

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

NUEVAS APLICACIONES DE LA MONITORIZACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LEVADURA: RESPUESTA A ÁCIDOS ORGÁNICOS Y REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CRISTINA ARÉVALO DOMÍNGUEZ

TUTOR/A: AMPARO PASCUAL-AHUIR GINER

COTUTOR/A: MARKUS PROFT

Curso académico: 2018/2019

VALENCIA, JULIO 2019

Título: Nuevas aplicaciones de la monitorización en tiempo real de la expresión génica en levadura: Respuesta a ácidos orgánicos y regulación del ciclo celular

Resumen:

La levadura es un modelo celular para comprender los mecanismos moleculares que emplean las células eucariotas para adaptarse a estreses químicos. Un importante mecanismo de señalización es el reconocimiento directo del compuesto químico por factores de transcripción que lleva a la activación de la expresión génica de diversos transportadores del tipo multidroga. En levadura existe una familia de activadores transcripcionales del tipo zinc-cluster que se dedican al reconocimiento de diferentes compuestos xenobióticos. Ácidos orgánicos como el ácido acético, sórbico o benzoico activan el sistema multidroga en levadura. En este proyecto queremos cuantificar de forma dosis-dependiente la respuesta a los tres ácidos con reporteros de luciferasa desestabilizada. Además, se investigará la función de factores de transcripción particulares (como Pdr1, Pdr3 y otros) en este proceso. El empleo de mutantes para estos activadores en ensayos de supervivencia nos indicará la función fisiológica de cada factor.

Por otra parte, se pretende crear nuevas herramientas basadas en luciferasas desestabilizadas para la monitorización del ciclo celular durante las respuestas a estrés. Durante la adaptación a estrés químico se para transitoriamente el ciclo celular hasta la efectiva adaptación. Por lo tanto, la cuantificación de las células que reanudan el ciclo celular después de un insulto químico nos puede proporcionar una manera de cuantificar la eficiencia de su adaptación. Se fusionarán varios promotores naturales regulados por el ciclo celular, por ejemplo, *CLN1*, o regulados específicamente en células hijas, por ejemplo, *DSE2*, con el gen de luciferasa. Se comprobarán estas construcciones plasmídicas en levadura durante la adaptación a diferentes tipos y grados de estrés.

Palabras clave: Respuesta multidroga; adaptación a estrés; expresión génica; ciclo celular; Luciferasa desestabilizada; *Saccharomyces cerevisiae*.

Alumna: Dña. Cristina Arévalo Domínguez

Localidad y fecha: Valencia, julio de 2019

Tutora: Prof. Dña. Amparo Pascual-Ahuir Giner

Cotutor: D. Markus Proft

Title: New applications of the real-time monitorization of gene expression in yeast: Response to organic acids and cell cycle regulation

Summary:

Yeast is a cellular model to understand the molecular mechanism of the adaptation of eukaryotic cells to chemical stresses. An important signalling mechanism is the direct recognition of the chemical compound by transcriptional factors that leads to the activation of the gene expressions of various multidrug transporters. In yeast there is a family of transcriptional activator of the zinc-cluster type that are engaged in the recognition of different xenobiotic compounds. Organic acids such as acetic, sorbic or benzoic acid activate the multidrug system in yeast. In this project we want to quantify in a dose-dependent manner the response to the three acids with reporters of destabilized luciferase. In addition, the function of particular transcription factors (such as, Pdr1, Pdr3, and others) will be investigated in this process. The use of mutants for these activators in survival trials will indicate the physiological function of each factor.

On the other hand, we intend to create new tools based on destabilized luciferases for the monitorization of the cell cycle upon stress exposure. During the adaptation to chemical stress, the cell cycle is temporarily stopped until the effective adaptation. Therefore, the quantification of cells that resume the cell cycle after a chemical insult can provide us with a way to quantify the efficiency of their adaptation. Several natural promoters regulated by the cell cycle, for example, *CLN1*, or specifically regulated in daughter cells, for example, *DSE2*, will be fused with the luciferase gene. These plasmid constructions will be functionally tested in yeast during the adaptation to different types and degrees of stress.

Key words: multidrug response; stress adaptation; gene expression; cell cycle; destabilized luciferase; *Saccharomyces cerevisiae*.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi tutor Markus, todo el tiempo, dedicación y paciencia que ha tenido conmigo, y por enseñarme a apreciar los pequeños logros conseguidos, con esa frase en una mañana de laboratorio: “Hay que aprender que también forma parte de la investigación el frustrarse porque no te salgan las cosas y alegrarse por los logros, por pequeños que sean. No es bueno pasar de todo, ni frustrarse por todo, se debe buscar el equilibrio”.

Gracias también, a mi familia, por acompañarme siempre y permitir que aprenda tropezando, pero dejándome ser. Mamá, a ti, gracias por todo, que te voy a decir, si te debo la vida. Y a mis hermanas, que, sin vosotras, soy, pero con vosotras, mejor.

Y por último, a mis niñxs que me ha dado esta carrera y mi paso por Valencia, gracias por confiar siempre en mí, sois muy grandes.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Expresión génica en respuesta a estrés	1
1.1.1. Efecto de ácidos débiles	3
1.2. Respuesta multidroga.....	3
1.3. Sistema luciferasa desestabilizada	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Cepas	8
3.1.1. Bacterias.....	8
3.1.2. Levaduras	8
3.2. Medios de cultivo	9
3.2.1. Bacterias.....	9
3.2.2. Levaduras	9
3.3. Diseño de cebadores	10
3.4. Construcción de plásmidos	10
3.4.1. Aislamiento ADN cromosómico de levadura	10
3.4.2. PCR y purificación.....	11
3.4.3. Propagar plásmidos en <i>E. coli</i> y purificación.....	11
3.4.4. Digestión con enzima de restricción	11
3.4.5. Ligación vector e inserto	12
3.5. Transformación de bacterias.....	12
3.6. Secuenciación	12
3.7. Transformación de levaduras.....	13
3.8. Preparación disolución ácidos orgánicos y NaCl.....	13
3.9. Medida de actividad luciferasa a tiempo real frente a ácidos orgánicos y NaCl	14
3.10. Estudio de sensibilidad frente a ácidos orgánicos	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Sensibilidad de cepas de levadura con reportero 3xPDRE-lucCP⁺ a ácidos orgánicos ..	16
4.2. Papel de factores de transcripción de tipo multidroga en respuesta a ácidos orgánicos	18
4.2.1. Respuesta a ácido sórbico	18
4.2.2. Respuesta a ácido benzoico	21
4.3. Ensayo de crecimiento de cepas mutantes para los FT estudiados frente a diferentes estreses por ácidos orgánicos	24

4.3.1. Ácido acético	24
4.3.2. Ácido benzoico	25
4.4. Construcciones con promotor de interés fusionado al gen de la luciferasa	27
4.5. Aplicación de las construcciones generadas a la respuesta a estrés osmótico	29
5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del sistema PDR (Pleotropic Drug Resistance) en levadura.....	4
Figura 2. Proteínas zinc-cluster involucradas en la red PDR en <i>S. cerevisiae</i>	5
Figura 3. Esquema del funcionamiento del sistema luciferasa a nivel molecular.....	6
Figura 4. Representación esquemática de la construcción lucCP ⁺ de luciferasa.....	6
Figura 5. Comportamiento dosis-respuesta de elementos PDRE en respuesta a ácido acético, sórbico y benzoico obtenido a través del sistema luciferasa.....	17
Figura 6. Respuesta de diferentes FT del sistema PDR a ácido sórbico.....	20
Figura 7. Respuesta de diferentes FT del sistema PDR a ácido benzoico.....	23
Figura 8. Caracterización del crecimiento de cepas mutantes para varios FT frente a ácido acético.....	25
Figura 9. Caracterización del crecimiento de cepas mutantes para varios FT frente a ácido benzoico.....	26
Figura 10. Esquema del proceso para la creación de una construcción con un promotor fusionado al gen de la luciferasa desestabilizada.....	28
Figura 11. Comportamiento dosis-respuesta de promotores relacionados con el ciclo celular, la división de célula hija y de estrés en general.....	31
Figura 12. Representación dinámica de la expresión de los promotores para diferentes concentraciones de NaCl.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de levadura utilizadas en este estudio.....	8
Tabla 2. Descripción de los promotores estudiados según SGD.....	27

ABREVIATURAS

ABC: Sitio de unión del ATP (*ATP-binding cassette*)

AD: Dominio de activación

Ade: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

amp: Ampicilina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

DBD: Dominio de unión al ADN

DMSO: Dimetilsulfóxido

E. coli: *Escherichia coli*

ESR: Respuesta de estrés ambiental (*Environmental stress response*)

FT: Factor de transcripción

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green fluorescence protein*)

His: Histidina

HSE: Elementos de respuesta al choque-térmico (*Heat shock element*)

kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

Leu: Leucina

MDR: Resistencia multidroga (*Multidrug resistance*)

Met: Metionina

MFS: Familia facilitadora principal (*Major facilitator superfamily*)

min: Minuto

OD: Densidad óptica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDR: Resistencia pleiotrópica a drogas (*Pleiotropic drug resistance*)

PDRE: Elementos de resistencia pleiotrópica a drogas (*Pleiotropic Drug Resistance Element*)

PEG: Polietilenglicol

rpm: Revoluciones por minuto

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SD: Medio de cultivo "Synthetic Dextrose"

SGD: Base de datos de *Saccharomyces cerevisiae*

STRE: Elemento de respuesta a estrés (*Stress responsive element*)

Ura: Uracilo

WT: Cepa silvestre (*Wild type*)

XBD: Dominio de unión a xenobióticos

YPD: Medio de cultivo "Yeast-extract-Peptone-Dextrose"

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos presentan mecanismos que les permiten adaptarse a las constantes fluctuaciones que tienen lugar en su entorno y que, a menudo, son capaces de perturbar la homeostasis celular y causar daño molecular, generando un estrés. Esos mecanismos, que implican la detección de los cambios ambientales y la transducción de la señal de estrés, dan como resultado la regulación de los procesos celulares mediante la modulación de proteínas ya existentes y la inducción transcripcional de un conjunto de genes cuyos productos contrarrestan la tensión inicial y reparan o eliminan el daño molecular causado por esa tensión. (Brown *et al.*, 2017; Gasch y Werner-Washburne, 2002; de Nadal y Posas, 2015)

Los diferentes estreses ambientales pueden darse debido a variaciones en la temperatura, pH, la disponibilidad de nutrientes, la presencia de tóxicos (fármacos, iones metálicos o agentes oxidantes), debido a sales o choques osmóticos, etc., y generan cambios rápidos en la expresión génica de las células para que sean capaces de adaptarse y sobrevivir a las nuevas condiciones, recuperando de nuevo el estado de equilibrio (Hohmann, 2002; Soontornngun, 2017; Sousa et al., 2012)

Los organismos multicelulares presentan órganos y tejidos especializados que les proporcionan un entorno interno relativamente estable, mientras que los organismos unicelulares, como levaduras, han desarrollado mecanismos autónomos para adaptarse a cambios ambientales drásticos. Estas soportan fluctuaciones dependiendo de los tipos y cantidades de nutrientes disponibles, temperatura, osmolaridad y acidez del medio. (Gasch *et al.*, 2000).

Las levaduras comparten estructura celular y ciclo de vida con eucariotas multicelulares como plantas y animales, y muchos de los genes de levaduras están relacionados evolutivamente y funcionalmente con los genes de eucariotas superiores. Además, al ser microorganismos no patógenos y no móviles, se propagan y manipulan fácilmente en el laboratorio. (Mell y Burgess, 2002).

Estas propiedades han convertido a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) en un organismo adecuado para llevar a cabo una amplia gama de estudios biológicos, como potente modelo de organismos eucariotas (Leskinen *et al.*, 2003). En este caso, la levadura es un excelente modelo para observar el impacto de los cambios ambientales, la adaptación transcripcional tanto a escala genómica como específica de gen, y, además, caracterizar los eventos moleculares que conducen a la activación de la expresión génica específica del estímulo. (Dolz-Edo *et al.*, 2013; Gasch *et al.*, 2000; Rienzo *et al.*, 2012). Además, fue el primer organismo eucariota secuenciado y, actualmente, presenta el genoma eucariota más conocido.

1.1. Expresión génica en respuesta a estrés

Las células eucariotas han desarrollado mecanismos de detección y sistemas de transducción de señales que les permite generar un conjunto de cambios funcionales, dinámicos y precisos en respuesta al estrés, siendo muy importantes las producidos en la expresión génica, que les permite recuperar la homeostasis celular. (de Nadal *et al.*, 2011).

Entre estos cambios encontramos, por una parte, la reducción de las actividades relacionadas con la proliferación celular y la síntesis de proteínas, las vías anabólicas y procesos asociados con alto gasto de energía. Por otra parte, aumento de actividades relacionadas con la protección

y reparación del daño de diferentes moléculas y estructuras celulares (Sousa *et al.*, 2012; Gasch *et al.*, 2000). Además, en el caso de estrés químico, la respuesta de adaptación celular suele basarse en el bombeo de la sustancia tóxica fuera de la célula mediante transportadores o en la activación de enzimas detoxificadoras que degraden esos compuestos (Vanacloig-Pedros, 2018).

Los procesos implicados en las respuestas de adaptación se componen de respuestas genéricas para muchos tipos de estreses y respuestas específicas de un tipo de estrés en particular. Ambas, actúan generando efectos postraduccionales, con respuestas inmediatas, y regulando la expresión génica que será necesaria para las respuestas más lentas y prolongadas de adaptación y recuperación (de Nadal *et al.*, 2011), lo que podría ocasionar una adaptación evolutiva al desarrollar nuevas variaciones fenotípicas en las células. (Vanacloig-Pedros, 2018). Mayoritariamente, la activación de la expresión de estos genes de defensa se produce de forma rápida y transitoria. Así, a través de perfiles genómicos se conoce que cientos de genes son sensibles a estreses osmóticos y oxidativos en levaduras (Gasch *et al.*, 2000). El cambio en los perfiles de expresión génica tiene lugar en los primeros minutos de exposición al estrés, se debe tener en cuenta la velocidad de inducción y la duración de la respuesta con el objetivo de optimizar la supervivencia a ese estrés. (Nadal *et al.*, 2011)

Varios estudios mostraron que la reorganización a nivel genómico en levadura ante distintos estreses llega a implicar, aproximadamente, el 10% de su genoma. Entre ellos se incluyen tanto genes sobreexpresados conocidos como, genes de estrés ambiental (ESR) de respuesta general, que no son específicos para un estrés en particular, y otros genes de defensa que son activados exclusivamente por un estrés específico (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000).

Los mecanismos generales de respuesta a estrés explican la idea de “protección cruzada” que se da debido a que la inducción a la tolerancia de un estrés, puede provocar la tolerancia a otros tipos de estreses. En este contexto, se descubrió una secuencia consenso, que regula la expresión de esos genes, en los promotores de diversos genes de respuesta a diferentes estreses, conocida como STRE (Stress Responsive Element) (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Este elemento es reconocido por dos factores de transcripción (FT) Msn2p y Msn4p, proteínas homólogas de la familia de dedos de zinc. En condiciones normales de crecimiento, los FT se encuentran en el citoplasma donde son secuestrados impidiendo que activen sus genes diana. En cambio, en situación de estrés, son hiperfosforilados y traslocados al núcleo gracias a la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico (AMPC). (Beck y Hall, 1999; Gerner *et al.*, 1998; Folch-Mallol *et al.*, 2004).

Los mecanismos específicos de respuesta a estrés son característicos de cada tipo de estrés, por ejemplo, una modificación de la temperatura adecuada, genera elementos de choque-térmico (HSE) que se unen al FT de choque-térmico que será activado al acumularse proteínas anormales inducidas por ese cambio en la temperatura. Así como, en el estrés osmótico, la proteína quinasa Hog1 permitirá la adaptación a este estrés, a través de varios FT específicos (Sko1, Hot1, Smp1...) (Ruis y Schüller, 1995).

Según Radmaneshfar *et al.* (2013) en presencia de un estrés, como el osmótico, la progresión del ciclo celular se retrasa o para temporalmente hasta que se produce la adaptación adecuada al mismo. Este retraso depende de la dosis de estrés, de la etapa del ciclo en la que se encuentre la célula y de la tolerancia de las células al mismo. Por esto, es interesante disponer de reporteros involucrados en la reiniciación del ciclo, como *CLN1*, y la primera hija (*CTS1*, *DSE2* y

SCW11) tras la adaptación al estrés, así se podría comparar las sensibilidades entre ellos, es decir, comparar los diferentes comportamientos.

1.1.1. Efecto de ácidos débiles

Es importante conocer la respuesta adaptativa de *S. cerevisiae* frente a ácidos débiles, como ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico, entre otros. Estos son generalmente, conservantes alimentarios que inhiben el crecimiento de células microbianas (Kim *et al.*, 2019).

Los ácidos débiles se encuentran mayormente en forma no disociada cuando el pH extracelular es bajo, por lo que pueden penetrar en la célula fácilmente donde se disocian. Esta disociación genera protones y contraiones asociados, que al acumularse en el interior pueden provocar cierta toxicidad, y activan mecanismos de defensa contra el estrés producido por estos. Entre estos mecanismos, se encuentra la activación de las proteínas ATPasas de la membrana plasmática, y los transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (Mira *et al.*, 2010).

