binding cassette (ABC) transporter
YFL057C	<i>AAD16</i>	13.7	1.51×10^{-5}	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YOL149W	<i>DCP1</i>	13.5	3.61×10^{-5}	Subunit of the Dcp1p-Dcp2p decapping enzyme complex
YDR171W	<i>HSP42</i>	13.5	1.19×10^{-3}	Small heat shock protein (sHSP) with chaperone activity
YIL101C	<i>XBP1</i>	12.3	3.01×10^{-5}	Transcriptional repressor
YHR139C	<i>SPS100</i>	12.3	1.95×10^{-7}	Protein required for spore wall maturation
YGR213C	<i>RTA1</i>	12.1	1.04×10^{-8}	Protein involved in 7-aminosterol resistance
YEL039C	<i>CYC7</i>	11.8	4.14×10^{-8}	Cytochrome c isoform 2
YIL056W	<i>VHR1</i>	10.5	4.95×10^{-7}	Transcriptional activator

Table 3. Cont.

Gene	Standard Name	FC *	p-Value	Description
YCL026C-B	<i>HBN1</i>	10.5	8.33×10^{-6}	Protein of unknown function
YOL123W	<i>HRP1</i>	10.4	2.81×10^{-6}	Subunit of cleavage factor I
YHL036W	<i>MUP3</i>	9.5	6.44×10^{-7}	Low affinity methionine permease
YKR076W	<i>ECM4</i>	9.4	4.12×10^{-7}	Omega class glutathione transferase
YLR108C	-	9.1	3.50×10^{-7}	Protein of unknown function
YER054C	<i>GIP2</i>	8.9	1.55×10^{-7}	Putative regulatory subunit of protein phosphatase Glc7p
YOR298W	<i>MUM3</i>	8.9	3.49×10^{-6}	Protein of unknown function involved in outer spore wall organization
YHL024W	<i>RIM4</i>	8.6	4.31×10^{-8}	Putative RNA-binding protein
YMR169C	<i>ALD3</i>	8.3	6.99×10^{-3}	Cytoplasmic aldehyde dehydrogenase
YOR028C	<i>CIN5</i>	8.2	2.47×10^{-7}	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor of the yAP-1 family
YGR088W	<i>CTT1</i>	8.1	3.34×10^{-6}	Cytosolic catalase T
YER103W	<i>SSA4</i>	8.0	1.02×10^{-5}	Heat shock protein member of the HSP70 family
YER185W	<i>PUG1</i>	7.5	1.07×10^{-5}	Plasma membrane protein involved in protoporphyrin and heme transport
YER053C-A	-	7.2	1.56×10^{-4}	Protein of unknown function
YOR152C	<i>ATG40</i>	7.2	3.92×10^{-5}	Autophagy receptor
YDL204W	<i>RTN2</i>	6.7	1.74×10^{-6}	Reticulon protein
YOR065W	<i>CYT1</i>	6.6	4.43×10^{-6}	Cytochrome c1
YJL051W	<i>IRC8</i>	6.6	5.68×10^{-5}	Bud tip localized protein of unknown function
YLR329W	<i>REC102</i>	6.5	4.83×10^{-6}	Protein involved in early stages of meiotic recombination
YKR077W	<i>MSA2</i>	6.4	6.97×10^{-6}	Putative transcriptional activator
YHR138C	-	6.1	7.19×10^{-3}	Protein of unknown function
YPL201C	<i>YIG1</i>	6.0	4.46×10^{-7}	Protein that interacts with glycerol 3-phosphatase
YDL025C	<i>RTK1</i>	6.0	3.61×10^{-2}	Putative protein kinase
YOR178C	<i>GAC1</i>	5.9	9.69×10^{-4}	Regulatory subunit for Glc7p type-1 protein phosphatase (PP1)
YFL016C	<i>MDJ1</i>	5.8	4.14×10^{-5}	Co-chaperone member of the HSP40 (DnaJ) family of chaperones
YFL030W	<i>AGX1</i>	5.8	1.51×10^{-6}	Alanine:glyoxylate aminotransferase (AGT)
YKL086W	<i>SRX1</i>	5.8	5.28×10^{-5}	Sulfiredoxin
YOR328W	<i>PDR10</i>	5.8	1.96×10^{-6}	ATP-binding cassette (ABC) transporter
YPR151C	<i>SUE1</i>	5.6	1.71×10^{-7}	Protein required for degradation of unstable forms of cytochrome c
YLL026W	<i>HSP104</i>	5.5	4.85×10^{-2}	Disaggregase
YGR243W	<i>MPC3</i>	5.5	5.30×10^{-5}	Highly conserved subunit of the mitochondrial pyruvate carrier (MPC)
YKL093W	<i>MBR1</i>	5.5	2.19×10^{-5}	Protein involved in mitochondrial functions and stress response
YNL036W	<i>NCE103</i>	5.5	5.13×10^{-5}	Carbonic anhydrase
YNL008C	<i>AS13</i>	5.5	1.69×10^{-5}	Subunit of the nuclear inner membrane Asi ubiquitin ligase complex
YLR343W	<i>GAS2</i>	5.5	4.37×10^{-6}	1,3-beta-glucanosyltransferase
YGR223C	<i>HSV2</i>	5.4	1.69×10^{-6}	Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-binding protein
YER060W-A	<i>FCY22</i>	5.2	1.17×10^{-5}	Putative purine-cytosine permease
YNL155W	<i>CUZ1</i>	5.2	1.90×10^{-3}	Protein with a role in the ubiquitin-proteasome pathway
YHL021C	<i>AIM17</i>	5.2	1.36×10^{-4}	Putative protein of unknown function
YHR199C	<i>AIM46</i>	5.2	1.08×10^{-5}	Putative protein of unknown function
YGR281W	<i>YOR1</i>	5.1	2.18×10^{-3}	Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter
YGL010W	<i>MPO1</i>	5.1	3.53×10^{-6}	Protein involved in metabolism of phyto sphingosine

* Fold change (FC) refers to the fold induction of the genes as compared to the untreated control.

