

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Microbiología II**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel del complejo SWI/SNF en la transcripción regulada por la  
ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Belén Sanz Santamaría

Directores

Francisco Javier Arroyo Nombela  
José Manuel Rodríguez Peña

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DPTO. DE MICROBIOLOGÍA II



**Papel del complejo SWI/SNF en la transcripción  
regulada por la ruta de integridad celular en  
*Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por:

**Ana Belén Sanz Santamaría**

Directores:

**Francisco Javier Arroyo Nombela**

**José Manuel Rodríguez Peña**







Esta tesis ha sido posible gracias a:

- Una beca de posgrado para la Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia durante el período 2007-2011.
- El proyecto de investigación "Biogénesis de la pared fúngica como base del mantenimiento de la integridad celular: una aproximación genómica global en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*". BIO2007-67821 subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (2008-2010).
- El proyecto de investigación "Genómica Funcional de Levaduras y Hongos". Proyecto GR58/08. Ref. 920640. Entidad financiadora UCM/BSCH (2009-2010).



Dra. CONCHA GIL GARCÍA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que ANA BELÉN SANZ SANTAMARÍA ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los doctores Fco. Javier Arroyo Nombela y José Manuel Rodríguez Peña, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en farmacia con el título:

**“Papel del complejo SWI/SNF en la transcripción regulada por la ruta de integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*”**

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, a 16 de Enero de 2012

Fdo. Dra. Concha Gil García



## Agradecimientos...

Hay tantos y somos tantos que resulta difícil empezar... La verdad es que me gustaría daros las gracias a todos y cada uno de los que formáis parte del Departamento de Microbiología II ya que me habéis hecho sentir como en casa, dentro de una gran familia. A los profesores, compañeros, técnicos de laboratorio, secretaria... todos. Por ello, espero haber sabido mostraros todo mi agradecimiento y cariño durante el tiempo compartido y deciros que vosotros, de una forma u otra, también sois parte de este trabajo. ¡Gracias por todo!

Me gustaría hacer un agradecimiento especial a mis directores de Tesis, Javier y Jose, con los que ha sido un placer trabajar. Gracias por toda la confianza depositada en mí para este nuevo proyecto, da gusto ver que aunque haya sido difícil, las cosas al final se consiguen y los experimentos salen, para bien o para mal... ¡así es la ciencia! Gracias por todo, por todo lo que aquí he aprendido y por recordarnos siempre que aquí estamos para disfrutar. Gracias también a César Nombela por iniciarnos en el mundo de la genómica y por transmitirnos su entusiasmo por la ciencia.

Del mismo modo quisiera dar las gracias a todos mis compañeros de la U4, a los que forman y formaron parte de esta gran unidad. A Raúl por toda su ayuda, ya sabes que has sido un gran compañero y que me has enseñado mucho de lo que ahora sé. Gracias por haber estado siempre ahí y recuerda que este trabajo es en parte tuyo. A Sonia, que hace que te sientas afortunado de trabajar aquí ¡eres una gran *"lab manager!"*. Gracias por todo tu trabajo inicial, espero que te guste como ha terminado, también es en parte tuyo. A Patricia, mi compañera de Tesis. Gracias porque todo es más fácil cuando tienes una amiga con quien compartir tus estreses, ¡y que además te comprende perfectamente! A Noelia, con la que he compartido muy buenos momentos en el laboratorio. Gracias por todo y mucha suerte, ¡qué eres la siguiente! A Quique y Pilar, que aunque llevan menos tiempo ya son una parte importante del laboratorio. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por vuestro apoyo. A Lorena, que aunque sólo haya pasado un año por aquí su alegría y vitalidad han dejado marca. Gracias por hacer que estos días hayan sido menos estresantes. Y a Pablo, que aunque no sea de esta unidad, ¡es uno más! Gracias por tu ayuda y consejos. La verdad es que me llevo buenos amigos de aquí...

Quisiera expresar mi agradecimiento al Profesor Craig Peterson (University of Massachusetts Medical School) por darme la oportunidad de realizar dos estancias

científicas en su laboratorio, así como a toda la gente de allí, por hacerme sentir como en casa.

Gracias también a la Unidad de Genómica, siempre dispuestos a ayudar, por su excelente trabajo.

Y por último, mi familia y amigos, que desde fuera del laboratorio han sabido apoyarme y han intentado comprenderme siempre. A mis padres y hermanas, Susana y Maite, gracias por vuestros ánimos e interés en mis "bichos". A Roberto muchas gracias por tu apoyo incondicional y, por entre tantas cosas... estar a mi lado.





<b>ÍNDICE</b>	<b>I - V</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VII - IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs</b>	<b>3</b>
1.1. LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR (CWI)	5
1.1.1. Sensores	7
1.1.2. Rho1 y Pkc1	8
1.1.3. Módulo de MAPKs	9
1.1.4. Factores de transcripción	11
1.1.5. Respuesta transcripcional mediada por la ruta CWI	14
<b>2. EL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN EN LEVADURAS</b>	<b>16</b>
2.1. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA	17
2.2. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	22
2.3. MAQUINARIA GENERAL DE LA TRANSCRIPCIÓN	23
2.4. COMPLEJOS MODIFICADORES DE CROMATINA	25
2.4.1. Complejos modificadores de histonas	25
2.4.2. Complejos remodeladores de cromatina	28
2.4.3. Complejo SWI/SNF	32
<b>3. CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN SITUACIONES DE ESTRÉS</b>	<b>37</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>43</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS</b>	<b>55</b>
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
1.2. <i>Escherichia coli</i>	56
<b>2. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS</b>	<b>56</b>
2.1. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO	57
2.2. CULTIVO Y RECOGIDA DE CÉLULAS DE LEVADURA	57
<b>3. PLÁSMIDOS</b>	<b>58</b>
<b>4. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b>	<b>60</b>

4.1. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIA	61
4.2. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURA	61
<b>5. GENERACIÓN DE CEPAS ETIQUETADAS CON EL EPÍTOPO HA</b>	<b>61</b>
<b>6. DISECCIÓN DE ASCAS DE LEVADURA PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS HAPLOIDES</b>	<b>62</b>
6.1. CONDICIONES DE ESPORULACIÓN	62
6.2. DISECCIÓN DE ASCAS Y MICROMANIPULACIÓN DE ESPORAS	62
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS HAPLOIDES OBTENIDAS	63
6.4. VERIFICACIÓN DE LAS DELECCIONES GÉNICAS MEDIANTE PCR	63
<b>7. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS</b>	<b>64</b>
7.1. MÉTODO DE SIEMBRA POR DILUCIÓN EN GOTA	64
7.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) EN MEDIO LÍQUIDO	65
<b>8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD <math>\beta</math>-GALACTOSIDASA</b>	<b>65</b>
<b>9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN-BLOTTING</i></b>	<b>66</b>
9.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	66
9.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	67
9.3. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA DE NITROCELULOSA	67
9.4. INMUNODETECCIÓN	68
<b>10. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE <i>MICROARRAYS</i> DE DNA</b>	<b>68</b>
10.1. EXTRACCIÓN DE RNA	69
10.2. SÍNTESIS, MARCAJE E HIBRIDACIÓN DEL cDNA	69
10.3. ANÁLISIS DE IMÁGENES, PROCESAMIENTO DE DATOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS	70
<b>11. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA</b>	<b>71</b>
<b>12. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)</b>	<b>72</b>
12.1. ENTRECruzAMIENTO " <i>IN VIVO</i> " Y RECOGIDA DE CÉLULAS	73
12.2. LISIS CELULAR Y AISLAMIENTO DE CROMATINA	74
12.3. TITULACIÓN DE ANTICUERPOS	75
12.4. INMUNOPRECIPITACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA	75
12.5. CÁLCULO DE LA TASA DE ENRIQUECIMIENTO MEDIANTE PCR CUANTITATIVA	76
<b>13. TRATAMIENTO CON MNasa Y ESCANEADO DE NUCLEOSOMAS</b>	<b>77</b>
13.1. ENTRECruzAMIENTO " <i>IN VIVO</i> " Y RECOGIDA DE CÉLULAS	78
13.2. TRATAMIENTO CON MNasa, REVERSIÓN DEL ENTRECruzAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL DNA	78
13.3. MUESTRAS CONTROL GENERADAS A PARTIR DE DNA GENÓMICO	80

13.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS, AMPLIFICACIÓN POR qPCR Y ANÁLISIS DE DATOS	81
<b>14. PURIFICACIÓN TAP-tag DEL COMPLEJO SWI/SNF</b>	<b>82</b>
<b>15. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST</b>	<b>83</b>
<b>16. ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN "IN VITRO"</b>	<b>84</b>
<b>17. ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN "IN VIVO"</b>	<b>84</b>
<b>18. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS</b>	<b>85</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>89</b>
<hr/>	
<b>1. EL PROMOTOR DE <i>MLP1</i> POSEE DOS CAJAS FUNCIONALES DE UNIÓN A Rlm1</b>	<b>91</b>
<b>2. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>MLP1</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS</b>	<b>92</b>
<b>3. LA RNA Pol II SE RECLUTA AL PROMOTOR DE <i>MLP1</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS</b>	<b>93</b>
3.1. LA UNIÓN DE LA RNA Pol II AL PROMOTOR DE <i>MLP1</i> ES DEPENDIENTE DEL CORRECTO FUNCIONAMIENTO DE LA RUTA CWI	94
<b>4. Rlm1 SE ENCUENTRA UNIDO A <i>MLP1</i> EN CONDICIONES BASALES Y SE RECLUTA ACTIVAMENTE EN CONDICIONES DE ESTRÉS</b>	<b>95</b>
4.1. CINÉTICA DE ENTRADA DE Rlm1 AL PROMOTOR DE <i>MLP1</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS	97
4.2. Rlm1 OCUPA LOS PROMOTORES DE OTROS GENES DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI	97
4.3. LA ENTRADA DE Rlm1 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES <i>MLP1</i> , <i>SRL3</i> E <i>YLR194C</i> DEPENDE DE Sit2	99
<b>5. PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO SWI/SNF EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI</b>	<b>100</b>
<b>6. LA INACTIVACIÓN DEL COMPLEJO SWI/SNF CAUSA HIPERSENSIBILIDAD A ESTRÉS DE PARED CELULAR</b>	<b>102</b>
<b>7. PARTICIPACIÓN DE LAS DIFERENTES SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SWI/SNF EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI</b>	<b>104</b>
<b>8. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GLOBAL UTILIZANDO <i>MICROARRAYS</i> DE DNA</b>	<b>106</b>
8.1. ANÁLISIS DE LOS PERFILES GLOBALES DE EXPRESIÓN DEL MUTANTE <i>swi3Δ</i> EN AUSENCIA DE ESTRÉS	106

8.2.	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ROJO CONGO Y ZIMOLIASA EN LA CEPA SILVESTRE	108
8.3.	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ROJO CONGO EN EL MUTANTE <i>swi3Δ</i>	108
8.4.	ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL A ROJO CONGO EN EL MUTANTE <i>rlm1Δ</i>	112
8.5.	ANÁLISIS GLOBAL DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL AL TRATAMIENTO CON ZIMOLIASA EN EL MUTANTE <i>swi3Δ</i>	113
<b>9.</b>	<b>LA ELIMINACIÓN DEL COMPLEJO SWI/SNF NO AFECTA A LA FOSFORILACIÓN DE LA MAPK Sit2</b>	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>MLP1</i> ES DEPENDIENTE DE Swi3 DURANTE EL TRATAMIENTO CON RC</b>	<b>114</b>
<b>11.</b>	<b>LA UNIÓN DE LA RNA Pol II A LOS PROMOTORES DEPENDE DEL COMPLEJO SWI/SNF</b>	<b>115</b>
<b>12.</b>	<b>LA ENTRADA DE Rlm1 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN DEPENDE DE Swi3</b>	<b>116</b>
<b>13.</b>	<b>EL COMPLEJO SWI/SNF SE RECLUTA A LOS PROMOTORES EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN</b>	<b>121</b>
<b>14.</b>	<b>LA ENTRADA DEL COMPLEJO SWI/SNF A LOS PROMOTORES DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI</b>	<b>123</b>
<b>15.</b>	<b>Rlm1 INTERACCIONA CON EL COMPLEJO SWI/SNF</b>	<b>125</b>
<b>16.</b>	<b>EL COMPLEJO SWI/SNF ES RESPONSABLE DE LA DESORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI</b>	<b>127</b>
16.1.	DESPLAZAMIENTO DE HISTONAS	127
16.2.	DESPLAZAMIENTO DE NUCLEOSOMAS	130
<b>17.</b>	<b>Sit2 SE ASOCIA AL GEN <i>MLP1</i> EN RESPUESTA A ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR</b>	<b>133</b>
17.1.	Sit2 SE UNE A LOS PROMOTORES DE OTROS GENES DE LA RESPUESTA CWI DE FORMA Rlm1-DEPENDIENTE	134
17.2.	Sit2 ACTÚA COMO CO-ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL INDEPENDIENTEMENTE DE Rlm1 EN UN “SISTEMA DE UN HÍBRIDO”	134

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>137</b>
------------------	------------

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>161</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>185</b>







$\Delta$	Delección
A	Absorbancia
aa	Aminoácido
AD	Dominio de activación ( <i>Activation Domain</i> )
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grado centígrado
cDNA	DNA complementario
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina ( <i>Chromatin ImmunoPrecipitation</i> )
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CRE	Elemento cis-regulador ( <i>Cyclic AMP Responsive Element</i> )
cRNA	RNA complementario
Ct	Ciclo umbral ( <i>Cycle threshold</i> )
CTD	Dominio carboxi terminal ( <i>Carboxy-Terminal Domain</i> )
CWI	Integridad de la pared celular ( <i>Cell Wall Integrity pathway</i> )
CWPs	Proteínas de pared celular ( <i>Cell Wall Proteins</i> )
DBD	Dominio de unión al DNA ( <i>DNA-Binding Domain</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ESR	Respuesta general a estrés ambiental ( <i>Environmental Stress Response</i> )
F.E.	Tasa de enriquecimiento ( <i>Fold Enrichment</i> )
FT	Factor de transcripción
GAP	Proteína activadora de GTPasa ( <i>GTPase activating protein</i> )
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de GTP ( <i>Guanine nucleotide exchange factor</i> )
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GS	Glucan sintasa
GST	Glutathione S-Transferasa
GTF	Factores generales de la transcripción ( <i>General Transcription Factors</i> )
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HAT	Histona acetiltransferasa ( <i>Histone Acetyltransferase</i> )

<b>HDAC</b>	Histona deacetilasa ( <i>Histone deacetylase</i> )
<b>HMT</b>	Histona metiltransferasa ( <i>Histone methyltransferase</i> )
<b>HOG</b>	Elevada Osmolaridad Glicerol ( <i>High Osmolarity Glycerol</i> )
<b>IN</b>	<i>Input</i> , control de extractos
<b>IP</b>	Inmunoprecipitado
<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>MAD</b>	<i>Mcm 1-Agamous-Deficiens-serum response factor</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
<b>MEF2</b>	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
<b>min</b>	Minuto
<b>MNasa</b>	Enzima nucleasa microcócica ( <i>Micrococcal Nuclease</i> )
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NFR</b>	Regiones libres de nucleosomas ( <i>Nucleosome-Free Región</i> )
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>o/n</b>	Durante la noche ( <i>overnight</i> )
<b>ONPG</b>	Orto-nitro fenil-b-D galactopiranósido
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>Poliacrilamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PIC</b>	Complejo de pre-iniciación de la transcripción ( <i>Pre-Initiation Complex</i> )
<b>PIR</b>	Proteínas con repeticiones internas ( <i>Proteins with Internal Repeats</i> )
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>Pro</b>	Prolina
<b>Pol (I, II, III)</b>	RNA Polimerasa (I, II, III)
<b>PSA</b>	Persulfato amónico
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa en tiempo real
<b>RT-qPCR</b>	Retrotranscripción inversa asociada a la cuantificación por PCR en tiempo real
<b>RC</b>	Rojo Congo
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico

<b>RNA<sub>m</sub></b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SBF</b>	Complejo heterodimérico formado por Swi4 y Swi6 ( <i>Swi Binding Factors</i> )
<b>SC</b>	Medio mínimo de crecimiento de levaduras
<b>Ser</b>	Serina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>TAE</b>	Solución Tris-acetato EDTA
<b>TAF</b>	Factor asociado a TBP ( <i>TBP-Associated Factor</i> )
<b>TAP</b>	Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad en <i>tándem</i> ( <i>Tandem affinity purification</i> )
<b>TBP</b>	Proteína de unión a la caja TATA ( <i>TATA Binding Protein</i> )
<b>TE</b>	Solución Tris EDTA
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenediamina
<b>TSS</b>	Sitio de inicio de la transcripción ( <i>Transcription Start Site</i> )
<b>Thr</b>	Treonina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>U</b>	Unidades de actividad enzimática
<b>UAS</b>	<i>Secuencias activadoras delanteras (Upstream Activating Sequence)</i>
<b>URS</b>	<i>Secuencias represoras delanteras (Upstream Repressing Sequence)</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Volumen en volumen
<b>YPD</b>	Medio rico de crecimiento de levaduras ( <i>Yeast extract peptone dextrose</i> )
<b>ZL</b>	Zimoliasa
<b>WT</b>	Cepa silvestre ( <i>Wild type</i> )







1



**INTRODUCCIÓN**



## 1. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs

Toda célula viva es capaz de detectar y actuar adecuadamente frente a cambios en las condiciones ambientales de crecimiento o la presencia de diferentes estímulos. Para ello, utiliza rutas de señalización altamente complejas y de rápida respuesta que le permiten adaptarse y sobrevivir ante las nuevas situaciones. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la mayoría de estas respuestas están reguladas a través de rutas de transducción de señales mediadas por MAP (*Mitogen-activated protein*) quinasas. Estas rutas constan de un módulo conservado de proteínas quinasas, a través del cual la fosforilación se transmite de forma secuencial de un elemento del módulo a otro, permitiendo la amplificación de las señales iniciadas en la superficie celular (Widmann *et al.*, 1999). Una vez activado en respuesta a un estímulo, el primer componente de esta cascada, la MAPKKK (*MAPK Kinase Kinase* o MEKK) fosforila a la MAPKK (*MAPK Kinase* o MEK), que a su vez fosforila y activa a la MAPK (Marshall, 1995; Cobb y Goldsmith, 1995; Cooper, 1994). Una vez activada, la MAPK fosforila a elementos que van a generar una respuesta adecuada, fundamentalmente factores transcripcionales y otras proteínas, que, en conjunto, van a modificar la expresión génica y a regular el metabolismo, la morfología celular o la progresión del ciclo celular, en respuesta a una señal extracelular. También se han descrito situaciones en las que la MAPK es capaz de regular directamente, y por sí sola, la activación transcripcional mediante la formación de interacciones estables con el DNA (Alepuz *et al.*, 2001; Alepuz *et al.*, 2003; Proft y Struhl, 2002; Pokholok *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). Normalmente, la inducción de las rutas es transitoria, y está regulada por fosfatasas que reconocen la forma fosforilada de la MAPK y revierten la activación una vez que la célula ha respondido al estímulo extracelular o se ha adaptado a las nuevas condiciones (Martín *et al.*, 2005). El conocimiento actual sobre las rutas de MAPKs está basado, en gran parte, en la investigación realizada en la levadura *S. cerevisiae*, dado que muchos de los componentes de estas rutas y mecanismos por los cuales operan, están conservados evolutivamente en todo el reino eucariota.

Las MAPKKKs contienen un dominio regulador N-terminal y un dominio Ser/Thr proteína quinasa C-terminal. En condiciones de activación, la MAPKKK fosforila dos residuos de Ser o Thr de posiciones conservadas en el *loop* de activación de su diana MAPKK, que posee una actividad proteína quinasa dual específica (Ser/Thr y Tyr). La MAPKK activada fosforila ambos residuos de treonina y tirosina de un motivo –Thr-X-Tyr- conservado en el *loop* de activación de su diana, la MAPK. Estas fosforilaciones activan la MAPK causando cambios conformacionales importantes para su actividad. Finalmente, la MAPK fosforila

sus sustratos en residuos de serina y treonina en dominios -Ser/Thr-Pro- (Chen y Thorner, 2007).

Cinco MAPKs (*Fus3*, *Kss1*, *Hog1*, *Slit2* y *Smk1*) están codificadas en el genoma de *S. cerevisiae* (Hunter y Plowman, 1997) y median respuestas biológicas especializadas dependientes de estímulo (Figura 1). *Fus3* es necesaria para el apareamiento; *Kss1* regula el crecimiento invasivo tanto en células haploides como diploides; *Hog1* es necesaria para la respuesta a estrés hiperosmótico y *Slit2* controla la integridad celular frente a daños en la pared celular, estrés hipoosmótico y choque térmico, entre otros. *Kss1* también media la integridad celular en respuesta a defectos en la glicosilación de proteínas. Por último, *Smk1* está implicada en esporulación (Qi y Elion, 2005).

La especificidad de respuesta parece estar regulada por múltiples mecanismos. Uno de ellos es la presencia de elementos específicos por encima de la ruta, como receptores y osmosensores que conducen la señal de estrés por un módulo concreto de MAPKs hacia los factores de transcripción apropiados, cuya actuación desencadena la respuesta oportuna frente a un estímulo determinado. Algunas de estas rutas comparten elementos (como la MAPKKK *Ste11*) y deben estar finamente reguladas para que no se produzcan entrecruzamientos indebidos entre ellas (Saito, 2010). Una excelente revisión de las rutas de MAPKs en *S. cerevisiae* se puede consultar en Chen y Thorner (2007).

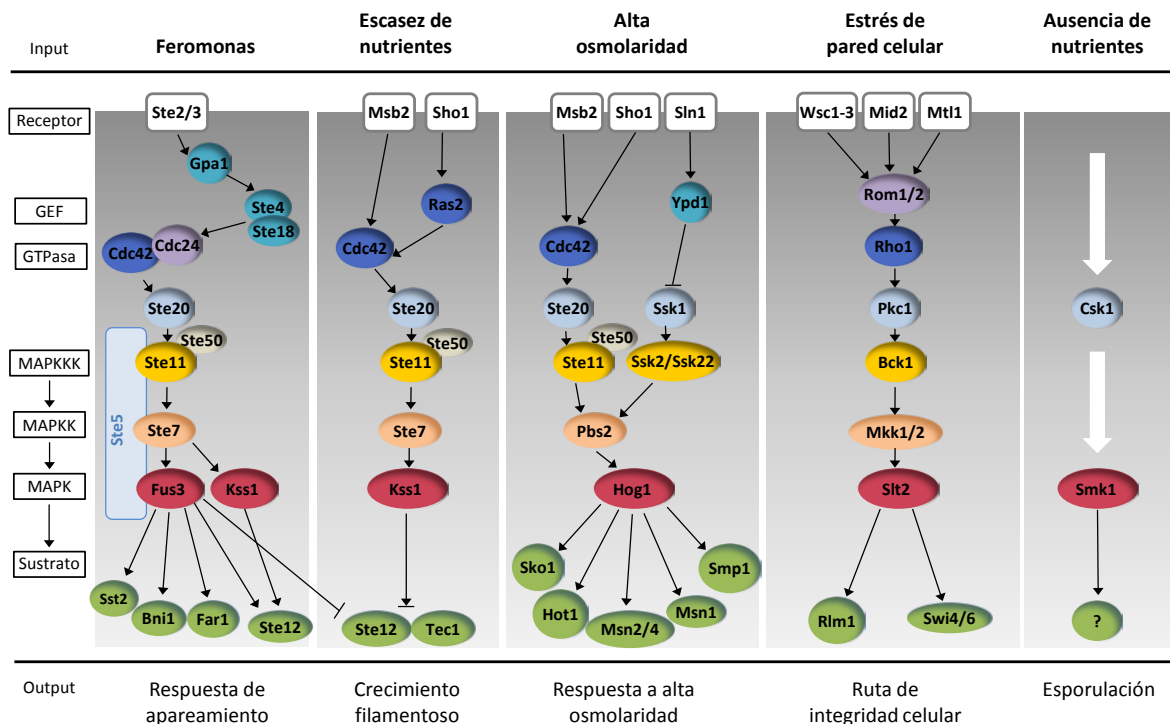


FIGURA 1: Esquema de las rutas de MAP quinasa en *S. cerevisiae*.

## **1.1. La ruta de integridad celular (CWI)**

La pared celular de *S. cerevisiae* es una envuelta externa que protege a la célula de las condiciones adversas del medio que la rodea, garantizando su viabilidad. Esta estructura es esencial para contrarrestar la presión de turgencia establecida en el interior de la célula como consecuencia de las diferencias en concentración osmótica respecto al exterior (Svoboda, 1981; Klis *et al.*, 2006). Asimismo, actúa como barrera permeable modulando la absorción selectiva y secreción de macromoléculas, participa en las interacciones célula-célula y en la protección frente a diferentes tipos de estrés (Morris *et al.*, 1986; Klis *et al.*, 2002). El papel de esta pared es fundamental también, en el mantenimiento de la morfología celular (Molina *et al.*, 2000; Cid *et al.*, 1995; Smits *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2006). La pared en células vegetativas tiene una estructura laminada con una capa interna de glucano y quitina y una capa externa de manoproteínas (Orlean, 1997; Lipke y Ovalle, 1998; Klis *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005). Estos tres componentes fundamentales:  $\beta$ -glucano, manoproteínas y quitina, representan un 50-60%, 35-40% y 1-2% del peso seco de la pared, respectivamente y se encuentran unidos unos a otros formando complejos macromoleculares (Nguyen *et al.*, 1998). El glucano está constituido por residuos de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6, dando lugar al  $\beta$ -1,3 glucano y al  $\beta$ -1,6 glucano, respectivamente. El  $\beta$ -1,3 glucano se asocia localmente a través de enlaces de hidrógeno constituyendo una red tri-dimensional continua y elástica (Lipke y Ovalle, 1998; Molina *et al.*, 2000; Klis *et al.*, 2002). Los extremos no reducidos del  $\beta$ -1,3 glucano pueden funcionar como puntos de unión para quitina y  $\beta$ -1,6 glucano. En la capa externa de la red de  $\beta$ -1,3 glucano, altamente ramificada, se encuentran las manoproteínas unidas directamente a las cadenas de  $\beta$ -1,3 glucano o indirectamente a través del  $\beta$ -1,6 glucano (Kapteyn *et al.*, 1996; Kollar *et al.*, 1997). La quitina se asocia tanto al  $\beta$ -1,3 glucano como al  $\beta$ -1,6 glucano, existiendo una fracción de quitina libre, no unida a polisacáridos (Cabib y Duran, 2005).

Este complejo macromolecular es una estructura dinámica, que puede variar en composición y grosor para adaptarse a las condiciones de crecimiento (composición del medio, temperatura, pH externo, niveles de oxigenación, etc.) y remodelarse durante los procesos morfogénicos (Molina *et al.*, 2000; Cid *et al.*, 1995; Smits *et al.*, 1999; Klis *et al.*, 2006). Las situaciones de estrés que alteran esta estructura conducen a la activación de una respuesta celular conocida como "mecanismo compensatorio" (Popolo *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2001), que permite a la célula variar la composición y estructura de la pared celular para conseguir adaptarse. Este mecanismo incluye: 1) Un incremento en el contenido de quitina en la pared lateral de la célula madre y en la célula hija (revisado en

Smits *et al.*, 1999); 2) Cambios en la asociación entre diferentes polímeros de la pared (Kapteyn *et al.*, 1997); 3) Un incremento de distintas proteínas de pared celular (de Nobel *et al.*, 2000; Jung y Levin, 1999; Kapteyn *et al.*, 1999); 4) Una redistribución transitoria del complejo  $\beta$ -1,3 glucan-sintasa (GS) en toda la superficie celular (Delley y Hall, 1999); y 5) Una respuesta transcripcional estímulo-específica que incluye entre otros genes un grupo numeroso relacionado con la biogénesis de la pared celular (García *et al.*, 2004; Lagorce *et al.*, 2003). Todos estos mecanismos, que están implicados en la reparación de la pared celular bajo condiciones de estrés y por tanto, permiten a la célula sobrevivir en estas circunstancias (Popolo *et al.*, 2001), están principalmente regulados a través de la ruta de MAPKs CWI.

La ruta de integridad celular o CWI (*Cell Wall Integrity*) (Figura 2) consta de una serie de sensores transmembrana que reconocen señales producidas en la pared celular y que las transmiten a las proteínas Rom1/2. Estas proteínas activan a la GTPasa Rho1, y ésta a su vez a la proteína quinasa C (Pkc1), responsable de la activación de un módulo de MAPKs. La MAPKKK Bck1 fosforila a las MAPKKs Mkk1/Mkk2 que activan finalmente a la MAPK Sit2. Sit2 actúa sobre dos factores de transcripción, Rlm1 y Swi4/Swi6, que conducen a cambios importantes en la transcripción de genes permitiendo la supervivencia celular (revisado en Levin, 2005).

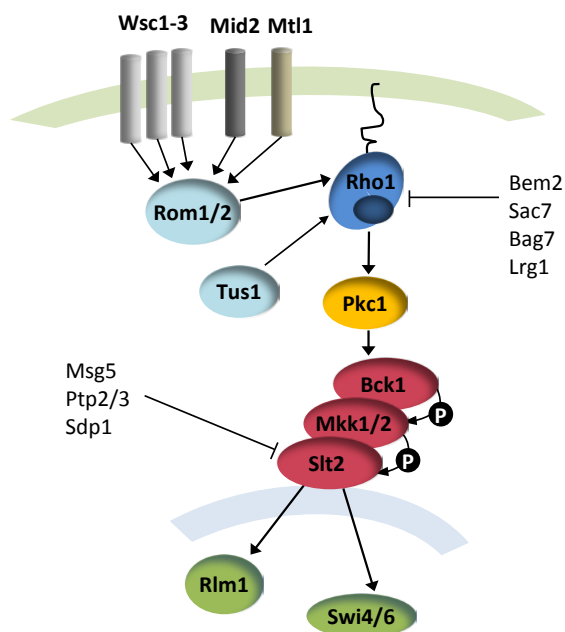


FIGURA 2: Esquema de la ruta de integridad celular (CWI) de *S. cerevisiae*.

En condiciones normales, la regulación de la ruta de integridad celular está controlada por el ciclo celular. En ausencia de estrés, la remodelación de la pared celular se produce, únicamente, durante los diferentes estadios del ciclo vegetativo de la

levadura, siendo esencial para el crecimiento celular. Sin embargo, la ruta CWI se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos externos que causan estrés en la pared celular, para conseguir la adaptación y supervivencia. La exposición de la levadura a altas temperaturas (37-39°C) produce la activación persistente de la ruta CWI (Kamada *et al.*, 1995), de tal forma que mutantes delecionados en alguno de sus componentes presentan lisis celular, únicamente cuando crecen a altas temperaturas (Torres *et al.*, 1991). El choque hipoosmótico provoca una activación rápida pero transitoria de la ruta (Davenport *et al.*, 1995). Además, el tratamiento con feromonas estimula la señalización al mismo tiempo que se inicia el proceso de morfogénesis (Errede *et al.*, 1995). Entre otras situaciones que conducen a la activación de la ruta CWI se encuentran también el tratamiento con cafeína y vanadato (Martín *et al.*, 2000), el estrés de retículo endoplasmático (Scrimale *et al.*, 2009), defectos en O-glicosilación (Arroyo *et al.*, 2011), estrés oxidativo (Alic *et al.*, 2003) y pH extremos (Claret *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006). Por último, la ruta de integridad celular se activa en respuesta a daños sobre la pared de la levadura producidos por tratamientos con agentes como Rojo Congo o Blanco de Calcoflúor que se unen a la quitina interfiriendo con el correcto ensamblaje de la pared celular (García *et al.*, 2004; Ketela *et al.*, 1999), la zimoliasa que degrada enzimáticamente la pared celular, principalmente por su actividad  $\beta$ -1,3 glucanasa (Bermejo *et al.*, 2008), o Caspofungina que inhibe la actividad  $\beta$ -1,3 glucan-sintasa (Reinoso-Martín *et al.*, 2003). Asimismo, mutaciones en genes importantes para la biogénesis de la pared celular como *FKS1*, *GAS1* y *MNN9* entre otros, dan lugar a células con una pared celular debilitada que presentan una activación basal de la ruta (de Nobel *et al.*, 2000; Lagorce *et al.*, 2003).

### 1.1.1. Sensores

La activación de la ruta CWI, está basada por tanto, en la detección de señales específicas en la superficie celular. Una familia de sensores de superficie: Wsc1-4, Mid2 y Mtl1, reconocen las señales externas que llegan a la membrana plasmática (Rajavel *et al.*, 1999; Verna *et al.*, 1997; Heinisch *et al.*, 2010). Estos sensores son proteínas transmembrana, con una estructura semejante que consiste en un dominio pequeño citoplasmático, una región transmembrana y un dominio extracelular rico en residuos de Ser/Thr, altamente O-manosiladas, siendo dicha manosilación esencial para la señalización (Lommel *et al.*, 2004). Adicionalmente, Wsc1 contiene un motivo rico en cisteínas en el dominio extracelular N-terminal (Lodder *et al.*, 1999). Dentro de este grupo de sensores, los que participan en la señalización de la mayoría de los estímulos y actúan como principales activadores de la ruta son Wsc1 (también llamado Slg1 o Hcs77) (Gray *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; Verna *et al.*, 1997) y Mid2 (Rajavel *et al.*, 1999). Así, la deleción

simultánea de ambos sensores da lugar a cepas no viables en la mayoría de los fondos genéticos, a menos que estas células crezcan en presencia de soporte osmótico (Rajavel *et al.*, 1999; Ketela *et al.*, 1999).

La funcionalidad de estos sensores es estímulo-dependiente, existiendo papeles específicos para cada sensor en función de la naturaleza del estrés. Tanto Wsc1 como Mid2 participan en respuesta a estrés térmico (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Ketela *et al.*, 1999). La activación de la MAPK Slt2 por caspofungina (Reinoso-Martín *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2010) o pH alcalinos (Serrano *et al.*, 2006) depende, principalmente, del sensor Wsc1. Por el contrario, la fosforilación de Slt2 en respuesta a feromonas (Errede *et al.*, 1995), estrés térmico y Blanco de Calcoflúor (de Nobel *et al.*, 2000; Ketela *et al.*, 1999), vanadato (Martín *et al.*, 2000) o pH ácido (Claret *et al.*, 2005) se encuentra significativamente disminuida en mutantes *mid2Δ*. Además, la respuesta transcripcional consecuencia del tratamiento con Rojo Congo está mayoritariamente mediada por Mid2, y sólo una pequeña parte depende de la presencia de Wsc1. Sin embargo, el efecto de la zimoliasa está exclusivamente reconocido por la rama Sho1 de la ruta HOG y solo depende marginalmente de Wsc1 y Mid2 (Bermejo *et al.*, 2008; Bermejo *et al.*, 2010; García *et al.*, 2009). Por último, Mtl1 responde principalmente a estrés oxidativo (Vilella *et al.*, 2005).

Aunque el mecanismo molecular preciso mediante el cual estos sensores detectan daños en la pared celular no es completamente conocido, los sensores Wsc1 y Mid2 parecen operar como mecanosensores que detectarían cambios en la rigidez de la pared celular o en la membrana plasmática tras la exposición a estreses externos (Heinisch *et al.*, 2010; Dupres *et al.*, 2009; Hutzler *et al.*, 2008; Levin, 2005; Philip y Levin, 2001).

Como consecuencia del “reconocimiento” de la situación de daño, el dominio intracelular del sensor interacciona con Rom1/2. Estas proteínas son GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factor*) de Rho1, que estimulan el intercambio de nucleótido de GDP por GTP, activando a la GTPasa Rho1 (Philip y Levin, 2001).

### 1.1.2. Rho1 y Pkc1

Rho1 es una proteína esencial en el control de la señalización de la ruta CWI, recibiendo la mayor parte de la información de entrada desde la superficie celular y regulando la salida de las señales implicadas en diferentes procesos como la biogénesis de la pared celular, la organización del citoesqueleto de actina y la secreción polarizada (revisado en Cabib *et al.*, 1998). Rho1 es una GTPasa perteneciente a la familia RHO, que

cicla entre dos estados: uno activo, unido a GTP y otro inactivo, unido a GDP. Este proceso se encuentra regulado negativamente por proteínas activadoras de GTPasas, denominadas GAP (*GTPase Activating Protein*) y positivamente por factores intercambiadores del guanosina o GEF. Bem2 y Sac7 son las GAPs implicadas en la regulación negativa de Rho1, en su papel de activador de la ruta de integridad celular (Martín *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2002). Por el contrario, Rho1 es activada mayoritariamente a través de las GEFs Rom1/2 (Ozaki *et al.*, 1996), activando a continuación a diferentes efectores. Rho1 actúa como una subunidad reguladora en el complejo GS, estimulando la actividad glucan-sintasa de manera GTP-dependiente (Mazur y Baginsky, 1996; Oadota *et al.*, 1996). Una pareja de genes relacionados, *FKS1* y *FKS2/GSC2*, codifican subunidades catalíticas del complejo GS, funcionando presumiblemente como dianas de la actividad Rho1. Por otro lado, Rho1 se une y activa a la proteína quinasa C, codificada por el gen *PKC1* (Nonaka *et al.*, 1995). La pérdida de función de *PKC1* o cualquiera de los componentes de la cascada de MAPKs bajo su control, resulta en lisis celular atribuida a una deficiencia en la construcción de la pared celular.

### 1.1.3. Módulo de MAPKs

Pkc1 fosforila al primer eslabón del módulo de MAPKs, la MAPKKK Bck1 (Lee y Levin, 1992). Bck1 fosforila y activa a un par de MAPKKs parcialmente redundantes Mkk1/2 (Irie *et al.*, 1993), responsables de la activación, en último lugar, de la MAPK Slt2 (Torres *et al.*, 1991).

Bck1 es fosforilada *in vitro* por Pkc1 en varios residuos (Ser 939, Thr 1119, Ser 1134) que parecen ser los residuos implicados en su activación. Determinadas mutaciones en esta región producen una activación constitutiva de la proteína y por tanto de la ruta, lo que ha permitido rescatar en multitud de ocasiones fenotipos de sensibilidad en diferentes mutantes y situaciones de estrés de pared celular (Levin *et al.*, 1994). Bck1 fosforila a las MAPKKs parcialmente redundantes, Mkk1/Mkk2 que son necesarias para la activación de Slt2 (Irie *et al.*, 1993; Kamada *et al.*, 1995; Paravicini y Friedli, 1996). La delección individual de cualquiera de las dos no impide el funcionamiento de la ruta de integridad celular, sino que es necesaria la delección de ambas MAPKKs para eliminar la funcionalidad de la ruta (Irie *et al.*, 1993; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). Estudios más recientes sugieren ciertas diferencias entre ambas y una mayor importancia de Mkk1 en la señalización (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2000). Mkk1 y Mkk2 fosforilan y activan la MAPK Slt2 (Torres *et al.*, 1991). El efecto contrario lo ejercen las proteínas fosfatasa Ptp2, Ptp3 (Mattison *et al.*, 1999), la fosfatasa de especificidad dual, Msg5

(Flández *et al.*, 2004) y Sdp1 que actúa específicamente sobre Slt2 (Collister *et al.*, 2002). La desfosforilación e inactivación de las MAPKs por las proteínas fosfatasa es una de las formas más directas de modular tanto la duración como la intensidad de la respuesta generada por las rutas de MAPKs. De lo contrario, la activación descontrolada de estas proteínas podría llegar a ser perjudicial para la célula.

También se ha descrito un papel de retrofosforilación de Slt2 sobre sus MAPKKs, que podría tener cierto papel en la retroalimentación positiva de la ruta (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). En cuanto a su localización, originalmente se propuso que Slt2 se encontraba predominantemente en núcleo y citoplasma en condiciones basales, relocalizándose al citoplasma rápidamente en respuesta a estrés térmico (Kamada *et al.*, 1995). Trabajos posteriores indicaron que Slt2 podía localizarse también en sitios de crecimiento polarizado (van Drogen y Peter, 2002).

Uno de los mecanismos que proporcionan especificidad en la señalización de las rutas de MAPKs son las interacciones específicas entre proteínas. Muchas de las proteínas que interactúan con las MAPKs (activadores, sustratos o proteínas fosfatasas) contienen motivos conservados, conocidos como dominios *docking*, que se encuentran fuera de los dominios catalíticos y que median uniones específicas e interacciones de alta afinidad con las MAPKs (Treisman, 1996; Tanoue y Nishida, 2002; Bardwell y Thorner, 1996). Estos dominios de anclaje han sido caracterizados también dentro de las mismas MAPKs. La región de las MAPKs que interactúa con los dominios *docking* es compleja y está formada por el dominio CD (*Common-docking*), el motivo ED (*Glu/Asp containing*) y una región hidrofóbica (Akella *et al.*, 2008). El dominio CD se encuentra muy conservado y se caracteriza por contener aminoácidos cargados negativamente (aspárticos y glutámicos) en el dominio C-terminal de la quinasa (Tanoue *et al.*, 2000). La sustitución de estos residuos por aminoácidos de carga neutra elimina completamente la unión entre proteínas, indicando la importancia de la interacción electrostática de los dominios CD con los aminoácidos positivamente cargados dentro de los dominios *docking* de las proteínas que interactúan con las MAPKs (Tanoue y Nishida, 2002). Los motivos ED se encuentran cerca de los dominios CD en la estructura terciaria de la MAPK y contribuyen también a la especificidad de unión (Tanoue y Nishida, 2003). La MAPK Slt2 se une a su activador Mkk1 a través de su dominio CD. Teniendo en cuenta que los dominios *docking* median la interacción de Slt2 con otros componentes de la ruta CWI, como Mkk2 y los factores de transcripción Rlm1 o Swi4, esto indicaría que Slt2 utiliza preferentemente este tipo de interacción para unirse con otras proteínas. Sin embargo la unión a la fosfatasa Msg5 es independiente del dominio CD y está mediada por el *loop* L16 conservado de las MAPKs presentes en la región CD-proximal (Palacios *et al.*, 2011).

A diferencia del resto de MAPKs, Slt2 y su ortólogo en humanos ERK5 (Truman *et al.*, 2006) presentan dominios de activación transcripcional dentro de la zona C-terminal (Soler *et al.*, 1995; Kasler *et al.*, 2000). Uno de estos dominios se encuentra en la región definida por los aa 274-329 y la segunda es una secuencia rica en glutaminas definida por los aa 347-374, que está implicada tanto en la activación transcripcional como en la asociación de Slt2 consigo misma (Kim *et al.*, 2007).

Mlp1 (codificada por el gen *MLP1/KDX1*) es una proteína paróloga de Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997) que comparte el 53% de identidad en su secuencia aminoacídica (Kim *et al.*, 2008), aunque en realidad se trata de una pseudoquinasa (Kim *et al.*, 2008; Hanks y Hunter, 1995). El hecho de que se demostrara mediante ensayos de dos híbridos su interacción con Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997), sugirió que Mlp1 podía afectar a la ruta CWI a través de Rlm1. La delección de *MLP1* no produce ningún fenotipo detectable, aunque el doble mutante *slt2Δm/p1Δ* es más sensible a cafeína que el mutante sencillo *slt2Δ* y la sobreexpresión de Mlp1 suprime el fenotipo de sensibilidad a cafeína observado en un mutante *bck1Δ*, mientras que es incapaz de suprimir el defecto en crecimiento a altas temperaturas (Watanabe *et al.*, 1997). Sin embargo, se desconoce cual es el papel funcional de Mlp1 a este nivel. Más recientemente se ha descrito que tanto Slt2 como Mlp1 pueden activar la transcripción de genes a través de un mecanismo no catalítico (Kim *et al.*, 2008) (este mecanismo se tratará en detalle más adelante). Por último, hay que destacar que el gen *MLP1* se induce transcripcionalmente en respuesta a múltiples situaciones de estrés sobre la pared celular (Agarwal *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2004; Lagorce *et al.*, 2003).

#### 1.1.4. Factores de transcripción

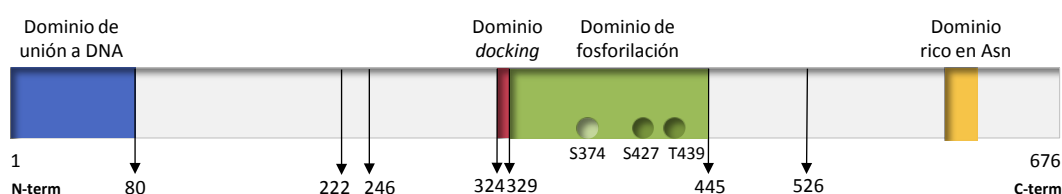
La fosforilación de Slt2 conduce a la activación de dos factores de transcripción identificados hasta el momento, Rlm1 y SBF que producen cambios importantes en la expresión génica (Jung y Levin, 1999; García *et al.*, 2004; Madden *et al.*, 1997).

SBF es un complejo heterodimérico formado por las proteínas Swi4 y Swi6 (Taba *et al.*, 1991; Andrews y Herskowitz, 1989; Breeden y Nasmyth, 1987). Swi4 es la subunidad de unión a DNA de secuencia específica, aunque necesita a Swi6, la subunidad reguladora, para dicha unión. Este factor de transcripción participa principalmente en la activación de genes durante la transición G1/S del ciclo celular (*CLN1*, *CLN2*, *PCL1* y *PCL2*) y durante la morfogénesis (Iyer *et al.*, 2001; Igual *et al.*, 1996). Algunas evidencias sugieren desde hace tiempo una relación entre el complejo SBF y la ruta de integridad: (i) la sobreexpresión de Swi4 es capaz de suprimir el fenotipo de lisis celular de un mutante

*slt2Δ* (Madden *et al.*, 1997); (ii) los mutantes *swi4Δ* y *swi6Δ* son hipersensibles a calcoflúor, indicando el papel de SBF en la biogénesis de pared celular (Iguar *et al.*, 1996); (iii) Slt2 se asocia con SBF *in vivo* (Madden *et al.*, 1997) y con Swi4, pero no con Swi6, *in vitro* (Baetz *et al.*, 2001); y (iv) Swi6 es fosforilado *in vivo* e *in vitro* por Slt2 en respuesta a estrés sobre la pared celular (Madden *et al.*, 1997). Trabajos más recientes han demostrado que SBF juega cierto papel en la regulación de genes de respuesta a estrés sobre la pared celular (Kim y Levin, 2010; Kim *et al.*, 2008). El complejo SBF regula la activación transcripcional de los genes *FKS2* (Kim *et al.*, 2008), *CHA1*, *YLR042C* e *YKR013W* (Kim y Levin, 2010), caracterizados por inducirse en situaciones de daño sobre la pared celular independientemente de Rlm1 (García *et al.*, 2004). Estos genes son activados a través de un mecanismo no catalítico de la MAPK: la forma activa o fosforilada de la MAPK Slt2 y su pseudoquinasa Mlp1, forman un complejo con Swi4 que se asocia a los promotores de los genes diana independientemente de Swi6 (Kim y Levin, 2010; Kim *et al.*, 2008). Sin embargo, el reclutamiento posterior de Swi6 es necesario para la activación de la transcripción. Además, se ha descrito recientemente que Slt2 posee también una función no catalítica en el proceso de elongación, a través de su interacción con el complejo asociado a la Pol II, Paf1C (Kim y Levin, 2011).

Otra diana de la ruta de integridad celular es el factor de transcripción Rlm1. Esta proteína controla la expresión de la mayoría de los genes inducidos en situaciones de estrés sobre la pared celular. El gen *RLM1* (*Resistant to the Lethality of Mkk1<sup>S386P</sup>*) fue identificado en un *screening* genético dirigido a la identificación de mutantes resistentes a la inhibición de crecimiento causada por la sobreexpresión del alelo *MKK<sup>S386P</sup>* (Watanabe *et al.*, 1995). La mutación de una serina a prolina en la posición 386 de Mkk1 produce la activación de la ruta CWI de forma constitutiva incluso en ausencia de elementos que se encuentren localizados por encima de la MAPKK (Watanabe *et al.*, 1995). El factor de transcripción codificado por dicho gen pertenece a la familia de las proteínas MADS (*Mcm1-Arg80-Deficiens-serum response factor* [SRF]), compartiendo similitud con la subfamilia MEF2 de mamíferos. La comparación de su secuencia, de 676 aminoácidos, con las bases de datos de GenBank y EMBL (Pearson y Lipman, 1988) revela una región N-terminal de 80 aminoácidos homóloga a los dominios de unión a DNA y dimerización de las proteínas MADS. El dominio MADS presenta los primeros 16 aminoácidos conservados en todas estas proteínas, siendo mayoritariamente residuos básicos y polares. La región básica tiene dos segmentos teóricos de  $\alpha$ -hélices (Watanabe *et al.*, 1995). El dominio de unión a DNA del factor de transcripción Rlm1 reconoce secuencias específicas en el DNA definidas por Dodou y Treisman (Dodou y Treisman, 1997): CTAWWWWTAG, siendo W adenina ó timina. Este dominio se redefinió como TAWWWWTAGM por Boorsma *et al.*, en

2004 (Boorsma *et al.*, 2004). Rlm1 es un sustrato de Slt2 *in vitro* y muestra *in vivo*, bajo condiciones de estrés térmico, una fosforilación dependiente de Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997). La interacción *in vivo* de Rlm1 con Slt2, se descubrió mediante ensayos de dos híbridos, definiéndose específicamente la región central determinada por los aminoácidos 246-445, como responsable de dicha unión (Watanabe *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1995). Rlm1 comparte una región con las proteínas MEF2 que es presumiblemente un dominio *docking* para Slt2 (residuos 324-329), necesario para la activación transcripcional en respuesta a estrés sobre la pared celular (Jung *et al.*, 2002). Rlm1 reside en el núcleo, independientemente de la presencia o ausencia de estrés sobre la pared celular (Jung *et al.*, 2002). Su fosforilación por Slt2, en residuos de serina y treonina en una región que presenta similitud con el dominio de activación transcripcional de las proteínas MEF2 (delimitado por los residuos 329 y 445), estimula su actividad. Dentro de esta región se encuentran 3 motivos Ser/Thr-Pro (S374, S427 y T439), dianas potenciales para la fosforilación por la MAPK Slt2. La fosforilación de los residuos Ser427 y Thr439 parecen ser responsables de la mayor parte de la activación transcripcional en respuesta a daños sobre la pared celular (Jung *et al.*, 2002). Por último, el dominio C-terminal de Rlm1 (residuos 526-676) es necesario para la activación transcripcional (Watanabe *et al.*, 1997). Este dominio contiene secuencias ricas en asparaginas. Por tanto, es razonable suponer que el dominio C-terminal de Rlm1 contenga un fuerte dominio de activación, cuya actividad esté potenciada por la fosforilación de múltiples motivos Ser/Thr-Pro presentes en la región central (Figura 3).



**FIGURA 3:** Estructura del factor de transcripción Rlm1, indicando las posiciones aminoacídicas más relevantes.

A diferencia de lo que ocurre en mutantes de la ruta de integridad celular, la delección de *RLM1* no produce fenotipos de sensibilidad a estímulos que afectan a la pared celular, excepto el de sensibilidad a cafeína (Watanabe *et al.*, 1995). Por tanto, el modesto fenotipo de un mutante *rlm1Δ*, comparado con el del mutante *slt2Δ*, sugiere que Slt2 ha de tener dianas adicionales.

### 1.1.5. Respuesta transcripcional mediada por la ruta CWI

Como ya se ha mencionado anteriormente, las situaciones que alteran la integridad de la pared celular activan el denominado “mecanismo compensatorio” (Popolo *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2001), cuyo principal resultado es el cambio del programa transcripcional de la célula, responsable en última instancia de los cambios observados en la levadura. La adaptación de la levadura a estrés sobre la pared celular está principalmente regulada a través de la ruta CWI. La activación de esta ruta produce la hiperfosforilación de la MAPK Slt2, que a continuación activa al factor de transcripción Rlm1 y que en último lugar desencadena una respuesta transcripcional. Este cambio en la expresión de genes modula la adaptación frente a las condiciones que interfieren en ese momento con la estabilidad de la pared celular. El desarrollo de nuevas herramientas y técnicas de análisis genómico, como la tecnología de *microarrays* de DNA, ha sido fundamental para definir estas respuestas, permitiendo el análisis de los perfiles de expresión génica en determinadas situaciones. De esta manera, el programa transcripcional de la levadura en respuesta tanto a daños constitutivos como transitorios sobre la pared celular ha sido ampliamente estudiado. El primer trabajo centrado en la caracterización de la respuesta transcripcional global producida bajo la activación de la ruta CWI, consistió en un estudio a escala genómica dirigido a identificar cambios en la expresión como resultado de la activación de la MAPK. Para ello se empleó el alelo hiperactivo de Mkk1 (*MKK1<sup>S386P</sup>*), que producía una activación basal de Slt2 (Jung y Levin, 1999). Posteriormente, se analizaron los perfiles transcripcionales de la levadura a situaciones de estrés constitutivo y transitorio. Así, se analizó el transcriptoma de mutantes como *gas1Δ*, *mnn9Δ*, *fks1Δ*, *kre6Δ* o *knr4Δ*, afectados en diferentes procesos de la construcción de pared celular, como la biosíntesis de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucano, la manosilación de proteínas de pared, el entrecruzamiento de componentes de la pared celular y la coordinación entre la síntesis de pared y el crecimiento celular (Lagorce *et al.*, 2003). Como daños transitorios se han estudiado las respuestas a tratamientos con Rojo Congo (García *et al.*, 2004), zimoliasa (García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2004; Boorsma *et al.*, 2004), Caspofungina (Bermejo *et al.*, 2010) y Calcoflúor (Boorsma *et al.*, 2004), cuyo mecanismo de activación ha sido comentado anteriormente.

Aunque existen diferencias en los perfiles transcripcionales inducidos por las diferentes situaciones que conducen a daños en la pared celular, el núcleo principal de la respuesta es similar. La comparación de los perfiles transcripcionales bajo las condiciones arriba indicadas, señalan que a pesar de que existen respuestas específicas en cada caso, la inducción de genes implicados en la biogénesis de la pared, metabolismo y generación

de energía, morfogénesis, transducción de señales y estrés, es común a la mayoría de las respuestas. Adicionalmente, el análisis comparativo de los resultados obtenidos para los estreses mediados por Rojo Congo, zimoliasa y casopofungina identificó un grupo de 18 genes fuertemente inducidos bajo las tres condiciones y que pueden por tanto considerarse la “huella transcripcional” de la respuesta en situaciones de estrés sobre la pared (Arroyo *et al.*, 2009).

A diferencia de otras respuestas a estrés ambiental, el módulo principal de la respuesta transcripcional a daños en la pared celular alcanza su pico a tiempos largos. La cinética de expresión global estudiada para el tratamiento con Rojo Congo demuestra que, aunque tras una hora de tratamiento se induce la expresión de algunos genes, la inducción de una respuesta transcripcional eficiente requiere de 2-3 horas de tratamiento (García *et al.*, 2004). La cinética de esta respuesta indica la existencia de una respuesta transitoria para un grupo de genes, incluyendo aquellos relacionados con transducción de señales, y una respuesta más sostenida en el tiempo para otro grupo de genes que codifican para proteínas con un papel en la construcción y remodelado de la pared celular (García *et al.*, 2004).

El análisis de los múltiples sitios de unión para diferentes factores de transcripción en los promotores de los genes inducidos en esta respuesta transcripcional indica que la mayoría de los genes presentan motivos de unión para Rlm1. Este hecho sugiere el papel más importante para la ruta de integridad celular mediada por la MAPK Slt2 y su factor de transcripción Rlm1 en la regulación de la respuesta transcripcional del mecanismo compensatorio. Sin embargo, existe un enriquecimiento significativo en genes que presentan motivos para otros factores de transcripción como Crz1, SBF, Msn2/Msn4, Hsf1, Ste12 y Tec1, entre otros, sugiriendo una regulación mucho más compleja de esta respuesta, con la posible participación de otras rutas de señalización (García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2004; Boorsma *et al.*, 2004; Lagorce *et al.*, 2003).

La caracterización experimental de perfiles transcripcionales de mutantes en diferentes elementos de la ruta de integridad CWI en situaciones de activación, ha permitido evaluar la participación directa de estos elementos en la regulación de la respuesta transcripcional. La activación de la mayoría de genes en respuesta a Rojo Congo (García *et al.*, 2004), temperatura (Jung y Levin, 1999) y zimoliasa (García *et al.*, 2009) depende del factor de transcripción Rlm1. Sin embargo, existen diferencias según el estímulo. En condiciones de estrés mediado por Rojo Congo toda la respuesta transcripcional depende de Slt2 y Rlm1 (García *et al.*, 2004), con la excepción de los genes *PHO89*, *FKS2*, *YLR042C* y *CHA1*, mientras que el daño en pared causado por zimoliasa es

señalizado a través de la rama Sho1 de la ruta de alta osmolaridad (ruta HOG), dependiendo la expresión de muchos de los genes inducidos en estas condiciones, tanto de Slt2 como de Hog1 (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009). Mientras que la respuesta a RC está mediada mayoritariamente por Mid2, los daños inducidos por la zimoliasa no son señalizados por los sensores de la ruta CWI, sino por el sensor Hkr1 de la rama Sho1, por debajo de la cual se produce una conexión entre la ruta HOG y la ruta CWI, necesaria para la activación de Slt2 (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009). Por tanto, el daño celular por zimoliasa implicaría dos respuestas transcripcionales diferentes: una respuesta transcripcional de adaptación a estrés osmótico, que incluiría los genes que responden a bajos niveles de activación de Hog1, y una respuesta principal relacionada con la adaptación a defectos en la integridad de la pared celular regulada por Slt2 y Rlm1, que requiere también la participación de elementos de la rama Sho1 de la ruta HOG.

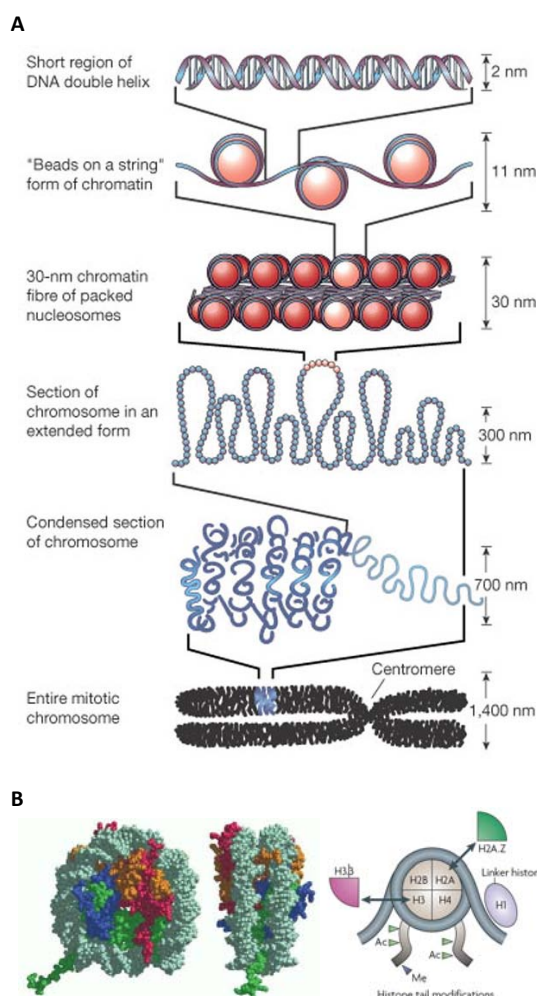
## 2. EL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN EN LEVADURAS

La RNA polimerasa (RNA Pol) es la enzima encargada de llevar a cabo la transcripción, uno de los procesos celulares que controla de forma más directa la expresión génica. A diferencia de los organismos procariotas, que sólo tienen una RNA Pol, los eucariotas presentan tres, RNA Polimerasa I, II y III, que se encargan de producir diferentes tipos de RNAs. La RNA Pol I es la responsable de la síntesis de una parte del RNA ribosómico, la RNA Pol III se encarga de transcribir RNAs de pequeño tamaño como el RNA de transferencia, mientras que la RNA Pol II es la encargada de transcribir el RNA mensajero (RNAm) que codifica para proteínas estructurales y otros RNAs no codificantes. El proceso de transcripción llevado a cabo por la Pol II se divide en tres etapas: iniciación, elongación y terminación. El inicio de la transcripción en eucariotas es un proceso altamente regulado en el que participan un gran número de proteínas, desde factores de transcripción que se unen de forma específica al DNA, hasta complejos remodeladores y modificadores de cromatina que alteran esta estructura, controlando la unión de estos mismos activadores y permitiendo a continuación la unión de los componentes de la maquinaria general de la transcripción y la Pol II (Struhl *et al.*, 1998; Pugh, 2000; Orphanides y Reinberg, 2002; Li *et al.*, 2007). El proceso de transcripción comienza con la unión de los activadores transcripcionales en secuencias específicas del DNA en respuesta a señales celulares. Estos reclutan coactivadores transcripcionales como los complejos remodeladores de cromatina ATP dependientes y los complejos modificadores de histonas, que producen una relajación de la estructura de la cromatina, permitiendo a continuación la entrada de los factores generales de la transcripción (GTFs) y la Pol II para

la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC). Es importante destacar que la organización del genoma en nucleosomas es capaz de afectar todas las etapas de la transcripción, desde la unión del activador transcripcional, hasta la formación del PIC y también, pasos posteriores como la elongación (revisado en Workman y Kingston, 1998).

## 2.1. Estructura y organización de la cromatina

El genoma eucariota se encuentra empaquetado dentro del núcleo celular en forma de cromatina, una estructura altamente organizada que tiene como unidad fundamental el nucleosoma. Estos nucleosomas se encuentran organizados en cadenas lineales a lo largo del DNA, denominadas collar de cuentas o rosario (*beads-on-a-string*), siendo cada cuenta o unidad repetida lo que se define como nucleosoma (Figura 4A). Esta estructura puede compactarse en estructuras de orden superior, como la fibra de 30 nm que es transcripcionalmente inactiva, pero que puede desorganizarse en función de las necesidades de la célula (Luger y Hansen, 2005). A su vez, estas fibras se empaquetan en estructuras de orden superior hasta formar los cromosomas, altamente compactados durante la mitosis (Figura 4A).



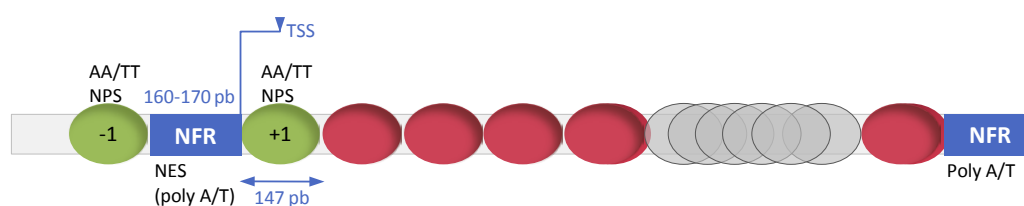
**FIGURA 4: Empaquetamiento del DNA.** (A) Organización del DNA dentro de la cromatina. El nivel más bajo de organización es el nucleosoma. En el siguiente nivel de organización, las cuentas en rosario se compactan en la fibra de 30 nm de diámetro, y estas fibras se organizan después en estructuras de orden superior. (B) La estructura del nucleosoma obtenida mediante difracción de rayos X (vista frontal y lateral), donde cada histona se presenta de diferentes colores y el DNA de color gris. A la derecha, representación esquemática del nucleosoma, donde se señalan ejemplos de modificación de histonas (Ac, acetilación y Me, metilación) y las variantes de histonas, H3.3 y H2A.Z. Figuras adaptadas de Jiang y Pugh (2009b), Luger *et al.* (1997) y Felsenfeld y Groudine (2003).

Los nucleosomas están formados por un fragmento de DNA de 146 pb, enrollado 1,65 veces a un octámero de histonas, estableciéndose 14 contactos entre ellos (Luger *et al.*, 1997). Cada octámero está compuesto a su vez por dos copias de cada una de las 4 histonas: H2A, H2B, H3 y H4 (Figura 4B). Cada histona posee una cola N-terminal de 16 a 44 residuos de longitud, que junto con los dominios globulares pueden ser post-traduccionalmente modificados en residuos específicos, conduciendo a cambios en la estructura de la cromatina a través de interacciones directas con elementos del nucleosoma y de la maquinaria nuclear (Kouzarides, 2007). Las histonas H2A y H3 pueden ser reemplazadas por las variantes de histonas H2A.Z (Htz1 en levaduras) y H3.3. H2A.Z ha sido relacionada tanto con activación como con la represión de la expresión génica, mientras que H3.3 se deposita únicamente en regiones transcripcionalmente activas (Kamakaka y Biggins, 2005; Sarma y Reinberg, 2005).

La cromatina puede presentarse en dos estados diferentes: eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se encuentra diseminada por todo el núcleo y representa la forma activa de la cromatina, en la que se está transcribiendo el material genético y por lo tanto, donde se encuentran la mayoría de los genes activos. Por otro lado, la heterocromatina es la forma inactiva condensada, localizada sobre todo en la periferia del núcleo. En estas regiones, los nucleosomas se encuentran unidos a proteínas adicionales produciendo el silenciamiento de los genes.

La importancia de los nucleosomas en la regulación génica pasó desapercibida hasta que se demostró que su presencia inhibe el inicio de la transcripción *in vitro* (Lorch *et al.*, 1987), indicando que los nucleosomas actuaban como una barrera física para la transcripción. La eliminación de histonas en *S. cerevisiae* conduce a un incremento global en la transcripción, proporcionando evidencias *in vivo* de que los nucleosomas pueden reprimir este proceso (Han y Grunstein, 1988; Wyrick *et al.*, 1999). El estudio de la distribución de nucleosomas ha permitido conocer cómo la localización de los mismos a lo largo de los genes afecta el acceso de la maquinaria transcripcional a los promotores en el inicio de la transcripción y su progresión durante la elongación. Por ejemplo, trabajos en el gen *PHO5* han demostrado que los nucleosomas pueden regular la transcripción por la oclusión de la caja TATA y de las regiones UAS (*Upstream Activating Sequence*) y que el desplazamiento de dicho nucleosoma es crítico para la activación transcripcional (Lohr, 1997; Martínez-Campa *et al.*, 2004). Por tanto, además de su función estructural como una forma conveniente de almacenar grandes cantidades de DNA dentro del núcleo celular, la cromatina tiene un papel esencial en la regulación de la transcripción.

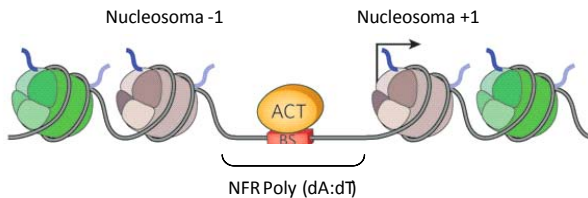
Durante los últimos años, se han llevado a cabo un elevado número de estudios genómicos dirigidos a la localización de nucleosomas a lo largo del genoma completo de algunos organismos, principalmente la levadura (Field *et al.*, 2008; Jiang y Pugh, 2009a; Whitehouse *et al.*, 2007; Shivaswamy y Iyer, 2008; Segal *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Mavrigh *et al.*, 2008; Schones *et al.*, 2008; Valouev *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2005). Estos ensayos han proporcionado una imagen global de la estructura de la cromatina en levaduras. En primer lugar, hay que destacar que las regiones promotoras poseen un menor número de nucleosomas que las regiones codificantes (Bernstein *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Sekinger *et al.*, 2005). Además, los nucleosomas en levaduras están altamente organizados, encontrándose un 80% bien posicionados, es decir, en la misma localización en todas las células dentro de una misma población (Lee *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005). Estos estudios han definido también la arquitectura general de “genes típicos”, que se caracterizan por poseer una serie de propiedades comunes. En primer lugar, presentan regiones libres de nucleosomas o NFR (*Nucleosome-Free Región*) cuya amplitud es de 150-170 pb aproximadamente (Albert *et al.*, 2007; Kaplan *et al.*, 2009; Mavrigh *et al.*, 2008; Whitehouse *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005). Estos NFRs se encuentran corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción o TSS (*Transcription Start Site*) y también en el extremo 3' de la región codificante (Figura 5). En segundo lugar, el primer nucleosoma corriente abajo del TSS, denominado nucleosoma +1, está bien localizado, y los nucleosomas en el extremo 5' del gen están generalmente mejor localizados que los que se encuentran en medio de éste (Figura 5). Por último, el primer nucleosoma corriente arriba del NFR está también bien posicionado y se denomina nucleosoma -1. El centro del nucleosoma +1 está localizado ~50-60 pb corriente abajo del TSS, por lo que la transcripción empieza típicamente sobre unas 10 bases dentro del primer nucleosoma (Mavrigh *et al.*, 2008; Whitehouse *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005).



