

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
DEPT. BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**GENERACIÓ I ÚS DE MICROXIPS DE DNA PER A
L'ESTUDI DE LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL A pH
ALCALÍ EN *Saccharomyces cerevisiae*.**

LAIA VILADEVALL MASBERNAT

TESI DOCTORAL

MAIG 2005

Als meus pares, la meva germana i a en Dani. Per recolzar-me i ajudar-me en tot moment. Perquè el que tinc, el que sóc, és vostre...

Memòria presentada per la llicenciada LAIA
VILADEVALL MASBERNAT per optar al grau de
Doctora en Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la
direcció dels Drs. Joaquim Ariño Carmona i Anna
Barceló Vernet a la Unitat de Veterinària del
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.

LAIA VILADEVALL MASBERNAT JOAQUIM ARIÑO CARMONA ANNA BARCELÓ VERNET

Maig de 2005
BELLATERRA

AGRAÏMENTS

La veritat és que no sé per on començar a donar les gràcies, ja que tots vosaltres heu fet possible la realització d'aquesta tesi. Em venen al cap tantes persones, tantes anècdotes, la multitud de cops que m'heu ajudat, el suport moral en els moments baixos, totes les rialles conjuntes, etc. Per aquest motiu espero ser capaç de donar-vos a tots els que heu participat en la realització d'aquesta tesi de mil maneres diferents els agraïment que realment us mereixeu. De tot cor, moltes gràcies a tots.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Joaquim Ariño per acceptar-me en el seu grup, per guiar-me en la realització d'aquest treball, per la seva constància i dedicació, i per mostrar-me en tot moment la gran passió que sent pel món de la ciència i la investigació.

A la Dra. Anna Barceló perquè sense ella la realització d'aquesta tesi hagués estat molt més feixuga en tots els aspectes. Gràcies per acollir-me tant i tant bé en el laboratori de seqüenciació, per la teva ajuda incondicional, per ser tant positiva i trobar solucions a tots els problemes, gràcies per escoltar-me sempre que ho he necessitat i gràcies per implicar-te tant en aquest treball. Però el que em fa més feliç és l'amistat que ha sorgit entre nosaltres, gràcies per aguantar-me en els meus moments crítics.

Al laboratori del Dr. José Enrique Perez-Ortín (Universitat de València) i al laboratori del Dr. Javier Arroyo (Universitat Complutense de Madrid) perquè sense la seva col·laboració no hagués estat possible la realització d'aquesta tesi.

A tots els companys de laboratori que, encara que físicament hem estat una mica lluny, heu contribuït de manera molt important en la realització d'aquesta tesi. A l'Ivan pels cafès, converses compartides i sobretot per la teva amistat. A l'Amparo i a la Raquel per ajudar-me sempre que us ho he demanat i pels "bailoteos" que hem compartit, sou incansables?. A la Loli, la Maribel, la Maria, el Martí i

l'Asier per tots els moments que hem passat junts. Al Xavi que, per estar en el mateix laboratori, hem compartit moltes més coses i sobretot et vull donar les gràcies per acompanyar-me al metge quan estava realment fotuda, gràcies per la teva amistat i espero que segueixis tant autèntic com sempre. A l'Antonio que, tot i arribar en l'últim any de tesi, ha estat sempre disposat a ajudar-me i a compartir la seva gran ironia i els seus extensos coneixements. A l'Anna Vilalta i a la Maria Jesús per la seva gran dedicació, gràcies per fer més fàcil la realització d'aquest treball. A l'equip administratiu, la Rosa, la Sílvia i l'Ester per solucionar-ho tot el més ràpid possible. També vull donar les gràcies a aquells que ja han marxat com l'Ernesto per les bones converses compartides a l'hora del cafè i a aquells que van estar temporalment per aquí i que personalment m'hagués agradat que es quedessin com l'Anna Ferrer. Gràcies, de veritat.

A l'Irma, l'Ignasi, l'Eduard i el Dr. Isidre Gibert per acollir-me en el seu grup en els meus inicis en el món de l'investigació i per ensenyar-me l'A,B,C de la microbiologia i la biologia molecular. Especialment vull donar les gràcies a l'Irma i a l'Ignasi per recolzar-me en moments baixos i perquè sense ells probablement no hauria arribat a on estic ara.