Acute CIT exposure provoked the robust upregulation of 68 yeast genes. When classified for the most statistically relevant functional groups, we identified the response to oxidative stress as the dominant group (see Table 4). These data confirmed that CIT toxicity is fundamentally based on its capacity to generate reactive oxygen species (ROS) in cells. Specifically, genes involved in the metabolism of glutathione were preferentially expressed upon CIT exposure, indicating that the antioxidant function of glutathione was necessary to palliate the toxic effect of CIT. Additionally we identified “Drug transport” as a main CIT-inducible gene group, suggesting that the activated export of the toxin might be a major determinant for the adaptation of yeast cells to CIT.

For OTA exposure, we were able to identify 115 genes whose expression was at least 5-fold induced (Table 2). The analysis of the functional groups enriched in the dataset derived from OTA-treated cells revealed that the “response to oxidative stress” was retrieved with much less significance as compared to the CIT dataset. In turn, we identified yet other functional groups as most significantly upregulated by OTA, which belong to developmental processes of yeast cells and specifically to the differentiation

processes of sporulation and reproduction (see Table 4). These data indicated that both mycotoxins induced different gene sets in yeast. Indeed, the comparison of the most significantly upregulated genes revealed that less than 5% (a total of only 8 genes) of the transcripts were induced commonly by either CIT or OTA as depicted in Figure 2. The subset of CIT- and OTA-responsive genes was enriched for the functional category “Oxidation–reduction process”. These results clearly showed that CIT and OTA induced largely separated gene sets in the initial adaptive phase, which suggested that both mycotoxins might have different biological effects in yeast cells. We next analyzed the transcriptomic response of yeast cells to the combined exposure of CIT and OTA. A total of 68 transcripts were significantly upregulated >5-fold under these conditions (see Table 3). The functional gene groups enriched by the combined mycotoxin treatment represented a combination of the gene functions induced in the previous experiments by the separated toxin treatment. As a result, all categories covering “oxidative stress response”, “drug transport”, “developmental processes”, and “sporulation” were significantly enriched upon the combined CIT/OTA exposure (see Table 4). Taken together, our transcriptomic survey of the response to CIT and OTA strongly supported the idea that both toxins cause distinct and separable biological responses. CIT caused a clear antioxidant response and the induction of multiple drug extrusion systems, while OTA seemed to retain a weak oxidation-related toxicity and to cause a marked deregulation of developmental genes. We wanted to further dissect these divergent toxicity effects of CIT and OTA in the yeast model.

Table 4. Functional gene groups induced by the separated or combined exposure to CIT and OTA.

CIT	
Gene Ontology Group	<i>p</i> -value
Oxidation-reduction process	1.8×10^{-13}
Cell response to oxidative stress	2.2×10^{-9}
Glutathione metabolic process	1.8×10^{-6}
Drug transport	1.3×10^{-5}
Response to reactive oxygen species	1.3×10^{-4}
OTA	
Gene Ontology Group	<i>p</i> -value
Single organism developmental process	2.2×10^{-8}
Oxidation-reduction process	2.0×10^{-7}
Cell differentiation	3.0×10^{-6}
Developmental process involved in reproduction	5.4×10^{-6}
Sporulation	1.6×10^{-5}
Cell response to oxidative stress	5.4×10^{-3}
CIT + OTA	
Gene Ontology Group	<i>p</i> -value
Oxidation-reduction process	1.7×10^{-7}
Drug transport	1.3×10^{-5}
Cell response to oxidative stress	3.1×10^{-4}
Spore wall assembly	1.4×10^{-3}
Single organism developmental process	4.2×10^{-3}

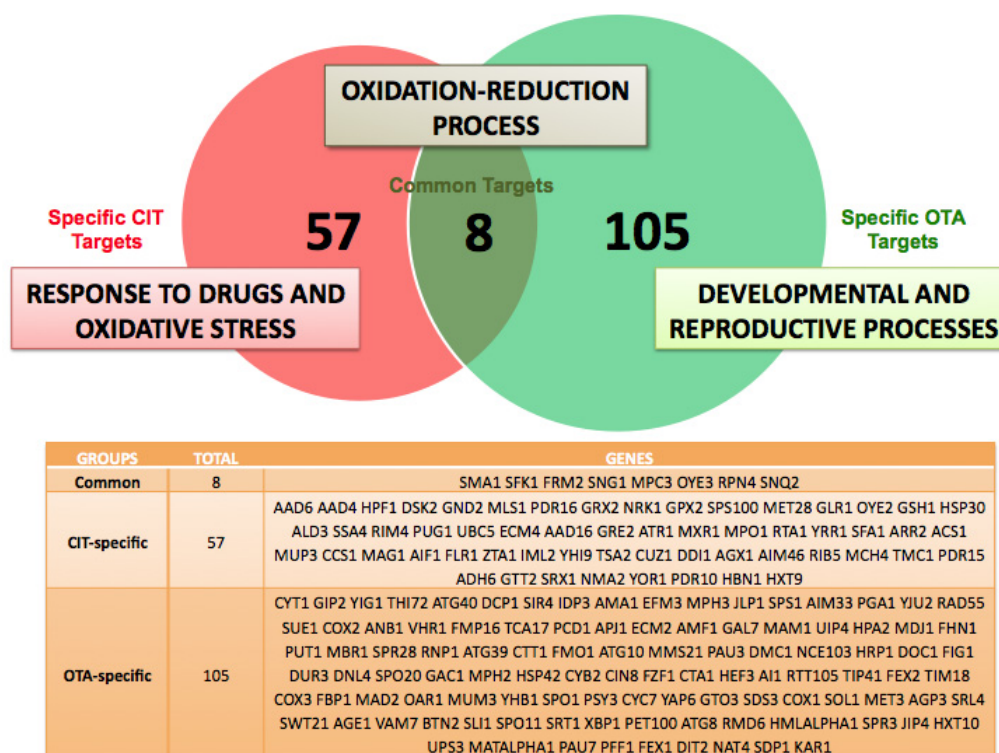


Figure 2. Ochratoxin A and citrinin activate largely nonoverlapping gene sets in the yeast genome. Venn diagram comparing the >5-fold induced transcripts of the yeast genome upon OTA and CIT exposure. The exclusively upregulated genes by one mycotoxin (CIT or OTA) and the commonly upregulated genes are depicted in the table. The main functional groups associated with each gene cluster are given.