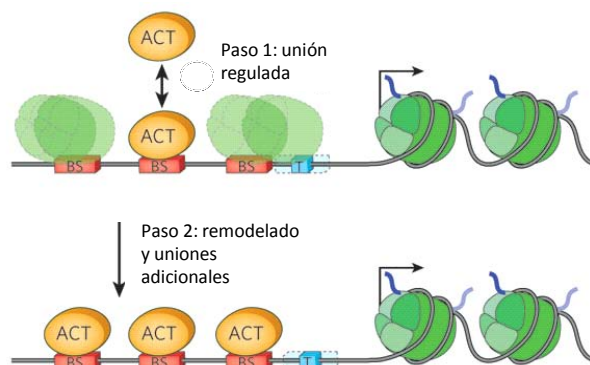
**FIGURA 5: Localización de nucleosomas en un “gen típico”.** Los nucleosomas en rojo y gris están fuerte y débilmente posicionados, respectivamente. Las regiones libres de nucleosomas se presentan con las siglas NFR, las regiones que presentan secuencias que favorecen la posición de un nucleosoma se definen como NPS y las secuencias que excluyen nucleosomas aparecen como NES. Los nucleosomas en color verde están posicionados debido normalmente a la secuencia del DNA. Figura adaptada de Radman-Livaja y Rando (2010).

En base a estas características, los promotores se pueden diferenciar en dos categorías, abiertos y cerrados, que definen a su vez dos tipos de genes, constitutivos por un lado, y altamente regulados por otro (Figura 6):

**(A) Promotores abiertos: constitutivos**



**(B) Promotores cerrados: regulados**



**FIGURA 6: Representación esquemática donde se muestra las características más frecuentes para cada tipo de promotor: (A) Abierto y (B) cerrado. Los nucleosomas representados en color verde son aquellos que contienen la histona canónica H2A, mientras que los de color morado presentan aquellos que contienen la histona modificada H2A.Z. Los sitios de unión (BS) para los activadores (ACT) aparecen también indicados. Figura tomada de Cairns (2009)**

- *Genes constitutivos, con promotores abiertos* (Figura 6A): estos promotores poseen la estructura definida arriba para un “gen típico” (nucleosoma -1/ NFR/ nucleosoma +1). La variante de histona H2A.Z se encuentra enriquecida en los nucleosomas -1 y +1 de estos genes, pudiendo facilitar la pérdida del nucleosoma y la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción. En estos casos, los sitios de unión para activadores transcripcionales residen generalmente dentro de las regiones libres de nucleosomas (Struhl *et al.*, 1985), facilitando así su unión y la activación de la transcripción.
- *Genes regulados, con promotores cerrados* (Figura 6B): en este caso, los genes regulados poseen una región libre de nucleosomas menor, debido normalmente a la deslocalización de los nucleosomas que cubren el promotor (Albert *et al.*, 2007; Field *et al.*, 2008; Tirosh y Barkai, 2008). Presentan en su estado reprimido nucleosomas cubriendo el TSS, las regiones adyacentes al TSS y la mayoría de los sitios de unión para los factores de transcripción (FT). En estos promotores, los nucleosomas compiten con los factores de transcripción

por sus sitios de unión, por lo que la acción de complejos remodeladores de cromatina y modificadores de histonas es necesaria para “abrir” los promotores, facilitando así la asociación de los activadores y la transcripción. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones, al menos uno de los sitios de unión del FT permanece expuesto, o parcialmente expuesto en el borde del nucleosoma (Struhl, 1985), permitiendo así el acceso de una primera molécula al promotor. Tras esta unión inicial, sería necesaria la acción de los remodeladores y modificadores de cromatina para la entrada de nuevas moléculas al resto de sitios de unión ocultos inicialmente (Becker y Horz, 2002). Este proceso es conocido como “modelo de activación en dos pasos” (Figura 7B). El gen *PHO5*, es un claro ejemplo de promotor cubierto, que posee un sitio expuesto para la unión del activador Pho4, localizado entre dos nucleosomas y otros ocultos dentro de nucleosomas (Almer *et al.*, 1986; Fascher *et al.*, 1990).

Los genes constitutivos difieren de los altamente regulados en otras características relacionadas con el inicio de la transcripción. La caja TATA está presente en el núcleo del promotor, típicamente a unos 30-60 pb del TSS, siendo su secuencia consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G) (Basehoar *et al.*, 2004). Análisis filogenéticos de seis especies de *Saccharomyces* revelaron que sólo un 20% de los 5700 genes de levadura contienen caja TATA (Basehoar *et al.*, 2004). Este elemento, predomina en promotores cubiertos más que en los abiertos, y en genes altamente regulados (normalmente, genes de respuesta a estrés), más que en genes constitutivos (Basehoar *et al.*, 2004; Huisinga y Pugh, 2004). El posible bloqueo de este elemento justificaría la necesidad de complejos remodeladores de cromatina en estos promotores para la activación de la transcripción. Aunque no todos los promotores presenten caja TATA, todos los genes regulados por la Pol II requieren la actuación de la proteína TBP (*TATA Binding Protein*) para el inicio de la transcripción (ver más adelante) (Kuras y Struhl, 1999; Li *et al.*, 1999).

Los nucleosomas no se encuentran dispersos a lo largo de los promotores de forma aleatoria, si no que existen factores que determinan su posición en el genoma. Entre estos factores destacan en primer lugar la propia secuencia del DNA. Secuencias poly (dA/dT) son más resistentes al enrollamiento y por tanto interfieren con la formación y estabilidad del nucleosoma (Segal y Widom, 2009). Por otro lado, repeticiones del dinucleótido AA/TT cada 10 pb proporcionan una curvatura favorable para la formación del nucleosoma (Segal *et al.*, 2006; Ioshikhes *et al.*, 2006; Lowary y Widom, 1998). Sin embargo, son las secuencias poly (dA/dT) las más aceptadas como determinantes de la posición de los nucleosomas (Segal y Widom, 2009; Mavrich *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2005;

Anderson y Widom, 2001; Iyer y Struhl, 1995). Por otro lado, el posicionamiento de nucleosomas puede ser también consecuencia de la actividad reguladora de los complejos remodeladores de cromatina (ver revisión de Cairns, 2005), de los factores de transcripción (Shim *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1991; Varga-Weisz y Becker, 1995) y de la Pol II (Field *et al.*, 2008; Mavrich *et al.*, 2008; Schones *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2005). Por ejemplo, es imposible reconstituir *in vitro* el promotor de *PHO5* utilizando sólo histonas y DNA, ya que es necesaria la presencia de una actividad ATP-dependiente para recrear el estado de la cromatina *in vivo* (Korber *et al.*, 2004).

Dentro de los promotores existen también elementos cis-reguladores (CREs), secuencias específicas que son reconocidas por factores de transcripción y que controlan la transcripción. En función de su impacto en la transcripción, estas regiones se denominan colectivamente en levaduras como secuencias corriente arriba activadoras (UAS) ó represoras (URS), localizadas típicamente varios cientos de pares de bases corriente arriba del TSS (Harbison *et al.*, 2004). El número de promotores regulados por este tipo de proteínas, que reconocen secuencias específicas en el DNA, es variable. Por ejemplo, el regulador Gal4 se une solo a 10 promotores (Ren *et al.*, 2000), mientras que Rap1 (*Represor Activator Protein 1*) se une a unos 300 promotores en el genoma de *S. cerevisiae* (Buck y Lieb, 2006).

## **2.2. Factores de transcripción**

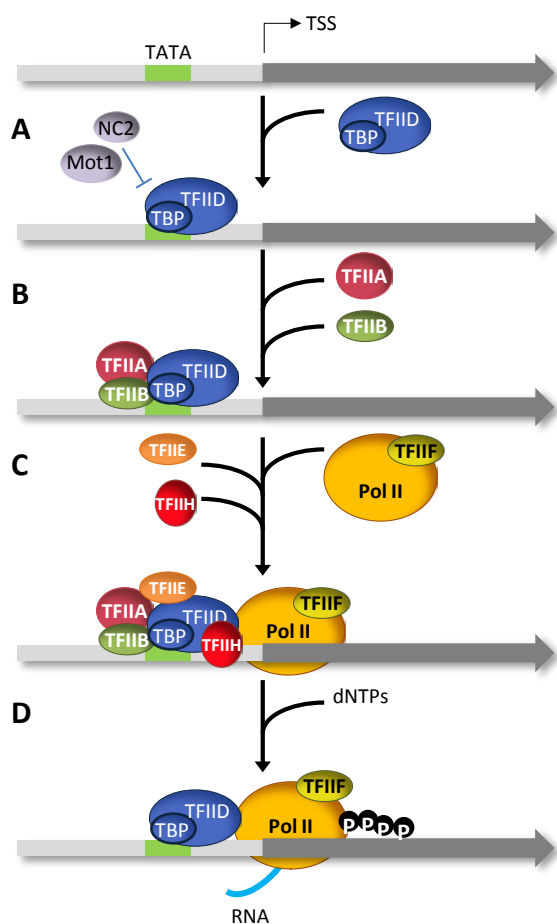
Los activadores transcripcionales son proteínas reguladoras de la transcripción que presentan dos dominios: un dominio de unión a DNA (DBD), responsable de la unión a las zonas UAS del promotor en secuencias específicas para cada factor transcripcional y un dominio de activación (AD), que contacta con las proteínas remodeladoras y/o modificadoras de cromatina o coactivadores, mediando el inicio de la transcripción (Kadonaga, 2004). Mientras que los dominios de unión a DNA se encuentran muy bien caracterizados, tanto funcional como estructuralmente, los dominios de activación no comparten motivos o estructuras fácilmente reconocibles (Triezenberg, 1995). Así, mientras que más de 50 patrones para los DBD han sido documentados en las bases de datos, ningún patrón específico o motivo para la identificación de AD ha sido definido (Hulo *et al.*, 2004; Letunic *et al.*, 2004). La actividad y localización celular de estos factores transcripcionales está controlado por señales del medio interno y externo, normalmente mediante su activación por fosforilación. En todos los casos conocidos, los activadores transcripcionales reclutan proteínas adicionales o complejos completos hacia promotores específicos, conduciendo a la unión de una de las tres RNA polimerasas y, si ello fuera necesario, al remodelado de la cromatina (Ptashne y Gann, 1997; Utley *et al.*, 1998).

### 2.3. Maquinaria general de la transcripción

Junto con los factores transcripcionales mencionados anteriormente, la célula precisa de una maquinaria general de transcripción, formada por la RNA polimerasa II, los factores generales de la transcripción y el complejo coactivador *Mediator* que conecta a los activadores con la Pol II y GTFs.

Los factores generales de transcripción (GTFs): TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFIIF y TFIIH, se encuentran evolutivamente muy conservados, y han sido definidos como el mínimo conjunto de proteínas auxiliares necesarias y suficientes para iniciar la transcripción *in vitro* desde un promotor mínimo. A diferencia de los reguladores transcripcionales, que se unen específicamente a secuencias del DNA y que son dirigidos a un discreto grupo de genes, los GTFs, como su nombre indica, son ampliamente utilizados por la célula y tienen baja especificidad de unión. Estos componentes de la maquinaria basal de transcripción funcionan en la mayoría de genes asistiendo a la unión y liberación de la Pol II en el TSS (revisado en Thomas y Chiang, 2006).

En la figura 7, se muestra la secuencia de eventos que tiene lugar en el inicio de la transcripción, que se detalla a continuación.



**FIGURA 7:** Secuencia de eventos producidos en el ensamblaje del complejo transcripcional basal e iniciación de la transcripción.

TFIID (*Transcription Factor II D*) es un complejo multiproteico que contiene la proteína de unión a la caja TATA o TBP y los factores asociados a la proteína TBP o TAFs (*TBP-Associated Factors*). La proteína TBP también puede formar parte del complejo acetilador de histonas SAGA (Grant *et al.*, 1997; Mizzen *et al.*, 1996; Nishikawa *et al.*, 1997). Como ya se ha comentado, la unión de la proteína TBP a los promotores es necesaria para la transcripción de todos los genes, independientemente de si presentan o no caja TATA (Pugh y Tjian, 1991). No obstante, este reclutamiento tiene lugar por vías diferentes. La proteína TBP es dirigida a los promotores que presentan caja TATA (aproximadamente un 10% del total) formando parte del complejo modificador de histonas SAGA (Sermwittayawong y Tan, 2006; Huisinga y Pugh, 2004), mientras que en el caso de los genes que carecen de caja TATA (alrededor del 90% del total) la unión de TBP con los promotores está estabilizada a través del complejo TFIID, posiblemente mediante la acción de los TAFs (Basehoar *et al.*, 2004; Huisinga y Pugh, 2004; Pugh y Tjian, 1991). Los genes regulados por SAGA son en su mayoría genes de respuesta a estrés, indicando un mecanismo de regulación diferente para los genes inducidos en esas situaciones.

El complejo NC2 (*Negative Cofactor 2*) y la ATPasa Mot1 regulan conjuntamente la localización de la proteína TBP a lo largo del genoma, desactivando la expresión génica (Lee y Young, 1998; Pugh, 2000). Este proceso se lleva a cabo a través de dos mecanismos diferentes. Mot1 utiliza la energía de hidrólisis del ATP para disociar la proteína TBP del DNA (Auble *et al.*, 1994; Darst *et al.*, 2003). De esta manera, Mot1 actúa negativamente en la transcripción, aunque también se ha descrito lo contrario, posiblemente mediante la eliminación de la proteína TBP ensamblada incorrectamente en orientación contraria o en sitios inapropiados debido a la débil especificidad por la caja TATA (Muldrow *et al.*, 1999; Sprouse *et al.*, 2009). Por otro lado, NC2 atenúa la transcripción mediante su unión al complejo formado por la TBP y el DNA, bloqueando el ensamblaje de los factores TFIIA y TFIIB (Cang *et al.*, 1999; Inostroza *et al.*, 1992). Por tanto, mientras que la unión TBP-DNA es intrínsecamente estable, su interacción *in vivo* puede ser altamente dinámica (Sprouse *et al.*, 2008).

Tras la unión de la TBP a la caja TATA (Figura 7A), se produce el reclutamiento de los factores TFIIA y TFIIB, que estabilizan las interacciones TBP-DNA (posiblemente en cooperación con otros GTFs y factores reguladores) y promueven la formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción o PIC (Figura 7B). De esta manera, se une a continuación el complejo formado por el TFIIF y la Pol II, colocando la polimerasa sobre el TSS. Sin embargo, es necesario que se unan dos factores más, TFIIE y TFIIH antes de que se separe la hélice de DNA y se exponga el DNA molde (Figura 7C). Los complejos TFIIE y

TFIIH trabajan de manera coordinada modulando la actividad de la Pol II y facilitando la liberación del promotor en el inicio de la transcripción. TFIIE se asocia después de la Pol II pero antes que TFIIH (Buratowski *et al.*, 1989), reclutando junto con el complejo *Mediator* al factor TFIIH, a través de interacciones directas (Esnault *et al.*, 2008). Sin embargo, TFIIE puede también asociarse con un PIC parcial en ausencia de Pol II (Yokomori *et al.*, 1998). La unión de TFIIH completa la formación del complejo de pre-iniciación. La actividad helicasa de una de las subunidades de TFIIH, utiliza la energía de hidrólisis del ATP para la separación de las cadenas del DNA, permitiendo por tanto, la formación de un complejo abierto con la Pol II (Wang *et al.*, 1992). La subunidad del TFIIH, Kin28, produce el proceso de transición, desde la iniciación de la transcripción hacia la elongación a través de la fosforilación de la serina en posición 5 del motivo repetido YSPTSPS del dominio CTD (*Carboxy-Terminal Domain*) de la Pol II (Komarnitsky *et al.*, 2000; Valay *et al.*, 1995) (Figura 7D). Esta marca induce el reclutamiento, por parte de la polimerasa, de un gran número de factores, incluyendo enzimas de "capping" de RNAm, el complejo Nrd-Nab3 y el complejo PAF (*Polymerase II-Associated Factor*) (Komarnitsky *et al.*, 2000; Hampsey y Reinberg, 2003; Ng *et al.*, 2003; Vasiljeva *et al.*, 2008). Las enzimas de "capping" introducen una estructura 7-metil guanina ("cap") en el extremo 5' del transcrito naciente para protegerlo de la degradación y marcarlo para el transporte al citoplasma donde será traducido finalmente. El complejo Nrd-Nab3 promueve la terminación de los transcritos alterados y por tanto codificantes de regiones no funcionales y los dirige a la ruta del exosoma nuclear para su degradación. Y por último, el complejo PAF conecta la fosforilación de esta serina con una red de modificaciones de histonas.

## **2.4. Complejos modificadores de cromatina**

Para regular el acceso de la maquinaria transcripcional a la cromatina, la célula utiliza enzimas modificadoras de cromatina, que suelen formar parte de grandes complejos proteicos. Se clasifican en dos grupos fundamentales, atendiendo a su mecanismo de acción: (i) complejos modificadores de histonas, que catalizan la modificación post-traduccional de las histonas, y (ii) complejos remodeladores de cromatina que alteran las interacciones entre el DNA y las histonas de forma ATP-dependiente.

### **2.4.1. Complejos modificadores de histonas**

Los complejos modificadores de histonas alteran el estado de la cromatina mediante la incorporación o eliminación de grupos acetilos, fosfatos o metilos a través de enlaces covalentes. También se han descrito otras modificaciones como la ubiquitinación,

sumoilación y la ADP-ribosilación. La mayoría de estas reacciones se producen en los extremos N-terminal de las colas de histonas, a excepción de la ubiquitinación, que ocurre en los extremos C-terminales de H2A e H2B. Adicionalmente, también se producen modificaciones en los dominios globulares de las histonas (Kouzarides, 2007).

La modificación de histonas da lugar a diferentes efectos. A excepción de la metilación, la modificación de histonas produce cambios en la carga neta de los nucleosomas, que debilitan las interacciones establecidas entre el DNA y las histonas, disminuyendo la estabilidad del nucleosoma y alterando la interacción entre nucleosomas. Algunas modificaciones influyen directamente en estructuras de orden superior de la cromatina, como por ejemplo, la acetilación H4K16 que inhibe la formación de la fibra compacta de 30 nm (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Asimismo, la modificación de histonas puede generar también sitios de reconocimiento para otras proteínas (revisado en Seet *et al.*, 2006). En la tabla 1 se resumen las modificaciones de histonas más relevantes, las enzimas que las producen, los dominios que interaccionan con las histonas modificadas y sus posteriores efectos en transcripción.

**TABLA 1: Modificación de histonas asociada con transcripción.** (\*) Las proteínas indicadas dentro de paréntesis reconocen las correspondientes modificaciones pero los dominios específicos están sin determinar. Tabla adaptada de Li *et al.* (2007).

Modificaciones	Posición	Enzimas	Módulo(s) reconocimiento*	Funciones en transcripción	
Metilación	H3	K4	Set1	PHD, Chromo, WD-40	Activación
		K9	n/a	Chromo (HP1)	Represión, Activación
		K27		Ezh2, G9a	Represión
	H4	K36	Set2	Chromo(Eaf3), JMJD	Reclutamiento de Rpd3S para reprimir la iniciación
		K79	Dot1	Tudor	Activación
Arg Metilación	H3	R2		Silenciamiento	
Arg Metilación	H3	R17		Activación	
		R26		Activación	
		R3		Activación	
Fosforilación	H4	R3	(p300)	Activación	
Fosforilación	H3	S10	Snf1	(Gcn5)	Activación
Ubiquitinación	H2B	K120/123	Rad6, Bre1	(COMPASS)	Activación
	H2A	K119			Represión
Acetilación	H3	K56		(Swi/Snf)	Activación
	H4	K16	Sas2, NuA4	Bromodomain	Activación
	Htz1	K14	NuA4, SAGA		Activación

Generalmente, la modificación covalente de las histonas no ocurre de forma aislada. De hecho, una modificación puede depender de otra, dentro de la misma o en una histona adyacente. Por ejemplo, la fosforilación de la Ser10 H3 estimula la acetilación de la Lys14 de la misma cola de la histona por Gcn5 (Lo *et al.*, 2000). Por tanto, se ha propuesto que modificaciones individuales o patrones de modificaciones de histonas

forman un “código de histonas” que puede ser “leído” por otras proteínas que influyen en la dinámica de la cromatina y en su función (Jenuwein y Allis, 2001; Strahl y Allis, 2000; Turner, 2000).

Las modificaciones de histonas mejor caracterizadas y estudiadas son la acetilación y deacetilación. En cuanto al primer proceso, las *histonas acetiltransferasas (HAT)* llevan a cabo la acetilación de grupos  $\epsilon$ -amino de las lisinas, altamente conservado en las histonas. Esta reacción requiere al cofactor acetil-CoA como donador del grupo acetilo. La acetilación de lisinas, posiblemente una de las modificaciones mejor conocidas, introduce carga negativa y neutraliza la interacción entre la cola de la histona y el grupo fosfato del DNA, produciendo la pérdida del empaquetamiento sobre el DNA. La acetilación de las histonas H3 y H4 está generalmente, aunque no siempre, asociada con la activación de la transcripción (Deckert y Struhl, 2001; Wu y Grunstein, 2000; Struhl, 1998; Shivaswamy e Iyer, 2008). Además, la acetilación de lisinas crea nuevas superficies de unión para factores que presenten bromodominios como la subunidad ATPasa del complejo SWI/SNF, el factor TAF250 o el propio Gcn5 presente en los complejos SAGA y ADA (Winston y Allis, 1999).

Las proteínas con actividad HAT descritas en levadura se han clasificado en cuatro familias diferentes en base a las similitudes estructurales y a los diferentes dominios identificados (Roth *et al.*, 2001):

- (A) Familia GNATs (*Gcn5 related N-acetyltransferases*): similares a Gcn5 de *S. cerevisiae*, tales como PCAF, la citoplasmática Hat1, Hpa2 y Elp3. Gcn5 es la subunidad catalítica de diferentes complejos entre los que destaca el complejo activador transcripcional SAGA (*Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase complex*).
- (B) Familia MYST (*MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60 y Esa1*). Sas3 forma parte del complejo NuA3 y Esa1, la única HAT esencial en levaduras, forma parte del complejo NuA4.
- (C) Familia p300/CBP.
- (D) Factores de transcripción: la subunidad TAF250 del TFIID y Nut1, un componente del complejo Mediator.

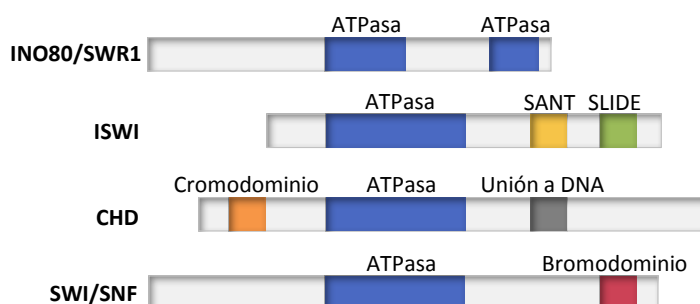
Las HATs son dirigidas hacia los promotores por proteínas específicas de unión a DNA. Por ejemplo, el activador transcripcional Gcn4 dirige la HAT Gcn5 al promotor del gen *HIS3*, produciendo la acetilación de histonas próximas (Kuo *et al.*, 2000). Gcn5 acetila mayoritariamente histonas H3 y H2B (Suka *et al.*, 2001). La acetiltransferasa Esa1, acetila histonas H4 y H2A (Suka *et al.*, 2001) y parece ser dirigida a los promotores de genes de

proteínas ribosómicas. Por otro lado, estudios transcripcionales a gran escala mediante la utilización de *microarrays*, han demostrado que la delección de *GCN5* afecta la expresión de sólo un 5% del conjunto de los genes de levadura en condiciones normales de crecimiento, lo que indicaría que Gcn5 es requerida para la regulación de un grupo relativamente pequeño de genes (Holstege *et al.*, 1998). Por otro lado, el resto de HATs podría afectar a grupos más amplios estableciéndose una división de funciones entre las diferentes HATs.

La acetilación de histonas es un proceso reversible. La eliminación del grupo acetilo es llevado a cabo por las *deacetilasas de histonas (HDAC)*. La presencia de histonas deacetiladas puede reprimir la transcripción, desestabilizando la unión de complejos multiproteicos tales como SWI/SNF, SAGA y el factor de transcripción basal TBP en el promotor (Deckert y Struhl, 2002) o devolviendo la cromatina a su hermetismo inicial. La utilización de *microarrays* de DNA que estudian el impacto en la transcripción de mutantes de levadura en distintas HDAC, han demostrado que Rpd3 y Hda1 son las principales deacetilasas en levaduras, afectando a numerosos promotores (Robyr *et al.*, 2002).

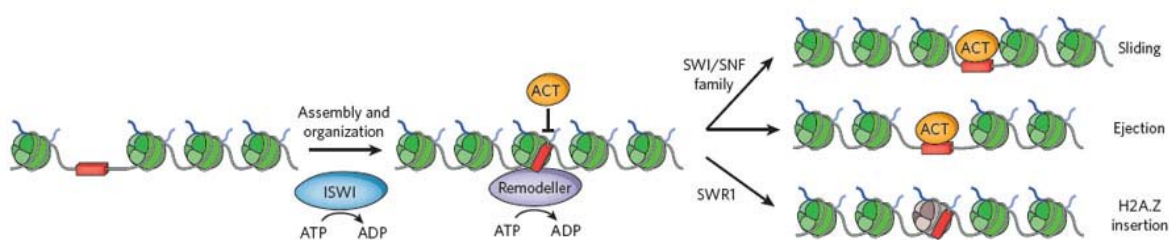
#### 2.4.2. Complejos remodeladores de cromatina

Los remodeladores de cromatina ATP-dependientes son grandes complejos multiproteicos que se encuentran muy conservados en eucariotas. Se caracterizan por presentar una subunidad ATPasa perteneciente a la superfamilia SF2 de ATPasas y helicasas que contiene un dominio ATPasa compuesto por las regiones DExx y HELICc (Flaus *et al.*, 2006). Estos complejos se agrupan en cuatro familias fundamentales: SWI/SNF, INO80/SWR1, ISWI y CHD, en base a la organización de sus dominios funcionales. En la figura 8, se indican los dominios más característicos de las subunidades catalíticas de cada familia.



**FIGURA 8:** Organización de los dominios de las subunidades ATPasa de los complejos remodeladores de cromatina. Las cuatro familias comparten un dominio ATPasa similar. La familia INO80/SWR1 presenta el dominio ATPasa dividido. La familia ISWI posee dominios SANT y SLIDE en el extremo carboxilo, que supuestamente unirían histonas y DNA *linker*, respectivamente. La familia CHD contiene un cromodominio N-terminal y un dominio de unión a DNA. La familia SWI/SNF contiene un bromodominio en el extremo carboxilo.

Estos complejos carecen de la capacidad de unirse a los genes de forma específica, por lo que los factores de transcripción suelen dirigir su reclutamiento hacia los promotores donde realizan su acción. Allí, emplean la energía derivada de la hidrólisis del ATP para alterar las interacciones entre DNA e histonas y mediar diferentes acciones (Figura 9), como: el deslizamiento de nucleosomas, variando la posición de estos en el DNA; la creación de un estado remodelado en el que el DNA es más accesible pero las histonas permanecen unidas; la disociación completa entre el DNA y las histonas y el reemplazamiento de histonas por variantes de histonas (Mohrmann y Verrijzer, 2005).



**FIGURA 9: Representación esquemática de los mecanismos de acción de los diferentes complejos remodeladores ATP-dependientes.** La mayoría de los complejos remodeladores de la familia ISWI colaboran en el ensamblaje y organización de la cromatina produciendo el espaciado de los nucleosomas. Esta organización puede cubrir sitios de unión (en rojo) para factores de transcripción (ACT). La familia SWI/SNF permite el acceso a estos sitios de unión a través del deslizamiento o eliminación del nucleosoma. La familia SWR1 modifica los nucleosomas insertando la variante de histona H2A.Z en el DNA, inestabilizándolo. Figura tomada de Cairns (2009).

### Familia INO80/SWR1

La familia de remodeladores INO80/SWR1 (*INOsitol requiring 80/Sick UIT Rat8 ts 1*) es única ya que contiene un dominio ATPasa dividido en dos regiones (Bao y Shen, 2011). El gen *INO80* apareció en un rastreo genómico dirigido a la identificación de genes requeridos para la activación del gen de síntesis de inositol *INO1*, importante en varias rutas de señalización (Ebbert *et al.*, 1999). INO80 juega un papel más amplio que el resto de los remodeladores en la regulación génica ya que participa en la activación transcripcional, en la reparación del DNA y en las paradas de las horquillas de replicación (Shen *et al.*, 2000; Shimada *et al.*, 2008). El complejo INO80 carece de dominios de reconocimiento de histonas, por lo que se desconoce cómo es dirigido a los sitios de transcripción, reparación y replicación.

El complejo SWR-C/SWR1 es un remodelador de cromatina que altera la composición de los nucleosomas. SWR1 utiliza la energía de hidrólisis del ATP para reemplazar la histona H2A por su variante H2A.Z en los nucleosomas del promotor

(Guillemette *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). H2A.Z promueve la transcripción mediante la desestabilización de nucleosomas (Zhang *et al.*, 2005; Krogan *et al.*, 2004). Esta variante de histona se ha asociado con estados de cromatina abierta, más que con estados cerrados, aunque su presencia no es suficiente para crear un entorno transcripcionalmente activo.

### **Familia ISWI**

---

Al contrario que los complejos de las familias SWI/SNF e INO80, la familia ISWI (*Imitation SWItch*) lleva a cabo la organización de la cromatina creando cadenas de nucleosomas uniformemente espaciados, en las que algunos nucleosomas se sitúan en regiones inicialmente desfavorables. En la mayoría de los casos, este proceso tiene un efecto negativo en transcripción (Langst *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1997). Por ejemplo, el complejo ISWI2, junto con la histona deacetilasa Rpd3, crea una organización de nucleosomas que conduce a la represión de genes meióticos (Fazzio *et al.*, 2001). ISWI2 puede también cooperar con otros complejos represores, como TUP1-SSN6, en el mantenimiento de estados represores (Zhang y Reese, 2004). La organización de la cromatina por estos complejos, ayuda a prevenir la transcripción en sentido contrario en regiones intergénicas y la transcripción aleatoria por la Pol II que tiene lugar si la densidad y localización de nucleosomas no está optimizada (Whitehouse *et al.*, 2007).

### **Familia CHD**

---

El papel funcional de la familia de remodeladores de cromatina CHD (*Chromatin organization modifier, Helicase, and DNA-binding domains*) es el menos conocido de todos. Perfiles de expresión en mutantes *chd1Δ* muestran sólo unos pocos genes afectados (Tran *et al.*, 2000), sugiriendo que Chd1 puede operar en rutas paralelas con otros remodeladores de cromatina o que, simplemente, es reclutado sólo a unos pocos genes. Una característica que define a esta familia es la presencia de un cromodominio que se une a lisinas metiladas. De hecho, Chd1 interacciona *in vitro* con la histona metilada H3K4 (Flanagan *et al.*, 2005; Pray-Grant *et al.*, 2005).

### **Familia SWI/SNF**

---

El complejo SWI/SNF fue el primer complejo remodelador de cromatina descrito. Varias de sus subunidades fueron identificadas genéticamente como proteínas implicadas en la regulación del gen codificante de la endonucleasa *HO* y del gen *SUC2*. *HO* es necesario para el intercambio del tipo sexual, de ahí SWI (*SWItching deficient*), mientras que los mutantes *suc2* son clasificados como no fermentadores de sacarosa y de ahí el

acrónimo SNF (*Sucrose NonFermenting*) (Workman y Kingston, 1998; Sudarsanam y Winston, 2000).

La familia SWI/SNF, que también incluye el complejo RSC (*Remodels Structure of Chromatin*), produce el deslizamiento y desplazamiento total de los nucleosomas, por lo que sus funciones están normalmente relacionadas con la desorganización de los nucleosomas y la regulación positiva de la transcripción (Narlikar *et al.*, 2002; Saha *et al.*, 2006; Lorch *et al.*, 1999). Sin embargo, también se conocen algunos genes regulados negativamente por estos complejos (Angus-Hill *et al.*, 2001; Cairns *et al.*, 1999; Sudarsanam y Winston, 2000). La hiperacetilación de los nucleosomas favorece la interacción con los complejos SWI/SNF y RSC a través de sus bromodominios (Horn y Peterson, 2001; Martens y Winston, 2003; Ng *et al.*, 2002), ya que se unen a residuos acetilados de las lisinas de las histonas. Este reconocimiento suele ser un requisito importante para que se produzca la asociación proteína-histona. Dado que esta modificación disminuye las interacciones electrostáticas entre las lisinas de las histonas y el esqueleto fosfato del DNA, y altera la compactación de estructuras superiores, la previa acetilación de los nucleosomas facilita el remodelado durante la activación de la expresión. Estudios transcripcionales *in vitro* muestran que la acetilación de nucleosomas por NuA4 estimula la actividad de RSC y aumenta la entrada de la Pol II (Carey *et al.*, 2006).

El complejo RSC contiene muchas proteínas homólogas a subunidades del complejo SWI/SNF (Tabla 2). Este complejo incluye una proteína homóloga a la ATPasa Swi2/Snf2 llamada Sth1, y homólogos a Snf5, Swi3 y Swp73 (Sfh1, Rsc8/Swh3 y Rsc6, respectivamente). Asimismo, ambos complejos contienen las mismas proteínas relacionadas con actina, Arp7 y Arp9, que podrían ser necesarias para la asociación del complejo con la matriz nuclear (Cairns *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 1998). Sin embargo, RSC es mucho más abundante en la célula, miles de moléculas comparadas frente a 100 ó 200 del complejo SWI/SNF (Cairns *et al.*, 1996) y se encuentra localizado en varios cientos de promotores (Damelin *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002), funcionando tanto en promotores regulados por la Pol I como por la Pol II (Damelin *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002). Estos datos explicarían por qué el complejo RSC es esencial para la levadura, mientras que el complejo SWI/SNF no lo es (Cairns *et al.*, 1996).

**TABLA 2: Subunidades de los complejos SWI/SNF y RSC.** Las subunidades homólogas de estos complejos se muestran en la misma fila.

SWI/SNF	RSC
Swi2/Snf2	Sth1/Nsp1
Swi1	
Snf5	Sfh1
Swi3	Rsc8/Swh3
Swp82	
Swp73/Snf12	Rsc6
Swp61/Arp7	Rsc11/Arp7
Swp59/Arp9	Rsc12/Arp9
Snf6	
Swp29/Taf14	
Snf11	
	Rsc1 ó 2
	Rsc3-5,7,9,10
	Rsc13-15

### 2.4.3. Complejo SWI/SNF

SWI/SNF es un complejo multiproteico de ~2 MDa, que contiene los productos de varios genes identificados originalmente por sus defectos en el intercambio del tipo sexual y/o por sus defectos en la fermentación de sacarosa (Cairns *et al.*, 1994; Côté *et al.*, 1994; Winston y Carlson, 1992). El complejo SWI/SNF está altamente conservado en eucariotas y posee homólogos en *Drosophila* y humanos (Kingston y Narlikar, 1999). La función del complejo SWI/SNF fue inicialmente asociada a la cromatina, cuando se descubrió que mutaciones que suprimían los fenotipos asociados a los mutantes *swi1/snf* de levadura correspondían a genes que codificaban para proteínas histonas y otros componentes de la cromatina (Winston y Carlson, 1992). Posteriormente, se comprobó que el complejo SWI/SNF, purificado tanto en levaduras como en humanos, alteraba la estructura de los nucleosomas de forma ATP-dependiente (Côté *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 1994).

El complejo SWI/SNF está integrado por 11 subunidades conocidas (Tabla 2): Snf2p/Swi2p, Swi1p, Snf5p, Swi3p, Swp82p, Swp73p/Snf12p, Arp7p, Arp9p, Snf6p, Snf11p y Swp29p/Taf14p. El motor de dicho complejo es la subunidad ATPasa Snf2/Swi2, precursora de una subfamilia de la superfamilia SF2 de ATPasas y helicasas estimuladas por DNA (Flaus *et al.*, 2006), cuyo homólogo en humanos es la proteína BRG1 (Phelan *et al.*, 2000; Phelan *et al.*, 1999). Aunque la funcionalidad de alguna de las otras subunidades es menos conocida, el complejo SWI/SNF puede dividirse funcionalmente en cuatro módulos interdependientes (Yang *et al.*, 2007):

- A. **Swi2-Arp7-Arp9**: translocan DNA de forma ATP-dependiente conduciendo al remodelado de la cromatina.
- B. **Swi3-Swp73-Snf6**: se unen a histonas produciendo la pérdida de dímeros de histonas H2A-H2B.
- C. **Snf5** y D. **Swi1**: interaccionan con dominios de activación acídicos de factores de transcripción, y esta interacción es esencial para el reclutamiento del complejo SWI/SNF hacia el gen diana (Prochasson *et al.*, 2003).

El complejo SWI/SNF tiene la capacidad de unirse al DNA y a los nucleosomas con alta afinidad, pero sin especificidad de secuencia (Côté *et al.*, 1998; Quinn *et al.*, 1996). Swi1 contiene un dominio de interacción rico en AT (ARID) que permite la unión no específica al DNA, mientras que Swi3 posee un dominio conservado SANT que interacciona con los dominios N-terminales de las histonas, y que es importante para la función del complejo (Boyer *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). Mutaciones dirigidas en Snf5, una de las subunidades centrales también conservada en eucariotas superiores, muestran que está implicada en el ensamblaje y en funciones catalíticas del complejo (Geng *et al.*, 2001). Interesantemente, los complejos SWI/SNF de levaduras y eucariotas superiores contienen proteínas relacionadas con actina, Arp7 y Arp9. Estas proteínas podrían proporcionar una unión a estructuras nucleares, tales como la matriz nuclear. Al menos cuatro subunidades de dicho complejo, Swi1, Swi3, Snf5 y Snf6 son necesarias para el correcto ensamblaje de Snf2/Swi2 en el complejo (Prochasson *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007). Por tanto, la delección de estas subunidades conduce a fenotipos idénticos a los del mutante *snf2Δ*.

Aunque el mecanismo por el que actúa el complejo SWI/SNF no está del todo claro, estudios recientes han sugerido un modelo en el que utilizaría un sistema de "bombeo" de DNA para generar *loops* transitorios de DNA en la superficie del octámero (Zhang *et al.*, 2006; Zofall *et al.*, 2006). Este modelo es consistente con la habilidad del complejo para utilizar la energía derivada de la hidrólisis del ATP y generar torsiones superhelicoidales, movilizar nucleosomas y aumentar la accesibilidad del DNA nucleosomal (Smith y Peterson, 2005a). El complejo SWI/SNF también puede producir la pérdida de dímeros de histonas H2A/H2B de los nucleosomas a través de la subunidad Swi3 (Yang *et al.*, 2007). La actuación del complejo SWI/SNF genera nucleosomas alterados cuya conformación persiste incluso después de la separación de estos complejos (Côté *et al.*, 1998). Además, este complejo puede acelerar el proceso contrario, devolviendo la conformación remodelada del nucleosoma a su estado inicial (Lorch *et al.*, 1998; Schnitzler *et al.*, 1998). Algunas de las características de los nucleosomas

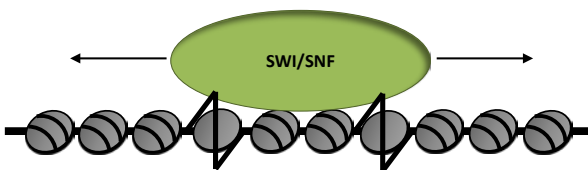
remodelados por el complejo SWI/SNF, son:

- Pérdida de la fase rotacional del DNA en la superficie del octámero de histonas aunque el DNA permanece, al menos parcialmente, asociado a la superficie de dicho octámero (Côté *et al.*, 1998).
- Incremento de la accesibilidad del DNA nucleosomal por los factores de transcripción y enzimas de restricción (Côté *et al.*, 1998).
- Reducción de la cantidad total de DNA asociado con el octámero de histonas (Bazett-Jones *et al.*, 1999).
- Reducción de la estabilidad de los nucleosomas cuando se someten a fuerza iónica elevada (Lorch *et al.*, 1998).

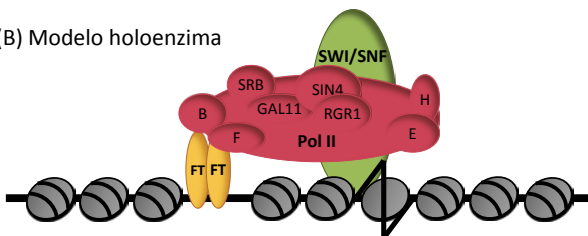
La homología entre el dominio ATPasa de Swi2/Snf2 con las helicasas, sugieren que esta proteína podría actuar como tal. Sin embargo, esta actividad no se ha encontrado en el complejo purificado (Côté *et al.*, 1994).

La funcionalidad del complejo SWI/SNF se requiere para la transcripción de menos del 5% de los genes de la levadura en condiciones normales de crecimiento (Holstege *et al.*, 1998). Además, se encuentra presente solo entre 100-500 copias por núcleo (Côté *et al.*, 1994). Estas evidencias sugieren que el complejo SWI/SNF debe ser dirigido *in vivo* a lugares específicos dentro de los promotores de los genes que regula, habiéndose propuesto tres modelos para explicar dicho proceso (Figura 10) (Peterson y Workman, 2000):

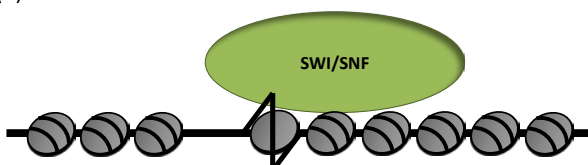
(A) Modelo catalítico



(B) Modelo holoenzima



(C) Modelo activador



**FIGURA 10** Diferentes modelos para el reclutamiento del complejo SWI/SNF a los promotores. El "modelo catalítico" postula que el complejo SWI/SNF introduce cambios transitorios de forma aleatoria en el genoma, mientras que los cambios persistentes y dirigidos ocurren solo en presencia de los factores de transcripción. El "modelo holoenzima" sugiere que el complejo es un componente dentro del complejo de la polimerasa II. El "modelo activador" propone al complejo SWI/SNF como un objetivo directo de los activadores gen específicos. Figura adaptada de Peterson y Workman (2000).

1. Modelo catalítico. SWI/SNF introduciría cambios transitorios y aleatorios en la estructura de la cromatina. Sin embargo, este modelo parece insuficiente para explicar la especificidad de función del complejo SWI/SNF.
2. Modelo holoenzima. Este modelo alternativo propone que SWI/SNF es reclutado a los genes diana mediante su asociación con la maquinaria general de la transcripción. Tanto el complejo SWI/SNF de levaduras como el de humanos se han co-purificado y co-inmunoprecipitado con la holoenzima (Pol II y Mediator) (Wilson *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1998; Neish *et al.*, 1998). Sin embargo, en otros experimentos realizados, las preparaciones de Pol II no incluían el complejo SWI/SNF, lo que sugiere que probablemente sólo una fracción de holoenzima contiene dicho complejo (Myers *et al.*, 1998). Además, varias mutaciones que alteran la holoenzima, como deleciones en los genes *SRB2* y *GAL11*, no afectan a la presencia del complejo SWI/SNF en los promotores. Adicionalmente, estudios bioquímicos han demostrado la inconsistencia de este modelo. Por un lado, Natarajan y colaboradores no obtuvieron resultados positivos en la co-inmunoprecipitación del complejo SWI/SNF y la holoenzima, mientras que sí se observaron fuertes interacciones entre SWI/SNF y el activador Gcn4 (Natarajan *et al.*, 1999). Por otro lado, Yudkovky y colaboradores utilizaron extractos nucleares para ensamblar el complejo de pre-iniciación en un DNA molde y aunque SWI/SNF se unía al molde inmovilizado de DNA, su reclutamiento era independiente de la proteína TBP y de la holoenzima (Yudkovsky *et al.*, 1999). Por tanto, el reclutamiento de SWI/SNF no requiere obligatoriamente su asociación con la holoenzima, pero sí puede interactuar funcionalmente con ésta en uno o más pasos de la transcripción, por ejemplo, durante la fase de elongación.
3. Modelo activador. En este caso, el complejo SWI/SNF sería reclutado a través de interacciones directas con activadores gen-específicos, siendo el mecanismo más probable para dirigir la actividad remodeladora a los promotores. Por ejemplo, la presencia del complejo SWI/SNF en el promotor del gen *HO* depende *in vivo* del activador transcripcional Swi5 (Cosma *et al.*, 1999). Ensayos *in vitro* han demostrado que el complejo purificado en levadura interacciona directamente con Swi5 (Neely *et al.*, 1999). SWI/SNF también interacciona *in vitro* con los dominios de activación ácidos de los activadores transcripcionales Gcn4, Hap4, Gal4-VP16 y Gal4-AH (Neely *et al.*, 1999; Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999). Esta asociación es necesaria para el reclutamiento de la actividad remodeladora a un conjunto de nucleosomas *in vitro*, estimulando después, la transcripción por la Pol II (Neely

*et al.*, 1999; Natarajan *et al.*, 1999; Yudkovsky *et al.*, 1999). Por otro lado, la actividad del complejo SWI/SNF puede también ser reclutada a genes diana vía interacciones con represores gen-específicos (Dimova *et al.*, 1999).

Un gran número de estudios indican que la actividad de SWI/SNF puede facilitar también la unión de los activadores transcripcionales a los promotores. La actividad de SWI/SNF estimula la unión de diferentes activadores transcripcionales *in vitro* y la unión eficiente del activador Gal4 a sitios de baja afinidad en nucleosomas requiere a SWI/SNF *in vivo* (Burns y Peterson, 1997). Si SWI/SNF estimula la unión de activadores a sus sitios de unión, ¿cómo recluta el activador al complejo SWI/SNF hacia los genes diana? El papel preciso de este complejo y de activadores individuales va a estar gobernado por el contexto de promotores específicos. Los activadores que inicialmente reclutan al complejo SWI/SNF podrían tener sus sitios de unión localizados en regiones libres entre nucleosomas o ser particularmente eficientes en su unión a sitios dentro del nucleosoma. Por el contrario, activadores con dificultad para acceder a su sitio de unión podrían requerir la actuación previa del complejo. En este último caso, el complejo SWI/SNF podría ser reclutado previamente por un activador diferente o podría entrar a los promotores tras su interacción con el activador en solución. Ambas situaciones se producen en el promotor del gen *HO* (Cosma *et al.*, 1999). La región URS1 del promotor contiene dos sitios de unión para el activador Swi5, mientras que presenta ocho sitios de reconocimiento para el complejo SBF. Uno de los sitios de unión al factor de transcripción Swi5, se encuentra posicionado entre dos nucleosomas, permitiendo inicialmente la entrada de Swi5 al promotor. A continuación, Swi5 media el reclutamiento del complejo SWI/SNF, que tras remodelar la cromatina y desplazar los nucleosomas, posibilita la posterior unión de un segundo activador, el complejo SBF, que finalmente conlleva el inicio de la transcripción del gen *HO* (Cosma *et al.*, 1999; Cosma *et al.*, 2001; Takahata *et al.*, 2009).

En conclusión, al menos tres factores, como son: (i) la afinidad entre SWI/SNF y los activadores transcripcionales, (ii) la estructura de la cromatina en el sitio de unión del activador y (iii) la afinidad del activador por su sitio de unión, influirían en la participación del complejo SWI/SNF en cada promotor.

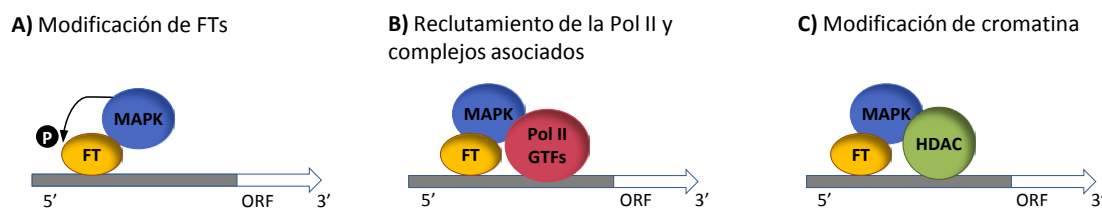
### 3. CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN SITUACIONES DE ESTRÉS

Las condiciones ambientales adversas inician en la levadura respuestas de estrés que conducen a cambios globales en la transcripción. Como consecuencia de estos cambios en el patrón de expresión génica, la célula se adapta. Aunque existen diferencias entre especies, las respuestas básicas están muy conservadas, y el estudio de rutas de transducción de señales que se inducen en las levaduras permite conocer y comprender mecanismos observados en el resto de eucariotas (Qi y Elion, 2005). La supervivencia frente a condiciones desfavorables depende de la capacidad de la célula para producir una respuesta adaptativa rápida y específica frente a un determinado estrés. La mayoría de estas respuestas siguen una estrategia similar: una actuación de la célula inmediata para paliar el daño, seguida rápidamente por una respuesta de protección global, permitiendo a la célula sobrevivir momentos después del daño y prepararse para un estrés más severo o duradero (Proft y Struhl, 2004). Estas respuestas incluyen cambios transcripcionales a diferentes niveles, regulando negativamente la inducción de genes constitutivos o no esenciales en esos momentos e induciendo la expresión de genes de respuesta a estrés. Los genes inducidos en estas situaciones incluyen por un lado genes específicos para cada tipo de estrés y genes que responden indiscriminadamente a diferentes tipos de estrés. Este último grupo de genes es conocido como la respuesta general a estrés ambiental (ESR) (revisado en Gasch, 2007). La respuesta a estrés ambiental incluye entre 300 y 600 genes cuya expresión es inducida o reprimida en diferentes situaciones de estrés, entre las que destacan: el daño en el DNA, el estrés térmico, osmótico u oxidativo (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Capaldi *et al.*, 2008). La ESR ha sido relacionada con el concepto de “protección cruzada”, donde la exposición a dosis no letales de un tipo de estrés puede proteger frente a dosis potencialmente letales de otro tipo de estrés no relacionado (Berry y Gasch, 2008).

En este contexto, las proteínas quinasas activadas por estrés juegan un papel esencial. Las MAPK regulan el proceso de transcripción, no sólo mediante la fosforilación de los correspondientes factores de transcripción, sino también con la formación de interacciones estables con el DNA. Este último concepto ha sido ampliamente caracterizado para la MAPK Hog1 (revisado en de Nadal y Posas, 2010). Hog1 es activado en respuesta a estrés osmótico y utiliza diferentes mecanismos para la inducción de la expresión de genes, incluyendo el reclutamiento de factores de transcripción, remodeladores de cromatina y la Pol II a los promotores de los genes diana (de Nadal y Posas, 2010). Hog1 regula la actividad de diferentes factores de transcripción (Hot1, Smp1,

Msn1, Msn2 y Msn4, y también del represor Sko1), cada uno de ellos responsable del control de la expresión de un grupo de genes, directamente o en colaboración con otros factores. El mecanismo mejor comprendido por el que las MAPK modulan el inicio de la transcripción en respuesta a estrés es la fosforilación directa de factores de transcripción específicos (Figura 11A). Esta fosforilación puede darse como requisito previo para la unión del factor de transcripción al DNA o puede producirse sobre un factor de transcripción que se encuentre ya unido a los promotores. Esta última situación, permitiría obviar la necesidad de la unión tras el estrés, manteniendo un estado de pre-activación. Por ejemplo, el factor de transcripción Hsf1 se encuentra constitutivamente unido a ciertos promotores de genes relacionados con estrés térmico, preparándolos para una rápida inducción (Gross *et al.*, 1990; Sorger y Pelham, 1987). En condiciones de estrés osmótico, la MAPK Hog1 interacciona y fosforila al activador Smp1 y al represor Sko1, siendo esta activación fundamental para sus funciones (Proft *et al.*, 2001; de Nadal *et al.*, 2003). El caso de Sko1 es más complejo, ya que en condiciones normales actúa como represor mediante la unión del complejo co-represor Ssn6 (Cyc8)-Tup1 a los promotores diana (García-Gimeno y Struhl, 2000; Pascual-Ahuir *et al.*, 2001). La fosforilación de Sko1 por Hog1 lo convierte en activador, modificando su asociación con el complejo Ssn6-Tup1 y permitiendo el reclutamiento de complejos modificadores de histonas y remodeladores de cromatina (Proft y Struhl, 2002). Este mecanismo que mantiene los genes de respuesta a estrés en un estado reprimido, permite también, “enchufar” y “desenchufar” rápida y eficazmente la expresión de un determinado grupo de genes. El efecto de Hog1 sobre los factores de transcripción no se limita únicamente a su activación por fosforilación. Hog1 interacciona con los factores de transcripción Msn2/4 y Hot1, permitiendo la unión de la MAPK a los promotores (Alepez *et al.*, 2001) (Figura 11B). La expresión de los genes regulados por estos factores es independiente de su fosforilación por la MAPK Hog1 (Alepez *et al.*, 2003), aunque Hog1 requiere de su actividad catalítica para unirse a los promotores. Este hecho indica que la actividad catalítica de Hog1 “*per se*” y la presencia pero no la fosforilación de Msn2/4 y Hot1 es un requisito fundamental para el reclutamiento de la Pol II y por tanto, para el inicio de la transcripción. Asimismo, Hog1 es importante para el reclutamiento de complejos modificadores de cromatina como SAGA y SWI/SNF (Proft y Struhl, 2002), que permiten a su vez el proceso de transcripción. Adicionalmente, en condiciones de estrés osmótico, Hog1 recluta la deacetilasa Rpd3 a los promotores (Figura 11C), donde lleva a cabo la deacetilación de histonas, permitiendo la entrada de la Pol II y la inducción de la expresión génica (de Nadal *et al.*, 2004). Aunque la deacetilación de histonas ha sido clásicamente relacionada con la represión génica (Robyr *et al.*, 2002), existen más ejemplos en los que una disminución en la acetilación de

histonas también se encuentra asociada con la inducción de la transcripción (Bernstein *et al.*, 2000; Shahbazian y Grunstein, 2007).



**FIGURA 11: Las proteínas quinazas activadas por estrés (SAPKs) regulan la iniciación de la transcripción génica a través de diferentes mecanismos. (A)** Fosforilación directa de factores de transcripción específicos de promotor. **(B)** Estimulación del reclutamiento de la RNA Pol II y coactivadores al promotor. **(C)** Reclutamiento de la histona deacetilasa Rpd3 y otras actividades modificadoras de la cromatina. Figura adaptada de Nadal y Posas (2010).

A diferencia de la MAPK Hog1, que requiere de su actividad proteína quinasa para llevar a cabo todos los mecanismos descritos anteriormente, se ha descrito para Slt2 y su parálogo Mlp1 un mecanismo no catalítico para activar la transcripción de un reducido número de genes de la respuesta de integridad celular dependientes del complejo SBF (Kim y Levin, 2010; Kim *et al.*, 2008; Truman *et al.*, 2009) (comentado en detalle en el apartado 1.2.4.). Sin embargo, el mecanismo que regula la respuesta transcripcional mayoritariamente a través de la ruta CWI y mediada por Rlm1, permanece desconocido.

El papel de la cromatina y su estado represivo hacen que los complejos modificadores de cromatina sean críticos en el desarrollo de respuestas eficientes en situaciones de estrés. Si un factor de transcripción se une débilmente al promotor de un gen o su sitio de unión se ve ocupado por un nucleosoma, la actividad remodeladora de estos complejos podría ayudar a su función. Por el contrario, para activadores que se unan fuertemente a su sitio, el reclutamiento de complejos remodeladores sería necesario en pasos posteriores, como la unión de otros factores de transcripción o de la TBP, la estabilización de la interacción con la polimerasa o la progresión de la Pol II durante la elongación. Por ejemplo, en situaciones de estrés osmótico, el complejo RSC es dirigido por Hog1 a las regiones codificantes de los genes de respuesta a estrés, donde produce el desplazamiento de nucleosomas. Este proceso es fundamental para la progresión de la Pol II y por tanto, para la expresión génica (Mas *et al.*, 2009). En situaciones de estrés, el reclutamiento paralelo de diferentes complejos modificadores de cromatina que actúen conjuntamente en la activación transcripcional, puede dar lugar a respuestas más rápidas. En estrés osmótico, tanto el complejo SWI/SNF como el SAGA son necesarios para superar la represión por Tup1 y ambos reclutamientos parecen ser paralelos y dependientes de los

mismos factores, Hog1 y Tup1 (Proft y Struhl, 2002). Actividades paralelas de estos mismos coactivadores se han observado también en genes como *SUC2*, reprimidos por glucosa (Geng y Laurent, 2004).

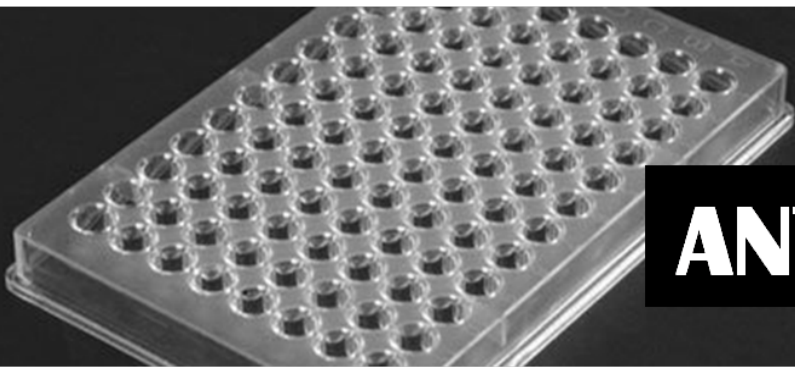
La arquitectura de los promotores de los genes de respuesta a estrés también juega un papel vital en la unión de los factores de transcripción y en la regulación del inicio de la transcripción. La respuesta a estrés térmico, es un claro ejemplo de cómo genes pertenecientes a la misma respuesta: *HSP12*, *HSP82* y *SSA4*, se encuentran regulados de forma diferente, en función de la estructura de su promotor (Erkina *et al.*, 2008; Erkina *et al.*, 2010). Estos tres promotores se encuentran regulados por el factor de transcripción Hsf1 (*Heat Shock Factor*) que reconoce y se une a secuencias HSE (*Heat Shock Elements*) dentro del promotor. Sin embargo, diferencias en estas secuencias establecen que los genes *HSP82* y *SSA4* se encuentren asociados constitutivamente con el activador Hsf1, mientras que el promotor de *HSP12* sólo se encuentre unido al factor Hsf1 en condiciones de estrés. Esta situación establece que la participación de diferentes complejos remodeladores de cromatina sea diferente y que el mecanismo de regulación transcripcional no sea común para genes que responden a las mismas condiciones (Erkina *et al.*, 2008; Erkina y Erkinen, 2006; Erkina *et al.*, 2010).

En resumen, las interacciones entre las MAPKs, factores de transcripción, complejos modificadores de histonas, remodeladores de cromatina y la enzima Pol II pueden variar en los diferentes tipos de estrés e incluso dentro de una misma respuesta, pueden funcionar de forma distinta para cada promotor.





*2*



**ANTECEDENTES**



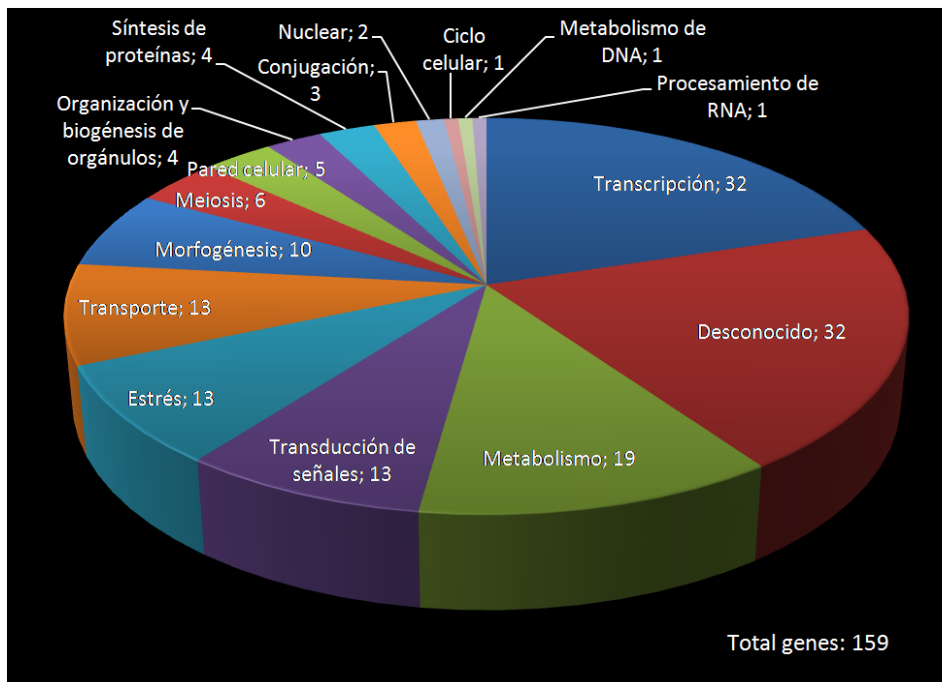
La adaptación de la levadura a situaciones de estrés sobre la pared celular está regulada principalmente a través de la ruta CWI. La activación de esta ruta produce un cambio importante en el programa transcripcional de la célula. Mediante el empleo de *microarrays* de DNA, nuestro laboratorio y otros grupos han realizado análisis de expresión a escala genómica del transcriptoma de la levadura bajo diferentes condiciones de estrés sobre la pared celular. Estos estudios revelan la activación transcripcional de diferentes genes implicados principalmente en el remodelado de la pared celular, metabolismo, estrés y transducción de señales (Agarwal *et al.*, 2003; Boorsma *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009; García *et al.*, 2004; Lagorce *et al.*, 2003). Esta respuesta depende casi en su totalidad tanto de la presencia de la MAPK Slt2, como del factor de transcripción Rlm1 (García *et al.*, 2004). Asimismo, los sensores, Wsc1 y Mid2, median la mayoría de las respuestas mediadas por la ruta CWI (Bermejo *et al.*, 2010).

El análisis comparativo de los perfiles de expresión en respuesta a diferentes daños ha permitido identificar un grupo de genes que se induce en la mayoría de las situaciones que conducen a alteraciones en la pared celular (García *et al.*, 2004). Dentro de este grupo se encuentra el gen *YKL161C/MLP1*, que muestra altos niveles de activación en la mayoría de las situaciones de estrés estudiadas hasta el momento, y bajos niveles de expresión en condiciones normales de crecimiento (Rodríguez-Peña *et al.*, 2008). Por este motivo, *MLP1* se ha utilizado como gen "modelo" de la respuesta transcripcional estudiada para la realización de la mayoría del trabajo aquí presentado.

Previamente a este trabajo, en nuestro laboratorio se desarrolló el plásmido pJS05, un sistema reportero que presenta una fusión transcripcional del promotor del gen *MLP1* al gen de resistencia al antibiótico nourseotricina (*NAT1*) (Rodríguez-Peña *et al.*, 2008). Las células transformadas con este plásmido presentan en condiciones de estrés sobre la pared celular, un aumento de la resistencia a nourseotricina, respecto a las células no tratadas como consecuencia del aumento de la expresión de *MLP1*. Utilizando como herramienta el plásmido pJS05 se llevó a cabo un rastreo genómico dirigido a la identificación de nuevos genes implicados en la regulación de la respuesta transcripcional de adaptación a daños sobre la pared celular. La base de este estudio consistió en la identificación de mutantes de levadura en los que la transcripción de *MLP1*, como consecuencia del tratamiento con 1 U/ml de zimoliasa, se encontrara bloqueada. La zimoliasa conduce a la inducción de este gen y por consiguiente se induce la expresión de *NAT1*, permitiendo el crecimiento de la cepa silvestre en presencia de 200 µg/ml de nourseotricina, mientras que en los mutantes en genes necesarios para la inducción de *MLP1* no se induce la expresión del gen *NAT1*, y por tanto, no sobreviven en estas

condiciones. Para la realización del *screening* se transformó con el plásmido pJS05 la colección completa de cepas haploides delecionadas individualmente en cada uno de los ORFs no esenciales de *S. cerevisiae* en el fondo genético BY4741 (proporcionada por Euroscarf). Para ello se siguió un protocolo de transformación en placa multipocillo (Gietz y Woods, 2002) usando como medio de cultivo de selección SC-URA. Estos transformantes se transfirieron a medio YPD suplementado con 200  $\mu\text{g/ml}$  de nourseotricina y 1 U/ml de zimoliasa. Las placas se incubaron a 28°C durante 72 y 96 horas y el crecimiento en cada pocillo se determinó midiendo la absorbancia a 550 nm. Así se seleccionaron 347 mutantes cuyo crecimiento estaba inhibido con respecto a la cepa silvestre. Estos mutantes se transformaron individualmente con la construcción *MLP1-LacZ*, midiéndose la inducción de *MLP1* en ausencia y presencia de estrés. De los 347 mutantes seleccionados, 159 fueron confirmados como positivos.

La clasificación funcional de estos 159 genes, siguiendo las anotaciones disponibles en las bases de datos *SGD* (<http://www.yeastgenome.org>) y *Proteome* (<https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>) se incluye en la figura 12. Los grupos funcionales mayoritarios identificados corresponden a funciones relacionadas con transcripción y genes de función desconocida, siendo también numerosos los genes pertenecientes a los grupos de metabolismo, transducción de señales, estrés y transporte.



**FIGURA 12:** Clasificación funcional de los genes identificados en el *screening* de activación transcripcional de *MLP1* en respuesta a zimoliasa.





3



**OBJETIVOS**



El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio de los mecanismos implicados en el control de la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* en situaciones de estrés que comprometen la integridad de su pared celular. Esta aproximación global se concreta en varios objetivos parciales:

1. La caracterización a nivel molecular de la regulación de la expresión génica mediada por la MAPK Sit2 y el factor de transcripción Rlm1.
2. Investigar la participación del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF en dicha respuesta transcripcional:
  - 2a. Análisis de la expresión génica en respuesta a estrés en los mutantes del complejo.
  - 2b. Estudio del papel del complejo en el reclutamiento de Rlm1 y la maquinaria transcripcional a los genes regulados por la ruta de integridad celular.
  - 2c. Caracterización del papel del complejo en el desplazamiento de nucleosomas y en la remodelación de la cromatina en situaciones de estrés.





4

# MATERIALES Y MÉTODOS



# 1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

## 1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura utilizadas en este trabajo se detallan a continuación en la Tabla 3.

**TABLA 3:** Relación de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo, genotipo y procedencia.

Cepa	Genotipo	Procedencia
<b>BY4741</b>	Mat a; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i>	Euroscarf, Alemania (Y00000)
<b><i>swi3Δ</i></b>	BY4741 <i>swi3::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y01250)
<b><i>snf2Δ</i></b>	BY4741 <i>snf2::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y01586)
<b><i>snf5Δ</i></b>	BY4741 <i>snf5::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y07175)
<b><i>snf6Δ</i></b>	BY4741 <i>snf6::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y06409)
<b><i>taf14Δ</i></b>	BY4741 <i>taf14::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y02123)
<b><i>swp82Δ</i></b>	BY4741 <i>swp82::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y05670)
<b><i>snf11Δ</i></b>	BY4741 <i>snf11::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y04008)
<b><i>rtt102Δ</i></b>	BY4741 <i>rtt102::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y05927)
<b><i>swi1Δ</i></b>	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>swi1::KanMX4</i>	Este trabajo
<b><i>snf12Δ</i></b>	<i>MATa</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lysΔ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>snf12::KanMX4</i>	Este trabajo
<b><i>rlm1Δ</i></b>	BY4741 <i>rlm1::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y02739)
<b><i>slt2Δ</i></b>	BY4741 <i>slt2::KanMX4</i>	Euroscarf, Alemania (Y00993)
<b><i>swi1Δ</i></b>	BY4743; Mat a/α; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>YPL016W::KanMX4/YPL016W</i>	Euroscarf, Alemania (Y22812)
<b><i>snf12Δ</i></b>	BY4743; Mat a/α; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; <i>MET15/met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; <i>YNR023W::KanMX4/YNR023W</i>	Euroscarf, Alemania (Y25398)
<b>WT-RLM1-HA</b>	BY4741; <i>RLM1-3xHA::LEU2</i>	Este trabajo
<b><i>slt2Δ-RLM1-HA</i></b>	<i>slt2Δ</i> ; <i>RLM1-3xHA::LEU2</i>	Este trabajo
<b><i>snf2Δ-RLM1-HA</i></b>	<i>snf2Δ</i> ; <i>RLM1-3xHA::LEU2</i>	Este trabajo
<b><i>swi3Δ-RLM1-HA</i></b>	<i>swi3Δ</i> ; <i>RLM1-3xHA::LEU2</i>	Este trabajo
<b>WT-SLT2-HA</b>	BY4741 <i>SLT2-3xHA::HIS3</i>	Este trabajo
<b><i>rlm1Δ-SLT2-HA</i></b>	<i>rlm1Δ</i> ; <i>SLT2-3xHA::HIS3</i>	Este trabajo
<b><i>swi3Δ-SLT2-HA</i></b>	<i>swi3Δ</i> ; <i>SLT2-3xHA::HIS3</i>	Este trabajo
<b>CY1552</b>	BY4741; <i>SWI2-TAP</i> (fusión del epítipo C-terminal)	C. L. Peterson, UMMAS (Worcester, USA)
<b><i>snf2Δ rlm1Δ</i></b>	BY4741 <i>snf2::KanMX4 rlm1::HIS3</i>	Nuestro laboratorio
<b>SFY526</b>	<i>MATa</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>ura3-52</i> , <i>ura3::GAL1-lacZ</i> , <i>ade2-101</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>his3-200</i> , <i>trp1-905</i> , <i>lys2-801</i> , <i>can<sup>R</sup></i>	Clontech
<b><i>rlm1Δ</i> (SFY526)</b>	SFY526 <i>rlm1::HIS3</i>	Este trabajo

## 1.2. *Escherichia coli*

Para llevar a cabo la amplificación de los plásmidos empleados en este trabajo se ha utilizado la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  (*SupE44* $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Hanahan, 1983). En los experimentos de sobreexpresión de proteínas se empleó la cepa de *E. coli* Rosetta ( $F^-$  *ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm pRARE* (Cam<sup>R</sup>)) derivada de la cepa BL21.