Sin embargo, los efectos citotóxicos y los genes inducidos difieren dependiendo del ácido. En *S. cerevisiae*, los FT Msn2, Msn4, War1, Haa1... están involucrados en la respuesta al estrés por ácidos débiles. De manera específica, War1 está involucrado en la protección de la célula frente a ácidos débiles lipófilos, como ácido sórbico y ácido benzoico, siendo un FT de tipo zinc-cluster, localizado en el núcleo, incluso cuando no hay estrés (Kim *et al.*, 2019).

1.2. Respuesta multidroga

Las células eucariotas presentan mecanismos de respuesta a xenobióticos que les permite tolerar y resistir la toxicidad de gran variedad de compuestos como fármacos o toxinas. Estos mecanismos cuentan con dos familias de transportadores multidroga involucradas, "ATP-binding cassette" (ABC) y "Major facilitator superfamily" (MFS) (Cannon *et al.*, 2009; Sa-Correia *et al.*, 2009; Vanacloig-Pedros, 2018).

En levaduras, en esta respuesta adaptativa a xenobióticos participa un grupo de proteínas PDR (pleotropic drug resistance) que pertenecen a la familia ABC, y que está formado por numerosos factores de transcripción y transportadores multidroga de la membrana plasmática que eliminan compuestos tóxicos de las células. Su especificidad en respuesta a tantas moléculas no está del todo clara. La sobreexpresión de los transportadores multidroga genera resistencia pleotrópica a drogas o, resistencia multidroga (Vanacloig-Pedros, 2018), el funcionamiento del sistema PDR puede observarse en la figura 1.

Es interesante conocer la manera de minimizar los efectos de este fenómeno ya que, aunque proporciona a la célula una forma de supervivencia, crea problemas en diversos tratamientos médicos, como quimioterapia en cáncer, infecciones fúngicas, etc., al disminuir su eficiencia (Holohan *et al.*, 2013; Löscher y Potschka, 2005; Paul and Moye-Rowley, 2014; Prasad y Rawal, 2014).

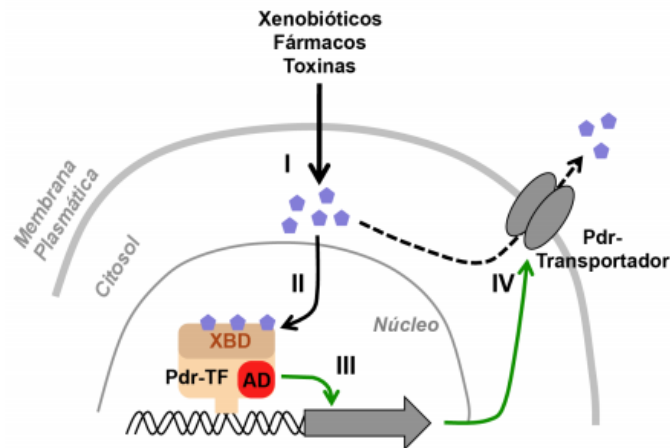


Figura 1. Esquema del sistema PDR (Pleotropic Drug Resistance) en levadura. Compuestos con actividad xenobiótica entran al interior de la célula, donde son reconocidos por factores de transcripción especializados (Pdr-FT). La unión del xenobiótico al dominio de reconocimiento de xenobióticos (XBD) activa el factor Pdr-FT y aumenta la expresión génica de transportadores del sistema PDR en la membrana plasmática, expulsando los compuestos fuera de la célula. (Vanacloig-Pedros, 2018)

En cuanto a la regulación genética del sistema PDR, se conoce que la expresión de estos transportadores está controlada por diferentes FT, destacando Pdr1 y Pdr3, que regulan numerosos genes (Balzi *et al.*, 1987; Delaveau *et al.*, 1994). Estos reguladores pertenecen a la familia de factores de transcripción Gal4, el tipo de proteínas zinc-cluster más estudiada en levaduras, y que se encuentran involucrado en numerosas funciones (Kolaczowska y Goffeau, 1999).

Las proteínas reguladoras transcripcionales zinc-cluster contienen un dominio de unión a ADN (DBD) con seis residuos de cisteína (Cys) unidos a dos átomos de zinc ($Zn(II)_2Cys_6$) en el extremo N-terminal, y un dominio de activación (AD) en el C-terminal. Entre ellos, está el dominio de unión a xenobióticos (XBD) que permite la unión directa del tóxico. En el genoma de *S. cerevisiae* hay más de 50 proteínas zinc-cluster codificadas, que actúan de activadores y/o represoras, siendo muy importantes en la transcripción (MacPherson *et al.*, 2006).

Estas proteínas pueden coordinar el control transcripcional de los genes dianas solos o en redes coordinadas con otros miembros de esta clase, actuando a través de uno o más sitios de reconocimiento de ADN, como se observa en la figura 2. También existen otros FT involucrados en la regulación como Stb5, Yrr1, Yrm1, Pdr8... (Akache y Turcotte, 2002; Lucau-Danila *et al.*, 2003; Hikkel *et al.*, 2003). Además, según Thakur *et al.* (2008) se observó tanto en *S. cerevisiae* como en *Candida glabrata* que los ortólogos Pdr1 presentan características funcionales mecánicamente similares al receptor nuclear de xenobiótico de vertebrados (PXR), siendo prometedor para el desarrollo de terapias que combatan esta MDR.

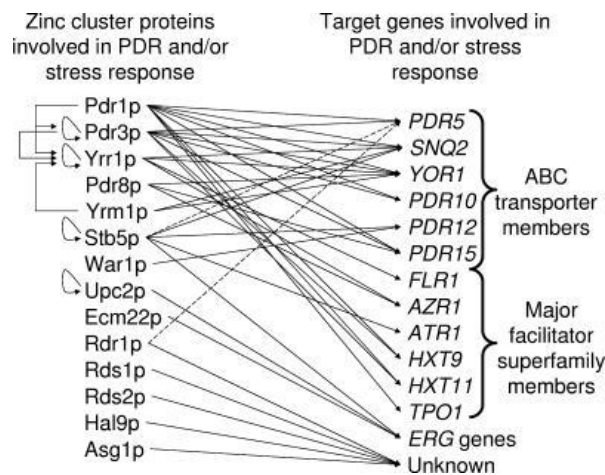


Figura 2. Proteínas zinc-cluster involucradas en la red PDR en *S. cerevisiae*. A la izquierda están representadas las proteínas zinc-cluster y a la derecha sus genes diana implicados en la PDR y la respuesta al estrés. Se muestran los transportadores ABC y los miembros de la superfamilia facilitadora principal más importantes. (MacPherson *et al.*, 2008)

1.3. Sistema luciferasa desestabilizada

Es importante conocer la modulación dinámica de la expresión génica para entender cómo responden a diferentes estímulos externos los sistemas biológicos, para ello se puede hacer uso de este sistema luciferasa con el objetivo de estudiar la respuesta transcripcional transitoria de varios genes a diferentes estreses (Rienzo *et al.*, 2012).

Generalmente, la transcripción se mide mediante la determinación directa o indirecta del nivel estable de ARNm de un gen de interés o, detectando la actividad enzimática de un reportero cuya expresión está controlada por el promotor de interés. Sin embargo, este tipo de métodos requieren la ruptura de la célula, y conlleva largos tiempos de preparación para estudiar la expresión génica diferencial de forma cinética o a través de una variedad de estímulos diferentes (Rienzo *et al.*, 2012).

Con el tiempo, se introdujeron métodos que utilizaban reporteros fluorescentes como la proteína GFP (*Green fluorescence protein*) que permite el estudio de la expresión génica en células vivas únicas, visualizando la actividad transcripcional de forma instantánea sin alterar la integridad física de la célula (Cormack, 1998). En cambio, al contrario que los ensayos con bioluminiscencia, los métodos fluorescentes necesitan excitación de una fuente de luz externa que interfiere con la cuantificación continua de la expresión génica durante las respuestas biológicas, por lo que la fluorescencia reduce la sensibilidad del ensayo (Simeonov *et al.*, 2008)

Además, numerosas respuestas transcripcionales son transitorias, lo que genera que sus análisis con reporteros deban realizarse con versiones desestabilizadas de las proteínas fluorescentes, si no, por el contrario, la estabilidad de la proteína podría enmascarar la correcta detección de la inducción o represión transitoria del gen. (Mateus y Avery, 2000; McNabb D. *et al.*, 2005).

La bioluminiscencia es utilizada como medio de detección en diferentes ensayos, se basan en el uso de enzimas luciferasa, como la luciferasa de luciérnaga, monómero de 61 kDa, que no requiere procesamiento postraduccion. Estas enzimas catalizan la oxidación de luciferinas en oxiluciferina, con el requerimiento de ATP, iones Mg^{2+} y O_2 , emitiendo luz en forma de fotón. (McNabb D. *et al.*, 2005). En la figura 3, se puede observar su funcionamiento a nivel molecular.

Este es un sistema “reportero” versátil, que aporta una medida inmediata y muy sensible de la actividad enzimática de la misma, sin necesidad de una excitación externa. (Rienzo *et al.*, 2012).

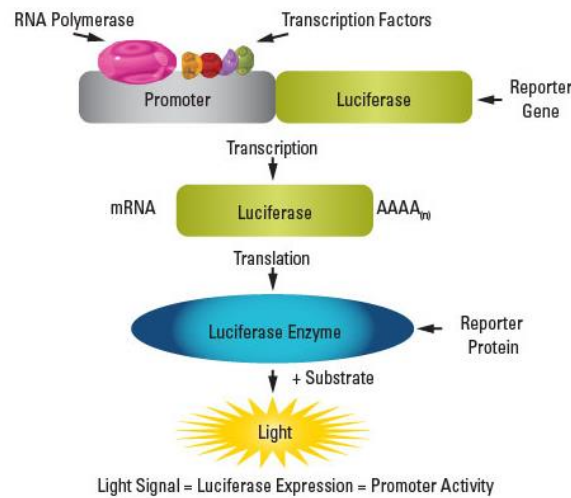


Figura 3. Esquema del funcionamiento del sistema luciferasa a nivel molecular. Frente a un estrés, la célula recluta ARN polimerasa y factores de transcripción, activando el promotor inducible y transcribiendo el gen de la luciferasa. En la traducción, se obtiene la enzima luciferasa, necesaria para catalizar la reacción que transforma la luciferina en oxiluciferina, emitiendo un fotón. (ThermoScientific, Luciferase Reporters)

En el sistema aplicado en este trabajo, la luciferasa se encuentra desestabilizada al contener las secuencias de degradación de dos dominios proteicos, CL1 y PEST, y además la secuencia de degradación del ARNm de ARE (resultando en la construcción lucCP⁺), proporcionándole una vida media de 20-30 minutos. (MacPherson *et al.*, 2008; Pascual-Ahuir *et al.*, 2019). En la figura 4, se observa el esquema de la construcción lucCP⁺ de la luciferasa. Al incluir el promotor de interés delante de la construcción del gen de la luciferasa desestabilizada, nos aseguramos que, solo cuando se encuentra el gen activamente transcrito, detectamos luz emitida por las células en cultivo (Pascual-Ahuir *et al.*, 2019).



Figura 4. Representación esquemática de la construcción lucCP⁺ de luciferasa. De izquierda a derecha se encuentra; el promotor de levadura que se quiere estudiar al que se le fusiona la construcción, seguido por la región codificante del gen de la luciferasa desestabilizada, con las secuencias CL1 y PEST que proceden de levadura y ratón respectivamente. Después, incluye la secuencia ARE para la desestabilización del ARNm.

Por lo tanto, la expresión de este reportero de vida corta nos permite medir de forma continua y cuantitativa el comportamiento del promotor y la realización de un análisis de la expresión de genes inducibles de manera dependiente de la dosis al aplicar gradientes de los diferentes estreses (Pascual-Ahuir *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

- Definir la señalización de un grupo de xenobióticos (ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico) con reporteros específicos del sistema multidroga de levadura (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrr1, Yrm1, Stb5, War1).
- Crear herramientas luciferasa para monitorizar la expresión de genes específicos del ciclo celular (*CLN1*) y de la célula hija (*CTS1*, *SCW11*, *DSE2*) in vivo. Aplicar estos “reporteros” al estudio dinámico de la respuesta a estrés en levadura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas

3.1.1. Bacterias

La cepa bacteriana utilizada en el trabajo para la propagación de plásmidos corresponde con células competentes de *E. coli* DH5 α .

3.1.2. Levaduras

Con respecto a las levaduras empleadas, en la tabla 1 se encuentran recogidas las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. Cepas de levadura utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741 (WT)	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	EUROSCARF
BY4741 con el plásmido pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺ clon 1	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 5	Cepa #1643 de la colección del laboratorio
BY4741 con el plásmido pAG413-3xPDRE-lucCP ⁺ clon 2	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 5	Cepa #1644 de la colección del laboratorio
Δ gal4 Gal4 _{DBD} -Pdr1 GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A gal4::KANMX4 con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr1-myc pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	Cepa #1867 de la colección del laboratorio
Δ gal4 Gal4 _{DBD} -Pdr3 GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A gal4::KANMX4 con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr3-myc pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	Cepa #1869 de la colección del laboratorio
Δ gal4 Gal4 _{DBD} -Yrm1 GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A gal4::KANMX4 con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Yrm1-myc pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	Cepa #1871 de la colección del laboratorio
Δ gal4 Gal4 _{DBD} -Yrr1 GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A gal4::KANMX4 con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Yrr1-myc pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	Cepa #1873 de la colección del laboratorio
Δ gal4 Gal4 _{DBD} -Pdr8 GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A gal4::KANMX4 con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Pdr8-myc pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	Cepa #1875 de la colección del laboratorio
Δ gal4 Gal4 _{DBD} -Stb5 GAL _{UAS} -lucCP ⁺	W303-1A gal4::KANMX4 con pGBKT7-ADH1p-Gal4 _{DBD} -Stb5-myc pAG413-GAL1 _{UAS} -lucCP ⁺	Cepa #1877 de la colección del laboratorio
BY4741-CLN1-lucCP ⁺	BY4741 con plásmido HIS3 pAG413-CLN1-lucCP ⁺	Este trabajo
BY4741-CTS1-lucCP ⁺	BY4741 con plásmido HIS3 pAG413-CTS1-lucCP ⁺	Este trabajo
BY4741-DDR48-lucCP ⁺	BY4741 con plásmido HIS3 pAG413-DDR48-lucCP ⁺	Este trabajo
BY4741-DSE2-lucCP ⁺	BY4741 con plásmido HIS3 pAG413-DSE2-lucCP ⁺	Este trabajo

BY4741-SCW11-lucCP⁺	BY4741 con plásmido HIS3 pAG413-SCW11-lucCP ⁺	Este trabajo
BY4741 Δpdr1	BY4741 con Δ pdr1::KAN	EUROSCARF
BY4741 Δpdr3	BY4741 con Δ pdr3::KAN	EUROSCARF
BY4741 Δpdr8	BY4741 con Δ pdr8::KAN	EUROSCARF
BY4741 Δyrr1	BY4741 con Δ yrr1::KAN	EUROSCARF
BY4741 Δyrm1	BY4741 con Δ yrm1::KAN	EUROSCARF
BY4741 Δstb5	BY4741 con Δ stb5::KAN	EUROSCARF
BY4741 Δwar1	BY4741 con Δ war1::KAN	EUROSCARF

El plásmido utilizado para obtener nuestras construcciones presenta la estructura pAG413-CYC1 Δ -lucCP⁺ y fue obtenido del laboratorio de la cepa #616, que fue construido por Rienzo *et al.*, (2012). CYC1 Δ es un promotor central sin elementos activadores de la transcripción. Ha sido utilizado en este trabajo ya que permite introducir los reporteros de interés, al sustituir a CYC1 Δ , antes de la secuencia codificante del gen de la luciferasa desestabilizada (lucCP⁺). Por otra parte, el plásmido pAG413-3xPDRE-lucCP⁺ se obtuvo a partir del plásmido mencionado anteriormente.

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Bacterias

- **Medio LB (Luria Bertani):**

Se preparó disolviendo en agua miliQ un 1% de triptona, un 0,5% de extracto de levadura y un 1% de NaCl. Para la preparación de medio sólido, a lo anterior, se le añadió un 2% de agar. En ambos casos, las disoluciones se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos. Para el medio LB sólido, tras esterilizarlo en la autoclave se añadió ampicilina al 1%.

3.2.2. Levaduras

- **Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose):**

Se preparó disolviendo en agua miliQ un 1% de extracto de levadura, un 2% de peptona y un 2% de glucosa (dextrosa). Para medio YPD sólido, se añadió un 2% de agar. Estas disoluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Por último, se ajustó el pH del medio con ácido succínico 0,5M a volumen 1/10 a pH 3 o pH 5,5.