2.3. Oxidative Stress is a Hallmark for CIT, but not OTA, Toxicity

According to our genomic expression experiments, CIT caused a specific antioxidant response in yeast cells, while antioxidant genes were only weakly induced by OTA. Additionally, CIT robustly induced the expression of a total of 7 different multidrug exporters (Flr1, Atr1, Snq2, Pdr15, Pdr10, Pdr16 and Yor1), while OTA moderately activated the expression of only the Snq2 drug exporter. We therefore wanted to quantify the importance of the antioxidant response and drug transport for the resistance to CIT or OTA. We employed specific yeast mutants with a defect in the oxidative stress adaptation (*yap1*, *skn7*) or multidrug export (*snq2*, *yor1*) and tested their resistance to CIT or OTA in comparison to wild type cells. As shown in Figure 3, the lack of the principal transcriptional activator of the oxidative stress defense Yap1 or of the multidrug transporter Snq2 rendered yeast cells hypersensitive to CIT, but not OTA. This sensitivity was observed after 8 h of toxin treatment. The deletion of a second transcription factor involved in the antioxidant response, Skn7, or an alternative multidrug exporter, Yor1, resulted in a weaker sensitivity phenotype exclusively in the case of CIT, which was observed after a prolonged toxin treatment (24 h). These data indicated that the antioxidant defense and the activated toxin export are key features for CIT detoxification, which are dispensable for the cellular defense against OTA.

We next wanted to test whether CIT and OTA caused different biological effects in the first instances of exposure. We therefore applied different live cell gene expression reporters in yeast cells to monitor transcriptional responses, which are triggered by distinct biological stimuli. Since we have previously shown that the Pdr5 drug transporter is important for the response to both CIT and OTA, we used a *PDR5*-luciferase expressing strain to monitor the induction of *PDR5*, which is activated by the accumulation of both toxins in the cell interior and not linked to a specific type of stress.

Furthermore, we recorded the activation of two additional reporters, the general stress-inducible GRE2–luciferase, and the oxidative stress-inducible AP1–luciferase fusion [42]. We obtained the complete dose-response profiles of all three reporter strains upon increasing CIT and OTA exposures (Figure 4A). The relationship between the toxin dose and the transcriptional output (A_{max}) allowed us to visualize the relative sensibilities, with which each reporter was activated by the two mycotoxins (Figure 4B), and to observe important differences. Both CIT and OTA induced the PDR5–lucCP reporter with similar dose-response kinetics. However, the stress-specific GRE2 and AP1 reporters were activated by CIT in a much more sensitive manner as compared to OTA (Figure 4B). Remarkably, the oxidative stress specific AP1–luciferase reporter remained completely uninduced even at the highest OTA concentrations. These data, together with the previous phenotypic analysis of specific yeast mutants, clearly indicated that CIT and OTA have divergent biological effects in cells. Taking together all the results presented here, CIT exposure causes strong oxidative stress, which triggers a massive transcriptional antioxidant and drug extrusion response, while OTA mainly deregulates developmental genes and only marginally induces the antioxidant defense.