També voldria donar les gràcies a la gran multitud de "Fátimos", a les "Bassoles" i "Bassols" i al Nestor per tots els moments i converses compartides. A la Mireia per portar aquest toc d'alegria cada cop que ve a fer-nos una visita al servei i per deleitar-nos amb els seus exquisits pastissos. A la Sara per tots els esmorzars compartits i per ajudar-me amb la correcció de la tesi i a la Carme pel "bon rotllo" que desprèn i ens contagia a tots. Al Jesús Giraldo, la Gemma Domenech, en Juan Serra i al Joan Antonio Lopez per l'anàlisi de les dades de microxips realitzat. Als meus amics informàtics (Carles, Joan, Jordi i Júlia) per solucionar-me totes les baralles, que no són poques, amb el món dels ordinadors. A la Maria per compartir tantes i tantes coses com dinars, cafès, converses intenses, festes i fins i tot pis!, però principalment per donar-me la seva amistat. Vull que sàpigues que aquí tens una amiga per sempre.

A les meves ex-companyes de carrera i gran amigues Arian i Noe que tot i que a vegades costa trobar el dia i l'hora per torbar-nos l'amistat que s'ha creat és per tota la vida. Als meus amics de tota la vida, la Mari, la Cris, l'Alba, la Nuri i la Roser per haver-me ajudat, animat i recolzat en tots els moments de la meua vida, i els que us queden per aguantar! Us dono mil gràcies, de tot cor.

A la meua família sobretot a la meua mare per haver-me animat sempre a tirar endavant i perquè segurament si no hagués estat per ella no hagués arribat fins aquí, ja ho saps, t'ho dec tot. Al meu pare per recolzar-me i ajudar-me sempre en totes les meves decisions, gràcies per estar sempre allà. A la meua estimadíssima germaneta per la gran estimació que ens tenim, ja saps que ho faria tot per tu. També vull donar les gràcies a la Pili, en Joan, en Josep M^a, l'àvia Pilar, en Jordi, la Conxita, la Glòria, la Sussanna, en Dani, l'avi Pepet, l'àvia Angeleta, en Joan, l'Angelina, en Jan, la Cristina i la Sònia per ser la millor família del món (i no és "peloteo!").

A en Dani per donar-m'ho tot, amor, comprensió, amistat i sobretot per la seva inacabable paciència. Em sembla que amb paraules és impossible agrair-te tot el recolzament que m'has donat al llarg d'aquests quatre anys. Gràcies al projecte comú que ens embarquem veig el futur amb gran esperança i il·lusió.

ABREVIACIONES

ATP: adenosin-5'-triphosphate

AA-dUTP: Amino Allyl deoxyuracil triphosphate

ANOVA: Analysis of Variance

BSA: Bovine Serum Albumine

CDRE: Calcineurin Dependent Responsive Element

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid

GST: Glutation-S-Transferase

HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etanosulfat

HOG: High osmolarity glicerol

LOWESS: Locally weighted scatter plot smooth

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MIAME: Minimum Information About a Microarray Experiment

MIPS: Munich Information Centre for Protein Sequences

ORF: Open Reading Frame

PCR: Polymerase Chain Reaction

PMT: Photo Multiplier Tube

RCN: Regulators of calcineurin

RT: Retrotranscription

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

SBF: Swi4-Swi6 Binding Factor

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SGD: Saccharomyces Genome Database

SSC: Sodium Saline Citrate

STRE: Stress Response Element

TAE: Tris-Acetate-EDTA

YPD: Yeast Peptone Dextrose

ÍNDEX

I. PRESENTACIÓ	1-2
II. INTRODUCCIÓ	3-42
1. INTRODUCCIÓ A LA TECNOLOGIA DE MICROXIPS DE DNA.	3
1.1. Disseny experimental.	7
1.2. Tipus de sonda.	11
1.3. Material de suport.	12
1.4. Fabricació del microxip.	12
1.5. Immobilització de les sondes.	13
1.6. Marcatge de les mostres.	14
1.7. Plataformes comercials	16
1.8. Detecció de la hibridació.	18
1.9. Anàlisi de les dades.	19
1.9.1. <i>Obtenció de les imatges</i>	20
1.9.2. <i>Pre-procès i normalització de les dades</i>	21
1.10. Estandarització de la informació generada.	24
1.11. Bases de dades de microxips.	24
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COM A MODEL GENÒMIC.	26
3. LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL A pH ALCALÍ EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	28
3.1.- Resposta a diferents tipus d'estrès en <i>S. cerevisiae</i>	28
3.1.1. <i>Resposta enfront a dany a la paret cel·lular</i>	29