- **Medio SD (Synthetic Dextrose):**

Este medio se preparó disolviendo en agua miliQ un 0,67% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y con sulfato de amonio, y un 0,2% de glucosa (dextrosa). Para medio SD sólido, se añadió 0,2% de agar. La disolución se autoclavó a 121°C durante 20 minutos. Después, el medio se suplementó con los aminoácidos requeridos por la cepa, dependiendo de la auxotrofia que presentaban y la que el plásmido insertado suplementaría. Las cepas con el plásmido pAG413-3XPDRE-lucCP⁺ requieren el medio SD –His +Leu +Met +Ura (el gen HIS3 se usa como marcador de selección, por eso el medio no debe contener ese aminoácido para mantener la presión selectiva y obligar a la levadura a conservar el plásmido). Por tanto, se suplementó con stocks a 100X con metionina (10 g/L), leucina (10 g/L) y uracilo (2,5 g/L). Para las cepas mutantes, se suplementó con adenina, leucina y uracilo de stocks a 100X con (2,5 g/L, 10 g/L y 2,5 g/L,

respectivamente). Después, el medio se ajustó al pH necesario añadiendo ácido succínico 0,5M en volumen 1/10 a pH 3 o pH 5,5.

3.3. Diseño de cebadores

Para las construcciones plasmídicas deseadas, se requiere de las secuencias codificantes de los promotores de los genes de interés (*CLN1*, *CTS1*, *DDR48*, *DSE2*, *SCW11*). Se diseñaron un total de seis cebadores (tres directos y tres reversos) para la amplificación del ADN genómico correspondiente a los promotores de los genes *CTS1*, *SCW11* y *CLN1*, debido a que para los dos genes restantes (*DSE2* y *DDR48*) el laboratorio ya tenía los cebadores necesarios.

El diseño se realizó con la ayuda de la base de datos de *Saccharomyces* (SGD), a partir de esta se obtuvo la secuencia de nucleótidos para los genes mencionados con 1000 nucleótidos aguas arriba correspondientes a la secuencia del promotor del gen. Además, se realizó sobre estos 1000 nucleótidos un análisis de los sitios de restricción que presentan, para comprobar que las enzimas de restricción *SacI* y *SmaI* con secuencias, GAGCTC y CCCGGG, respectivamente, no cortaran en estas regiones, debido a que son las enzimas que se utilizan para hacer la digestión.

Para los cebadores directos se añadió en el extremo 5' una secuencia adicional (GATC) que se observa en amarillo, con la finalidad de mejorar el reconocimiento de la enzima, seguida por la secuencia de la enzima de restricción *SacI* (en azul), más la secuencia de nucleótidos escogidos del principio de la secuencia del promotor.

Para los cebadores reversos se añadió en el extremo 5' la secuencia adicional complementaria (CTAG) (en amarillo), seguida por la secuencia de la enzima de restricción *SmaI* (en verde), más la secuencia complementaria de nucleótidos escogidos del final de la secuencia del promotor, en dirección 5'-3'.

Finalmente, los cebadores diseñados fueron los siguientes:

Cebador directo CLN 1-*SacI*: 5' – GATCGAGCTC GAATGTTACG GGACTAACAG G – 3'

Cebador reverso CLN1-*SmaI*: 5' – CTAGCCCGGG GATCTTTTAA TTTATTTTAC AGAAATA – 3'

Cebador directo CTS1-*SacI*: 5' – GATCGAGCTC CCAATGAGGA GGTA AAAAGA AG – 3'

Cebador reverso CTS1-*SmaI*: 5' – CTAGCCCGGG TCTATTATTA ATTATTTTAT ATTTAAATT – 3'

Cebador directo SCW11-*SacI*: 5' – GATCGAGCTC CCCAATTGG ATGAATATTA ATTA – 3'

Cebador reverso SCW11-*SmaI*: 5' – CTAGCCCGGG GATGGTTTTC TATTAGATAT TATAT – 3'

Posteriormente, fueron encargados para su síntesis a Thermo Fisher Scientific.

3.4. Construcción de plásmidos

3.4.1. Aislamiento ADN cromosómico de levadura

La extracción del ADN cromosómico se realizó a partir de la cepa BY4741 de tipo salvaje, que se incubó en 3 mililitros (ml) de medio líquido YPD, dejándola crecer toda la noche en agitación a 30°C y siguiendo un protocolo de aislamiento rápido. El cultivo crecido se centrifugó durante 30 segundos a 11.000 rpm (revoluciones por minuto) y se lavó el pellet con 1ml de H₂O. Se resuspendió en 400 µl de tampón de protoplastos (100 mM Tris/HCl a pH 7,5, 10mM EDTA, 0,2 mg/ml zimoliasa) incubándolo a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió 200 µl de

tampón de lisis (0,2M NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y, se incubó (65°C, 20 min). Después, se añadió 200 µl de K-acetato 5M pH 5,5, se centrifugó 3 minutos a máxima velocidad (13.400 rpm), se transfirió el sobrenadante en un nuevo eppendorf y se hizo precipitar el ADN cromosómico añadiendo 600 µl de isopropanol. Más tarde, se centrifugó nuevamente (3 min, 13.400 rpm), se lavó con 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó 1 minuto. Se secó el pellet (15 min, 45°C) y se resuspendió en 50 µl en tampón TE (10mM Tris/HCl a pH 7,5; 1mM EDTA).

3.4.2. PCR y purificación

Con el fin de clonar el fragmento de ADN de interés para cada construcción se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cada reacción se realizó en un volumen total de 50 µl, formado por: 5 µl de tampón de Taq polimerasa comercial (TrueStart), 0,5 µl de enzima Taq polimerasa a 1U/µl (TrueStart), 1 µl de cada uno de los dos cebadores correspondientes a cada reacción (100 pmol/µl), 5 µl de dNTPs a 2 mM, 1 µl de ADN cromosómico y 36,5 µl de H₂O MiliQ. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización (5 min, 95°C); 40 ciclos de amplificación (30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de alineamiento a 53°C, 2,5 minutos de extensión de la enzima ADN polimerasa a 72°C); un último paso de elongación a 72°C durante 7 minutos.

Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (1ml 50X TAE, 49 ml H₂O miliQ, 0,5 g agarosa), para comprobar si la amplificación había funcionado correctamente, y se observaron bandas de alrededor de 1 kilobase (kb) correspondiente con el tamaño de los promotores.

Posteriormente, se purificaron los productos de la PCR mediante un kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel) y se cuantificó la pureza del ADN mediante un NanoDrop.

3.4.3. Propagar plásmidos en *E. coli* y purificación

Con la finalidad de disponer del plásmido necesario, pAG413-CYC1Δ-lucCP⁺, para realizar las construcciones de interés, se llevó a cabo la propagación del mismo empleando la cepa DH5α de *E. coli*. Se creció en 3 ml de cultivo LB con ampicilina, incubándolos en agitación toda la noche a 37°C. El ADN plasmídico se purificó utilizando el kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel) y después se comprobó la eficiencia de la purificación midiendo la concentración mediante el espectrofotómetro NanoDrop, se obtuvo una concentración de 75,3 ng/µl.

3.4.4. Digestión con enzima de restricción

A partir de la purificación de las muestras obtenidas por PCR y del vector de clonación, se realizó la digestión de los mismos con las enzimas de restricción SacI y SmaI. Cada reacción se efectuó en un volumen de 20 µl, constituido por: 3 µl de ADN, 2 µl tampón Tango 10X, 0,2 µl SacI, 0,2 µl SmaI y 14,6 µl de agua miliQ. En primer lugar, se pusieron todos los componentes, excepto la enzima SacI, y se dejó durante 1 hora a 30°C incubando. Tras 1 hora, se añadió SacI y se volvió a incubar durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se comprobó la correcta digestión de los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa 1%.

Además, se extrajeron los fragmentos del gel y se purificaron utilizando el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machery-Nagel) y se cuantificó la concentración de los vectores y de los insertos empleando el espectrofotómetro NanoDrop.

3.4.5. Ligación vector e inserto

Para finalizar la construcción de los plásmidos, se llevó a cabo la ligación del vector con los fragmentos de PCR mediante la utilización de un kit de ligación rápida de ADN (ThermoScientific). La reacción se realizó con 2 μ l de vector, 2 μ l de inserto, 4 μ l de tampón de lisis 5X, 1 μ l de enzima T4 ADN ligasa y 11 μ l de agua, un total de 20 μ l de volumen. Además, se preparó un control, sin inserto, añadiendo la diferencia con agua. Todas las mezclas se incubaron a 22°C durante 30 minutos y después se conservaron en frío con una temperatura de 0-4°C.

3.5. Transformación de bacterias

Tras la obtención de las construcciones plasmídicas y con la finalidad de amplificarlas, se transformaron células bacterianas competentes de *E. coli* con ellas. Mediante condiciones estériles, se añadieron 10 μ l de plásmido a 80 μ l de células competentes que se encontraban a -80°C, dejando la mezcla durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y, justo después, se mantuvieron en hielo durante 5 minutos más. Tras este tiempo, se añadió 1 ml de LB (siempre en condiciones estériles) y se incubó a 37°C, 1 hora. Finalmente, se centrifugaron a velocidad máxima durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células con el líquido restante, sembrándolas, después, cada una en una placa de LB con ampicilina. Se dejaron incubando más de 48 horas a 37°C.

A partir de cada placa, se seleccionaron 5 colonias aisladas que se inocularon, cada una, en 2 ml de precultivo líquido LB con ampicilina, dejándolas crecer toda la noche a 37°C. Con estos precultivos, se realizaron minipreps para purificar el ADN (únicamente con 1,5 ml del precultivo), mediante el kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel). Seguidamente, se cuantificó su concentración en el espectrofotómetro Nanodrop. Además, se realizaron alícuotas de cada uno para ser digeridas con las mismas enzimas de restricción utilizadas anteriormente (SacI y SmaI) y, comprobar, mediante la realización de una electroforesis en agarosa 1%, que las colonias seleccionadas han sido transformación correctamente y que, por tanto, la ligación vector-inserto de interés ha tenido lugar. El gel mostraba, en casi todas las muestras, dos bandas, una superior correspondiente al vector de unas 8 kb, y otra inferior de alrededor de 1 kb que corresponde con el inserto.

Entre las construcciones generadas, se seleccionó una para cada gen, y a partir de los 0,5 ml sobrantes de los precultivos realizados en LB con ampicilina, se cultivaron en medio sólido LB con ampicilina para, una vez crecidos, realizar glicerizados de los mismos, y, así, guardarlos en la colección con visión hacia trabajos futuros. Los glicerizados se generaron añadiendo 1 ml de glicerol al 15% en un vial y liberando las colonias recogidas con asa de siembra del medio sólido en el glicerol. Después, se conservaron a -80°C.

3.6. Secuenciación

Cuando se comprobó que las construcciones se habían generado de forma adecuada, la ligación vector e inserto de interés se había dado y que había sido posible transformar bacterias. Estas construcciones se mandaron a secuenciar, aportando 10 μ l de cada una y, además, se preparó el cebador lucSeq reverse a 3,3 μ M necesario para amplificar la secuencia que se encuentra en posición anterior a la de la luciferasa. Después, las secuencias obtenidas se analizaron a través de la SGD, realizando un BLAST, de forma que se verificó la correspondencia con los promotores de los genes de interés.

3.7. Transformación de levaduras

Para la inserción de las construcciones generadas en el genoma de *S. cerevisiae* se prepararon mezclas siguiendo el protocolo propuesto por Gietz y Schiestl (2007) para plásmidos únicos que utiliza el método del acetato de litio. Estas mezclas se componen de 240 μ l PEG 3350 al 50% (polietilenglicol), 36 μ l LiAc 1M, 10 μ l de ADN portador monocatenario de salmón (2 mg/ml) y de 3-5 μ l de plásmido, más agua hasta alcanzar un volumen total de 360 μ l. Además, se preparó un tubo control con todos los compuestos, excepto el plásmido.

Por otra parte, se creció un cultivo líquido de levadura BY4741 en 50 ml de YPD hasta alcanzar una densidad óptica de 1,5-2,5 a 600 nm, medida con el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer Plus. Las células se centrifugaron en un tubo Falcon de 50 ml a una temperatura de 4°C y a 3000 rpm durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron con 25 ml de agua estéril, repitiéndolo dos veces. La segunda vez, se decantó y se añadió solamente 1 ml de agua estéril, transfiriéndolo a un eppendorf.

Con las células competentes de levadura preparadas, se volvieron a centrifugar 100 μ l de células por cada transformación en eppendorfs separados, a máxima velocidad (13.400 rpm) durante 30 segundos, eliminando después el sobrenadante. A cada uno de los eppendorfs, se le añadió la mezcla de transformación correspondiente y se vorteoó. Después, se dejaron incubar durante 40 minutos a 42°C para provocar un choque térmico. Se centrifugaron durante 30 segundos a 13.400 rpm, se descartó el sobrenadante, se añadió 0,5 ml de agua estéril y se volvieron a centrifugar, eliminando posteriormente el sobrenadante. Finalmente, con el líquido restante se resuspendieron las células y se sembraron en placas con medio de cultivo SD –His +Leu +Met +Ura a pH 5,5. Las colonias de levadura transformadas aparecieron a los 2-3 días después de la incubación a 30°C.

De estas colonias transformadas, se seleccionaron 3 de cada placa, y se sembraron en una placa todas ellas, dejándolas incubar a 30°C.

3.8. Preparación disolución ácidos orgánicos y NaCl

Los diferentes ácidos orgánicos utilizados en el trabajo fueron preparados para tenerlos todos ellos en fase líquida y a las concentraciones adecuadas, y así realizar los ensayos deseados.

Por una parte, para los ensayos de análisis de la respuesta transcripcional con luciferasa, se prepararon una serie de disoluciones:

- Se preparó un stock de ácido acético 5 M, añadiendo 1,22 ml de ácido acético a 2,78 ml de H₂O MiliQ. Se trabajó bajo campana extractora al ser un ácido fuerte. A partir de esta disolución se prepararon stocks al 10X con concentraciones crecientes de ácido acético; 0 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM.
- Con respecto a los ácidos sórbico y benzoico, se tuvo en cuenta que con una cantidad mayor a 0,1% se inhibía el crecimiento de las células. Por lo tanto, las concentraciones a ensayar fueron menores. En primer lugar, se preparó un stock 1 M de ambos, diluyendo los gramos necesarios en 1 ml de DMSO. Con esta disolución, se prepararon stocks al 10X con concentraciones crecientes de ácido sórbico y ácido benzoico; 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 250 μ M, 500 μ M. En este caso, se diluyeron con medio de cultivo líquido SD –His +Leu +Met +Ura a pH 3.

- Para el ensayo de monitorización de la expresión génica, se realizaron varias diluciones al 5X con diferentes concentraciones (0 M, 0,2M, 0,4M, 0,6M, 0,8 M y 1M) a partir de una disolución de NaCl 5M.

Por otra parte, para los ensayos de análisis de sensibilidad, se prepararon otras diluciones, teniendo en cuenta el trabajar bajo condiciones estériles:

- Para ácido acético, se prepararon dos diluciones a 27,8 mM y a 55,6 mM, ya que se pretendía realizar los ensayos a 25 mM y a 50 mM, respectivamente. Para su preparación, se añadió la cantidad necesaria de ácido acético y se disolvió en medio de cultivo YPD a pH 3.
- Para ácido benzoico, se preparó una dilución 1 M, con DMSO como disolvente y a partir de esta dilución se prepararon otras dos con 1,11 mM y 2,78 mM para luego realizar el ensayo realmente sobre 1 mM y 2,5 mM, respectivamente. Estas últimas diluciones, se diluyeron con medio YPD a pH 3.

3.9. Medida de actividad luciferasa a tiempo real frente a ácidos orgánicos y NaCl

El proceso seguido en este trabajo para medir la actividad luciferasa fue inspirado por el protocolo descrito por Rienzo *et al.*, (2012).

-Cultivo celular y preparación de las células para el ensayo de luminometría.

Primero, las levaduras se crecieron en tubos con 3 ml de medio SD con ácido succínico 50mM a pH 5,5. Se dejaron incubando en agitación toda la noche a 30°C. Las cepas con los promotores de interés integrados se cultivaron en medio SD –His +Ade +Leu +Ura, mientras que las cepas con el plásmido pAG413-3xPDRE-lucCP⁺ se crecieron en medio SD –His +Leu +Met +Ura. Al día siguiente, con los cultivos frescos a pH 5,5 se inocularon una serie de cultivos por duplicado con 3,5 ml en medio SD a pH 3. Se hicieron inóculos con volúmenes crecientes; 20 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 200 µl. Se incubaron toda la noche a 30°C y se seleccionaron los cultivos con densidad óptica (OD) de 1,5-2,5 a 600 nm. Los cultivos seleccionados, con el volumen adecuado para realizar el ensayo, se incubaron con luciferina a 10mM, añadiendo 50 µl por cada 1 ml de cultivo de levadura, durante 60 minutos a 30°C.

-Ensayo de luminometría.

El ensayo se realizó sobre una placa con 96 pocillos, donde se añadió 15 µl del tratamiento de estrés deseado por triplicado o 30 µl por duplicado en el caso de NaCl, con las concentraciones a 10X y a 5X, respectivamente. Posteriormente, se rellenaron los pocillos hasta llegar a 150 µl de las células de levadura tratadas con luciferina, con la ayuda de una pipeta multicanal. Inmediatamente, se introdujeron en el lector multimodo Promega, activado con anterioridad. En todos los casos, se realizaron 99 lecturas a lo largo del tiempo.