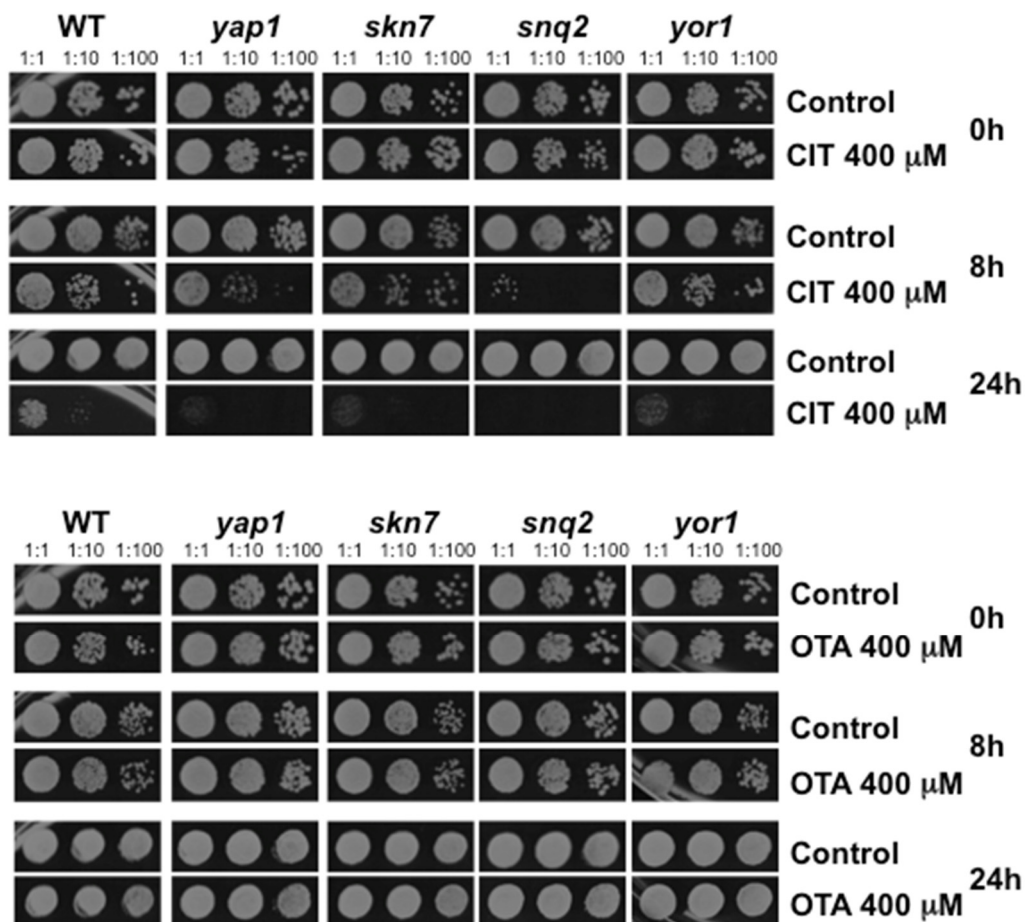


Figure 3. Citrinin, but not ochratoxin A, toxicity is exacerbated in mutants with a defective antioxidant response or multidrug export. The indicated yeast strains were treated or not with 400 μM CIT (upper panel) or 400 μM OTA (lower panel) for the indicated time. Serial dilutions 1:1, 1:10, and 1:100 of the yeast cultures were then assayed for survival on yeast extract peptone dextrose (YPD) agar plates without mycotoxins.

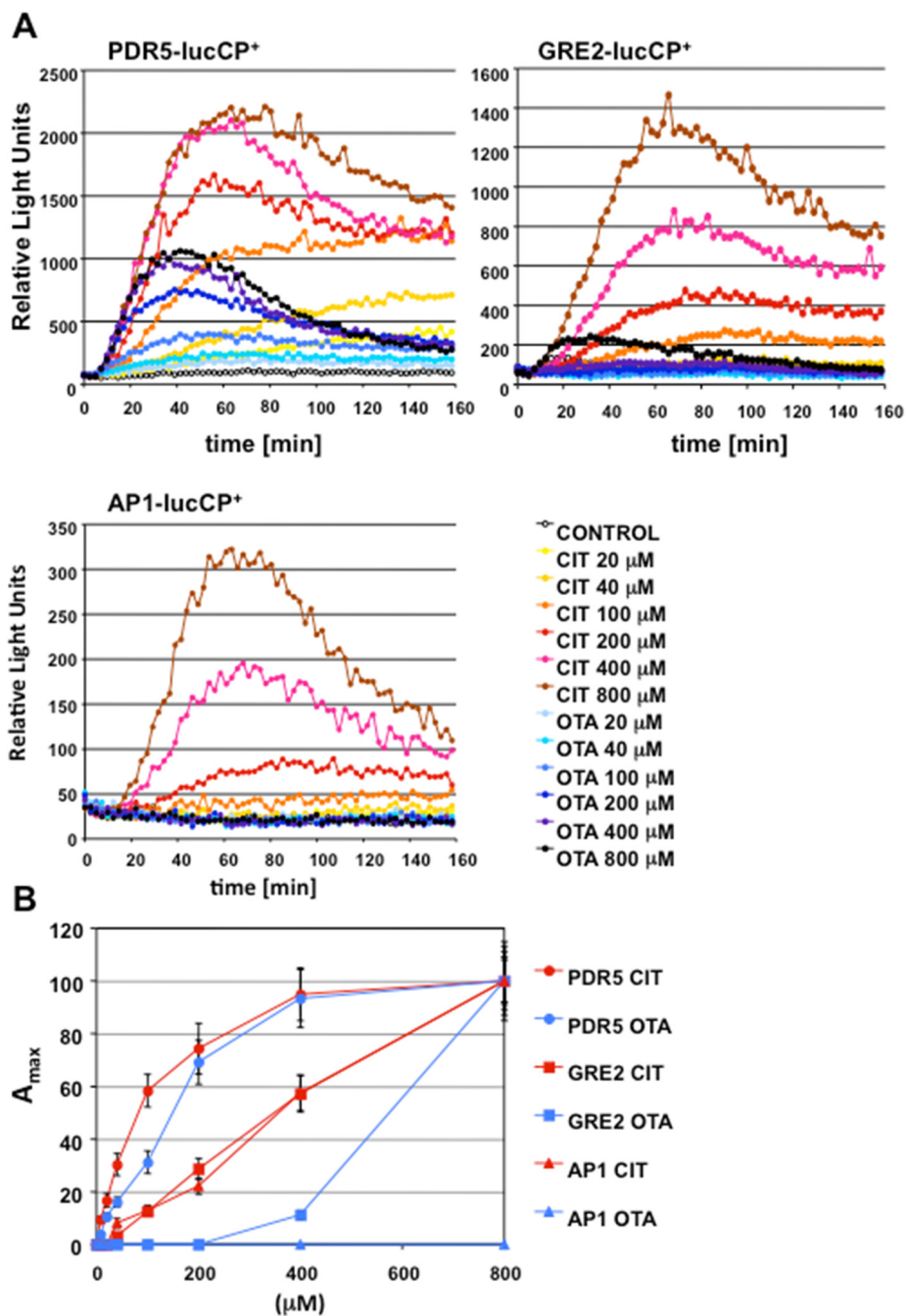


Figure 4. CIT, as opposed to OTA, induces a sensitive oxidative and general stress response in yeast cells. **(A)** OTA and CIT induction of the PDR5-, GRE2- and AP1-luciferase reporters. Live cell reporter fusions with destabilized luciferase were used in yeast wild type cells and the induction of both genes was measured in real time upon the indicated mycotoxin doses. The data are derived from three independent culture aliquots and had an error of <15%. **(B)** Dose-response profiles of the different luciferase reporters. The maximal steady-state activity (A_{max}) was calculated for each reporter strain and toxin dose and plotted against the mycotoxin concentration. A_{max} for the highest toxin exposure was arbitrarily set to 100.