## 2. CONDICIONES DE CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

Las células de levadura se crecieron a 24°C en agitación a 200 rpm para incubaciones en medio líquido y a 30°C en estático para incubaciones en medio sólido. Los medios de cultivo empleados fueron: medio rico YPD (20 g/l glucosa, 20 g/l peptona y 10 g/l extracto de levadura) o medio sintético completo SC (1,7 g/l base nitrogenada para levaduras, 5 g/l sulfato amónico, 20 g/l glucosa y 2 g/l de la mezcla completa de aminoácidos excepto el aminoácido o base nitrogenada utilizada como marcador de selección [ver concentración final aproximada de cada componente en la Tabla 4]).

**TABLA 4:** Cantidades de aminoácidos o bases nitrogenadas incluidas en el en el medio de cultivo SC para el crecimiento de *S. cerevisiae*.

Aminoácido o base	g/l	Aminoácido o base	g/l	Aminoácido o base	g/l	Aminoácido o base	g/l
Adenina	0,5	Glutamina	2	Leucina	10	Serina	2
Alanina	2	Ácido Glutámico	2	Lisina	2	Treonina	2
Arginina	2	Glicina	2	Metionina	2	Triptófano	2
Asparagina	2	Histidina	2	Ácido p-aminobenzoico	2	Tirosina	2
Acido Aspártico	2	Inositol	2	Fenilalanina	2	Uracilo	2
Cisteína	2	Isoleucina	2	Prolina	2	Valina	2

Para el crecimiento de células bacterianas se utilizó el medio LB (*Luria-Bertani*) cuya composición es: 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 5-10 g/l de cloruro sódico. Las cepas resistentes a ampicilina se cultivaron en este medio suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (Britapen, G.S.K.). Las células bacterianas fueron crecidas a 37°C y en agitación a 200 rpm, para incubaciones en medio líquido.

Para la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua desionizada purificada mediante el sistema Millipore (Mili-Ro). Para la obtención de medios sólidos, se utilizó una concentración final de agar de 20 g/l. La esterilización de dichos medios se realizó por autoclavado a una temperatura de 120°C y 1 atm de presión durante 20 min.

## **2.1. Determinación del crecimiento**

El crecimiento de los cultivos de *S. cerevisiae* y *E. coli* se realizó por turbidimetría, mediante lectura de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640.

## **2.2. Cultivo y recogida de células de levadura**

En la mayoría de las aproximaciones experimentales realizadas se procedió inoculando el medio de cultivo líquido apropiado (YPD o SC si las cepas se encontraban transformadas con plásmidos) con la cepa o cepas a estudiar, creciéndolas en agitación a 24°C durante toda la noche, de tal manera que al día siguiente la D.O.<sub>600</sub> del cultivo no superara el valor de 1,5. Al día siguiente, los cultivos se refrescaron a una D.O.<sub>600</sub> de 0,2 en medio YPD y se incubaron durante aproximadamente 2-3 h más a 24°C. De esta manera el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, ideal para la mayoría de las aproximaciones que se han llevado a cabo en este trabajo. Posteriormente, el cultivo se dividió en dos partes iguales, añadiendo a uno de ellos la droga o tratamiento a ensayar, mientras que el otro actuaba como cultivo control sin tratamiento, siendo ese momento el tiempo cero del experimento. Los cultivos se incubaron seguidamente durante el tiempo indicado para cada experimento, transcurrido el cual las células eran recogidas mediante centrifugación.

Las drogas utilizadas en este trabajo para la activación de la ruta de integridad celular en la levadura *S. cerevisiae* fueron las siguientes:

**Rojo Congo (Kongorot MERCK):** Interfiere con la correcta construcción de la pared celular a través de su unión a quitina. Se ha utilizado a una concentración final de 30 µg/ml para todos los estudios realizados en medio líquido. La droga se añade al medio de cultivo una vez disuelta en agua estéril en el momento de su uso.

**Zimoliasa 100T (ImmunO™, MP BIOMEDICALS, Inc.):** mezcla de enzimas hidrolíticas procedente del cultivo del microorganismo *Arthrobacter luteus* que está constituida principalmente por actividad β-1,3-glucanasa y proteasa y que digiere la pared celular de levaduras. Este preparado contiene 100.000 unidades enzimáticas por gramo. La zimoliasa

100T se disolvió según indicaciones de la casa comercial en una solución 0,5 M de Tris-HCl pH 7,5 y glucosa al 5% (previamente esterilizada por filtración). Se ha utilizado a una concentración final de 0.4 U/ml para todos los estudios realizados en medio líquido.

### 3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados y generados en este trabajo se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 5:** Relación de plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Características relevantes	Procedencia
<i>MLP1</i> -LacZ	Vector episómico YEp352 con la fusión transcripcional del promotor de <i>MLP1</i> (-1000,-1) al gen <i>lacZ</i> (URA3).	García <i>et al.</i> (2009)
<i>MLP1</i> -LacZ-HIS3	Vector episómico YEp352 con la fusión transcripcional del promotor de <i>MLP1</i> (-1000,-1) al gen <i>lacZ</i> (HIS3) (1).	Este trabajo
<i>SED1</i> -LacZ	Vector episómico YEp352 con la fusión transcripcional del promotor de <i>SED1</i> (-999,-1) al gen <i>lacZ</i> (URA3).	García <i>et al.</i> (2009)
<i>CWP1</i> -LacZ	Vector episómico YEp352 con la fusión transcripcional del promotor de <i>CWP1</i> (-978,-5) al gen <i>lacZ</i> (URA3).	García <i>et al.</i> (2009)
<i>AFR1</i> -LacZ	Vector episómico YEp352 con la fusión transcripcional del promotor de <i>AFR1</i> (-842,+8) al gen <i>lacZ</i> (URA3).	García <i>et al.</i> (2009)
<i>CRH1</i> -LacZ	Vector episómico YEp352 con la fusión transcripcional del promotor de <i>CRH1</i> al gen <i>lacZ</i> (URA3).	Bermejo <i>et al.</i> (2008)
p704 (pLG669-Z)	Contiene el promotor del gen <i>CYC1</i> (1100 pb) fusionado a <i>lacZ</i> . La región UAS de este promotor puede ser eliminada por la deleción de la región flanqueada por los puntos <i>XhoI</i> (440 pb).	Guarente y Ptashne (1981)
P705	Plásmido p704 sin la región UAS- <i>CYC1</i> (2).	Este trabajo
p704-BOX1	Plásmido p705 en el que ha sido clonada por restricción con <i>XhoI</i> , la caja 1 de unión a Rlm1 del gen <i>MLP1</i> (3).	Este trabajo
p704-BOX2	Plásmido p705 en el que ha sido clonada por restricción con <i>XhoI</i> , la caja 2 de unión a Rlm1 del gen <i>MLP1</i> (4).	Este trabajo
pRS316	Vector centromérico, URA3, Amp <sup>r</sup> .	Sikorski y Hieter (1989)
pRS316[ <i>SLT2</i> ]	Gen <i>SLT2</i> clonado en el vector pRS316.	H. Martín, Dept. Microbiología II (UCM)
pRS316[ <i>slt2</i> (T54F)]	Versión de <i>SLT2</i> catalíticamente inactivo integrada en el vector pRS316.	H. Martín, Dept. Microbiología II (UCM)
pRS316[ <i>slt2</i> (T190AY192A)]	Versión de <i>SLT2</i> no fosforilable integrada en el vector pRS316.	H. Martín, Dept. Microbiología II (UCM)
pGBT9	Vector sistema de dos híbridos en levadura.	Clontech
pGBT9[ <i>SLT2</i> ]	Fusión <i>Slt2</i> (aminoácidos 1-484) al dominio de unión a DNA de Gal4 clonada en el vector pGBT9.	Soler <i>et al.</i> (1995)
pRS305- <i>RLM1</i> -3xHA	Plásmido pRS305-3xHA al que se ha introducido un inserto de 2 Kb perteneciente al ORF de <i>RLM1</i> mediante la clonación en <i>Sall/PstI</i> .	Nuestro laboratorio
YEp352	Vector episómico, URA3, Amp <sup>r</sup> .	Hill <i>et al.</i> (1986)

YEp352[ <i>RLM1</i> -HA]	Vector episómico YEp352 conteniendo el promotor y ORF de <i>RLM1</i> fusionado a 3 copias del epítipo HA (5).	Este trabajo
pGEX-KG	Vector de sobreexpresión bajo el control del promotor <i>tac</i> de la proteína Gst en bacteria.	Guan y Dixon (1991)
pGEX-KG- <i>RLM1</i>	Plásmido de sobreexpresión bajo el control del promotor <i>tac</i> de la proteína Gst fusionada a <i>RLM1</i> en el extremo N-terminal (6).	Este trabajo
pGEX-KG- <i>Rlm1</i> $\Delta$ N	Plásmido de sobreexpresión bajo el control del promotor <i>tac</i> de la proteína Gst fusionada a <i>RLM1</i> $\Delta$ N en el extremo N-terminal (7).	Este trabajo
pGEX-KG- <i>Rlm1</i> _222-526	Plásmido de sobreexpresión bajo el control del promotor <i>tac</i> de la proteína Gst fusionada a <i>RLM1</i> _222-526 en el extremo N-terminal (8).	Este trabajo
CP233	Contiene la fusión <i>SNF2</i> -HA-6xHIS insertada en YEp24 (vector episómico <i>URA3</i> , Amp <sup>r</sup> ).	Peterson <i>et al.</i> , 1994
YEp181[ <i>RLM1</i> -6xMyc]	El epítipo 6xMyc se clonó en fase al extremo C-terminal de <i>RLM1</i> en el plásmido YEp181 conteniendo el gen <i>RLM1</i> .	Nuestro laboratorio

(1) *MLP1*-LacZ-HIS3: se obtuvo un fragmento de 1,8 Kb pertenecientes al gen *HIS3* a partir de la restricción del plásmido p34H HIS (cedido por H. Martín) con la enzima *Sma*I. Dicho fragmento fue insertado en el plásmido *MLP1*-LacZ, previamente digerido con *Stu*I, en la región *URA3*.

(2) Plásmido P705: Procede del plásmido p704 en el que se ha eliminado la región UAS-*CYC1* y un punto *Sma*I por restricción con *Xho*I.

(3) Plásmido p704-BOX1: Plásmido p705 en el que ha sido clonada por restricción con *Xho*I, la caja 1 de unión a *Rlm1* del gen *MLP1*, flanqueada por las 5 pb correspondientes a la secuencia del promotor de *MLP1* que incluían un punto de restricción para *Xho*I. Este fragmento fue obtenido mediante la hibridación de los oligonucleótidos indicados a continuación:

Oligonucleótido MLP1-RLM 1.1: 5' @-TCGAGTTAAAAATAGTAACT 3'

Oligonucleótido MLP1-RLM 1.2: 5' @-TCGAAGTTACTATTTTAAAC 3'

Protocolo de hibridación: 1  $\mu$ l de cada oligo (100 pmoles) en 48  $\mu$ l de buffer de anillamiento (100 mM KAcO, 30 mM HEPES-KOH pH7,4 y 2mM Mg(AcO)<sub>2</sub>, fueron sometidos 4' a 95°C, 10' a 70°C y enfriamiento progresivo hasta alcanzar temperatura ambiente.

(4) Plásmido p704-BOX2: Plásmido p705 en el que ha sido clonada por restricción con *Xho*I la caja 2 de unión a *Rlm1* del gen *MLP1*, flanqueada por las 5 pb correspondientes a la secuencia del promotor de *MLP1* y un punto añadido de restricción para *Xho*I. Este fragmento fue obtenido por la hibridación de los oligonucleótidos indicados a continuación, siguiendo el protocolo descrito anteriormente:

Oligonucleótido MLP1-RLM 2.1: 5' @-TCGATAATTATAAAAAATAGAAATA 3'

Oligonucleótido MLP1-RLM 2.2: 5' @-TCGATATTTCTATTTTATAAATA 3'

(5) Plásmido YEp352[*RLM1*-HA]: se obtuvo un fragmento de 3,5 Kb pertenecientes al promotor más la región codificante completa de *RLM1*, obtenida mediante la restricción del plásmido YEp181-*RLM1* (Watanabe *et al.*, 1995) con las enzimas *Pst*I/*Kpn*I. Dicho fragmento se clonó en el plásmido

YEp352, previamente digerido con *Pst*I y *Kpn*I obteniendo el plásmido YEp352-RLM1. El epitopo 3xHA (obtenido del plásmido pRS305-3xHA) se clonó en fase en el extremo C-terminal de *RLM1* presente en el plásmido anterior.

(6) Plásmido pGEX-KG-RIm1: se obtuvo un inserto de 2 kb pertenecientes al ORF completo de *RLM1* obtenidos desde el plásmido pEG-KGH-RLM1 (cedido por J.M. Rodríguez-Peña), mediante la restricción con *Sma*I/*Sa*I. Dicho fragmento se clonó en el plásmido pGEX-KG, previamente digerido con *Sma*I y *Sa*I, quedando GST y *RLM1* en fase (fusión N-terminal).

(7) Plásmido pGEX-KG-RIm1ΔN: se amplificó por PCR el fragmento correspondiente a las posiciones 664-2031 pb del ORF de *RLM1* utilizando la enzima DNA polimerasa *Phusion High-fidelity* (New England BioLabs), incorporando los puntos de corte *Sma*I/*Sa*I. Dicho fragmento se clonó en el plásmido pGEX-KG, previamente digerido con *Sma*I y *Sa*I. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del inserto fueron:

Oligonucleótido GST-RIm1ΔN: 5' AAACCCGGAATGTACAATCTTAACCAGCC 3'

Oligonucleótido GST-RIm1-676: 5' CCCGTCGACTTATATTTTGCTTGAATTTT 3'

(8) Plásmido pGEX-KG-RIm1\_222-526: se amplificó por PCR el fragmento correspondiente a las posiciones 664-1592 pb del ORF de *RLM1* utilizando la enzima DNA polimerasa *Phusion High-fidelity* (New England BioLabs), incorporando los puntos de corte *Sma*I/*Sa*I. Dicho fragmento se clonó en el plásmido pGEX-KG, previamente digerido con *Sma*I y *Sa*I. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del inserto fueron:

Oligonucleótido GST-RIm1ΔN: 5' AAACCCGGAATGTACAATCTTAACCAGCC 3'

Oligonucleótido GST-RIm1-526-end: 5'GGTGTGCGACTTACATCGATATAGAAGAAACATTTGGAG3'

#### 4. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las técnicas básicas de biología molecular como la digestión con enzimas de restricción, desfosforilación del extremo 5' del DNA, amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc., se realizaron siguiendo los protocolos convencionales de laboratorio descritos en Ausubel *et al.* (1993) y Sambrook *et al.* (1989). Para la extracción y purificación de DNA plasmídico se utilizaron sistemas comerciales de la casa Roche, "High Pure Plasmid Isolation Kit". Las enzimas de restricción empleadas, la DNA ligasa y la DNA fosfatasa (CIAP), han sido suministradas por la casa comercial Roche diagnostics. La visualización de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8-1,5%), preparados en tampón TAE (Tris/Acético/EDTA) (0,004 M Tris Acetato pH 7,5 y 0,001 M EDTA pH 8), tras la adición de bromuro de etidio al gel de agarosa a una

concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , utilizando un transiluminador de luz UV. Para la elución de fragmentos de DNA en los geles de agarosa, se empleó el kit comercial “*Gene Clean Turbo Kit*” (MP Biomedicals). La secuenciación de DNA se realizó en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid/UCM, utilizando el secuenciador automático multicapilar ABI Prism 3730 de la casa comercial Applied Biosystems y cebadores “universales” o específicos, según necesidad.

#### **4.1. Transformación de bacterias**

La transformación de *E.coli* se realizó según el método de Hanahan (1983). Para ello, se utilizaron 100  $\mu\text{l}$  de células competentes de las correspondientes cepas de *E. coli*, a las que se añadió 5-10  $\mu\text{l}$  de cada ligación ó 1-2  $\mu\text{l}$  de DNA plasmídico con una concentración apropiada de DNA. Se incubaron 30 minutos en hielo, seguido de un choque térmico a 42°C de 2 minutos. Tras dejar la mezcla un minuto en hielo, se añadieron 4 volúmenes de medio LB líquido y se incubaron durante una hora a 37°C. La mezcla de transformación se plaqueó en medio sólido LB suplementado con ampicilina, incubando las placas durante 24 horas a 37°C.

#### **4.2. Transformación de levaduras**

La transformación de levadura con DNA plasmídico se realizó siguiendo el método del acetato de litio descrito por Ito *et al.* (1983). Para ello, se partieron de 10 ml de cultivo en fase exponencial crecido en medio YPD o SC. Las células se recogieron en esterilidad por centrifugación, y se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de una mezcla 1:5 de acetato de litio 1 N y PEG 40%. A continuación, se añadieron a la suspensión 50  $\mu\text{g}$  de ssDNA de esperma de salmón (hervido previamente) y 0,1-0,5  $\mu\text{g}$  del DNA a transformar en el menor volumen posible. La mezcla se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se sometió a un choque térmico a 42°C durante 20 minutos. Finalmente, las células se plaquearon en medio selectivo y se incubaron a 30°C durante 48-72 horas.

### **5. GENERACIÓN DE CEPAS ETIQUETADAS CON EL EPÍTOPO HA**

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se realizaron en algunos casos empleando cepas que llevaban integrada en su genoma la fusión transcripcional de

la proteína en estudio al epítipo HA, que corresponde a los residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana.

Las cepas epitopadas *WT-RLM1-HA*, *slt2Δ-RLM1-HA*, *snf2Δ-RLM1-HA* y *swi3Δ-RLM1-HA* se obtuvieron por integración de la fusión *RLM1-3xHA* por recombinación homóloga en el *locus RLM1*. Con este fin se amplificó por PCR la región codificante de *RLM1* y se clonó en el vector integrativo *LEU2* pRS305 que contiene el epítipo 3xHA. La integración de la versión epitopada con 3xHA en el *locus* de *RLM1* se realizó transformado con el plásmido previamente obtenido (pRS305-*RLM1-3xHA*) linearizado con *HindIII* y utilizando como medio de selección SC-Leu. La integración fue confirmada con una estrategia basada en PCR.

Para la generación de las cepas *WT-SLT2-HA*, *rlm1Δ-SLT2-HA* y *swi3Δ-SLT2-HA* se empleó el plásmido pFA6a-3HA-His3MX6 (descrito en Longtine *et al.*, 1998). Para la amplificación del fragmento que incluye 3xHA-His3 se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos descritos en la misma publicación que incluyen la región específica de gen *SLT2*: R1 (gene-specific sequence- GAATTCGAGCTCGTTTAAAC) y F2 (gene-specific sequence- CGGATCCCCGGGTTAATTA). El fragmento amplificado se integró en el genoma por recombinación homóloga en el *locus SLT2*, mediante la transformación de las respectivas cepas, seleccionándolas en medio mínimo carente de histidina.

## **6. DISECCIÓN DE ASCAS DE LEVADURA PARA LA OBTENCIÓN DE CEPAS HAPLOIDES**

### **6.1. Condiciones de esporulación**

Para inducir la esporulación, las estirpes diploides de *S. cerevisiae* crecidas 24-48 h en medio YPD, se transfirieron en masa a medio de pre-esporulación sólido (8 g/l extracto de levadura, 3 g/l peptona, 100 g/l glucosa y 20 g/l agar) durante dos días. A continuación, se transfirieron a placas de medio de esporulación (1 g/l extracto de levadura, 10 g/l acetato potásico, 0,5 g/l glucosa y 20 g/l agar), incubándose a 30°C durante tres días. Transcurrido ese tiempo se llevó a cabo la disección de tétradas.

### **6.2. Disección de ascas y micromanipulación de esporas**

Una vez que las cepas en estudio habían esporulado, se resuspendió una masa de células en 200 µl de una dilución 1/20 (v/v) de NEE-154 gluculasa (DuPont Company,

Wilmington USA) en agua estéril y se incubaron a 37°C durante 8 minutos para permitir la rotura de la envuelta del asca. La reacción se detuvo con 800 µl de agua fría. Se hicieron tres estrías de esta suspensión en una placa de YPD (de bajo espesor y completamente lisa) y se procedió a la micromanipulación (Micromanipulador de Singer Instruments). La placa conteniendo las esporas separadas se incubó a 30°C durante tres días con el fin de inducir el proceso de germinación.

### **6.3. Caracterización de las cepas haploides obtenidas**

Las colonias credidas en el lugar de depósito de cada espora se re-sembraron en una placa individual de YPD suplementado con 200 mg/l de geneticina (Gibco). Se utilizó este medio puesto que el objetivo era conseguir mutantes haploides que presentaban el gen de interés sustituido por una casete de resistencia a kanamicina, partiendo de los correspondientes diploides heterocigóticos. Para determinar el tipo sexual se hicieron experimentos de apareamiento, enfrentando los haploides obtenidos a cepas silvestres de tipo sexual *a* y de tipo sexual *α*, por separado, en placas YPD. Por otro lado, se sembraron los haploides en estudio en placas de medio sintético completo carentes de metionina, lisina, uracilo o histidina, para determinar sus auxotrofías, tomando como referente el fondo genético utilizado (BY4741).

### **6.4. Verificación de las deleciones génicas mediante PCR**

Todo el procedimiento anteriormente descrito se llevó a cabo para obtener mutantes haploides *swi1Δ* y *snf12Δ*, ya que solamente se disponía de los correspondientes mutantes diploides heterocigóticos. Con el fin de comprobar las deleciones en *SNF12* y *SWI1* y la presencia en su lugar del marcador de resistencia a kanamicina, se utilizó el método de PCR desde colonia, suspendiendo una colonia del mutante en estudio en la siguiente mezcla de reacción: 9 µl del Buffer Expand 10x, 8 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 20 µl de dNTPs 6,25 mM, 5 µl de cada oligonucleótido 100 µM, y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 90 µl. La reacción se incubó 10 minutos a 97°C y a continuación se adicionó: 1 µl de buffer Expand 10x, 1 µl de la enzima DNA polimerasa *Expand high fidelity* (Roche) (3,5 U/µl) y 8 µl de H<sub>2</sub>O. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un primer ciclo de 2' a 97°C, 30 ciclos de la secuencia 30" a 94 °C, 30" a 53°C y 1' 30" a 72 °C y una extensión final de 4' a 72°C.

El resultado de cada PCR se analizó mediante visualización del producto generado en un gel de agarosa al 0,8%, comprobando el tamaño de la banda amplificada con

respecto al esperado. Se realizaron para verificar cada mutante dos PCRs independientes para confirmar tanto la región 5' como 3' de cada *locus* genómico.

Los oligonucleótidos utilizados se diseñaron sobre el promotor y terminador del gen, a unas 500 pb de distancia del inicio del ORF y del codón de terminación, denominándose gen-K2 y gen-K3, respectivamente. Los oligonucleótidos denominados K2 y K3 anillan en la región codificante del gen de resistencia a kanamicina.

SNF12-K2: 5' CATGGCGTTTAGAGAGCTGTTG 3'

SNF12-K3: 5' CGTTGGAGATTATGAGATTGGG 3'

SWI1-K2: 5' GAACGCTGATTGACTTTACG 3'

SWI1-K3: 5' GATCTTGACTTTGTGGGCAG 3'

K2: 5' CCGTGCGGCCATCAAATG 3'

K3: 5' GCCCAGATGCGAAGTTAAG 3'

## **7. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS**

La sensibilidad/resistencia de las cepas empleadas en este trabajo a diferentes tratamientos se ensayó utilizando cultivos en fase de crecimiento exponencial, empleando dos métodos diferentes. En ambos casos, las células de las cepas a estudiar se crecieron en medio líquido YPD, a 24°C y en agitación durante toda la noche de tal manera que al día siguiente la D.O. del cultivo no superara el valor de 1,5.

### **7.1. Método de siembra por dilución en gota**

Esta técnica se empleó para testar la sensibilidad de *S. cerevisiae* a Rojo Congo (RC). Se preparó una primera dilución del cultivo en medio líquido YPD, de forma que su D.O. fuera de 0,2 (aproximadamente  $3 \times 10^3$  células/ $\mu$ l) y se hicieron 4 diluciones seriadas adicionales 1:5 en un volumen de 160  $\mu$ l de YPD utilizando placas estériles de 96 pocillos. Posteriormente, se sembraron con un replicador (Multi-blot replicator VP407, V&P Scientific, INC.) 5  $\mu$ l de cada una de las diluciones preparadas, en placas con medio sólido YPD suplementado con Rojo Congo (Merk, Darmstadt, Alemania) a concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 150  $\mu$ g/ml. Se incubaron a 30°C durante 48 -72 horas.

## **7.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido**

Este método se utilizó para la determinación de la sensibilidad de *S. cerevisiae* a zimoliasa (ZL). Se preparó una dilución del cultivo en medio líquido YPD a una D.O. de 0,009 ( $\sim 10^4$  células/75  $\mu$ l). En la primera columna de una placa estéril de 96 pocillos se dispensaron 150  $\mu$ l de YPD suplementado con 250 U/ml de zimoliasa 20T (MP Biomedicals, Inc., USA) y se hicieron 8 diluciones seriadas 1:2 en YPD en las siguientes columnas de la placa (donde se dispensaron previamente 75  $\mu$ l de YPD), transfiriendo 75  $\mu$ l de volumen desde el pocillo anterior, dejando la columna décima como control positivo de crecimiento sin droga incluyendo únicamente 75  $\mu$ l de YPD. Posteriormente, se añadieron 75  $\mu$ l de la suspensión celular indicada anteriormente en todos los pocillos. El rango de concentraciones de zimoliasa estudiado en un volumen final de 150  $\mu$ l, quedó por tanto delimitado entre 0 y 125 U/ml. Tras 24-48 horas de incubación a 30°C en estático, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Model 680 Microplate Reader; Bio-Rad) con el objetivo de determinar el grado de crecimiento en cada pocillo.

## **8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA**

Este tipo de determinación se utilizó para cuantificar los niveles de expresión de fusiones transcripcionales de diversas regiones promotoras de genes de interés, fusionadas al gen *lacZ* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Estas construcciones se han generado utilizando como base un plásmido multicopia (ver Tabla 5).

Las cepas en estudio, transformadas con el plásmido correspondiente, se crecieron y procesaron según se describe en el apartado 2.2. Se recogió un volumen de 5 ml por centrifugación a temperatura ambiente y se congelaron los "pellet" de células a -80°C. A cada "pellet" de células se añadieron 250  $\mu$ l de tampón de lisis (100 mM Tris-Cl, 1 mM DTT y 20% glicerol) y 5  $\mu$ l de PMSF 0,1 M. Seguidamente, se añadió 1/3 del volumen de bolitas de vidrio de 1 mm para romper las células en la Fast-prep FP120 (BIO101/Savant) aplicando dos pulsos a una fuerza de 5,5 durante 35 segundos. La cantidad de proteína del extracto celular total obtenido se midió mediante el método de Bradford.

El ensayo de  $\beta$ -galactosidasa se realizó en formato de placa multipocillo, tomando como base el método descrito por Amberg (2005). La mezcla de reacción se preparó en

90  $\mu$ l de tampón Z (16,1 g/l  $\text{Na}_2\text{PO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ , 5,5 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,75 g/l KCl y 0,246 g/l  $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ ) con  $\beta$ -mercaptoetanol (2,7 ml/l), a los que se añadieron después 5-10  $\mu$ l del extracto proteico en tampón de lisis. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ l de ONPG (orto-nitro-fenil-galacto-piranósido (Sigma) 4 mg/ml. La placa así preparada se incubó a 30°C durante 10 minutos, tras los cuales se paró la reacción mediante la adición de 50  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. El ONPG es un sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa que lo convierte en galactosa y orto-nitrofenol, siendo este último compuesto de color amarillo, medible espectrofotométricamente a una longitud de onda de 415 nm. La lectura se realizó en un lector de placas (Microplate Reader Model 680, BioRad) a 415 nm. El resultado se expresó calculando la actividad específica  $\beta$ -galactosidasa, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{D.O.}_{415} \times 0,17}{0,0045 \times \text{proteína (mg/ml)} \times \text{volumen de extracto (ml)} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

## 9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR *WESTERN-BLOTTING*

### 9.1. Obtención de extractos y preparación de muestras

Las células se crecieron en medio líquido YPD y se llevó a cabo el tratamiento descrito en el apartado 2.2. Se recogieron diferentes volúmenes de cultivo en función de los tiempos de tratamiento en estudio con el objeto de conseguir un número suficiente de células ( $3 \times 10^8$  células), en tubos Falcon donde previamente se había añadido un volumen de hielo similar al de medio de cultivo recogido. Se centrifugaron a 4°C y 2600 rpm durante 4 minutos y, tras eliminar el sobrenadante, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Cada "pellet" de células se resuspendió en 250  $\mu$ l del tampón de lisis de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM  $\beta$ -glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico). Este tampón se suplementa en el momento de uso con inhibidores de proteasas (Complete Mini, EDTA-free, *Protease inhibitor cocktail tablets*, de la casa comercial Roche), que se usa a una concentración de un comprimido por cada 10 ml de tampón de lisis y, además, se añade PMSF a una concentración final de 1 mM. Las suspensiones celulares se transfirieron a tubos eppendorf y se añadieron bolitas de vidrio de 1 mm de diámetro (Glasperlen, Germany) hasta la mitad del volumen de la suspensión. Las células se rompieron por agitación en Fast-Prep, aplicando un pulso de 30 segundos a fuerza 5,5, centrifugando

inmediatamente a 13000 rpm durante 15 min a 4°C, para recuperar los sobrenadantes. La concentración aproximada de proteína total en los extractos, se calculó midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Una unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 1 mg/ml de proteína. A partir de cada extracto, se preparó un volumen de 40 µl ajustado con agua destilada, con una concentración de proteína total de 30 µg/µl. A continuación, se añadieron 10 µl de tampón de carga SDS-PAGE 2x (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 25% glicerol, 0,6 g de azul de bromofenol, al que se añade en el momento de uso DTT a una concentración final de 200 mM) ó la cantidad correspondiente de 5x (40 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% azul de bromofenol, 10% SDS, 33% glicerol y 20% de β-ME). Por último, las muestras se hirvieron durante 5 min para su desnaturalización.

## **9.2. Electroforesis de proteínas**

Para la separación electroforética de las proteínas de los extractos celulares se utilizó SDS-PAGE, usando geles de poliacrilamida a una concentración del 8-10%. La composición del gel separador al 10% fue: Acrilamida 30% (1,98 ml), Bis-acrilamida 2% (0,8 ml), Tris-HCl 1 M pH 8,8 (2,25 ml), H<sub>2</sub>O (0,87 ml), SDS 10% (60 µl), PSA (Persulfato amónico) 10% (30 µl) y TEMED (Tetrametiletilenediamina) (8 µl). La composición del gel concentrador es: Acrilamida 30% (0,325 ml), Bis-acrilamida 2% (0,135 ml), Tris-HCl 1 M pH 6,8 (0,25 ml), H<sub>2</sub>O (1,25 ml), SDS 10% (20 µl), PSA 10% (20 µl) y TEMED (2 µl).

La electroforesis se realizó en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad) a un voltaje entre 150-200 V. La composición del tampón de electroforesis fue de 196 mM glicina, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,3. El patrón de pesos moleculares utilizado fue *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). En cada pocillo se cargaron aproximadamente 240 µg de proteína total.

## **9.3. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa**

Las proteínas separadas durante la electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) de aproximadamente 5x8 cm. Se utilizaron cubetas de transferencia en húmedo *Mini Trans-Blot Transfer Cell* (Bio-Rad). La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 60 min. Para fabricar el tampón de transferencia se mezcló un volumen del tampón de transferencia concentrado 10X (58 g/l Tris-HCl, 29 g/l de glicina, 3,7 g/l de SDS) con dos volúmenes de metanol y siete volúmenes de agua destilada.

## 9.4. Inmunodetección

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada al 5% en TTBS (29,2 g/l de NaCl, 24,2 g/l de Tris pH 7,5 y 500 µl de Tween 20) entre 30 min y 1 hora. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario preparado, a la concentración adecuada, en una mezcla de TTBS-leche al 5% durante 90 min a temperatura ambiente u o/n a 4°C. A continuación, se llevaron a cabo al menos 3 lavados con TTBS de 5-15 min cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa, diluido en TTBS-leche al 5% durante 45 min-1 h. De nuevo se realizaron al menos 3 lavados con TTBS de la forma ya descrita.

Para el revelado de las membranas se utilizó el sistema de detección quimioluminiscente (ECL, Amersham-Biosciences) y películas Hyperfilm™ MP (Amersham-Biosciences). El revelado de las películas se realizó de forma manual. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen a continuación en la Tabla 6.

**TABLA 6:** Descripción de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Características	Procedencia
Anti-fosfo p42/44 MAPK (Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> )	Policlonal de conejo	Cell Signaling
Anti-actina	Clon C4; Monoclonal de ratón	ICN Biomedicals
Anti-HA	HA.11 clon 16B12; Monoclonal de ratón (MMS-101R)	Covance
Anti-HA	HA.11 clon 16B12; Monoclonal de ratón purificado (MMS-101P)	Covance
Anti-GST	Policlonal de conejo GST (Z-5) sc-459	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Myc	C-myc clon 9E10; Monoclonal de ratón purificado (MMS-150P)	Covance
Anti-Snf2	Policlonal de conejo	J. Reese (Pennsylvania State University, USA)
Anti-rabbit IgG-HRP	Policlonal de burro	Amersham Pharmacia Biotech
Anti-mouse IgG-HRP	Policlonal de oveja	Amersham Pharmacia Biotech

## 10. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE *MICROARRAYS* DE DNA

Los experimentos realizados en este trabajo con *microarrays* emplearon soportes de la marca Affimetrix GeneChip® Yeast Genome 2.0. Estos experimentos han sido

realizados en la Unidad de Genómica de la U.C.M. incluyendo el marcaje de los RNAs problema, hibridación de los *microarrays* y análisis básico de imágenes y resultados obtenidos. A continuación se detallan los aspectos metodológicos más relevantes de las fases clave de esta tecnología. En la figura 13 se incluye un esquema general del proceso.

### 10.1. Extracción de RNA

Las células de *S. cerevisiae* se procesaron de la forma descrita en el apartado 2.2. El volumen de cultivo recogido fue de 5 ml ( $5 \times 10^7$  células aproximadamente), centrifugando a 4°C y 2600 rpm durante 3 min, y congelando el “pellet” de células inmediatamente después de retirar el sobrenadante en nitrógeno líquido. La extracción de RNA se realizó utilizando el “*RNeasy Mini Kit*” (QIAGEN), mediante el procedimiento de disrupción mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se comprobó mediante cromatografía capilar utilizando el equipo Nano Bioanalyzer 2100B (Agilent Technologies).

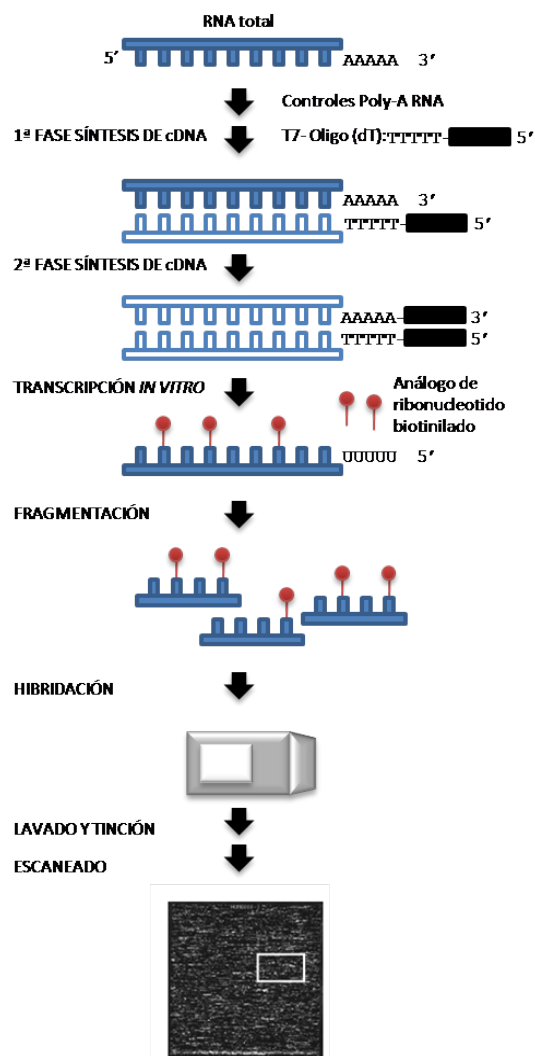


FIGURA 13: Esquema general del proceso de síntesis y marcaje de cDNA e hibridación de microarrays mediante la tecnología Affymetrix.

### 10.2. Síntesis, marcaje e hibridación del cDNA

A partir de 5 µg de RNA total se sintetizó el cDNA de doble cadena por retrotranscripción usando el kit “*One-cycle cDNA Synthesis Kit*” (Affymetrix, Santa Clara, CA). Posteriormente, este cDNA se purificó utilizando el “*GeneChip Sample Cleanup*

*Module*" (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA se usó como molde para la transcripción *in vitro* y obtener así el cRNA marcado con biotina utilizando el "GeneChip IVT Labeling Kit". Por último, se llevó a cabo la fragmentación química del cRNA marcado con biotina siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniéndose fragmentos de unos 100 nucleótidos. La concentración de RNA marcado obtenido se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro ND-1000 (Nanodrop) y su calidad y perfil de tamaños se evaluó por cromatografía capilar en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Se emplearon 15 µg del cRNA marcado en el cóctel de hibridación para cada *microarray* procediéndose a la hibridación durante 16 h a 45°C. Una vez hibridados fueron procesados en la plataforma de fluidos "GeneChip® Fluidics Station 450". El cRNA hibridado fue identificado mediante un conjugado estreptavidina-ficoeritrina. Las señales de fluorescencia fueron recogidas utilizando el escáner GeneChip® 3000.

### **10.3. Análisis de imágenes, procesamiento de datos y métodos estadísticos**

Los archivos generados en el escaneado de los *microarrays* (.CEL) fueron convertidos a niveles de expresión génica utilizando el software GCRMA (Bioconductor) (Han *et al.*, 2004).

Para cada condición experimental tres experimentos diferentes, correspondientes a tres muestras biológicas independientes, fueron procesados y analizados. Los cambios en la expresión génica entre las condiciones experimentales en estudio, fueron calculadas como el ratio entre la media de las señales de expresión génica de las muestras tratadas frente a las no tratadas. Los genes fueron considerados como inducidos o reprimidos cuando su ratio de expresión bajo las condiciones analizadas  $\geq$  ~~1,5~~  $\leq$  0,5, respectivamente. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Cyber-t (<http://cybert.microarray.ics.uci.edu/>) (Baldi and Long, 2001). Aquellos valores con un p-value bayesiano  $< 0,01$  fueron considerados como significativos y los genes correspondientes se consideraron para su posterior análisis. Con el objetivo de determinar si la inducción génica observada en la cepa WT tras el tratamiento con RC o ZL se encontraba bloqueada en los mutantes *swi3Δ* y *rlm1Δ*, se utilizó la relación entre las respuestas de la cepa mutante *versus* la presentada por la WT. Un valor del ratio mutante/ratio WT  $\leq 0,65$  fue considerado como umbral para definir una reducción significativa en la inducción génica, de acuerdo con criterios previos (Garcia *et al.*, 2009).

En todo caso, aquellos genes cuyo ratio fuera  $< 1,65$  fueron considerados como no inducidos en las condiciones de estudio. Además, para determinar los genes cuyos niveles de expresión basal dependieran de *SWI3* o *RLM1*, se estableció el mismo valor umbral para la relación entre el mutante/WT *versus* la relación WT tratamiento/WT.

El análisis del agrupamiento de genes por sus perfiles de expresión se realizó utilizando MeV (Multiexperiment viewer), versión 4.6 de TIGR (<http://www.tigr.org/software/>). Asimismo, la gráfica de dispersión de los datos normalizados de expresión génica frente el correspondiente ORF fue obtenida con el programa Spotfire.

## 11. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Las células se crecieron y procesaron según lo descrito en el apartado 2.2. El volumen de cultivo recogido fue de 5 ml ( $5 \times 10^7$  células aproximadamente), centrifugando en frío, desechando el sobrenadante y congelando el “pellet” de células inmediatamente con nitrógeno líquido. La extracción del RNA se realizó igual que en el apartado 10.1. La síntesis de cDNA se realizó con el kit “*AS Transcription System*” (Promega) empleando 2  $\mu$ g de RNA total, siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa de retrotranscripción fue de 45 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C y finalmente 5 minutos a 4°C. A partir del cDNA generado se preparó una dilución de trabajo 1/100 en agua mili-Q. Las reacciones de qPCR se realizaron en placas multipocillo–384 por duplicado con un volumen de muestra de 4,5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l de *Power SYBR Green PCR Master MIX* (Applied Biosystems) y 0,6  $\mu$ l de cada oligonucleótido a concentración 5  $\mu$ M. Las parejas de oligonucleótidos correspondientes se diseñaron en el extremo 3’ de los genes en estudio, con ayuda del programa bioinformático *Primer Express* (Tabla 7). La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en el equipo *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time* y las condiciones de reacción fueron las siguientes: un ciclo de 10’ a 95°C seguido de 40 ciclos de 15’’ a 95°C y 1’ a 60°C. La expresión de cada gen en estudio fue normalizada relativizando los valores según la expresión del gen control *ACT1* y los ratios de variación de la expresión (tratamiento *versus* no tratamiento) fueron obtenidos siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrito por Livak y Schmittgen (2001).

**TABLA 7:** Relación de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR-cuantitativa en tiempo real.

Oligonucleótido	Gen	Secuencia (5'-3')
MLP1_RP MLP1_UP	<i>MLP1</i>	TCCTTCCCTTCAAACATTGGTT TGAATTATCAAGAATGCACAAAAGC
ACT_F_BIS ACT_R_BIS	<i>ACT1</i>	ACGAAAGATTCAGAGCCCCA GCAGATTCCAAACCCAAAACA
YJL107C_F YJL107C_R	<i>YJL107C</i>	ACACCGGTTTCATCCTACGCA CAGCCTATGCGTCGGAGC
YIL117C_F YIL117C_R	<i>PRM5</i>	AGACATAAGGAAACCCGCAAAA ACGATTTACGCTACCATCACTTTCT
YKL096W_F YKL096W_R	<i>CWP1</i>	CCTCTGCTAGCTCCCAACTG TGTGTTTGGAGCTTGGATTTGT
CRH1_F CRH1_R	<i>YGR189C</i>	ACTACCCAGATATCAAGCAAATACACA TCAGCACCGTTAGAAATTTGAACA
CRG1_F CRG1_R	<i>YHR209W</i>	TCGATTTGGAGATATTGAAGTCACA GCATTTGGGTCCGAAGGA
YSN1_F YSN1_R	<i>YNR065C</i>	ACGCACGAAGGCAGGTGTA AACCTTGCCCTTAATTTTGAAGAA
PRM10_F PRM10_R	<i>YJL108C</i>	TTCAAGTGCCATCTGGTATTGC GCAACCCAGACAACAACGAA
RTC3_F RTC3_R	<i>YHR087W</i>	CAAGGCCAAGTGGAAAATG ACTTCTTCGATCTTCTTGCCCTTA
YKR091W_F YKR091W_R	<i>SRL3</i>	TTCGTCCAAACATGCCAAA GACCAACGTAACGGCGAAA
YLR040C_F YLR040C_R	<i>YLR040C</i>	ACGCAGGCCAGTCCATGA TGATGCGGATATAAGTGCTGTTG
YHR097C_F YHR097C_R	<i>YHR097C</i>	GTCCTGCCACCCAAGGAA AGCTTGTTGCCGGTGTITTC
YLR042C_F YLR042C_R	<i>YLR042C</i>	GTTCAATTGTTCAAGCGCAACTT CCAAGGGCAGTATTCAAATCCT
YLR194C_F YLR194C_R	<i>YLR194C</i>	GGTAGCGTCCGTAATGTCCAA CCCGCACCATTAAGCTATGTGA
YDR077W_F YDR077W_R	<i>SED1</i>	ACCACAGCCAACCCAAGTCT TGATGACAACGGAATGAGAAGAA

## 12. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

La inmunoprecipitación de cromatina es una técnica empleada para detectar la asociación *in vivo* de proteínas individuales con regiones específicas del genoma. Una característica clave de estos ensayos es la utilización de formaldehído para conservar las interacciones proteína-DNA, mediante enlaces covalentes entre las aminas primarias de las bases del DNA y de las proteínas en una proximidad  $\approx 2 \text{ \AA}$ . El formaldehído es el agente más utilizado para generar estos entrecruzamientos (Orlando *et al.*, 1997; Solomon y Varshavsky, 1985; Toth y Biggin, 2000), ya que (i) penetra rápidamente en las células,

actuando sobre interacciones nativas antes de que se produzca una respuesta fisiológica en la célula, (ii) es un compuesto con un único átomo de carbono, que permite eficientemente generar entrecruzamientos proteína-DNA *in vivo* (también se pueden formar uniones proteína-proteína y proteína-RNA), y (iii) las uniones generadas son reversibles, permitiendo que se lleven a cabo pasos posteriores para la detección de DNA. Los experimentos de ChIP permiten también comparar diferentes eventos que se produzcan de forma simultánea en la célula, antes o durante situaciones de estrés en diferentes promotores, mediante la utilización de oligonucleótidos específicos. Un esquema general de esa técnica se muestra en la figura 14.

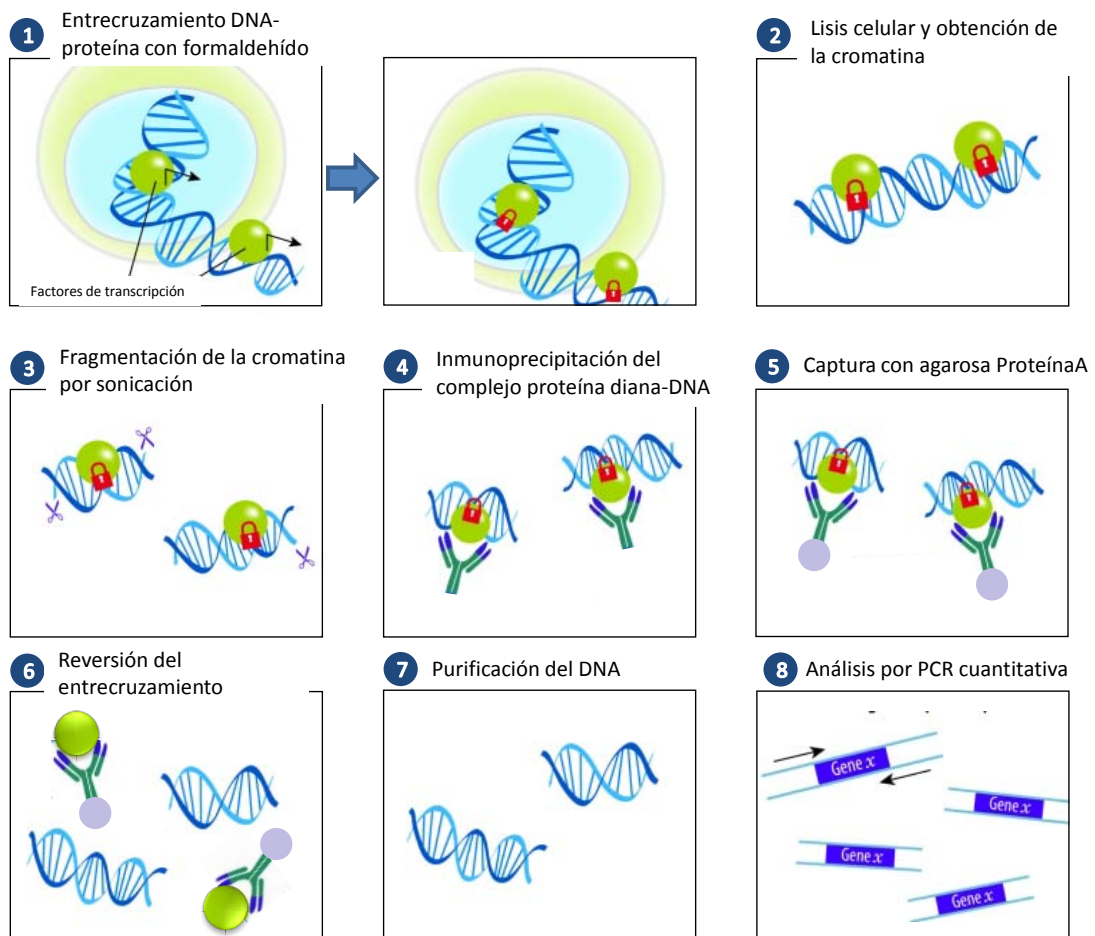


FIGURA 14: Esquema general de un experimento de ChIP estándar.

### 12.1. Entrecruzamiento *in vivo* y recogida de células

Para la realización de estos experimentos se emplearon cepas que expresaban desde su propio *locus* genómico proteínas epitopadas en su región C-terminal con 3

copias del epítipo HA y también cepas sin epitopar. Las células se crecieron y procesaron según el apartado 2.2. Transcurrido un tiempo determinado, según el experimento planteado, las células fueron tratadas con formaldehído a una concentración final del 1% durante 15 minutos, en agitación por rotación y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de glicina a una concentración final de 150 mM y, tras 5 minutos de incubación en las mismas condiciones, se recogieron las células por centrifugación a 4°C y 2600 rpm durante 3 min (el volumen recogido varió en función del tiempo de tratamiento con la droga, por ejemplo, 50 ml de cultivo cuando éste alcanza una D.O.<sub>600</sub> de 0,5) y se lavaron dos veces con PBS, por centrifugación (2600 rpm, 3 min y 4°C). El “pellet” de células se procesó inmediatamente o se congeló a -80°C para un procesamiento posterior.

## **12.2. Lisis celular y aislamiento de cromatina**

El “pellet” de células se resuspendió en un volumen de 400 µl de tampón de lisis (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 y 0,1% deoxicolato sódico) suplementado en el momento de uso con 16 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete Mini*, EDTA-free, *Protease inhibitor cocktail tablets* [Roche]), preparado a partir de una tableta disuelta en 2 ml de agua milli-Q y 4 µl PMSF 0,1 M, siendo la concentración final de 1 mM. La suspensión de células se traspasó a tubos eppendorf a los que previamente se había añadido bolitas de vidrio de 0,4-0,6 mm en un volumen equivalente a 500 µl, enfriados en hielo, y se rompió por agitación en vórtex (*Vortex-Genie<sup>®</sup>2*, *Scientific Industries*) a 4°C, durante 40 minutos a la máxima velocidad. Para la obtención del extracto celular total se perforaron los eppendorf con la ayuda de una aguja y al centrifugarse a 4°C durante unos segundos a velocidad máxima, se recogió en otros tubos. La fragmentación de la cromatina se realizó por sonicación (*High Intensity Ultrasonic Processor*, modelo VC375): 7 ciclos de 10 segundos a fuerza 4, enfriando las muestras entre ciclo y ciclo sumergiéndolas 5 segundos en una mezcla de nieve carbónica/etanol. Las condiciones de sonicación varían en función del equipo utilizado, por tanto, es importante tener en cuenta que el objetivo fue siempre conseguir fragmentos de DNA de un tamaño aproximado de 500 pb. Tras la sonicación, el extracto se diluyó con 1 ml de tampón de lisis más inhibidores de proteasas y se centrifugó 30 minutos a 13000 rpm y 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf y se centrifugó una hora más en idénticas condiciones, traspasando el sobrenadante una vez más a una batería de eppendorf nuevos, consiguiendo finalmente una cromatina completamente limpia. De esta preparación se apartaron 25 µl (IN: *input*) y se continuó el experimento con 250 µl de muestra que, tras el correspondiente procesamiento descrito más adelante constituyó el *inmunoprecipitado* (IP).

### 12.3. Titulación de anticuerpos

Para la determinación de la cantidad óptima de anticuerpo a utilizar en cada experimento, alícuotas de 250  $\mu$ l de cromatina fueron incubadas en rotación a 4°C y o/n con cantidades crecientes de anticuerpo: añadiendo 0,1  $\mu$ g como la cantidad más baja y doblándola hasta llegar a cantidades aproximadas de 6,4  $\mu$ g, incluyendo siempre un control sin anticuerpo. Al día siguiente, se añadieron 15  $\mu$ l de Protein A Sepharose (Rockland), incubándose durante dos horas a 4°C en rotación. A continuación, se centrifugó a temperatura ambiente a 13000 rpm y se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo. Se añadieron 20  $\mu$ l de tampón de carga de proteínas DTT 2x tanto a la resina como a 20  $\mu$ l de sobrenadante y se hirvieron durante 5 min. Finalmente, se realizó un *western-blotting* cargando 20  $\mu$ l de las muestras de las dos fracciones para monitorizar la presencia o ausencia de la proteína de interés. La cantidad de anticuerpo que retire completamente la proteína del lisado de tal manera que aparezca enriquecida en la fracción de la resina y que esté ausente en el sobrenadante, será la adecuada para su utilización en los experimentos posteriores.

### 12.4. Inmunoprecipitación y purificación del DNA

La cromatina de las muestras IP fue inmunoprecipitada con la cantidad correspondiente para cada anticuerpo (ver Tabla 8) durante toda la noche en agitación por rotación a 4°C.

**TABLA 8:** Relación de los anticuerpos utilizados en los experimentos de ChIP.

Anticuerpo	Referencia	Cantidad añadida
Anti-HA	Rabbit polyclonal to HA tag ab9110 (Abcam)	2 $\mu$ g
Anti-Snf2	J. Reese (Pennsylvania State University, USA)	2 $\mu$ l
Anti-Snf6	J. Reese (Pennsylvania State University, USA)	2 $\mu$ l
Anti-H3	Rabbit polyclonal to Histone H3 ab1791 (Abcam)	1 $\mu$ g
Anti-polimerasa II	RNA Polymersase II 8WG16 monoclonal MMS-126R (Covance)	5 $\mu$ g

Al día siguiente, las muestras se incubaron a 4°C durante dos horas después de añadir 15  $\mu$ l de Protein A Sepharose (Rockland) para capturar la cromatina unida al anticuerpo. A continuación, se realizaron lavados de 5 minutos en rotación a temperatura ambiente con: tampón de lisis, tampón de lisis alto en sales (50 mM HEPES/KOH pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 y 0,1% deoxicolato sódico), tampón de lavado (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,25 M LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% deoxicolato sódico y 1 mM EDTA) y

TE (10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA). Una vez retirado el resto de tampón de la resina, se añadieron 250  $\mu$ l de tampón de elución (50 mM Tris pH 8, 1% SDS y 10 mM EDTA) y se incubaron a 65°C y 1400 rpm durante 10 minutos en un termoagitador (*Termomixer compact*, Eppendorf). Inmediatamente, se centrifugaron las muestras 2 minutos a 13000 rpm y se traspasó el sobrenadante a otro tubo. Tanto las muestras IP como las IN se llevaron a un volumen final de 500  $\mu$ l con TE y se incubaron 2 horas a 42°C en presencia de 100  $\mu$ g de proteinasa K (MERK) y después a 65°C durante toda la noche, con el objetivo de revertir el entrecruzamiento y eliminar las proteínas. Finalmente, se purificó el DNA de cada una de las muestras (IP e IN) mediante extracción en tres pasos: dos, con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y uno, con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), recuperándose tras la agitación por vórtex (10 segundos) y centrifugación a máxima velocidad durante 5 min, la fase superior (volumen aproximado de 500  $\mu$ l). Para la precipitación del DNA se utilizaron 400  $\mu$ l del IP y 100  $\mu$ l del IN, a los que se añadieron 2,5 volúmenes de etanol, 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 1  $\mu$ l de glicógeno. Se incubaron 30 minutos a -80°C y se centrifugaron 30 minutos a 13000 rpm a 4°C. A continuación, se lavó el "pellet" con etanol al 70% y, finalmente, se dejó secar al aire. El DNA obtenido se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua milli-Q para las muestras IP y en 500  $\mu$ l para las muestras IN.

### **12.5. Cálculo de la tasa de enriquecimiento mediante PCR cuantitativa**

Para cuantificar el DNA inmunoprecipitado se empleó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Las reacciones de qPCR se hicieron por duplicado utilizando un volumen de muestra de 4,5  $\mu$ l tanto para el IN como para el IP, 5  $\mu$ l de *Power SYBR Green PCR Master MIX* y 0,6  $\mu$ l de los oligonucleótidos a concentración 5  $\mu$ M. Las parejas de oligonucleótidos empleadas en cada caso se diseñaron de tal forma que la región amplificada fuera de aproximadamente 150 pb. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 9.

El nivel de enriquecimiento (F.E., *Fold Enrichment*) en regiones específicas del DNA fue calculado siguiendo el método comparativo de Ct previamente descrito (Aparicio *et al.*, 2004) y utilizando la región promotora del gen *VMA8* como control. En resumen, el valor de Ct de la muestra IN fue restado al Ct de la muestra IP obteniendo el valor de  $\Delta$ Ct, tanto para la secuencia control ( $\Delta$ Ct<sub>control</sub>) como para la secuencia en estudio ( $\Delta$ Ct<sub>problema</sub>), en cada condición. Finalmente, F.E. fue calculado utilizando la fórmula  $2^{-[\Delta$ Ct<sub>problema</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>control</sub>]}.

Por tanto, el método del  $\Delta\Delta\text{Ct}$  ha sido aplicado para cada muestra experimental (cepa o condición):

$$\left. \begin{array}{l} \text{Gen}^{\text{CONTROL}} \rightarrow \Delta\text{Ct}_{\text{control}} [\text{Ct}(\text{IP})-\text{Ct}(\text{IN})] \\ \text{Gen}^{\text{PROBLEMA}} \rightarrow \Delta\text{Ct}_{\text{problema}} [\text{Ct}(\text{IP})-\text{Ct}(\text{IN})] \end{array} \right\} \text{F.E.} = 2^{[\Delta\text{Ct}_{\text{problema}} - \Delta\text{Ct}_{\text{control}}]}$$

**TABLA 9:** Relación de oligonucleótidos utilizados en ensayos de CHIP, indicando la secuencia y posición relativa respecto al ATG del gen.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Posición respecto al ORF
<b>MLP1</b>		
MLP1 BOX2-UP	TTTCAGCCCACAAGACGTCAT	-548
MLP1 BOX2-DW	TTTGCTGCGTTTAATAACTACAACAGT	-408
MLP1 BOX1-UP	AATTTCACTGTTCCGTTAACTGTTG	-453
MLP1 BOX1-DW	TCCTACGGTGCTTCCTGCAT	-313
MLP1 PRO1-UP	AAAAAGCGCTGCCACAACT	-253
MLP1 PRO1- DW	CCAGTCTCAAACGACAATTAGGACTT	-98
MLP1 PRO2-UP	GCAAAAAGCCTATTTAATGTAAGTCC	-143
MLP1 PRO2-DW	AGGATAAAATCTTGCCGAATG	56
MLP1 ORF1-UP	CACACAGCCTTATTGTTCTTCAAC	98
MLP1 ORF1-DW	TGGGTGCCCTCTTAAATGTCTT	250
MLP1 ORF2-UP	CGACGGCTTCATTAAGGGTTATA	555
MLP1 ORF2-DW	CCTACCAAGTAGTTCGGCCAAG	687
<b>RLM1</b>		
RLM1 BOX1-UP	GCAGCATCACCGGGTGA	-402
RLM1 BOX1-DW	TTATTGTTTCAGAGGAAGATCGAGCT	-271
<b>YLR194C</b>		
YLR194C BOX1,2,3-UP	AATGGCTGGCTTTAGAGTGTCAG	-254
YLR194C BOX1,2,3-DW	TTCAGCTACCTCAGTCGCTAAAAAT	-123
<b>SRL3</b>		
SRL3 BOX2-UP	ATTCACTACGTTGTCTTCTTCAACA	-265
SRL3 BOX2-DW	TGTTCCCTTTTAGCTTTTAGCCTT	-135
<b>VMA8</b>		
VMA8-UP	CACAGATGAGCTCCACCGATT	-321
VMA8-DW	GGTGTAAGTGCAGCAATTGTT	-191

### 13. TRATAMIENTO CON MNasa Y ESCANEADO DE NUCLEOSOMAS

El objetivo principal de estos experimentos consiste en analizar la organización de los nucleosomas mediante tratamiento con *Micrococcal Nuclease* o MNasa. Un esquema simplificado del proceso completo se muestra en la figura 15. La enzima MNasa es una nucleasa extracelular de *Staphylococcus aureus*, que produce la degradación de DNA de doble cadena, de cadena simple, lineal o circular, pero no digiere el DNA protegido por

los nucleosomas. De esta manera, tras el tratamiento de la cromatina con MNasa, el DNA que no forma parte de los nucleosomas es degradado, mientras que el DNA unido a los nucleosomas permanece intacto, dejando fragmentos de 146 pb aproximadamente.

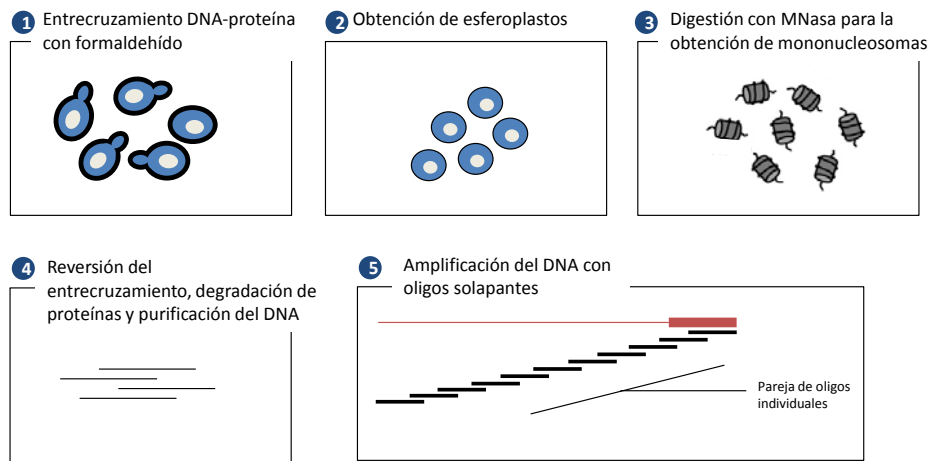


FIGURA 15: Esquema del protocolo de tratamiento con MNasa y escaneado de nucleosomas.

### 13.1. Entrecruzamiento *in vivo* y recogida de células

Las células fueron crecidas en medio líquido YPD siguiendo las condiciones descritas anteriormente (Apartado 2.2). Transcurrido el tiempo establecido para el experimento, las células fueron tratadas con formaldehído para generar entrecruzamientos entre el DNA y las proteínas unidas a éste, a una concentración final del 1% durante 15 minutos, en agitación a 200 rpm y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de glicina a una concentración final de 150 mM durante 5 minutos en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente. El volumen recogido fue de 200 ml por condición, a una D.O.<sub>600</sub> estimada de 1,2 (este volumen permitía obtener la cantidad suficiente de células para la preparación de 4 muestras). Tras el tratamiento con glicina, las células fueron recogidas por centrifugación a 2600 rpm durante 3 min a 4°C y lavadas una vez con agua ultrapura milli-Q.

### 13.2. Tratamiento con MNasa, reversión del entrecruzamiento y purificación del DNA

El "pellet" de células se resuspendió en 39 ml de tampón Z (1 M sorbitol, 50 mM Tris pH 7,5) y 28 µl de β-mercaptoetanol (14,3 M), quedando a una concentración final de 10 mM. A continuación, se añadió 1 ml de una solución de zimoliasa 20T preparada en el momento de uso (10 mg/ml en tampón Z), y se incubaron a 30°C con agitación suave (80

rpm) durante 35-40 minutos. De esta manera, se obtuvieron esferoplastos, que se recogieron por centrifugación a 1900 rpm durante 10 minutos a 4°C, evitando el acelerado/frenado rápido de la centrifuga. Los esferoplastos fueron resuspendidos con pipeta, en 2,5 ml de tampón NP (0,5 mM espermidina, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,075% NP-40, 50 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 5 mM  $MgCl_2$  y 1 mM  $CaCl_2$ ). A continuación, se transvasaron 600  $\mu$ l de esta suspensión celular a tubos eppendorf a los que previamente se había añadido la cantidad de MNasa apropiada (ver más adelante: titulación de la cantidad de MNasa utilizada), incluyendo un control sin enzima. A continuación los tubos se invirtieron rápidamente una vez y se incubaron durante 20 minutos a 37°C. La reacción se detuvo trasladando los tubos a 4°C y añadiendo 12  $\mu$ l de EDTA 0,5 M. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ l de una solución de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó toda la noche a 65°C para revertir el entrecruzamiento. Para la purificación del DNA se realizó una extracción y una precipitación similar a la realizada para los experimentos de ChIP, descritos anteriormente. El "pellet" de DNA se resuspendió en 29  $\mu$ l de tampón NEB 3 (New England Biolabs) y se trató con 0,5  $\mu$ g de RNasa A libre de DNasa (Sigma) durante una hora a 37°C. A continuación, se trató con fosfatasa alcalina (New England Biolabs) durante una hora más. Finalmente, el DNA se purificó mediante cromatografía de adsorción en columna utilizando "*MinElute Enzyme Cleanup Kit*" (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 20  $\mu$ l de agua ultrapura milli-Q.

#### **Titulación de la cantidad de MNasa utilizada en estos experimentos**

Como se ha indicado anteriormente, la puesta a punto de este protocolo requirió el ajuste de la cantidad de enzima MNasa a utilizar. Cantidades inferiores a las requeridas producen una digestión parcial del DNA, dando lugar a fragmentos de di-, tri-nucleosomas, etc., mientras que cantidades superiores suponen un efecto de sobredigestión.

Por tanto, la cantidad ideal de MNasa era aquella que daba lugar mayoritariamente a mono-nucleosomas, dejando como máximo un 10% de di-nucleosomas. La titulación de la enzima se realizó tanto en la cepa silvestre BY4741, como en el mutante *swi3 $\Delta$*  crecidos en medio YPD. El rango de cantidad de MNasa ensayado fue de 0 a 40 U. La enzima MNasa (Worthington Biochem) se preparó inicialmente a una concentración final de 20 U/ $\mu$ l en Tris 1 M pH 7,5. De esta manera, los 600  $\mu$ l de la suspensión celular obtenidos en tampón NP (indicado anteriormente) fueron añadidos a tubos eppendorf que contenían las diferentes cantidades de MNasa a ensayar. Los tubos fueron invertidos rápidamente y se incubaron a 37°C durante 20 minutos de incubación.

Tras este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 75  $\mu$ l de EDTA 0,5 M y 75  $\mu$ l de SDS 10%. Después, se añadió proteinasa K y se incubó durante toda la noche a 65°C. La purificación del DNA se realizó añadiendo 1 volumen de fenol/cloroformo y la precipitación del DNA se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2 y un volumen de isopropanol. Se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y se lavó el "pellet" una vez con etanol al 70%, dejándose secar al aire. El DNA fue resuspendido en tampón NEB 3 (New England Biolabs) y se trató con 0,5  $\mu$ g de RNasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1,5% y se determinó visualmente la cantidad óptima de enzima a utilizar. En el ejemplo presentado en la figura 16, se observa como la cantidad adecuada de enzima para la realización de estos ensayos es de 30 U.

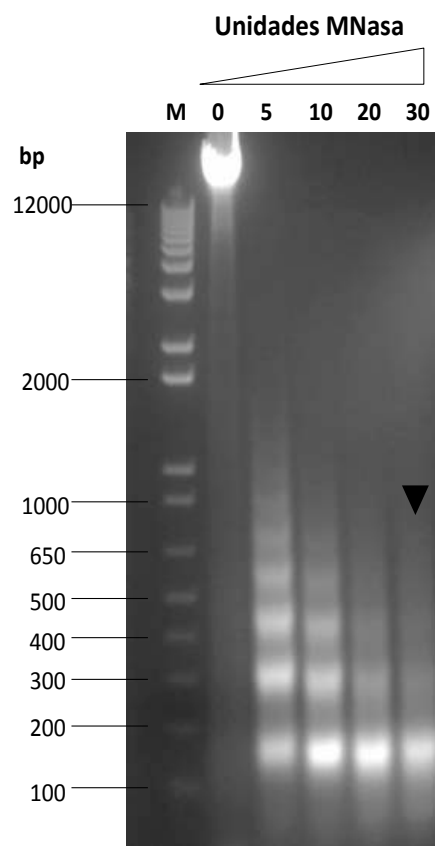


FIGURA 16: Ejemplo de titulación de la cantidad de enzima a utilizar en los ensayos de MNasa.