Tras finalizar todas las lecturas de la placa completa, los datos fueron extraídos a una hoja de Microsoft Excel. Se realizaron promedios de las medidas por triplicado o duplicado, y se representaron los valores de intensidad de luz en función del tiempo, añadiendo la desviación estándar para los valores promedio. Además, se representaron las diferentes respuestas de todos los promotores para alguna concentración de estrés, con respecto al tiempo. Con esto, se pudieron analizar las variaciones en respuesta a estrés por ácido acético, ácido sórbico, ácido benzoico y por estrés salino, de las cepas con los promotores de interés integrados.

3.10. Estudio de sensibilidad frente a ácidos orgánicos

El estudio de sensibilidad se realizó interrogando a diferentes cepas mutantes para factores de transcripción de tipo zinc-cluster (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrr1, Yrm1, Stb5, War1) involucrados en la respuesta a estrés por ácidos débiles.

Para ello, se cultivaron en 2 placas Petri en medio YPD, las 8 cepas de levadura de la colección, incluida la cepa salvaje. Dejándolas incubar en estufa a 30°C durante unos 2-3 días. Tras la siembra y crecimiento en placa, se realizaron precultivos de 3 ml en medio líquido YPD, incubándolas toda la noche a 30°C. Con estos precultivos, se inoculó 1 µl en 3 ml de medio YPD a pH 3 con ácido succínico 50 mM, para cada cepa, y se dejaron crecer toda la noche. Al día siguiente, se midió la OD a 600 nm, y se realizaron las diluciones adecuadas en cada cepa para preparar 1 ml de cada una a una OD₆₀₀ de 0,25, diluyendo con medio YPD a pH 3.

Además, trabajando en condiciones estériles, se preparó una placa transparente de 96 pocillos donde se añadieron 234 µl de medio de cultivo con la concentración de estrés a estudiar por duplicado. Por ejemplo, en el caso de ácido acético, para cada cepa se tenían; 2 pocillos con medio YPD a pH 3 sin tratamiento (control), 2 pocillos con medio YPD a pH 3 y 25 mM, y 2 pocillos con medio YPD a pH 3 y 50 mM. Después, se añadieron 26 µl de células a una OD₆₀₀ de 0,25 para que la OD₆₀₀ inicial de todos los pocillos fuera 0,025. Asimismo, se añadieron pocillos con 260 µl de medio YPD a pH 3 sin células, ni tratamiento, que permitiría conocer si el medio de cultivo se hubiera contaminado y, por lo tanto, si el experimento hubiera funcionado completamente mal. Finalmente, se midió la sensibilidad a estos ácidos débiles durante 72 horas con el lector Tecan de microplacas multimodo Spark®.

Para el análisis de los resultados se empleó el programa Microsoft Excel, donde se realizaron promedios de los duplicados y se representaron los valores de absorbancia en función del tiempo, comparando cada cepa con la de tipo salvaje.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

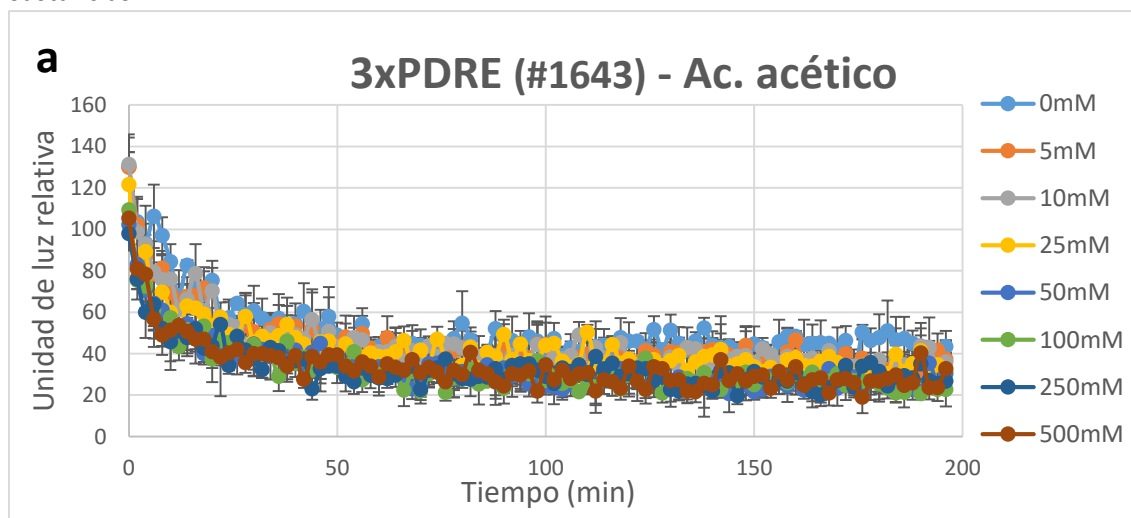
4.1. Sensibilidad de cepas de levadura con reportero 3xPDRE-lucCP⁺ a ácidos orgánicos

Las levaduras, como las células humanas, presentan sistemas de defensa frente a una gran diversidad de compuestos químicos (fármacos, drogas, toxinas...). Las respuestas adaptativas generadas respecto a estas sustancias se denominan generalmente “Resistencia pleiotrópica a drogas” (PDR). Este sistema mediante la activación de diversos factores transcripcionales, regula la transcripción de los genes diana a través de sitios de unión en el promotor del gen conocidos como elementos de resistencia pleiotrópica a drogas (PDRE - “Pleiotropic Drug Resistance Element”). Además, produce la sobreexpresión de transportadores multidroga ayudando a la célula a eliminar el compuesto químico responsable del estrés producido, permitiendo que sean capaces de mantener el equilibrio adecuado para su correcto funcionamiento.

Así, mediante el sistema reportero de la luciferasa desestabilizada bajo el control de varios elementos PDRE se puede analizar si la exposición de la levadura a ciertas sustancias genera respuestas de defensa, al observar actividad de la enzima luciferasa. La cepa de levadura que contiene el plásmido con los promotores PDRE más la secuencia codificante para el gen de la luciferasa desestabilizada, será nombrada como 3xPDRE.

Para llevar a cabo este primer ensayo, se crecieron las dos cepas en medio SD -His +Leu +Met +Ura pH 3 hasta una OD₆₀₀ de entre 1,5 y 2,5. Las células se incubaron durante 60 minutos a 30°C con el sustrato luciferina a una concentración de 0,5 mM de un stock a 20X (10 mM en DMSO) (Rienzo *et al.*, 2012). En una placa blanca de 96 pocillos con 15 µl de tratamiento por pocillo (cada concentración por triplicado), se añadieron 135 µl de células tratadas con luciferina, registrando la actividad de las células mediante un luminómetro.

Los resultados obtenidos se representan como unidades de luz relativa emitida al expresarse la luciferasa frente al tiempo. Se realizó un promedio de los valores triplicados y se normalizaron frente al tiempo 0, para ácido sórbico y benzoico. Además, se presentan las barras de error para cada uno de los valores representados. Se han mostrado únicamente los resultados de una de las cepas 3xPDRE (figura 5) ya que ambas presentan un comportamiento parecido ante estas sustancias.



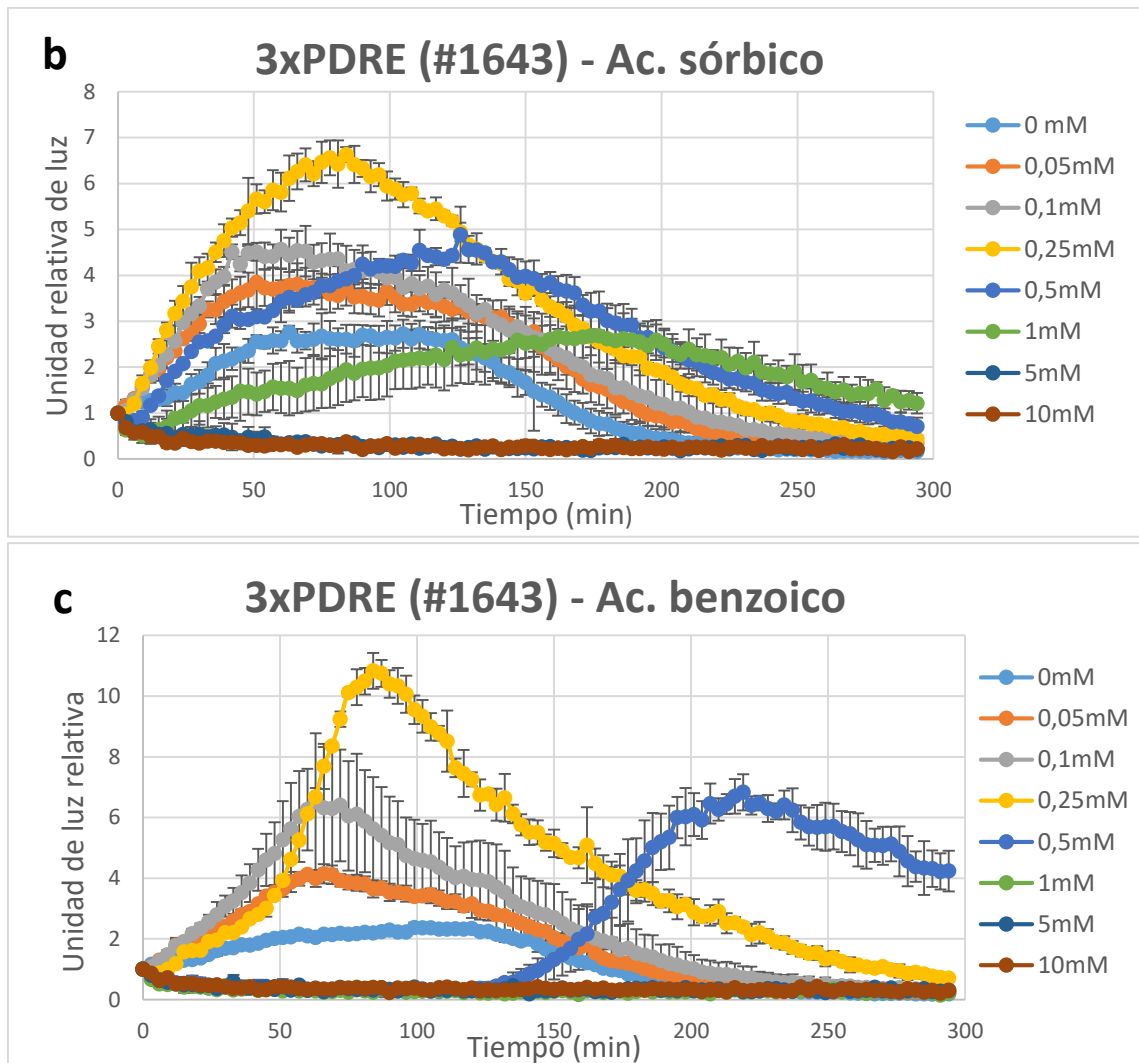


Figura 5. Comportamiento dosis-respuesta de elementos PDRE en respuesta a ácido acético, sórbico y benzoico obtenido a través del sistema luciferasa. Se observa por parte de elementos PDRE la respuesta a estrés en unidades de luz relativa frente al tiempo para diferentes concentraciones de ácido acético (a), ácido sórbico (b) y ácido benzoico (c). Los valores de las figuras 5.b y 5.c están normalizados frente al tiempo 0. Se representa el promedio de los valores por triplicado obtenidos y su desviación estándar.

Como se observa, en la figura 5.a, el ácido acético no genera una respuesta inducida por los elementos PDRE, por lo que puede ser que la manera en que las células responden a este tipo de estrés esté mediada por otro tipo de elementos transcripcionales. Por otra parte, tanto en la figura 5.b, como en la 5.c, con estreses generados por ácido sórbico y benzoico, respectivamente, sí se observa actividad de estos elementos en respuesta a los diferentes estreses.

En el caso de ácido sórbico, desde 0,05 mM a 0,5 mM, las células responden a este estrés a través de los elementos PDRE, visualizando una ola de respuesta que aumenta con el tiempo de exposición al estrés hasta alcanzar aproximadamente 75 minutos, disminuyendo luego hasta llegar de nuevo a 0. Con concentraciones mayores a 1 mM, ya no se observa activación debido a la severidad del estrés. Además, con 0 mM también se observa una pequeña activación que puede deberse a algún otro tipo de estrés como un choque térmico al cambiar la temperatura de la incubadora al luminómetro.

Para ácido benzoico, el rango de respuesta es parecido al de ácido sórbico, observando una respuesta claramente más rápida en el caso de 0,25 mM, ya que, al llegar a los 50 minutos, se incrementa la unión a elementos PDRE. Por otra parte, para la concentración de 0,5 mM, se muestra un comportamiento diferente, se retrasa hasta los 150 minutos el comienzo de la inducción de la respuesta lo que supone mayor tiempo de adaptación y recuperación de las células, mientras que, con concentraciones mayores, las células no consiguen adaptarse.

Por lo tanto, este ensayo sirvió para acotar las concentraciones de los ácidos orgánicos que inducen estrés en las células de *S. cerevisiae* y que permiten una recuperación posterior por parte de las células. Así, se acotaría las concentraciones tanto de ácido sórbico, como ácido benzoico de 0-0,5 mM. El ácido acético se descarta, al no observar inducción. Tras esto, se quiere conocer qué factor o factores de transcripción están involucrados en la recuperación al estrés.

4.2. Papel de factores de transcripción de tipo multidroga en respuesta a ácidos orgánicos

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema PDR, encargado de eliminar compuestos perjudiciales para la célula, está compuesto entre otras proteínas, por diversos factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de transportadores PDR. A veces, estos factores de transcripción están sobreexpresados, lo que genera resistencia a múltiples drogas, siendo de gran importancia en tratamientos médicos como quimioterapia, cáncer o antifúngicos, porque reducen su eficacia.

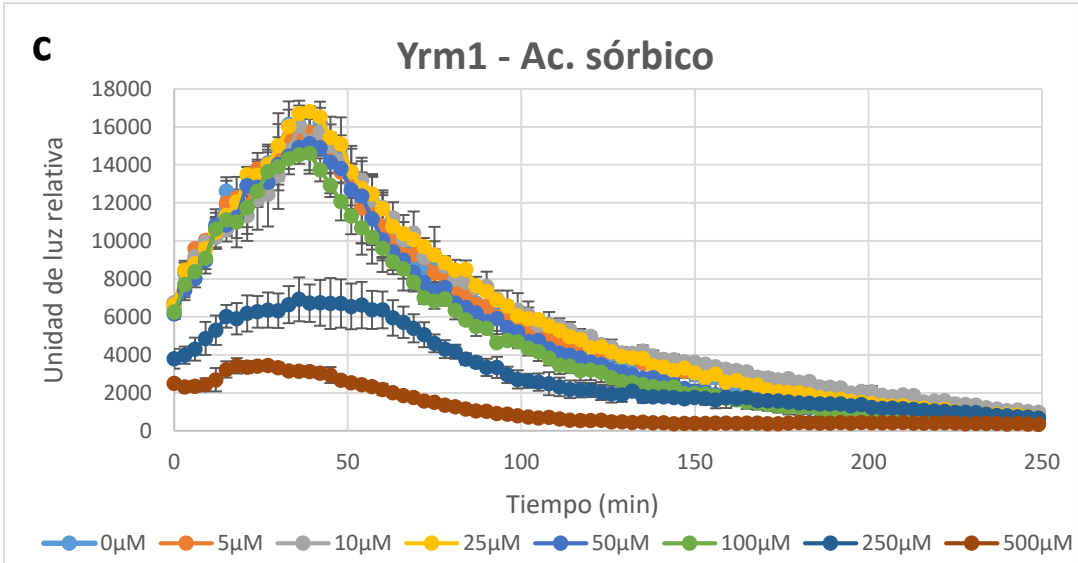
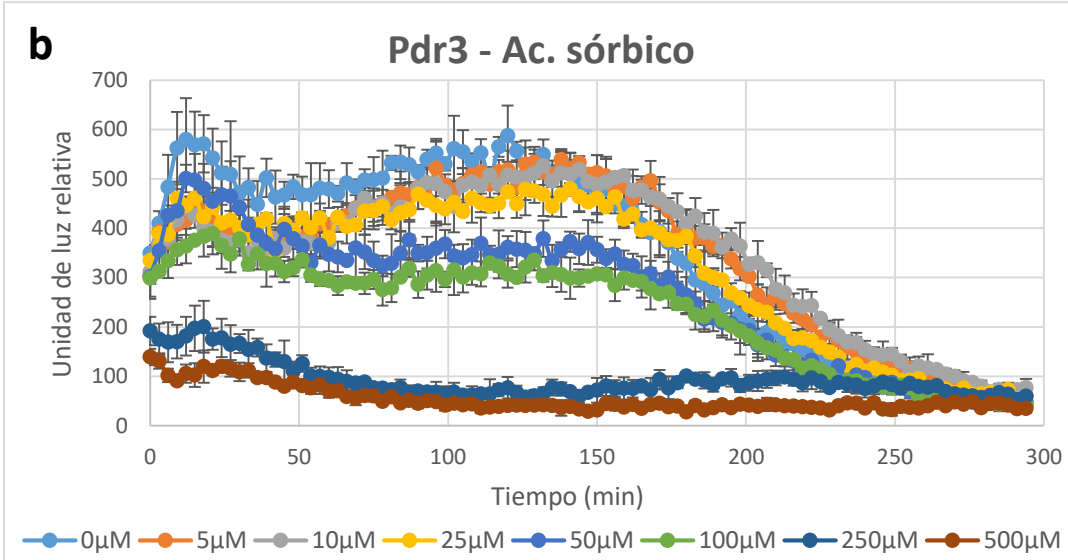
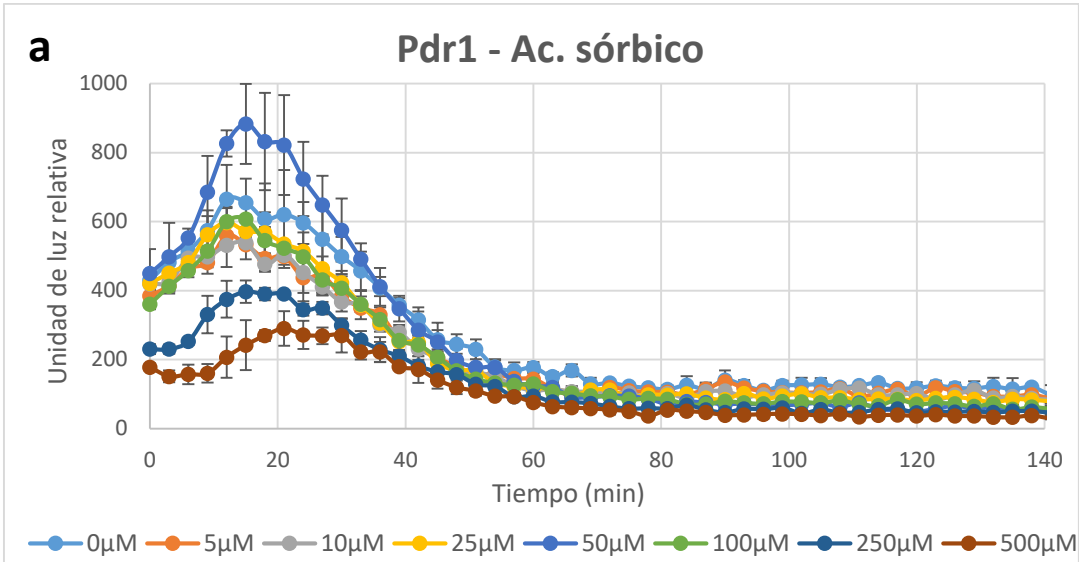
Se han estudiado varios factores de transcripción (Pdr1, Pdr3, Pdr8, Yrm1, Yrr1, Stb5), a través de la cuantificación de la expresión de la luciferasa, tratando a las cepas de levadura con concentraciones ascendentes de dos ácidos orgánicos diferentes: ácido sórbico y ácido benzoico. Los factores de transcripción se encuentran integrados en plásmidos en cepas de levadura con un "cluster" de zinc modificado (Gal4_{DBD}), por lo tanto, si se expresan, reconocerán el motivo de ADN Gal_{UAS} que está ligado al gen de la luciferasa desestabilizado (lucCP⁺), pudiendo observar su actividad al luminómetro.