3. Discussion

Here we compare the toxicity targets of the mycotoxins ochratoxin A and citrinin using yeast as a model. *Saccharomyces cerevisiae* is a very suitable organism to investigate the adaptive response

triggered by OTA and CIT, because both toxins cause rapid and profound changes in gene expression in yeast. Moreover, yeast transcriptional responses can be compared quantitatively in real time for different stress-specific reporters and additionally on a genomic scale. These approaches are thus suitable as a diagnostic tool to discern divergent and common biological effects of toxins. It is important to note that yeast cells seem to resist much higher CIT and OTA doses as compared to mammalian cells. The reasons for this might be a very efficient extrusion by multidrug transporters in this organism—which is shown here as being especially relevant for CIT detoxification—or the function of the yeast cell wall, which might serve as a primary barrier for mycotoxins. The adsorption by the yeast cell wall is actually an emerging biotechnological approach to control the concentration of different mycotoxins including OTA [43,44].

A common defense strategy of eukaryotic cells against many unrelated toxic compounds and xenobiotics is the activation of multidrug transporters at the plasma membrane [45,46]. In yeast cells, such as in other fungi and human cells, the intracellular levels of toxic molecules are directly sensed by specialized transcription factors, which in turn activate the expression of multidrug transporter genes in an attempt to physically extrude the toxic agents from the cell interior [47]. Here we take advantage of a specific drug efflux pump, Pdr5, which seems to be important for both CIT and OTA detoxification. Mutants for Pdr5 respond in a much more sensitive manner to both mycotoxins, as indicated by a more pronounced transcriptional activation of stress reporters by lower toxin concentrations. Although not tested directly, we assume that *pdr5* mutant cells accumulate higher CIT and OTA concentrations. We took advantage of this sensitivity phenotype to carry out genomic profiling experiments. The use of a hypersensitive mutant strain and the selection of optimized toxin concentrations and time points for sample preparation favored the identification of many significantly deregulated gene functions in the immediate response to both compounds. We show that the expression of the *PDR5* gene is activated by CIT and OTA with similar dose response profiles (Figure 3B). This result indicates that both mycotoxins are similarly taken up by yeast cells and that the differences in the gene expression profiles are not due to a differential intracellular accumulation of the two compounds.

Citrinin induces the expression of many different multidrug transporters, and the functional category “Drug membrane transport” is significantly enriched among the CIT target genes. Seven multidrug exporter genes are highly induced by CIT: *FLR1*, *ATR1*, *SNQ2*, *PDR15*, *PDR10*, *PDR16*, and *YOR1*. All of these transporters are localized, at least in part, at the plasma membrane. Thus the inducible active transport of CIT from the cytosol to the cell exterior is an important feature of detoxification of this mycotoxin in yeast cells. Accordingly, we detect an increased sensitivity to CIT by the loss of individual transporters such as Pdr5, Snq2 or Yor1. OTA, however, has a much weaker impact on the induction of the multidrug extrusion system, which coincides with the CIT response only in the moderate induction of the *SNQ2* gene. Of note, the yeast pleiotropic drug response is activated by the mere presence of the compound in the cell interior and also by the cytotoxic stress triggered by the compound. Thus the higher impact of CIT on the ROS balance of the cell as compared to OTA could result in a much more profound transcriptional activation of the multidrug export system.

Here we show that the predominant mechanism of CIT toxicity is the induction of oxidative stress. Moreover, oxidative stress reporters are immediately upregulated upon CIT exposure and yeast mutants with a weakened antioxidant defense are hypersensitive to this mycotoxin, which altogether suggests that the induction of ROS inside cells is a primary mode of CIT action. Our result is in agreement with a previous transcriptomic assay in yeast upon prolonged CIT treatment [41] and with several studies showing CIT induced oxidative damage in diverse cellular models from yeast to humans [26–28,30]. As a consequence, external addition of antioxidants usually alleviates CIT toxicity [25,48,49]. How, at the molecular level, CIT increases intracellular ROS levels is currently unknown, however, several studies have implied an inhibition of mitochondrial respiration in CIT-activated oxidative stress [29,31,50]. On the other hand, we demonstrate here that OTA has a much less pronounced impact on the yeast antioxidant response at the genomic level, which is further corroborated by specific oxidative stress reporters. Thus, oxidative stress might not be the primary

toxicity mechanism for this mycotoxin. This divergent impact of CIT and OTA on ROS production is in complete agreement with a recent study showing that CIT-, but not OTA-induced hepatotoxicity, is efficiently counteracted by antioxidant treatment [49]. However, the genomic response of yeast to OTA does include the upregulation of some antioxidant functions, which interestingly are different from the antioxidant genes induced by CIT. OTA induces, for example, the expression of both mitochondrial/peroxisomal and cytosolic catalases (Ctt1 and Cta1), while CIT preferentially stimulates enzymatic functions involved in glutathione metabolism (Ecm4, Glr1, Gsh1, Gtt2, and Grx2). Thus, apart from considerable differences in absolute ROS induction, it might be possible that CIT and OTA produce distinct types of reactive oxygen species. These differences are striking because CIT and OTA are structurally related mycotoxins. Both share a dihydroisocoumarin moiety as the central structure element, which is coupled to the amino acid phenylalanine in the case of OTA. However, a functional divergence has been suggested also with respect to the environmental conditions, which induce the biosynthesis of CIT or OTA in their natural producer *Penicillium verrucosum*. Here different stress conditions, such as oxidative or salt stress, have been shown to differentially favor the production of one mycotoxin over the other [19,20].