### 13.3. Muestras control generadas a partir de DNA genómico

Como control de amplificación se empleó DNA genómico obtenido a partir de la cepa BY4741 crecida en medio YPD. El DNA genómico se extrajo utilizando el kit "Genomic DNA isolation Kit" (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, 24  $\mu$ g del DNA genómico obtenido, se llevaron a un volumen final de 200  $\mu$ l en una solución 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$  y 40 mM HEPES pH 7,5 y se dividió en 4 alícuotas de 50  $\mu$ l, a las que se añadieron diferentes cantidades de MNasa. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 20 minutos, y la reacción se detuvo trasladando los tubos a 4°C y añadiendo EDTA a una concentración final de 10 mM. Las muestras se purificaron con el kit "PCR purification Kit" (Qiagen) eluyendo en un volumen final de 20  $\mu$ l de agua milli-Q. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1,5 %. Para seleccionar fragmentos entorno a las 146 pb, se cortó la banda del gel de agarosa correspondiente a un tamaño de DNA entre 140-220 pb y se purificó el DNA utilizando el kit comercial "Gene Clean Turbo Kit" (MP Biomedicals), eluyendo finalmente en 30  $\mu$ l de agua milli-Q.

### 13.4. Diseño de oligonucleótidos, amplificación por qPCR y análisis de datos

Los oligonucleótidos utilizados para el escaneado de los nucleosomas a lo largo de una región de 860 pb del gen *MLP1*, fueron diseñados teniendo en cuenta que cada pareja debía amplificar fragmentos de 100 pb aproximadamente, solapando 20-30 pb entre fragmentos colindantes. La longitud óptima de los oligonucleótidos fue de 20-30 pb. Los oligonucleótidos y las características de estos se muestran en la Tabla 10.

**TABLA 10:** Relación de oligonucleótidos utilizados en ensayos de MNasa.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Inicio	Longitud (pb)	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño amplicón (pb)
MLP1tiling 1_F	TACTCCATCGCCATCCCTTTT	-699	21	59,4	
MLP1tiling 1_R	AATGTCGATACTGTGTTACGTTTGC	-602	25	58,3	97
MLP1tiling 2_F	CTTGCAAACGTAACACAGTATCGA	-629	24	58,1	
MLP1tiling 2_R	GACGTCTTGTGGGCTGAAAAC	-530	21	58,3	99
MLP1tiling 3_F	CCGTAGTTTTTCAGCCACAAG	-555	21	58,4	
MLP1tiling 3_R	ATTGGGGACTTCAAGTAACGAA	-455	23	57,8	100
MLP1tiling 4_F	ATTCGTTACTTGAAAGTCCCAAT	-478	24	58,1	
MLP1tiling 4_R	GTGTTTCTCCGGTGTGTTCAA	-377	22	58,6	101
MLP1tiling 5_F	GATTATTTTGAACAACACCGGAGA	-405	24	58,1	
MLP1tiling 5_R	AATCCTACGGTGCTTCTCTGC	-310	21	59,2	95
MLP1tiling 6_F	TCAATCAATGCAGGAAGCACC	-339	21	59,7	
MLP1tiling 6_R	TTTGTGGCAGCGCTTTTACT	-236	21	58,7	103
MLP1tiling 7_F	AGTAAAAAGCGCTGCCACAAA	-256	21	58,7	
MLP1tiling 7_R	AAAAGTACCTTCTTTGTTTCTTCAA	-159	27	58,1	97
MLP1tiling 8_F	TTGGAAGAAACAAAAGAAGGTACTTT	-185	26	57	
MLP1tiling 8_R	CCATTTGTCCCTTTTCATCCA	-79	22	59,6	106
MLP1tiling 9_F	GAGACTGGATGAAAAGGGACAAA	-105	23	58,2	
MLP1tiling 9_R	CGGTGTCAGTCGCCATTTAAT	15	21	58,6	120
MLP1tiling 10_F	TCACAATTAATGGCGACTGACA	-10	23	59,1	
MLP1tiling 10_R	CCCCGACCAATCTTACCTGTC	94	21	59,3	104
MLP1tiling 11_F	CATTTTCATTTGACAGGTAAGATTGG	63	26	58,8	
MLP1tiling 11_R	TCTGATAGCCACGTGAGTTTCT	161	23	58,9	98

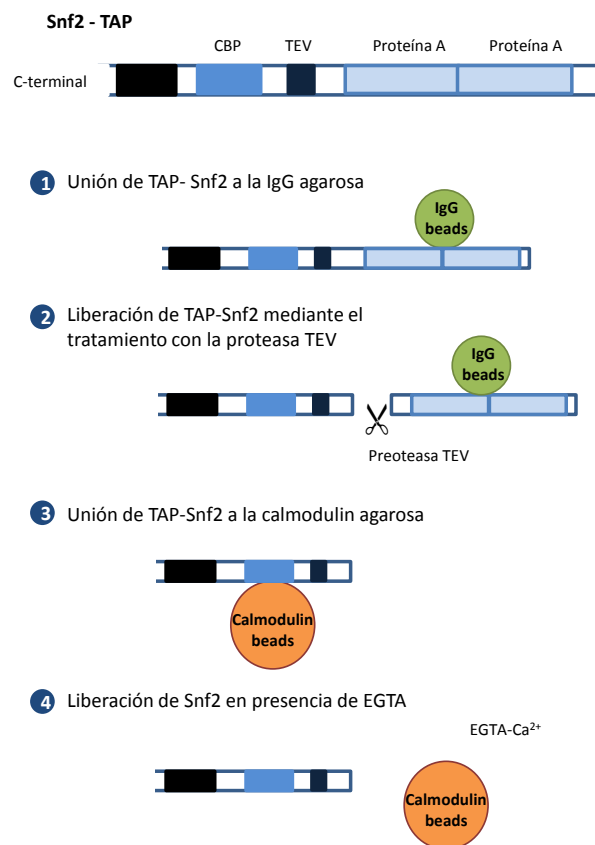
Para cuantificar el DNA inmunoprecipitado se utilizó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Las reacciones de qPCR se hicieron en placas multipocillo-384, por duplicado utilizando un volumen de muestra de 4,5 µl a partir de una dilución 1/100, 5 µl de *Power SYBR Green PCR Master MIX* y 0,6 µl de cada oligonucleótido a concentración 5 µM. En este caso, se realizó para cada pareja de oligonucleótidos una recta patrón utilizando 4 diluciones seriadas (1/10) de DNA genómico con el objetivo de extrapolar los valores de Ct en dicha curva y obtener valores de cantidades absolutas de DNA. El nivel de enriquecimiento de DNA nucleosomal para una región determinada de DNA y para cada una de las condiciones, fue calculado como el ratio entre las cantidades del producto de

qPCR obtenidas de las muestras problemas y las muestras de DNA genómico también tratadas con MNasa (muestras control).

$$\text{Enriquecimiento de DNA nucleosomal} = \frac{\text{Cantidad de DNA de la muestra tratada con MNasa}}{\text{Cantidad de DNA del genómico control tratado con MNasa}}$$

## 14. PURIFICACIÓN TAP-tag DEL COMPLEJO SWI/SNF

Con el fin de purificar el complejo SWI/SNF, se empleó la cepa CY1552 que expresa la proteína Snf2 fusionada por su extremo C-terminal al epítipo TAP (Figura 17).



**FIGURA 17:** Purificación en tándem a partir de una proteína unida al epítipo TAP.

Las células se crecieron en 6 litros de medio líquido YPD a 30°C en agitación durante toda la noche, de tal manera que al día siguiente la D.O.<sub>600</sub> del cultivo fuera aproximadamente 2. Las células fueron recogidas por centrifugación a 4°C, lavadas con agua milli-Q y resuspendidas en 5 ml de tampón E (20 mM HEPES pH 7,5, 350 mM NaCl,

10% glicerol, 0,1% Tween 20, más inhibidores de proteasas: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatina, 1 mM de PMSF y aprotinina). Esta suspensión se congeló directamente sobre  $\text{N}_2$  líquido y se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ . La lisis celular se realizó en mortero, siempre en frío con  $\text{N}_2$  líquido, moliendo con la maza hasta conseguir más de un 50% de rotura. A continuación, se añadieron 20 ml más de tampón E, incubándose en hielo durante 30 min, para finalizar la lisis. El lisado celular fue centrifugado a 40000 rpm durante 1 hora a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante clarificado se incubó mediante rotación con agarosa IgG rabbit (Sigma) durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$ . El complejo SWI/SNF se eluyó de la matriz IgG mediante el tratamiento con 300 unidades de la proteasa TEV (Invitrogen) a  $4^\circ\text{C}$  en agitación durante toda la noche. El eluido obtenido por gravedad en columna, se incubó a continuación mediante rotación con resina de afinidad por calmodulina (Stratagene) equilibradas con tampón E incluyendo 2 mM  $\text{CaCl}_2$  durante dos horas más a  $4^\circ\text{C}$ . Finalmente, el complejo SWI/SNF se eluyó en tampón E en presencia de 10 mM EGTA. La proteína purificada fue dializada frente a tampón E en presencia de 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ . Para la cuantificación del complejo fue necesaria la realización de un ensayo adicional de actividad ATPasa (Smith y Peterson, 2005b). También se realizó una tinción de plata para verificar la presencia de las subunidades del complejo visibles en gel.

## 15. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS FUSIONADAS A GST

Para la producción de GST y proteínas fusionadas a GST se utilizó la cepa Rosetta derivada de la BL21, transformada con los plásmidos pGEX-KG, pGEX-KG-RLM1, pGEX-KG-Rlm1 $\Delta$ N y pGEX-KG-Rlm1\_222-526 (ver tabla 5). Los transformantes se crecieron en medio líquido LB-ampicilina a  $37^\circ\text{C}$  en agitación y, al día siguiente se refrescaron los cultivos a una  $\text{D.O.}_{600}$  de 0,1 en 100 ml del mismo medio en el caso de las cepas transformadas con los plásmidos pGEX-KG, pGEX-KG-Rlm1 $\Delta$ N y pGEX-KG-Rlm1\_222-526 y en 2 litros para el caso de la cepa transformada con pGEX-KG-RLM1. Tras hora y media de incubación, se añadió IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosido) a una concentración final de 0,2 mM para inducir la expresión de las proteínas de fusión, durante 5 horas a  $30^\circ\text{C}$  en todos los casos excepto para la expresión de Rlm1-GST que se realizó a  $24^\circ\text{C}$ . Las células fueron recogidas por centrifugación en frío a 5000 rpm y lavadas una vez con agua milli-Q. A continuación, se resuspendieron en 10 ml de PBS conteniendo inhibidores de proteasas (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pepstatina, 1 mM de PMSF y aprotinina) y se lisaron por sonicación (10 ciclos de 10 segundos). La clarificación del sobrenadante se llevó a cabo por centrifugación a 15000 rpm durante una hora a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante (aproximadamente

10 ml) se incubó con 200  $\mu$ l de resina Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) durante 2 horas a 4°C en agitación por rotación. A continuación, se lavaron 3 veces durante 10 minutos con 1 ml de la solución de PBS más inhibidores de proteasas. Del volumen total de resina, se tomaron 20  $\mu$ l a los que se añadió el mismo volumen de tampón de carga 2x para proteínas, almacenando el resto a -80°C hasta su uso. Las muestras se hirvieron durante 2 min. La visualización de la cantidad de proteína obtenida se realizó por electroforesis en un gel, seguido de tinción con Azul de Coomassie.

## 16. ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN “*IN VITRO*”

Para la realización de estos ensayos se añadieron 20  $\mu$ l de resina “Glutathione Sepharose 4B” unida a GST (control negativo) y a las proteínas de fusión a GST en 100  $\mu$ l de “Binding Buffer” (20 mM Tris pH=7,5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glicerol, BSA 100  $\mu$ g/ml y los inhibidores de proteasas comentados anteriormente). A continuación, se añadieron 5  $\mu$ l del complejo SWI/SNF purificado (concentración ~110 nM). La reacción se incubó a 4°C en agitación por rotación durante 2 horas y media. A continuación, tras centrifugar a 3000 rpm, 1 min a 4°C, se apartó el sobrenadante (fracción “*unbound*”) y se prosiguió con el lavado de la resina en 100  $\mu$ l de “Binding Buffer” (6 lavados de 5 minutos cada uno a 4 °C). Finalmente, se recogió la fracción de resina obtenida tras los lavados (“*bound*”). Ambas fracciones fueron cargadas en un gel de acrilamida al 10%: 10% del “*unbound*” y 20% del “*bound*” con tampón de carga de proteínas SDS 2x, así como un 10% del complejo SWI/SNF purificado añadido a las reacciones. La detección del complejo mediante *western-blotting* se realizó utilizando un anticuerpo primario anti-Snf2 y la cantidad de proteínas de fusión a GST ensayadas se monitorizaron mediante el uso de un anticuerpo anti-GST (ver tabla 6).

## 17. ENSAYO DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN “*IN VIVO*”

El doble mutante *rlm1 $\Delta$  snf2 $\Delta$*  fue co-transformado con los plásmidos CP233 y YEp181[*RLM1-6xMyc*] expresando Snf2-HA y Rlm1-Myc, respectivamente, o con el plásmido YEp181[*RLM1-6xMyc*] y el vector vacío YEp352. Estas células fueron crecidas o/n a 24°C en medio SC-Ura-Leu, de tal manera que al día siguiente la D.O.<sub>600</sub> del cultivo no superara el valor de 1,5. Los cultivos se refrescaron con YPD en un volumen total de 200 ml a una D.O.<sub>600</sub> de 0,25 y se incubaron durante dos horas más. Posteriormente, el cultivo

se dividió en dos partes iguales, dejando uno como control y otro al que se añadió la droga (RC 30  $\mu\text{g/ml}$ ). Tras 30 min de tratamiento, se añadió a los cultivos formaldehído a una concentración final del 1% durante 15 minutos, en agitación a 200 rpm y a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de glicina a una concentración final de 150 mM y, tras 5 minutos de incubación en agitación, se recogieron las células por centrifugación a 4°C y 2600 rpm durante 3 min y se lavaron con PBS frío. Las células lavadas se resuspendieron en 400  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (descrito en el apartado 11.2) al que se añadió en el momento de su uso, 1 mM PMSF, 2mM benzamidina, 16  $\mu\text{l}$  de una mezcla de inhibidores de proteasas (preparado a partir de una tableta disuelta en 2 ml de agua milli-Q), 2  $\mu\text{g/ml}$  leupeptina, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatina y 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinina. El proceso de rotura llevado a cabo, así como la sonicación de las muestras es el mismo que el realizado para los experimentos de ChIP (ver apartado 12). Tras la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a 4°C y 13000 rpm durante 40 min. El sobrenadante se recogió y se separó un 5% del volumen para el *input* (IN). El resto del sobrenadante (IP: *immunoprecipitado*) fue incubado en rotación con 2  $\mu\text{g}$  de anticuerpo anti-HA (MMS-101P, ver Tabla 6) a 4°C durante toda la noche. Después, se añadieron 60  $\mu\text{l}$  de resina rProteinA Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), incubándose durante 1 h y 30 min a 4°C, en rotación. A continuación, se realizaron lavados por duplicado con 1 ml de cada uno de los siguientes tampones (descritos en el apartado 11.4): tampón de lisis más 0,1% SDS, tampón de lisis alto en sales más 0,1% SDS, tampón de lavado y TE. A continuación, se añadieron a la resina 60  $\mu\text{l}$  de tampón de elución (descrito en el apartado 11.4) y se incubaron a 65°C y 1400 rpm durante 10 minutos en un termoagitador (*Termomixer compac*, Eppendorf). Tras centrifugación a 13000 rpm durante 2 min, se recogió el sobrenadante y se le añadieron 12  $\mu\text{l}$  de tampón de carga de proteínas 5x, hirviendo las muestras durante 20 min. El material inmunoprecipitado fue analizado por *western-blotting* utilizando los anticuerpos anti-HA MMS-101P y anti-Myc MMS-150P descritos anteriormente en la Tabla 6.

## 18. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

A lo largo del trabajo se han utilizado varias herramientas bioinformáticas:

GeneCodis (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>): es una herramienta de la red que integra diferentes fuentes de información biológica para la búsqueda de las características biológicas (anotaciones) que frecuentemente co-ocurren en un conjunto de genes y clasificarlos por la significación estadística. Se ha utilizado para determinar las anotaciones

biológicas que se asocian significativamente a una lista de genes en estudio con respecto a una lista de referencia.

Funspec (<http://funspec.med.utoronto.ca/>): proporciona un resumen de las clases funcionales, localizaciones celulares, complejos de proteínas, etc, que están sobre-representados en una lista de genes. Las clases y categorías evaluadas fueron descargadas de la base de datos MIPS y GO. En nuestro caso se ha utilizado para clasificar un grupo de genes en diferentes complejos proteicos.

RSAT (*Regulatory Sequence Analysis Tools*) (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>): es un programa diseñado para detectar la presencia de secuencias reguladoras en las regiones no codificantes del genoma.

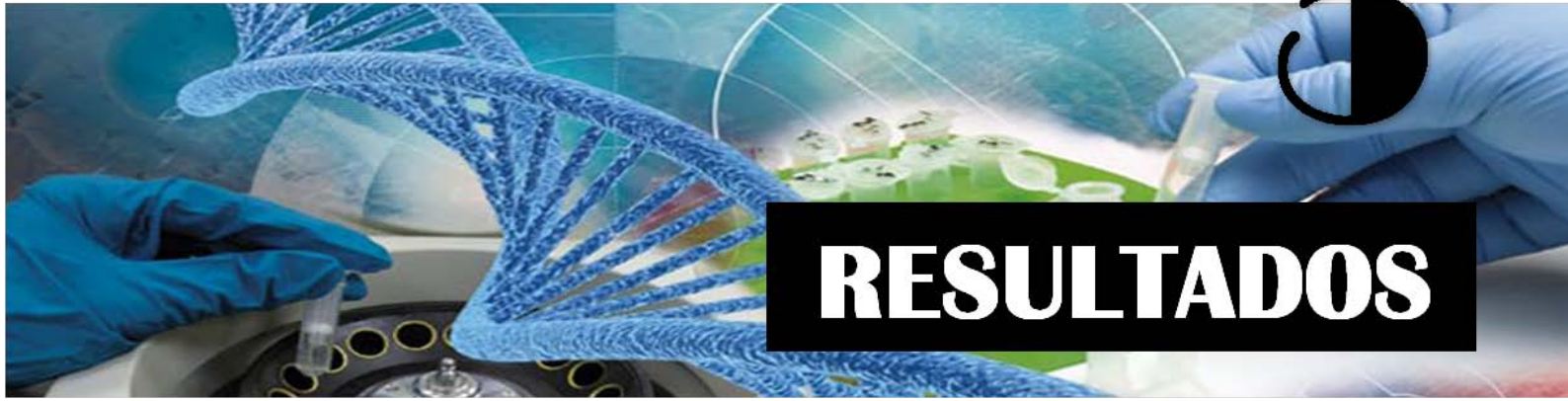
YEASTRACT (*Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking*) (<http://www.yeasttract.com>): base de datos en la que hay depositada información sobre más de 30990 asociaciones entre factores de transcripción de genes de *S. cerevisiae*, y que se basa en más de 1000 referencias bibliográficas. También incluye la descripción de los sitios específicos de unión a DNA de más de 100 factores de transcripción.





5

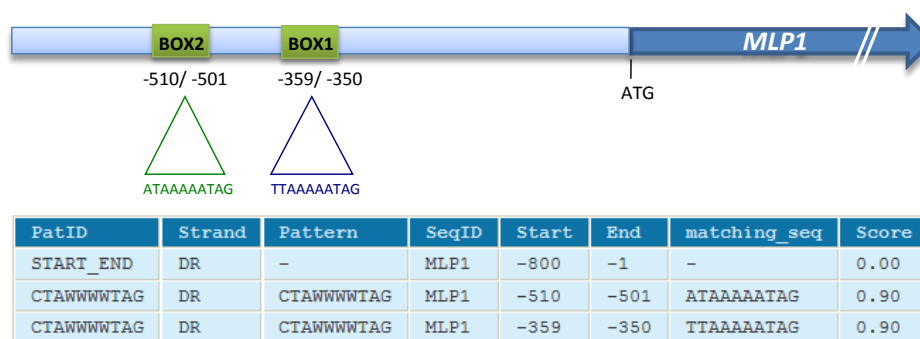
**RESULTADOS**





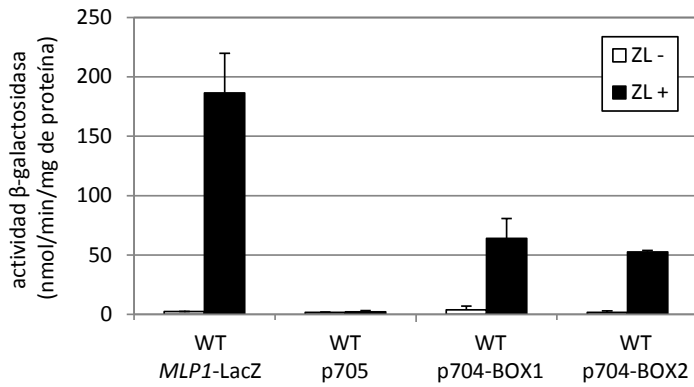
## 1. EL PROMOTOR DE *MLP1* POSEE DOS CAJAS FUNCIONALES DE UNIÓN A Rlm1

Utilizando las herramientas bioinformáticas RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/>) y YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com/>), que permiten establecer la presencia de secuencias reguladoras en las regiones no codificantes del genoma, se analizaron los hipotéticos sitios de unión para Rlm1 en el promotor de *MLP1*. De esta manera, se definió la presencia de dos posibles sitios, cuya secuencia difería en un nucleótido respecto al consenso establecido por Dodou y Treisman: CTAWWWWTAG (Dodou y Treisman, 1997), siendo W adenina ó timina. En este trabajo se denominaron como caja 1 (BOX1) y caja 2 (BOX2) de unión a Rlm1, en función de su posición respecto al ATG del gen (Figura 18).



**FIGURA 18: Promotor del gen *MLP1*.** Localización de las cajas 1 y 2 de unión a Rlm1 cuya secuencia varía en un nucleótido respecto el consenso establecido por Dodou y Treisman (1997). Los números indicados representan la posición relativa de la secuencia respecto al ATG.

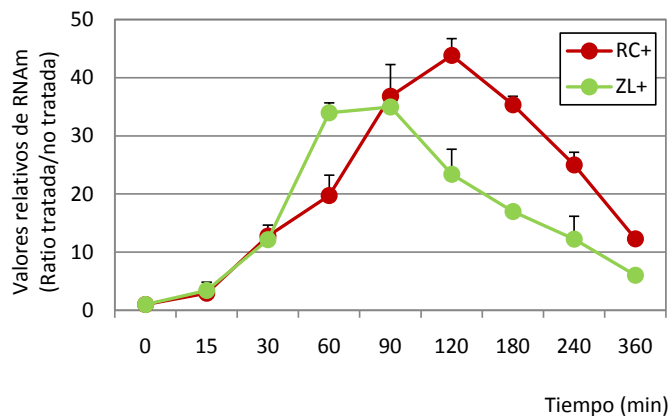
Para estudiar su funcionalidad en condiciones de activación de la ruta CWI, se clonaron individualmente ambas cajas, BOX1 y BOX2, en el plásmido pLG669-Z (Guarente y Ptashne, 1981), sustituyendo la región UAS del promotor del gen *CYC1*. El promotor de este gen se encuentra fusionado al gen *lacZ* y por tanto, conduce su expresión. Sin embargo, si la región UAS es eliminada, el plásmido resultante sólo sería capaz de dirigir la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa si otra región UAS es introducida corriente arriba de la caja TATA del gen *CYC1*. En base a esta premisa se construyeron los plásmidos denominados p705, p704-BOX1 y p704-BOX2 (descritos en *Materiales y Métodos*). La cepa silvestre BY4741 fue transformada con dichos plásmidos y sometida a estrés mediante el tratamiento con ZL. Asimismo se incluyó también la cepa silvestre transformada con el plásmido *MLP1*-LacZ, que contiene la región promotora completa de este gen (de -1000 a -2). Como se muestra en la figura 19, los niveles de  $\beta$ -galactosidasa obtenidos con las construcciones de las cajas individuales (p704-BOX1 y p704-BOX2), aunque menores que las obtenidas con la versión íntegra del promotor, sugieren que ambas cajas son funcionales y que probablemente tengan un efecto sinérgico.



**FIGURA 19:** Los dos sitios de unión a Rim1 dentro del promotor de *MLP1* son funcionalmente activos. La cepa WT transformada individualmente con los plásmidos *MLP1-LacZ*, p704-BOX1, p704-BOX2 y el plásmido vacío p705, fue sometida al tratamiento con zimoliasa (0,4 U/ml) durante 4 horas. A partir de los extractos proteicos obtenidos, se realizaron ensayos de β-galactosidasa para determinar la activación transcripcional de *MLP1*. El plásmido p705 fue incluido como control negativo de activación.

## 2. CINÉTICA DE EXPRESIÓN DEL GEN *MLP1* EN CONDICIONES DE ESTRÉS

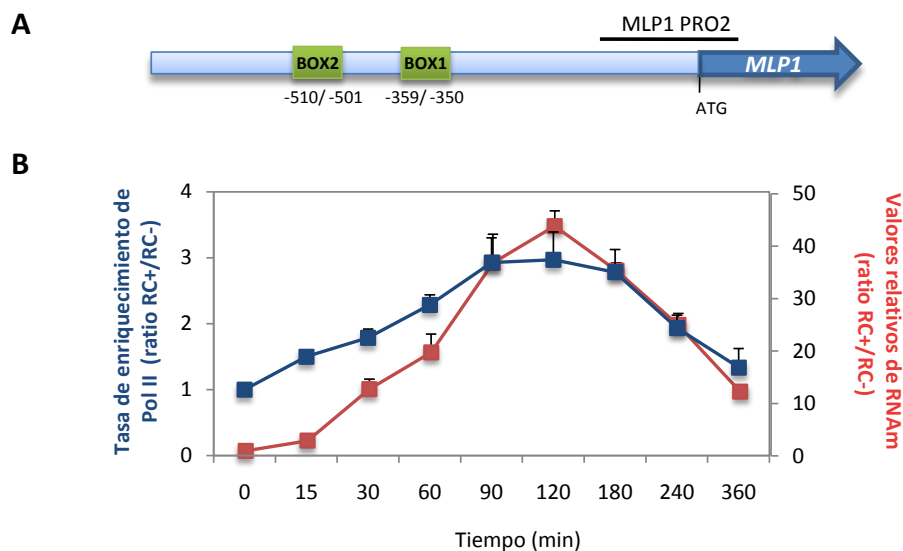
Para estudiar la cinética de expresión del gen *MLP1* en condiciones de estrés sobre la pared celular, se analizaron los niveles de RNAm en la cepa silvestre BY4741, a diferentes tiempos de tratamiento con Rojo Congo (RC) y zimoliasa mediante retrotranscripción inversa asociada a PCR cuantitativa (RT-qPCR) (para una información más detallada sobre el cálculo de los valores relativos de mensajero ver *Materiales y Métodos*). Como se muestra en la figura 20, la activación transcripcional para ambos estímulos comienza aproximadamente a los 15 minutos de tratamiento y aumenta progresivamente hasta alcanzar un punto máximo alrededor de las 2 horas para el caso del RC, y un poco anterior en el tiempo, para la activación por zimoliasa. A partir de este punto, los niveles de expresión disminuyen, hasta alcanzar valores próximos a los iniciales tras 6 horas de tratamiento. Por tanto, las cinéticas de expresión de *MLP1* en ambas condiciones son muy semejantes, siendo respuestas tardías y sostenidas en el tiempo a diferencia de otros tipos de estrés, como el osmótico y el térmico, para los que niveles máximos de expresión se producen tras pocos minutos de exposición al estrés.



**FIGURA 20:** Cinética de expresión del gen *MLP1* en la cepa WT en respuesta a estrés. La cantidad total de RNAm fue analizada mediante RT-qPCR, utilizando el gen *ACT1* como control interno, en una cepa silvestre BY4741 crecida en fase exponencial y sometida al tratamiento con RC (30 μg/ml) o ZL 100T (0,4 U/ml), a los tiempos indicados. Los ratios de activación proceden de la comparación, en cada tiempo, de los niveles de RNAm de las muestras tratadas frente a las no tratadas. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

### 3. LA RNA Pol II SE RECLUTA AL PROMOTOR DE *MLP1* EN CONDICIONES DE ESTRÉS

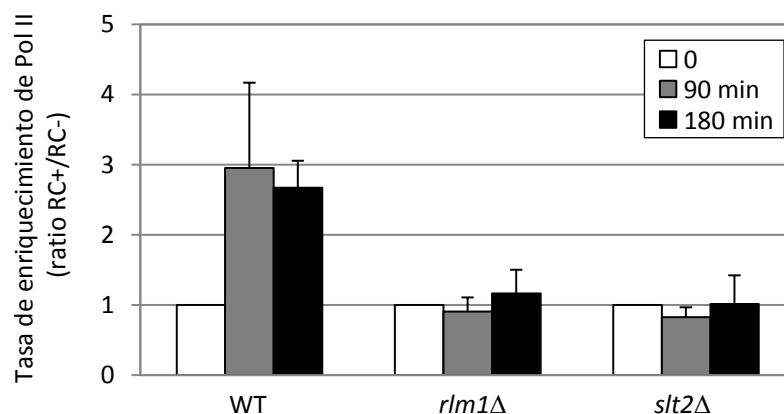
Con el fin de asociar los perfiles transcripcionales anteriores con un proceso de transcripción activa, se estudió, mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y PCR cuantitativa (qPCR), la entrada de la RNA Pol II en el gen *MLP1*. Para el estudio de la cinética de reclutamiento de la RNA Pol II en la cepa silvestre BY4741, se aisló la cromatina a partir de las células crecidas en ausencia y presencia de RC y se inmunoprecipitó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-RNA Pol II (Covance), que reconoce el heptapéptido C-terminal presente en la subunidad Rpb1 de la polimerasa. El DNA purificado se analizó por qPCR, estudiándose la unión de la Pol II en el gen *MLP1*, específicamente en la región MLP1PRO2 delimitada por las posiciones -143/+56, donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción (Figura 21A). Como se observa en la figura 21B, a tiempos cortos de tratamiento (15 min) se produce ya una ligera entrada de la Pol II que alcanza un máximo (alrededor de 3x) a las 2 horas de tratamiento. A partir de este momento, la unión de la Pol II comienza a disminuir. Este resultado indica una correlación entre la entrada de la polimerasa al promotor de este gen y los niveles de RNAm del gen *MLP1* (mostrados anteriormente y que se vuelven a incluir aquí para una comparación más fácil), demostrando por tanto, una transcripción activa de este gen como consecuencia del tratamiento con RC.



**FIGURA 21:** La unión de la RNA Pol II se correlaciona con el estado transcripcional del gen *MLP1* en situaciones de estrés. **(A)** Representación esquemática del gen *MLP1*, en el que se muestra la localización de las cajas de unión a Rlm1 (posiciones relativas al ATG) y la región amplificada en los experimentos de ChIP (línea horizontal). **(B)** Relación entre la cinética de entrada de la RNA Pol II al promotor de *MLP1* y la cinética de expresión del gen *MLP1*, en la cepa WT sometida al tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml). La unión o tasa de enriquecimiento de la Pol II en el gen *MLP1* de la cepa tratada vs la no tratada, fue analizada mediante ChIP, en la región MLP1PRO2. Los datos cuantitativos fueron obtenidos mediante qPCR, utilizando el promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización (ver *Materiales y Métodos*). Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos individuales.

### **3.1. La unión de la RNA Pol II al promotor de *MLP1* es dependiente del correcto funcionamiento de la ruta CWI**

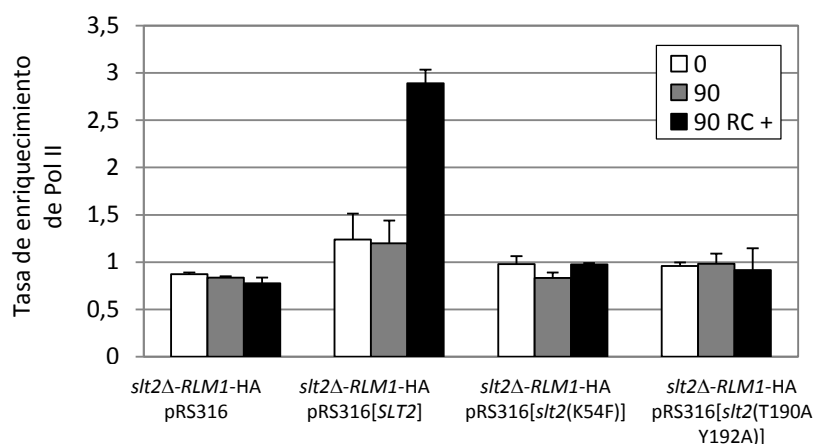
A continuación, se estudió la entrada de la RNA Pol II en ausencia de elementos claves de la ruta CWI, como la MAPK Slt2 y el factor de transcripción Rlm1. Para ello, se realizaron experimentos de ChIP a partir de las cromatinas aisladas de los mutantes *slt2Δ* y *rlm1Δ* tras 90 y 180 minutos de tratamiento con RC. La inmunoprecipitación de cromatina se llevó a cabo con el anticuerpo anti-RNA Pol II y el DNA obtenido fue analizado por qPCR. En la figura 22, se observa cómo la entrada de la Pol II inducida por estrés, está totalmente bloqueada tanto en el mutante *slt2Δ* como en *rlm1Δ*, indicando que la funcionalidad de la ruta CWI es esencial para la entrada de la Pol II y por tanto, para la activación transcripcional en respuesta a estrés sobre la pared celular.



**FIGURA 22: La entrada de la Pol II al promotor de *MLP1* en condiciones de estrés depende de Rlm1 y Slt2.** La asociación de la Pol II al gen *MLP1* fue analizada por ChIP en una cepa silvestre y en los mutantes *rlm1Δ* y *slt2Δ*, tras el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml), durante los tiempos indicados. Dicha entrada fue analizada en la región MLP1PRO2 mediante qPCR utilizando el promotor de *VMA8* como control interno para la normalización. Los resultados se muestran como el ratio entre la tasa de enriquecimiento de las muestras tratadas vs las no tratadas (ver *Materiales y Métodos*). Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos individuales.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, decidimos estudiar si la actividad quinasa de Slt2 necesaria para la fosforilación de Rlm1, por un lado, y la fosforilación de Slt2 por las MAPKK Mkk1/2, por otro, eran esenciales para la entrada de la Pol II en los promotores. Para ello, se utilizaron diferentes versiones inactivas de *SLT2*. La cepa mutante *slt2Δ-RLM1-HA* fue transformada con los siguientes plásmidos centroméricos (cedidos por el Dr. H. Martín): (i) pRS316[*SLT2*], que expresa la forma silvestre del gen *SLT2*; (ii) pRS316[*slt2* (*K54F*)], que codifica la versión mutante *SLT2-K54F* que presenta una mutación dentro del sitio de unión a ATP, bloqueando su actividad catalítica, y (iii) pRS316[*slt2* (*T190A Y192A*)], que codifica la versión mutante *SLT2-T190A Y192A* que presenta una mutación dentro del sitio de unión a ATP, bloqueando su actividad catalítica.

]], que codifica la versión *SLT2-T190A/Y192A* que presenta sustituciones en dos sitios de fosforilación localizados en el *loop* de activación de Slt2, normalmente fosforilados por Mkk1/2. Sobre estas cepas incubadas o no en presencia de RC se llevaron a cabo experimentos de CHIP para estudiar la entrada de la Pol II en la región MLP1PRO2 del gen *MLP1*. En la figura 23, se observa como la unión de la RNA Pol II en la cepa transformada con la versión nativa de Slt2, desaparece en aquellas versiones que carecen de la capacidad para ser fosforiladas por las Mkks o de fosforilar a Rlm1. Estos resultados indican que la señalización a través de la ruta CWI es crítica para la unión de la RNA Pol II a los promotores de los genes de respuesta a estrés por RC.

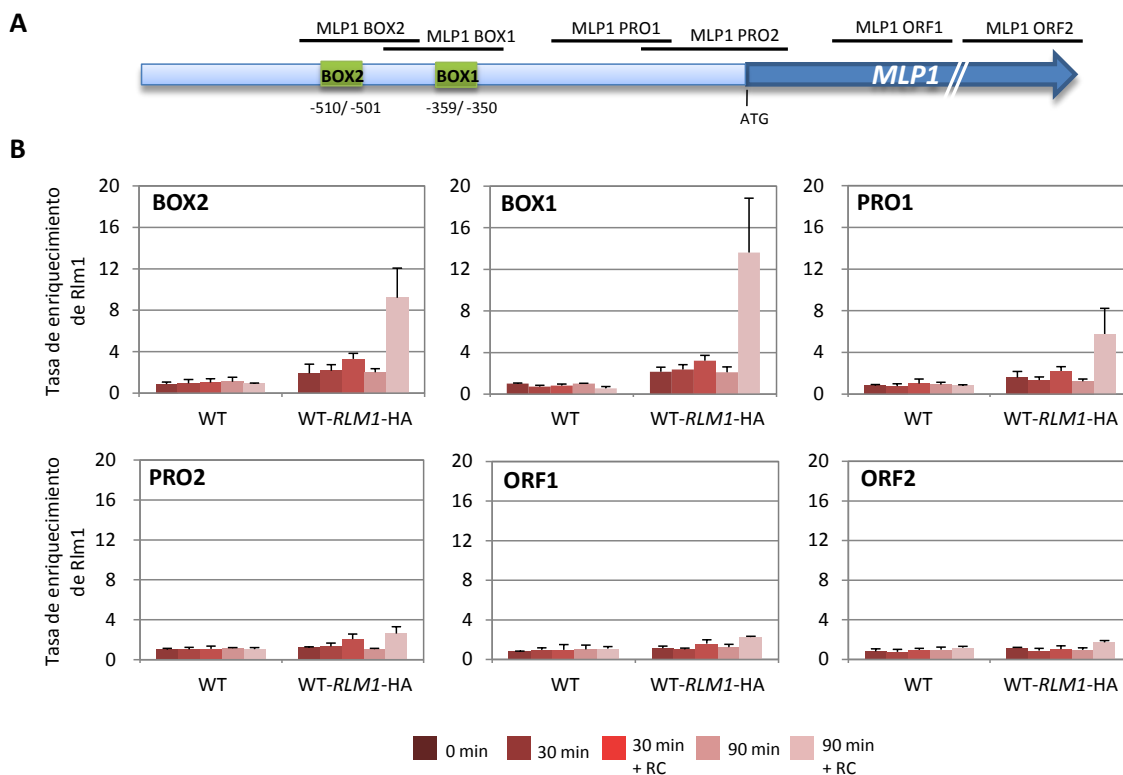


**FIGURA 23: El reclutamiento de la RNA Pol II depende de la actividad de Slt2.** La unión de la Pol II fue analizada en la región MLP1PRO2 en un mutante *slt2Δ* expresando Rlm1-HA, y transformado con los plásmidos pRS316, pRS316[*SLT2*], pRS316[*slt2* (K54F)] y pRS316[*slt2* (T190A Y192A)], antes ( $t=0$ ) y tras 90 min de crecimiento en ausencia (90) o presencia de 30  $\mu\text{g/ml}$  de RC (90 RC+). Los resultados obtenidos mediante qPCR fueron normalizados frente a la región promotora del gen *VMA8*, y los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

#### **4. Rlm1 SE ENCUENTRA UNIDO A MLP1 EN CONDICIONES BASALES Y SE RECLUTA ACTIVAMENTE EN CONDICIONES DE ESTRÉS**

A continuación, se decidió estudiar si el factor de transcripción Rlm1, interaccionaba *in vivo* con el gen *MLP1*, y si su reclutamiento a estas regiones estaba regulado por situaciones que comprometieran la integridad de la pared celular. Con este objetivo se aisló la cromatina a partir de una cepa silvestre BY4741 y una cepa silvestre portadora de una versión funcional del gen *RLM1* fusionado a 3 copias del epítipo HA, expresado desde su propio *locus* genómico (WT-*RLM1*-HA), tras 30 y 90 minutos de tratamiento con RC. La inmunoprecipitación de cromatina se realizó utilizando

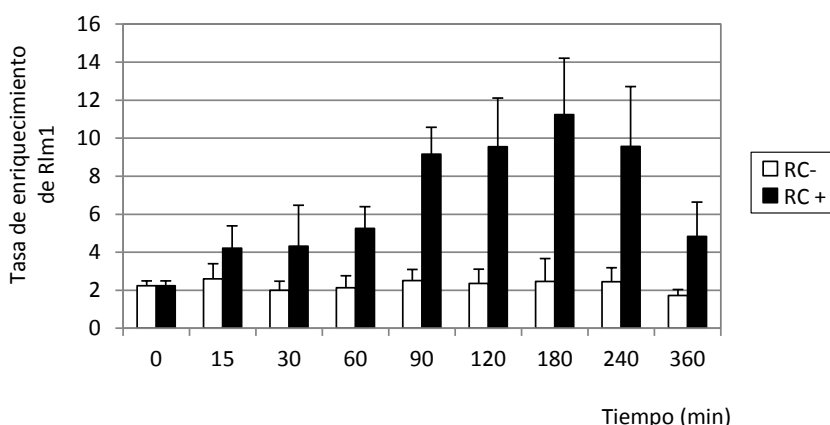
anticuerpos policlonales anti-HA (Abcam) y el DNA purificado se analizó por qPCR. La entrada de Rlm1 se estudió en diferentes regiones de *MLP1* (Figura 24A): las regiones MLP1BOX1 (-453/-313) y MLP1BOX2 (-548/-408), que incluyen los dos sitios de unión a Rlm1 (BOX1 y BOX2), regiones adyacentes dentro del promotor a las que se denominó MLP1PRO1 (-253/-98) y MLP1PRO2 (-143/+56), y dos regiones incluidas ya en el ORF del gen, MLP1ORF1 (+98/+250) y MLP1ORF2 (+555/+687). Como se muestra en la figura 24B, Rlm1 se encuentra unido en condiciones basales al promotor de *MLP1*, principalmente en la zona de las cajas de unión a Rlm1 (la tasa de enriquecimiento fue de 2x, comparada con la ausencia de entrada observada en una cepa silvestre sin epitopar [1x]), pero no al ORF. El tratamiento con RC induce el reclutamiento de Rlm1 hacia el promotor, presentando un ligero aumento a los 30 minutos y una entrada mucho más pronunciada a los 90 minutos de tratamiento, que alcanza valores máximos en las regiones MLP1BOX1 y MLP1BOX2 (entre 10 y 14x), y algo menores en la región MLP1PRO1. Sin embargo, la unión de Rlm1 es prácticamente indetectable en la región codificante del gen.



**FIGURA 24: Rlm1 ocupa el promotor de *MLP1* *in vivo* bajo condiciones basales y se recluta activamente al promotor en condiciones de estrés celular. (A)** Representación esquemática del gen *MLP1*, en el que se muestra la localización de las cajas de unión a Rlm1 en el promotor y las regiones analizadas en los experimentos de ChIP (mostradas como líneas horizontales). Los números indicados representan la posición relativa de la secuencia respecto al ATG. **(B)** La asociación de Rlm1-HA a lo largo del gen *MLP1* fue analizada en una cepa WT portadora o no de la versión epitopada de Rlm1-HA, antes y tras la adición de RC (30µg/ml) durante los tiempos indicados. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos anti-HA. La tasa de enriquecimiento de Rlm1-HA se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización (ver *Materiales y Métodos*). Las regiones analizadas están indicadas en la parte superior izquierda de cada panel.

#### **4.1. Cinética de entrada de Rlm1 al promotor de *MLP1* en condiciones de estrés**

Una vez realizado el estudio de unión de Rlm1 al promotor del gen *MLP1*, se analizó la cinética de unión de Rlm1 a la región MLP1BOX1, región donde se identificó el mayor nivel de unión de Rlm1, en condiciones de estrés. Con este objetivo, se llevaron a cabo experimentos de ChIP utilizando la cepa epitopada WT-*RLM1*-HA tratada y sin tratar con RC, recogiendo células a diferentes tiempos. Las muestras se procesaron del mismo modo que en el experimento anterior. Como se puede observar en la figura 25, la entrada de Rlm1 aumenta de forma progresiva, siendo máxima a las 3 horas de tratamiento. Tras este tiempo, la entrada va disminuyendo hacia los niveles iniciales, aunque todavía a las 6 horas de tratamiento se observa un enriquecimiento importante de Rlm1 (~4x). Estos resultados muestran que la cinética de reclutamiento de Rlm1-HA en el gen *MLP1*, se correlaciona completamente con el perfil de expresión para dicho gen, mostrado anteriormente (Figura 20).



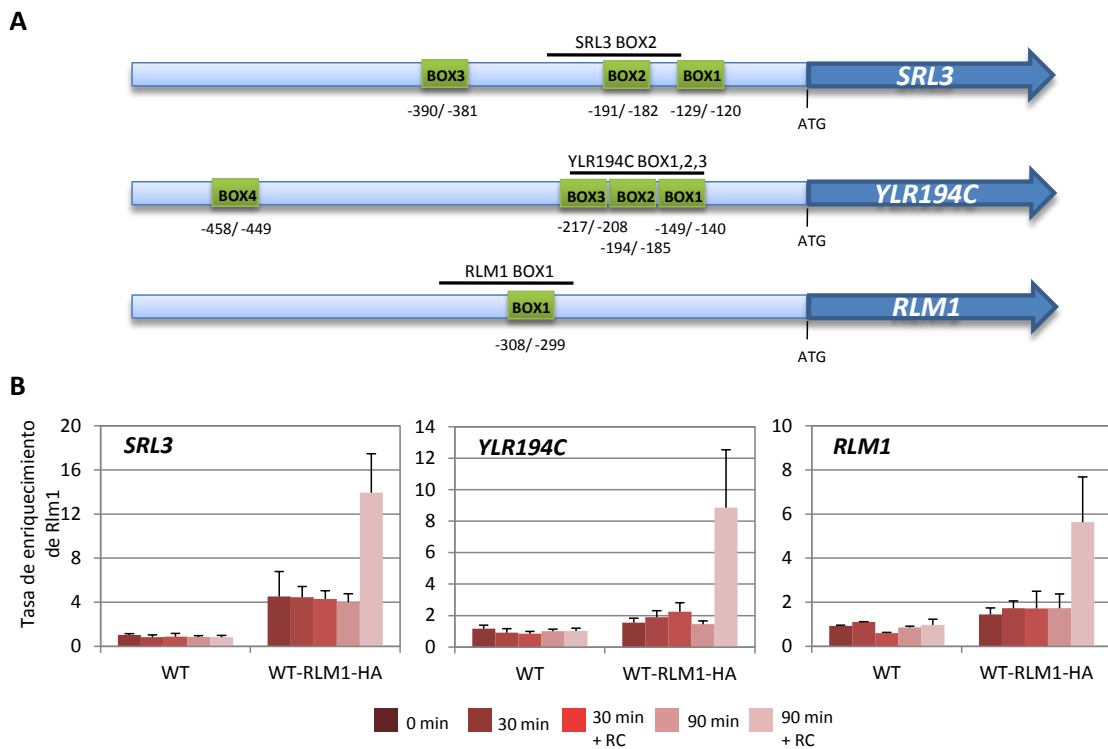
**FIGURA 25: Cinética de unión de Rlm1 al promotor de *MLP1* en presencia de estrés.** La asociación de Rlm1-HA al promotor de *MLP1* en la región MLP1BOX1, fue analizada mediante ChIP en una cepa silvestre expresando la versión epitopada de la proteína Rlm1-HA en ausencia y presencia de estrés sobre la pared celular (RC 30 µg/ml) a los tiempos indicados. La tasa de enriquecimiento de Rlm1-HA se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos individuales.

#### **4.2. Rlm1 ocupa los promotores de otros genes de la respuesta transcripcional mediada por la ruta CWI**

Con el fin de extender los estudios realizados sobre el gen *MLP1* a otros genes que forman parte de la respuesta de adaptación a situaciones que comprometen la integridad de la pared celular, se analizó la entrada de Rlm1 a los promotores de los genes *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*. Los dos primeros se encuentran altamente inducidos en situaciones de

estrés sobre la pared celular y *RLM1*, aunque se induce en menor medida, se incluyó también con el objetivo de estudiar cómo podía influir a nivel de promotor, el efecto de retroalimentación que Rlm1 ejerce sobre sí mismo al regular su propia expresión. En la figura 26A, se representa un esquema de los promotores de estos genes, en el que se incluye la localización de las diferentes cajas de unión a Rlm1.

Se llevaron a cabo experimentos de ChIP, analizando la unión de Rlm1 a *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*, antes y tras el tratamiento con RC, en la cepa silvestre (WT) y en la cepa epitopada (WT-*RLM1*-HA). Las regiones analizadas fueron aquellas que contenían las cajas de unión para este mismo factor de transcripción: *SRL3*BOX2 (-265/-135), *YLR194C*BOX1,2,3 (-254/-123) y *RLM1*BOX1 (-402/-271) (Figura 26A). Como se observa en la figura 26B, Rlm1 se une en condiciones basales a los promotores de estos genes, igual que ocurría en *MLP1*, siendo la tasa de enriquecimiento mucho mayor para el gen *SRL3*. En todos los casos, se observó la entrada de Rlm1 en condiciones de activación, tras 90 min de tratamiento con RC.

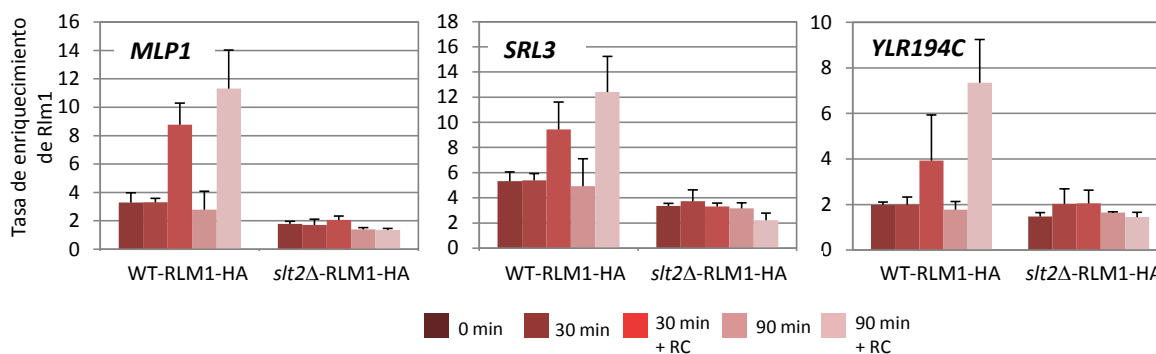


**FIGURA 26: Unión de Rlm1 a otros genes dependientes de estrés sobre la pared celular. (A)** Representación esquemática de los genes *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*, indicando las posiciones de los sitios de unión a Rlm1 y las regiones analizadas mediante ChIP (mostradas como líneas horizontales). **(B)** Asociación de Rlm1-HA a los promotores de los genes indicados, tras el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml) durante 30 y 90 minutos, en una cepa WT expresando o no la versión epitopada de Rlm1. Los resultados obtenidos mediante qPCR fueron normalizados respecto al promotor de *VMA8*. Todos los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Por tanto, el patrón de entrada de Rlm1 en estos tres genes estudiados es muy similar al de *MLP1*, y confirma que Rlm1 se encuentra unido basalmente a los genes de respuesta a estrés cuya expresión depende de este factor de transcripción y que en condiciones de estrés se produce un incremento importante en el reclutamiento de Rlm1 a estos promotores.

#### **4.3. La entrada de Rlm1 a los promotores de los genes *MLP1*, *SRL3* e *YLR194C* depende de *Slt2***

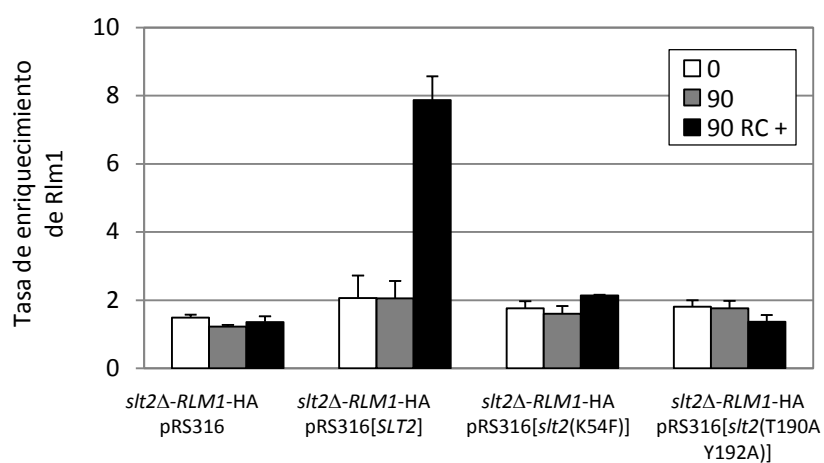
Dado que Rlm1 está regulado directamente por Slt2, se decidió estudiar si la entrada de Rlm1 dependía de la presencia de la MAPK, tanto en ausencia como en presencia de RC. Para ello, se aislaron las cromatinas de la cepa silvestre y del mutante *slt2Δ* que expresaban la fusión *RLM1-3xHA* desde su propio *locus* genómico (cepas WT-*RLM1-HA* y *slt2Δ-RLM1-HA*) y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-HA. El DNA obtenido se analizó por qPCR estudiando la tasa de enriquecimiento de Rlm1 en las regiones *MLP1BOX1*, *SRL3BOX2* e *YLR194CBOX1,2,3*. Como se muestra en la figura 27, en ausencia de tratamiento (condiciones basales), la entrada de Rlm1 en los promotores depende sólo parcialmente de la presencia de Slt2. Sin embargo, el reclutamiento de Rlm1 en condiciones de estrés se encuentra totalmente bloqueado en el mutante *slt2Δ*, tanto a los 30 como a los 90 minutos de tratamiento.



**FIGURA 27: El reclutamiento de Rlm1 depende de la presencia de Slt2.** La asociación de Rlm1-HA a los promotores de los genes indicados, fue analizada por ChIP en una cepa WT y en el mutante *slt2Δ*, expresando la proteína epitopada Rlm1-HA tras 30 y 90 min de crecimiento, en ausencia y presencia de RC (30  $\mu$ g/ml). La tasa de enriquecimiento de Rlm1-HA se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos individuales.

A continuación, se estudió la entrada de Rlm1 en presencia de las versiones inactivas de Slt2 presentadas en el apartado 3.1, utilizándose las mismas cromatinas empleadas anteriormente para analizar la entrada de la RNA Pol II. En este caso, las

cromatinas fueron inmunoprecipitadas utilizando anticuerpos anti-HA para estudiar la entrada de Rlm1 en la región MLP1BOX1 del gen *MLP1*. Como se muestra en la figura 28, se observó un enriquecimiento aproximado de 8x en el mutante *slt2Δ* transformado con el plásmido expresando la versión silvestre de *SLT2*. Sin embargo, dicha entrada se encontró totalmente bloqueada en las cepas transformadas con los plásmidos pRS316[*slt2* (K54F)] y pRS316[*slt2* (T190A Y192A)], indicando que la activación de Slt2 por Mkk1/2 y la fosforilación de Rlm1 por Slt2 son necesarias para la asociación de Rlm1 a los promotores de la respuesta en condiciones de activación de la ruta CWI. Sin embargo, la inactivación de la MAPK no afectó de forma importante la asociación de Rlm1 con el promotor del gen *MLP1* en ausencia de tratamiento.



**FIGURA 28: El reclutamiento de Rlm1 depende de la actividad de Slt2.** La unión de Rlm1 fue analizada en la región MLP1BOX1 en un mutante *slt2Δ* expresando Rlm1-HA, y transformado con los plásmidos pRS316, pRS316[*SLT2*], pRS316[*slt2* (K54F)] y pRS316[*slt2* (T190A Y192A)], tras el tratamiento con RC (30 μg/ml, 90 minutos). Los resultados obtenidos mediante qPCR fueron normalizados frente a la región promotora del gen *VMA8*, y los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

## 5. PARTICIPACIÓN DEL COMPLEJO SWI/SNF EN LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI

Sobre la base de los genes identificados en el *screening* descrito en *Antecedentes* y dado que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral era la caracterización de elementos de la maquinaria transcripcional implicados en la regulación de la expresión en situaciones de estrés que comprometen la integridad celular, se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de los grupos funcionales relevantes. Se utilizó en primera instancia la herramienta bioinformática *GeneCoDis2* (<http://genecodis.dacya.ucm.es>). Esta aplicación informática integra la información de diferentes fuentes para la anotación o búsqueda de

características biológicas que frecuentemente co-ocurren en un conjunto de genes (Nogales-Cadenas *et al.*, 2009; Carmona-Saez *et al.*, 2007). De esta manera, *GeneCoDis2* permite comparar las funciones de los genes identificados en el ensayo frente al número de genes totales en el genoma que presentan esas mismas funciones y asigna un determinado nivel de significación estadística para cada grupo funcional representado en el grupo de interés, tomando como referencia la probabilidad de encontrar esa asociación al azar a nivel genómico. Se confirmó así que la categoría funcional más importante está relacionada con el proceso de transcripción, destacando también el grupo anotado como organización de la pared celular y los grupos de endocitosis y fosforilación de proteínas (Tabla 11).

**TABLA 11: Clasificación funcional de los genes identificados en el *screening*.** El análisis se realizó utilizando la herramienta bioinformática *GeneCoDis2* y la asignación de "Proceso biológico" de acuerdo con GO (*Gene Ontology*).

Proceso biológico	Valor estadístico	Genes	Genes identificados	Genes genoma
GO:0006350 Transcripción	2,00E-07	PA34, NGG1, SNF6, NOT5, RRN10, LDB7, PUF4, CYC8 MED2, SWR1, GAL11, CAD1, SGF29, SPT7, SPT4, SPT8, CGI121, SWI6, THO2, RLM1, SNF2, RPB4, ADR1, RPA49, RTF1, IES6, BUR2, GCN5, HOG1, SPT3, PAF1, ARG82, TAF14, SWI3, ELF1, SWI4, ADA2, RPA14, AFT1, SNF11	40	527
GO:0007047 Organización de la pared celular	0.00011784	ECM30, PTC1, RLM1, SLT2, GIN4, SLA1, FPS1, SAC6, SWI4, SBE22, EDE1, BCK1	12	150
GO:0006897 Endocitosis	0.00034313	YCK1, RCY1, SLA1, BZZ1, SAC6, MYO3, AKR1, EDE1	8	79
GO:0006468 Fosforilación de proteínas	0.0098165	VPS15, YCK1, VPS34, SLT2, GIN4, PBS2, HOG1, BCK1	8	134

Un análisis bioinformático adicional utilizando la herramienta bioinformática *Funspec* (<http://funspec.med.utoronto.ca/>), permitió la identificación de diversos complejos proteicos dentro de los 40 genes incluidos anteriormente en el grupo de transcripción. En la tabla 12 se presenta la distribución de los diferentes complejos proteicos implicados en la regulación de la expresión génica identificados y su correspondiente significación estadística. Entre ellos destacan principalmente el complejo remodelador de cromatina ATP-dependiente SWI/SNF (p-value  $1,55 \times 10^{-6}$ ) y el complejo acetilador de histonas SAGA (p-value  $1,89 \times 10^{-9}$ ). Asimismo, es importante destacar un importante número de genes que se encuentran formando parte de la RNA Pol II y, aunque con menor significación estadística, de la RNA Pol I.

Debido a que muchos de los complejos relacionados con la modificación de la cromatina comparten las mismas subunidades, además del complejo SAGA, aparecen también los complejos SLIK y ADA, aunque el valor estadístico de esta agrupación es algo menor.

**TABLA 12: Complejos proteicos de los genes identificados en el *screening* pertenecientes al grupo de transcripción.** Este análisis se realizó mediante la herramienta bioinformática *Funspec*.

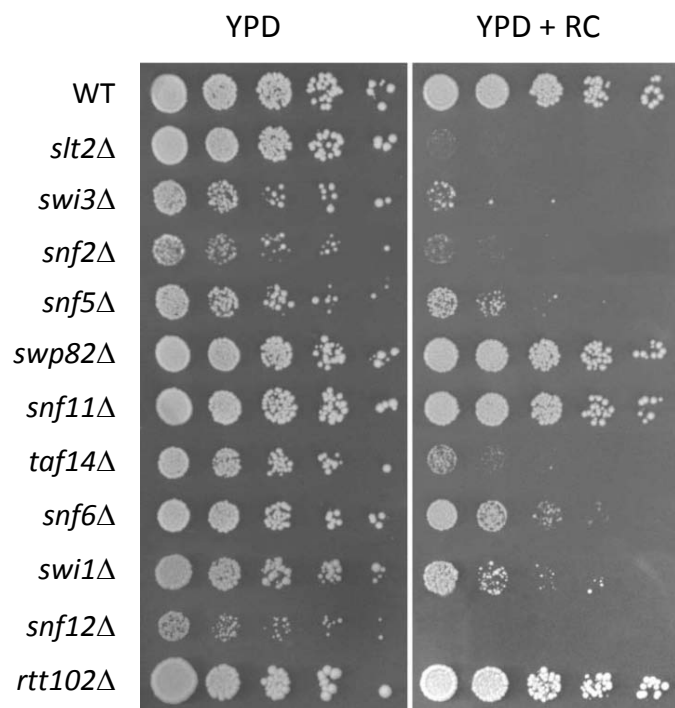
Complejos	Valor estadístico	Genes	Genes identificados	Genes genoma
SAGA complex	1,89E-09	<i>SPT7 SGF29 NGG1 SPT3 ADA2 GCN5 SPT8</i>	7	16
SWI/SNF transcription activator complex	1,55E-06	<i>SNF11 SNF6 SWI3 SNF2 TAF14</i>	5	10
SAGA-like complex (SLIK)	2,04E-03	<i>SPT7 SPT3 ADA2</i>	3	5
RNA Polymerase II	2,60E-03	<i>RPB4 RPA34 RPA49 TAF14</i>	4	17
ADA complex	4,07E-03	<i>NGG1 ADA2 GCN5</i>	3	6
SBF complex	3,58E-02	<i>SWI4 SWI6</i>	2	2
RNA polymerase I	7,16E-02	<i>RPA14 RPA34 RPA49</i>	3	14
Kornberg's mediator (SRB) complex	0.000254	<i>MED2 GAL11 TAF14</i>	3	21

## 6. LA INACTIVACIÓN DEL COMPLEJO SWI/SNF CAUSA HIPERSENSIBILIDAD A ESTRÉS DE PARED CELULAR

Para caracterizar en detalle la importancia del complejo SWI/SNF en el mantenimiento de la integridad celular se estudió en primer lugar si cepas de levadura delecionadas en cada uno de los 10 genes no esenciales codificantes de las subunidades del complejo SWI/SNF, incluyendo *RTT102*, presentaban alteraciones en la pared celular. Con este fin se realizaron diferentes ensayos fenotípicos dirigidos a poner de manifiesto defectos en la pared celular de dichos mutantes, incluyendo la sensibilidad a Rojo Congo y zimoliasa. Las cepas utilizadas procedieron de la colección de cepas de levadura generadas en el fondo genético BY4741. En esta colección no se encontraban los mutantes haploides *swi1Δ* y *snf12Δ* por lo que fue necesario obtenerlos a partir de las cepas diploides heterocigóticas correspondientes, según se detalla en *Materiales y Métodos*.

Los ensayos de sensibilidad a Rojo Congo se realizaron mediante siembra por dilución en gota en medio sólido. La concentración de droga empleada fue de 50 μg/ml y la incubación se realizó a 30°C. Los niveles de crecimiento se determinaron a las 72 horas. Como se muestra en la figura 29, los mutantes *swi3Δ*, *snf2Δ/swi2Δ*, *snf5Δ*, *taf14Δ*, *swi1Δ*, *snf6Δ* y *snf12Δ* resultaron ser hipersensibles a la droga. El crecimiento del resto de

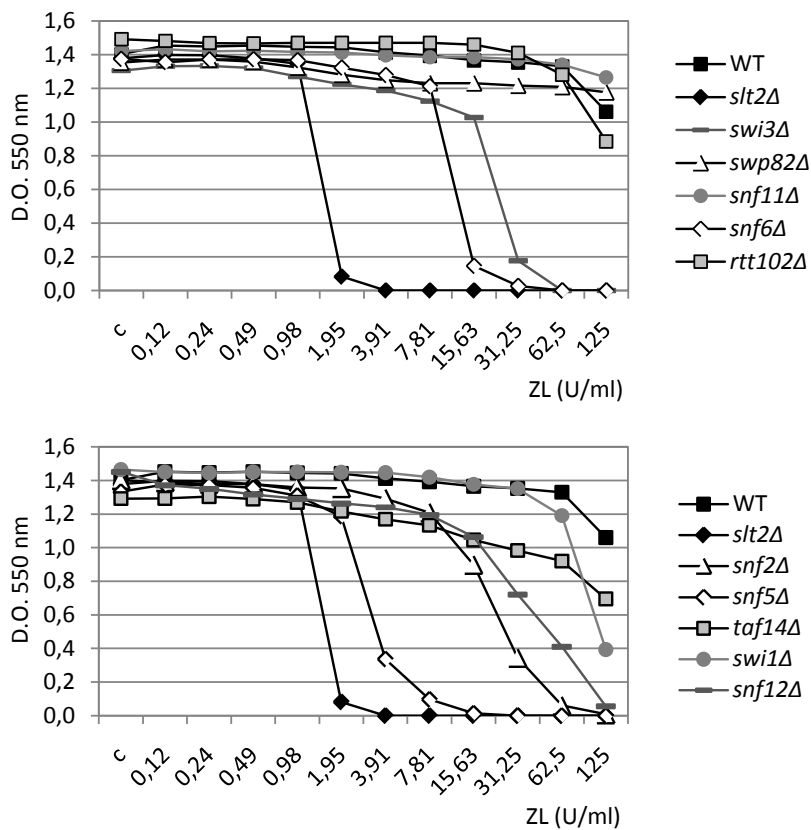
mutantes en medio YPD suplementado con Rojo Congo no se vio afectado respecto a la cepa silvestre.



**FIGURA 29:** La delección de los genes que codifican para subunidades del complejo SWI/SNF produce células hipersensibles a RC. Las cepas indicadas fueron inoculadas por el método de dilución en gota en medio sólido (placas de YPD), sin (control) y con 50 µg/ml de RC. Las placas fueron incubadas durante 72 horas a 30°C. Además de la cepa silvestre se incluye el mutante *slt2Δ* como control positivo de sensibilidad

Los experimentos de sensibilidad a zimoliasa (ZL) de la cepa silvestre y de los correspondientes mutantes, se llevaron a cabo mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido. Como se muestra en la figura 30, los mutantes *swi3Δ*, *snf6Δ*, *snf2Δ*, *snf5Δ* y *snf12Δ* mostraron una elevada hipersensibilidad a zimoliasa con valores de CMI inferiores a 125 U/ml, mientras que en el caso de la cepa silvestre este valor se encontraba por encima de 125 U/ml. Además, también mostraron cierta hipersensibilidad, aunque en menor medida, los mutantes *taf14Δ* y *swi1Δ*, mientras que el crecimiento de los mutantes *rtt102Δ*, *swp82Δ* y *snf11Δ* fue similar al de la cepa silvestre. Existe, por tanto, una buena correlación entre los resultados de sensibilidad a Rojo Congo y zimoliasa, en las cepas analizadas.

Todos estos resultados sugieren que aunque con diferentes grados de afectación, dependiendo de la subunidad, mutaciones en el complejo SWI/SNF dan lugar a defectos en la integridad de la pared celular.