4.2.1. Respuesta a ácido sórbico

Los perfiles dosis-respuesta se obtuvieron al representar el promedio de los valores por triplicado de la actividad luciferasa para cada concentración en unidades relativas de luz frente al tiempo. Estos mostraron diferencias entre los distintos factores de transcripción estudiados (figura 6), excepto en el caso de Yrm1 y Pdr8 que presentan una expresión bastante similar.

Es importante resaltar, que, en todos los casos, excepto para Stb5, incluso las células que no han sido tratadas con estrés muestran expresión a mayor o menor medida dependiendo del FT, lo que sugiere que incluso una disolución únicamente de agua también puede desencadenar la activación de estos FT, al generar algún tipo de estrés en el interior celular.

En el caso de Pdr1 (figura 6.a), la respuesta frente a una concentración de 50 μ M es la que muestra mayor expresión de luciferasa y, por tanto, del FT en estudio. Lo que demuestra el papel de Pdr1 en la respuesta al estrés generado por 50 μ M de ácido sórbico. Para el resto de concentraciones, la expresión va disminuyendo, mostrando una actividad similar para 0, 5, 10, 25 y 100 μ M, sin estar influida por la acción del ácido. Además, se observa que es el FT con el menor tiempo de actuación, ya que, su expresión va aumentando hasta transcurridos unos 20 minutos y a los 40 su actividad ya ha descendido prácticamente hasta 0. Por el contrario, Yrm1, Yrr1 y Pdr8, presentan actividad hasta cerca de los 100 minutos, pero no debido al estrés generado por el ácido sórbico.



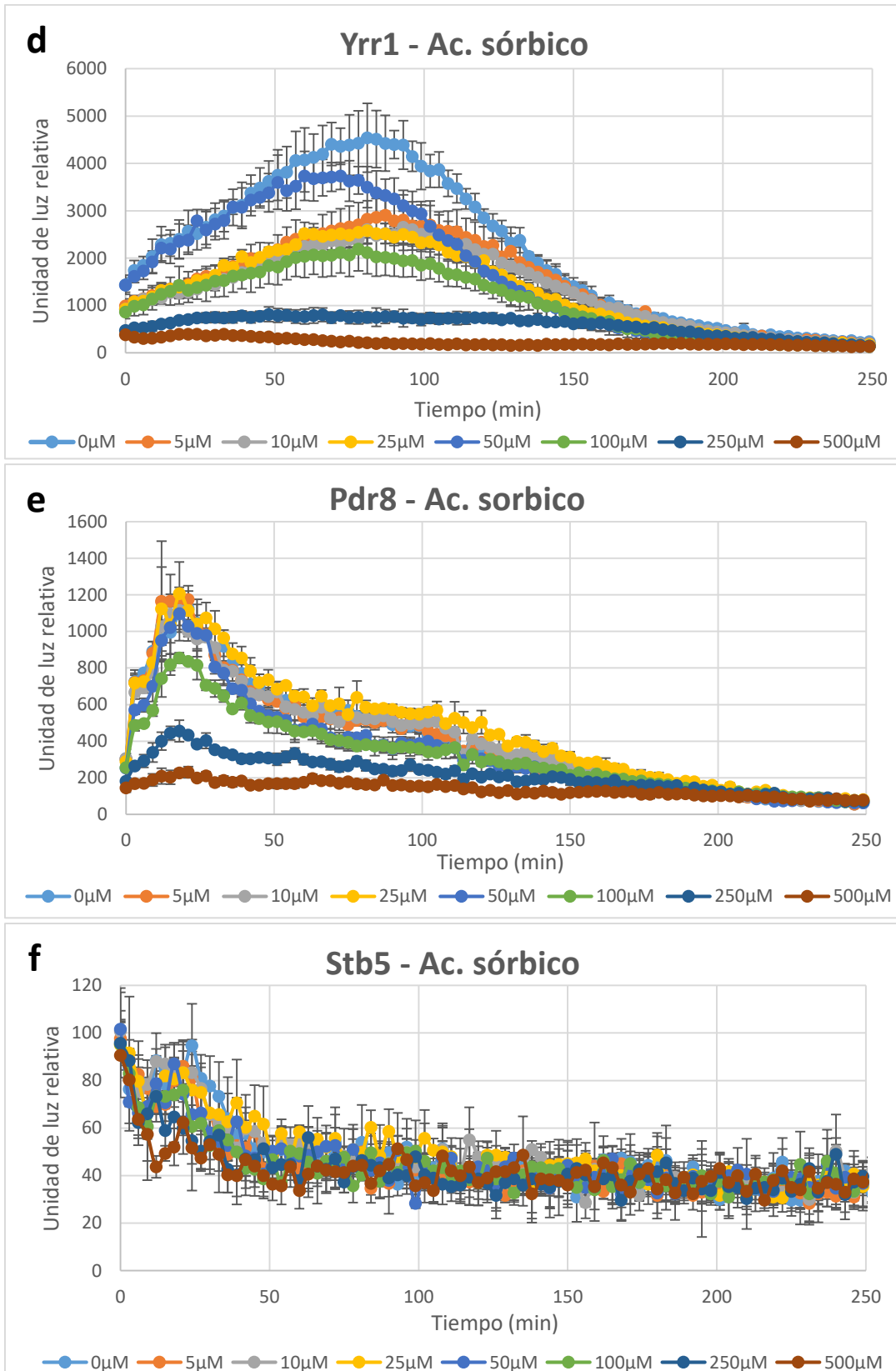


Figura 6. Respuesta de diferentes FT del sistema PDR a ácido sórbico. Curvas dosis-respuesta obtenidas al tratar diferentes cepas, con factores de transcripción integrados, con un baremo de concentraciones de ácido sórbico de 0 a 500 μ M durante 300 minutos. Se incluyen las barras de error para los valores representados. (a) FT Pdr1, (b) FT Pdr3, (c) FT Yrm1, (d) FT Yrr1, (e) FT Pdr8, (f) FT Stb5. De los valores obtenidos por triplicado se representa su promedio y la desviación estándar.

Por otra parte, Pdr3 (figura 6.b), muestra una dosis-respuesta más duradera en el tiempo, pero no específica del estrés por ácido sórbico ya que observamos que el control muestra la mayor expresión de luciferasa registrada para este FT.

En el caso de Yrm1 y Pdr8 (figura 6.c y 6.e), se observa la misma respuesta para concentraciones de 0 a 50 μM , con la diferencia que el FT Yrm1 se expresa con mayores unidades de luz relativa (un máximo de 17.000 aprox.) que Pdr8 (máximo de 12.000 aprox.). Así mismo, la figura 6.d, muestra la expresión de Yrr1 con una curva dosis-respuesta similar para 0 y 50 μM , aunque con 0 μM alcanza un máximo mayor. Para el resto de concentraciones la expresión disminuye y se comportan de manera parecida. Sin embargo, ninguno es específico para este ácido orgánico.

Por último, como se observa en la figura 6.f, el FT Stb5 no muestra expresión, lo que sugiere que tampoco Stb5 está involucrado en la respuesta celular al estrés generado por el ácido sórbico.

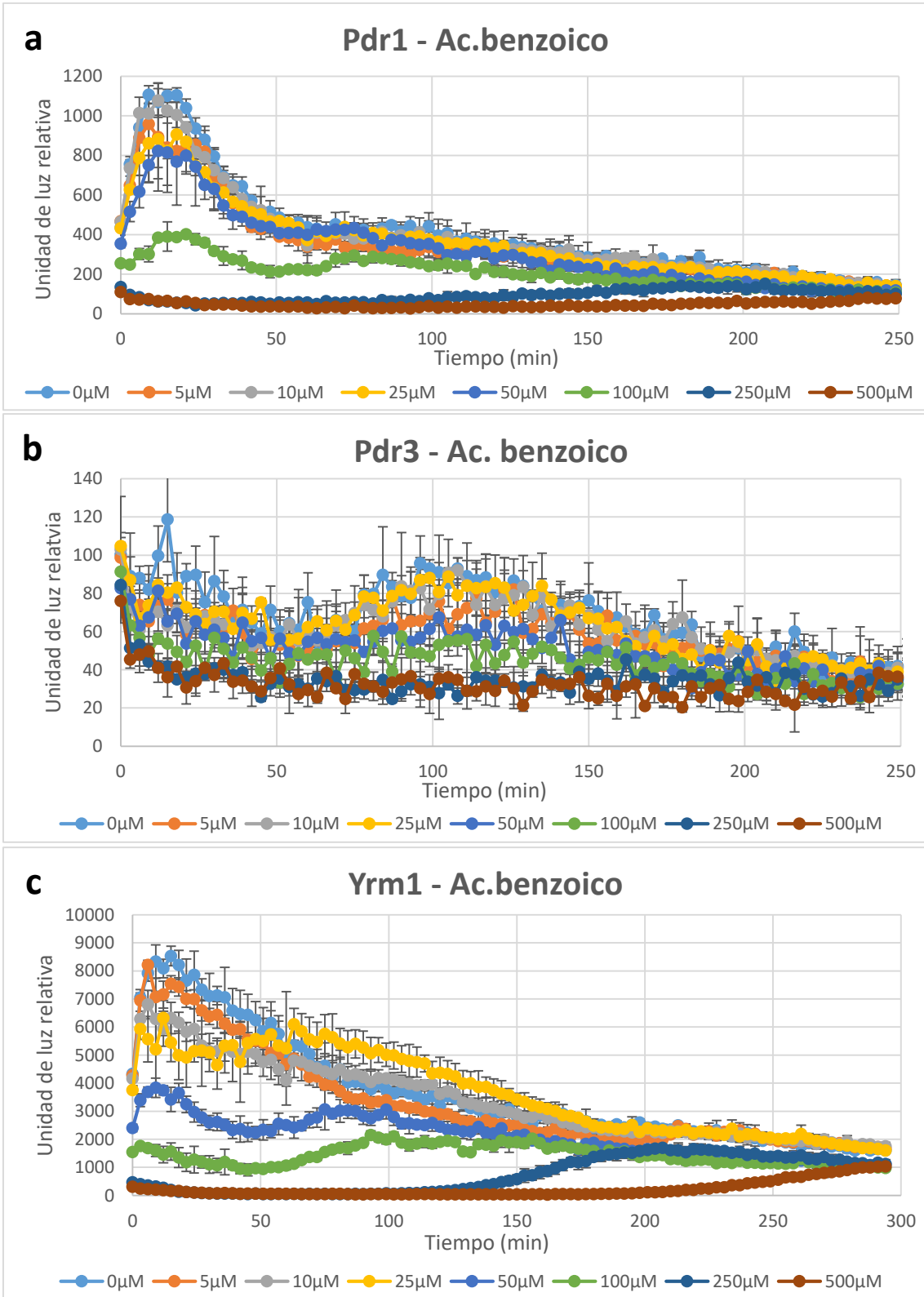
4.2.2. Respuesta a ácido benzoico

Este ensayo de exposición de las distintas cepas con los FT de estudio frente a diferentes concentraciones de ácido benzoico, se realizó igual que para el ácido sórbico, y los resultados obtenidos se trataron de la misma manera, representando unidades de luz relativa frente al tiempo.

Observando las curvas dosis-respuesta de todos los FT (figura 7), se ve que para Pdr3, Yrr1 y Stb5, no se induce su activación pudiendo no estar involucrados en los mecanismos de respuesta a estrés por ácido benzoico. También se puede pensar que la actividad de luciferina registrada no es la adecuada, pudiendo influir las densidades ópticas iniciales de los cultivos a 600 nm en la captación del sustrato luciferina por las células, fenómeno que tiene lugar a una OD_{600} mayor a 2,5, y los correspondientes cultivos tenían una OD_{600} de 2,4, 3,2 y 3,2, respectivamente. Además, en el caso de Yrr1, se observa que, en el control hay una ligera expresión, pudiendo responder a otro tipo de estrés, al modificar el medio celular y hacerlo más hipotónico. Por lo que no quedaría claro, el papel de estos FT en la respuesta a ácido benzoico.

En la figura 7.a., observamos que Pdr1 muestra una expresión del gen de la luciferasa parecido al ensayo frente a ácido sórbico, en cambio, frente a ninguna de las concentraciones medidas el FT se activa específicamente, no depende del ácido.

Un comportamiento parecido se puede observar para los FT Yrm1 y Pdr8, es decir se observan curvas de inducción, pero se producen igualmente en ausencia de ácido benzoico solo en presencia del disolvente. Por lo tanto, ninguno de los FT incluidos en este estudio parece activarse específicamente por ácido benzoico.