Despite a large scientific effort, the critical mechanism underlying OTA cytotoxicity still remains unknown. Oxidative stress has been widely implied in OTA action [15], but it certainly cannot explain the carcinogenic properties of this mycotoxin. Here we confirm that OTA is able to trigger an antioxidant response in yeast, however, ROS production is not the principle effect of OTA. This is in agreement with recent studies, which demonstrate in rats that renal carcinogenicity and cell cycle aberrations caused by OTA cannot be explained by oxidative damage [51,52]. Here we show that OTA treatment causes a general deregulation of developmental genes in yeast. This effect is OTA-specific and is not observed upon CIT exposure. The affected gene functions are related to the processes of meiosis and sporulation, which are normally tightly repressed in haploid yeast cells such as the strains used here for the transcriptomic experiments. Therefore, OTA seems to cause a genomic reprogramming of a developmental process, which is normally exclusively triggered in diploid yeast cells upon the appropriate environmental stimuli [53,54]. A tight epigenetic control, composed of specific DNA-binding factors which recruit histone deacetylases such as the Hst1 sirtuin to meiotic and sporulation genes, are known in yeast to assure repression of these developmental genes in haploid cells [55–57]. How OTA can interfere with the epigenetic control of silenced genes in yeast is currently only speculative, but opens an emerging research towards the biological function of this mycotoxin. This is of outstanding importance because the interference with gene silencing and the function of sirtuin histone deacetylases are hallmarks in the reprogramming of cancer cells [58,59] and thus could provide insights into the carcinogenic function of OTA. Taken together, our results demonstrate divergent biological effects of two related mycotoxins, which will be important for understanding their toxicity mechanisms at the molecular level.

4. Materials and Methods

4.1. Yeast Strains and Growth Conditions

Saccharomyces cerevisiae strains used in this study were: wild type BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) and the mutant alleles *yap1::KanMX4*; *skn7::KanMX4*; *yor1::KanMX4*; *pdr5::KanMX4*; *snq2::KanMX4*. For luciferase assays the cells were transformed with the respective lucCP⁺ fusion plasmids and grown in synthetic dextrose (SD) medium which contained 0.67% yeast nitrogen base, 50 mM succinic acid pH 5.5, 2% dextrose, 100 mg/L methionine, 100 mg/L leucine, and 25 mg/L uracil. For CIT and OTA sensitivity assays on agar plates, the respective yeast strains were grown in SD liquid medium containing 2% dextrose to exponential growth phase and then incubated with 400 μM of CIT or OTA for the indicated time in small culture aliquots in multiwell plates at 28 °C. Citrinin and ochratoxin A were purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA), and stock solutions were prepared with DMSO as the solvent.

4.2. Plasmid Constructions

The destabilized luciferase reporter fusions with the natural *GRE2* or *SOD2* promoters are described elsewhere [60,61]. Briefly, the *GRE2*-lucCP⁺ fusion contains the upstream 940 nucleotides of the *GRE2* gene fused with the destabilized luciferase lucCP⁺ gene in a centromeric *HIS3*-containing yeast expression plasmid. The *SOD2*-lucCP⁺ fusion contains the upstream 977 nucleotides of the *SOD2* gene in the same vector backbone. The AP-1-specific destabilized luciferase reporter is described in [60]. Briefly, it contains a triple insertion of the AP-1 promoter element in the *CYC1* core promoter fused to lucCP⁺ in centromeric *HIS3*-containing yeast expression plasmids. A PDR5-luciferase expressing reporter strain was created by integrative transformation of a PDR5-lucCP⁺-Kan MX DNA cassette into yeast wild type strain BY4741 to replace the endogenous *PDR5* gene with the destabilized luciferase gene.

4.3. Live Cell Luciferase Assays

Yeast strains transformed with the respective luciferase reporter plasmids were grown at 28 °C overnight in SD medium to OD = 2 at 600 nm. The culture volume necessary for the entire luciferase assay was incubated on a roller at 28 °C for 90 min with 0.5 mM luciferin (Synchem, Felsberg, Germany) from a 10 mM stock solution in Dimethylsulfoxide. The culture was then distributed in 120 µL aliquots in white 96-well plates (Nunc, Penfield, NY, USA) and growing concentrations of CIT or OTA were added from a stock solution in DMSO. In Figure 1, 200 µM (= 50 ppm), 800 µM (= 200 ppm), and 1600 µM (= 400 ppm) of CIT and 124 µM (= 50 ppm), 497 µM (= 200 ppm), and 994 µM (= 400 ppm) of OTA were applied. Additionally, a constant dose of 200 µM (= 50 ppm) of CIT was combined with growing OTA concentrations (124 µM (= 50 ppm), 497 µM (= 200 ppm), and 994 µM (= 400 ppm)). In Figure 3, 20 µM, 40 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, and 800 µM of CIT or OTA were used. The mock-treated samples contained the same concentration of solvent without the mycotoxin. The light emission from the culture aliquots was continuously recorded in a GloMax Multidetector System (Promega, Madison, WI, USA) in the luminometer mode. Data were normalized for the absolute number of cells used in the assay and processed in Microsoft Excel (2010). For each condition, three independent culture aliquots were analyzed. The maximal luciferase activity depicted in Figures 1C and 4B was calculated by correcting the maximal light emission for each treatment with the value obtained for the mock-treated culture.

4.4. Yeast Sensitivity Assays

For plate assays, the yeast strains under study were grown in SD liquid medium to exponential growth phase. 1:1, 1:10 and 1:100 dilutions of culture aliquots were then distributed in multiwell plates and exposed for the indicated time to CIT or OTA added from stock solutions in DMSO. Equal amounts of cells were then plated on fresh yeast extract peptone dextrose (YPD) agar plates, which were incubated at 28 °C for 2 days.