3.1.2. <i>Resposta a elevades temperatures.</i>	29
3.1.3. <i>Resposta a estrès osmòtic.</i>	30
3.1.4. <i>Resposta a estrès oxidatiu.</i>	31
3.2. Resposta a estrès per pH alcalí.	31
3.2.1. <i>Estrès per pH alcalí en Aspergillus nidulans.</i>	32
3.2.2. <i>Estrès per pH alcalí en Candida albicans.</i>	34
3.2.3. <i>Estrès per pH alcalí en Saccharomyces cerevisiae.</i>	33
3.3. La via de la calcineurina com un possible mediador de la resposta transcripcional en condicions d'estrès per pH alcalí.	37
3.4. Dependència a calci de la resposta a pH alcalí.	42
III. OBJECTIUS	43
IV. MATERIALS I MÈTODES	44-61
1. SOQUES UTILITZADES I CONDICIONS DE CREIXEMENT.	44
2. FABRICACIÓ DE MICROXIPS DE DNA.	45
2.1. Generació de les sondes.	45
2.1.1. <i>Estratègia general.</i>	48
2.1.2. <i>Estratègia per a ORFs de longitud superior a 3Kb.</i>	48
2.1.3. <i>Estratègia per a ORFs inferiors a 3 Kb d'amplificació negativa i ORFs afegits no presents a la col·lecció inicial.</i>	49
2.1.4. <i>Comprovació i purificació de les amplificacions.</i>	49
2.2. Deposició del DNA sonda sobre porta-objectes modificats.	50
3. EXTRACCIÓ DEL RNA TOTAL.	52

3.1. Comprovació de la integritat del RNA utilitzant l'equip Bioanalyzer.	52
4. MARCATGE DE LES MOSTRES.	53
4.1. Marcatge directe.	53
4.2. Marcatge indirecte.	53
4.3. Comprovació del marcatge.	54
5. HIBRIDACIÓ.	54
5.1. Prehibridació.	54
5.2. Hibridació.	55
5.2.1. Hibridació mitjançant cassetes.	55
5.2.2. Hibridació utilitzant l'equip ArrayBooster.	56
5.3. Rentats.	56
6. DETECCIÓ DE LA HIBRIDACIÓ.	56
7. ANÀLISI DE LES DADES.	57
7.1. Anàlisi mitjançant els programes Cluster i TreeView.	58
7.2. Anàlisi mitjançant els programa GEPAS (CNIO).	59
7.3. Anàlisi dels promotors.	59
8. COMPROVACIÓ DELS RESULTATS PER ALTRES TÈCNiques.	60
8.1. Northern blot.	60
8.2. PCR quantitativa a temps real.	60
9. MICROSCOPIA DE FLUORESCÈNCIA.	61

V. RESULTATS I DISCUSSIÓ	62-113
1. AMPLIFICACIÓ D'APROXIMADAMENT 6000 GENS DE <i>S. cerevisiae</i> PER A LA CREACIÓ DE MICROXIPS QUE CONTINGUIN LA TOTALITAT DEL SEU GENOMA.	62
1.1. Generació de les sondes.	62
1.1.1. <i>Amplificació d'aproximadament 2000 ORFs de llevat en el nostre laboratori.</i>	63
1.1.2. <i>Amplificació de tot el genoma de llevat en col·laboració amb altres laboratoris.</i>	72
1.2. Posada a punt de la tecnologia de microxips de DNA.	73
2. ESTUDI DE LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL DE <i>S. cerevisiae</i> A pH ALCALÍ.	77
2.1. Disseny experimental utilitzat per realitzar els experiments amb microxips de DNA.	78
2.2. Anàlisi del conjunt de gens que presenten un augment dels nivells de mRNA com a resposta a l'exposició a pH alcalí.	79
2.2.1. <i>Anàlisi global.</i>	80
2.2.2. <i>Anàlisi de les principals categories funcionals afectades.</i>	85
2.2.3. <i>Comparació dels resultats obtinguts amb altres estudis.</i>	91
2.3. Anàlisi del conjunt de gens que presenten una disminució dels nivells de mRNA com a resposta a l'exposició a pH alcalí.	95
2.4. La via de la calcineurina com a possible mediador de la resposta transcripcional a pH alcalí.	98
2.5. Translocació del factor de transcripció Crz1 al nucli en condicions d'estrès per pH alcalí.	112

VI. CONCLUSIONS **114-115**

VII. BIBLIOGRAFIA **116-132**

ANNEXE:

ARTICLE 1:

A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses.