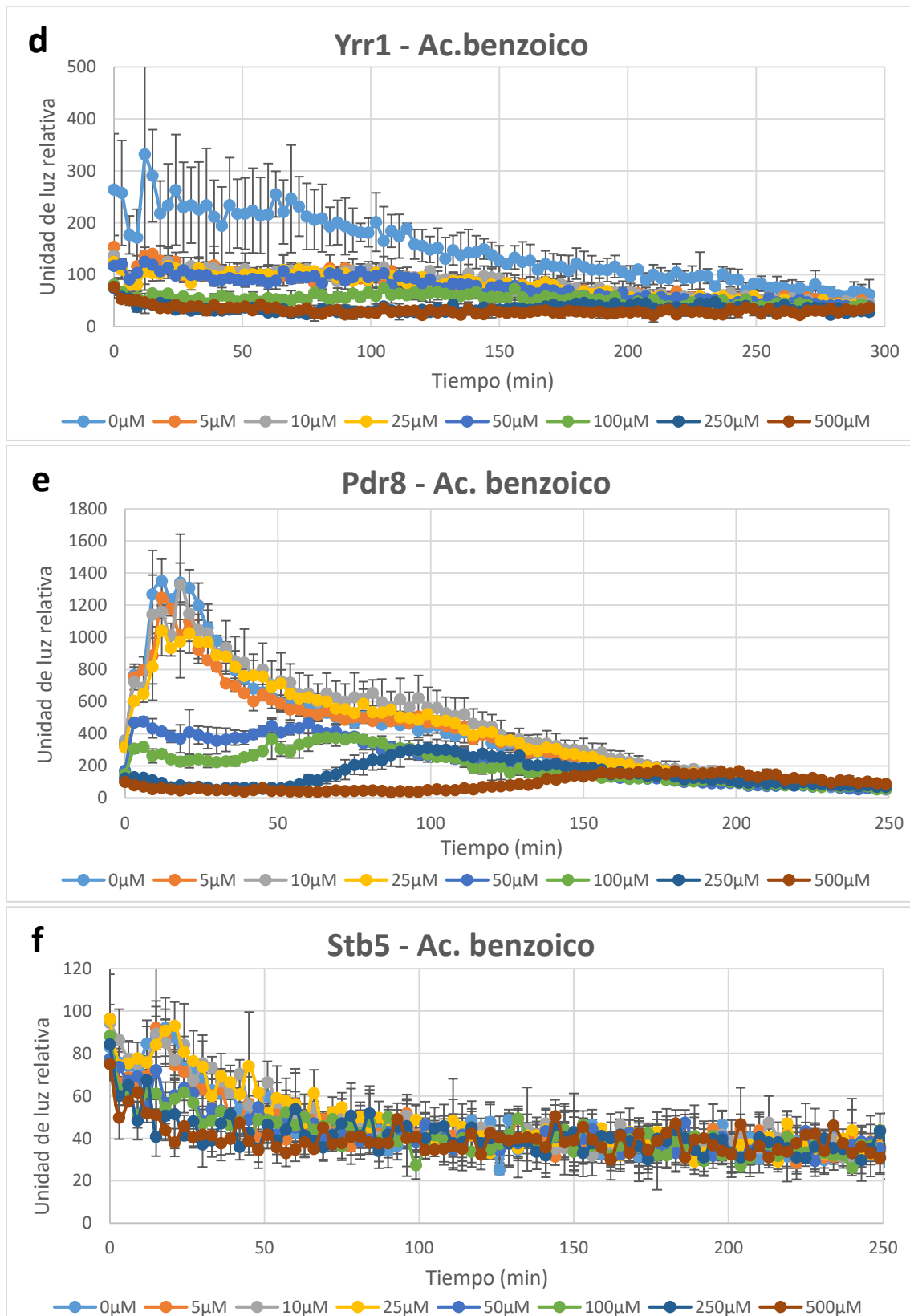


Figura 7. Respuesta de diferentes FT del sistema PDR a ácido benzoico. Curvas dosis-respuesta obtenidas al tratar diferentes cepas, con factores de transcripción integrados, con un baremo de concentraciones de ácido sórbico de 0 a 500 μM durante 300 minutos. Se incluyen las barras de error para los valores representados. (a) FT Pdr1, (b) FT Pdr3, (c) FT Yrr1, (d) FT Yrr1, (e) FT Pdr8, (f) FT Stb5. De los valores obtenidos por triplicado se representa su promedio y la desviación estándar.

4.3. Ensayo de crecimiento de cepas mutantes para los FT estudiados frente a diferentes estreses por ácidos orgánicos

Para comprobar si los factores de transcripción estudiados con anterioridad, presentan una posible función diferencial en la respuesta a diferentes ácidos débiles, se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad con varias cepas mutantes para estos FT, incluyendo la cepa mutante para el FT War1 y la cepa de tipo silvestre (wt). Con esto se pretende observar la mayor o menor sensibilidad de las cepas mutantes a ácidos frente a la cepa silvestre.

A través de diversos estudios, se conoce que frente a estreses generados por ácidos débiles lipofílicos como ácido sórbico y benzoico, las células confieren protección mediante la activación de War1. Se cree que se produce la unión directa entre este FT y los aniones ácidos, aunque no está completamente claro. Por esto, se ha considerado que sería interesante añadir a este ensayo el FT War1.

El ensayo se llevó a cabo en una placa transparente de 96 pocillos, donde se añadieron las células de las cepas mutantes o de tipo silvestre a una OD₆₀₀ de 0,25 y, posteriormente, se añadió el medio tratado con las diferentes concentraciones de estudio por duplicado, consiguiendo una OD₆₀₀ final de 0,025, adecuada para apreciar el crecimiento de las células y conseguir el mayor número de ciclos de división. Con los resultados obtenidos, se realizó el promedio de los valores por duplicado y se representó la absorbancia frente al tiempo, obteniendo las gráficas que se observan en la figura 8 y figura 9. Estas figuras solo exponen 3 gráficas, debido a que los FT Pdr1, Pdr3, Yrr1 e Yrm1 muestran un comportamiento muy similar, resumiéndolo en la presentación de la figura 8.a y figura 9.a.

4.3.1. Ácido acético

En el ensayo de crecimiento frente a ácido acético, las concentraciones de estudio fueron 0 mM, 25 mM y 50 mM, los resultados obtenidos se muestran en la figura 8, donde podemos observar como el crecimiento de las cepas mutantes para *pdr1*, *pdr3*, *yrr1* e *yrm1* (figura 8.a) es parecido al de la cepa silvestre, muestran la misma sensibilidad por el ácido, por lo que, estos factores de transcripción no intervienen en la respuesta de levaduras a estreses generados por ácido acético.

En las cepas mutantes para *Stb5*, se observa un retraso en el crecimiento tanto para 25 mM, como para 50 mM, comparado con la cepa silvestre, alcanzando un estado estacionario mayor que la cepa control. Esto confirmaría la selección de *Stb5* como uno de los factores de transcripción necesarios para la resistencia a ácido acético en levaduras, presentando un alto porcentaje de dianas entre los genes requeridos para la tolerancia a este ácido (Mira *et al.*, 2010).

Por último, en el caso del mutante $\Delta war1$, para una concentración de ácido acético de 25 mM no presenta diferencia en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, para 50 mM de ácido, la cepa retrasa su crecimiento, lo que sugiere que el FT War1 no es necesario en la respuesta al estrés generado por el ácido si no se dan unas concentraciones elevadas del mismo, como sería de 50 mM en adelante. Sería necesario repetir el ensayo con concentraciones más elevadas y observar cómo influyen en el crecimiento de estas cepas.

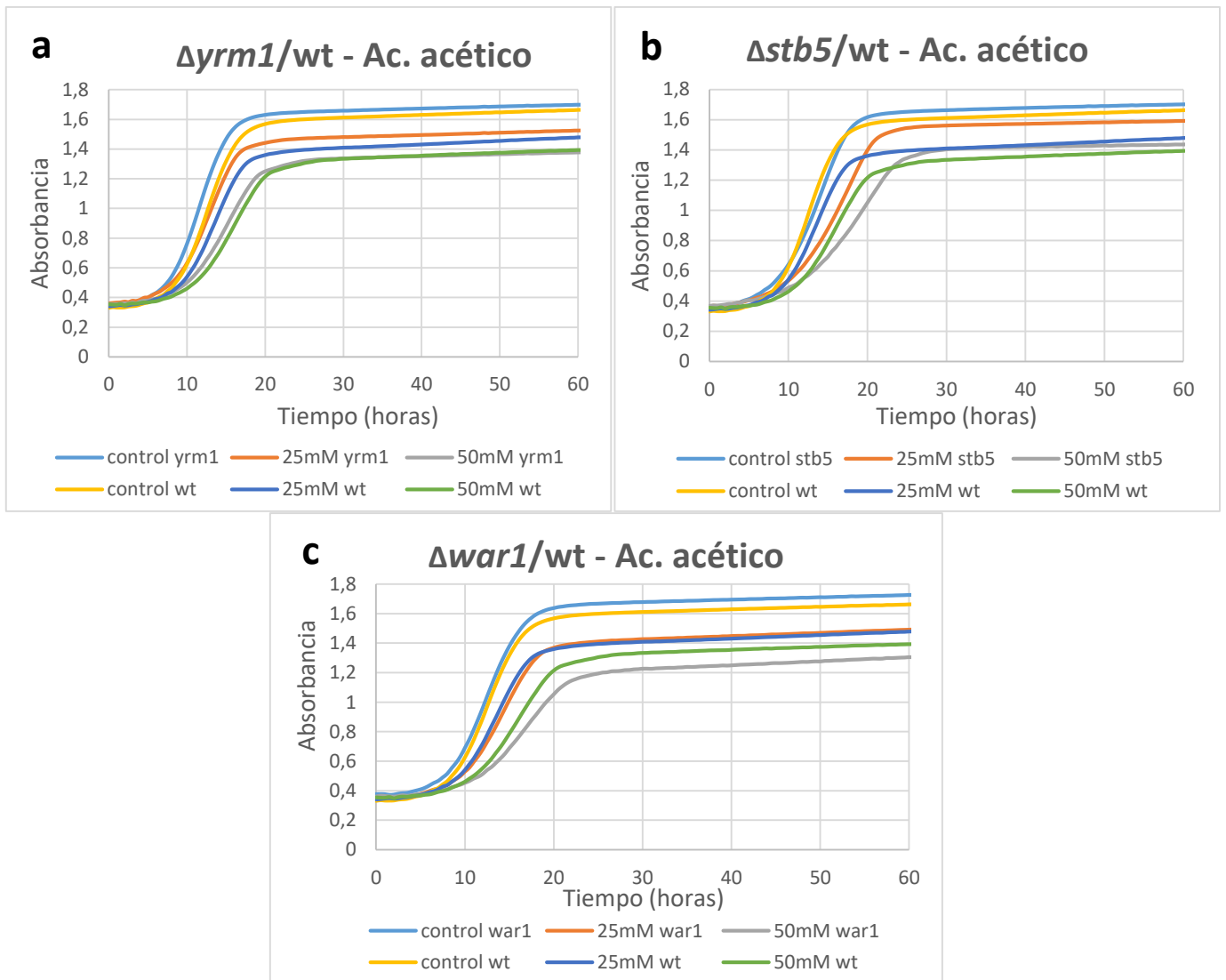


Figura 8. Caracterización del crecimiento de cepas mutantes para varios FT frente a ácido acético. Representación de las curvas de crecimiento obtenidas al tratar cepas de levadura mutantes y la cepa silvestre con diferentes concentraciones (0, 25 y 50 mM) de ácido acético durante 60 horas. El experimento se realizó por duplicado y se muestra el valor promedio. La desviación estándar es menor del 10% para cada replica, las barras de error no han sido representadas para facilitar la visualización de las gráficas. (a) Curva de crecimiento del mutante $\Delta yrm1$ y la cepa silvestre (b) Curva de crecimiento del mutante $\Delta stb5$ y la cepa silvestre. (c) Curva de crecimiento del mutante $\Delta war1$ y la cepa silvestre.

4.3.2. Ácido benzoico

En el caso del ensayo con ácido benzoico, las concentraciones de estudio fueron mucho más pequeñas, de 1 y 2,5 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.

Cabe destacar que, para todas las cepas estudiadas, la concentración de 2,5 mM induce la muerte celular, las células no son capaces de hacer frente a esta concentración de ácido débil. Los mutantes de *pdr1*, *pdr3*, *yrr1* e *yrm1*, presentan un crecimiento muy similar, representando únicamente la gráfica correspondiente a *yrm1*, en la figura 9.a. Así mismo, tanto el crecimiento sin estrés como frente a una concentración de ácido de 1 mM es prácticamente igual para estos mutantes que para la cepa silvestre, indicando que estos no interfieren en el crecimiento de la célula frente a ácido benzoico, como se había deducido del ensayo de expresión de la luciferasa.

En cambio, el mutante *stb5* (figura 9.b) presenta un ligero retraso en el crecimiento frente a la cepa silvestre lo que puede sugerir que *stb5* presente sensibilidad frente a este ácido, lo que corroboraría que la OD inicial de las células del experimento anterior podría ser la causante de la expresión obtenida, siendo necesario volver a realizar el experimento con el fin de obtener datos fiables.

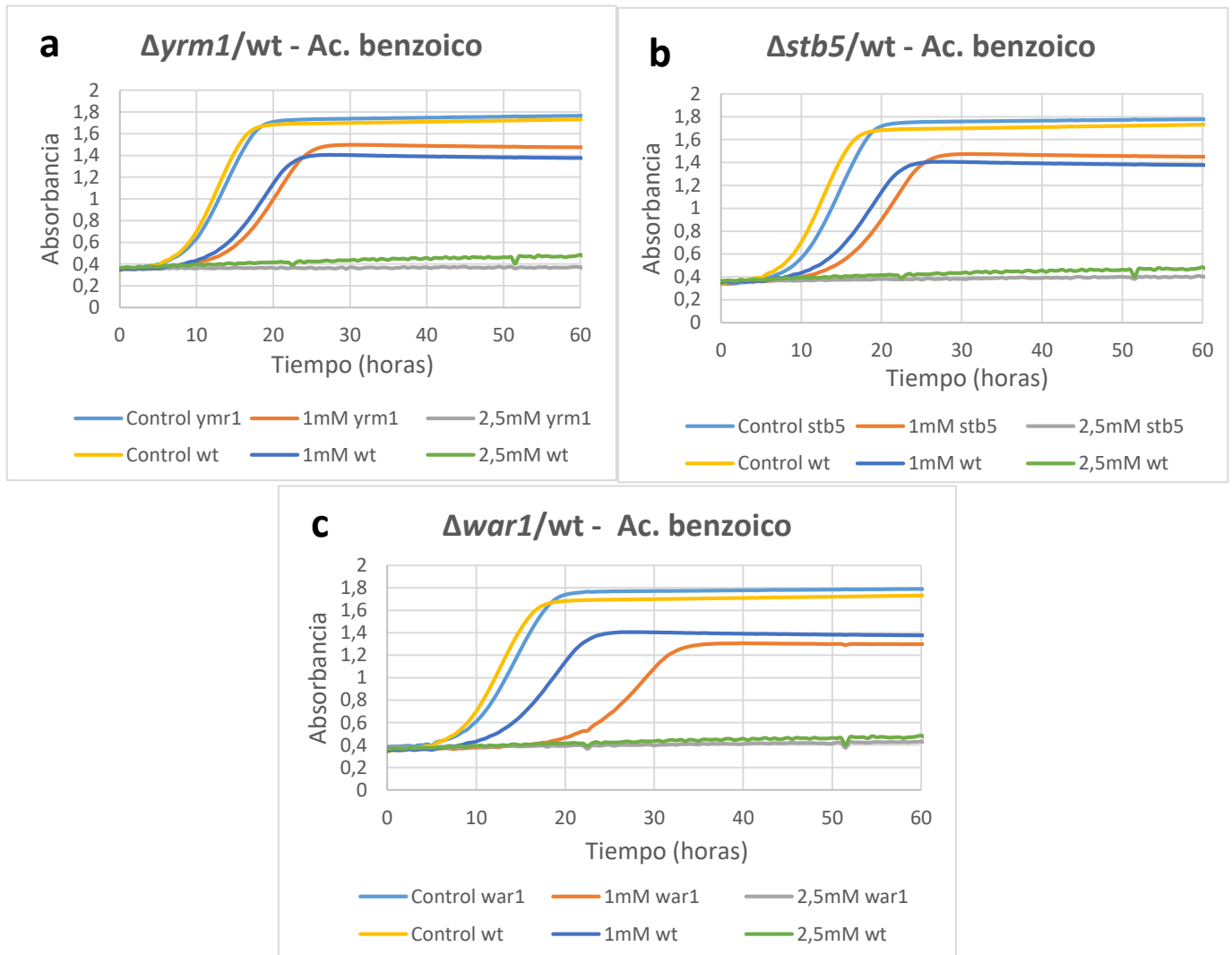


Figura 9. Caracterización del crecimiento de cepas mutantes para varios FT frente a ácido benzoico. Representación de las curvas de crecimiento obtenidas al tratar cepas de levadura mutantes y la cepa silvestre con diferentes concentraciones (0, 1 y 2,5 mM) de ácido benzoico durante 60 horas. El experimento se realizó por duplicado y se muestra el promedio. La desviación estándar es menor del 18% para cada replica, las barras de error no han sido representadas para facilitar la visualización de las gráficas. (a) Curva de crecimiento del mutante *yrm1* y la cepa silvestre (b) Curva de crecimiento del mutante *stb5* y la cepa silvestre. (c) Curva de crecimiento del mutante *war1* y la cepa silvestre.

Por último, el mutante para War1 (figura 9.c), es el que mayor sensibilidad muestra entre todos los FT estudiados, para una concentración de 1 mM se observa como tarda 10 horas más en responder al estrés generado que la cepa silvestre e iniciar el crecimiento celular, alcanzando un estado estacionario ligeramente menor que la cepa silvestre. Esto indica que War1 está involucrado en la respuesta a ácido benzoico, la eliminación del gen *WAR1* conduce a un

fenotipo de hipersusceptibilidad frente a ácidos débiles moderadamente lipófilos (Sousa *et al.*, 2012).

Conociendo estos datos y viendo que tanto Stb5 y, en mayor medida, War1, tienen efecto en el crecimiento de levaduras frente a ácido acético y benzoico, sería interesante realizar ensayos con otros ácidos como ácido sórbico, estudiado en otros ensayos de este trabajo, o incluso frente a otros como ácido propiónico. Así mismo, se podría generar una construcción que incluyera el promotor War1 para realizar ensayos de expresión génica con luciferasa desestabilizada frente a diversos estreses. Además, se podrían añadir concentraciones intermedias dentro del rango acotado, para conocer con mayor exactitud entre qué concentraciones se genera la respuesta al estrés generado.