4.5. Microarray Experiments and Analysis

For the comparison of the transcriptome upon various mycotoxin treatments, the *pdr5* mutant strain was used. Cells were grown in SD medium until exponential phase and then subjected to four different toxin treatments: control (mock treated with solvent), CIT (200 ppm for 60 min), OTA (200 ppm for 30 min), and a combination of both mycotoxins CIT/OTA (100 ppm each for 30 min). Total RNA was prepared from four independent culture aliquots for each condition using the acid phenol extraction method. Total RNA was further purified with the RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The samples were labeled using the one-color method with Cy3 fluorophore, hybridized to Agilent Yeast Gene Expression 8 × 15 K microarrays, and scanned with Agilent DNA Microarray Scanner (G2505B, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Raw data were obtained using the Feature Extraction software 9.5.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 2007). These procedures

were performed by the Genomic Service of the Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, Valencia, Spain). Data analysis was performed using GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Data were normalized using the quantile method and then statistically analyzed with the Student *t*-Test. Significant differences in gene expression were selected using a *p*-value < 0.05. To avoid the detection of false positives, a multiple testing correction (Bonferroni FWER) was applied to obtain corrected *p*-values. The complete dataset from all transcriptomic experiments of this publication has been assigned accession number GSE84187 in the Gene Expression Omnibus (GEO) Database. Significantly enriched functional gene groups were identified with the YeastMine Gene Ontology (GO) search option of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database (SGD).

Acknowledgments: We thank Lorena Latorre and Javier Forment for their help with the microarray experiments and data analysis. This work was funded only in the initial phase by a grant from Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-23326). We thank the Fond for Open Access Publication from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) for supporting publication costs of this article.