Alberola TM, Garcia-Martinez J, Antunez O, Viladevall L, Barcelo A, Arino J, Perez-Ortin JE. *International Microbiology*, 2004;7:199-206.

ARTICLE 2:

Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*.

Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barcelo A, Arino J. *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279:43614-24.

I. PRESENTACIÓ

La resposta enfront a situacions d'estrès és de gran importància en microorganismes, degut a que el seu entorn és molt variable, i diferents condicions com la temperatura, l'osmolaritat, el pH i la disponibilitat de nutrients presenten fluctuacions importants. *Saccharomyces cerevisiae* ha estat utilitzat com a punt de partida per estudiar la resposta de les cèl·lules eucariotes enfront a situacions d'estrès i determinar la funció específica del conjunt de proteïnes induïdes. A més, l'elevat grau de conservació en les vies de senyalització d'estrès entre el llevat i eucariotes superiors fa que el llevat sigui utilitzat com a sistema model per a la caracterització d'aquesta resposta en organismes més complexos.

Una situació d'estrès per a la cèl·lula genera una remodelació en l'expressió gènica. En el nostre grup estem interessats en l'estudi de la resposta transcripcional enfront a diversos tipus d'estrès en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* i vàrem pensar que seria molt interessant la utilització massiva de la tecnologia de microxips de DNA. Per aquest motiu ens vàrem plantejar una solució atrevida que consistia en amplificar els aproximadament 6000 ORFs del genoma sencer de *Saccharomyces cerevisiae* amb la col·laboració dels laboratoris dels Drs. José Enrique Perez-Ortín (Universitat de València) i Javier Arroyo (Universitat Complutense de Madrid) i fabricar nosaltres mateixos els microxips de DNA. Un primer ús d'aquests microxips, l'estudi de la resposta transcripcional de *S. cerevisiae* enfront a una situació d'estrès per pH alcalí, constitueix una part important del treball que es presenta a continuació.

Saccharomyces cerevisiae creix bé en un rang de pH relativament ampli, tot i que creix més ràpidament a pH àcid. Per tant, l'exposició a un pH lleugerament alcalí es pot considerar una situació d'estrès. En llevat, el pH extracel·lular actua sobre l'expressió de diferents bombes de ions i transportadors que promouen l'adaptació a canvis de pH. A més, el pH extracel·lular regula el creixement haploide invasiu i l' esporulació de manera que aquests estan inhibits en condicions de pH àcid i afavorits en condicions de pH alcalí. El pH extracel·lular és, per tant, una senyal ambiental clau que influeix en el creixement, fisiologia i diferenciació cel·lular.

Les respostes moleculars produïdes per variacions del pH extracel·lular han estat poc estudiades en *Saccharomyces cerevisiae* a diferència d'altres fongs com *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans* o *Yarrowia lipolytica*. Quan es va iniciar aquest treball de recerca el nombre de gens de *Saccharomyces cerevisiae* que es sabia que presentaven una resposta a pH alcalí era sorprenentment petit: *ENA1*, que codifica un ATPasa de sodi essencial per la destoxicació de sodi, *SHCI* i *SCY1* dels quals no es coneixia pràcticament res. Per aquest motiu en aquest treball s'han utilitzat microxips de DNA fabricats en el nostre laboratori amb l'objectiu de realitzar una millor caracterització de la resposta transcripcional enfront a una situació d'estrès com és la exposició a pH alcalí.

Recentment, s'ha observat en el nostre laboratori que la calcineurina podria estar involucrada en la tolerància enfront a pH alcalí. Es va demostrar que una part significativa de la resposta a pH alcalí del promotor *ENA1* i pràcticament la totalitat de la resposta de *PHO89* (codifica una permeasa Na^+/Pi) estava bloquejada per l'inhibidor de la calcineurina FK506 i també en absència de Cnb1 o Crz1 suggerint que la resposta transcripcional d'una sèrie de gens enfront a l'acalinització del medi podria ser, com a mínim en part, dependent de la calcineurina. El fet que dos dels quatre gens estudiats més exhaustivament presentessin dependència a calcineurina en la seva resposta enfront a pH alcalí ens va fer pensar que un nombre important de gens de llevat podrien respondre a pH alcalí a través de la via de senyalització de la calcineurina. En aquest treball confirmem i ampliem aquesta hipòtesis definint, mitjançant la tecnologia de microxips de DNA, un conjunt de gens la resposta transcripcional dels quals està regulada per la via de la calcineurina.

II. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ A LA TECNOLOGIA DE MICROXIPS DE DNA

La seqüenciació de centenars de genomes de diferents organismes ha suposat una gran revolució en el camp de la genòmica. La genòmica és la ciència que estudia els genomes en al seva totalitat, ja sigui des de un punt de vista estructural o funcional. Per tant, aquesta ciència es divideix en dos categories: la genòmica estructural i la funcional. La genòmica estructural és la branca orientada a la caracterització i localització de les seqüències que constitueixen el DNA corresponent als gens. En canvi, la genòmica funcional consisteix en el desenvolupament i aplicació de tècniques experimentals que avaluen la funció dels gens utilitzant la informació i els elements de la genòmica estructural. Aquestes tècniques es caracteritzen per la combinació de metodologies experimentals a gran escala acompanyades d'estudis computacionals dels resultats (Hieter and Boguski, 1997). L'objectiu de la genòmica funcional és omplir els forats existents entre el coneixement de les seqüències d'un gen i la seva funció, per així desvetllar el comportament dels sistemes biològics. Es tracta d'expandir la capacitat de la investigació biològica passant d'estudiar gens individualment a estudiar tots els gens d'una cèl·lula al mateix temps en un moment determinat.

La tecnologia de microxips de DNA és una de les eines més poderoses que disposa actualment la genòmica per tal d'obtenir informació sobre les funcions dels diferents gens, conèixer en quins processos participen, de quina manera estan regulats, la interacció amb altres productes gènics, com varien els nivells d'expressió entre diferents tipus cel·lulars i estadis, i com varia l'expressió gènica sota diferents condicions ambientals, entre d'altres (Shalon *et al.*, 1996; Lashkari *et al.*, 1997). Un microxip de DNA consisteix en un gran nombre de molècules de DNA ordenades sobre un suport sòlid (freqüentment porta-objectes de vidre o membranes de niló) de manera que formen una matriu ordenada de seqüències en dos dimensions. Aquests fragments de material genètic poden ser seqüències de poca longitud (oligonucleòtids) o, de major longitud com cDNA (DNA complementari sintetitzat a partir de mRNA), o bé productes de PCR (replicació *in vitro* de seqüències de DNA mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa). Aquests fragments de DNA immobilitzats en el suport s'anomenen sondes. Els àcids nucleics de les mostres a analitzar es marquen utilitzant diferents mètodes (fluorescents, radioactius, etc.), s'ajunten amb les sondes dipositades en el suport sòlid i s'incuben permetent la unió de seqüències homòlogues. Durant aquest procés, anomenat

hibridació, les mostres d'àcids nucleics marcades s'uniran a les seves complementaries immobilitzades en el suport del xip, permetent la identificació i quantificació de DNA present en la mostra. Finalment, la detecció de la senyal i els programes informàtics ens permeten analitzar i interpretar les dades obtingudes (**Figura 1**).