4.4. Construcciones con promotor de interés fusionado al gen de la luciferasa

Con respecto a uno de los objetivos, se crearon construcciones con promotores específicos y el gen de la luciferasa desestabilizado (lucCP⁺), para monitorizar *in vivo* la expresión génica frente a un tipo de estrés con respecto al ciclo celular, con el gen *CLN1*; a la célula hija, con los genes *CTS1*, *SCW11* y *DSE1*; y a estrés en general, con el gen *DDR48* (mirar tabla 2, para información sobre estos promotores).

La forma en que se generaron las construcciones promotor-lucCP⁺ se presenta esquematizada en la figura 10, además, se explica a continuación. En primer lugar, se diseñaron los cebadores adecuados para amplificar la región promotora requerida, y tras la extracción del ADN cromosómico de la cepa de levadura BY4741, se amplificaron las regiones de interés mediante una PCR. Después, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar que la amplificación había funcionado correctamente, y se purificaron y cuantificaron los productos.

Por otro lado, se hicieron precultivos de la cepa DH5 α de *E. coli* que contiene el plásmido pAG413-CYC1 Δ -lucCP⁺, se purificó el ADN plasmídico y se cuantificó su concentración. Con

Tabla 2. Descripción de los promotores estudiados según SGD.

Nombre	Descripción
CLN1	Ciclina G1 involucrada en la regulación del ciclo celular; activa la quinasa Cdc28p para promover la transición de las fases G1 a S.
CTS1	Endocitinasas, requerida para la separación celular después de la mitosis
DSE2 (Daughter Specific Expression)	Proteína secretada específica de células hijas con similitud con glucanasas; degrada la pared celular de la célula hija haciendo que esta se separe de la madre.
SCW11 (Soluble Cell Wall Protein)	Proteína de la pared celular con similitud a glucanasas; puede desempeñar un papel en la conjugación durante su apareamiento.
DDR48 (DNA Damage Responsive)	Proteína sensible al daño en el ADN; la expresión aumenta en respuesta al estrés por choque térmico o tratamientos que producen lesiones en el ADN.

ambos ADNs purificados, se hizo una digestión con las enzimas de restricción SacI y SmaI, seguido de una electroforesis y la extracción, purificación y cuantificación del ADN de interés, correspondiente al vector y a los insertos, por separado. Posteriormente, se hizo una ligación del vector con los insertos y se transformaron células competentes de *E. coli*, cultivándolas,

después, en medio sólido LB con ampicilina. De las colonias crecidas, algunas fueron cultivadas en medio líquido, para purificar su ADN, que debería contener la construcción deseada.

Para comprobar que, efectivamente, las células de *E. coli* contenían la construcción con la secuencia promotora de los genes de estudio, se realizó, por una parte, una digestión con las mismas enzimas de restricción y una electroforesis. Se observaron dos bandas; una de 8 kilobases correspondiente al vector, y otra de 1 kilobases aproximadamente, que correspondía con el inserto. Por otra parte, el ADN purificado se mandó a secuenciar, obteniendo las secuencias correspondientes a las regiones amplificadas. Tras esta validación, se hicieron glicerizados de los cultivos bacterianos con las construcciones plasmídicas deseadas, con el fin de guardarlos en la colección del laboratorio para posibles trabajos futuros.

Por último, se transformaron células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*, previamente cultivadas, con una OD₆₀₀ entre 1,5 y 2,5, y se cultivaron en medio SD –His +Leu +Met +Ura durante 2-3 días a 30°C. Se seleccionaron tres colonias bacterianas por cada construcción, ya que también habían crecido levaduras y se volvieron a crecer todas ellas en una placa con el mismo medio, quedando preparadas para realizar el ensayo de expresión génica frente a estrés osmótico.

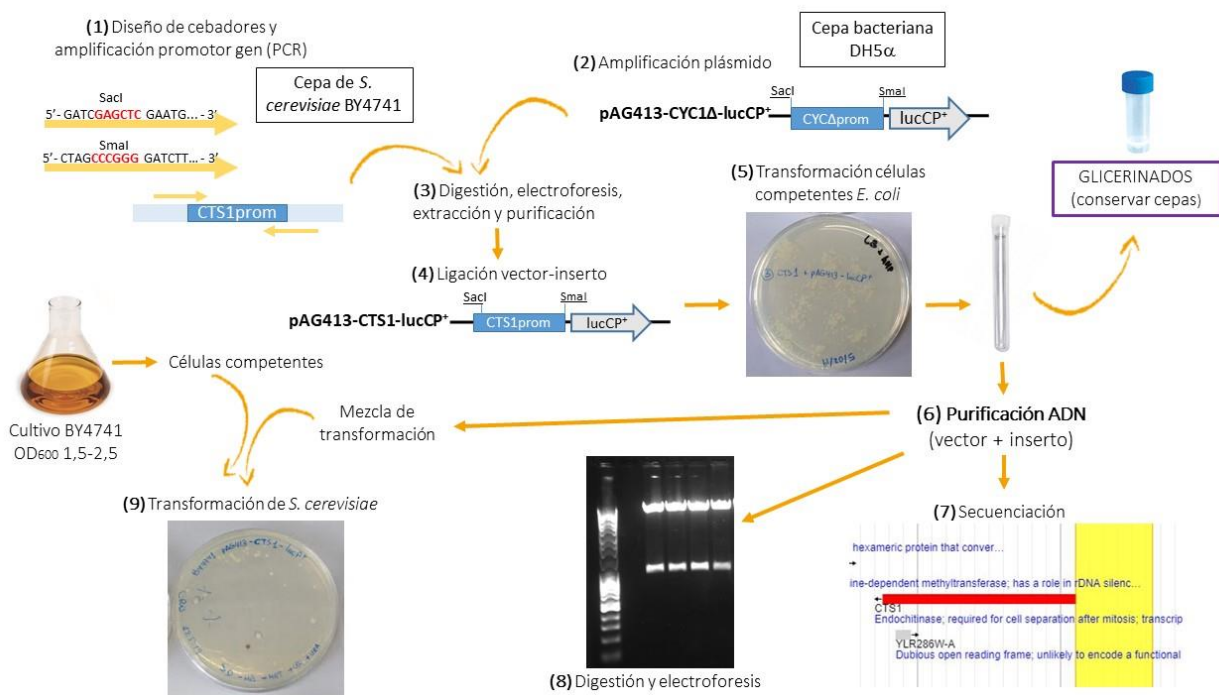


Figura 10. Esquema del proceso para la creación de una construcción con un promotor fusionado al gen de la luciferasa desestabilizada. Muestra los pasos a seguir para crear una construcción plasmídica con un promotor de interés. (1) Diseño de cebadores y amplificación del promotor del gen de la cepa BY4741 de *S. cerevisiae*, mediante PCR utilizando ADN genómico como molde. (2) Amplificación del plásmido, cultivando la cepa bacteriana DH5α con la construcción pAG-CYC1Δ-lucCP+. (3) Se realiza una digestión con las enzimas de restricción SacI y SmaI, electroforesis, extracción de los fragmentos y su purificación. (4) Se realiza la ligación del vector y el inserto. (5) Se transforman las células competentes de *E. coli* y se pasan a medio líquido LB amp, del que se generaran glicerizados para conservar las cepas y, por otra parte, (6) se realizará la purificación del ADN. Posteriormente, como métodos de comprobación (7) se determina la secuencia del inserto y su fusión con el gen de la luciferasa y (8) se realiza una digestión y una electroforesis, donde se observan los fragmentos correspondientes al vector (8 kb) y al inserto (1 kb). Además, se prepara la mezcla de transformación para (9) transformar células de levadura de la cepa BY4741 para ensayos funcionales.

4.5. Aplicación de las construcciones generadas a la respuesta a estrés osmótico

El ciclo celular es una secuencia de eventos bioquímicos que están controlados por una maquinaria molecular compleja, pero al mismo tiempo, robusta. Esto permite a las células lograr una auto-reproducción precisa bajo una amplia gama de condiciones diferentes, incluso bajo condiciones de estrés.

Como se ha descrito con anterioridad, cualquier tipo de estrés desencadena una respuesta adaptativa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, generando una respuesta transcripcional, produciéndose cambios en la expresión génica. En este caso, frente a un estrés producido por cualquier sustancia, la levadura responderá expresando aquellos genes que permitan la adaptación celular, y se inhibirá la expresión de genes que tengan que ver con el ciclo celular y la división de la célula hija hasta que las células se hayan adaptado y sean capaces de retomar su actividad normal. En este contexto, se puede hacer uso del sistema luciferasa para observar los cambios in vivo y a tiempo real que se producen en la célula, y obtener un patrón del tiempo que tardan las células en adaptarse a un estrés y volver a dividirse.

Con las construcciones preparadas, se transformaron las células de la cepa BY4741 de levadura *S. cerevisiae*. Se obtuvieron precultivos celulares que se prepararon para el ensayo de luminometría, conforme al proceso descrito en la sección de *Materiales y métodos* inspirado por el protocolo de Rienzo *et al.*, (2012). Las células fueron expuestas a un estrés osmótico frente a diferentes concentraciones desde 0 a 1M (por duplicado), generado por la adición de NaCl, y posteriormente, se midió la actividad luciferasa a tiempo real durante unos 300 minutos.

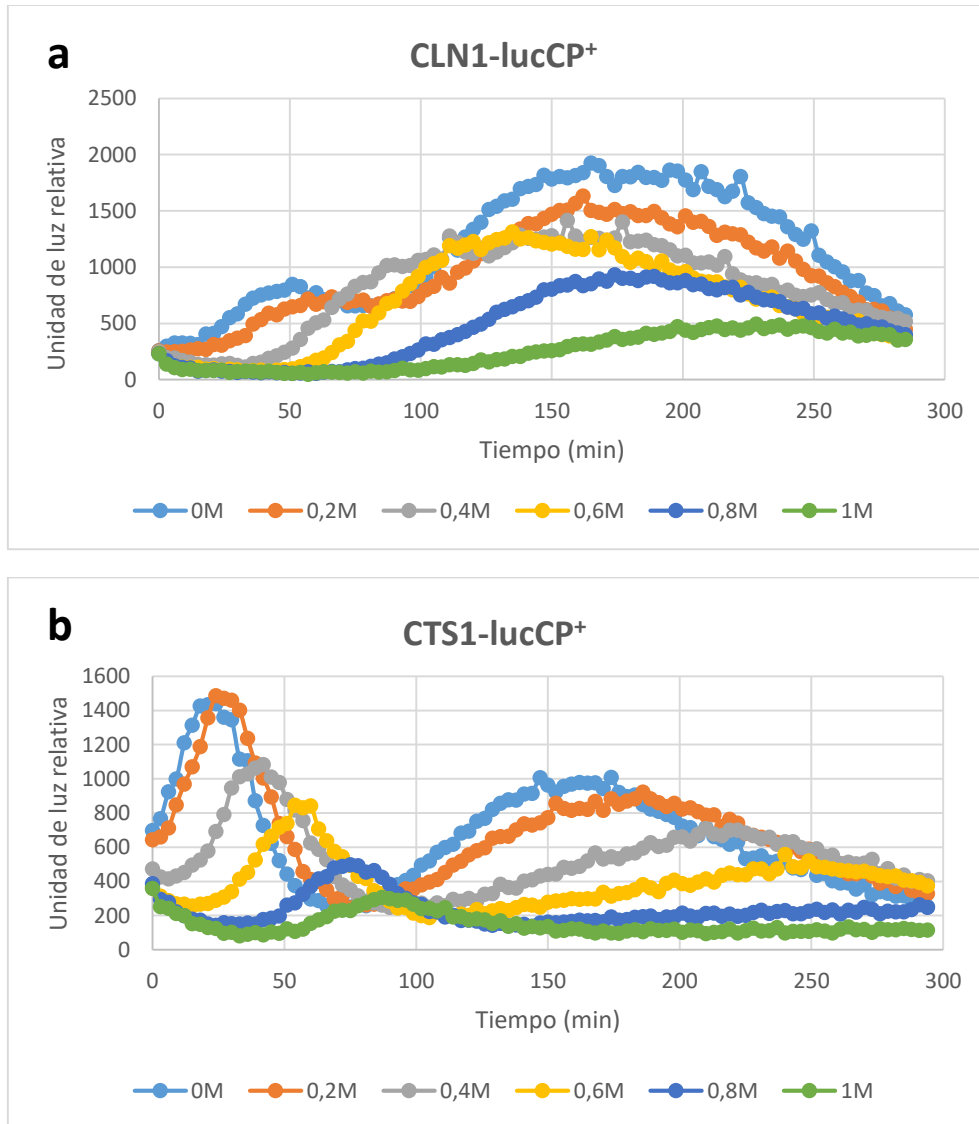
A partir de los resultados obtenidos, se realizó un promedio de los valores por duplicado, se normalizaron respecto a la OD₆₀₀ inicial de cada cultivo y se representaron en unidades de luz relativa frente al tiempo, obteniendo las gráficas de la figura 11. Así mismo, con el objetivo de comparar la expresión génica de todos los genes con respecto al tiempo, y poder observar el momento en que se expresan unos u otros genes dependiendo de las necesidades de la célula, se representaron para las concentraciones de 0,4, 0,6 y 0,8 M todos los genes en una misma gráfica (figura 12).

En la figura 11, se observa que la respuesta transcripcional de todas las cepas con los diferentes promotores integrados va disminuyendo y se va retrasando según aumenta la concentración de NaCl, excepto en el caso de DDR48-lucCP⁺ (figura 11.e) donde la mayor expresión se consigue a 0,4 M, seguido de 0,2 y luego 0,6 y 0, debido a que *DDR48* es un gen en respuesta a distintos estreses. Se interpreta que, para las concentraciones de 0,2, 0,4 y 0,6 de NaCl, las células tienen que hacer frente al daño causado por estrés y, por lo tanto, se expresa en mayor medida este gen. Para concentraciones mayores, se atrasa la expresión, pero también tiene lugar.

Es importante notar que en condiciones “control” (0 M NaCl) las células se exponen a H₂O en una dilución 1:5, lo que en realidad significa un pequeño choque hipo-osmótico. Esto explica que todos los reporteros empleados demuestran inducción también en estas condiciones. Una manera de evitar este efecto sería hacer los ensayos cinéticos con NaCl disuelto en el medio de crecimiento, eliminando así la disminución de la osmolaridad.

El gen *CLN1*, que se observa en la figura 11.a, muestra dos olas de expresión para las concentraciones de 0 y 0,2 M, con unos 25 minutos aproximadamente entre ellas, y según aumenta la concentración de NaCl se retrasa su expresión, llegando a ser mínima para las células tratadas con 1M de NaCl.

Para las construcciones con *CTS1*, *DSE2* y *SCW11*, se observa un comportamiento bastante similar, de acuerdo a lo que cabría esperar al estar todas relacionadas con la célula hija. Presentan dos olas de expresión a concentraciones 0 y 0,2 M, (a excepción de *CTS1* que también las muestra para 0,4 y 0,6 M), correspondiente con la aparición de las células hijas. Según aumenta la concentración se produce un retraso en la aparición de las curvas dosis-respuesta, se observa que, al pasar de 0,2 a 0,4 M pasan aproximadamente 20 minutos, de 0,4 a 0,6 unos 15 minutos y de 0,6 a 0,8 otros 15 minutos, probablemente debido a que las células necesitan un tiempo mayor para adaptarse al estrés generado y poder volver a dividirse. Además, a partir de 1 M no presentan prácticamente expresión, lo que sugiere que es demasiada concentración como para que las células se dividan y proliferen.