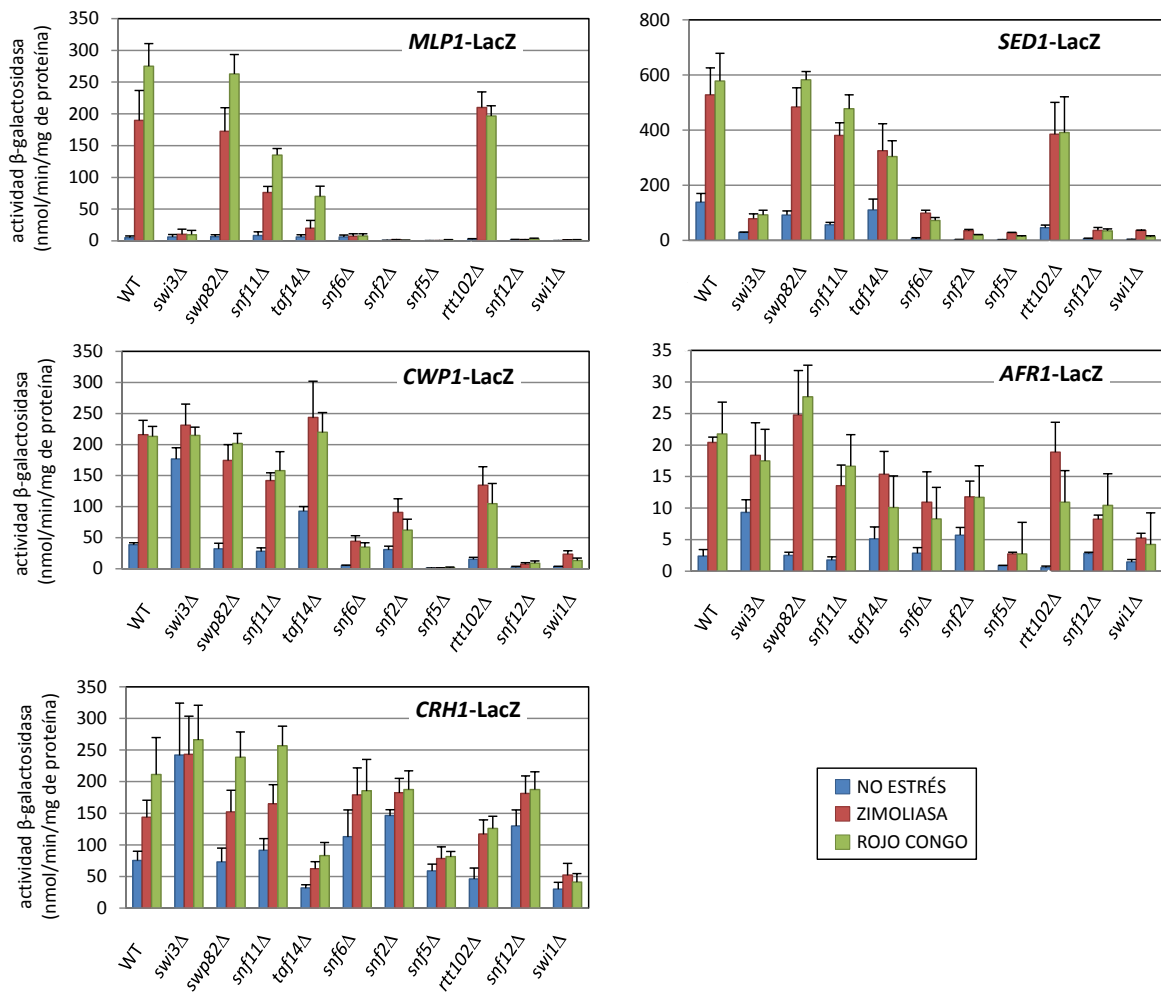
**FIGURA 30:** La delección de los genes que codifican para subunidades del complejo SWI/SNF produce células sensibles a zimoliasa. Los experimentos de sensibilidad a zimoliasa se llevaron a cabo en placas multipocillo, en medio líquido (YPD), inoculadas con  $\sim 10^4$  células por pocillo y concentraciones crecientes de zimoliasa 20T (0,12-125 U/ml). C representa el control sin droga. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 horas, midiéndose posteriormente la D.O. a 550 nm. Además de la cepa silvestre se incluye el mutante *slt2Δ* como control de sensibilidad.

## 7. PARTICIPACIÓN DE LAS DIFERENTES SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SWI/SNF EN LA ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL MEDIADA POR LA RUTA CWI

El requerimiento del complejo SWI/SNF para la supervivencia celular en presencia de compuestos que alteran la integridad de la pared celular, nos llevó a analizar la participación de cada una de las subunidades del complejo en la activación de varios genes de la respuesta a estrés sobre esta estructura. Con este objetivo se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en los mutantes en todas las subunidades no esenciales del complejo SWI/SNF, transformados individualmente con los plásmidos *MLP1-LacZ*, *CRH1-LacZ*, *SED1-LacZ*, *CWP1-LacZ* y *AFR1-LacZ*. Estos plásmidos incluyen fusiones transcripcionales del promotor correspondiente de cada uno de estos genes al gen *lacZ*. Los experimentos se realizaron en ausencia y en presencia de RC y zimoliasa, tras 4 horas de tratamiento.

Como se observa en la figura 31, la inducción de la expresión en condiciones de activación de todos los genes ensayados que se produce en una cepa silvestre se

encuentra, en todos los casos, comprometida en los mutantes *swi3Δ*, *snf5Δ*, *snf6Δ*, *swi1Δ*, *snf12Δ* y *snf2Δ*. Sólo la activación transcripcional del gen *MLP1*, se encuentra también disminuida en los mutantes *taf14Δ* y *snf11Δ*. Sin embargo, la eliminación de las subunidades Swp82 y Rtt102, y en la mayoría de los casos, de Snf11 y Taf14, no produce ninguna alteración importante en los niveles de activación transcripcional, con respecto a los observados para la cepa silvestre. Es de destacar el aumento de expresión de *CWP1*, *AFR1* y *CRH1* en el mutante *swi3Δ* en ausencia de estrés, lo que indica que en estos casos Swi3 tiene un papel en el control de la expresión en condiciones basales.



**FIGURA 31:** Análisis de la expresión de los genes *CRH1*, *MLP1*, *AFR1*, *SED1* y *CWP1* en cepas mutantes en diferentes subunidades del complejo SWI/SNF. La activación transcripcional de los genes indicados se cuantificó en la cepa WT y en los distintos mutantes de los genes que codifican para las subunidades del complejo SWI/SNF transformados con los plásmidos reporteros (*MLP1-LacZ*, *SED1-LacZ*, *CWP1-LacZ*, *AFR1-LacZ* y *CRH1-LacZ*) correspondientes. Los niveles transcripcionales fueron analizados mediante ensayos de actividad β-galactosidasa en células sometidas o no al tratamiento con RC y zimoliasa [RC 30 μg/ml y ZL 0,4 U/ml] durante 4 horas.

Todos estos resultados indican que el complejo SWI/SNF participa en la regulación de la expresión en respuestas de adaptación a situaciones de estrés que afectan a la integridad de la pared celular, siendo las subunidades Swi3, Snf2, Snf5, Snf6, Swi1 y Snf12 esenciales para esta regulación. Cabe destacar también la existencia de un alto grado de correlación entre los fenotipos de alteración de la pared de los mutantes del complejo SWI/SNF descritos en el apartado anterior y el bloqueo de la activación transcripcional en estas condiciones, lo que sugiere que este bloqueo es el responsable de que las células no puedan sobrevivir en condiciones de estrés.

## **8. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GLOBAL UTILIZANDO MICROARRAYS DE DNA**

Sobre la base de los resultados anteriores, se decidió estudiar el papel de SWI/SNF en la respuesta transcripcional global mediada por la ruta CWI. Para ello, se analizó el patrón de expresión de la cepa silvestre BY4741 y del mutante *swi3Δ*, tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés sobre la pared celular. Se eligió este mutante ya que la subunidad Swi3 es una de las más importantes desde el punto de vista de integridad del complejo SWI/SNF, además de haberse descrito diversas interacciones genéticas del gen *SWI3* con otros genes relacionados con la pared celular como *SWI4* (Collins *et al.*, 2007; Costanzo *et al.*, 2010), *CHS5* (Lesage *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2004), *CHS3*, *SLT2*, *MNN10*, *GAS1*, *BGL2*, *FKS1* (Costanzo *et al.*, 2010) y *KRE6* (Tong *et al.*, 2004). Estos experimentos se llevaron a cabo en células en fase de crecimiento logarítmico, creciendo en medio rico YPD a 24°C, en ausencia y presencia de Rojo Congo (30 µg/ml) y zimoliasa 100T (0,4 U/ml), durante 4 y 3 horas, respectivamente. Los perfiles transcripcionales fueron caracterizados utilizando *microarrays* de DNA de la plataforma Affymetrix (la metodología experimental se describe en *Materiales y Métodos*).

### **8.1. Análisis de los perfiles globales de expresión del mutante *swi3Δ* en ausencia de estrés**

Aunque nuestro principal objetivo era estudiar el papel del complejo SWI/SNF en condiciones de activación de la ruta CWI, quisimos también analizar sobre la base de la regulación de la expresión basal de *CWP1*, *CRH1* y *AFR1* por SWI/SNF (ver apartado 7), el perfil de expresión del mutante *swi3Δ* comparado con el de la cepa silvestre BY4741 en ausencia de estrés. El análisis de los ratios de expresión *swi3Δ*/BY, reveló la inducción

(ratio *swi3Δ*/BY  $\geq$  2) de 255 genes en dicho mutante (Anexo 1, Tabla 1). Estos genes se encontrarían reprimidos por Swi3 en condiciones normales de crecimiento. Por el contrario, 115 genes se encuentran reprimidos en estas condiciones (ratio *swi3Δ*/BY  $\leq$  0,5), indicando que estos genes estarían regulados positivamente por Swi3 (Anexo 1, Tabla 2). Dentro del grupo de genes que presentan elevados niveles de RNAm en el mutante *swi3Δ*, destacan los relacionados funcionalmente con transcripción, transporte, metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de aminoácidos y genes de función desconocida. En cuanto a los genes reprimidos en ausencia de Swi3, destacan aquellos implicados en el metabolismo del fosfato, como los genes *PHO3*, *PHO5*, *PHO11*, *PHO8*, *PHO84* y *PHO89*.

En trabajos previos desarrollados por otros grupos se habían analizado, utilizando *microarrays* de DNA, los genes cuya expresión en condiciones basales eran dependientes de dos subunidades del complejo SWI/SNF, Snf2 y Swi1 (Sudarsanam et al., 2000). Estos resultados fueron comparados con los nuestros para el mutante *swi3Δ*. En la figura 32 se muestran diagramas de Venn comparativos de las respuestas de inducción y represión de estos mutantes. De los 255 genes inducidos en el mutante *swi3Δ* en nuestro estudio, solo 54 (21%) y 38 (15%) genes coincidían con los inducidos en los mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ*, respectivamente. Por otro lado, de los 115 reprimidos en el mutante *swi3Δ*, 53 y 57 eran comunes a lo presentado en los mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ*, respectivamente. En este caso, los genes comunes representan aproximadamente para ambos casos un 50% de la respuesta. Aunque hay que tener en cuenta que las plataformas utilizadas son diferentes, estos datos comparativos parecen sugerir una regulación de la expresión específica para las diferentes subunidades, especialmente para los genes reprimidos por Swi3 en condiciones basales.

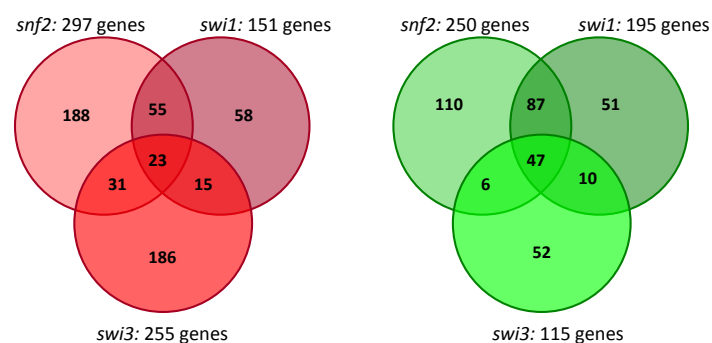


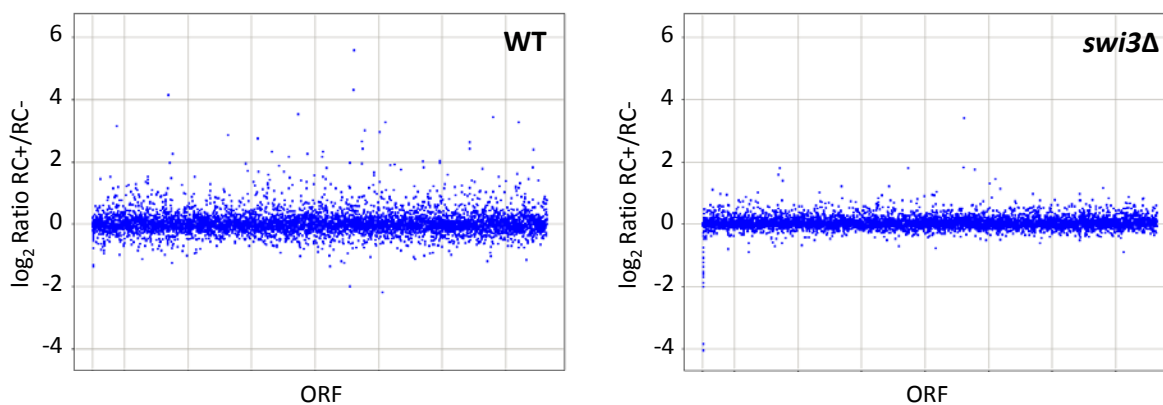
FIGURA 32: Diagramas de Venn en los que se muestran los genes inducidos en color rojo y los genes reprimidos en color verde para los mutantes *snf2Δ*, *swi1Δ* y *swi3Δ* en condiciones basales. Las intersecciones muestran los genes comúnmente activados o reprimidos en cada mutante.

## **8.2. Análisis de la respuesta transcripcional a Rojo Congo y zimoliasa en la cepa silvestre**

A continuación, se estudiaron los cambios transcripcionales de *S. cerevisiae* al tratamiento con drogas que alteran la integridad de la pared celular en la cepa silvestre (BY4741) y en el mutante *swi3Δ*. El análisis de los datos de *microarrays* comparando los niveles de RNAm de la cepa BY4741 tratada con RC (30 μg/ml, 4 horas) frente a la misma cepa no tratada, reveló que el tratamiento con RC induce en la cepa silvestre una respuesta transcripcional que implica la inducción de 128 genes (ratios BY-RC/BY ≥ 2) y la represión de 15 (ratios BY-RC/BY ≤ 0,5), mientras que la zimoliasa (0,4 U/ml, 3 horas) induce la expresión de 197 genes y la represión de 11. En total, 92 de estos genes se indujeron en ambas condiciones (Anexo 2). Funcionalmente, la respuesta común para ambos estímulos presenta un amplio grupo de genes relacionados con la biogénesis y organización de la pared celular (genes *PIR3*, *YLR194C*, *CRH1*, *YPS3* y *GSC2*), transducción de señales (genes *MLP1*, *BAG7* y *AFR1*) y transporte (genes *YPT53*, *YKE4* y *MCH5*). También destaca un elevado número de genes de función desconocida. Los resultados obtenidos son muy similares (70% de coincidencia) a los observados previamente en nuestro laboratorio (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009), empleando plataformas de *microarrays* de DNA y condiciones de tratamiento diferentes, si bien el número de genes inducidos obtenidos en este trabajo son para ambos estímulos mucho más numerosos (128 genes *vs* 38 inducidos tras 4 horas de tratamiento con RC y 197 genes inducidos por 0,4 U/ml de ZL-3 h *vs* 78 inducidos por una concentración de 0,8 U/ml de ZL-3 h).

## **8.3. Análisis de la respuesta transcripcional a Rojo Congo en el mutante *swi3Δ***

En contraste con la inducción de 128 genes en la cepa silvestre como consecuencia del tratamiento con RC (30 μg/ml, 4 h), el análisis de los datos de expresión de la cepa *swi3Δ* tratada con RC frente a la no tratada, indicó que sólo se inducen 14 genes tras el tratamiento (ratio *swi3Δ*-RC/*swi3Δ* ≥ 2). Además, la mayoría de estos genes muestran una expresión significativamente reducida respecto a la cepa silvestre (Figura 33). Estos resultados sugieren, por tanto, que la respuesta de activación transcripcional mediada por RC en una cepa silvestre, depende mayoritariamente de la presencia de Swi3.



**FIGURA 33:** Gráfica de dispersión de los ratios normalizados de expresión génica en las cepas WT y *swi3Δ*. El  $\log_2$  del ratio de expresión génica (tratamiento/sin tratamiento) fue representado frente al correspondiente ORF, utilizando el programa informático *Spotfire*.

Con el fin de establecer de forma más precisa la dependencia de la respuesta transcripcional mediada por RC respecto a Swi3, se obtuvo la relación del ratio en el mutante (*swi3Δ*-RC/*swi3Δ*) versus la cepa silvestre (BY-RC/BY). Se consideró un valor arbitrario de 0,65 como punto de corte para definir una reducción significativa en la expresión génica. Además, se consideraron como genes no inducidos, aquellos con un ratio en el mutante  $\leq 1,6$ . Utilizando este análisis, de los 128 genes inducidos por RC en la cepa BY4741, sólo 7 (5%) presentaron valores de ratio *swi3Δ*-RC/*swi3Δ* vs BY-RC/BY superiores a 0,65 y por tanto se consideraron independientes de *SWI3* para su activación transcripcional. El resto de genes que presentaron una expresión significativamente aumentada (121), se inducen de manera *SWI3*-dependiente.

Dado que, como se ha mostrado anteriormente, *SWI3* controla la expresión basal de un importante grupo de genes, quisimos saber en qué genes la dependencia de la respuesta transcripcional a RC en una cepa silvestre respecto a *SWI3* estaba relacionada con el control basal mediado por *SWI3* o si por el contrario, Swi3 era necesaria para la activación transcripcional de estos genes en presencia de estrés. Para ello, se llevó a cabo un segundo análisis comparativo estableciéndose el ratio *swi3Δ*/BY vs BY-RC/BY. Utilizando el mismo umbral de corte, se puede concluir que de los 121 genes inducidos por RC de forma *SWI3*-dependiente, 97 (76% de la respuesta) mostraron una activación transcripcional dependiente de *SWI3*, mientras que en 24 de ellos (19%) lo que se produce es una dependencia de *SWI3* para la expresión basal del gen.

En la figura 34 se presenta un *clustering* jerárquico de los ratios de tres comparaciones distintas: a) BY-RC vs BY; b) *swi3Δ*-RC vs *swi3Δ* y c) *swi3Δ* vs BY. Este

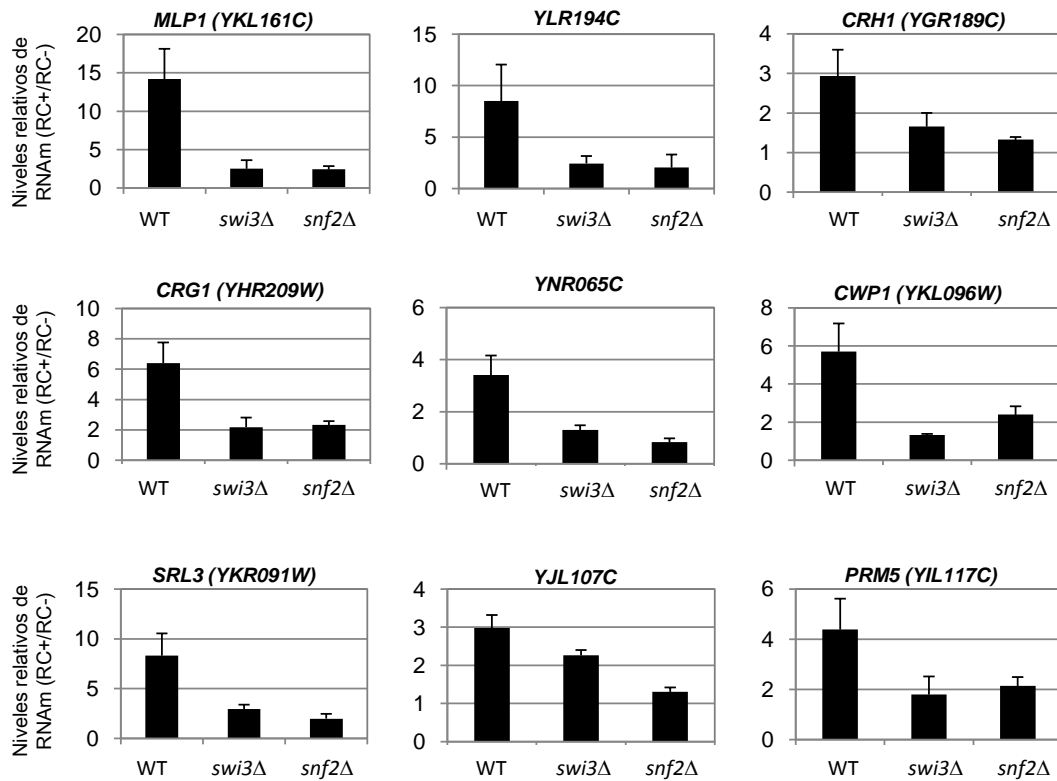


Como se muestra en la tabla 13, no se encontraron diferencias significativas entre estos tres grupos en relación a la distribución funcional de los genes incluidos en cada uno de ellos respecto a la respuesta global.

**TABLA 13: Distribución funcional de los genes inducidos por el tratamiento con RC, en los grupos I, II y III, según su dependencia respecto a *SWI3*.** La anotación se realizó utilizando la información disponible en las bases de datos *SGD* y *Proteome*.

Grupo funcional	Respuesta a RC en la cepa BY4741	Dependencia de <i>SWI3</i>		
		Grupo I	Grupo II	Grupo III
Desconocido	44	33	9	2
Biogénesis y organización de la pared celular	20	15	4	1
Transducción de señales	14	11	3	-
Transporte	10	10	-	-
Respuesta a estrés	9	6	2	1
Metabolismo de carbohidratos	6	5	1	-
Metabolismo de lípidos	4	3	1	-
Metabolismo de aminoácidos	3	3	-	-
Morfogénesis	3	3	-	-
Modificación de proteínas	3	-	1	2
Transcripción	3	1	2	-
Metabolismo de DNA	2	2	-	-
Conjugación	2	2	-	-
Biogénesis y organización de organelas	2	2	-	-
Esporulación	2	1	1	-
Metabolismo de poliaminas	1	-	-	1
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>97</b>	<b>24</b>	<b>7</b>

Los datos obtenidos con los perfiles globales de expresión fueron confirmados mediante ensayos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se analizaron los niveles de expresión de varios genes en mutantes del complejo SWI/SNF y en la cepa silvestre, creciendo en presencia y ausencia de RC durante 2 horas. Como se muestra en la figura 35, la activación transcripcional de los genes *MLP1*, *YLR194C*, *CRH1*, *CRG1*, *YNR065C*, *CWP1*, *SRL3*, *YJL107C* y *PRM5*, fue dependiente no sólo de *SWI3*, sino también de *SNF2* que codifica para la subunidad ATPasa del complejo SWI/SNF.



**FIGURA 35: Swi3 y Snf2 son necesarios para la activación transcripcional bajo situaciones de estrés sobre la pared celular.** Los niveles de expresión de los genes indicados fueron analizados mediante RT-qPCR en la cepa silvestre y en los mutantes *swi3Δ* y *snf2Δ* tras el tratamiento con RC (30  $\mu\text{g/ml}$ , 2 horas). Los valores relativos de expresión proceden de la comparación en cada caso de los niveles de RNAm de cada gen de muestras tratadas vs no tratadas, utilizando el gen *ACT* como control interno. Los datos presentados corresponden a la media de tres experimentos independientes.

#### **8.4. Análisis de la respuesta transcripcional a Rojo Congo en el mutante *rlm1Δ***

Con el fin de estudiar el papel funcional del factor de transcripción Rlm1 en la respuesta al tratamiento por RC, se analizaron, utilizando *microarrays* de DNA, los perfiles globales de expresión de un mutante *rlm1Δ* expuesto o no al tratamiento con RC (30  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 4 horas. Para el análisis de los resultados obtenidos, se calculó el ratio  $(rlm1\Delta\text{-RC}/rlm1\Delta)/(\text{BY-RC}/\text{BY})$ , estableciéndose la dependencia de Rlm1 para la activación por RC, con valores inferiores a 0,65. De los 128 genes inducidos por RC en una cepa silvestre, el 90% (115 genes) requieren de Rlm1 para su activación transcripcional (Figura 34), lo que está de acuerdo con los datos publicados previamente por nuestro laboratorio (García *et al.*, 2004), utilizando una plataforma diferente de *microarrays* de DNA.

Cabe señalar que, si bien la mayoría de los genes regulados por Rlm1 requieren también del complejo SWI/SNF para su activación transcripcional, en el grupo III, encontramos un pequeño grupo de genes cuya activación transcripcional es independiente de Swi3, pero que si requiere Rlm1 para su inducción.

### **8.5. Análisis global de la respuesta transcripcional al tratamiento con zimoliasa en el mutante *swi3Δ***

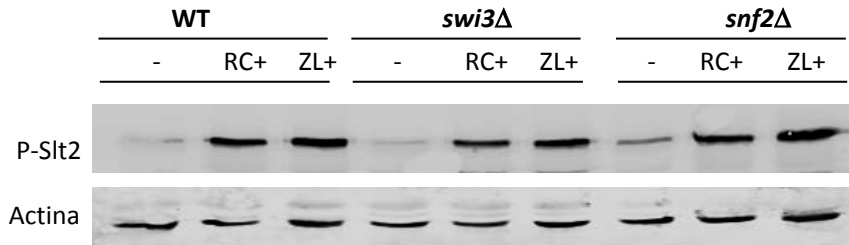
De forma similar a la expuesta para el Rojo Congo, se analizaron los perfiles globales de expresión en respuesta a zimoliasa (0,4 U/ml, 3 horas) tanto en una cepa silvestre (BY4741) como en el mutante *swi3Δ*. La zimoliasa induce la expresión de 197 genes y reprime la expresión de 11 genes en la cepa silvestre. Por otro lado, los genes inducidos en el mutante *swi3Δ* por el tratamiento con zimoliasa fueron 39, presentando muchos de ellos un ratio de inducción considerablemente reducido respecto al observado en la cepa silvestre. El análisis comparativo de los ratios *swi3Δ*-ZL/*swi3Δ* vs BY-ZL/BY y *swi3Δ*/BY vs BY-ZL/BY, estableció también la presencia de 3 grupos de genes respecto a la dependencia de *SWI3* para la activación transcripcional. El 48% de la respuesta observada en la cepa silvestre tras el tratamiento con zimoliasa es dependiente de *SWI3* en condiciones de activación, un 40% de los genes inducidos en la cepa silvestre están controlados en condiciones basales por *SWI3* y el 12% de la respuesta observada en la cepa silvestre es totalmente independiente de *SWI3*.

Estos resultados indican un comportamiento similar por parte del mutante *swi3Δ* en la respuesta producida por el tratamiento con RC y zimoliasa, confirmando la importancia del complejo SWI/SNF para la activación transcripcional de genes inducidos en el mecanismo de adaptación a daños sobre la pared celular.

## **9. LA ELIMINACIÓN DEL COMPLEJO SWI/SNF NO AFECTA A LA FOSFORILACIÓN DE LA MAPK Sit2.**

Con el objeto de descartar la posibilidad de que el bloqueo en la activación transcripcional por RC y ZL de los mutantes del complejo SWI/SNF estuviera relacionado con alteraciones en el correcto funcionamiento de la ruta de integridad celular como consecuencia de la eliminación del complejo, se analizó el estado de fosforilación de la MAPK Sit2, como indicador del nivel de activación de la ruta, en los mutantes *swi3Δ* y

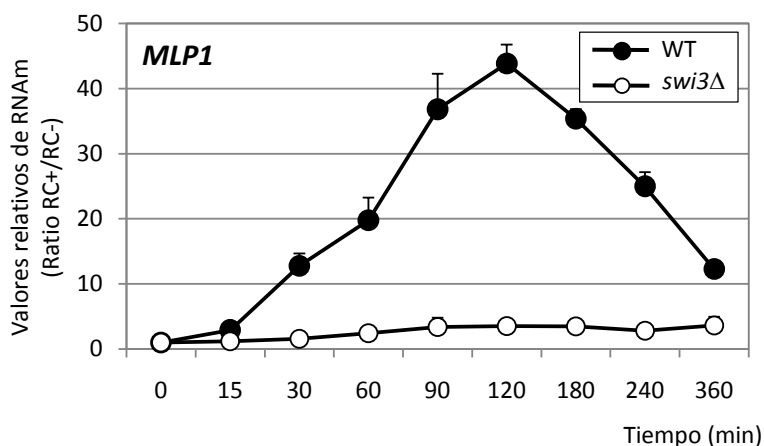
*snf2Δ*, crecidos en presencia de RC y ZL. Como se observa en la figura 36, los niveles de activación de Slt2 por RC y ZL fueron semejantes en los mutantes *swi3Δ* y *snf2Δ* en la cepa silvestre, lo que indica que la ruta CWI está operativa en los mutantes *swi3Δ* y *snf2Δ*.



**FIGURA 36:** La fosforilación de Slt2 en condiciones de estrés no depende del complejo SWI/SNF. La activación de Slt2 fue analizada por *western-blotting* utilizando anticuerpos específicos frente a la forma doblemente fosforilada de la MAPK, en la cepas WT, *swi3Δ* y *snf2Δ*, sometidas a situaciones de estrés (RC 30  $\mu\text{g/ml}$  y ZL 0,4 U/ml, 3 horas). La carga de proteína se monitorizó utilizando anticuerpos anti-actina.

## 10. LA EXPRESIÓN DEL GEN *MLP1* ES DEPENDIENTE DE Swi3 DURANTE EL TRATAMIENTO CON RC

Teniendo en cuenta que la expresión de *MLP1* tras 2 y 4 horas de tratamiento con RC (30  $\mu\text{g/ml}$ ) depende completamente del complejo SWI/SNF (Figuras 34 y 35), quisimos caracterizar la cinética completa de expresión de *MLP1* en el mutante *swi3Δ*. Para ello, se analizaron mediante RT-qPCR los niveles de mRNA de este gen en el mutante *swi3Δ* en ausencia o presencia de RC a lo largo del tiempo. Como se observa en la figura 37, la inducción de la transcripción del gen *MLP1* se encuentra totalmente bloqueada en el mutante *swi3Δ* (respecto a la cepa WT), confirmando la dependencia de esta subunidad a lo largo de toda la respuesta.



**FIGURA 37:** La expresión de *MLP1* depende del complejo SWI/SNF a lo largo del tratamiento con RC. Cinética de expresión del gen *MLP1* en el WT y mutante *swi3Δ* durante el tratamiento con RC (30  $\mu\text{g/ml}$ , de 0 a 6 h). El RNAm total fue analizado por RT-qPCR y los ratios de activación se calcularon comparando en cada tiempo los niveles de RNAm de las muestras tratadas vs no tratadas, utilizando el gen *ACT* como control interno. Los datos presentados corresponden a la media de al menos tres experimentos independientes.

## 11. LA UNIÓN DE LA RNA Pol II A LOS PROMOTORES DEPENDE DEL COMPLEJO SWI/SNF

A continuación, decidimos estudiar si la unión de la RNA Pol II se encontraba afectada en ausencia del complejo SWI/SNF, al igual que ocurre con los niveles transcripcionales del gen *MLP1*. Para ello, se aislaron las cromatinas procedentes del mutante *swi3Δ*, a diferentes tiempos del tratamiento con RC. La inmunoprecipitación se realizó utilizando el anticuerpo anti-Pol II y se analizó el DNA purificado mediante qPCR, amplificando la región MLP1PRO2. Como se observa en la figura 38, en contraste con la entrada activa de la Pol II al promotor como consecuencia del tratamiento con RC en la cepa silvestre (Figura 21), ésta se encuentra significativamente reducida en el mutante *swi3Δ* durante todos los tiempos estudiados.

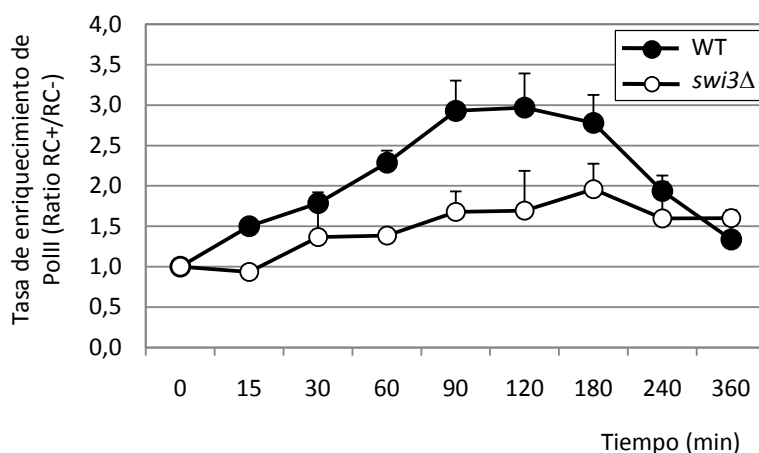
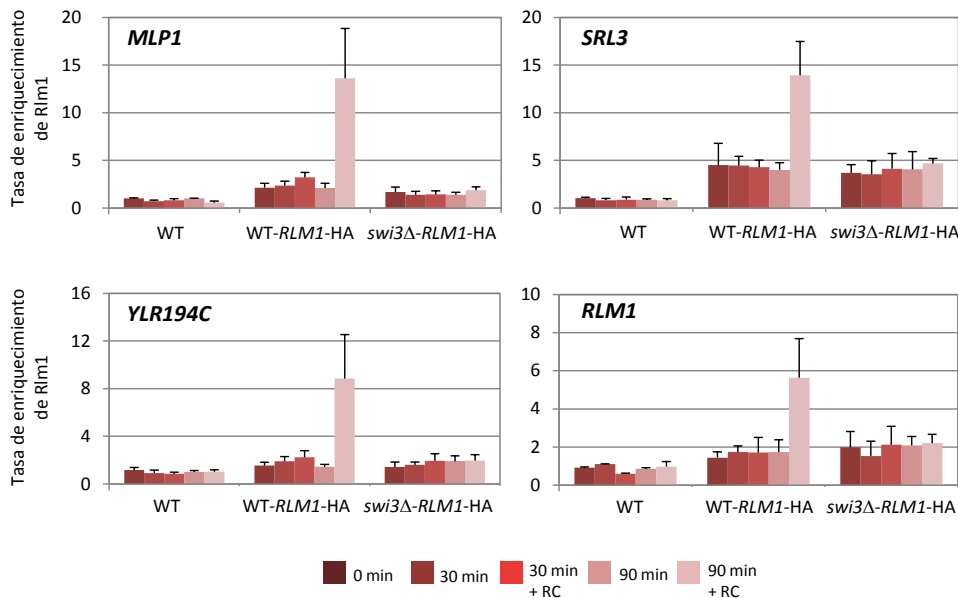


FIGURA 38: La unión de la Pol II al promotor de *MLP1* se encuentra disminuida en el mutante *swi3Δ*. La unión de la Pol II se analizó mediante ChIP en la cepa WT y el mutante *swi3Δ* sometidos al tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml), durante los tiempos indicados. La entrada de la Pol II fue analizada en la región MLP1PRO2, utilizando el gen *VMA8* como control interno para la normalización. Los resultados se expresan como la tasa de enriquecimiento de la muestra tratada vs la muestra sin tratar. Los datos representan la media y desviación estándar de tres experimentos individuales.

Un efecto similar sobre la entrada de la maquinaria transcripcional se pudo comprobar analizando mutantes de la ATPasa del complejo SWI/SNF, *Snf2*, tras 90 y 180 minutos de tratamiento con RC (datos no mostrados). Aunque, los niveles de reclutamiento de la RNA Pol II en los mutantes *swi3Δ* y *snf2Δ* no están totalmente bloqueados, sí se encuentran considerablemente reducidos con respecto a los presentados por la cepa silvestre. De acuerdo con los datos obtenidos en los experimentos transcripcionales, este nivel de reclutamiento de la Pol II en los mutantes *swi3Δ* y *snf2Δ* no es suficiente para inducir la expresión del gen *MLP1*, en situaciones en las que la integridad de la pared celular se encuentre comprometida.

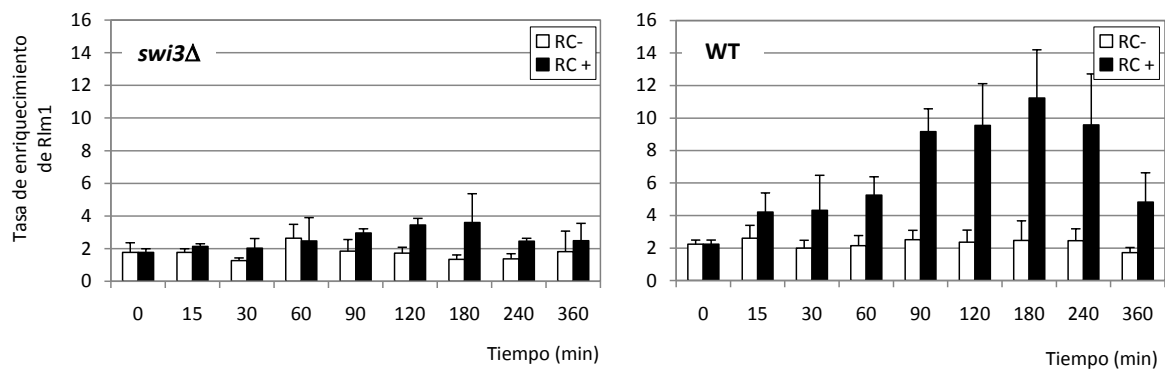
## 12. LA ENTRADA DE Rlm1 A LOS PROMOTORES DE LOS GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN DEPENDE DE Swi3

Dado que el reclutamiento de la Pol II y la correspondiente inducción de los genes de respuesta al tratamiento con RC se eliminaban en ausencia de *SWI3*, decidimos estudiar si la entrada de Rlm1 a los promotores de los genes de la respuesta dependía del complejo SWI/SNF. Con este objetivo se realizaron experimentos de ChIP empleando una cepa silvestre sin epitopar, así como una cepa silvestre y el mutante *swi3Δ* portando una versión funcional del gen *RLM1* fusionado al epítipo 3xHA, expresado desde su propio *locus* genómico (WT-*RLM1*-HA y *swi3Δ*-*RLM1*-HA). Se asiló la cromatina a partir de estas cepas, tratadas o no con RC durante 30 y 90 min, y se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-HA. El DNA obtenido se analizó mediante qPCR para determinar la entrada de Rlm1 en el promotor de los genes *MLP1*, *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*. Como se muestra en la figura 39, la unión de Rlm1 al promotor de todos los genes estudiados en condiciones de activación, es totalmente dependiente de Swi3. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la cepa silvestre y el mutante *swi3Δ* en ausencia de tratamiento, indicando que la unión de Rlm1 en condiciones basales es independiente del complejo SWI/SNF.



**FIGURA 39: La unión de Rlm1 depende de Swi3 en condiciones de activación.** La asociación de Rlm1-HA fue analizada en las regiones *MLP1*BOX1, *SRL3*BOX2, *YLR194C*BOX1,2,3 y *RLM1*BOX1 de los genes indicados, mediante experimentos de ChIP en una cepa WT sin epitopar y en las cepas WT y *swi3Δ* expresando Rlm1-HA, durante el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml) a 0, 30 y 90 min. Los resultados obtenidos mediante qPCR fueron normalizados respecto al promotor de *VMA8*. Todos los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

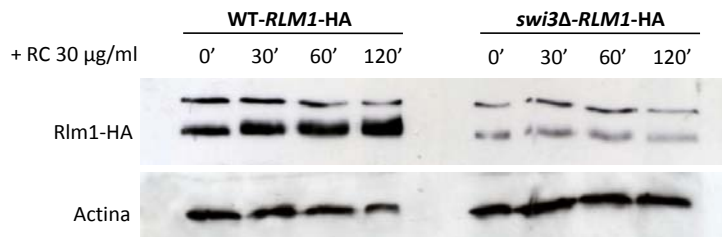
Para poder determinar si la dependencia en la entrada de Rlm1 con respecto a Swi3 era completa durante el tratamiento con agentes que desestabilizan la pared celular, decidimos estudiar la cinética de reclutamiento del factor de transcripción en ausencia de Swi3 y compararla con la de la cepa silvestre (Apartado 4.1). Con este objetivo, se llevaron a cabo experimentos de ChIP utilizando el mutante *swi3Δ* epitopado (*swi3Δ-RLM1-HA*) en presencia y ausencia de RC, recogiendo células a diferentes tiempos de tratamiento. Las muestras se procesaron del mismo modo que en los experimentos anteriores. Como se observa en la figura 40, la unión de Rlm1 en condiciones basales (ausencia de tratamiento) es independiente de SWI/SNF en todos los tiempos ensayados. El reclutamiento de Rlm1 al promotor de *MLP1* depende, sin embargo, del complejo SWI/SNF a lo largo del tratamiento con RC, si bien a tiempos de máxima entrada de Rlm1 en la cepa silvestre (2-3 horas) se observa cierta entrada residual del factor de transcripción en el mutante *swi3Δ*.



**FIGURA 40: Cinética de unión de Rlm1 al promotor de *MLP1* en ausencia de Swi3.** La asociación de Rlm1-HA al promotor de *MLP1* en la región MLP1BOX1, fue analizada mediante ChIP en el mutante *swi3Δ* expresando la versión epitopada de la proteína Rlm1-HA en ausencia y presencia de estrés sobre la pared celular (RC 30  $\mu\text{g/ml}$ ) a los tiempos indicados. A la derecha se incluye la cinética de reclutamiento de Rlm1 en la cepa silvestre, estudiada en las mismas condiciones y presentada en el apartado 4.1, para facilitar su comparación. La tasa de enriquecimiento de Rlm1-HA se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos individuales.

Teniendo en cuenta que la expresión de *RLM1* en condiciones de activación está regulada por SWI/SNF, decidimos estudiar los niveles de la proteína Rlm1 en ausencia de Swi3. Para ello, analizamos las cepas WT (BY4741) y *swi3Δ* expresando fusiones *RLM1-3xHA*, integradas en su propio *locus* en el genoma. Se crecieron ambas cepas en ausencia y presencia de RC y se evaluó a diferentes tiempos la cantidad de Rlm1 mediante *western-blotting*, utilizando anticuerpos anti-HA. Como se observa en la figura 41, en la cepa WT se produce un aumento de los niveles de la proteína Rlm1 en condiciones de activación respecto a los presentados en condiciones basales, de acuerdo con la inducción de la

expresión de *RLM1* de forma Rlm1-dependiente. Además, se observa un ligero cambio en el patrón de movilidad electroforética de Rlm1 en condiciones de activación ("shift"), como era de esperar por el efecto de la fosforilación de esta proteína por Slt2 en estas condiciones. El análisis de los niveles de Rlm1 en una cepa *swi3Δ* (Figura 41) reveló una sorprendente disminución de los niveles de esta proteína tanto en condiciones basales como en condiciones de activación por RC.

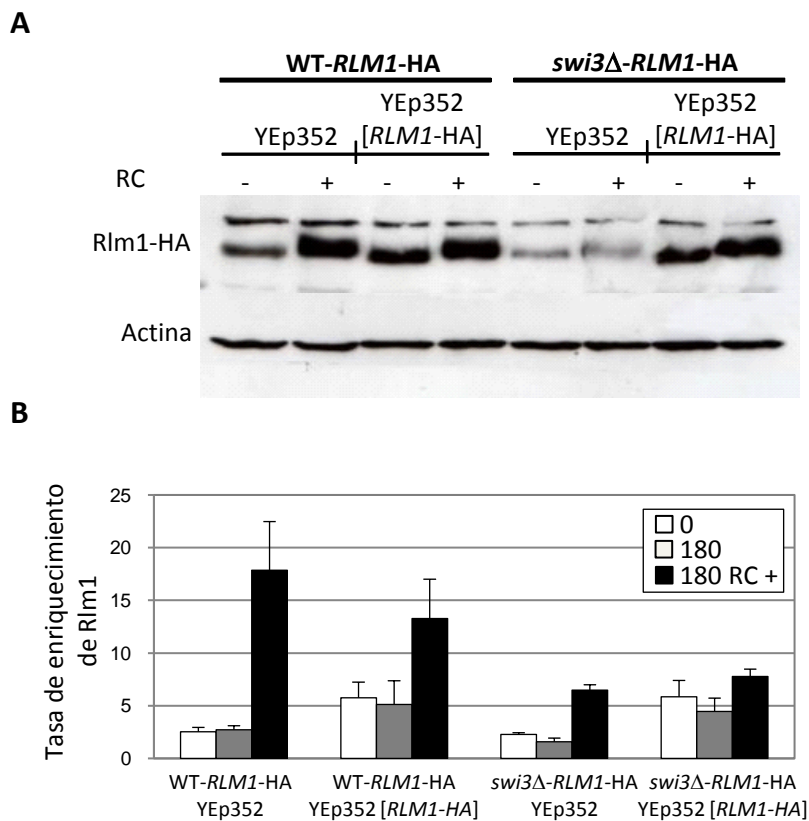


**FIGURA 41: Los niveles de Rlm1 proteína se encuentran disminuidos en el mutante *swi3Δ*.** Los niveles de Rlm1 fueron analizados por *western-blotting*, en la cepa WT y *swi3Δ* expresando la versión epitopada de Rlm1-HA, tras el tratamiento con RC (30 μg/ml) a los tiempos indicados. La proteína fue detectada utilizando anticuerpos anti-HA y como control del nivel de proteína total se muestran los niveles de actina.

Este resultado planteaba la cuestión de si la disminución de los niveles de Rlm1 en la célula en ausencia de Swi3, podría estar limitando la entrada de este factor de transcripción a los promotores de los genes de estrés. Con objeto de estudiar este efecto, se sobreexpresó la fusión *RLM1-3xHA* desde el plásmido episómico YEp352-*[RLM1-HA]*, tanto en la cepa silvestre *WT-RLM1-HA*, como en el mutante *swi3Δ-RLM1-HA*. En primer lugar, se analizaron mediante *western-blotting* los niveles de Rlm1 en ambas cepas en ausencia de estrés y en condiciones de activación. Como era de esperar, la expresión de Rlm1 en la cepa *WT-RLM1-HA* desde un plásmido episómico da lugar a mayores niveles de proteína que los encontrados en la misma cepa sin transformar, que expresa Rlm1-HA desde su propio *locus* cromosómico (Figura 42A). Además, como se muestra en la misma figura, la sobreexpresión de Rlm1 en el mutante *swi3Δ-RLM1-HA* restaura los niveles de Rlm1 hasta unos niveles similares a los de la cepa silvestre, tanto en condiciones basales, como en condiciones de activación. Cabe destacar que también se produce un cambio de movilidad electroforética ("shift") en Rlm1 en condiciones de estrés, tanto en la cepa silvestre *WT-RLM1-HA*, como en la cepa *swi3Δ-RLM1-HA* transformadas con el plásmido YEp352-*[RLM1-HA]*.

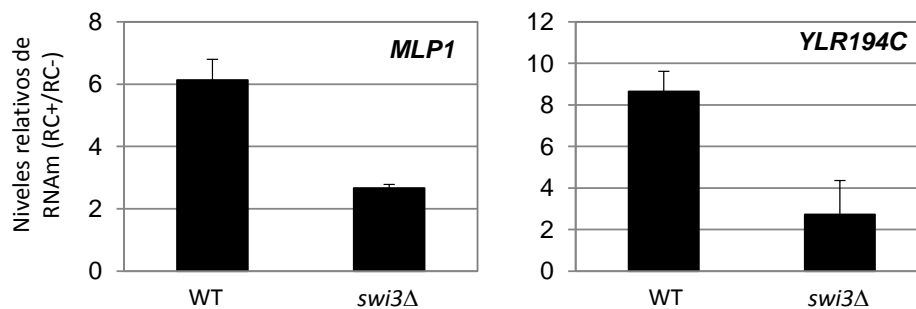
Una vez comprobado que la sobreexpresión de Rlm1 restaura los niveles normales de Rlm1 en el mutante *swi3Δ*, se estudió mediante experimentos de CHIP, la entrada de Rlm1 en la región BOX1 del promotor del gen *MLP1* en estas mismas cepas y en las mismas condiciones. Se aislaron las cromatinas y se inmunoprecipitaron utilizando el

anticuerpo anti-HA. El DNA purificado se analizó por qPCR. En la figura 42B, se muestran los resultados del experimento de ChIP. La sobreexpresión de Rlm1 en una cepa silvestre aumenta la entrada de Rlm1 en el promotor de *MLP1* en condiciones basales (aproximadamente un 5x de enriquecimiento comparado con el 2x de la cepa transformada con el plásmido vacío, en estas condiciones). En condiciones de activación, se induce el reclutamiento de Rlm1 (13x) al promotor de *MLP1* en la cepa WT-*RLM1*-HA transformada con el plásmido YEp352-[*RLM1*-HA]. Por otro lado, la sobreexpresión de Rlm1 desde el plásmido YEp352-[*RLM1*-HA] en el mutante *swi3Δ*, produce un aumento en la entrada de Rlm1 en condiciones basales. Sin embargo, pese a que los niveles de Rlm1 en esta cepa son similares a los de la cepa WT, no se recupera la entrada del factor de transcripción al promotor de *MLP1* en condiciones de activación.



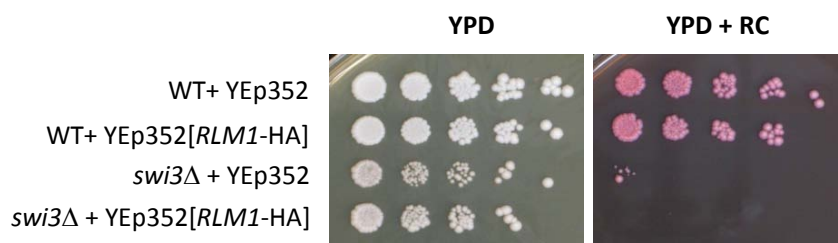
**FIGURA 42: La sobreexpresión de Rlm1 recupera los niveles de Rlm1 en *swi3Δ*, pero no su entrada a los promotores en condiciones de activación. (A)** La expresión de Rlm1-HA desde un plásmido multicopia restaura los niveles de Rlm1 similares a los encontrados en la cepa WT tanto en condiciones basales como en activación (RC) en el mutante *swi3Δ*. Las cepas WT y *swi3Δ* expresando Rlm1-HA fueron transformadas con el plásmido YEp352-[*RLM1*-HA] y el correspondiente vector vacío YEp352. Los transformantes fueron crecidos en fase exponencial y sujetos o no a estrés de pared (RC 30  $\mu$ g/ml, 3 horas). La cantidad de Rlm1-HA fue determinada mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-HA y la cantidad de proteína total fue monitorizada utilizando anticuerpos anti-actina. **(B)** La sobreexpresión de Rlm1 en el mutante *swi3Δ* no restaura su unión a los promotores. La unión de Rlm1-HA a la región MLP1BOX1 fue analizada mediante ChIP y normalizada respecto a la región promotora de *VMA8* en las mismas células y condiciones descritas en el panel A.

Adicionalmente, se analizó la expresión de los genes *MLP1* e *YLR194C* en la cepa silvestre BY4741 y en el mutante *swi3Δ* transformados con el plásmido YEp352-*[RLM1-HA]*, cuantificándose mediante qPCR los niveles de mRNA para ambos genes tras 3 horas de tratamiento con RC y en ausencia de estrés. Como se observa en la figura 43, la inducción transcripcional de los genes *MLP1* e *YLR194C* se encuentra bloqueada en el mutante *swi3Δ* transformado con el plásmido YEp352-*[RLM1-HA]*, a pesar de que los niveles de Rlm1 en esta cepa son similares a los de la WT.



**FIGURA 43:** La sobreexpresión de Rlm1 en el mutante *swi3Δ* en condiciones de estrés no restaura los niveles de inducción transcripcional de genes regulados por la ruta CWI de una cepa WT. Los niveles de de RNAm de *MLP1* e *YLR194C* fueron analizados por RT-qPCR en la cepa WT y en el mutante *swi3Δ* transformados con el plásmido YEp352-*[RLM1-HA]* y sometidos a tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml, 3 horas). Los valores relativos de expresión representan el ratio entre el RNAm de las muestras tratadas vs las no tratadas, utilizando el gen *ACT* como control interno. Los datos presentados corresponden a la media de al menos tres experimentos independientes.

En paralelo, comprobamos también mediante ensayos de sensibilidad por dilución en gota, si el fenotipo de hipersensibilidad a RC de un mutante *swi3Δ*, revertía por sobreexpresión de Rlm1. Como era de esperar, por todos los resultados anteriores, el mutante *swi3Δ* transformado con el plásmido YEp352-*[RLM1-HA]*, sigue siendo hipersensible a agentes que alteran la pared celular (Figura 44).

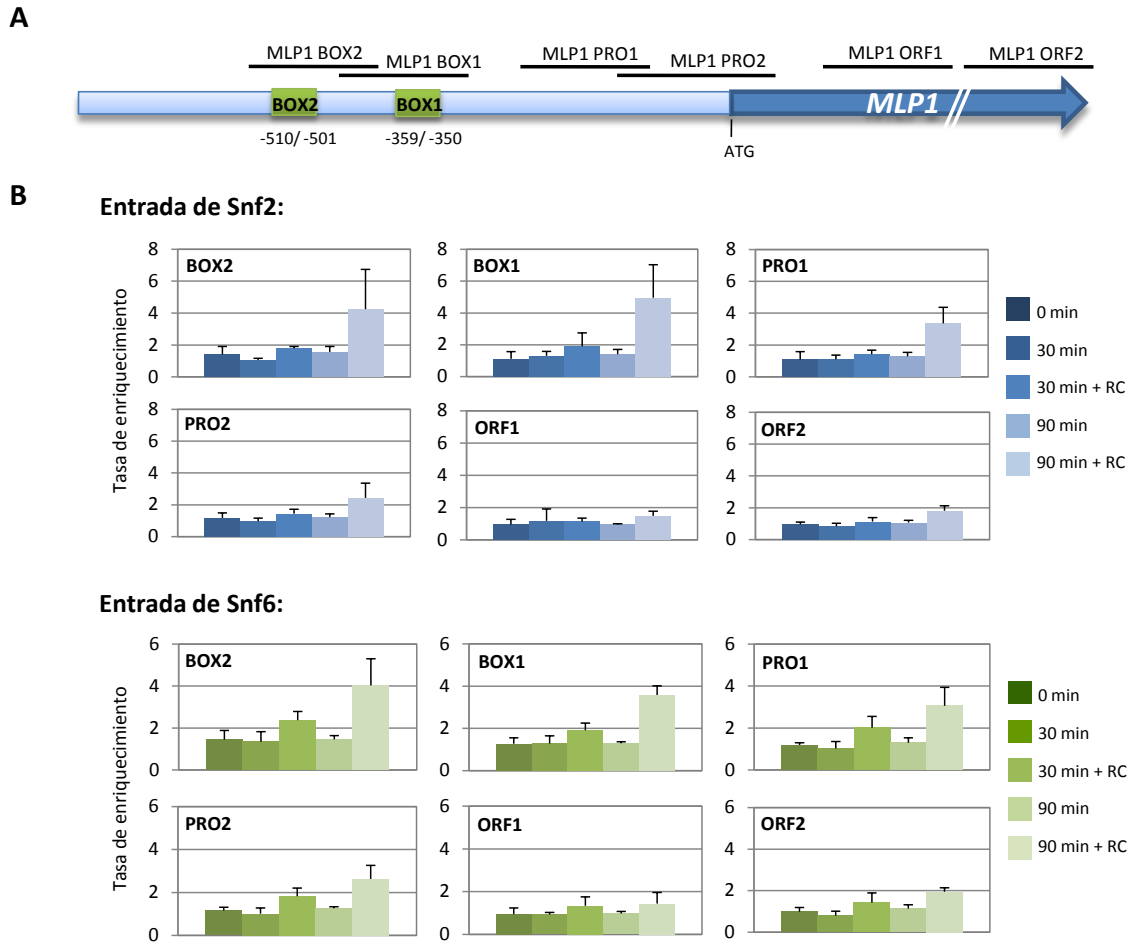


**FIGURA 44:** La sobreexpresión de Rlm1 en el mutante *swi3Δ* no revierte la hipersensibilidad de este mutante a RC. La cepa WT y el mutante *swi3Δ* expresando o no Rlm1-HA desde el plásmido multicopia YEp352-*[RLM1-HA]*, fueron inoculadas por el método de dilución en gota en placas de YPD con y sin RC (50  $\mu$ g/ml) e incubadas durante 72 horas a 30°C.

Todos estos resultados apoyan la idea de que el defecto en la activación transcripcional de los genes de respuesta a estrés sobre la pared celular del mutante *swi3Δ* no es consecuencia de la disminución en los niveles de Rlm1 en este mutante, sino del papel funcional del complejo SWI/SNF en la regulación de la expresión de los genes inducidos a través de la ruta CWI. Además, confirman: 1) que la ocupación basal por parte de Rlm1 de los promotores de los genes de respuesta a estrés sobre la pared celular no depende de *SWI3* y 2) que el reclutamiento de Rlm1 a estos genes en condiciones de activación es dependiente de *SWI3*.

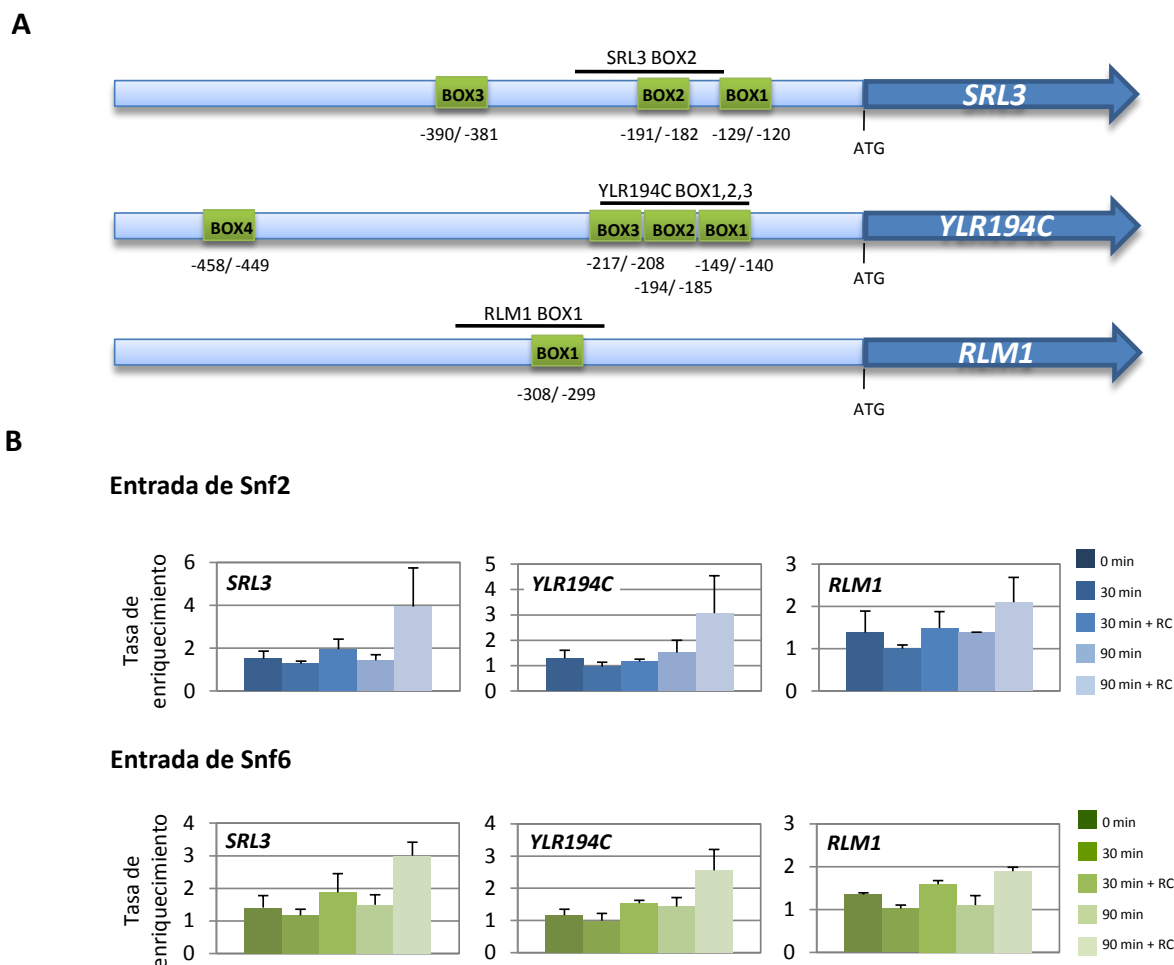
### **13. EL COMPLEJO SWI/SNF SE RECLUTA A LOS PROMOTORES EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN**

Sobre la base de los resultados mostrados hasta ahora, cabía esperar un reclutamiento del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF a los genes de la respuesta CWI. Para comprobarlo, se realizaron experimentos de ChIP para analizar la unión de Snf2 y Snf6 (dos de las subunidades del complejo) a los promotores de los genes de la respuesta de adaptación a la presencia de RC en el medio de cultivo. La cromatina obtenida de la cepa silvestre BY4741 tras 0, 30 y 90 minutos de tratamiento, o no, con RC fue inmunoprecipitada con anticuerpos policlonales específicos frente a cada una de las proteínas (cedidos por J. Reese, Pennsylvania State University, USA). El material resultante fue analizado por qPCR utilizando los oligonucleótidos que amplificaban las diferentes regiones del gen *MLP1* (Figura 45A). Los resultados de ChIP se muestran en la figura 45B. En este caso y a diferencia de lo que ocurría con Rlm1, el complejo SWI/SNF no se encuentra unido al promotor en condiciones basales. Por otro lado, la activación con RC induce tras 30 minutos de tratamiento, una ligera entrada de 2x tanto de Snf2 como Snf6, predominantemente en la región de las cajas de unión de Rlm1 y en la región adyacente denominada PRO1. Esta unión es más evidente después de 90 min de tratamiento, llegando a valores de enriquecimiento alrededor de 4x en las regiones BOX1, BOX2 y PRO1. A medida que nos acercamos a la región codificante de *MLP1* y en el propio ORF, este enriquecimiento disminuye considerablemente. Como se observa en la figura 46B, los niveles de enriquecimiento son similares para las subunidades Snf2 y Snf6. De forma general se puede concluir que la entrada del complejo SWI/SNF se produce sólo en condiciones de activación, principalmente en la región promotora del gen que interacciona con el factor de transcripción Rlm1.



**FIGURA 45: Snf2 y Snf6 son reclutados al promotor del gen *MLP1* en condiciones de estrés sobre la pared celular. (A)** Representación esquemática del gen *MLP1*, en el que se muestra la localización de las cajas de unión a Rlm1 (posiciones relativas al ATG) y la región amplificada en los experimentos de ChIP (línea horizontal). **(B)** La asociación *in vivo* de Snf2 y Snf6 a lo largo del gen *MLP1* fue analizada por ChIP en una cepa silvestre *WT-RLM1-HA* sometida a estrés por el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml), durante los tiempos indicados. Los experimentos de ChIP se llevaron a cabo empleando anticuerpos específicos frente a Snf2 y Snf6, respectivamente. La tasa de enriquecimiento de Snf2 y Snf6 se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización. Las regiones analizadas están indicadas en la parte superior izquierda de cada gráfica. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

El análisis de la entrada del complejo SWI/SNF se extendió a otros genes de respuesta a estrés sobre la pared celular, como *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*. El DNA obtenido en los experimentos anteriores se analizó por qPCR, analizando en este caso, la tasa de enriquecimiento en las regiones *SRL3BOX2*, *YLR194CBOX1,2,3* y *RLM1BOX1* (Figura 46A). Como se observa en la figura 46B, como consecuencia del tratamiento con RC se produce un aumento en la entrada de Snf2 y Snf6 en los promotores de estos genes, confirmado que el reclutamiento del complejo SWI/SNF es un mecanismo general en la regulación de la expresión de genes regulados a través de la ruta CWI.



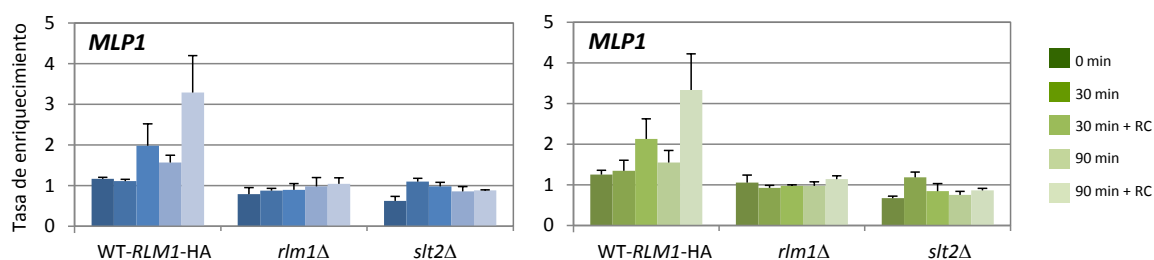
**FIGURA 46: Unión de Snf2 y Snf6 a otros genes dependientes de estrés sobre la pared celular. (A)** Representación esquemática de los genes *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*, en el que se muestra la localización de las cajas de unión a Rlm1 (los números indicados representan la posición relativa de la secuencia respecto al ATG) y la localización de la región analizada en el experimento de ChIP (línea horizontal). **(B)** Asociación de Snf2 y Snf6 en los genes indicados durante el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml). Los experimentos de ChIP se llevaron a cabo empleando una cepa WT-RLM1-HA y anticuerpos específicos frente a Snf2 y Snf6, respectivamente. La tasa de enriquecimiento de Snf2 y Snf6 se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

## 14. LA ENTRADA DEL COMPLEJO SWI/SNF A LOS PROMOTORES DEPENDE DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI

Los resultados anteriores mostraban que la entrada de Rlm1 es dependiente del complejo SWI/SNF. Para establecer el orden de reclutamiento del complejo SWI/SNF con respecto al factor de transcripción Rlm1 en el promotor de estos genes, se realizaron experimentos de ChIP para determinar si la entrada del complejo dependía de Rlm1. Así, se estudió la unión de las subunidades Snf2 y Snf6 en la región BOX1 del gen *MLP1*, tras el

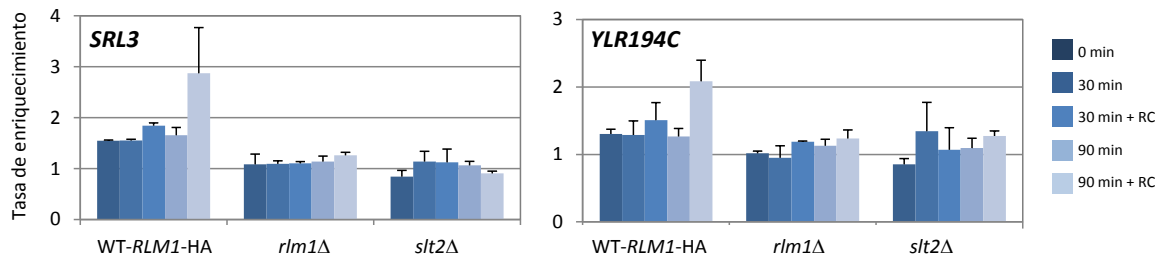
tratamiento con RC durante 30 y 90 minutos tanto en la cepa silvestre epitopada (WT-*RLM1*-HA) como en el mutante *rlm1* $\Delta$ . La figura 47 muestra cómo en el mutante *rlm1* $\Delta$ , la entrada del complejo en condiciones de estrés, está totalmente bloqueada. Estos resultados sugieren un proceso de co-dependencia en el proceso de entrada de Rlm1 y del complejo SWI/SNF a los promotores en condiciones de activación, ya que por un lado, la unión de Rlm1 es dependiente de la presencia del complejo (Figura 39 y 40), y por el otro, la unión del complejo depende de la presencia de Rlm1 (Figura 47).

Simultáneamente, se estudió también la dependencia de la MAPK Slt2 en la unión del complejo SWI/SNF a la región BOX1 del promotor de *MLP1*, determinando mediante experimentos de ChIP la tasa de enriquecimiento de Snf2 y Snf6 en el mutante *slt2* $\Delta$ . Como se muestra en la figura 47, la ausencia de la MAPK Slt2 bloquea el reclutamiento del complejo SWI/SNF al promotor de *MLP1* en condiciones de activación.



**FIGURA 47: El reclutamiento del complejo SWI/SNF a los promotores requiere de la presencia de Rlm1 y Slt2.** La unión de Snf2 (en azul) y Snf6 (en verde) a la región MLP1PRO1 fue analizada por ChIP en la cepa WT-*RLM1*-HA, y en los mutantes *rlm1* $\Delta$  y *slt2* $\Delta$ -*RLM1*-HA, durante el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml), en los tiempos indicados. La tasa de enriquecimiento se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* como valor de referencia para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

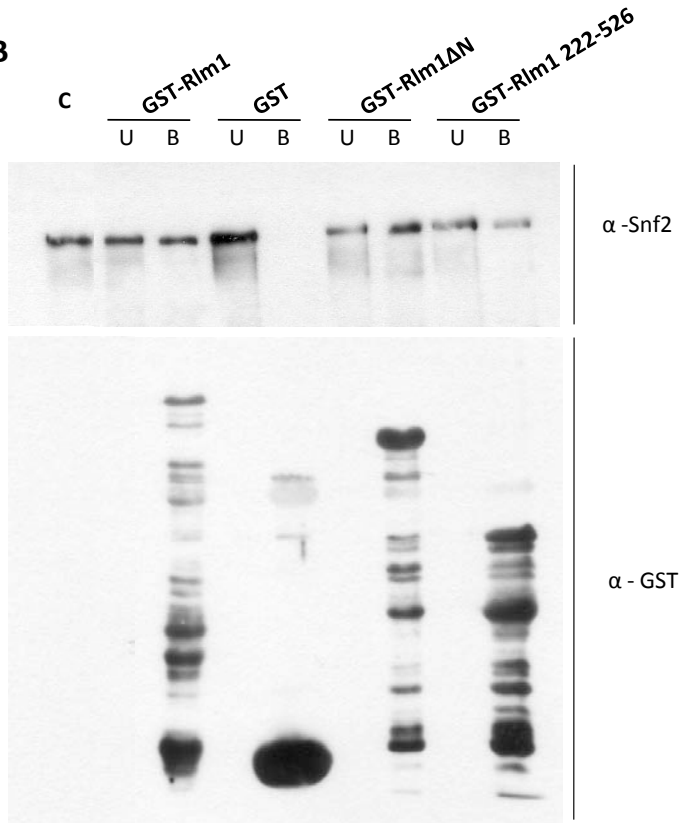
Este análisis se extendió también a los promotores de los genes *SRL3* e *YLR194C*, comprobando, como se muestra en la figura 48, que la entrada de Snf2 a los promotores de estos genes, depende totalmente de Rlm1 y Slt2. Por tanto, se puede concluir de forma general que la entrada del complejo SWI/SNF a los promotores, necesaria para producir la respuesta transcripcional en situaciones de estrés sobre la pared celular, requiere la integridad de la ruta CWI y la presencia del factor de transcripción Rlm1.