Author Contributions: M.P. and A.P.-A. conceived and designed the experiments; E.V.-P. performed the experiments; E.V.-P., M.P. and A.P.-A. analyzed the data; M.P. and A.P.-A. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Marroquin-Cardona, A.G.; Johnson, N.M.; Phillips, T.D.; Hayes, A.W. Mycotoxins in a changing global environment—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *69*, 220–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Moretti, A.; Susca, A.; Mule, G.; Logrieco, A.F.; Proctor, R.H. Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 57–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wu, F.; Groopman, J.D.; Pestka, J.J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, *5*, 351–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mobius, N.; Hertweck, C. Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2009**, *12*, 390–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Doi, K.; Uetsuka, K. Mechanisms of Mycotoxin-induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis through Oxidative Stress-related Pathways. *J. Toxicol. Pathol.* **2014**, *27*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Escriva, L.; Font, G.; Manyes, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food. Chem. Toxicol.* **2015**, *78*, 185–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Vettorazzi, A.; Gonzalez-Penas, E.; de Cerain, A.L. Ochratoxin A kinetics: A review of analytical methods and studies in rat model. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 273–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Wang, Y.; Wang, L.; Liu, F.; Wang, Q.; Selvaraj, J.N.; Xing, F.; Zhao, Y.; Liu, Y. Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Koszegi, T.; Poor, M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins* **2016**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Faucet, V.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Dai, J.; Castegnaro, M.; Manderville, R.A. Evidence for covalent DNA adduction by Ochratoxin A following chronic exposure to rat and subacute exposure to pig. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1289–1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mantle, P.G.; Faucet-Marquis, V.; Manderville, R.A.; Squillaci, B.; Pfohl-Leszkowicz, A. Structures of covalent adducts between DNA and Ochratoxin A: A new factor in debate about genotoxicity and human risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pfohl-Leszkowicz, A.; Manderville, R.A. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin a carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 252–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rahimtula, A.D.; Bereziat, J.C.; Bussacchini-Griot, V.; Bartsch, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 4469–4477. [[CrossRef](#)]
15. Sorrenti, V.; di Giacomo, C.; Acquaviva, R.; Barbagallo, I.; Bognanno, M.; Galvano, F. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: A review. *Toxins* **2013**, *5*, 1742–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Bragulat, M.R.; Martinez, E.; Castella, G.; Cabanes, F.J. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. *Int. J. Food. Microbiol.* **2008**, *126*, 43–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Vrabcheva, T.; Usleber, E.; Dietrich, R.; Martlbauer, E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 2483–2488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ostry, V.; Malir, F.; Ruprich, J. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. *Toxins* **2013**, *5*, 1574–1586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schmidt-Heydt, M.; Graf, E.; Stoll, D.; Geisen, R. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food Microbiol.* **2012**, *29*, 233–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Schmidt-Heydt, M.; Stoll, D.; Schutz, P.; Geisen, R. Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *192*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Stoll, D.; Schmidt-Heydt, M.; Geisen, R. Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. *Toxins* **2013**, *5*, 1282–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Flajs, D.; Peraica, M. Toxicological properties of citrinin. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **2009**, *60*, 457–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bouslimi, A.; Ouannes, Z.; Golli, E.E.; Bouaziz, C.; Hassen, W.; Bacha, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin a and citrinin: Individual and combined effects. *Toxicol. Mech. Methods* **2008**, *18*, 341–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chan, W.H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells, and causes developmental injury in blastocysts. *Biochem. J.* **2007**, *404*, 317–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kumar, M.; Dwivedi, P.; Sharma, A.K.; Sankar, M.; Patil, R.D.; Singh, N.D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Toxicol. Ind. Health* **2014**, *30*, 90–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kumar, R.; Dwivedi, P.D.; Dhawan, A.; Das, M.; Ansari, K.M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. *Toxicol. Sci.* **2011**, *122*, 557–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mate, G.; Gazdag, Z.; Mike, N.; Papp, G.; Pocsi, I.; Pesti, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon* **2014**, *90*, 155–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Pascual-Ahuir, A.; Vanaclouig-Pedros, E.; Proft, M. Toxicity mechanisms of the food contaminant citrinin: Application of a quantitative yeast model. *Nutrients* **2014**, *6*, 2077–2087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ribeiro, S.M.; Chagas, G.M.; Campello, A.P.; Kluppel, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell. Biochem. Funct.* **1997**, *15*, 203–209. [[CrossRef](#)]
30. Singh, N.D.; Sharma, A.K.; Dwivedi, P.; Leishangthem, G.D.; Rahman, S.; Reddy, J.; Kumar, M. Effect of feeding graded doses of citrinin on apoptosis and oxidative stress in male Wistar rats through the F1 generation. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32*, 385–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yu, F.Y.; Liao, Y.C.; Chang, C.H.; Liu, B.H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. *Toxicol. Lett.* **2006**, *161*, 143–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Follmann, W.; Behm, C.; Degen, G.H. Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1097–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Klaric, M.S.; Rasic, D.; Peraica, M. Deleterious effects of mycotoxin combinations involving ochratoxin A. *Toxins* **2013**, *5*, 1965–1987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Afshari, C.A.; Hamadeh, H.K.; Bushel, P.R. The evolution of bioinformatics in toxicology: Advancing toxicogenomics. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120* (Suppl. 1), S225–S237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yasokawa, D.; Iwahashi, H. Toxicogenomics using yeast DNA microarrays. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *110*, 511–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Arbillaga, L.; Azqueta, A.; van Delft, J.H.; Lopez de Cerain, A. In vitro gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *220*, 216–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Hibi, D.; Kijima, A.; Kuroda, K.; Suzuki, Y.; Ishii, Y.; Jin, M.; Nakajima, M.; Sugita-Konishi, Y.; Yanai, T.; Nohmi, T.; et al. Molecular mechanisms underlying ochratoxin A-induced genotoxicity: Global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression. *J. Toxicol. Sci.* **2013**, *38*, 57–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hundhausen, C.; Boesch-Saadatmandi, C.; Matzner, N.; Lang, F.; Blank, R.; Wolffram, S.; Blaschek, W.; Rimbach, G. Ochratoxin A lowers mRNA levels of genes encoding for key proteins of liver cell metabolism. *Cancer Genom. Proteom.* **2008**, *5*, 319–332.
39. Marin-Kuan, M.; Nestler, S.; Verguet, C.; Bezencon, C.; Piguët, D.; Mansourian, R.; Holzwarth, J.; Grigorov, M.; Delatour, T.; Mantle, P.; et al. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin A carcinogenicity in rat. *Toxicol. Sci.* **2006**, *89*, 120–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Vettorazzi, A.; van Delft, J.; Lopez de Cerain, A. A review on ochratoxin A transcriptomic studies. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *59*, 766–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Iwahashi, H.; Kitagawa, E.; Suzuki, Y.; Ueda, Y.; Ishizawa, Y.H.; Nobumasa, H.; Kuboki, Y.; Hosoda, H.; Iwahashi, Y. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray. *BMC Genomics* **2007**, *8*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Toone, W.M.; Morgan, B.A.; Jones, N. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* **2001**, *20*, 2336–2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Luo, Y.; Wang, J.; Liu, B.; Wang, Z.; Yuan, Y.; Yue, T. Effect of yeast cell morphology, cell wall physical structure and chemical composition on patulin adsorption. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Piotrowska, M.; Masek, A. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin A decontamination. *Toxins* **2015**, *7*, 1151–1162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jungwirth, H.; Kuchler, K. Yeast ABC transporters—A tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1131–1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Prasad, R.; Goffeau, A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, *66*, 39–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Thakur, J.K.; Arthanari, H.; Yang, F.; Pan, S.J.; Fan, X.; Breger, J.; Frueh, D.P.; Gulshan, K.; Li, D.K.; Mylonakis, E.; et al. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature* **2008**, *452*, 604–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Chen, C.C.; Chan, W.H. Inhibition of citrinin-induced apoptotic biochemical signaling in human hepatoma G2 cells by resveratrol. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3338–3357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Gayathri, L.; Dhivya, R.; Dhanasekaran, D.; Periasamy, V.S.; Alshatwi, A.A.; Akbarsha, M.A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *83*, 151–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Aleo, M.D.; Wyatt, R.D.; Schnellmann, R.G. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1991**, *109*, 455–463. [[CrossRef](#)]
51. Qi, X.; Yu, T.; Zhu, L.; Gao, J.; He, X.; Huang, K.; Luo, Y.; Xu, W. Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2014**, *280*, 543–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Taniai, E.; Yafune, A.; Nakajima, M.; Hayashi, S.M.; Nakane, F.; Itahashi, M.; Shibutani, M. Ochratoxin A induces karyomegaly and cell cycle aberrations in renal tubular cells without relation to induction of oxidative stress responses in rats. *Toxicol. Lett.* **2014**, *224*, 64–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Govin, J.; Berger, S.L. Genome reprogramming during sporulation. *Int. J. Dev. Biol.* **2009**, *53*, 425–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Winter, E. The Sum1/Ndt80 transcriptional switch and commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, *76*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Grunstein, M.; Gasser, S.M. Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Pijnappel, W.W.; Schaft, D.; Roguev, A.; Shevchenko, A.; Tekotte, H.; Wilm, M.; Rigaut, G.; Seraphin, B.; Aasland, R.; Stewart, A.F. The *S. cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2991–3004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Xie, J.; Pierce, M.; Gailus-Durner, V.; Wagner, M.; Winter, E.; Vershon, A.K. Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **1999**, *18*, 6448–6454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Chalkiadaki, A.; Guarente, L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 608–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Roth, M.; Chen, W.Y. Sorting out functions of sirtuins in cancer. *Oncogene* **2014**, *33*, 1609–1620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Dolz-Edo, L.; Rienzo, A.; Poveda-Huertes, D.; Pascual-Ahuir, A.; Proft, M. Deciphering dynamic dose responses of natural promoters and single cis elements upon osmotic and oxidative stress in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 2228–2240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Rienzo, A.; Pascual-Ahuir, A.; Proft, M. The use of a real-time luciferase assay to quantify gene expression dynamics in the living yeast cell. *Yeast* **2012**, *29*, 219–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).