

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE GENERAL

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

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

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

ÍNDICE DE FIGURAS

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

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

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

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

ÍNDICE DE TABLAS

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