**FIGURA 48: El reclutamiento de Snf2 a promotores de otros genes de la respuesta también depende de elementos claves de la ruta CWI.** La asociación de Snf2 a los promotores de los genes *SRL3* (SRL3BOX2) e *YLR194C* (YLR194CBOX1,2,3), fue analizada mediante ChIP, en una cepa WT-RLM1-HA, y en los mutantes *rlm1*Δ y *slt2*Δ-RLM1-HA, tratados o no con RC (30 μg/ml) durante los tiempos indicados. Los resultados fueron obtenidos mediante qPCR utilizando el promotor del gen *VMA8* como control de referencia para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

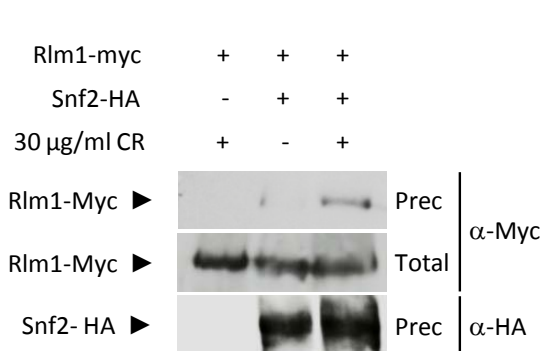
## 15. Rlm1 INTERACCIONA CON EL COMPLEJO SWI/SNF

La interdependencia entre Rlm1 y el complejo SWI/SNF para su unión a los promotores de respuesta a estrés sugería que este complejo podía estar interactuando físicamente con Rlm1. Para comprobarlo, se realizaron en primer lugar estudios de interacción *in vitro* utilizando el complejo SWI/SNF purificado desde levadura y diferentes variantes del factor de transcripción Rlm1 fusionadas al epítipo GST, producidas y purificadas en *E. coli* (ver detalles en *Materiales y Métodos*). Las variantes de Rlm1 estudiadas fueron (Figura 49A): i) Rlm1; ii) Rlm1 que carece del dominio N-terminal (residuos 1-222) donde se localiza el dominio de unión a DNA; y iii) Rlm1 que carece tanto del dominio N-terminal como del dominio C-terminal (residuos 526-676), necesario para la activación transcripcional. En ensayos de “pull-down” se comprobó la capacidad de las diferentes variantes de Rlm1 para precipitar el complejo SWI/SNF. La unión entre el complejo y Rlm1 se detectó mediante *western-blotting* utilizando anticuerpos anti-Snf2. Como se observa en la figura 49B, las tres variantes de Rlm1 son capaces de interactuar directamente con Snf2, a diferencia de lo que ocurre con la proteína GST sola. Estos resultados demuestran por primera vez, la interacción directa entre Rlm1 y el complejo SWI/SNF, no siendo esenciales para dicha unión, ni la región de unión a DNA (aa 1-222), ni el dominio necesario para la activación transcripcional (aa 526-676).

**A****B**

**FIGURA 49: Rlm1 interacta con el complejo SWI/SNF *in vitro*.** (A) Esquema de las diferentes variantes de Rlm1 empleadas en el ensayo. El epitopo GST se representa en color blanco y la región de color verde indica la posición del dominio de fosforilación por la MAPK Sit2. (B) GST, GST-Rlm1, GST-Rlm1ΔN y GST-Rlm1 222-526 fueron expresados y purificados en *E. coli*. El complejo SWI/SNF fue purificado en una cepa de levadura portadora de la proteína Snf2-TAP. El complejo SWI/SNF fue incubado con las proteínas de fusión a GST unidas a la resina de "glutatió-n-sepharosa". Tras dos horas de incubación se centrifugaron las muestras, separando el sobrenadante (fracción no unida: U) y la resina, lavada exhaustivamente a continuación (fracción unida: B). La presencia del complejo fue analizada por *western-blotting* utilizando un anticuerpo anti-Snf2 (parte superior del panel). Los niveles de GST y las proteínas de fusión a GST, se detectaron con anticuerpos anti-GST. El carril C representa un 10% de la cantidad de complejo utilizado para la inmunoprecipitación, mientras que la fracción no unida y unida cargada en el gel fue de 10% y 20%, respectivamente.

La interacción entre el complejo SWI/SNF y Rlm1 fue también demostrada mediante experimentos de co-inmunoprecipitación *in vivo*. En este caso, los experimentos se realizaron en el doble mutante *rlm1Δsnf2Δ*, expresando desde diferentes plásmidos episómicos y cada uno bajo el control de su propio promotor, una versión de Rlm1 epitopada con *Myc* y una versión de Snf2 epitopada con HA. Las células fueron sometidas a estrés mediante el tratamiento con RC (30 μg/ml) durante 30 minutos, y Snf2 fue inmunoprecipitado utilizando anticuerpos específicos frente al epitopo HA. La presencia de Snf2-HA y Rlm1-Myc fue detectada mediante *western-blotting* empleando anticuerpos específicos frente a los epitopos HA y *Myc*, respectivamente. Como se observa en la figura 50, Snf2 fue capaz de co-inmunoprecipitar Rlm1 de forma estrés dependiente, ya que sólo en presencia de RC, Rlm1-Myc es detectado en el precipitado.



**FIGURA 50: Rlm1 y el complejo SWI/SNF interactúan *in vivo* en situaciones de estrés.** Snf2 fue inmunoprecipitado con anticuerpos monoclonales anti-HA a partir de la cepa *rlm1Δsnf2Δ* transformada con los plásmidos episómicos YEp181[*RLM1-6xMyc*] y CP233 (expresan Rlm1-Myc y Snf2-HA, respectivamente), creciendo en fase exponencial y sometidas o no a estrés por RC (30 µg/ml) durante 30 minutos. Rlm1-Myc y Snf2-HA fueron detectados por *western-blotting* utilizando anticuerpos anti-Myc y anti-HA, respectivamente. Los extractos totales representan un 10% del *input* total de proteína.

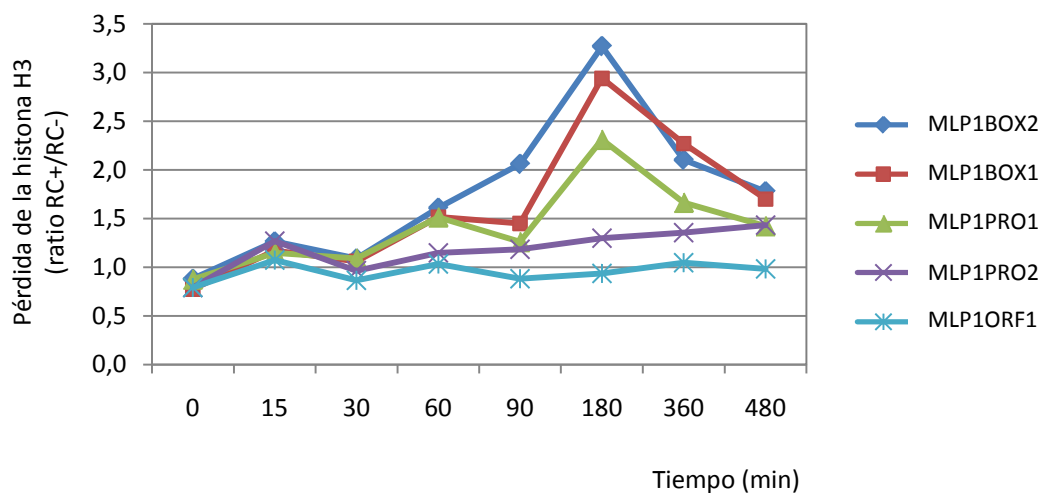
## 16. EL COMPLEJO SWI/SNF ES RESPONSABLE DE LA DESORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI

Los resultados mostrados hasta el momento indican que el complejo SWI/SNF se une a los promotores en condiciones de estrés sobre la pared celular y que su presencia es esencial para reclutar al factor de transcripción Rlm1 a estos promotores durante la activación de la ruta CWI. El complejo SWI/SNF pertenece a la familia de remodeladores de cromatina dependientes de ATP. Generalmente, estos complejos producen una desorganización local de la cromatina, que permite la entrada de la maquinaria transcripcional y el inicio de la transcripción. Para estudiar los procesos de remodelación de la cromatina en condiciones de activación de la ruta de integridad CWI, se han seguido dos aproximaciones diferentes, que aportan información complementaria: 1) el estudio del desplazamiento de la histona H3 mediante experimentos de ChIP y 2) el estudio de la distribución de nucleosomas mediante tratamiento con la enzima MNasa.

### 16.1. Desplazamiento de histonas

En estos ensayos, se ha empleado un anticuerpo anti-H3 (Abcam), que reconoce específicamente el dominio C-terminal de la histona H3. Este anticuerpo permite detectar la abundancia total de la proteína H3 dado que no se conoce ninguna modificación post-traducciona para esta región. Los resultados de estos experimentos, se han representado de dos maneras diferentes: (i) “enriquecimiento de histonas”, en los que se ve una disminución en su contenido durante la activación génica (de 1 a 0 o de 100% a 0%), y (ii) “pérdida de histonas”, siendo el valor inverso del enriquecimiento, que presenta los cambios desde 1 a ∞.

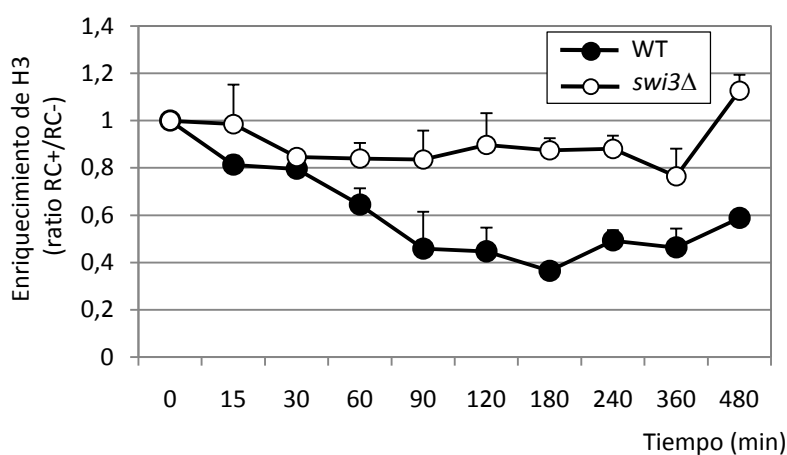
En primer lugar, se estudió mediante experimentos de ChIP la presencia de la histona H3 en las diferentes regiones del gen *MLP1* durante el tratamiento con RC. Para ello, se aisló la cromatina procedente de una cepa silvestre BY4741 a diferentes tiempos de tratamiento con RC y se inmunoprecipitó utilizando el anticuerpo específico anti-H3. El DNA obtenido se analizó mediante qPCR utilizando parejas de oligonucleótidos que amplificaban las diferentes regiones del gen *MLP1*. Como se observa en la figura 51, la pérdida de histonas alcanza un valor máximo tras 3 horas de tratamiento y tiene lugar, principalmente en las regiones que presentan las cajas de unión a Rlm1, mientras que apenas se aprecia dicho desplazamiento en la región codificante del gen (*MLP1ORF1*). Por tanto, como consecuencia del estrés sobre la pared celular se induce el remodelado de la cromatina mayoritariamente en las regiones promotoras de *MLP1*. El estudio temporal de la pérdida de histonas muestra como a tiempos más largos (Figura 51), los niveles de histonas vuelven a los niveles iniciales, de acuerdo con la reorganización de la cromatina que tiene lugar tras el estrés y coincidiendo con las cinéticas de expresión del gen *MLP1* y las entradas de Rlm1 y de la RNA Pol II.



**FIGURA 51: Cinética de desplazamiento de la histona H3 en *MLP1*.** La unión de H3 a diferentes regiones del gen *MLP1* fue analizada mediante ChIP en una cepa silvestre, sometida a estrés por RC (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los resultados se indican como ratio de la pérdida de histonas entre las muestras tratadas vs no tratadas, siendo la pérdida de histonas el valor inverso del enriquecimiento. Los resultados fueron obtenidos mediante qPCR utilizando la región promotora de *VMA8* como control para la normalización. Los datos representados corresponden a tres experimentos independientes.

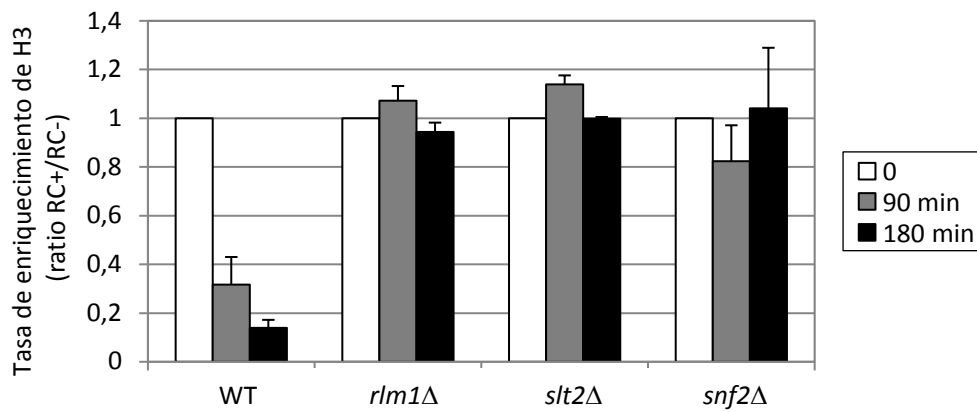
Para comprobar si el complejo SWI/SNF era, el responsable del desplazamiento de histonas observado, se realizaron experimentos de ChIP utilizando la cepa silvestre y el mutante *swi3Δ*. Se aislaron las cromatinas de ambas cepas a diferentes tiempos de tratamiento con RC y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-H3. El DNA obtenido

se analizó por qPCR para determinar el enriquecimiento de H3 en la región BOX1 del gen *MLP1*, en la que habíamos visto junto con la región BOX2 los mayores niveles de desplazamiento. Como se observa en la figura 52, mientras que en una cepa WT se produce un claro desplazamiento de la histona H3 a lo largo del tiempo de tratamiento con RC, apenas se producen variaciones respecto a la presencia de la histona H3 en el promotor en el mutante *swi3Δ*. Por tanto, el complejo SWI/SNF es el responsable del desplazamiento de histonas producido en el promotor del gen *MLP1* como consecuencia del estrés provocado sobre la pared celular.



**FIGURA 52: La eliminación de Swi3 bloquea el desplazamiento de H3 en el promotor de *MLP1* consecuencia del estrés sobre la pared.** La cinética de unión de la histona H3 a la región MLP1BOX1 fue analizada mediante ChIP en una cepa silvestre y en el mutante *swi3Δ* durante el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml) a los tiempos indicados. La tasa de enriquecimiento se representa como el ratio entre las muestras tratadas y sin tratar, utilizando como control la región promotora del gen *VMA8*.

Para confirmar estos resultados por un lado y para determinar el nivel de dependencia con respecto a la ruta CWI por otro, se analizó el desplazamiento de histonas tras 90 y 180 minutos de tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml) en los mutantes *snf2Δ*, *rlm1Δ* y *slt2Δ*, siguiendo la misma metodología. Como se observa en la figura 53, el desplazamiento de histonas está prácticamente bloqueado en un mutante *snf2Δ*, tanto a los 90 como a los 180 minutos de tratamiento, al igual que ocurría en el mutante *swi3Δ*. Adicionalmente, el desplazamiento de la histona H3 se encuentra totalmente eliminado en los mutantes *rlm1Δ* y *slt2Δ*, demostrando que el proceso de desorganización de la cromatina es dependiente de la funcionalidad de la ruta CWI, de la misma forma que lo es la entrada del complejo SWI/SNF.



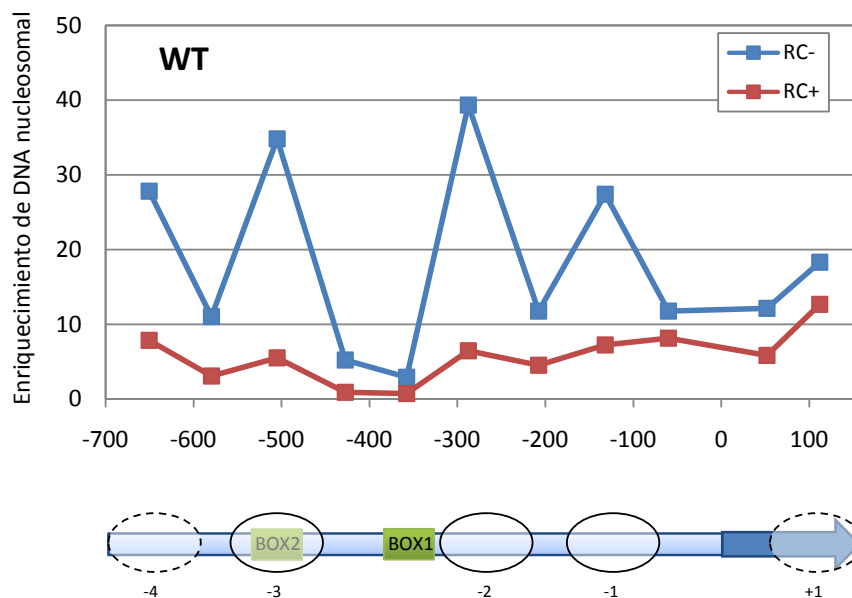
**FIGURA 53: Asociación de la histona H3 al promotor de *MLP1* en la cepa WT y en los mutantes *rlm1Δ*, *slt2Δ* y *snf2Δ*.** Las células fueron crecidas exponencialmente y sometidas al tratamiento con RC (30  $\mu\text{g/ml}$ , 1,5 y 3 horas). La unión de la histona H3 a la región MLP1BOX1 fue analizada mediante ChIP. La tasa de enriquecimiento se representa como el ratio entre las muestras tratadas y sin tratar, utilizando como control interno la región promotora del gen *VMA8*. Los datos representan la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

## 16.2. Desplazamiento de nucleosomas

Los complejos remodeladores de cromatina producen la desorganización de esta estructura mediante diferentes mecanismos, incluyendo el deslizamiento del nucleosoma, la creación de un “nucleosoma remodelado” en el que el DNA es más accesible o su completo desplazamiento, permitiendo así la unión de la maquinaria transcripcional.

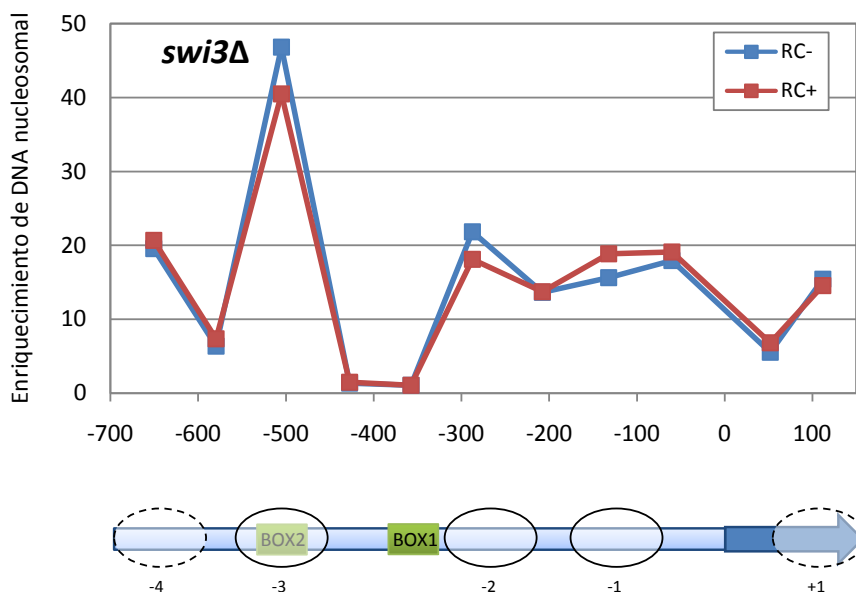
A la vista de los resultados anteriores, decidimos caracterizar el patrón de nucleosomas posicionados en el gen *MLP1* y estudiar si existía un desplazamiento de nucleosomas en las condiciones de estrés estudiadas dependiente o no del complejo SWI/SNF. El análisis del desplazamiento de los nucleosomas se realizó mediante el tratamiento de la cromatina con la enzima MNasa. Esta enzima produce la degradación del DNA, dejando intacto aquel que se encuentre formando parte de los nucleosomas. De esta manera, el entrecruzamiento de las proteínas unidas al DNA por el tratamiento con formaldehído, seguido de la digestión de la cromatina con MNasa y la posterior purificación y cuantificación del DNA obtenido por qPCR, nos permitiría conocer la distribución de los nucleosomas en determinadas regiones genómicas de interés. Se llevó a cabo, en primer lugar, el estudio de los nucleosomas presentes en el gen *MLP1* en la cepa silvestre, tanto en presencia como en ausencia de estrés (Figura 54). La región estudiada se extendió desde la posición -699 del promotor hasta la posición +161, dentro ya de la región codificante del gen, utilizando parejas de oligonucleótidos que amplificaban regiones de aproximadamente 100 pb que se solapaban alrededor de 30 pb con las regiones vecinas. El cálculo del enriquecimiento del DNA nucleosomal se

encuentra definido en *Materiales y Métodos*. La distribución de la posición de los nucleosomas genera una representación con picos y valles, donde los valles corresponden con regiones de unión entre los nucleosomas y los picos indican la posición de un nucleosoma. Si sólo una fracción de células contiene ese nucleosoma posicionado, la diferencia en magnitud entre los picos y los valles se encontrará reducida (Sekinger *et al.*, 2005). Así, el patrón de nucleosomas para el fragmento del gen *MLP1* estudiado en la cepa silvestre BY4741 en condiciones basales (Figura 54), muestra la presencia de dos nucleosomas bien posicionados, uno en la región de la caja 2 de Rlm1, que hemos denominado -3 y otro en el borde de la caja 1 de Rlm1, que hemos denominado -2. También aparecen en la región promotora un nucleosoma, -1, que presenta menores diferencias de magnitud entre los valles y los picos, de manera que no se considera bien posicionado al estar presente sólo en una parte de la población. En esta distribución, es importante señalar una amplia región libre de nucleosomas, dentro de la que se encuentra la caja 1 de unión a Rlm1. Como se observa en la figura 54, en condiciones de activación, tras 3 horas de tratamiento con RC, el patrón de nucleosomas definido para la cepa silvestre en condiciones basales se encuentra totalmente desorganizado, indicando un proceso de remodelación de la cromatina en situaciones de estrés sobre la pared celular que produce el desplazamiento total de los nucleosomas en la región estudiada.



**FIGURA 54: La activación mediada por RC produce el remodelado de nucleosomas en el promotor de *MLP1*.** Análisis de la localización de los nucleosomas en el promotor de *MLP1* en la cepa WT bajo condiciones de estrés. Los mononucleosomas fueron aislados de la cepa silvestre crecida en ausencia (línea azul) o presencia (línea roja) de RC (30  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 3 horas. El DNA purificado fue analizado mediante qPCR utilizando un grupo de 11 parejas de oligonucleótidos solapantes sobre el gen *MLP1* (desde la posición -699 hasta la posición +161). En la parte inferior de la figura se representan los nucleosomas como óvalos localizados en las posiciones correspondientes dentro del gen *MLP1*.

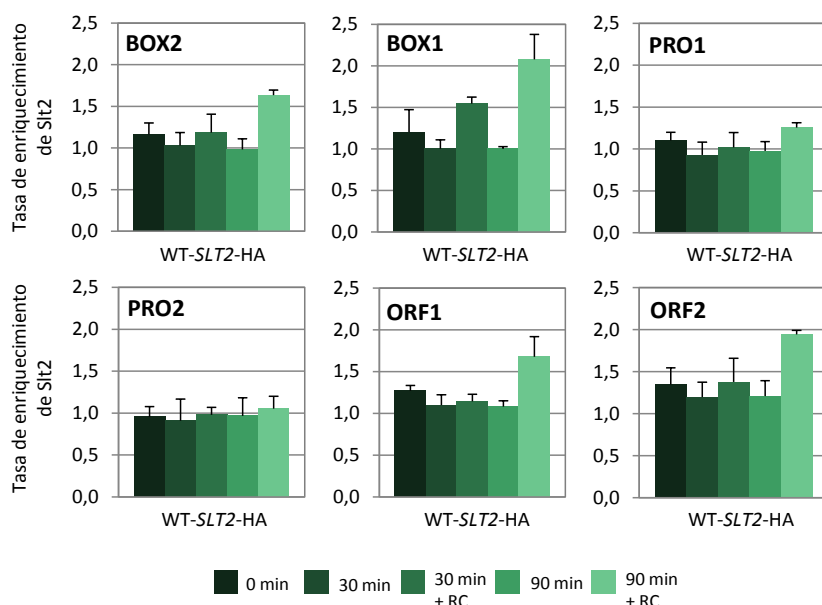
Con el fin de establecer si el desplazamiento de nucleosomas observado en condiciones de estrés dependía del complejo SWI/SNF, se realizó este mismo análisis para el mutante *swi3Δ* tanto en condiciones basales como en condiciones de activación. Los resultados se muestran en la figura 55. Como se puede observar, al igual que para la cepa silvestre, el nucleosoma que hemos denominado -3 se encuentra perfectamente posicionado en el gen *MLP1*. Existe, sin embargo, cierta alteración de la cromatina en condiciones basales respecto a la cepa WT, en la región de los nucleosomas -2 y -1, ya que se encuentran en el mutante *swi3Δ* menos posicionados. Estos datos sugieren que el complejo SWI/SNF participa en alguna medida en la organización de los nucleosomas en condiciones basales. El análisis de nucleosomas en el gen *MLP1* en condiciones de activación, muestra un patrón de posicionamiento de nucleosomas idéntico al observado en ausencia de estrés. Dicho de otro modo, no se observa el desplazamiento de estos nucleosomas como consecuencia de la presencia de RC, al contrario de lo que ocurría en la cepa silvestre. Estos resultados, junto con los mostrados anteriormente en relación a la salida de la histona H3 del promotor del gen *MLP1*, demuestran que el complejo SWI/SNF es el responsable de la remodelación de la cromatina en condiciones de estrés sobre la pared celular.



**FIGURA 55:** El remodelado de nucleosomas producido en *MLP1* en situaciones de estrés depende de la presencia de *Swi3*. Análisis de la localización de los nucleosomas en el promotor de *MLP1* en el mutante *swi3Δ* bajo condiciones de estrés. Los mononucleosomas fueron aislados de las células crecidas en ausencia (línea azul) o presencia (línea roja) de RC (30  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 3 horas. El DNA purificado fue analizado mediante qPCR utilizando un grupo de 11 parejas de oligonucleótidos solapantes sobre el promotor de *MLP1* (desde la posición -699 hasta la posición +161). En la parte de abajo se representan los nucleosomas como óvalos localizados en las posiciones correspondientes dentro del gen *MLP1*.

## 17. Slt2 SE ASOCIA AL GEN *MLP1* EN RESPUESTA A ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR

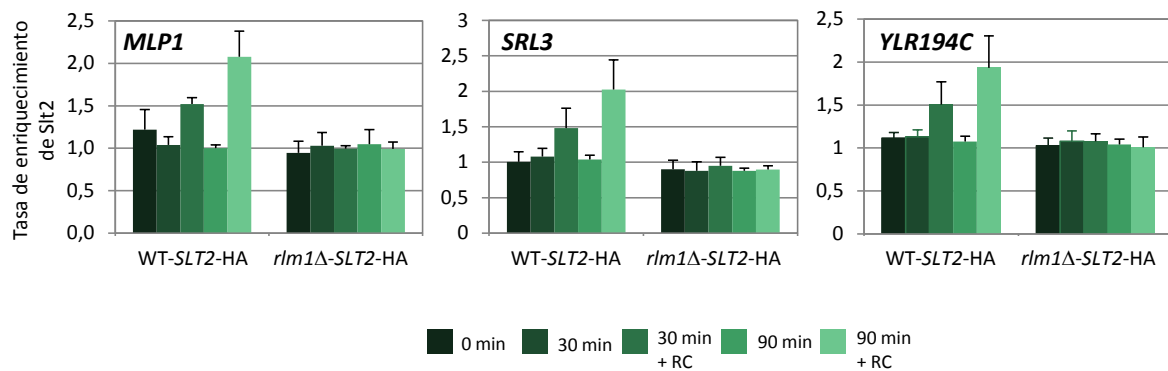
Diversos trabajos han revelado que el papel de algunas MAPK (Kss1, Fus3 y especialmente Hog1) en la regulación de las respuestas transcripcionales a estrés no está limitado únicamente a la fosforilación de diferentes factores de transcripción sino que pueden participar activamente en el reclutamiento de la maquinaria transcripcional a los promotores (Alepuz *et al.*, 2003; Alepuz *et al.*, 2001; Pokholok *et al.*, 2006). Aunque Pokholok *et al.* (2006) no encontraron evidencias de la asociación entre Slt2 y el DNA en condiciones de activación de la ruta CWI (durante ciclo celular y tratamiento con feromonas), decidimos estudiar si Slt2 se reclutaba a los promotores de los genes regulados por Rlm1 como consecuencia del estrés producido sobre la pared celular. Se aisló la cromatina a partir de la cepa silvestre BY4741 portadora de la versión funcional del gen *SLT2-3xHA*, integrada en su mismo *locus* genómico, en ausencia o presencia de RC. La inmunoprecipitación de cromatina se realizó utilizando anticuerpos anti-HA y del mismo modo que en experimentos anteriores, el DNA obtenido fue analizado por qPCR, estudiando la entrada de Slt2 a lo largo del gen *MLP1*. Como se muestra en la figura 56, la MAPK Slt2 no se encuentra unida al promotor en ausencia de estrés. Sin embargo, aunque en niveles moderados, sí es reclutada al gen *MLP1* en condiciones de activación, siendo más evidente tras 90 minutos de tratamiento con RC. Esta interacción no es homogénea a lo largo del promotor, de manera que la unión se produce fundamentalmente en la región donde se encuentran los sitios de unión para Rlm1 y por tanto donde se produce la mayor unión del factor de transcripción. A su vez, y a diferencia de lo que ocurre con Rlm1, Slt2 se recluta también a la región codificante del gen.



**FIGURA 56:** Slt2 es reclutado al gen *MLP1* en condiciones de activación. La unión de Slt2 a lo largo del gen *MLP1* fue analizada mediante experimentos de ChIP en una cepa WT portadora de la versión epitopada de Slt2-HA, durante 30 y 90 minutos de tratamiento (RC 30  $\mu$ g/ml). La cuantificación de la tasa de enriquecimiento de Slt2-HA se realizó mediante qPCR y se calculó utilizando la ocupación del promotor del gen *VMA8* para la normalización. Las regiones analizadas están indicadas en la parte superior izquierda de cada panel.

## **17.1. Slt2 se une a los promotores de otros genes de la respuesta CWI de forma Rlm1-dependiente**

A continuación, caracterizamos la entrada de Slt2 en otros genes de la respuesta CWI, como *SRL3* e *YLR194C*, y se estudió si esta entrada dependía de Rlm1. Para ello se aislaron las cromatinas de una cepa silvestre y de un mutante *rlm1Δ* que llevaban integrada en el genoma la fusión epitopada *SLT2-3xHA*, sometidas o no a estrés, y se llevaron a cabo experimentos de ChIP. Las regiones analizadas fueron MLP1BOX1, SRL3BOX2 e YLR194CBOX1,2,3, respectivamente (Figura 26A). Como se muestra en la figura 57, la MAPK Slt2 se une *in vivo* a las regiones promotoras indicadas de *MLP1*, *SRL3* e *YLR194C*, sólo en condiciones de activación, siendo dicha unión completamente dependiente de la presencia de Rlm1.

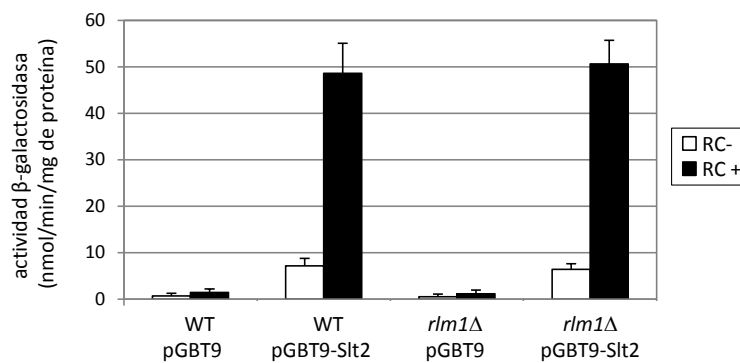


**FIGURA 57: Slt2 se asocia a los promotores de otros genes dependientes de la ruta CWI.** La unión de Slt2-HA a los promotores de los genes indicados en la parte superior izquierda de cada panel, se analizó mediante ChIP, en una cepa WT y en el mutante *rlm1Δ* expresando la versión epitopada de Slt2-HA, en presencia y ausencia de RC (30  $\mu$ g/ml) a los tiempos indicados. La cuantificación se realizó por qPCR utilizando el promotor del gen *VMA8* como control interno para la normalización. Los datos representan la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

## **17.2. Slt2 actúa como co-activador transcripcional independientemente de Rlm1 en un “sistema de un híbrido”**

Una vez establecida la asociación de Slt2 con los promotores de los genes de la respuesta CWI, nos preguntamos cuál sería su papel en el inicio de la transcripción en respuesta a estrés. Dado que Rlm1 ha de ser fosforilado por Slt2, su asociación al promotor podría estar asociada a este hecho. Sin embargo, cabía también la posibilidad de que una vez asociada al promotor, la MAPK tuviera también una función directa, independiente de Rlm1, en la activación transcripcional. De acuerdo con esta última idea, la fusión de Slt2 al

dominio de unión a DNA del activador Gal4 (Gal4DBD) puede activar la transcripción del *reporter GAL1-LacZ* en respuesta a situaciones de estrés sobre la pared celular (Soler *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2007). Decidimos por ello estudiar si la capacidad transactivadora de Slt2 era o no dependiente de Rlm1. Para ello, se transformaron las cepas WT y *rlm1Δ*, en el fondo genético SFY526 que lleva integrada en el genoma la fusión *GAL1-LacZ*, con el plásmido vacío pGBT9 y con el que presenta Slt2 fusionado a Gal4DBD (pGBT9-Slt2). Estas cepas fueron sometidas a estrés por RC y se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de los extractos proteicos obtenidos. Como se observa en la figura 58, la actividad transactivadora de Slt2 observada en condiciones de activación, es totalmente independiente de Rlm1, cuando la MAPK es artificialmente dirigida a los promotores a través del dominio de unión a DNA del activador Gal4. Este resultado sugiere que, adicionalmente a la fosforilación de Rlm1, Slt2 podría jugar un papel diferente en la activación de la transcripción de los genes regulados a través de la ruta CWI.



**FIGURA 58:** La activación de Slt2 conduce la transcripción en un "sistema de un híbrido" en respuesta a estrés de pared celular en ausencia de Rlm1. La activación transcripcional presentada en la cepa WT y el mutante *rlm1Δ* (fondo SFY526) transformados con pGBT9 y pGBT9-Slt2, fue analizada mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa, tras el tratamiento con RC (30  $\mu$ g/ml, 3 horas).



6

**DISCUSIÓN**



La exposición de la levadura a diferentes tipos de estrés produce la activación de respuestas celulares que permiten en última instancia la supervivencia celular. La mayoría de estas respuestas están mediadas por rutas de transducción de señales formadas por un módulo conservado de proteínas quinasas. La activación de la MAPK da lugar a la fosforilación de diferentes sustratos entre los que se encuentran los factores de transcripción, responsables de la modificación de la expresión génica. La MAPK puede regular la actividad de los factores de transcripción a través de diferentes mecanismos, incluyendo el control de los niveles de proteína, la regulación de su unión a DNA, el intercambio núcleo-citoplasmático o la alteración de su capacidad transactivadora (Yang *et al.*, 2003). Sin embargo, el papel de las MAPKs no se limita únicamente a este contexto. Estudios relativamente recientes, indican un nuevo papel para las MAPKs como componentes de complejos transcripcionales unidos a los promotores (Edmunds y Mahadevan, 2004). En primer lugar, se estableció la interacción directa de la MAPK Hog1 con las regiones promotoras y codificantes de los genes inducidos en la respuesta a alta osmolaridad (Alepez *et al.*, 2001; Proft *et al.*, 2006; Proft y Struhl, 2002; Pascual-Ahuir *et al.*, 2006; Pokholok *et al.*, 2006). Este hecho amplió las funciones de la MAPK Hog1 en el proceso de transcripción, participando en el reclutamiento de factores de transcripción, componentes de la maquinaria general de la transcripción, la RNA Pol II y complejos remodeladores y modificadores de cromatina (Alepez *et al.*, 2003; Alepez *et al.*, 2001; de Nadal *et al.*, 2004; Mas *et al.*, 2009; Proft y Struhl, 2002; Proft *et al.*, 2006). Pokholok *et al.* extendieron este concepto a otras proteínas quinasas demostrando que tanto Fus3 como Kss1 (MAPKs de la ruta de apareamiento) se asocian físicamente con las regiones codificantes de genes de respuesta a feromonas (Pokholok *et al.*, 2006).

Al contrario que Hog1, la función de la MAPK Slt2 en la regulación de la expresión génica en respuesta a estrés se encuentra mucho menos estudiada. El trabajo realizado por el grupo del Dr. D. Levin, estableció recientemente un mecanismo no catalítico en el que la MAPK Slt2 y la pseudoquinasa Mlp1 forman un complejo estable con Swi4 capaz de unirse a los sitios de unión del complejo SBF dentro del promotor de *FKS2* para activar la transcripción (Kim *et al.*, 2008). En este contexto, la actividad quinasa y por tanto la fosforilación del factor de transcripción Swi4 no es necesaria. También se ha descrito la participación de Slt2 en el proceso de elongación en el gen *FKS2* a través de su asociación con la Pol II y el complejo asociado Paf1C (Kim y Levin, 2011). Sin embargo, estos mecanismos se encuentran limitados a la regulación de un pequeño grupo de genes, cuya inducción en respuesta a estrés de pared celular depende del complejo SBF pero no de Rlm1 (Kim y Levin, 2010). Precisamente, la mayoría de la respuesta de adaptación a estrés sobre la pared celular (~90 %), depende del factor de transcripción Rlm1 (Jung y Levin,

1999; García *et al.*, 2004; este trabajo). Los mecanismos moleculares que regulan la transcripción a través de Slt2 y Rlm1 eran prácticamente desconocidos y por este motivo se estableció como el objetivo principal de esta Tesis Doctoral. Los resultados presentados en este trabajo definen una nueva función para la ruta CWI en el reclutamiento del complejo SWI/SNF a los genes Rlm1-dependientes de la respuesta a estrés sobre la pared celular, donde la desorganización de la cromatina es necesaria para el desarrollo de respuestas transcripcionales adecuadas bajo situaciones de estrés. Así, hemos demostrado que el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta transcripcional global mediada por Slt2 y Rlm1. Los mutantes *swi/snf* presentan una drástica reducción en la expresión de genes de respuesta a estrés sobre la pared celular e hipersensibilidad a compuestos que interfieren con esta estructura. Además, como consecuencia del estrés, Rlm1 interacciona físicamente con SWI/SNF para dirigir su asociación con los promotores de destino. En estas condiciones, el complejo SWI/SNF produce el desplazamiento de nucleosomas en el *locus MLP1*. Asimismo, la respuesta de adaptación a estrés de pared requiere la participación de la RNA Pol II y la unión de este complejo al DNA depende de la presencia de Rlm1, la MAPK Slt2 y el complejo SWI/SNF. En conjunto, nuestros resultados definen, por primera vez, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la mayor parte de la respuesta transcripcional en situaciones de estrés sobre la pared celular, a través de la ruta CWI.

### **Estructura del promotor del gen *MLP1***

Para poder comprender el mecanismo de activación transcripcional regulado por la ruta CWI, es fundamental conocer la estructura del promotor de los genes inducidos en dicha respuesta. En este trabajo hemos utilizado como modelo el gen *MLP1*. Este gen fue seleccionado por expresarse en condiciones que afectan a la integridad de la pared celular y por presentar unos niveles de expresión muy bajos en condiciones normales de crecimiento y altamente incrementados en condiciones que activan la ruta (García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009). La presencia de nucleosomas puede competir eficazmente en la ocupación de los sitios de unión a DNA dentro de los promotores con factores de transcripción específicos, así como con el resto de la maquinaria transcripcional, siendo necesaria la participación de complejos proteicos para que modifiquen esta estructura (Li *et al.*, 2007; Jansen y Verstrepen, 2011). El patrón de nucleosomas caracterizado en este trabajo para el gen *MLP1*, reveló la presencia de 4 nucleosomas posicionados entre las regiones -699 y +161, en ausencia de estrés celular. El promotor de *MLP1* presenta dos sitios funcionales de unión para Rlm1, BOX1 (-359/-350) y BOX2 (-510/-501). Según los resultados obtenidos, la BOX1 se encontraría expuesta entre los nucleosomas -3 y -2, o

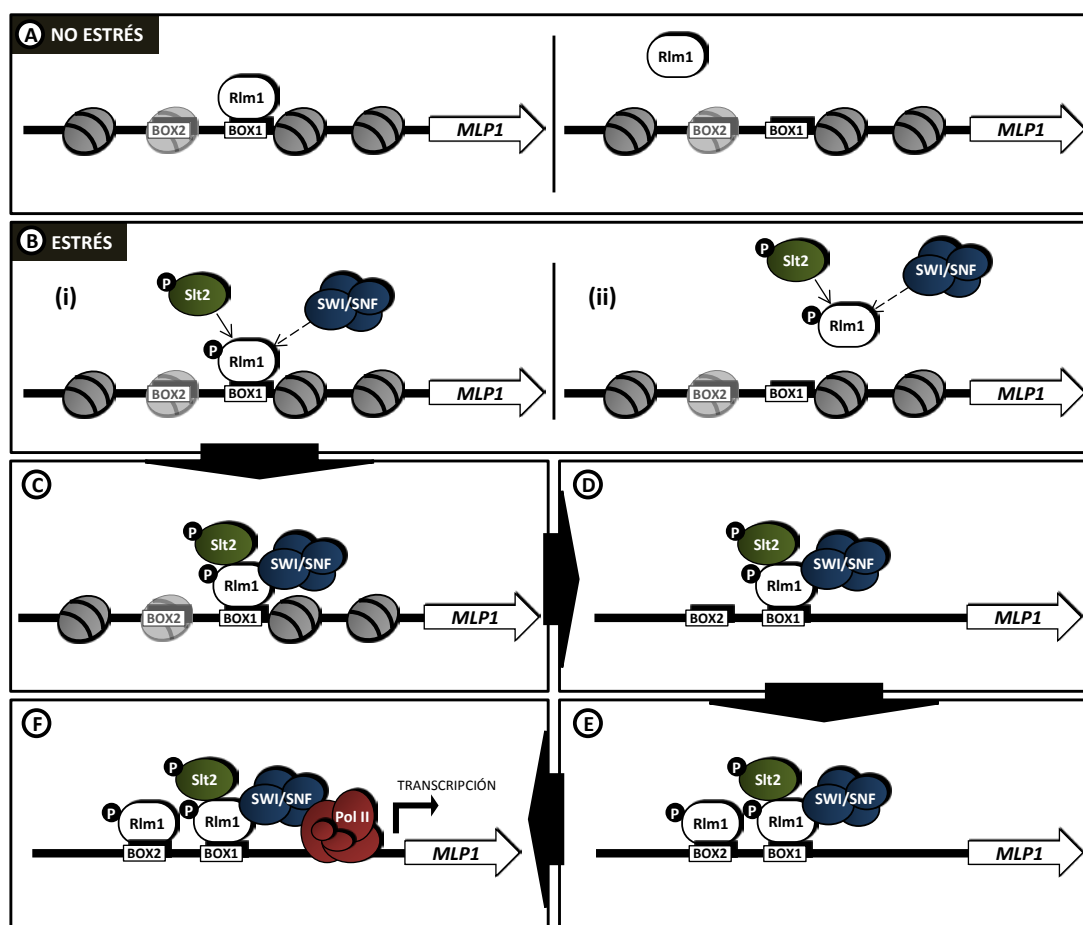
parcialmente expuesta en el borde del nucleosoma -2, mientras que la BOX2 se encontraría totalmente situada dentro del nucleosoma -3, impidiendo o dificultando al menos, la unión de Rlm1 a esta secuencia. Por tanto, al igual que ocurre en el promotor del gen *PHO5*, en el que uno de los sitios de unión para el activador Pho4 se encuentra situado entre dos nucleosomas y el resto dentro de los nucleosomas (Almer *et al.*, 1986; Fascher *et al.*, 1990), uno de los sitios de unión para Rlm1 del promotor de *MLP1* se encontraría libre y otro bloqueado por la presencia de un nucleosoma. La estructura del promotor del gen *MLP1* correspondería a un promotor cerrado, identificado en la mayoría de los genes de respuesta a estrés (revisado en Cairns, 2009). Estos promotores se caracterizan por presentar nucleosomas cubriendo el TSS, las regiones adyacentes al TSS y la mayoría de los sitios de unión para los activadores transcripcionales, estando altamente regulados por diferentes complejos remodeladores y/o modificadores de cromatina. Los promotores cubiertos se caracterizan también por presentar caja TATA, presente principalmente en genes de respuesta a estrés, más que en genes constitutivos. Sin embargo, como excepción a la mayoría de genes regulados por estrés y portadores de un promotor cerrado, el gen *MLP1* carece de caja TATA (Basehoar *et al.*, 2004), aunque la unión de TBP al promotor *MLP1* estaría regulada conjuntamente por TFIID y por el complejo SAGA (Huisinga y Pugh, 2004).

El patrón de nucleosomas presentado en este trabajo para el promotor de *MLP1* en ausencia de estrés, se correlaciona perfectamente con varios mapas de alta resolución obtenidos a nivel genómico para las posiciones de nucleosomas *in vivo* de *S. cerevisiae* (Field *et al.*, 2008; Jiang y Pugh, 2009a; Lee *et al.*, 2007; Mavrigh *et al.*, 2008; Shivaswamy e Iyer, 2008; Whitehouse *et al.*, 2007). Estos estudios, fueron recientemente integrados por Jiang y Pugh estableciendo un mapa de referencia único de la distribución de nucleosomas a lo largo del genoma de la levadura *S. cerevisiae* (Jiang y Pugh, 2009b).

### **Modelo para la activación transcripcional de los genes de la respuesta mediada por la ruta CWI y regulados a través de Rlm1**

La combinación de análisis de expresión génica, experimentos de ChIP y ensayos de remodelado de cromatina, nos ha permitido sobre la base de nuestros resultados, establecer un modelo que describe la secuencia de eventos producidos durante el inicio de la transcripción en situaciones de estrés sobre la pared celular. En el mecanismo que nosotros proponemos, el reclutamiento selectivo del complejo remodelador de cromatina hacia genes de la respuesta CWI es esencial para la eficiente reorganización de los nucleosomas, necesaria para el ensamblaje del complejo de pre-iniciación en los

promotores diana y la correcta organización de la respuesta (ver figura 59). A diferencia de otros tipos de estrés, la cinética de activación en estas respuestas es mucho más lenta y sostenida en el tiempo. La inducción del gen *MLP1* comienza a detectarse tras 15 minutos de exposición a agentes que producen daño sobre la pared celular. El aumento en la transcripción de *MLP1* se correlaciona tanto con el aumento en el reclutamiento del factor de transcripción Rlm1 como de la enzima Pol II, siendo las tres cinéticas similares. El pico de la respuesta tiene lugar a las 2 horas, coincidiendo también con el máximo desplazamiento de histonas observado en el promotor del gen *MLP1*. A partir de este momento, la respuesta va disminuyendo hasta alcanzar niveles próximos a los iniciales tras 6 horas de estrés, al mismo tiempo que se produce la reorganización de la cromatina en el promotor.



**FIGURA 59: Modelo para la activación transcripcional de los genes de la respuesta CWI.** La reprogramación de la expresión génica en respuesta a alteraciones en la pared celular requiere la asociación de la Pol II a los promotores, proceso que depende de la presencia de la MAPK Sit2, el activador Rlm1 y el reclutamiento del complejo SWI/SNF. En la figura se detalla el modelo de activación para *MLP1*. **(A)** En ausencia de estrés, la región de la BOX1 se encuentra libre de nucleosomas permitiendo el acceso de Rlm1 al promotor, mientras que la presencia de un nucleosoma en la BOX2, lo estaría impidiendo. **(B)** En condiciones de estrés, SWI/SNF es reclutado a los promotores a través de la interacción directa con Rlm1, siendo posibles dos alternativas: (i) Rlm1 pre-unido al promotor es fosforilado por Sit2, reclutando después al complejo, y (ii) la interacción entre el factor de transcripción y SWI/SNF podría producirse en solución tras la activación por la MAPK y reclutarse a los sitios de unión a Rlm1 libres. A continuación, el complejo SWI/SNF produciría el remodelado de la cromatina, eliminando los nucleosomas del promotor y permitiendo en un segundo paso la entrada de Rlm1 a la BOX2 y finalmente la asociación de la Pol II al promotor para iniciar la transcripción. Los nucleosomas posicionados en el promotor de *MLP1* se representan como óvalos de color gris.

En ausencia de estrés (Figura 59A), Rlm1 se encontraría unido a los promotores de los genes Rlm1-dependientes activados por la ruta CWI, específicamente en la región de las cajas de unión establecidas. La unión basal de Rlm1 a los promotores es parcialmente dependiente de la presencia de Slt2 y totalmente independiente de la fosforilación de Rlm1 por la MAPK y de la fosforilación de Slt2 por Mkk1/Mkk2. El hecho de que tampoco se haya observado remodelado de la cromatina en estos genes, ni reclutamiento de la enzima Pol II antes de someter a la célula a condiciones de estrés, sugiere que Rlm1 se encuentra pre-unido a los genes de la respuesta CWI en un estado inactivo (no fosforilado). Una situación semejante se ha descrito para el gen *HSP82*, donde la unión del activador Hsf1 al promotor en condiciones basales permite iniciar el remodelado de la cromatina de forma inmediata tras la aparición del estrés térmico y por tanto, el reclutamiento de la Pol II (Erkina *et al.*, 2008; Erkina y Erkine, 2006). Este mecanismo permitiría superar el estado represivo de la cromatina, crítico para la transcripción, de manera rápida y eficiente, especialmente importante en las respuestas de adaptación a estrés donde la supervivencia celular depende de ello. Es importante destacar que aunque la unión de Rlm1 se observe en las regiones donde se encuentran situadas las cajas BOX1 y BOX2, la estructura del promotor comentada anteriormente podría restringir esta interacción sólo a la primera. Para *MLP1*, la BOX1 es la única secuencia que se encuentra en una región libre de nucleosomas y dado que no se ha observado remodelado de la cromatina en ausencia de tratamiento en la región de la BOX2, la unión se estaría produciendo principalmente, o con mayor afinidad, en esta región. Esta idea está en total acuerdo con el hecho de que la entrada en condiciones basales de Rlm1 no requiera de la actividad del complejo y por tanto sea totalmente independiente de la subunidad Swi3. A pesar del importante valor de los experimentos de ChIP, hay que tener en cuenta que una de sus limitaciones es la determinación del sitio de unión exacto para cada factor, debido a su limitada resolución. La sonicación de la cromatina en fragmentos de ~500 pb, hace difícil discernir entre regiones próximas, siendo éste el caso de las cajas de unión a Rlm1 en el promotor de *MLP1*, separadas tan sólo por unas 150 pb.

En condiciones de estrés sobre la pared celular, se produciría la activación de la MAPK Slt2 por Mkk1/2. A continuación, Slt2 fosforilaría a Rlm1 en dos situaciones: (i) cuando Rlm1 se encuentra pre-unido al DNA y (ii) cuando Rlm1 se encuentra libre en solución en el núcleo (Figura 59B). Este último se uniría tras su activación a los sitios de unión específicos dentro del promotor (Figura 59C-E). De esta manera, la asociación de Rlm1 al promotor de *MLP1* aumenta ligeramente a los 15 minutos de estrés y de forma

progresiva, hasta alcanzar un valor máximo a las 3 horas. La entrada de Rlm1 a los promotores de los genes de respuesta a estrés de pared celular es totalmente dependiente de Slt2 y de la funcionalidad de esta proteína, indicando que la fosforilación de Rlm1 por Slt2 es necesaria para el reclutamiento del factor de transcripción a los promotores, en condiciones de estrés.

Uno de los resultados quizá inesperado de este trabajo fue la detección *in vivo* de la asociación, en condiciones de estrés, de la MAPK Slt2 a los promotores de los genes de la respuesta en estudio (*MLP1*, *SRL3* e *YLR194C*). En el análisis genómico realizado por Pokholok y colaboradores para identificar la asociación de diferentes MAPK con el DNA, estos autores confirmaron la asociación de Hog1, descrita previamente (Alepuz *et al.*, 2001), tanto con regiones promotoras como codificantes de los genes de respuesta a estrés osmótico y descubrieron la presencia de las MAPKs Fus3 y Kss1 en regiones codificantes de genes de respuesta a feromonas. Sin embargo, no observaron indicios de ocupación génica para Slt2 en condiciones en las que la ruta CWI se encuentra activada (durante ciclo celular y exposición a feromonas) (Pokholok *et al.*, 2006). El hecho de que seamos capaces de detectar la unión de Slt2 a los genes de la respuesta podría estar asociado a diferencias tanto en la sensibilidad de los ensayos realizados como en las condiciones de estrés empleadas. La unión de Slt2 a los promotores depende de la presencia de Rlm1, sugiriendo que el reclutamiento de la MAPK estaría mediado por la interacción física descrita entre Slt2 y Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1995), y que sea el factor de transcripción el que dirija a la MAPK hacia los promotores, específicamente a los sitios de unión para Rlm1. La presencia de Slt2 en los promotores podría estar asociada a dos hechos diferentes, que no han de ser necesariamente excluyentes: (i) la fosforilación de Rlm1 y (ii) la existencia de funciones adicionales e independientes de Rlm1 en el inicio de la transcripción.

Una de las principales consecuencias de la activación de la ruta CWI es la fosforilación del factor de transcripción Rlm1 por Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002). La fosforilación de Rlm1 por la MAPK es crítica para su función transactivadora. Así, una versión de Rlm1 portadora de una doble mutación en dos de los residuos fosforilables por Slt2 (T439 y S427), pierde la capacidad de activar la transcripción aunque se ancle artificialmente a los promotores en condiciones de estrés de pared (Jung *et al.*, 2002). El dominio de activación de Rlm1 presente en su región C-terminal, es también necesario para la activación transcripcional en respuesta a estrés, cuya actividad podría estar regulada por la fosforilación mediada por Slt2 (Watanabe *et al.*, 1997). Hasta el momento, el control de la actividad de Rlm1 es el mecanismo mejor comprendido por el que Slt2 regula el inicio de la transcripción en respuesta a estrés. Ejemplos de este mismo proceso

han sido descritos para otras MAPK como Hog1, donde la fosforilación directa de factores de transcripción como Smp1 y Sko1 en respuesta a estrés osmótico, es importante para su función. Así, mutaciones en estos factores de transcripción que afecten a la fosforilación por la MAPK conducen a defectos en la expresión de genes de estrés (Proft *et al.*, 2001; de Nadal *et al.*, 2003). Una situación diferente se ha descrito para Hot1, otro de los factores de transcripción activados por Hog1. Hot1 se encuentra, al igual que Rlm1, pre-unido al promotor del gen *GPD1* en condiciones basales, reclutando a la MAPK Hog1 en activación. A diferencia de Rlm1, la fosforilación de Hot1 por la MAPK es innecesaria para la inducción transcripcional (Alepez *et al.*, 2003; Alepez *et al.*, 2001), de manera que este factor de transcripción actúa únicamente como punto de anclaje, dirigiendo a Hog1 a genes específicos donde a continuación, la MAPK recluta y activa la maquinaria general de transcripción en respuesta a estrés osmótico.

Adicionalmente a la fosforilación de Rlm1, Slt2 podría tener otros papeles en la regulación del inicio de la transcripción, ya sea reclutando la RNA Pol II u otras proteínas coactivadoras. Slt2 y su ortólogo en humanos ERK5 (Truman *et al.*, 2006) son diferentes al resto de las MAPK ya que poseen dominios de activación transcripcional dentro de la región C-terminal (Soler *et al.*, 1995; Kasler *et al.*, 2000). Por tanto, y de acuerdo con esta última posibilidad, Slt2 es capaz de activar la transcripción del reportero *GAL1-LacZ* en respuesta a estrés cuando se fusiona artificialmente al dominio de unión a DNA del activador Gal4. En este proceso es necesaria la fosforilación de la MAPK (Kim *et al.*, 2007). En este trabajo, hemos demostrado que la capacidad transactivadora de Slt2 es independiente de la presencia de Rlm1 dentro del sistema artificial explicado. Por tanto, adicionalmente a la fosforilación de Rlm1, Slt2 podría tener *in vivo* otras actividades en el proceso de activación transcripcional. Estos resultados abrirían un nuevo campo de estudio sobre la regulación de la respuesta mediada por la ruta CWI en el que no sólo la fosforilación de Rlm1 si no la posibilidad de que Slt2 forme parte de complejos transcripcionales unidos al promotor, participaría en la activación de genes en respuesta a estrés. Además, Slt2 se encuentra también presente en la región codificante del gen *MLP1* bajo condiciones de estrés celular, lo que indicaría que la MAPK juega también un papel funcional después del inicio de la transcripción, en el proceso de elongación. En este contexto ha sido definido también el papel de la MAPK Hog1. El hecho de que Hog1 se asociara específicamente a los genes que regula y que su actividad quinasa fuera necesaria para la activación transcripcional, aunque la fosforilación de los factores de transcripción no fuera siempre un requisito para la iniciación de la transcripción, sugirió que la MAPK Hog1 podía inducir la transcripción por otros mecanismos independientes de la fosforilación de los factores de transcripción. Así, se definió que Hog1 es el responsable del

reclutamiento de la RNA Pol II (Alepez *et al.*, 2003) y de diversos complejos modificadores de cromatina a los genes de respuesta a osmoestrés, que participan tanto en el inicio de la transcripción (SAGA, SWI/SNF y Rpd3) (de Nadal *et al.*, 2004; Zapater *et al.*, 2007; Proft y Struhl, 2002), como en el proceso de elongación (RSC) (Mas *et al.*, 2009).

## Paso 2: participación del complejo SWI/SNF

---

La entrada de Rlm1 a los promotores en condiciones de activación no es sencilla. La posición de los nucleosomas en el promotor de *MLP1* estaría limitando el acceso de Rlm1 a uno de sus sitios de unión, de manera que la unión de este factor en situaciones de estrés podría estar regulada por complejos remodeladores y/o modificadores de cromatina. En este trabajo, se demuestra por primera vez la participación del complejo SWI/SNF en la regulación de la respuesta CWI y su interacción *in vivo* con genes de la respuesta en condiciones de activación. Puesto que la unión de Rlm1 a los promotores en condiciones de estrés se encuentra totalmente bloqueada en ausencia de la subunidad del complejo Swi3, aunque se aumenten artificialmente los niveles de Rlm1, el reclutamiento del complejo SWI/SNF a los promotores tendría como objetivo la desorganización de la cromatina necesaria para exponer el otro sitio de unión a Rlm1. De esta manera, se permitiría el incremento observado en la entrada del activador en condiciones de estrés, en un modelo de activación en dos pasos (Figura 59B-E). Este mecanismo ha sido ya establecido en levaduras para el promotor del gen *PHO5*. Este promotor presenta un sitio de unión para el activador Pho4 de baja afinidad, expuesto entre los nucleosomas -2 y -3, mientras que el sitio de unión de alta afinidad se encuentra localizado dentro del nucleosoma -2 (Fascher *et al.*, 1990; Almer *et al.*, 1986; Lam *et al.*, 2008). La completa correlación entre la inducción de *PHO5* con la disrupción de la cromatina ha puesto de manifiesto que el acceso del activador Pho4 a su sitio de alta afinidad, requiera de la acción de complejos modificadores de cromatina. Varios complejos modificadores y remodeladores de cromatina han sido identificados por su interacción con el gen *PHO5*, incluyendo SAGA (Barbaric *et al.*, 2003), NuA4 (Nourani *et al.*, 2004), INO80 (Steger *et al.*, 2003) y SWI/SNF (Dhasarathy y Klade, 2005), donde es posible que ejerzan funciones redundantes. Asimismo, existe un gran número de trabajos que indican que la actividad de SWI/SNF facilita la unión de activadores transcripcionales a determinados sitios en el DNA. Por ejemplo, la eficiente unión del activador Gal4 a sitios de baja afinidad requiere la actividad de SWI/SNF *in vivo* (Burns y Peterson, 1997). La incapacidad de Gal4 para ocupar estos sitios de baja afinidad en ausencia de la actividad de SWI/SNF puede ser suprimida al reemplazar los sitios de baja por otros de alta afinidad, o al situar los sitios de baja afinidad dentro de una región libre de nucleosomas (Burns y Peterson, 1997).

A pesar de que este complejo ha sido relacionado con diferentes tipos de estrés (Proft y Struhl, 2002; Geng y Laurent, 2004), la participación de SWI/SNF en la deslocalización de nucleosomas permitiendo la unión de activadores transcripcionales a determinadas secuencias dentro del promotor, sólo ha sido descrita en el contexto de genes de respuesta a estrés térmico (Erkina *et al.*, 2008). En estas condiciones, se produce una fuerte disminución de la ocupación de nucleosomas, así como un incremento moderado de la acetilación de la histona H4 en los promotores de los genes activados, mientras que los promotores de los genes reprimidos presentan un efecto inverso. El complejo SWI/SNF es reclutado activamente a los promotores y regiones codificantes de los genes de respuesta a estrés térmico donde media, en condiciones de activación, el remodelado de la cromatina (Shivaswamy e Iyer, 2008). En este contexto, la eliminación de la subunidad Snf2 produce retrasos importantes en la cinética de desplazamiento de los nucleosomas localizados en los promotores de estos genes (Erkina *et al.*, 2008; Shivaswamy e Iyer, 2008), y afecta finalmente la expresión génica (Shivaswamy e Iyer, 2008). La mayoría de los factores de transcripción relacionados con estrés térmico, como Hsf1, Msn2, Msn4 y Atf2, muestran un fuerte incremento en el acceso a sus sitios de unión durante la activación transcripcional, debido al reposicionamiento de los nucleosomas dentro del promotor en condiciones de estrés (Shivaswamy *et al.*, 2008). Así, en ausencia de Snf2 se bloquea totalmente el desplazamiento de histonas en el promotor del gen *HSP12*, y por tanto la entrada del factor de transcripción Hsf1. En otros genes de esta respuesta (*HSP82* y *SSA4*), donde el factor de transcripción Hsf1 ya se encuentra pre-unido al promotor en condiciones basales, la acción del complejo SWI/SNF es menos crítica (Erkina *et al.*, 2008).

En el modelo que proponemos, la entrada de Rlm1 en condiciones de activación, depende de la presencia de SWI/SNF y a su vez, la entrada del complejo SWI/SNF depende totalmente de la presencia de Rlm1. La interdependencia entre Rlm1 y SWI/SNF para su reclutamiento a los promotores de los genes de la respuesta regulada por la ruta CWI, indica una conexión funcional cercana entre ambos elementos. ¿Cómo se produce el reclutamiento del complejo SWI/SNF al promotor en condiciones de activación? La existencia de una interacción física directa entre SWI/SNF y Rlm1 en condiciones de activación, demostrada aquí tanto con experimentos *in vitro* como *in vivo*, así como el hecho de que el reclutamiento del complejo dependa de la presencia de Rlm1, indicaría que el reclutamiento de SWI/SNF a los promotores está mediado por su interacción directa con el factor de transcripción Rlm1. La interacción física con factores de transcripción específicos es uno de los mecanismos más empleados por la levadura para el reclutamiento del complejo SWI/SNF hacia diferentes promotores (Cosma *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 1999;

Yudkovsky *et al.*, 1999; Yoshinaga *et al.*, 1992). Así, la presencia de SWI/SNF en el promotor del gen *HO* es dependiente del activador Swi5 (Cosma *et al.*, 1999) y de acuerdo con esto, SWI/SNF interacciona directamente con Swi5 *in vitro* (Neely *et al.*, 2002). El complejo SWI/SNF también interacciona directamente con los activadores Gcn4, Hap4, Pho4, Gal4-AH y Gal3-VP16 *in vitro* y es reclutado a través de ellos a los promotores *in vivo* (Neely *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 2002; Yudkovsky *et al.*, 1999). En base a este mecanismo, hemos establecido dos posibles alternativas para el reclutamiento del complejo SWI/SNF por Rlm1 (Figura 59B):

- (i) La fracción de Rlm1 que se encuentra pre-unida en el sitio expuesto dentro del promotor es activado por fosforilación a través de Sit2, mediando a continuación el reclutamiento del complejo SWI/SNF hacia los promotores.
- (ii) La interacción entre el factor de transcripción y el complejo SWI/SNF puede tener lugar en solución, y ocupar a través de Rlm1 aquellos sitios de unión que se encontraran libres en condiciones basales (aunque tampoco se podría descartar que SWI/SNF-Rlm1 se unieran con una baja afinidad a los sitios ocupados por nucleosomas).

Ambas alternativas podrían ser posibles y podrían tener lugar sin ser excluyentes (Vignali *et al.*, 2000; Peterson y Workman, 2000), ya que se ha demostrado que las interacciones entre activadores y el complejo SWI/SNF son estables tanto en solución como cuando se unen al DNA o a nucleosomas (Neely *et al.*, 2002).

El conjunto de resultados expuestos en este trabajo establecen que el mecanismo utilizado por el complejo SWI/SNF para alterar la estructura de la cromatina, en condiciones de activación, es la eliminación/expulsión de nucleosomas a lo largo del promotor del gen *MLP1*. De esta manera, el DNA será accesible para Rlm1, permitiendo su reclutamiento masivo en condiciones de activación y la posterior formación del complejo de pre-iniciación de la transcripción. El desplazamiento de histonas producido por el complejo SWI/SNF se observa sólo en el promotor de *MLP1*, siendo inexistente en la región codificante del gen. Este resultado, junto con el hecho de no haber detectado una interacción *in vivo* entre el complejo SWI/SNF y el ORF del gen *MLP1*, indicarían que la acción del complejo SWI/SNF no es necesaria en pasos posteriores como la elongación, sino que se limitaría al inicio de la transcripción.

Aunque el complejo SWI/SNF no se encontró asociado en ausencia de estrés a los genes de la respuesta analizados, la eliminación de *SWI3* produce una pequeña deslocalización de los nucleosomas -1 y -2 del gen *MLP1*, comparado con el patrón normal

observado en la cepa silvestre. Si bien este efecto no tiene consecuencias en la expresión basal de *MLP1*, los resultados procedentes del estudio transcripcional realizado aquí a escala genómica descubrieron la existencia de un grupo de genes de la respuesta que sí se encontraba regulado en condiciones basales por el complejo SWI/SNF. La eliminación de la subunidad *SWI3* tiene como resultado la inducción basal de un 19% y un 40% de los genes de la respuesta, para el tratamiento con RC y ZL, respectivamente. La inducción de estos genes en ausencia de Swi3, indicaría que el complejo SWI/SNF está participando en su represión en condiciones basales. Aunque la unión *in vivo* de SWI/SNF no ha sido analizada en el promotor de estos genes, es probable que el complejo se esté reclutando y que regule la posición de los nucleosomas en ausencia de estrés, dificultando la transcripción basal. Este efecto sería el contrario al producido por el complejo SWI/SNF en otro grupo de genes de la respuesta y en condiciones de activación, donde el remodelado de la cromatina mediado por estrés permite finalmente la asociación de la Pol II y el inicio de la transcripción.