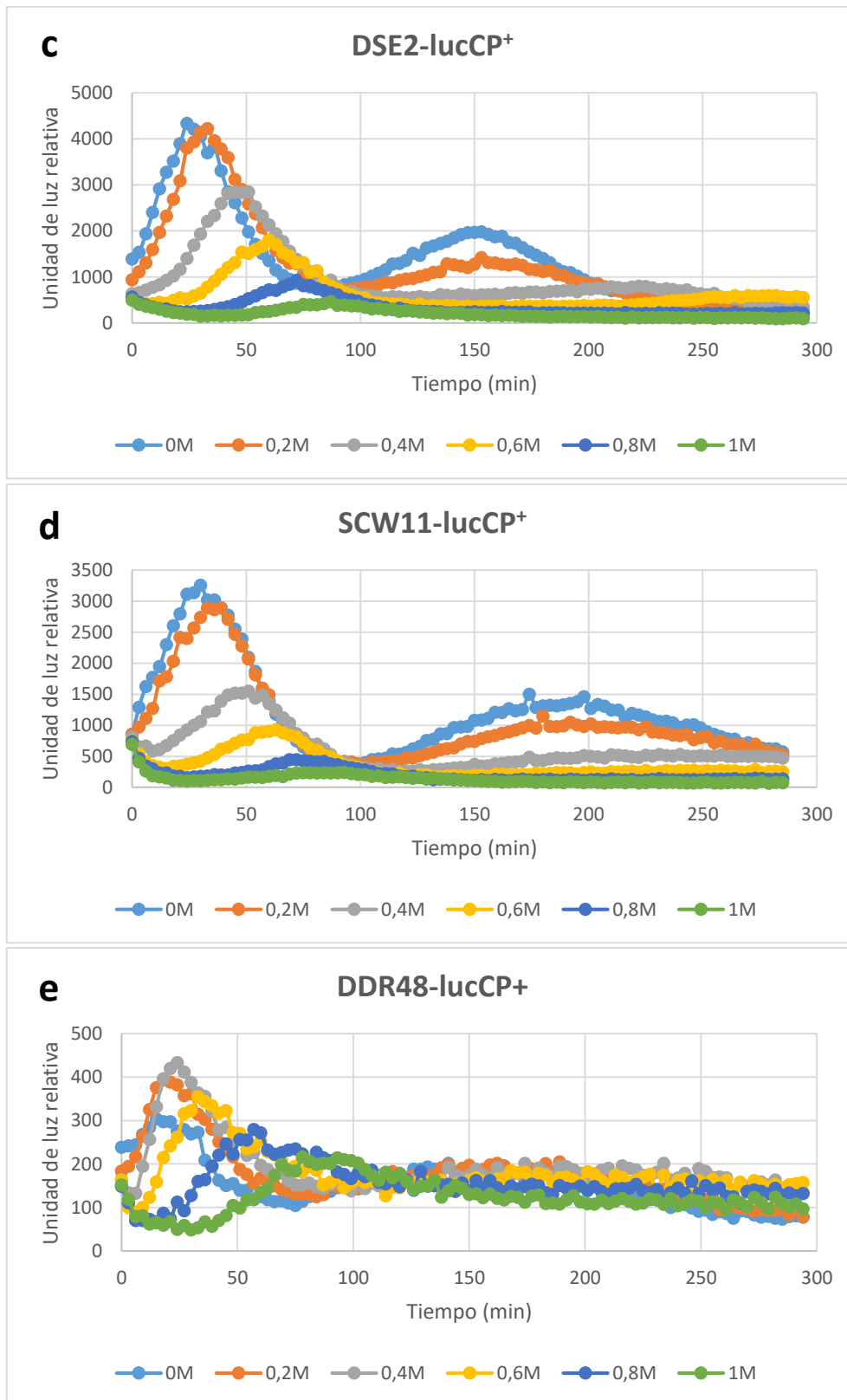


Figura 11. Comportamiento dosis-respuesta de promotores relacionados con el ciclo celular, la división de célula hija y de estrés en general. Las curvas se obtuvieron a través del sistema luciferasa, representando la expresión en unidades de luz relativa frente al tiempo para concentraciones de NaCl de 0 a 1 M. Las construcciones estudiadas corresponden con: (a) CLN1-lucCP⁺, (b) CTS1-lucCP⁺, (c) DSE2-lucCP⁺, (d) SCW11-lucCP⁺ y (e) DDR48-lucCP⁺. Los resultados obtenidos fueron normalizados con respecto

a la OD₆₀₀. Los valores obtenidos por duplicado se promediaron. La desviación estándar de los valores no superó el 35%.

Por otra parte, con respecto a la figura 12.f, se observa la dinámica en la expresión de los diferentes genes en conjunto según son necesarios para que la célula responda a un estrés general, induzca la división celular o de lugar a células hijas. Así, vemos que en primer lugar, se da la expresión del gen *DDR48*, como respuesta al estrés generado por las diferentes concentraciones de NaCl. Posteriormente, se observa la expresión, casi al mismo tiempo, de los genes *CTS1*, *DSE2* y *SCW11*, ya que, tras unos minutos de adaptación, las células están preparadas para continuar con su ciclo normal de reproducción. También se observa cómo según aumenta la concentración de NaCl, el tiempo de respuesta de la célula, caracterizado por la expresión de los genes de estudio, se va retrasando unos minutos. Esto puede deberse a que las células tienen que hacer frente a un mayor estrés y, por tanto, la respuesta transcripcional es más lenta.

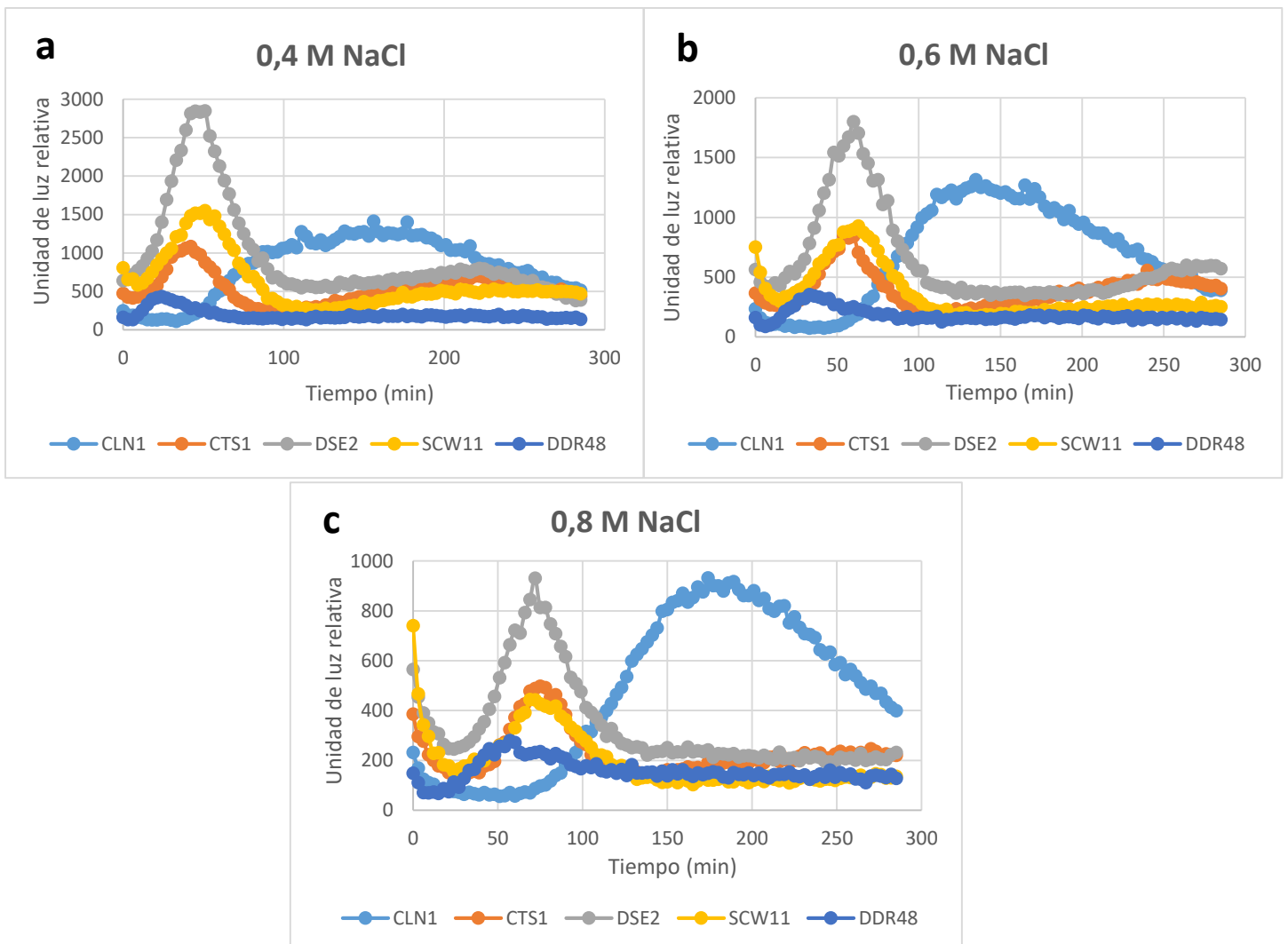


Figura 12. Representación dinámica de la expresión de los promotores para diferentes concentraciones de NaCl. Curvas dosis-respuesta de los promotores CLN1, CTS1, DSE2, SCW11 y DDR48 con respecto a diferentes concentraciones de NaCl: (a) 0,4M, (b) 0,6 M y (c) 0,8 M. Muestran la expresión de cada uno de los promotores frente al tiempo. Los valores obtenidos por duplicado se promediaron. La desviación estándar de los duplicados no superó el 30%.

Cabe destacar, que en todas la gráficas, se observa una curva de expresión para *CLN1* que comienza cuando disminuye notablemente la expresión de los genes relacionados con las células hijas, fenómeno que sorprende debido a que la expresión de *CLN1* se espera que se dé de forma previa a la generación de las células hijas, siendo necesaria para el comienzo de la división celular. Se puede pensar, que la primera ola de expresión de *CLN1* no ha sido registrada en la curva dosis-respuesta mediante la luciferasa, y que posteriormente a la curva que se visualiza se debería volver a observar expresión de los tres genes estudiados en relación a la célula hija, generando un ciclo de división celular.

Sería interesante investigar con más profundidad la aparente falta de inducción de *CLN1* en la primera división de las células en condiciones de estrés. Se podrían aplicar otros tipos de estrés para corroborar si se trata de un fenómeno general. Además sería necesario el seguimiento de más marcadores del ciclo celular durante las primeras divisiones después del impacto de un estrés para obtener una imagen más completa de la regulación de la proliferación en condiciones de estrés ambiental.

Sin embargo, en general y observando estos resultados se debe tener en cuenta que al ser construcciones forzadas, no se dan de forma natural, puede ser que entre diferentes fusiones con la luciferasa haya diferencias de eficiencia de expresión. Esto genera que el promotor presente mayor sensibilidad y especificidad, observando probablemente mayor expresión de unos u otros, lo que puede influir en los resultados obtenidos. Pero en general podemos concluir que las construcciones creadas en este trabajo son útiles para el seguimiento de la expresión relativa de los genes de interés a lo largo de la adaptación al estrés.

Este ensayo nos permite determinar la dinámica en la respuesta transcripcional respecto al ciclo celular, al generar un estrés osmótico en la célula a diferentes concentraciones. Y conociendo estos datos, pueden servir para el desarrollo de aplicaciones futuras, incluyendo otros tipos de estrés, donde se podrá investigar cómo diferentes factores genéticos alargan (o acortan) la fase entre adaptación a un estrés y la entrada de las células en proliferación. Otra aplicación interesante sería investigar como diferentes pre-tratamientos (p. ej. Antioxidantes frente a estrés oxidativo, etc.) mejoran el tiempo en retomar el ciclo celular después del impacto al estrés.

5. CONCLUSIONES

Tras la exposición y discusión de los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, las conclusiones que se extraen son las siguientes:

- Los elementos PDRE involucrados en el sistema multidroga de levadura, forman parte de la respuesta de defensa frente a ácido sórbico y benzoico, pero no frente a ácido acético.
- En la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a ácido sórbico interviene, al menos parcialmente, el factor de transcripción Pdr1; la respuesta a ácido acético involucra a Stb5 y War1; y la respuesta a ácido benzoico implica al FT War1.
- Se han generado herramientas de monitorización in vivo de la expresión génica específicas de genes del ciclo celular (*CLN1*), de la célula hija (*CTS1*, *SCW11*, *DSE2*) y de estrés en general (*DDR48*).
- La aplicación de estas construcciones “reporteros” a la respuesta a estrés osmótico demuestra que permiten conocer el tiempo que tardan las células en adaptarse a este estrés y comenzar de nuevo su división.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AKACHE, B. & TURCOTTE, B. (2002). New Regulators of Drug Sensitivity in the Family of Yeast Zinc Cluster Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21254–21260. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202566200>
- BALZI, E.; CHEN, W.; ULASZEWSKI, S.; CAPIEAUX, E. & GOFFEAU, A. (1987). The multidrug resistance gene PDR1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(35), 16871–16879. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316228>
- BECK, T. & HALL, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762), 689–692. <https://doi.org/10.1038/45287>
- BROWN, A. J. P.; COWEN, L. E.; DI PIETRO, A. & QUINN, J. (2017). Stress Adaptation. In *The Fungal Kingdom* (Vol. 5, pp. 463–485). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0048-2016>
- CANNON, R. D.; LAMPING, E.; HOLMES, A. R.; NIIMI, K.; BARET, P. V.; KENIYA, M. V.; TANABE, K.; NIIMI, M.; GOFFEAU, A. & MONK, B. C. (2009). Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 291–321. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>
- CAUSTON, H. C.; REN, B.; KOH, S. S.; HARBISON, C. T.; KANIN, E.; JENNINGS, E. G.; LEE, T. I.; TRUE, H. L.; LANDER, E. S. & YOUNG, R. A. (2001). Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2), 323–337. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.2.323>
- CORMACK, B. (1998). Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 1(4), 406–410. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066516>
- DE NADAL, E.; AMMERER, G. & POSAS, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 833–845. <https://doi.org/10.1038/nrg3055>
- DE NADAL, E. & POSAS, F. (2015). Osmostress-induced gene expression - a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS Journal*, 282(17), 3275–3285. <https://doi.org/10.1111/febs.13323>
- DELAVEREAU, T.; DELAHODDE, A.; CARVAJAL, E.; SUBIK, J. & JACQ, C. (1994). PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon. *Molecular & General Genetics: MGG*, 244(5), 501–511. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8078477>
- 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. *Molecular and Cellular Biology*, 33(11), 2228–2240. <https://doi.org/10.1128/MCB.00240-13>
- FOLCH-MALLOL, J. L.; GARAY-ARROYO, A.; LLEDÍAS, F. & COVARRUBIAS ROBLES, A. A. (2004). [The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1–2), 24–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17061523>

- GASCH, A. P.; SPELLMAN, P. T.; KAO, C. M.; CARMEL-HAREL, O.; EISEN, M. B.; STORZ, G., BOTSTEIN, D. & BROWN, P. O. (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–4257. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4241>
- GASCH, A. P. & WERNER-WASHBURNE, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & Integrative Genomics*, 2(4–5), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s10142-002-0058-2>
- GIETZ, R. D. & SCHIESTL, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols*, 2(1), 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- GORNER, W.; DURCHSCHLAG, E.; MARTINEZ-PASTOR, M. T.; ESTRUCH, F.; AMMERER, G.; HAMILTON, B.; RUIS, H. & SCHÜLLER, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, 12(4), 586–597. <https://doi.org/10.1101/gad.12.4.586>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 11427–11432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208549200>
- HOLOHAN, C.; VAN SCHAEYBROECK, S.; LONGLEY, D. B. & JOHNSTON, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>
- KIM, M. S.; CHO, K. H.; PARK, K. H.; JANG, J. & HAHN, J.S. (2019). Activation of Haa1 and War1 transcription factors by differential binding of weak acid anions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 47(3), 1211–1224. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1188>
- LESKINEN, P.; VIRTANEN, M. & KARP, M. (2003). One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast*, 20(13), 1109–1113. <https://doi.org/10.1002/yea.1024>
- LÖSCHER, W. & POTSCHKA, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8), 591–602. <https://doi.org/10.1038/nrn1728>
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(52), 52641–52650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309580200>
- MACPHERSON, S.; LAROCHELLE, M. & TURCOTTE, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(3), 583–604. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-06>
- MCNABB, D. S.; REED, R. & MARCINIAK, R. A. (2005). Dual luciferase assay system for rapid assessment of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(9), 1539–1549. <https://doi.org/10.1128/EC.4.9.1539-1549.2005>

- MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C. & SÁ-CORREIA, I. (2010). Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. *Omic: A Journal of Integrative Biology*, 14(5), 525–540. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0072>
- PASCUAL-AHUIR, A.; GONZÁLEZ-CANTÓ, E.; JUYOUX, P.; PABLE, J.; POVEDA-HUERTES, D.; SAIZ-BALBASTRE, S.; SQUEO, S.; UREÑA-MARCO, A.; VANACLOIG-PEDROS, E.; ZARAGOZA-INFANTE, L. & PROFT, M. (2019). Dose dependent gene expression is dynamically modulated by the history, physiology and age of yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1862(4), 457–471. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.02.009>
- 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), 219–231. <https://doi.org/10.1002/yea.2905>
- RIENZO, A.; POVEDA-HUERTES, D.; AYDIN, S.; BUCHLER, N. E.; PASCUAL-AHUIR, A. & PROFT, M. (2015). Different Mechanisms Confer Gradual Control and Memory at Nutrient- and Stress-Regulated Genes in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 35(21), 3669. <https://doi.org/10.1128/MCB.00729-15>
- SÁ-CORREIA, I.; DOS SANTOS, S. C.; TEIXEIRA, M. C.; CABRITO, T. R. & MIRA, N. P. (2009). Drug:H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends in Microbiology*, 17(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.007>
- SIMEONOV, A.; YASGAR, A.; JADHAV, A.; LOKESH, G. L.; KLUMPP, C.; MICHAEL, S.; AUSTIN, C. P.; NATARAJAH, A. & INGLESE, J. (2008). Dual-fluorophore quantitative high-throughput screen for inhibitors of BRCT–phosphoprotein interaction. *Analytical Biochemistry*, 375(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.11.039>
- SOONTORNGUN, N. (2017). Reprogramming of nonfermentative metabolism by stress-responsive transcription factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 63(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0609-z>
- SOUSA, M. J.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F.; LEÃO, C. & CÔRTE-REAL, M. (2012). Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid. In *Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response*. <https://doi.org/10.5772/27726>
- VANACLOIG-PEDROS, M.E. (2018). *Estrategias de defensa a estrés químico en Saccharomyces cerevisiae: regulación genética del transporte multidroga y mecanismos de detoxificación*. Tesis Doctoral en Biotecnología. Univ. Politécnica de Valencia. 179 pp.