En estudios de expresión realizados a escala genómica en la levadura *S. cerevisiae* (Holstege *et al.*, 1998; Sudarsanam y Winston, 2000) ya se observó que la acción del complejo SWI/SNF era necesaria para la transcripción, en condiciones basales, de un grupo de genes, pudiendo actuar como represor y activador *in vivo*. La caracterización de los perfiles globales de expresión del mutante *swi3Δ* realizada en este trabajo, estarían también de acuerdo con una limitada pero cierta necesidad del complejo SWI/SNF para la expresión constitutiva de los genes de la levadura. La comparación de los resultados obtenidos en este trabajo para el mutante *swi3Δ* con los previamente ya publicados por Sudarsanam y colaboradores para los mutantes *swi1Δ* y *snf2Δ*, demuestran que la eliminación de diferentes subunidades del complejo producen la inducción y represión de diferentes genes, siendo la respuesta parcialmente solapante. Las diferencias encontradas entre ambos estudios pueden deberse en primer lugar a que se están estudiando perfiles de expresión de mutantes en genes que codifican para proteínas diferentes, que aunque formen parte del mismo complejo, pueden tener funciones adicionales independientes. Además, la metodología experimental y el fondo genético de la cepa utilizada, pueden aumentar la variabilidad en los resultados de estos experimentos.

### Paso 3: entrada de la RNA Pol II e inicio de la transcripción

---

La reprogramación de la expresión génica bajo situaciones de estrés celular implica la unión de la RNA Pol II a los promotores de genes de respuesta a estrés. En las condiciones de estrés estudiadas en este trabajo, la entrada de la Pol II requiere la

presencia de Sit2 activo, el factor de transcripción Rlm1 y el complejo SWI/SNF (Figura 59F). La cinética de entrada de Rlm1, así como la pérdida de la histona H3 en el promotor de *MLP1*, se correlacionan completamente con la unión de la Pol II al promotor.

Aunque en este trabajo hemos mostrado únicamente el remodelado de la cromatina mediado por el complejo SWI/SNF en el gen *MLP1*, sugerimos que el mecanismo propuesto para la regulación de la expresión génica, no se restringe únicamente a *MLP1*, sino que es un mecanismo general para la activación transcripcional de genes de respuesta a estrés sobre la pared celular, regulados por Rlm1. La existencia de un modelo general en el que la participación del complejo SWI/SNF sea crítica para la respuesta desencadenada a través de la ruta CWI, se apoya en los siguientes resultados:

- (i) El perfil de expresión global en respuesta a diferentes tipos de estrés sobre la pared celular está severamente afectado en el mutante *swi3Δ*.
- (ii) El complejo SWI/SNF es reclutado también a promotores de otros genes de la respuesta como son *SRL3*, *YLR194C* y *RLM1*, de forma Sit2 y Rlm1-dependiente.
- (iii) El reclutamiento de Rlm1 a estos promotores depende de la presencia del complejo SWI/SNF en condiciones de activación.
- (iv) La delección de elementos del complejo SWI/SNF produce células con defectos en la pared celular, sensibles a agentes que producen daños sobre esta estructura. Los análisis fenotípicos indican que tanto la función catalítica de Snf2, así como la integridad estructural del complejo son fundamentales para la supervivencia celular bajo condiciones de estrés de pared.

Además, la localización de nucleosomas posicionados de acuerdo al mapa de referencia establecido (Jiang y Pugh, 2009b), revela la presencia de sitios de unión a Rlm1, tanto ocupados por nucleosomas como expuestos en regiones libres, en varios genes de la respuesta mediada por la ruta CWI analizados, sugiriendo que el modelo en dos pasos propuesto aquí para *MLP1* pueda ser extendido a otros genes inducidos dentro de la respuesta de adaptación a estrés celular.

Uno de los genes inducidos en respuesta a estrés sobre la pared celular es *RLM1*. Al igual que el resto de genes inducidos en la respuesta a estrés dependiente de Rlm1, el promotor de este gen presenta un sitio potencial de unión al propio factor de transcripción y actividad UAS dependiente de Rlm1 y de Sit2 (Dodou y Treisman, 1997). Esto permite a la célula un mecanismo de retroalimentación positiva, al regular Rlm1 su propia expresión. La inducción de *RLM1* en situaciones de estrés sobre la pared celular depende también del complejo SWI/SNF. El hecho de que el complejo SWI/SNF controle la expresión del factor

de transcripción que lleva a cabo el programa transcripcional asociado a situaciones de estrés de pared, tiene consecuencias muy importantes. Así, en condiciones de activación y en ausencia de diferentes subunidades del complejo SWI/SNF, se produce una disminución en los transcritos de *RLM1*, reflejado en la disminución de los niveles de proteína en estas condiciones. Sin embargo, la sobreexpresión de Rlm1 en un mutante *swi3Δ* no rescata los defectos en el reclutamiento de Rlm1 a los promotores mediado por estrés, la inducción de genes de la respuesta CWI o la hipersensibilidad a RC causada por la delección del gen *SWI3*, confirmando que el complejo SWI/SNF es necesario para la regulación de la expresión de los genes inducidos a través de la ruta CWI.

### **Cooperación entre diferentes complejos**

La cooperación entre complejos remodeladores de cromatina es importante para la regulación de esta estructura y la correcta activación transcripcional de genes bajo diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, la relación funcional entre los complejos remodeladores de cromatina ATP-dependientes RSC, SWI/SNF e ISWI es necesaria para la regulación de genes de respuesta a estrés térmico (Erkina *et al.*, 2010). Además, bajo estrés osmótico, tanto el complejo RSC (Mas *et al.*, 2009) como SWI/SNF (Proft y Struhl, 2002) son reclutados a los genes de respuesta a estrés osmótico por Hog1, si bien, el complejo RSC parece ser el remodelador clave en la reorganización de la cromatina bajo estas circunstancias, siendo un proceso crítico para la progresión de la Pol II y la expresión génica en estas condiciones (Mas *et al.*, 2009).

En el contexto del *screening* genómico realizado en nuestro laboratorio para la identificación de mutantes con defectos en la inducción transcripcional del gen *MLP1*, se descubrió por primera vez la participación directa de diferentes complejos proteicos en la regulación de la expresión génica, incluyendo además del complejo SWI/SNF, al acetilador de histonas SAGA. En este trabajo hemos demostrado que el complejo SWI/SNF juega un papel principal en el remodelado de la cromatina y en el desarrollo de una respuesta transcripcional de adaptación eficiente en condiciones de estrés sobre la pared celular. Sin embargo, la identificación de varias subunidades del complejo SAGA sugeriría una posible colaboración entre remodeladores ATP-dependientes y modificadores de histonas en el proceso de activación transcripcional (Narlikar *et al.*, 2002). Además, el hecho de que se haya establecido recientemente una interacción directa entre Slt2 y las subunidades del complejo SAGA, Gcn5 y Ada2, inducida bajo estrés de pared celular y dependiente de Rlm1 (Kim y Levin, 2011), sugiere claramente la participación del complejo SAGA en la activación transcripcional mediada por la ruta CWI. La acetilación de nucleosomas estabiliza la unión *in vitro* del complejo SWI/SNF a los nucleosomas (Hassan *et al.*, 2001) y

los nucleosomas acetilados por el complejo SAGA son desplazados más fácilmente por el complejo SWI/SNF (Chandy *et al.*, 2006). La acetilación de histonas puede predisponer los nucleosomas para su desplazamiento, al menos de dos formas diferentes: (i) facilitando el desplazamiento de nucleosomas al desestabilizar las interacciones histona-DNA y/o (ii) incrementando el reconocimiento de los nucleosomas acetilados por los bromodominios presentes en la subunidad Snf2 del complejo SWI/SNF. Cabe por tanto esta posibilidad en la regulación de las respuestas de adaptación a estrés a través de la ruta CWI.

Sin embargo, no siempre la acción del complejo SAGA precede a la unión del complejo SWI/SNF, pudiendo ocurrir incluso reclutamientos paralelos de ambas maquinarias. Así, se han descrito reclutamientos paralelos del complejo SAGA y SWI/SNF en respuesta a estrés osmótico, siendo importantes para la transcripción de genes reprimidos por Cyc8-Tup1 (Proft y Struhl, 2002) y como consecuencia de limitación aguda de glucosa, donde Gcn5 y otra histona acetiltransferasa, Esa1, facilitan la asociación de SWI/SNF con el promotor para una óptima inducción de *SUC2* (Geng y Laurent, 2004).

En las respuestas de adaptación a estrés sobre la pared celular sólo podemos señalar en este momento que el complejo SAGA parece tener importancia en la regulación de las respuestas transcripcionales mediadas por la ruta CWI. Adicionalmente, mutaciones en determinadas subunidades del complejo RSC confieren defectos en la pared celular (Angus-Hill *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2006), sugiriendo que RSC también podría estar implicado en la regulación de la integridad de la pared celular.





**7**

**CONCLUSIONES**



Las conclusiones de este trabajo son:

1. La activación transcripcional del gen *MLP1* en situaciones de estrés sobre la pared celular de *S. cerevisiae* requiere la unión de la RNA Pol II a su promotor y depende del correcto funcionamiento de la ruta de integridad celular y del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF.
2. En condiciones de activación, la cinética de reclutamiento de la Pol II se correlaciona con los niveles de expresión del gen *MLP1*, con la asociación al promotor del factor de transcripción Rlm1 y el desplazamiento de la histona H3, estando todos estos procesos limitados en ausencia de Swi3.
3. Rlm1 se une a los promotores de los genes de la respuesta CWI en condiciones basales y se recluta activamente en condiciones de estrés sobre la pared celular. La asociación basal de Rlm1 es independiente de Swi3 y parcialmente dependiente de Slt2, mientras que en condiciones de activación depende completamente de ambos elementos.
4. La inactivación del complejo SWI/SNF anula la activación transcripcional de diferentes genes regulados por la ruta de integridad CWI y causa hipersensibilidad a agentes que dañan la pared celular, pero no afecta a la señalización a través de la ruta.
5. La subunidad Swi3 es esencial para la respuesta transcripcional global desencadenada en la levadura por situaciones que comprometen la integridad de la pared celular.
6. La MAPK Slt2 se recluta al promotor del gen *MLP1* en condiciones de estrés sobre la pared celular, proceso que depende de la presencia del factor de transcripción Rlm1.
7. El complejo SWI/SNF se asocia a los promotores de los genes de la respuesta CWI, sólo en condiciones de activación, y su unión depende tanto de la MAPK Slt2 como del factor de transcripción Rlm1.
8. Rlm1 interacciona físicamente con el complejo SWI/SNF en respuesta a situaciones que comprometen la integridad de la pared celular.

9. El complejo SWI/SNF es el responsable de la reorganización de la cromatina en respuesta a la activación de la ruta CWI y dirige el desplazamiento de nucleosomas en el promotor del gen *MLP1* en estas condiciones.







# **BIBLIOGRAFÍA**



- Agarwal,A.K., Rogers,P.D., Baerson,S.R., Jacob,M.R., Barker,K.S., Cleary,J.D. *et al.* (2003) Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 34998-35015.
- Akella,R., Moon,T.M., and Goldsmith,E.J. (2008) Unique MAP Kinase binding sites. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 48-55.
- Albert,I., Mavrich,T.N., Tomsho,L.P., Qi,J., Zanton,S.J., Schuster,S.C., and Pugh,B.F. (2007) Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **446**: 572-576.
- Alberts B., Bray D. and Hopkin K. *et al.* *Essential Cell Biology*. 2nd ed. New York and London: Garland Science. 2004.
- Alepuz,P.M., de Nadal,E., Zapater,M., Ammerer,G., and Posas,F. (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J* **22**: 2433-2442.
- Alepuz,P.M., Jovanovic,A., Reiser,V., and Ammerer,G. (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* **7**: 767-777.
- Alic,N., Higgins,V.J., Pichova,A., Breitenbach,M., and Dawes,I.W. (2003) Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 41849-41855.
- Almer,A., Rudolph,H., Hinnen,A., and Horz,W. (1986) Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J* **5**: 2689-2696.
- Amberg, D.C., Burke, D.J. and Strathern, J.N. (2005) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York: John Inglis.
- Anderson,J.D., and Widom,J. (2001) Poly(dA-dT) promoter elements increase the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. *Mol Cell Biol* **21**: 3830-3839.
- Andrews,B.J., and Herskowitz,I. (1989) Identification of a DNA binding factor involved in cell-cycle control of the yeast HO gene. *Cell* **57**: 21-29.
- Angus-Hill,M.L., Schlichter,A., Roberts,D., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Cairns,B.R. (2001) A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell* **7**: 741-751.
- Aparicio O, Geisberg JV, and Struhl K (2004) Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 17:Unit 17.7**.
- Arroyo,J., Hutzler,J., Bermejo,C., Ragni,E., García-Cantalejo,J., Botías,P. *et al.* (2011) Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Mol Microbiol* **79**: 1529-1546.
- Arroyo,J., Bermejo,C., García,R., and Rodríguez-Peña,J.M. (2009) Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 1**: 44-46.
- Auble,D.T., Hansen,K.E., Mueller,C.G., Lane,W.S., Thorner,J., and Hahn,S. (1994) Mot1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev* **8**: 1920-1934.

- Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, S.A. and Struhl, K. (1993) Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Willey Interscience.
- Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. (2001) Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* **21**: 6515-6528.
- Baldi P and Long AD (2001) A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics*, **17**, 509-519.
- Bao, Y., and Shen, X. (2011) SnapShot: Chromatin remodeling: INO80 and SWR1. *Cell* **144**: 158.
- Barbaric, S., Reinke, H., and Horz, W. (2003) Multiple mechanistically distinct functions of SAGA at the PHO5 promoter. *Mol Cell Biol* **23**: 3468-3476.
- Bardwell, L., and Thorner, J. (1996) A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem Sci* **21**: 373-374.
- Basehoar, A.D., Zanton, S.J., and Pugh, B.F. (2004) Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* **116**: 699-709.
- Bazett-Jones, D.P., Côté, J., Landel, C.C., Peterson, C.L., and Workman, J.L. (1999) The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA and polynucleosome arrays and can disrupt DNA-histone contacts within these domains. *Mol Cell Biol* **19**: 1470-1478.
- Becker, P.B., and Horz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* **71**: 247-273.
- Bermejo, C., García, R., Straede, A., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Heinisch, J.J., and Arroyo, J. (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**: 679-688.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez de la Concepción ML, Rivas, C. *et al.* (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**: 1113-1124.
- Bernstein, B.E., Liu, C.L., Humphrey, E.L., Perlstein, E.O., and Schreiber, S.L. (2004) Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol* **5**: R62.
- Bernstein, B.E., Tong, J.K., and Schreiber, S.L. (2000) Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13708-13713.
- Berry, D.B., and Gasch, A.P. (2008) Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell* **19**: 4580-4587.
- Boorsma, A., de Nobel, H., ter Riet, B., Bargmann, B., Brul, S., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2004) Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 413-427.
- Boyer, L.A., Langer, M.R., Crowley, K.A., Tan, S., Denu, J.M., and Peterson, C.L. (2002) Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell* **10**: 935-942.
- Breedon, L., and Nasmyth, K. (1987) Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators. *Cell* **48**: 389-397.

- Buck,M.J., and Lieb,J.D. (2006) A chromatin-mediated mechanism for specification of conditional transcription factor targets. *Nat Genet* **38**: 1446-1451.
- Buratowski,S., Hahn,S., Guarente,L., and Sharp,P.A. (1989) Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**: 549-561.
- Burns,L.G., and Peterson,C.L. (1997) The yeast SWI-SNF complex facilitates binding of a transcriptional activator to nucleosomal sites in vivo. *Mol Cell Biol* **17**: 4811-4819.
- Cabib,E., Drgonova,J., and Drgon,T. (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **67**: 307-333.
- Cabib,E., and Duran,A. (2005) Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem* **280**: 9170-9179.
- Cairns,B.R. (2009) The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**: 193-198.
- Cairns,B.R. (2005) Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 185-190.
- Cairns,B.R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Winston,F., and Kornberg,R.D. (1998) Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol Cell* **2**: 639-651.
- Cairns,B.R., Kim,Y.J., Sayre,M.H., Laurent,B.C., and Kornberg,R.D. (1994) A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1950-1954.
- Cairns,B.R., Lorch,Y., Li,Y., Zhang,M., Lacomis,L., Erdjument-Bromage,H. *et al.* (1996) RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**: 1249-1260.
- Cairns,B.R., Schlichter,A., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., Kornberg,R.D., and Winston,F. (1999) Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol Cell* **4**: 715-723.
- Cang,Y., Auble,D.T., and Prelich,G. (1999) A new regulatory domain on the TATA-binding protein. *EMBO J* **18**: 6662-6671.
- Capaldi,A.P., Kaplan,T., Liu,Y., Habib,N., Regev,A., Friedman,N., and O'Shea,E.K. (2008) Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nat Genet* **40**: 1300-1306.
- Carey,M., Li,B., and Workman,J.L. (2006) RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol Cell* **24**: 481-487.
- Carmona-Saez,P., Chagoyen,M., Tirado,F., Carazo,J.M., and Pascual-Montano,A. (2007) GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. *Genome Biol* **8**: R3.
- Causton,H.C., Ren,B., Koh,S.S., Harbison,C.T., Kanin,E., Jennings,E.G. *et al.* (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 323-337.
- Chandy,M., Gutierrez,J.L., Prochasson,P., and Workman,J.L. (2006) SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot Cell* **5**: 1738-1747.
- Chen,D., Toone,W.M., Mata,J., Lyne,R., Burns,G., Kivinen,K. *et al.* (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214-229.

- Chen,R.E., and Thorner,J. (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1311-1340.
- Cho,H., Orphanides,G., Sun,X., Yang,X.J., Ogryzko,V., Lees,E. *et al.* (1998) A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* **18**: 5355-5363.
- Cid,V.J., Duran,A., del Rey,F., Snyder,M.P., Nombela,C., and Sánchez,M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345-386.
- Claret,S., Gatti,X., Doignon,F., Thoraval,D., and Crouzet,M. (2005) The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1375-1386.
- Cobb,M.H., and Goldsmith,E.J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**: 14843-14846.
- Collins,S.R., Kemmeren,P., Zhao,X.C., Greenblatt,J.F., Spencer,F., Holstege,F.C. *et al.* (2007) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* **6**: 439-450.
- Collister,M., Didmon,M.P., MacIsaac,F., Stark,M.J., MacDonald,N.O., and Keyse,S.M. (2002) YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **527**: 186-192.
- Cooper,J.A. (1994) MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr Biol* **4**: 1118-1121.
- Cosma,M.P., Panizza,S., and Nasmyth,K. (2001) Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol Cell* **7**: 1213-1220.
- Cosma,M.P., Tanaka,T., and Nasmyth,K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**: 299-311.
- Costanzo,M., Baryshnikova,A., Bellay,J., Kim,Y., Spear,E.D., Sevier,C.S. *et al.* (2010) The genetic landscape of a cell. *Science* **327**: 425-431.
- Côté,J., Peterson,C.L., and Workman,J.L. (1998) Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4947-4952.
- Côté,J., Quinn,J., Workman,J.L., and Peterson,C.L. (1994) Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**: 53-60.
- Damelin,M., Simon,I., Moy,T.I., Wilson,B., Komili,S., Tempst,P. *et al.* (2002) The genome-wide localization of Rsc9, a component of the RSC chromatin-remodeling complex, changes in response to stress. *Mol Cell* **9**: 563-573.
- Darst,R.P., Dasgupta,A., Zhu,C., Hsu,J.Y., Vroom,A., Muldrow,T., and Auble,D.T. (2003) Mot1 regulates the DNA binding activity of free TATA-binding protein in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* **278**: 13216-13226.
- Davenport,K.R., Sohaskey,M., Kamada,Y., Levin,D.E., and Gustin,M.C. (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* **270**: 30157-30161.
- de Nadal,E., and Posas,F. (2010) Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J* **29**: 4-13.

- de Nadal,E., Zapater,M., Alepuz,P.M., Sumoy,L., Mas,G., and Posas,F. (2004) The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* **427**: 370-374.
- de Nadal,E., Casadome,L., and Posas,F. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**: 229-237.
- de Nobel,H., Ruiz,C., Martín,H., Morris,W., Brul,S., Molina,M., and Klis,F.M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146**: 2121-2132.
- Deckert,J., and Struhl,K. (2002) Targeted recruitment of Rpd3 histone deacetylase represses transcription by inhibiting recruitment of Swi/Snf, SAGA, and TATA binding protein. *Mol Cell Biol* **22**: 6458-6470.
- Deckert,J., and Struhl,K. (2001) Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. *Mol Cell Biol* **21**: 2726-2735.
- Delley,P.A., and Hall,M.N. (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**: 163-174.
- Dhasarathy,A., and Kladde,M.P. (2005) Promoter occupancy is a major determinant of chromatin remodeling enzyme requirements. *Mol Cell Biol* **25**: 2698-2707.
- Dimova,D., Nackerdien,Z., Furgeson,S., Eguchi,S., and Osley,M.A. (1999) A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol Cell* **4**: 75-83.
- Dodou,E., and Treisman,R. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 1848-1859.
- Dupres,V., Alsteens,D., Wilk,S., Hansen,B., Heinisch,J.J., and Dufrene,Y.F. (2009) The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* **5**: 857-862.
- Ebbert,R., Birkmann,A., and Schuller,H.J. (1999) The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol Microbiol* **32**: 741-751.
- Edmunds,J.W., and Mahadevan,L.C. (2004) MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcription complexes. *J Cell Sci* **117**: 3715-3723.
- Erkina,T.Y., and Erkin,A.M. (2006) Displacement of histones at promoters of *Saccharomyces cerevisiae* heat shock genes is differentially associated with histone H3 acetylation. *Mol Cell Biol* **26**: 7587-7600.
- Erkina,T.Y., Tschetter,P.A., and Erkin,A.M. (2008) Different requirements of the SWI/SNF complex for robust nucleosome displacement at promoters of heat shock factor and Msn2- and Msn4-regulated heat shock genes. *Mol Cell Biol* **28**: 1207-1217.
- Erkina,T.Y., Zou,Y., Freeling,S., Vorobyev,V.I., and Erkin,A.M. (2010) Functional interplay between chromatin remodeling complexes RSC, SWI/SNF and ISWI in regulation of yeast heat shock genes. *Nucleic Acids Res* **38**: 1441-1449.
- Errede,B., Cade,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* **42**: 477-485.
- Esnault,C., Ghavi-Helm,Y., Brun,S., Soutourina,J., Van Berkum,N., Boschiero,C. *et al.* (2008) Mediator-dependent recruitment of TFIIH modules in preinitiation complex. *Mol Cell* **31**: 337-346.

- Fascher,K.D., Schmitz,J., and Horz,W. (1990) Role of trans-activating proteins in the generation of active chromatin at the PHO5 promoter in *S. cerevisiae*. *EMBO J* **9**: 2523-2528.
- Fazio,T.G., Kooperberg,C., Goldmark,J.P., Neal,C., Basom,R., Delrow,J., and Tsukiyama,T. (2001) Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **21**: 6450-6460.
- Felsenfeld,G., and Groudine,M. (2003) Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448-453.
- Field,Y., Kaplan,N., Fondufe-Mittendorf,Y., Moore,I.K., Sharon,E., Lubling,Y. *et al.* (2008) Distinct modes of regulation by chromatin encoded through nucleosome positioning signals. *PLoS Comput Biol* **4**: e1000216.
- Flanagan,J.F., Mi,L.Z., Chruszcz,M., Cymborowski,M., Clines,K.L., Kim,Y. *et al.* (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**: 1181-1185.
- Flández,M., Cosano,I.C., Nombela,C., Martín,H., and Molina,M. (2004) Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **279**: 11027-11034.
- Flaus,A., Martin,D.M., Barton,G.J., and Owen-Hughes,T. (2006) Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* **34**: 2887-2905.
- García,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Rodríguez-Peña,J.M., Francois,J. *et al.* (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183-15195.
- García,R., Rodríguez-Peña,J.M., Bermejo,C., Nombela,C., and Arroyo,J. (2009) The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**: 10901-10911.
- García-Gimeno,M.A., and Struhl,K. (2000) Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress. *Mol Cell Biol* **20**: 4340-4349.
- Gasch,A.P. (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* **24**: 961-976.
- Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G. *et al.* (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.
- Geng,F., Cao,Y., and Laurent,B.C. (2001) Essential roles of Snf5p in Snf-Swi chromatin remodeling in vivo. *Mol Cell Biol* **21**: 4311-4320.
- Geng,F., and Laurent,B.C. (2004) Roles of SWI/SNF and HATs throughout the dynamic transcription of a yeast glucose-repressible gene. *EMBO J* **23**: 127-137.
- Gietz,R.D., and Woods,R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.
- Grant,P.A., Duggan,L., Côté,J., Roberts,S.M., Brownell,J.E., Candau,R. *et al.* (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* **11**: 1640-1650.
- Gray,J.V., Ogas,J.P., Kamada,Y., Stone,M., Levin,D.E., and Herskowitz,I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* **16**: 4924-4937.

- Gross,D.S., English,K.E., Collins,K.W., and Lee,S.W. (1990) Genomic footprinting of the yeast HSP82 promoter reveals marked distortion of the DNA helix and constitutive occupancy of heat shock and TATA elements. *J Mol Biol* **216**: 611-631.
- Guan KL and Dixon JE (1991) Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* **192**: 262-267.
- Guarente L and Ptashne M (1981) Fusion of Escherichia coli lacZ to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 2199-2203.
- Guillemette,B., Bataille,A.R., Gevry,N., Adam,M., Blanchette,M., Robert,F., and Gaudreau,L. (2005) Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* **3**: e384.
- Hampsey,M., and Reinberg,D. (2003) Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**: 429-432.
- Han,M., and Grunstein,M. (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* **55**: 1137-1145.
- Han ES, Wu Y, McCarter R, Nelson JF, Richardson A, and Hilsenbeck SG (2004) Reproducibility, sources of variability, pooling, and sample size: important considerations for the design of high-density oligonucleotide array experiments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **59**: 306-315.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanks,S.K., and Hunter,T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**: 576-596.
- Harbison,C.T., Gordon,D.B., Lee,T.I., Rinaldi,N.J., Macisaac,K.D., Danford,T.W. *et al.* (2004) Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**: 99-104.
- Hassan,A.H., Neely,K.E., and Workman,J.L. (2001) Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* **104**: 817-827.
- Heinisch,J.J., Dupres,V., Alsteens,D., and Dufrene,Y.F. (2010) Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nat Protoc* **5**: 670-677.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, and Tzagoloff A (1986) Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**: 163-167.
- Holstege,F.C., Jennings,E.G., Wyrick,J.J., Lee,T.I., Hengartner,C.J., Green,M.R. *et al.* (1998) Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**: 717-728.
- Horn,P.J., and Peterson,C.L. (2001) The bromodomain: a regulator of ATP-dependent chromatin remodeling? *Front Biosci* **6**: D1019-D1023.
- Huisinga,K.L., and Pugh,B.F. (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **13**: 573-585.
- Hulo,N., Sigrist,C.J., Le,S., V, Langendijk-Genevaux,P.S., Bordoli,L., Gattiker,A. *et al.* (2004) Recent improvements to the PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **32**: D134-D137.
- Hunter,T., and Plowman,G.D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* **22**: 18-22.

- Hutzler,F., Gerstl,R., Lommel,M., and Strahl,S. (2008) Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol* **68**: 1438-1449.
- Igual,J.C., Johnson,A.L., and Johnston,L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J* **15**: 5001-5013.
- Inostroza,J.A., Mermelstein,F.H., Ha,I., Lane,W.S., and Reinberg,D. (1992) Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* **70**: 477-489.
- Ioshikhes,I.P., Albert,I., Zanton,S.J., and Pugh,B.F. (2006) Nucleosome positions predicted through comparative genomics. *Nat Genet* **38**: 1210-1215.
- Irie,K., Takase,M., Lee,K.S., Levin,D.E., Araki,H., Matsumoto,K., and Oshima,Y. (1993) MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3076-3083.
- Ito,T., Bulger,M., Pazin,M.J., Kobayashi,R., and Kadonaga,J.T. (1997) ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* **90**: 145-155.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, and Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Iyer,V., and Struhl,K. (1995) Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *EMBO J* **14**: 2570-2579.
- Iyer,V.R., Horak,C.E., Scafe,C.S., Botstein,D., Snyder,M., and Brown,P.O. (2001) Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**: 533-538.
- Jacoby,J.J., Nilius,S.M., and Heinisch,J.J. (1998) A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet* **258**: 148-155.
- Jenuwein,T., and Allis,C.D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Jansen,A., and Verstrepen,K.J. (2011) Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 301-320.
- Jiang,C., and Pugh,B.F. (2009a) A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Biol* **10**: R109.
- Jiang,C., and Pugh,B.F. (2009b) Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* **10**: 161-172.
- Jiménez-Sánchez,M., Cid,V.J., and Molina,M. (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKs by the Slr2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **282**: 31174-31185.
- Jung,U.S., and Levin,D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**: 1049-1057.
- Jung,U.S., Sobering,A.K., Romeo,M.J., and Levin,D.E. (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* **46**: 781-789.
- Kadonaga,J.T. (2004) Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* **116**: 247-257.

- Kamada,Y., Jung,U.S., Piotrowski,J., and Levin,D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* **9**: 1559-1571.
- Kamakaka,R.T., and Biggins,S. (2005) Histone variants: deviants? *Genes Dev* **19**: 295-310.
- Kaplan,N., Moore,I.K., Fondufe-Mittendorf,Y., Gossett,A.J., Tillo,D., Field,Y. *et al.* (2009) The DNA-encoded nucleosome organization of a eukaryotic genome. *Nature* **458**: 362-366.
- Kapteyn,J.C., Montijn,R.C., Vink,E., de la,C.J., Llobell,A., Douwes,J.E. *et al.* (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**: 337-345.
- Kapteyn,J.C., Ram,A.F., Groos,E.M., Kollar,R., Montijn,R.C., van den,E.H. *et al.* (1997) Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J Bacteriol* **179**: 6279-6284.
- Kapteyn,J.C., Van,E.P., Sievi,E., van den,E.H., Makarow,M., and Klis,F.M. (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol* **31**: 1835-1844.
- Kasler,H.G., Victoria,J., Duramad,O., and Winoto,A. (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* **20**: 8382-8389.
- Ketela,T., Green,R., and Bussey,H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* **181**: 3330-3340.
- Kim,K.Y., Cosano,I.C., Levin,D.E., Molina,M., and Martin,H. (2007) Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast* **24**: 335-342.
- Kim,K.Y., and Levin,D.E. (2010) Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast* **27**: 541-548.
- Kim,K.Y., and Levin,D.E. (2011) Mpk1 MAPK association with the paf1 complex blocks sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* **144**: 745-756.
- Kim,K.Y., Truman,A.W., and Levin,D.E. (2008) Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* **28**: 2579-2589.
- Kingston,R.E., and Narlikar,G.J. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* **13**: 2339-2352.
- Klis,F.M., Boorsma,A., and De Groot,P.W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202.
- Klis,F.M., Mol,P., Hellingwerf,K., and Brul,S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239-256.
- Kollar,R., Reinhold,B.B., Petrakova,E., Yeh,H.J., Ashwell,G., Drgonova,J. *et al.* (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**: 17762-17775.
- Komarnitsky,P., Cho,E.J., and Buratowski,S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14**: 2452-2460.
- Kouzarides,T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.

- Krogan,N.J., Baetz,K., Keogh,M.C., Datta,N., Sawa,C., Kwok,T.C. *et al.* (2004) Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13513-13518.
- Kuo,M.H., vom,B.E., Struhl,K., and Allis,C.D. (2000) Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol Cell* **6**: 1309-1320.
- Kuras,L., and Struhl,K. (1999) Binding of TBP to promoters in vivo is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* **399**: 609-613.
- Kwon,H., Imbalzano,A.N., Khavari,P.A., Kingston,R.E., and Green,M.R. (1994) Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**: 477-481.
- Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodriguez,C., Martin-Yken,H., Arroyo,J. *et al.* (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 20345-20357.
- Lam,F.H., Steger,D.J., and O'Shea,E.K. (2008) Chromatin decouples promoter threshold from dynamic range. *Nature* **453**: 246-250.
- Langst,G., Bonte,E.J., Corona,D.F., and Becker,P.B. (1999) Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* **97**: 843-852.
- Lee,C.K., Shibata,Y., Rao,B., Strahl,B.D., and Lieb,J.D. (2004) Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet* **36**: 900-905.
- Lee,K.S., and Levin,D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* **12**: 172-182.
- Lee,T.I., and Young,R.A. (1998) Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev* **12**: 1398-1408.
- Lee,W., Tillo,D., Bray,N., Morse,R.H., Davis,R.W., Hughes,T.R., and Nislow,C. (2007) A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet* **39**: 1235-1244.
- Lesage,G., Shapiro,J., Specht,C.A., Sdicu,A.M., Menard,P., Hussein,S. *et al.* (2005) An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* **6**: 8.
- Letunic,I., Copley,R.R., Schmidt,S., Ciccarelli,F.D., Doerks,T., Schultz,J. *et al.* (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* **32**: D142-D144.
- Levin,D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Levin,D.E., Bowers,B., Chen,C.Y., Kamada,Y., and Watanabe,M. (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* **40**: 229-239.
- Li,B., Carey,M., and Workman,J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707-719.
- Li,B., Pattenden,S.G., Lee,D., Gutierrez,J., Chen,J., Seidel,C. *et al.* (2005) Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18385-18390.
- Li,X.Y., Virbasius,A., Zhu,X., and Green,M.R. (1999) Enhancement of TBP binding by activators and general transcription factors. *Nature* **399**: 605-609.

- Lipke,P.N., and Ovalle,R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735-3740.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lo,W.S., Trievel,R.C., Rojas,J.R., Duggan,L., Hsu,J.Y., Allis,C.D. *et al.* (2000) Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell***5**: 917-926.
- Lodder,A.L., Lee,T.K., and Ballester,R. (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**: 1487-1499.
- Lohr,D. (1997) Nucleosome transactions on the promoters of the yeast GAL and PHO genes. *J Biol Chem* **272**: 26795-26798.
- Lommel,M., Bagnat,M., and Strahl,S. (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol***24**: 46-57.
- Longtine MS, McKenzie A, III, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, and Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961.
- Lorch,Y., Cairns,B.R., Zhang,M., and Kornberg,R.D. (1998) Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell***94**: 29-34.
- Lorch,Y., LaPointe,J.W., and Kornberg,R.D. (1987) Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell***49**: 203-210.
- Lorch,Y., Zhang,M., and Kornberg,R.D. (1999) Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell***96**: 389-392.
- Lowary,P.T., and Widom,J. (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J Mol Biol***276**: 19-42.
- Luger,K., and Hansen,J.C. (2005) Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 188-196.
- Luger,K., Mader,A.W., Richmond,R.K., Sargent,D.F., and Richmond,T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* **389**: 251-260.
- Madden,K., Sheu,Y.J., Baetz,K., Andrews,B., and Snyder,M. (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**: 1781-1784.
- Marshall,C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell***80**: 179-185.
- Martens,J.A., and Winston,F. (2003) Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 136-142.
- Martín,H., Flández,M., Nombela,C., and Molina,M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol***58**: 6-16.
- Martín,H., Rodríguez-Pachon,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., and Molina,M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.

- Martínez-Campa,C., Politis,P., Moreau,J.L., Kent,N., Goodall,J., Mellor,J., and Goding,C.R. (2004) Precise nucleosome positioning and the TATA box dictate requirements for the histone H4 tail and the bromodomain factor Bdf1. *Mol Cell* **15**: 69-81.
- Mas,G., de Nadal,E., Dechant,R., Rodríguez de la Concepcion ML, Logie,C., Jimeno-Gonzalez,S. *et al.* (2009) Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J* **28**: 326-336.
- Mattison,C.P., Spencer,S.S., Kresge,K.A., Lee,J., and Ota,I.M. (1999) Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol* **19**: 7651-7660.
- Mavrich,T.N., Ioshikhes,I.P., Venters,B.J., Jiang,C., Tomsho,L.P., Qi,J. *et al.* (2008) A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* **18**: 1073-1083.
- Mazur,P., and Baginsky,W. (1996) In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem* **271**: 14604-14609.
- Mizzen,C.A., Yang,X.J., Kokubo,T., Brownell,J.E., Bannister,A.J., Owen-Hughes,T. *et al.* (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**: 1261-1270.
- Mohrmann,L., and Verrijzer,C.P. (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* **1681**: 59-73.
- Molina,M., Gil,C., Pla,J., Arroyo,J., and Nombela,C. (2000) Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Tech* **51**: 601-612.
- Morris,G.J., Winters,L., Coulson,G.E., and Clarke,K.J. (1986) Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **132**: 2023-2034.
- Muldrow,T.A., Campbell,A.M., Weil,P.A., and Auble,D.T. (1999) MOT1 can activate basal transcription in vitro by regulating the distribution of TATA binding protein between promoter and nonpromoter sites. *Mol Cell Biol* **19**: 2835-2845.
- Myers,L.C., Gustafsson,C.M., Bushnell,D.A., Lui,M., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Kornberg,R.D. (1998) The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* **12**: 45-54.
- Narlikar,G.J., Fan,H.Y., and Kingston,R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475-487.
- Natarajan,K., Jackson,B.M., Zhou,H., Winston,F., and Hinnebusch,A.G. (1999) Transcriptional activation by Gcn4p involves independent interactions with the SWI/SNF complex and the SRB/mediator. *Mol Cell* **4**: 657-664.
- Neely,K.E., Hassan,A.H., Brown,C.E., Howe,L., and Workman,J.L. (2002) Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol* **22**: 1615-1625.
- Neely,K.E., Hassan,A.H., Wallberg,A.E., Steger,D.J., Cairns,B.R., Wright,A.P., and Workman,J.L. (1999) Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol Cell* **4**: 649-655.
- Neish,A.S., Anderson,S.F., Schlegel,B.P., Wei,W., and Parvin,J.D. (1998) Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Res* **26**: 847-853.
- Ng,H.H., Robert,F., Young,R.A., and Struhl,K. (2002) Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev* **16**: 806-819.

- Ng,H.H., Robert,F., Young,R.A., and Struhl,K. (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* **11**: 709-719.
- Nguyen,T.H., Fleet,G.H., and Rogers,P.L. (1998) Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**: 206-212.
- Nishikawa,J., Kokubo,T., Horikoshi,M., Roeder,R.G., and Nakatani,Y. (1997) Drosophila TAF(II)230 and the transcriptional activator VP16 bind competitively to the TATA box-binding domain of the TATA box-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 85-90.
- Nogales-Cadenas,R., Carmona-Saez,P., Vazquez,M., Vicente,C., Yang,X., Tirado,F. *et al.* (2009) GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. *Nucleic Acids Res* **37**: W317-W322.
- Nonaka,H., Tanaka,K., Hirano,H., Fujiwara,T., Kohno,H., Umikawa,M. *et al.* (1995) A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 5931-5938.
- Nourani,A., Utley,R.T., Allard,S., and Cote,J. (2004) Recruitment of the NuA4 complex poises the PHO5 promoter for chromatin remodeling and activation. *EMBO J* **23**: 2597-2607.
- Orlando V, Strutt H, and Paro R (1997) Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**: 205-214.
- Orphanides,G., and Reinberg,D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* **108**: 439-451.
- Ozaki,K., Tanaka,K., Imamura,H., Hihara,T., Kameyama,T., Nonaka,H. *et al.* (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 2196-2207.
- Palacios,L., Dickinson,R.J., Sacristán-Reviriego,A., Didmon,M.P., Marín,M.J., Martín,H. *et al.* (2011) Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity MAPKs in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem* **286**:42037-42050
- Paravicini,G., and Friedli,L. (1996) Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* **251**: 682-691.
- Pascual-Ahuir,A., Struhl,K., and Proft,M. (2006) Genome-wide location analysis of the stress-activated MAP kinase Hog1 in yeast. *Methods* **40**: 272-278.
- Pascual-Ahuir,A., Posas,F., Serrano,R., and Proft,M. (2001) Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem* **276**: 37373-37378.
- Pearson,W.R., and Lipman,D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 2444-2448.
- Proft,M., and Struhl,K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307-1317.
- Peterson CL, Dingwall A, and Scott MP (1994) Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2905-2908.

- Peterson,C.L., and Workman,J.L. (2000) Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 187-192.
- Peterson,C.L., Zhao,Y., and Chait,B.T. (1998) Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family. *J Biol Chem* **273**: 23641-23644.
- Phelan,M.L., Schnitzler,G.R., and Kingston,R.E. (2000) Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI-SNF and its isolated ATPases. *Mol Cell Biol* **20**: 6380-6389.
- Phelan,M.L., Sif,S., Narlikar,G.J., and Kingston,R.E. (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* **3**: 247-253.
- Philip,B., and Levin,D.E. (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**: 271-280.
- Pokholok,D.K., Zeitlinger,J., Hannett,N.M., Reynolds,D.B., and Young,R.A. (2006) Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* **313**: 533-536.
- Popolo,L., Gualtieri,T., and Ragni,E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39 Suppl 1**: 111-121.
- Pray-Grant,M.G., Daniel,J.A., Schieltz,D., Yates,J.R., III, and Grant,P.A. (2005) Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**: 434-438.
- Prochasson,P., Neely,K.E., Hassan,A.H., Li,B., and Workman,J.L. (2003) Targeting activity is required for SWI/SNF function in vivo and is accomplished through two partially redundant activator-interaction domains. *Mol Cell* **12**: 983-990.
- Proft,M., Mas,G., de Nadal,E., Vendrell,A., Noriega,N., Struhl,K., and Posas,F. (2006) The stress-activated Hog1 kinase is a selective transcriptional elongation factor for genes responding to osmotic stress. *Mol Cell* **23**: 241-250.
- Proft,M., Pascual-Ahuir,A., de Nadal,E., Ariño,J., Serrano,R., and Posas,F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123-1133.
- Proft,M., and Struhl,K. (2004) MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell* **118**: 351-361.
- Proft,M., and Struhl,K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell* **9**: 1307-1317.
- Ptashne,M., and Gann,A. (1997) Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**: 569-577.
- Pugh,B.F. (2000) Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* **255**: 1-14.
- Pugh,B.F., and Tjian,R. (1991) Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev* **5**: 1935-1945.
- Qadota,H., Python,C.P., Inoue,S.B., Arisawa,M., Anraku,Y., Zheng,Y. *et al.* (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**: 279-281.
- Qi,M., and Elion,E.A. (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**: 3569-3572.

- Quinn,J., Fyrberg,A.M., Ganster,R.W., Schmidt,M.C., and Peterson,C.L. (1996) DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **379**: 844-847.
- Radman-Livaja,M., and Rando,O.J. (2010) Nucleosome positioning: how is it established, and why does it matter? *Dev Biol* **339**: 258-266.
- Raisner,R.M., Hartley,P.D., Meneghini,M.D., Bao,M.Z., Liu,C.L., Schreiber,S.L. *et al.* (2005) Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**: 233-248.
- Rajavel,M., Philip,B., Buehrer,B.M., Errede,B., and Levin,D.E. (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3969-3976.
- Reinoso-Martín,C., Schuller,C., Schuetzer-Muehlbauer,M., and Kuchler,K. (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* **2**: 1200-1210.
- Ren,B., Robert,F., Wyrick,J.J., Aparicio,O., Jennings,E.G., Simon,I. *et al.* (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**: 2306-2309.
- Roby,D., Suka,Y., Xenarios,I., Kurdistani,S.K., Wang,A., Suka,N., and Grunstein,M. (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**: 437-446.
- Rodríguez-Peña,J.M., Díez-Muñoz,S., Nombela,C., and Arroyo,J. (2008) A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents. *J Biotechnol* **133**: 311-317.
- Roth,S.Y., Denu,J.M., and Allis,C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.
- Saha,A., Wittmeyer,J., and Cairns,B.R. (2006) Mechanisms for nucleosome movement by ATP-dependent chromatin remodeling complexes. *Results Probl Cell Differ* **41**: 127-148.
- Saito,H. (2010) Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr Opin Microbiol* **13**: 677-683.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarma,K., and Reinberg,D. (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 139-149.
- Schmitz,H.P., Lorberg,A., and Heinisch,J.J. (2002) Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol Microbiol* **44**: 829-840.
- Schnitzler,G., Sif,S., and Kingston,R.E. (1998) Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* **94**: 17-27.
- Schones,D.E., Cui,K., Cuddapah,S., Roh,T.Y., Barski,A., Wang,Z. *et al.* (2008) Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**: 887-898.
- Scrimale,T., Didone,L., de Mesy Bentley,K.L., and Krysan,D.J. (2009) The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **20**: 164-175.
- Seet,B.T., Dikic,I., Zhou,M.M., and Pawson,T. (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 473-483.

- Segal,E., Fondufe-Mittendorf,Y., Chen,L., Thastrom,A., Field,Y., Moore,I.K. *et al.* (2006) A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**: 772-778.
- Segal,E., and Widom,J. (2009) Poly(dA:dT) tracts: major determinants of nucleosome organization. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 65-71.
- Sekinger,E.A., Moqtaderi,Z., and Struhl,K. (2005) Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol Cell* **18**: 735-748.
- Sermwittayawong,D., and Tan,S. (2006) SAGA binds TBP via its Spt8 subunit in competition with DNA: implications for TBP recruitment. *EMBO J* **25**: 3791-3800.
- Serrano,R., Martin,H., Casamayor,A., and Ariño,J. (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem* **281**: 39785-39795.
- Shahbazian,M.D., and Grunstein,M. (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* **76**: 75-100.
- Shen,X., Mizuguchi,G., Hamiche,A., and Wu,C. (2000) A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* **406**: 541-544.
- Shim,E.Y., Woodcock,C., and Zaret,K.S. (1998) Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev* **12**: 5-10.
- Shimada,K., Oma,Y., Schleker,T., Kugou,K., Ohta,K., Harata,M., and Gasser,S.M. (2008) Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol* **18**: 566-575.
- Shivaswamy,S., Bhinge,A., Zhao,Y., Jones,S., Hirst,M., and Iyer,V.R. (2008) Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol* **6**: e65.
- Shivaswamy,S., and Iyer,V.R. (2008) Stress-dependent dynamics of global chromatin remodeling in yeast: dual role for SWI/SNF in the heat shock stress response. *Mol Cell Biol* **28**: 2221-2234.
- Shogren-Knaak,M., Ishii,H., Sun,J.M., Pazin,M.J., Davie,J.R., and Peterson,C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**: 844-847.
- Sikorski RS and Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27.
- Smith,C.L., and Peterson,C.L. (2005a) ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr Top Dev Biol* **65**: 115-148.
- Smith CL and Peterson CL (2005b) A conserved Swi2/Snf2 ATPase motif couples ATP hydrolysis to chromatin remodeling. *Mol Cell Biol* **25**: 5880-5892.
- Smits,G.J., Kapteyn,J.C., van den,E.H., and Klis,F.M. (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol* **2**: 348-352.
- Smits,G.J., van den,E.H., and Klis,F.M. (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.
- Soler,M., Plovins,A., Martin,H., Molina,M., and Nombela,C. (1995) Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* **17**: 833-842.

- Solomon MJ and Varshavsky A (1985) Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 6470-6474.
- Sorger,P.K., and Pelham,H.R. (1987) Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J* **6**: 3035-3041.
- Sprouse,R.O., Karpova,T.S., Mueller,F., Dasgupta,A., McNally,J.G., and Auble,D.T. (2008) Regulation of TATA-binding protein dynamics in living yeast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13304-13308.
- Sprouse,R.O., Wells,M.N., and Auble,D.T. (2009) TATA-binding protein variants that bypass the requirement for Mot1 in vivo. *J Biol Chem* **284**: 4525-4535.
- Steger,D.J., Haswell,E.S., Miller,A.L., Wentz,S.R., and O'Shea,E.K. (2003) Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science* **299**: 114-116.
- Strahl,B.D., and Allis,C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Struhl,K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* **12**: 599-606.
- Struhl,K. (1985) Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 8419-8423.
- Struhl,K., Chen,W., Hill,D.E., Hope,I.A., and Oettinger,M.A. (1985) Constitutive and coordinately regulated transcription of yeast genes: promoter elements, positive and negative regulatory sites, and DNA binding proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**: 489-503.
- Struhl,K., Kadosh,D., Keaveney,M., Kuras,L., and Moqtaderi,Z. (1998) Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**: 413-421.
- Sudarsanam,P., and Winston,F. (2000) The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* **16**: 345-351.
- Suka,N., Suka,Y., Carmen,A.A., Wu,J., and Grunstein,M. (2001) Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol Cell* **8**: 473-479.
- Svoboda,A. (1981) Polyethylene glycol induced membrane fusion in yeast protoplasts. *Acta Histochem Suppl* **23**: 211-217.
- Taba,M.R., Muroff,I., Lydall,D., Tebb,G., and Nasmyth,K. (1991) Changes in a SWI4,6-DNA-binding complex occur at the time of HO gene activation in yeast. *Genes Dev* **5**: 2000-2013.
- Takahata,S., Yu,Y., and Stillman,D.J. (2009) FACT and Asf1 regulate nucleosome dynamics and coactivator binding at the HO promoter. *Mol Cell* **34**: 405-415.
- Tanoue,T., Adachi,M., Moriguchi,T., and Nishida,E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**: 110-116.
- Tanoue,T., and Nishida,E. (2002) Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* **93**: 193-202.
- Tanoue,T., and Nishida,E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal* **15**: 455-462.
- Taylor,I.C., Workman,J.L., Schuetz,T.J., and Kingston,R.E. (1991) Facilitated binding of GAL4 and heat shock factor to nucleosomal templates: differential function of DNA-binding domains. *Genes Dev* **5**: 1285-1298.

- Thomas,M.C., and Chiang,C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**: 105-178.
- Tirosh,I., and Barkai,N. (2008) Two strategies for gene regulation by promoter nucleosomes. *Genome Res* **18**: 1084-1091.
- Tong,A.H., Lesage,G., Bader,G.D., Ding,H., Xu,H., Xin,X. *et al.* (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**: 808-813.
- Toth J and Biggin MD (2000) The specificity of protein-DNA crosslinking by formaldehyde: in vitro and in drosophila embryos. *Nucleic Acids Res* **28**: e4.
- Torres,L., Martín,H., García-Saez,M.I., Arroyo,J., Molina,M., Sánchez,M., and Nombela,C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* **5**: 2845-2854.
- Tran,H.G., Steger,D.J., Iyer,V.R., and Johnson,A.D. (2000) The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor. *EMBO J* **19**: 2323-2331.
- Treisman,R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 205-215.
- Triezenberg,S.J. (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* **5**: 190-196.
- Truman,A.W., Kim,K.Y., and Levin,D.E. (2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* **29**: 6449-6461.
- Truman,A.W., Millson,S.H., Nuttall,J.M., King,V., Mollapour,M., Prodromou,C. *et al.* (2006) Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* **5**: 1914-1924.
- Turner,B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**: 836-845.
- Utlely,R.T., Ikeda,K., Grant,P.A., Côté,J., Steger,D.J., Eberharter,A. *et al.* (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**: 498-502.
- Valay,J.G., Simon,M., Dubois,M.F., Bensaude,O., Facca,C., and Faye,G. (1995) The KIN28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1p CTD. *J Mol Biol* **249**: 535-544.
- Valouev,A., Ichikawa,J., Tonthat,T., Stuart,J., Ranade,S., Peckham,H. *et al.* (2008) A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res* **18**: 1051-1063.
- Van Drogen,F., and Peter,M. (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**: 1698-1703.
- Varga-Weisz,P.D., and Becker,P.B. (1995) Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models. *FEBS Lett* **369**: 118-121.
- Vasiljeva,L., Kim,M., Mutschler,H., Buratowski,S., and Meinhart,A. (2008) The Nrd1-Nab3-Sen1 termination complex interacts with the Ser5-phosphorylated RNA polymerase II C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 795-804.

- Verna,J., Lodder,A., Lee,K., Vagts,A., and Ballester,R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13804-13809.
- Vignali,M., Hassan,A.H., Neely,K.E., and Workman,J.L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* **20**: 1899-1910.
- Vilella,F., Herrero,E., Torres,J., and de la Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* **280**: 9149-9159.
- Wang,W., Carey,M., and Gralla,J.D. (1992) Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening. *Science* **255**: 450-453.
- Watanabe,Y., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995) Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **15**: 5740-5749.
- Watanabe,Y., Takaesu,G., Hagiwara,M., Irie,K., and Matsumoto,K. (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 2615-2623.
- Whitehouse,I., Rando,O.J., Delrow,J., and Tsukiyama,T. (2007) Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* **450**: 1031-1035.
- Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180.
- Wilson,B., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P., and Cairns,B.R. (2006) The RSC chromatin remodeling complex bears an essential fungal-specific protein module with broad functional roles. *Genetics* **172**: 795-809.
- Wilson,C.J., Chao,D.M., Imbalzano,A.N., Schnitzler,G.R., Kingston,R.E., and Young,R.A. (1996) RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* **84**: 235-244.
- Winston,F., and Allis,C.D. (1999) The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat Struct Biol* **6**: 601-604.
- Winston,F., and Carlson,M. (1992) Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet* **8**: 387-391.
- Workman,J.L., and Kingston,R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* **67**: 545-579.
- Wu,J., and Grunstein,M. (2000) 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* **25**: 619-623.
- Wyrick,J.J., Holstege,F.C., Jennings,E.G., Causton,H.C., Shore,D., Grunstein,M. *et al.* (1999) Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature* **402**: 418-421.
- Yang,S.H., Sharrocks,A.D., and Whitmarsh,A.J. (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320**: 3-21.
- Yang,X., Zaurin,R., Beato,M., and Peterson,C.L. (2007) Swi3p controls SWI/SNF assembly and ATP-dependent H2A-H2B displacement. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 540-547.

- Yin,Q.Y., De Groot,P.W., Dekker,H.L., de,J.L., Klis,F.M., and de Koster,C.G. (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**: 20894-20901.
- Yokomori,K., Verrijzer,C.P., and Tjian,R. (1998) An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6722-6727.
- Yoshinaga,S.K., Peterson,C.L., Herskowitz,I., and Yamamoto,K.R. (1992) Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* **258**: 1598-1604.
- Yuan,G.C., Liu,Y.J., Dion,M.F., Slack,M.D., Wu,L.F., Altschuler,S.J., and Rando,O.J. (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**: 626-630.
- Yudkovsky,N., Logie,C., Hahn,S., and Peterson,C.L. (1999) Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev* **13**: 2369-2374.
- Zapater,M., Sohrmann,M., Peter,M., Posas,F., and de Nadal,E. (2007) Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol Cell Biol* **27**: 3900-3910.
- Zhang,H., Roberts,D.N., and Cairns,B.R. (2005) Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**: 219-231.
- Zhang,Y., Smith,C.L., Saha,A., Grill,S.W., Mihardja,S., Smith,S.B. *et al.* (2006) DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. *Mol Cell* **24**: 559-568.
- Zhang,Z., and Reese,J.C. (2004) Ssn6-Tup1 requires the ISW2 complex to position nucleosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **23**: 2246-2257.
- Zofall,M., Persinger,J., Kassabov,S.R., and Bartholomew,B. (2006) Chromatin remodeling by ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 339-346.







**ANEXOS**



## ANEXO I

**TABLA 1: Genes inducidos basalmente en ausencia de *SWI3*.** Se incluyen los genes cuyo ratio de expresión *swi3Δ*/BY4741 es  $\geq 2$ . En las columnas *snf2Δ* vs BY y *swi1Δ* vs BY se indica si el gen está inducido (●) o reprimido (○) en los mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ* respectivamente, de acuerdo a datos publicados (Sudarsanam *et al.*, 2000). Los genes que no presentaban valor o cuya expresión no se vio alterada respecto a la cepa silvestre en los mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ*, están también representados (-). Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD y Proteome.

ORF	Gen	<i>swi3Δ</i> vs BY	<i>snf2Δ</i> vs BY	<i>swi1Δ</i> vs BY	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>					
YBL043W	<i>ECM13</i>	9,55	●	●	Desconocido
YCL024W	<i>KCC4</i>	2,20	-	-	Actividad proteín quinasa
YCL051W	<i>LRE1</i>	2,11	-	-	Regula la biosíntesis del $\beta$ -1,3 glucano
YDL049C	<i>KNH1</i>	2,25	●	-	Biosíntesis $\beta$ -1,6 glucano
YER096W	<i>SHC1</i>	3,22	-	-	Implicada en la síntesis o deposición de quitina
YER150W	<i>SPI1</i>	4,70	-	○	GPI-CWP
YIL169C	---	3,34	○	○	Actividad glucosidasa
YJR137C	<i>ECM17</i>	3,31	●	●	Sulfito reductasa
YJR150C	<i>DAN1</i>	7,71	-	-	Manoproteína
YKL096W	<i>CWP1</i>	2,13	-	○	GPI-CWP
YKL163W	<i>PIR3</i>	2,11	-	-	Manoproteína PIR
YLR343W	<i>GAS2</i>	2,26	○	-	Actividad $\beta$ -1,3-glucanosiltransferasa
YMR306W	<i>FKS3</i>	2,08	-	-	Actividad $\beta$ -1,3-D-glucansintasa
YOL155C	<i>HPF1</i>	3,75	○	○	Actividad glucosidasa
YOR010C	<i>TIR2</i>	6,84	○	○	Manoproteína de la pared celular
<b>Biogénesis y organización de organelas</b>					
YBR230C	<i>OM14</i>	2,98	●	-	Componente de la membrana externa mitocondrial*
YCL063W	<i>VAC17</i>	2,16	●	-	Necesario para la segregación de vacuolas
<b>Ciclo celular</b>					
YML058W-A	<i>HUG1</i>	20,22			Parada del ciclo celular por daño en el DNA
<b>Apareamiento</b>					
YIL117C	<i>PRM5</i>	2,03	●	●	Proteína regulada por feromonas
<b>Esporulación</b>					
YDR260C	<i>SWM1</i>	2,01	-	-	Relacionada con la maduración de la pared de la espora
YHL024W	<i>RIM4</i>	2,26	-	-	Necesario en esporulación
YIL099W	<i>SGA1</i>	7,93	-	●	Glucamilasa implicada en la formación de la ascospora
YMR017W	<i>SPO20</i>	7,43	●	-	Formación de la ascospora
YPR192W	<i>AQY1</i>	3,16	-	-	Formación de la ascospora
<b>Obtención de energía</b>					
YAL039C	<i>CYC3</i>	2,71	-	-	Citocromo c 3
YEL039C	<i>CYC7</i>	4,82	-	-	Citocromo c 2
YEL059C-A	<i>SOM1</i>	3,45	-	-	Generación de precursores
YOR388C	<i>FDH1/FDH2</i>	3,35			Regeneración de NADH
YDL085W	<i>NDE2</i>	2,21	-	-	NADH deshidrogenasa
YPL189C-A	<i>COA2</i>	3,13			Participa en el ensamblaje del Citocromo c oxidasa
<b>Respuesta a estrés</b>					
YBL064C	<i>PRX1</i>	3,03	-	-	Papel en la reducción de hidroperóxidos
YBR182C	<i>SMP1</i>	5,21	-	-	Factor de transcripción de la ruta de alta osmolaridad
YCR083W	<i>TRX3</i>	2,19	-	-	Oxidoreductasa mitocondrial
YDR213W	<i>UPC2</i>	2,25	-	-	Factor de transcripción
YDR259C	<i>YAP6</i>	4,62	●	●	Factor de transcripción
YGR213C	<i>RTA1</i>	2,42	-	-	Resistencia a aminocolesterol
YML100W	<i>TSL1</i>	2,05	●	-	trealosa-6-fosfato sintasa
YML131W	---	5,05	-	-	Actividad oxidoreductasa
YOL151W	<i>GRE2</i>	3,28	-	-	Actividad oxidoreductasa

YPR005C	HAL1	2,65	-	-	Implicado en la homeostasis de iones
YKL110C	KTI12	2,11	-	-	Implicada en la resistencia a toxina killer
<b>Transcripción</b>					
YBR066C	NRG2	3,72	●	-	Represor transcripcional
YBR147W	RTC2	2,44	●	●	Regulador de la transcripción
YDL048C	STP4	4,93	○	-	Unión a DNA
YDR043C	NRG1	9,27	-	-	Represor transcripcional
YDR216W	ADR1	4,01	-	-	Factor de transcripción
YDR223W	CRF1	2,06	-	-	Co-represor
YGL035C	MIG1	2,07	-	-	Represor transcripcional
YGR067C	---	2,53	-	-	Factor de transcripción
YGR097W	ASK10	2,66	-	-	Componente de la RNA polimerasa II holoenzima
YGR249W	MGA1	3,66	●	-	Factor de transcripción
YIL122W	POG1	2,61	-	-	Factor de transcripción
YIRO13C	GAT4	3,11	-	●	Factor de transcripción
YJR119C	JHD2	2,41	-	-	Actividad histona demetilasa
YKLO62W	MSN4	3,58	-	-	Factor general de respuesta a estrés
YKL109W	HAP4	2,75	-	-	Factor de transcripción
YMR069W	NAT4	2,12	●	-	Histona N-acetiltransferasa
YMR136W	GAT2	3,50	-	-	Factor de transcripción
YMR182C	RGM1	2,17	-	-	Represor transcripcional
YMR280C	CAT8	3,98	-	-	Regulador positivo de la gluconeogénesis
YOR028C	CIN5	4,11	●	-	Factor de transcripción de respuesta a estrés
YOR032C	HMS1	4,07	-	-	Factor de transcripción
YPL230W	USV1	2,54	-	-	Factor de transcripción; respuesta a estrés salino
YPR013C	---	2,02	●	-	Factor de transcripción
YPR015C	---	2,92	-	-	Factor de transcripción
YPR065W	ROX1	2,66	-	-	Represor transcripcional
YDR277C	MTH1	3,37	-	-	Factor de transcripción
YELO44W	IES6	2,02	-	-	Componente del complejo INO80
YPLO24W	RMI1	2,16	-	-	Actividad helicasa/topoisomerasa
<b>Transducción de señales</b>					
YBR203W	COS111	5,52	-	-	Resistencia a ciclopiroxina
YCR073C	SSK22	3,34	-	-	Serín-treonín proteín quinasa (ruta de alta osmolaridad)
YCR091W	KIN82	2,77	-	-	Serín-treonín proteín quinasa
YDL079C	MRK1	2,38	-	-	Serín-treonín proteín quinasa
YDL214C	PRR2	26,79	-	-	Serín-treonín proteín quinasa (respuesta a feromonas)
YGL158W	RCK1	20,19	-	-	Serín-treonín proteín quinasa
YGR023W	MTL1	2,72	-	-	Sensor de la ruta de integridad
YOL110W	SHR5	2,04	●	-	Palmitoiltransferasa de Ras2p
YOR107W	RGS2	3,67	-	○	Señalización por AMPc
YOR134W	BAG7	2,08	-	-	Proteína activadora de GTPasa (GAP), activa a Rho1
YOR178C	GAC1	3,65	-	-	Serín treonín fosfatasa
<b>Transporte</b>					
YBR298C	MAL31	2,70	●	-	Maltosa permeasa
YCR010C	ADY2	4,91	-	-	Transporte de acetato y amonio
YCR037C	PHO87	2,77	-	-	Transportador de fosfato
YFLO54C	---	3,08	●	●	Transporte de glicerol
YGR138C	TPO2/TPO3	6,52	-	-	Transportador de poliaminas
YGR289C	MAL11	2,71	-	-	Maltosa permeasa
YHR092C	HXT4	3,11	-	○	Transportador de hexosas
YKL217W	JEN1	6,06	-	-	Transportador de lactato, piruvato y acetato
YKR039W	GAP1	4,14	-	-	Aminoácido permeasa general
YLL028W	TPO1	2,08	○	○	Transporte de poliaminas
YLL061W	MMP1	3,87	●	●	S-metilmetionina permeasa
YLR092W	SUL2	4,53	●	●	Transportador de sulfato de alta afinidad
YLR348C	DIC1	2,72	●	●	Transporte de ácidos dicarboxílicos mitocondrial
YMR056C	AAC1	3,54	●	●	Transportador de membrana mitocondrial

YMR279C	---	7,30	-	-	Actividad transportadora
YNL270C	ALP1	3,96	-	-	Transporte de aminoácidos
YNR002C	ATO2	3,41	-	-	Transportador de amonio
YOL119C	MCH4	2,10	●	-	Transportador de ácidos monocarboxílicos
YOR100C	CRC1	4,41	-	●	Transportador de carnitina y acetyl-CoA
YOR328W	PDR10	3,39	-	-	Actividad ATP-asa
YOR348C	PUT4	18,78	●	-	Transportador de prolina, alanina y glicina
YPL134C	ODC1	5,02	-	●	Transportador de ácidos dicarboxílicos
YPL189W	GUP2	6,85	-	-	Transporte de glicerol
YBR105C	VID24	2,44	-	-	Transporte vacuolar
YHR160C	PEX18	2,81	-	-	Transporte de proteínas al peroxisoma
<b>Síntesis de proteínas</b>					
YCR003W	MRPL32	2,03	-	-	Componente del ribosoma
YJR047C	ANB1	5,13	-	-	Implicado en el proceso de traducción
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>					
YFR030W	MET10	3,67	●	●	Biosíntesis de metionina
YEL066W	HPA3	2,36	-	●	N-acetiltransferasa
YER069W	ARG5,6	2,43	●	●	Acetil glutamato kinasa
YER081W	SER3	2,83	●	●	Actividad fosfoglicerato deshidrogenasa
YER091C	MET6	2,41	●	●	Metionina sintasa
YGL125W	MET13	4,04	●	●	Biosíntesis de metionina
YGL184C	STR3	4,44	-	●	Cistationine β-liasa
YIR017C	MET28	8,61	●	●	Participa en la biosíntesis de metionina
YJL088W	ARG3	2,91	-	-	Biosíntesis de arginina
YJR010W	MET3	6,41	●	●	Metabolismo de metionina; sulfato adeniltransferasa
YKL001C	MET14	3,11	-	-	Actividad adenilsulfato quinasa
YKR069W	MET1	2,13	●	●	Metabolismo de metionina
YNL277W	MET2	10,25	●	-	Homoserina O-acetiltransferasa
YPL113C	---	2,22	-	-	Biosíntesis de serina
YPR167C	MET16	3,65	●	-	Metabolismo de metionina
YBR213W	MET8	2,27	-	-	Asimilación de sulfato y biosíntesis metionina
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>					
YBR070C	ALG14	2,23	-	●	Actividad UDP-N-acetilglucosaminiltransferasa
YCL040W	GLK1	2,07	●	-	Glucokinasa
YDL037C	BSC1	3,27	○	○	Actividad 1,4-α-glucosidasa
YDL246C	SOR1/SOR2	4,16	-	●	Deshidrogenasa de sorbitol
YEL011W	GLC3	2,25	-	-	Implicada en la acumulación de glicógeno
YGR087C	PDC6	2,43	-	-	Piruvato descarboxilasa
YGR248W	SOL4	6,00	●	○	Actividad 6-fosfogluconolactonasa
YGR287C	---	9,87	-	●	Isomaltasa
YIL155C	GUT2	2,07	-	●	actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
YKR097W	PCK1	3,27	-	-	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
YLR304C	ACO1	2,21	-	-	Aconitasa
YML054C	CYB2	4,97	-	●	L-lactato deshidrogenasa
YMR323W	ERR1/ERR/ERR3	3,53	-	-	Actividad fosfopiruvato hidratasa
YNL274C	GOR1	3,58	-	-	Glioxilato reductasa
YOR374W	ALD4	4,50	●	●	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
YPL088W	---	2,84	●	-	Posible aril alcohol deshidrogenasa
YPR184W	GDB1	2,02	○	-	Degradación del glicógeno
YCR073W-A	SOL2	2,03	-	-	Actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
YPR006C	ICL2	3,85	-	-	2-metilisocitrato liasa
YBR297W	MAL33	2,91	●	-	Implicada en fermentación de maltosa
YBR299W	MAL12/MAL32	14,27	●	●	Fermentación de maltosa
<b>Metabolismo de lípidos</b>					
YAR035W	YAT1	3,38	-	-	Carnitina O-acetiltransferasa
YBR183W	YPC1	3,17	-	-	Ceramidasa alcalina
YCR048W	ARE1	2,58	-	●	Actividad esterol acetiltransferasa
YDR018C	---	3,03	-	●	Posible actividad acetiltransferasa

YDR297W	SUR2	2,56	-	-	Hidrolasa implicada en el metabolismo de esfingolípidos
YGL205W	POX1	2,29	-	-	$\beta$ -oxidación de ácidos grasos
YGR110W	---	2,73	-	-	Cardiolipin fosfolipasa
YIL160C	POT1	2,97	-	-	$\beta$ -oxidación de ácidos grasos
YOR237W	HES1	8,14	-	-	Biosíntesis de ergosterol
YOR317W	FAA1	2,52	-	-	Metabolismo de ácidos grasos
YPL171C	OYE3	3,46	-	-	Actividad NADPH deshidrogenasa
YDR044W	HEM13	2,77	-	-	Biosíntesis del ergosterol
<b>Metabolismo de DNA</b>					
YCR026C	NPP1	2,14	-	-	Nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa
YIL066C	RNR3	11,84	-	-	Ribonucleósido-difosfato reductasa
YJL026W	RNR2	2,26	-	-	Ribonucleótido reductasa
<b>Metabolismo de RNA</b>					
YGR250C	---	2,21	-	-	Unión a RNA
YML091C	RPM2	2,13	-	-	Actividad ribonucleasa P
YCR020C-A	MAK31	2,85	-	-	Estabilidad estructural de la doble hélice de RNA
YCR047C	BUD23	2,71	-	-	Metilación del 18s rRNA
<b>Metabolismo de tiamina</b>					
YBR240C	THI2	2,83	-	-	Biosíntesis de tiamina
YCR020C	PET18	2,80	-	-	metabolismo de tiamina
YGR144W	THI4	4,04	-	-	Biosíntesis de tiamina
YELO60C	PRB1	2,52	●	-	Proteinasa vacuolar; degradación de proteínas en esporulación
YER098W	UBP9	2,06	-	-	Deubiquitinación
YGR161C	RTS3	8,53	●	●	Componente del complejo fosfatasa tipo 2A*
YKR098C	UBP11	2,74	-	-	Proteasa ubiquitin-específica
<b>Metabolismo de biotina</b>					
YGR286C	BIO2	2,89	-	-	Biotina sintetasa
YNR057C	BIO4	2,10	-	-	Biosíntesis de biotina
<b>Desconocido</b>					
YAR066W	---	2,22	-	-	Desconocido
YAR068W	---	2,23	○	○	Desconocido
YBR085C-A	---	3,22	-	-	Desconocido
YBR230W-A	---	2,39	-	-	Desconocido
YBR285W	---	2,49	-	-	Desconocido
YCL026C-B	HBN1	22,06	-	-	Desconocido
YCL042W	---	2,04	●	-	Desconocido
YCL047C	---	2,04	-	-	Desconocido
YCL049C	---	2,24	●	●	Desconocido
YCR059C	YIH1	2,10	-	-	Desconocido
YCR060W	TAH1	2,40	-	-	Desconocido
YCR061W	---	2,02	-	-	Desconocido
YDL038C	---	3,65	○	○	Desconocido
YDL039C	PRM7	3,33	-	-	Desconocido
YDL129W	---	2,95	-	-	Desconocido
YDR034C-A	---	3,57	-	-	Desconocido
YDR034W-B	---	2,77	-	-	Desconocido
YELO57C	---	2,82	-	-	Desconocido
YELO70W	DSF1	4,59	-	-	Desconocido
YER158C	---	2,05	-	-	Desconocido
YFLO52W	---	2,26	-	●	Desconocido
YFR017C	---	2,23	●	-	Desconocido
YGL007C-A	---	4,83	-	-	Desconocido
YGR043C	NQM1	2,20	-	-	Desconocido
YGR049W	SCM4	2,94	-	-	Desconocido
YGR052W	---	3,15	-	-	Desconocido
YGR066C	---	3,07	-	-	Desconocido
YGR153W	---	2,23	-	-	Desconocido

YGR243W	---	8,23			Desconocido
YHR022C	---	2,97	-	-	Desconocido
YHR049W	FSH1	2,26	o	-	Desconocido
YIL024C	---	2,29	-	-	Desconocido
YIL055C	---	2,94	-	-	Desconocido
YIR016W	---	2,07	-	-	Desconocido
YJL077W-B	---	2,41			Desconocido
YJL105W	SET4	7,45	-	-	Desconocido
YJL213W	---	2,24	-	-	Desconocido
YJR061W	---	3,97	-	-	Desconocido
YJR115W	---	2,38	-	-	Desconocido
YJR116W	---	2,56	-	-	Desconocido
YKL093W	MBR1	6,12	-	-	Desconocido
YKR041W	---	2,64	●	-	Desconocido
YKR046C	PET10	2,32	-	-	Desconocido
YKR075C	---	5,35	●	●	Desconocido
YLR012C	---	2,83	●		Desconocido
YLR149C	---	2,46	●	●	Desconocido
YLR281C	---	2,03	-	-	Desconocido
YLR297W	---	4,56	-	-	Desconocido
YLR312C	---	6,33			Desconocido
YLR327C	TMA10	6,06	●	-	Desconocido
YML083C	---	2,77	-		Desconocido
YMR107W	SPG4	3,72	●	-	Desconocido
YMR181C	---	2,05	●	-	Desconocido
YMR194C-B	---	3,41			Desconocido
YMR196W	---	2,88	-	-	Desconocido
YMR206W	---	11,14	●		Desconocido
YMR244C-A	---	2,73			Desconocido
YMR244W	---	3,09	-	-	Desconocido
YMR265C	---	2,02	-	-	Desconocido
YMR322C	HSP32/HSP33/SNO4	7,71			Desconocido
YNL146W	---	2,86	-	-	Desconocido
YNL194C	---	5,99	-	-	Desconocido
YNL195C	---	2,04	-	-	Desconocido
YNL234W	---	2,19	-	-	Desconocido
YNR014W	---	3,69	-	-	Desconocido
YOL084W	PHM7	7,37	-	●	Desconocido
YOR161C	PNS1	3,00	-	o	Desconocido
YOR338W	---	3,40			Desconocido
YOR389W	---	7,08	o		Desconocido
YOR394W	---	2,08	-	-	Desconocido
YPL054W	LEE1	2,89			Desconocido
YPL222W	---	3,36			Desconocido
YPL277C	---	5,04	-	-	Desconocido
YPL278C	---	7,18	-	-	Desconocido
YPR036W-A	---	2,18			Desconocido
YPR157W	---	2,33	●	-	Desconocido
YCR063W	BUD31	2,31	-	-	Desconocido
YCR104W	PAU15/PAU3	2,38	-	-	Desconocido
YGL045W	RIM8	3,82	-	-	Desconocido
YIL065C	FIS1	2,24	-	-	Desconocido
<b>Otras</b>					
YBL015W	ACH1	2,61	-	-	Acetil -CoA-hidrolasa
YDL181W	INH1	3,07	-	-	Inhibidor de la actividad ATP-sintasa
YBR114W	RAD16	3,64	-	-	Reparación de DNA

**TABLA 2: Genes reprimidos basalmente en ausencia de *SWI3*.** Se incluyen los genes cuyo ratio de expresión *swi3Δ*/BY4741 es  $\leq 0,5$ . En las columnas *snf2Δ* vs BY y *swi1Δ* vs BY se indica si el gen está inducido (●) o reprimido (○) en los mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ* respectivamente, de acuerdo a datos publicados (Sudarsanam *et al.*, 2000). Los genes que no presentaban valor o cuya expresión no se vio alterada respecto a la cepa silvestre en los mutantes *snf2Δ* y *swi1Δ*, están también representados (-). Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD y Proteome.

ORF	Gen	<i>swi3Δ</i> vs BY	<i>snf2Δ</i> vs BY	<i>swi1Δ</i> vs BY	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>					
<i>YDL179W</i>	<i>PCL9</i>	0,26	○	-	Proteín quinasa dependiente de ciclinas
<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	0,38	○	○	GPI-CWP
<i>YER001W</i>	<i>MNN1</i>	0,36	-	○	Manosiltransferasa
<i>YER011W</i>	<i>TIR1</i>	0,50	○	○	Manoproteína
<i>YER124C</i>	<i>DSE1</i>	0,34	○	○	Metabolismo de quitina
<i>YGL028C</i>	<i>SCW11</i>	0,35	○	○	Actividad glucanasa
<i>YIL011W</i>	<i>TIR3</i>	0,20	○	○	Manoproteína
<i>YJL078C</i>	<i>PRY3</i>	0,44	-	-	Participa en la eficiencia de la conjugación
<i>YMR013C</i>	<i>SEC59</i>	0,49	-	-	Biosíntesis de glicoproteínas
<i>YNR044W</i>	<i>AGA1</i>	0,15	○	○	Implicada en la adhesión celular
<i>YPL163C</i>	<i>SVS1</i>	0,35	○	○	Proteína de pared necesaria para la resistencia a vanadato
<b>Biogénesis y organización de organelas</b>					
<i>YPL158C</i>	---	0,37	○	○	Necesaria para la normal biogénesis de la mitocondria
<b>Ciclo celular</b>					
<i>YJL157C</i>	<i>FAR1</i>	0,37	-	-	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas
<i>YNL327W</i>	<i>EGT2</i>	0,33	○	○	Implicada en la separación celular tras la citoquinesis
<i>YNR067C</i>	<i>DSE4</i>	0,44	-	-	Citoquinesis
<i>YOL104C</i>	<i>NDJ1</i>	0,41	○	○	Implicada en meiosis
<i>YPL018W</i>	<i>CTF19</i>	0,34		-	Implicado en meiosis
<b>Apareamiento</b>					
<i>YBR040W</i>	<i>FIG1</i>	0,19	○		Regulador de los canales de calcio
<i>YCL027W</i>	<i>FUS1</i>	0,39	-	-	Regula la fusión delular y la cariogamia
<i>YDR461W</i>	<i>MFA1</i>	0,20	-	-	Feromona de apareamiento, factor- $\alpha$
<i>YGL032C</i>	<i>AGA2</i>	0,31		-	Relacionada con la adhesión celular
<i>YNL279W</i>	<i>PRM1</i>	0,32	○	○	Necesaria para la fusión celular
<b>Respuesta a estrés</b>					
<i>YBR157C</i>	<i>ICS2</i>	0,48	-	-	Resistencia a cobre
<i>YBR244W</i>	<i>GPX2</i>	0,06	○	○	Glutation peroxidasa
<i>YDR406W</i>	<i>PDR15</i>	0,30	-	-	Actividad ATPasa acoplada a transporte de membrana Glicoproteína secretada en respuesta a la limitación de nutrientes
<i>YNL160W</i>	<i>YGP1</i>	0,13	○	○	
<i>YGR234W</i>	<i>YHB1</i>	0,11	○	○	Actividad óxido nítrico dioxigenasa
<b>Transcripción</b>					
<i>YBL005W</i>	<i>PDR3</i>	0,45	○	○	Factor de transcripción implicado en la multiresistencia a drogas
<i>YAR009C</i>	---	0,16	○	○	Actividad DNA polimerasa
<i>YJL176C</i>	<i>SWI3</i>	0,03	-	-	Complejo remodelador de cromatina ATP-dependiente
<i>YJR147W</i>	<i>HMS2</i>	0,12	-	○	Factor de transcripción relacionado con crecimiento pseudohifal
<i>YKL185W</i>	<i>ASH1</i>	0,47	○	○	Regulador negativo del gen <i>HO</i>
<i>YOR315W</i>	<i>SFG1</i>	0,30	○	○	Factor de transcripción implicado en mitosis
<b>Transducción de señales</b>					
<i>YLR452C</i>	<i>SST2</i>	0,25	○	○	Activador de GTPasa; respuesta a feromonas
<b>Transporte</b>					
<i>YBR069C</i>	<i>TAT1</i>	0,18	○	○	Transportador de aminoácidos
<i>YBR296C</i>	<i>PHO89</i>	0,13	-	○	Transportador de fosfato
<i>YEL065W</i>	<i>SIT1</i>	0,20	○	○	Transportador de hierro
<i>YGL255W</i>	<i>ZRT1</i>	0,33	○	○	Transportador de Zinc de alta afinidad

YHL040C	ARN1	0,25	-	-	Sideróforo; relacionado con la multirresistencia a drogas
YHL047C	ARN2	0,14	-	-	Relacionado con la multirresistencia a drogas
YIL121W	QDR2	0,18	o	o	Confiere multirresistencia a drogas
YJL012C	VTC4	0,31	o	o	Transporte vacuolar
YJL212C	OPT1	0,28	-	o	Transportador de oligopéptidos
YLR214W	FRE1	0,27	o	o	Mantenimiento de la homeostasis del cobre y hierro
YML123C	PHO84	0,00	o	o	Transportador de fosfato inorgánico
YOL020W	TAT2	0,36	-	-	Transporte de aminoácidos
YOL158C	ENB1	0,15	o	o	Transportador de hierro
YOR153W	PDR5	0,36	o	-	Relacionado con la multirresistencia a drogas
YOR273C	TPO4	0,36	-	o	Transportador de poliaminas
YOR381W	FRE3	0,47	-	-	Mantenimiento de la homeostasis del cobre y hierro
YPL019C	VTC3	0,16	o	o	Transporte vacuolar
YPL265W	DIP5	0,08	-	-	Transporte de aminoácidos
YHL035C	VMR1	0,22	-	-	Implicado en el transporte de drogas
<b>Síntesis de proteínas</b>					
YJL191W	RPS14B	0,36	-	-	Componente del ribosoma
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>					
YJL101C	GSH1	0,42	-	-	Participa en al síntesis de glutation
YBR208C	DUR1,2	0,39	o	-	Urea amidoliasa
YDL182W	LYS20	0,40	-	-	Implicado en la biosíntesis de lisina
YGR154C	GTO1	0,43	-	-	Glutarredoxina
YHR137W	ARO9	0,08	o	o	Aminotransferasa aromática
YLR438W	CAR2	0,17	o	o	Ornitina aminotransferasa
YNR050C	LYS9	0,38	o	-	Biosíntesis de lisina
YFR055W	IRC7	0,19	o	o	Biosíntesis de metionina
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>					
YJR153W	PGU1	0,21	-	-	Actividad poligalacturonasa
<b>Metabolismo de lípidos</b>					
YGR157W	CHO2	0,30	o	o	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
YGR170W	PSD2	0,49	-	-	Fosfatidilserina descarboxilasa
YGR177C	ATF2	0,45	o	o	esterol O-acetiltransferasa
YPL095C	EEB1	0,41	-	-	Actividad alcohol O-acetiltransferasa
<b>Metabolismo de hierro</b>					
YLR205C	HMX1	0,43	-	-	Metabolismo del hemo
YOL152W	FRE7	0,28	o	o	Actividad ferorrreductasa
<b>Metabolismo de DNA</b>					
YKR080W	MTD1	0,41	-	-	Actividad metilen tetrahidrofolato deshidrogenasa
YDL227C	HO	0,05	-	-	Actividad endonucleasa; intercambio del tipo sexual
<b>Metabolismo de RNA</b>					
YLR136C	TIS11	0,13	-	-	Degradación de mRNA durante limitación de hierro
YCR018C	SRD1	0,41	-	-	Procesamiento del rRNA
YLR165C	PUS5	0,49	-	-	Pseudouridina sintasa
<b>Metabolismo del fosfato</b>					
YAR071W	PHO11/ PHO12	0,03	o	o	Actividad fosfatasa
YBR092C	PHO3	0,29	o	o	Actividad fosfatasa
YBR093C	PHO5	0,03	o	o	Actividad fosfatasa
YDR481C	PHO8	0,39	-	-	Actividad fosfatasa
YGR233C	PHO81	0,25	-	o	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas
YHR136C	SPL2	0,02	o	o	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas
<b>Modificación de proteínas</b>					
YBR054W	YRO2	0,09	o	o	Chaperona
YIL015W	BAR1	0,15			Degradación del factor $\alpha$
<b>Transposición</b>					
YAR010C	---	0,21	o	o	Retrotransposon
YBL005W-A	---	0,09	o	o	Retrotransposon
YBL101W-A	---	0,16	o	o	Retrotransposon
YBL101W-B	---	0,31	o	o	Retrotransposon

YDR261C-D	---	0,20			Retrotransposon
YDR261W-B	---	0,22			Retrotransposon
YDR316W-B	---	0,27			Retrotransposon
YGR109W-A	---	0,23			Retrotransposon
YGR109W-B	---	0,23			Retrotransposon
YIL082W-A	---	0,27	o	o	Retrotransposon
<b>Desconocido</b>					
YBR047W	---	0,26	-	-	Desconocido
YCL021W-A	---	0,16			Desconocido
YDL154W	MSH5	0,49	-	-	Desconocido
YDL241W	---	0,35	-	o	Desconocido
YDR033W	MRH1	0,25	o	o	Desconocido
YDR089W	---	0,48	-	o	Desconocido
YDR281C	PHM6	0,07	o	o	Desconocido
YER138W-A	---	0,35			Desconocido
YGR035C	---	0,28	●	o	Desconocido
YJL200C	ACO2	0,49	-	-	Actividad aconitasa hidratasa
YLL066W-B	---	0,38			Desconocido
YLR346C	---	0,19		-	Desconocido
YLR466C-B	---	0,28			Desconocido
YML047C	PRM6	0,22	-		Desconocido
YNL046W	---	0,46	-	-	Desconocido
YNL134C	---	0,39	-	o	Desconocido
YNL217W	---	0,43	o	o	Desconocido
YOL019W	---	0,49	o	-	Desconocido
YOR192C-C	---	0,47			Desconocido
YOR394C-A	---	0,48			Desconocido
YPL156C	PRM4	0,28	-	-	Desconocido
YHR140W	---	0,49	●	-	Desconocido
YAL061W	BDH2	0,30	-	-	Actividad oxidorreductasa

## ANEXO 2

**TABLA 1: Genes inducidos en la cepa WT (BY4741) por RC (30 µg/ml, 4 h) y ZL (0,4 U/ml, 3 h) y sus correspondientes valores (ratios) de inducción.** Se incluyen aquellos genes cuyo ratio (+/- tratamiento) es ≥ 2. Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD y Proteome.

ORF	Gen	BY+ZL vs BY (197)	BY+RC vs BY (128)	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>				
YAL053W	FLC2	2,58	2,74	Mantenimiento de la pared celular
YBR005W	RCR1	-	2,22	Deposición de quitina en pared celular
YDL049C	KNH1	2,53	-	Biosíntesis β-1,6 glucano
YDR055W	PST1	4,09	3,93	GPI-CWP
YER150W	SPI1	6,10	2,18	GPI-CWP
YGL038C	OCH1	2,52	-	Manosiltransferasa
YGR032W	GSC2	2,59	6,68	β-1,3 glucan sintasa
YGR166W	KRE11	-	2,38	Biosíntesis β-1,6 glucano
YGR189C	CRH1	2,39	2,68	GPI-CWP; transglicosidasa
YIRO39C	YPS6	3,98	2,97	Aspartil proteasa con posible anclaje GPI
YKL096W	CWP1	2,49	2,30	GPI-CWP
YKL104C	GFA1	2,16	2,23	Biosíntesis de quitina
YKL163W	PIR3	61,66	47,71	Manoproteína PIR
YKR061W	KTR2	3,80	5,36	Biosíntesis manoproteínas
YKR076W	ECM4	2,15	-	Organización de la pared celular
YLR040C	---	2,98	2,96	Proteína de pared con función desconocida
YLR042C	---	7,30	3,18	GPI-CWP
YLR120C	YPS1	-	2,54	Aspartil proteasa con anclaje GPI
YLR121C	YPS3	8,97	7,75	GPI-CWP; endopeptidasa
YLR194C	---	5,58	9,68	GPI-CWP
YNL192W	CHS1	2,18	2,27	Biosíntesis de quitina
YNL294C	RIM21	2,39	2,37	Construcción de pared celular
YPL175W	SPT14	2,01	-	Biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI)
YPL221W	FLC1	2,29	2,71	Biogénesis de la pared celular
<b>Biogénesis y organización de organelas</b>				
YDL130W-A	STF1	2,02	2,03	Regulación de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial
YDL204W	RTN2	3,85	-	Organización del retículo endoplásmico
YIL136W	OM45	2,12	-	Componente de la membrana externa mitocondrial
YJL116C	NCA3	11,38	2,86	Regulador de la expresión mitocondrial de Atp6 y Atp8
YOR193W	PEX27	2,14	-	Regulación del nº y tamaño de peroxisomas
<b>Ciclo celular</b>				
YLR178C	TFS1	2,25	-	Regulación de peptidolisis
YOL104C	NDJ1	2,11	-	Implicada en meiosis
YPL174C	NIP100	2,04	-	Implicada en la división del huso mitótico entre la célula madre e hija
<b>Apareamiento</b>				
YDL223C	HBT1	4,21	-	
YIL117C	PRM5	4,65	4,78	Proteína regulada por feromonas
YJL079C	PRY1	2,06	-	Posible papel en el apareamiento
YJL108C	PRM10	8,65	4,99	Proteína regulada por feromonas
<b>Esporulación</b>				
YDL239C	ADY3	2,03	-	
YGR225W	AMA1	2,10	-	Requerido en el ensamblaje de la pared de la espora
YJL106W	IME2	2,32	-	Serín/treonín proteín quinasa implicada en la activación de la meiosis
YLR054C	OSW2	-	2,08	Posible papel en el ensamblaje de la pared de la espora
<b>Morfogénesis</b>				
YMR238W	DFG5	-	2,30	Necesario para la polaridad y elongación celular
YNL020C	ARK1	2,06	-	
YNL293W	MSB3	2,18	2,02	Transporte vesicular

YOL112W	MSB4	-	2,07	Proteína activadora de GTPasa implicada en la organización del citoesqueleto
<b>Respuesta a estrés</b>				
YBL064C	PRX1	2,20	-	
YBR182C	SMP1	-	2,32	Factor de transcripción de la ruta de alta osmolaridad
YDR001C	NTH1	2,18	2,00	Trealasa
YDR453C	TSA2	2,37	-	Tiorredoxin peroxidasa
YFL014W	HSP12	4,96	7,23	Proteína de choque térmico
YGR088W	CTT1	4,31	-	Catalasa; protección frente a estrés oxidativo
YGR213C	RTA1	-	5,00	Resistencia a aminocolesterol
YIL101C	XBP1	3,07	-	Represor transcripcional inducido por estrés
YJL144W	---	-	2,20	Expresión inducida por choque osmótico
YLL039C	UBI4	-	2,25	Ubiquitina, esencial para la respuesta a estrés
YLR251W	SYM1	2,99	-	Metabolismo de etanol; Inducida por estrés térmico
YML100W	TSL1	2,93	-	Implicado en la biosíntesis de la trealosa
YML131W	---	2,35	-	Posible oxidorreductasa NAD-dependiente
YMR169C	ALD3	7,14	-	Aldehído deshidrogenasa
YMR250W	GAD1	2,36	-	Glutamato descarboxilasa; respuesta a estrés oxidativo
YOL052C-A	DDR2	6,08	2,56	Proteína de respuesta a múltiples estreses
YOR173W	DCS2	2,89	-	Decapping del mRNA
YPL230W	USV1	2,01	-	Factor de transcripción; respuesta a estrés salino
YPR005C	HAL1	4,81	5,21	Implicado en la homeostasis de iones
<b>Transcripción</b>				
YDR043C	NRG1	2,30	-	Represor transcripcional
YDR216W	ADR1	2,58	2,39	Factor de transcripción
YGR097W	ASK10	2,19	2,17	Componente de la RNA polimerasa II holoenzima
YMR280C	CAT8	-	2,09	Regulador positivo de la gluconeogénesis
YPL089C	RLM1	2,40	2,26	Factor de transcripción de la ruta de integridad
<b>Transducción de señales</b>				
YBR203W	COS111	3,04	2,39	Resistencia a ciclopiroxina
YCR073C	SSK22	2,07	2,55	Serín-treonín proteína quinasa (ruta de alta osmolaridad)
YDL214C	PRR2	2,19	-	Serín-treonín proteína quinasa (respuesta a feromonas)
YDR085C	AFR1	9,85	4,74	Morfogénesis celular en el proceso de conjugación
YGL121C	GPG1	3,33	3,82	Regulación del crecimiento pseudohifal
YGL248W	PDE1	-	2,37	AMPc fosfodiesterasa
YGR023W	MTL1	2,28	2,02	Sensor de la ruta de integridad
YGR070W	ROM1	2,52	-	GEF de Rho1
YHR030C	SLT2	3,80	3,23	MAPK de la ruta de integridad
YJL057C	IKS1	2,08	-	Serín-treonín proteína quinasa
YKL161C	MLP1	34,71	19,62	Serín-treonín proteína quinasa
YMR104C	YPK2	3,13	4,06	Serín-treonín proteína quinasa
YNL053W	MSG5	-	2,22	Fosfatasa de especificidad dual
YNR064C	---	-	2,23	Epóxido hidrolasa
YOL016C	CMK2	-	2,63	Quinasa dependiente de Ca/calmodulina
YOR107W	RGS2	2,28	-	Activador de la actividad GTPasa de la proteína G
YOR134W	BAG7	5,79	10,70	Proteína activadora de GTPasa (GAP), activa a Rho1 GAP de Rho1
YOR208W	PTP2	2,76	2,87	Tirosín fosfatasa
<b>Transporte</b>				
YBR295W	PCA1	-	2,45	ATPasa transportadora de Cobre tipo P
YBR296C	PHO89	-	2,19	Transportador de fosfato
YDL119C	---	2,06	-	Proteína de transporte mitocondrial
YDR536W	STL1	6,61	-	Transporte de glucosa y glicerol
YFL055W	AGP3	2,01	-	Permeasa de aminoácidos de baja afinidad
YHR094C	HXT1	2,69	-	Transportador de glucosa de baja afinidad
YHR096C	HXT5	2,79	2,21	Transportador de glucosa de moderada afinidad
YIL023C	YKE4	2,18	2,62	Transportador de Zinc
YIRO28W	DAL4	-	2,44	Permeasa de Alantoína
YNL093W	YPT53	-	3,03	Endocitosis y transporte de proteínas a la vacuola

YOL122C	SMF1	3,44	2,10	Transportador general de iones metálicos
YOR036W	PEP12	-	2,04	Transporte del Golgi a la vacuola
YOR137C	SIA1	2,24	2,08	Implicada en la activación de Pma1
YOR306C	MCH5	-	2,59	Transportador de riboflavina
YOR348C	PUT4	5,03	-	Requerido para el transporte de prolina de alta afinidad
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>				
YDR380W	ARO10	-	2,89	Fenilpiruvato decarboxilasa
YHR209W	CRG1	12,22	11,54	Actividad metiltransferasa
YIRO17C	MET28	2,70	-	Participa en la biosíntesis de metionina
YJRO10W	MET3	2,16	-	Metabolismo de metionina; actividad sulfato adeniltransferasa
YJRO78W	BNA2	-	2,19	Biosíntesis de nicotinato (NAD) a partir de triptófano
YMR170C	ALD2	2,26	-	Aldehído deshidrogenasa citoplasmática
YNL277W	MET2	2,14	-	Biosíntesis de metionina
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>				
YBR117C	TKL2	7,53	-	Ruta de las pentosas fosfato
YBR299W	MAL12 / MAL32	2,04	-	Maltasa
YDL022W	GPD1	2,65	-	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
YDL246C	SOR2	2,20	-	Deshidrogenasa de sorbitol
YDR074W	TPS2	2,55	-	Trealosa-6-fosfatasa
YDR315C	IPK1	2,25	-	Inositol polifosfato quinasa
YELO11W	GLC3	2,48	-	Implicada en la acumulación de glicógeno
YELO58W	PCM1	-	2,11	N-acetilglucosamina-fosfato mutasa
YER062C	HOR2	2,77	-	Biosíntesis de glicerol
YGL156W	AMS1	3,36	3,25	Degradación de oligosacáridos libres
YGR248W	SOL4	4,45	-	Actividad 6-fosfogluconolactonasa
YGR256W	GND2	2,17	-	Ruta de las pentosas fosfato
YGR287C	IMA1	2,10	-	Isomaltasa
YHR043C	DOG2	2,23	-	Fosfatasa; metabolismo de la glucosa
YIL107C	PFK26	2,37	2,20	6-fosfofructo quinasa; glicolisis
YJL155C	FBP26	2,77	2,73	Fructosa-2,6-bifosfatasa; metabolismo de la glucosa
YKR097W	PCK1	2,15	-	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa; gluconeogénesis
YLR258W	GSY2	2,33	-	Glicógeno sintasa
YML054C	CYB2	2,30	-	L-lactato deshidrogenasa
YMR105C	PGM2	2,63	-	Fosfoglucomutasa; metabolismo de hexosas
YOR374W	ALD4	2,29	-	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
YPL088W	---	8,50	9,59	Posible aril alcohol deshidrogenasa
YPR160W	GPH1	2,24	-	Glicógeno fosforilasa
YPR184W	GDB1	2,21	-	Degradación de glicógeno
<b>Metabolismo de lípidos</b>				
YBR183W	YPC1	2,03	-	Ceramidasa alcalina
YDL222C	FMP45	5,29	-	Implicada en el metabolismo de esfingolípidos
YDR018C	---	2,19	2,22	Posible actividad acetiltransferasa
YER037W	PHM8	2,00	-	Fosfatasa del ácido lisofosfatídico
YKR053C	YSR3	-	3,83	Metabolismo de esfingolípidos
YLR151C	PCD1	2,12	-	Actividad pirofosfatasa
YNL194C	---	3,34	-	Mantenimiento del contenido de esfingolípidos
YPL057C	SUR1	-	2,09	Biosíntesis de esfingolípidos
YPL110C	GDE1	2,01	2,47	Glicerofosfolina fosfodiesterasa
<b>Metabolismo de tiamina</b>				
YDL244W	THI13	2,07	-	Metabolismo de tiamina
YGR144W	THI4	2,05	-	Biosíntesis de tiamina
<b>Metabolismo de poliaminas</b>				
YPL052W	OAZ1	2,12	2,30	Inhibidor de la ornitina descarboxilasa
<b>Metabolismo de hierro</b>				
YLR205C	HMX1	3,05	-	Hemo oxigenasa
<b>Metabolismo del DNA</b>				
YHL022C	SPO11	2,96	3,67	Actividad endodeoxirribonucleasa

YMR271C	URA10	2,02	-	Biosíntesis de pirimidinas
YPR078C	---	-	2,62	Posible papel en metabolismo de DNA
<b>Metabolismo de RNA</b>				
YLR270W	DCS1	2,00	-	Catabolismo del RNAm
YML118W	NGL3	2,30	-	Endonucleasa
<b>Modificación de proteínas</b>				
YBL078C	ATG8	2,66	2,87	Componente del autofagosoma
YER054C	GIP2	2,45	-	Proteín fosfatasa
YGR161C	RTS3	-	2,47	Componente del complejo fosfatasa tipo 2A
YMR192W	GYL1	2,21	2,09	Proteína activadora de GTPasa (GAP)
YEL060C	PRB1	-	2,43	Proteinasa vacuolar; degradación de proteínas durante la esporulación
YPR193C	HPA2	2,16	-	Histona acetiltransferasa
<b>Función desconocida</b>				
YBL049W	MOH1	2,09	-	Desconocida
YBR054W	YRO2	2,00	-	Desconocida
YBR056W-A	---	2,93	8,82	Desconocida
YBR071W	---	2,01	2,29	Desconocida
YBR230W-A	---	-	2,07	Desconocida
YCL012C	---	-	2,14	Desconocida
YCL026C-B	HBN1	2,15	-	Desconocida
YCR099C	---	2,88	2,69	Desconocida
YCR100C	---	2,60	2,48	Desconocida
YDL057W	---	2,10	2,12	Desconocida
YDL110C	TMA17	2,04	-	Desconocida
YDL169C	UGX2	2,23	-	Desconocida
YDR034W-B	---	7,60	17,57	Desconocida
YDR070C	FMP16	4,31	2,78	Desconocida
YEL057C	---	2,92	-	Desconocida
YER039C-A	---	2,21	-	Desconocida
YER067W	---	2,20	-	Desconocida
YER158C	---	2,17	2,07	Desconocida
YFR017C	---	2,25	-	Desconocida
YGL157W	---	2,47	-	Desconocida
YGL258W-A	---	3,23	-	Desconocida
YGL230C	---	2,70	2,56	Desconocida
YGR008C	STF2	2,21	-	Desconocida
YGR043C	NQM1	9,71	3,19	Desconocida
YGR052W	---	5,51	-	Desconocida
YGR146C	---	2,01	-	Desconocida
YGR149W	---	2,55	-	Desconocida
YGR174W-A	---	2,89	-	Desconocida
YGR174W-A	---	2,27	3,03	Desconocida
YGR243W	FMP43	4,20	2,09	Desconocida
YHR022C	---	3,50	-	Desconocida
YHR033W	---	3,63	-	Desconocida
YHR087W	RTC3	11,07	4,44	Desconocida
YHR097C	---	2,88	2,83	Desconocida
YHR138C	---	2,11	2,40	Desconocida
YIL024C	---	2,19	-	Desconocida
YIL029C	---	2,27	-	Desconocida
YIL108W	---	2,47	2,54	Desconocida
YJL107C	---	8,49	4,45	Desconocida
YJL132W	---	2,51	-	Desconocida
YJL161W	FMP33	4,03	3,47	Desconocida
YJR008W	---	2,81	2,44	Desconocida
YKL107W	---	2,41	3,90	Desconocida
YKL133C	---	2,07	-	Desconocida
YKR046C	PET10	5,14	6,32	Desconocida

YKR091W	SRL3	8,61	8,08	Desconocida
YLR031W	---	3,17	2,39	Desconocida
YLR149C	---	3,01	2,03	Desconocida
YLR267W	BOP2	3,34	3,75	Desconocida
YLR297W	---	2,23	-	Desconocida
YLR312C	---	2,85	2,15	Desconocida
YLR327C	TMA10	4,20	3,80	Desconocida
YLR414C	PUN1	3,17	3,39	Desconocida
YML128C	MSC1	4,21	2,32	Desconocida
YMR040W	YET2	-	2,05	Desconocida
YMR090W	---	2,23	-	Desconocida
YMR118C	---	-	3,53	Desconocida
YMR196W	---	2,48	-	Desconocida
YMR315W-A	---	-	3,91	Desconocida
YMR316W	DIA1	2,41	4,09	Desconocida
YMR322C	SNO4	2,51	-	Desconocida
YNL058C	---	2,22	2,44	Desconocida
YNR034W-A	---	2,36	-	Desconocida
YNR065C	---	4,80	6,19	Desconocida
YNR066C	---	5,13	5,33	Desconocida
YOL084W	PHM7	2,87	-	Desconocida
YOL159C	---	2,42	3,42	Desconocida
YOR161C	PNS1	2,85	-	Desconocida
YOR220W	RCN2	-	2,33	Desconocida
YOR289W	---	2,03	2,03	Desconocida
YPL054W	LEE1	2,69	2,23	Desconocida
YPL067C	---	-	3,05	Desconocida
YPL222W	---	2,03	-	Desconocida
YPL272C	---	-	3,55	Desconocida
YCR101C	---	3,08	2,86	Desconocida
YER053C-A	---	4,56	-	Desconocida
YDL206W	---	2,36	-	Desconocida
YKR013W	PRY2	2,00	-	Desconocida

## ANEXO 3

**TABLA 1: Agrupación de los genes inducidos por RC (30 µg/ml, 4 h) en la cepa silvestre (BY4741) respecto a su dependencia de *SWI3*.** Se incluyen los ORFs cuya activación por RC en la cepa WT es ≥ 2, y se clasifican como: genes cuya activación transcripcional depende de *SWI3*, genes regulados basalmente por *SWI3* y genes cuya inducción es independiente de *SWI3* durante el tratamiento por RC, en base al análisis de datos descrito en Materiales y Métodos. Se incluyen los valores de inducción en ratios en las diferentes condiciones y también para el mutante *rlm1Δ*. Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD y Proteome.

GRUPO I: genes cuya activación transcripcional depende de <i>SWI3</i>						
ORF	Gen	BY+RC vs BY	<i>swi3Δ</i> +RC vs <i>swi3Δ</i>	<i>swi3Δ</i> vs BY	<i>rlm1Δ</i> + RC vs <i>rlm1Δ</i>	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>						
<i>YKL163W</i>	<i>PIR3</i>	47,71	10,56	1,68	0,94	Manoproteína PIR
<i>YLR194C</i>	---	9,68	2,71	0,68	1,50	GPI-CWP
<i>YLR121C</i>	<i>YPS3</i>	7,75	2,49	1,54	1,84	GPI-CWP; endopeptidasa
<i>YGR032W</i>	<i>GSC2</i>	6,68	1,16	0,64	3,71	β-1,3 glucan sintasa
<i>YKR061W</i>	<i>KTR2</i>	5,36	1,54	0,63	1,22	Biosíntesis manoproteínas
<i>YLR042C</i>	---	3,18	1,33	0,92	2,19	GPI-CWP
<i>YIRO39C</i>	<i>YPS6</i>	2,97	1,88	1,41	0,87	Aspartil proteasa con posible anclaje GPI
<i>YLR040C</i>	---	2,96	1,29	0,86	1,26	Proteína de pared con función desconocida
<i>YPL221W</i>	<i>FLC1</i>	2,71	1,24	0,87	1,45	Biogénesis de la pared celular
<i>YLR120C</i>	<i>YPS1</i>	2,54	1,45	1,21	2,01	Aspartil proteasa con anclaje GPI
<i>YGR166W</i>	<i>KRE11</i>	2,38	1,48	1,03	0,94	Biosíntesis β-1,6 glucano
<i>YNL294C</i>	<i>RIM21</i>	2,37	1,57	1,08	1,03	Construcción de pared celular
<i>YNL192W</i>	<i>CHS1</i>	2,27	1,44	1,11	1,18	Biosíntesis de quitina
<i>YKL104C</i>	<i>GFA1</i>	2,23	1,37	1,28	1,03	Biosíntesis de quitina
<i>YBR005W</i>	<i>RCR1</i>	2,22	1,50	1,15	2,09	Deposición de quitina en la pared celular
<b>Biogénesis y organización de organelas</b>						
<i>YJL116C</i>	<i>NCA3</i>	2,86	0,95	0,65	0,88	Regulador de la expresión mitocondrial de Atp6 y Atp8
<i>YDL130W-A</i>	<i>STF1</i>	2,03	1,50	1,14	1,15	Regulación de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial
<b>Apareamiento</b>						
<i>YJL108C</i>	<i>PRM10</i>	4,99	1,50	1,52	1,19	Proteína regulada por feromonas
<i>YJL117C</i>	<i>PRM5</i>	4,78	1,75	2,09	1,19	Proteína regulada por feromonas
<b>Esporulación</b>						
<i>YLR054C</i>	<i>OSW2</i>	2,08	1,17	1,05	1,44	Posible papel en el ensamblaje de la pared de la espóra
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>						
<i>YDR380W</i>	<i>ARO10</i>	2,89	1,05	0,07	2,11	Fenilpiruvato decarboxilasa
<i>YHR209W</i>	<i>CRG1</i>	11,54	3,51	0,75	1,22	Actividad metiltransferasa
<i>YJR078W</i>	<i>BNA2</i>	2,19	1,32	1,11	1,39	Biosíntesis de nicotinato (NAD) a partir de triptófano
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>						
<i>YPL088W</i>	---	9,59	1,84	2,46	1,26	Posible aril alcohol deshidrogenasa
<i>YGL156W</i>	<i>AMS1</i>	3,25	1,39	1,59	1,53	Degradación de oligosacáridos libres
<i>YJL155C</i>	<i>FBP26</i>	2,73	1,57	1,11	1,07	Fructosa-2,6-bifosfatasa; metabolismo de la glucosa
<i>YJL107C</i>	<i>PFK26</i>	2,20	1,59	1,11	0,94	6-fosfofructo quinasa; glicolisis
<i>YEL058W</i>	<i>PCM1</i>	2,11	1,47	1,41	1,03	N-acetilglucosamina-fosfato mutasa
<b>Metabolismo de DNA</b>						
<i>YPR078C</i>	---	2,62	1,26	1,30	0,95	Posible papel en metabolismo de DNA
<i>YHL022C</i>	<i>SPO11</i>	3,67	2,32	0,81	0,89	Actividad endodeoxirribonucleasa
<b>Metabolismo de lípidos</b>						
<i>YKR053C</i>	<i>YSR3</i>	3,83	0,93	0,51	2,54	Metabolismo de esfingolípidos
<i>YPL110C</i>	<i>GDE1</i>	2,47	1,59	0,58	1,04	Glicerofosfolina fosfodiesterasa
<i>YPL057C</i>	<i>SUR1</i>	2,09	1,23	1,44	1,54	Biosíntesis de esfingolípidos

<b>Morfogénesis</b>						
YMR238W	DFG5	2,30	1,45	1,28	1,16	Necesario para la polaridad y elongación celular
YOL112W	MSB4	2,07	1,51	1,03	1,17	Proteína activadora de GTPasa; organización del citoesqueleto
YNL293W	MSB3	2,02	1,49	1,00	1,02	Transporte vesicular
<b>Respuesta a estrés</b>						
YPR005C	HAL1	5,21	1,78	2,63	1,27	Implicado en la homeostasis de iones
YGR213C	RTA1	5,00	1,90	2,18	2,79	Resistencia a aminocolesterol
YOL052C-A	DDR2	2,56	0,97	0,68	0,71	Proteína de respuesta a múltiples estreses
YLL039C	UBI4	2,25	1,25	1,42	1,17	Ubiquitina, esencial para la respuesta a estrés celular
YJL144W	---	2,20	1,04	1,09	1,06	Expresión inducida por choque osmótico
YDR001C	NTH1	2,00	1,16	0,89	0,99	Trealasa
<b>Transcripción</b>						
YPL089C	RLM1	2,26	1,44	1,51	1,04	Factor de transcripción de la ruta de integridad
<b>Transducción de señales</b>						
YKL161C	MLP1	19,62	3,55	1,38	1,15	Serín-treonín proteín quinasa
YOR134W	BAG7	10,70	2,24	1,89	1,12	Proteína activadora de GTPasa (GAP), activa a Rho1
YDR085C	AFR1	4,74	2,63	1,69	1,20	Morfogénesis celular en el proceso de conjugación
YMR104C	YPK2	4,06	1,97	1,56	1,00	Serín-treonín proteín quinasa
YGL121C	GPG1	3,82	1,64	0,62	1,23	Regulación del crecimiento pseudohifal
YHR030C	SLT2	3,23	1,63	0,99	1,08	MAPK de la ruta de integridad
YOR208W	PTP2	2,87	1,78	1,07	1,08	Tirosín fosfatasa
YOL016C	CMK2	2,63	1,14	0,89	2,68	Quinasa dependiente de Ca/calmodulina
YGL248W	PDE1	2,37	1,14	0,90	1,10	AMPC fosfodiesterasa
YNR064C	---	2,23	1,11	0,71	1,22	Epóxido hidrolasa
YNL053W	MSG5	2,22	1,18	1,06	1,10	Fosfatasa de especificidad dual
<b>Transporte</b>						
YNL093W	YPT53	3,03	0,94	1,25	2,35	Endocitosis y transporte de proteínas a la vacuola
YIL023C	YKE4	2,62	1,33	0,82	1,04	Transportador de Zinc
YOR306C	MCH5	2,59	1,24	0,47	0,91	Transportador de riboflavina
YBR295W	PCA1	2,45	1,31	0,72	1,17	ATPasa transportadora de Cobre tipo P
YIRO28W	DAL4	2,44	1,12	1,18	1,07	Permeasa de Alantoína
YHR096C	HXT5	2,21	1,24	1,60	1,23	Transportador de glucosa de moderada afinidad
YBR296C	PHO89	2,19	1,09	0,15	2,67	Transportador de fosfato
YOL122C	SMF1	2,10	1,47	1,02	0,86	Transportador general de iones metálicos
YOR137C	SIA1	2,08	1,38	1,00	1,30	Implicada en la activación de Pma1
YOR036W	PEP12	2,04	1,40	1,03	1,38	Transporte del Golgi a la vacuola
<b>Desconocida</b>						
YDR034W-B	---	17,57	3,01	2,50	2,61	Desconocida
YBR056W-A	---	8,82	1,93	1,13	4,41	Desconocida
YKR091W	SRL3	8,08	3,35	0,82	1,18	Desconocida
YKR046C	PET10	6,32	1,51	2,33	1,17	Desconocida
YNR065C	---	6,19	1,69	0,74	1,02	Desconocida
YNR066C	---	5,33	1,98	0,66	1,06	Desconocida
YJL107C	---	4,45	1,92	1,21	1,18	Desconocida
YHR087W	RTC3	4,44	1,13	0,63	1,29	Desconocida
YMR316W	DIA1	4,09	1,44	1,18	3,39	Desconocida
YMR315W-A	---	3,91	1,40	1,37	0,69	Desconocida
YKL107W	---	3,90	1,42	1,42	1,15	Desconocida
YLR267W	BOP2	3,75	2,19	0,47	1,34	Desconocida
YPL272C	---	3,55	1,51	0,79	1,75	Desconocida
YMR118C	---	3,53	1,48	0,97	0,98	Desconocida
YJL161W	FMP33	3,47	2,07	0,82	0,96	Desconocida
YOL159C	---	3,42	1,72	0,64	1,09	Desconocida
YLR414C	PUN1	3,39	1,43	1,74	1,85	Desconocida
YGR043C	NQM1	3,19	0,93	1,87	1,13	Desconocida
YPL067C	---	3,05	1,44	0,84	1,47	Desconocida

YGR174W-A	---	3,03	1,65	0,87	1,01	Desconocida
YHR097C	---	2,83	1,10	0,92	1,37	Desconocida
YDR070C	FMP16	2,78	1,05	1,29	0,98	Desconocida
YCR099C	---	2,69	1,63	1,17	1,09	Desconocida
YGL230C	---	2,56	1,50	0,79	1,15	Desconocida
YIL108W	---	2,54	1,36	0,99	1,17	Desconocida
YCR100C	---	2,48	1,47	1,07	1,08	Desconocida
YJR008W	---	2,44	1,33	0,88	1,14	Desconocida
YHR138C	---	2,40	1,21	1,30	1,53	Desconocida
YOR220W	RCN2	2,33	1,23	0,97	1,97	Desconocida
YBR071W	---	2,29	1,55	1,04	1,35	Desconocida
YDL057W	---	2,12	1,34	0,83	1,23	Desconocida
YMR040W	YET2	2,05	1,38	0,92	1,14	Desconocida
YOR289W	---	2,03	1,23	1,10	1,23	Desconocida

### GRUPO II: genes regulados basalmente por SWI3

ORF	Gen	BY+RC vs BY	swi3Δ+RC vs swi3Δ	swi3Δ vs BY	rlm1Δ+ RC vs rlm1Δ	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>						
YAL053W	FLC2	2,74	1,55	1,87	1,12	Mantenimiento de la pared celular
YGR189C	CRH1	2,68	1,39	1,99	1,29	GPI-CWP; transglucosidasa
YKL096W	CWP1	2,30	1,17	2,21	0,75	GPI-CWP
YER150W	SPI1	2,18	0,83	4,32	1,01	GPI-CWP
<b>Metabolismo de lípidos</b>						
YDR018C	---	2,22	1,55	2,56	1,10	Posible actividad acetiltransferasa
<b>Modificación de proteínas</b>						
YGR161C	RTS3	2,47	1,19	6,37	1,24	Componente del complejo fosfatasa tipo 2A
YEL060C	PRB1	2,43	1,18	2,34	1,68	Proteinasa vacuolar; degradación de proteínas
<b>Respuesta a estrés</b>						
YFL014W	HSP12	7,23	1,25	7,50	0,82	Proteína de choque térmico
YBR182C	SMP1	2,32	1,40	5,19	1,32	Factor de transcripción de la ruta HOG
<b>Transcripción</b>						
YDR216W	ADR1	2,39	1,04	3,67	1,24	Factor de transcripción
YMR280C	CAT8	2,09	1,21	4,46	1,16	Regulador positivo de la gluconeogénesis
YGR097W	ASK10	2,17	1,24	2,63	0,95	Componente de la RNA pol II holoenzima
<b>Transducción de señales</b>						
YCR073C	SSK22	2,55	1,67	3,37	1,00	Serín-treonín proteín quinasa (ruta HOG)
YBR203W	COS111	2,39	1,71	4,61	1,25	Resistencia a ciclopiroxina
YGR023W	MTL1	2,02	1,44	2,72	0,92	Sensor de la ruta de integridad
<b>Desconocida</b>						
YLR327C	TMA10	3,80	1,19	5,49	1,67	Desconocida
YML128C	MSC1	2,32	0,96	1,74	0,98	Desconocida
YPL054W	LEE1	2,23	1,42	2,18	1,31	Desconocida
YLR312C	---	2,15	1,04	6,36	1,00	Desconocida
YCL012C	---	2,14	1,39	1,72	1,00	Desconocida
YGR243W	FMP43	2,09	0,95	7,82	1,18	Desconocida
YER158C	---	2,07	1,07	1,96	1,01	Desconocida
YBR230W-A	---	2,07	1,08	2,51	1,14	Desconocida
YLR149C	---	2,03	1,03	2,15	1,10	Desconocida

### GRUPO III: genes independientes de SWI3

ORF	Gen	BY+RC vs BY	swi3Δ+RC vs swi3Δ	swi3Δ vs BY	rlm1Δ+ RC vs rlm1Δ	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>						
YDR055W	PST1	3,93	3,49	0,33	1,05	GPI-CWP
<b>Metabolismo de poliaminas</b>						
YPL052W	OAZ1	2,30	1,63	1,48	1,06	Inhibidor de la ornitina descarboxilasa
<b>Modificación de proteínas</b>						

YBL078C	ATG8	2,87	1,98	0,79	1,05	Componente del autofagosoma
YMR192W	GYL1	2,09	1,70	0,95	1,05	Proteína activadora de GTPasa (GAP)
<b>Desconocida</b>						
YCR101C	---	2,86	2,02	0,83	1,07	
YNL058C	---	2,44	1,73	1,04	1,04	Desconocida
YLR031W	---	2,39	1,67	0,57	1,23	Desconocida

**TABLA 2: Agrupación de los genes inducidos por ZL (0,4 U/ml, 3 h) en la cepa silvestre (BY4741) respecto a su dependencia de *SWI3*.** Se incluyen los ORFs cuya activación por zimoliasa en la cepa WT es 2, y se clasifican como: genes cuya activación transcripcional depende de *SWI3*, genes regulados basalmente por *SWI3* y genes cuya inducción es independiente de *SWI3*, en base al análisis de datos descrito en Materiales y Métodos. Se incluyen los valores de inducción en ratios en las diferentes condiciones. Las categorías funcionales fueron asignadas según la información disponible en las bases de datos SGD y Proteome.

<b>GRUPO I: genes cuya activación transcripcional depende de <i>SWI3</i></b>						
ORF	Gen	BY+ZL vs BY	<i>swi3Δ</i> +ZL vs <i>swi3Δ</i>	<i>swi3Δ</i> vs BY	Función	
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>						
YLR040C	---	2,98	1,48	0,75	Proteína de pared con función desconocida	
YPL221W	FLC1	2,29	1,49	0,98	Biogénesis de la pared celular	
YKL104C	GFA1	2,16	1,56	1,39	Biosíntesis de quitina	
YGR032W	GSC2	2,59	1,21	0,82	β-1,3 glucan sintasa	
YLR042C	---	7,30	1,52	0,92	GPI-CWP	
YNL192W	CHS1	2,18	1,46	1,29	Biosíntesis de quitina	
YLR194C	---	5,58	3,45	0,67	GPI-CWP	
YGL038C	OCH1	2,52	1,57	0,93	Manosiltransferasa del aparato cis-Golgi	
YKL163W	PIR3	61,66	18,42	2,96	Manoproteína PIR	
YKR061W	KTR2	3,80	1,78	0,78	Biosíntesis manoproteínas	
YLR121C	YPS3	8,97	4,42	2,20	GPI-CWP; endopeptidasa	
YPL175W	SPT14	2,01	1,57	1,54	Biosíntesis del glicosilfosfatidilinositol (GPI)	
<b>Biogénesis y organización de organelas</b>						
YOR193W	PEX27	2,14	1,10	0,98	Regulación del número y tamaño de peroxisomas	
YJL116C	NCA3	11,38	0,95	0,90	Regulador de la expresión mitocondrial de Atp6 y Atp8	
YIL136W	OM45	2,12	1,39	1,54	Componente de la membrana externa mitocondrial	
YDL204W	RTN2	3,85	1,53	1,07	Organización del retículo endoplásmico	
<b>Apareamiento</b>						
YDL223C	HBT1	4,21	1,43	1,31		
YJL108C	PRM10	8,65	2,60	2,03	Proteína regulada por feromonas	
YIL117C	PRM5	4,65	1,95	2,56	Proteína regulada por feromonas	
YJL079C	PRY1	2,06	0,88	1,03	Posible papel en la eficacia del apareamiento	
<b>Esporulación</b>						
YDL239C	ADY3	2,03	1,26	0,87		
<b>Ciclo celular</b>						
YOL104C	NDJ1	2,11	0,98	0,58	Implicada en meiosis	
YPL174C	NIP100	2,04	1,12	1,42	Implicada en la división del huso mitótico entre la célula madre e hija	
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>						
YHR209W	CRG1	12,22	3,89	1,32	Actividad metiltransferasa	
YMR170C	ALD2	2,26	1,55	1,11	Aldehído deshidrogenasa citoplasmática	
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>						
YPR160W	GPH1	2,24	1,36	1,28	Glicógeno fosforilasa	
YER062C	HOR2	2,77	1,60	1,70	Biosíntesis de glicerol	
YDR074W	TPS2	2,55	1,41	1,50	Trealosa-6-fostatasa	
YPL088W	---	8,50	2,04	2,78	Posible aril alcohol deshidrogenasa	
YLR258W	GSY2	2,33	1,30	1,30	Glicógeno sintasa	
YBR117C	TKL2	7,53	1,21	1,68	Ruta de las pentosas fosfato	
YDR315C	IPK1	2,25	1,47	1,27	Inositol polifosfato quinasa	
<b>Metabolismo de DNA</b>						

YHL022C	SPO11	2,96	1,37	1,26	Actividad endodeoxirribonucleasa
YML118W	NGL3	2,30	1,38	1,46	Endonucleasa
YMR271C	URA10	2,02	1,32	1,44	Biosíntesis de pirimidinas
<b>Metabolismo de lípidos</b>					
YDL222C	FMP45	5,29	0,98	1,46	Implicada en el metabolismo de esfingolípidos
YER037W	PHM8	2,00	1,16	0,71	Fosfatasa del ácido lisofosfatídico
<b>Metabolismo del hierro</b>					
YLR205C	HMX1	3,05	1,21	0,35	Hemo oxigenasa
<b>Metabolismo del RNA</b>					
YLR270W	DCS1	2,00	1,32	1,59	Catabolismo del RNAm
<b>Modificación de proteínas</b>					
YPR193C	HPA2	2,16	1,46	1,21	Histona acetiltransferasa
<b>Morfogénesis</b>					
YNL020C	ARK1	2,06	1,31	1,24	
<b>Respuesta a estrés</b>					
YGR088W	CTT1	4,31	1,15	2,47	Catalasa; protección frente a estrés oxidativo
YPR005C	HAL1	4,81	1,78	3,08	Implicado en la homeostasis de iones
YFL014W	HSP12	4,96	1,85	2,87	Proteína de choque térmico
YIL101C	XBP1	3,07	1,48	1,83	Represor transcripcional inducido por estrés
YOL052C-A	DDR2	6,08	2,61	0,79	Proteína de respuesta a múltiples estreses
YMR169C	ALD3	7,14	1,13	1,49	Aldehído deshidrogenasa
YMR250W	GAD1	2,36	1,39	0,65	Glutamato descarboxilasa; respuesta a estrés oxidativo
YLR251W	SYM1	2,99	1,54	1,67	Metabolismo de etanol; Inducida por estrés térmico
YOR173W	DCS2	2,89	1,54	1,71	Decapping del mRNA
<b>Transducción de señales</b>					
YJL057C	IKS1	2,08	1,38	1,13	Serín-treonín proteín quinasa
YOR134W	BAG7	5,79	2,62	1,96	Proteína activadora de GTPasa (GAP), activa a Rho1 GAP de Rho1
YKL161C	---	34,71	3,53	2,58	Serín-treonín proteín quinasa
YGL121C	GPG1	3,33	2,16	0,81	Regulación del crecimiento pseudohifal
YDR085C	AFR1	9,85	3,55	3,21	Morfogénesis celular en el proceso de conjugación
YHR030C	SLT2	3,80	2,11	1,08	MAPK de la ruta de integridad
YGR070W	ROM1	2,52	1,26	1,43	GEF de Rho1
<b>Transporte</b>					
YDL119C	---	2,06	1,53	1,03	Proteína de transporte mitocondrial
YDR536W	STL1	6,61	2,41	1,70	Transporte de glucosa y glicerol
YIL023C	YKE4	2,18	1,23	0,95	Transportador de Zinc
YHR094C	HXT1	2,69	0,88	0,93	Transportador de glucosa de baja afinidad
YFL055W	AGP3	2,01	1,03	0,97	Permeasa de aminoácidos de baja afinidad
<b>Desconocida</b>					
YGR043C	---	9,71	1,99	2,18	Desconocida
YLR031W	---	3,17	2,02	1,22	Desconocida
YNR066C	---	5,13	1,39	1,46	Desconocida
YGR174W-A	---	2,89	1,57	1,53	Desconocida
YGR174W-A	---	2,27	1,35	1,31	Desconocida
YKL133C	---	2,07	1,48	1,34	Desconocida
YMR316W	DIA1	2,41	1,32	1,49	Desconocida
YER039C-A	---	2,21	1,33	1,28	Desconocida
YLR414C	---	3,17	1,98	1,67	Desconocida
YHR087W	---	11,07	4,30	0,90	Desconocida
YGL258W-A	---	3,23	1,69	1,66	Desconocida
YJL107C	---	8,49	2,34	2,39	Desconocida
YIL029C	---	2,27	1,46	1,52	Desconocida
YDR070C	---	4,31	1,56	1,70	Desconocida
YNR065C	---	4,80	1,97	0,98	Desconocida
YMR090W	---	2,23	1,44	1,21	Desconocida
YKR091W	SRL3	8,61	4,21	1,13	Desconocida
YJL161W	---	4,03	2,43	1,56	Desconocida
YKR013W	PRY2	2,00	1,52	1,41	Desconocida

YBR071W	---	2,01	1,35	1,32	Desconocida
YBR056W-A	---	2,93	1,78	1,20	Desconocida
YGL230C	---	2,70	1,74	1,23	Desconocida
YNL058C	---	2,22	1,55	1,16	Desconocida
YKR046C	PET10	5,14	2,71	2,96	Desconocida
YGR008C	STF2	2,21	1,32	1,21	Desconocida
YHR033W	---	3,63	1,24	1,45	Desconocida
YBR054W	YRO2	2,00	0,92	0,11	Desconocida
YHR097C	---	2,88	1,28	1,08	Desconocida
YML128C	MSC1	4,21	1,62	1,86	Desconocida
YJR008W	---	2,81	1,45	1,25	Desconocida
YER053C-A	---	4,56	0,54	2,45	Desconocida
YGL157W	---	2,47	1,59	1,58	Desconocida

## GRUPO II: genes regulados basalmente por SWI3

ORF	Gen	BY+ZL vs BY	swi3Δ+ZL vs swi3Δ	swi3Δ vs BY	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>					
YDL049C	KNH1	2,53	1,53	2,54	Biosíntesis β-1,6 glucano
YGR189C	CRH1	2,39	1,67	2,06	GPI-CWP; transglicosidasa
YER150W	SPI1	6,10	0,92	5,63	GPI-CWP
YIRO39C	YPS6	3,98	2,54	2,72	Aspartil proteasa con posible anclaje GPI
YKR076W	ECM4	2,15	1,35	2,39	Organización de la pared celular
YKL096W	CWP1	2,49	1,19	2,28	GPI-CWP
YAL053W	FLC2	2,58	1,82	2,02	Mantenimiento de la pared celular
<b>Ciclo celular</b>					
YLR178C	TFS1	2,25	1,41	1,78	Regulación de peptidolisis
<b>Esporulación</b>					
YJL106W	IME2	2,32	1,79	1,83	Serín/treonín proteín quinasa ; activación de la meiosis
YGR225W	AMA1	2,10	1,26	1,90	Requerido en el ensamblaje de la pared de la espora
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>					
YIRO17C	MET28	2,70	1,10	11,56	Participa en la biosíntesis de metionina
YNL277W	MET2	2,14	0,90	11,39	Biosíntesis de metionina
YJRO10W	MET3	2,16	0,92	6,97	Metabolismo de metionina; actividad sulfato adeniltransferasa
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>					
YML054C	CYB2	2,30	1,20	6,84	L-lactato deshidrogenasa
YEL011W	GLC3	2,48	1,13	2,73	Implicada en la acumulación de glicógeno
YDL246C	SOR2	2,20	1,55	4,32	Deshidrogenasa de sorbitol
YOR374W	ALD4	2,29	0,96	4,59	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
YHR043C	DOG2	2,23	0,92	2,78	Fosfatasa; metabolismo de la glucosa
YGR287C	---	2,10	1,21	16,88	Isomaltasa
YDL022W	GPD1	2,65	1,55	1,75	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
YMR105C	PGM2	2,63	1,23	1,83	Fosfoglucomutasa; metabolismo de hexosas
YGR256W	GND2	2,17	1,20	1,67	Ruta de las pentosas fosfato
YGL156W	AMS1	3,36	2,07	2,64	Degradación de oligosacáridos libres
YGR248W	SOL4	4,45	1,41	6,85	Actividad 6-fosfogluconolactonasa
YKR097W	PCK1	2,15	1,46	4,76	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa; gluconeogénesis
YPR184W	GDB1	2,21	1,52	2,49	Degradación de glicógeno
YBR299W	MAL12 /MAL32	2,04	1,49	16,49	Maltasa
<b>Metabolismo de lípidos</b>					
YDR018C	---	2,19	1,55	3,26	Posible actividad acetiltransferasa
YBR183W	YPC1	2,03	1,42	3,66	Ceramidasa alcalina
YLR151C	PCD1	2,12	1,43	1,93	Actividad pirofosfatasa
YNL194C	---	3,34	1,19	8,12	Mantenimiento del contenido de esfingolípidos
<b>Metabolismo de tiamina</b>					
YDL244W	THI13	2,07	1,53	2,37	Metabolismo de tiamina
YGR144W	THI4	2,05	1,40	4,84	Biosíntesis de tiamina
<b>Modificación de proteínas</b>					

<i>YER054C</i>	<i>GIP2</i>	2,45	1,17	2,15	Proteín fosfatasa
<b>Respuesta a estrés</b>					
<i>YBL064C</i>	<i>PRX1</i>	2,20	1,18	3,27	
<i>YML100W</i>	<i>TSL1</i>	2,93	1,30	2,68	Implicado en la biosíntesis de la trealosa
<i>YDR453C</i>	<i>TSA2</i>	2,37	1,30	1,99	Tiorredoxin peroxidasa
<i>YML131W</i>	---	2,35	1,06	5,82	Posible oxidorreductasa NAD-dependiente
<i>YPL230W</i>	<i>USV1</i>	2,01	1,47	3,29	Factor de transcripción; respuesta a estrés salino
<b>Transcripción</b>					
<i>YDR043C</i>	<i>NRG1</i>	2,30	1,27	13,23	Represor transcripcional
<i>YDR216W</i>	<i>ADR1</i>	2,58	1,04	4,21	Factor de transcripción
<i>YPL089C</i>	<i>RLM1</i>	2,40	1,65	1,73	Factor de transcripción de la ruta de integridad
<i>YGR097W</i>	<i>ASK10</i>	2,19	1,29	2,95	Componente de la RNA polimerasa II holoenzima
<b>Transducción de señales</b>					
<i>YCR073C</i>	<i>SSK22</i>	2,07	2,08	3,55	Serín-treonín proteín quinasa (ruta de alta osmolaridad)
<i>YBR203W</i>	<i>COS111</i>	3,04	1,56	6,19	Resistencia a ciclopiroxina
<i>YGR023W</i>	<i>MTL1</i>	2,28	1,51	3,62	Sensor de la ruta de integridad
<i>YOR107W</i>	<i>RGS2</i>	2,28	1,11	3,78	Activador de la actividad GTPasa de la proteína G
<i>YDL214C</i>	<i>PRR2</i>	2,19	1,22	27,24	Serín-treonín proteín quinasa (respuesta a feromonas)
<b>Transporte</b>					
<i>YHR096C</i>	<i>HXT5</i>	2,79	1,52	2,01	Transportador de glucosa de moderada afinidad
<i>YOR348C</i>	<i>PUT4</i>	5,03	0,79	20,62	Requerido para el transporte de prolina de alta afinidad
<b>Desconocida</b>					
<i>YCR100C</i>	---	2,60	1,48	1,95	Desconocida
<i>YBL049W</i>	<i>MOH1</i>	2,09	1,80	2,24	Desconocida
<i>YOR161C</i>	<i>PNS1</i>	2,85	1,16	2,81	Desconocida
<i>YMR322C</i>	<i>SNO4</i>	2,51	1,47	12,33	Desconocida
<i>YER158C</i>	---	2,17	1,35	2,41	Desconocida
<i>YLR327C</i>	<i>TMA10</i>	4,20	1,27	10,10	Desconocida
<i>YOL084W</i>	<i>PHM7</i>	2,87	1,02	11,69	Desconocida
<i>YPL054W</i>	<i>LEE1</i>	2,69	1,29	4,46	Desconocida
<i>YHR022C</i>	---	3,50	1,56	3,75	Desconocida
<i>YEL057C</i>	---	2,92	1,13	5,00	Desconocida
<i>YGR243W</i>	---	4,20	1,20	9,07	Desconocida
<i>YDL206W</i>	---	2,36	1,48	1,66	Desconocida
<i>YFR017C</i>	---	2,25	1,18	2,91	Desconocida
<i>YKL107W</i>	---	2,41	2,13	2,01	Desconocida
<i>YER067W</i>	---	2,20	1,35	1,92	Desconocida
<i>YLR312C</i>	---	2,85	1,03	8,24	Desconocida
<i>YCR101C</i>	---	3,08	1,24	2,44	Desconocida
<i>YGR052W</i>	---	5,51	1,18	4,02	Desconocida
<i>YCR099C</i>	---	2,88	1,30	2,21	Desconocida
<i>YNR034W-A</i>	---	2,36	0,98	1,82	Desconocida
<i>YOR289W</i>	---	2,03	1,21	1,63	Desconocida
<i>YDL169C</i>	<i>UGX2</i>	2,23	1,45	2,26	Desconocida
<i>YLR149C</i>	---	3,01	1,29	3,52	Desconocida
<i>YMR196W</i>	---	2,48	1,36	3,24	Desconocida
<i>YIL024C</i>	---	2,19	1,10	3,16	Desconocida
<i>YPL222W</i>	---	2,03	1,26	4,33	Desconocida
<i>YLR297W</i>	---	2,23	1,00	6,30	Desconocida
<i>YCL026C-B</i>	<i>HBN1</i>	2,15	1,14	21,35	Desconocida
<i>YHR138C</i>	---	2,11	1,46	1,74	Desconocida
<i>YDL110C</i>	<i>TMA17</i>	2,04	1,55	2,09	Desconocida
<b>GRUPO III: genes independientes de SWI3</b>					
ORF	Gen	BY+ZL vs BY	<i>swi3Δ</i> +ZL vs <i>swi3Δ</i>	<i>swi3Δ</i> vs BY	Función
<b>Biogénesis y organización de la pared celular</b>					
<i>YNL294C</i>	<i>RIM21</i>	2,39	1,80	1,33	Construcción de pared celular

<i>YDR055W</i>	<i>PST1</i>	4,09	4,40	0,44	GPI-CWP
<i>YDL130W-A</i>	<i>STF1</i>	2,02	1,74	1,30	Regulación de la F1F0-ATP sintasa mitocondrial
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>					
<i>YJL155C</i>	<i>FBP26</i>	2,77	1,89	1,37	Fructosa-2,6-bifosfatasa; metabolismo de la glucosa
<i>YIL107C</i>	<i>PFK26</i>	2,37	1,86	1,32	6-fosfofructo quinasa; glicolisis
<b>Metabolismo de lípidos</b>					
<i>YPL110C</i>	<i>GDE1</i>	2,01	2,01	0,62	Glicerofosfolina fosfodiesterasa
<b>Metabolismo de poliaminas</b>					
<i>YPL052W</i>	<i>OAZ1</i>	2,12	1,81	1,60	Inhibidor de la ornitina descarboxilasa
<b>Modificación de proteínas</b>					
<i>YMR192W</i>	<i>GYL1</i>	2,21	1,74	1,28	Proteína activadora de GTPasa (GAP)
<i>YBL078C</i>	<i>ATG8</i>	2,66	2,27	1,11	Componente del autofagosoma
<b>Morfogénesis</b>					
<i>YNL293W</i>	<i>MSB3</i>	2,18	1,70	1,34	Transporte vesicular
<b>Respuesta a estrés</b>					
<i>YDR001C</i>	<i>NTH1</i>	2,18	1,70	1,13	Trealasa
<b>Transducción de señales</b>					
<i>YMR104C</i>	<i>YPK2</i>	3,13	2,21	1,84	Serín-treonín proteín quinasa
<i>YOR208W</i>	<i>PTP2</i>	2,76	2,13	1,43	Tirosín fosfatasa
<b>Transporte</b>					
<i>YOL122C</i>	<i>SMF1</i>	3,44	2,28	1,02	Transportador general de iones metálicos
<i>YOR137C</i>	<i>SIA1</i>	2,24	1,71	1,27	Implicada en la activación de Pma1
<b>Desconocida</b>					
<i>YLR267W</i>	---	3,34	2,23	1,11	Desconocida
<i>YIL108W</i>	---	2,47	1,73	1,13	Desconocida
<i>YDR034W-B</i>	---	7,60	5,36	3,46	Desconocida
<i>YGR149W</i>	---	2,55	1,86	1,09	Desconocida
<i>YJL132W</i>	---	2,51	2,04	1,36	Desconocida
<i>YOL159C</i>	---	2,42	2,01	0,81	Desconocida
<i>YDL057W</i>	---	2,10	1,77	1,11	Desconocida
<i>YGR146C</i>	---	2,01	1,91	1,06	Desconocida