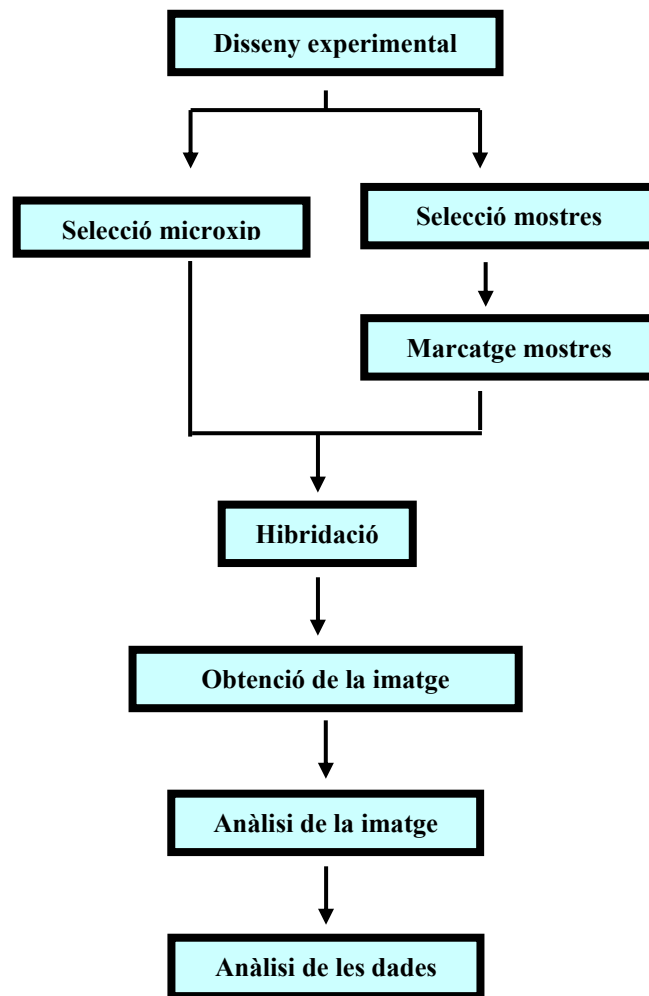


Figura 1. Esquema dels passos a seguir en la utilització de la tecnologia de microxips de DNA. Un experiment amb microxips de DNA comença amb un bon disseny experimental. Seguidament cal escollir el microxip més adient i obtenir mostres de qualitat. El següent pas és marcar les mostres i hibridar-les amb el microxip. Un cop les mostres s'han unit al DNA sonda es capta la imatge per obtenir un valor d'intensitat per a cadascuna de les senyals. Finalment, es procedeix a l'anàlisi de les dades obtingudes a través de diferents programes informàtics.

En funció del suport utilitzat i la densitat de les sondes existeixen dos tecnologies principals: els microxips (van Hal *et al.*, 2000; Schulze and Downward, 2001) i els macroxips de DNA (Hauser *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 1999; Alberola *et al.*, 2004). En la tecnologia de microxips de DNA la sonda es diposita sobre la superfície d'un porta-objectes de vidre modificat amb grups amina o aldehyd entre d'altres (Zammatteo *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Chiu *et al.*, 2003), mentre que les sondes dels macroxips són dipositades sobre superfícies poroses (membranes de niló) carregades positivament. Actualment, els suports més utilitzats són les superfícies no poroses, les quals permeten col·locar petites quantitats de DNA en un espai molt reduït sense que difongui per capilaritat a través de la membrana i, a més, el marcatge no és radioactiu sinó que s'utilitzen altres mètodes de marcatge basats en la fluorescència, quimioluminiscència, etc. Tot i això, els macroxips són més fàcils de fabricar i la seva utilització és més econòmica, per tant, ofereixen una alternativa interessant per molts laboratoris. En aquest treball hem utilitzat la tecnologia de microxips de DNA, de manera que ens centrarem en aquesta tècnica.

Hi ha dos tipus diferents de microxips: els microxips en els quals la sonda de DNA es diposita sobre una superfície de vidre, els pioners dels quals va ser el laboratori del Dr. Patrick Brown de la Universitat de Stanford (<http://brownlab.stanford.edu>), i els microxips d'oligonucleòtids sintetitzats "in situ" produïts inicialment per Affymetrix Inc. (www.affymetrix.com). El primer microxip creat en el laboratori del Dr. Patrick Brown es va crear amb 45 gens d'*Arabidopsis* (Schena *et al.*, 1995). A partir d'aquí la tècnica ha anat evolucionant ràpidament fins a obtenir microxips amb centenars o miler de gens. Actualment, molts laboratoris de tot el món utilitzen la tecnologia de microxips de DNA per un rang molt ampli d'aplicacions, però sobretot és molt útil en la comparació simultània dels nivells d'expressió de diferents mRNAs corresponents a milers de gens. En aquest treball ens centrarem, principalment, en la utilització de microxips de DNA per a l'estudi de l'expressió gènica diferencial (Schena *et al.*, 1995). La idea principal d'aquest tipus d'experiment és una hibridació competitiva entre una mostra marcada amb un fluorocrom (la cianina Cy3) i una altra mostra marcada amb un fluorocrom diferent (la cianina Cy5), (**figura 2**).

Per tal de dur a terme un experiment de microxips de DNA s'han de tenir en compte una sèrie de factors: disseny experimental, tipus de sonda (cDNA, oligonucleòtids...), marcatge de les mostres (fluorescent, radioactiu...), tipus de suport (vidre, membranes...), deposició de les mostres (impressió, síntesi "in situ"...), immobilització de les sondes (activa, passiva, covalent,...), detecció de la hibridació (tipus d'escàner), i processament de les dades (software).

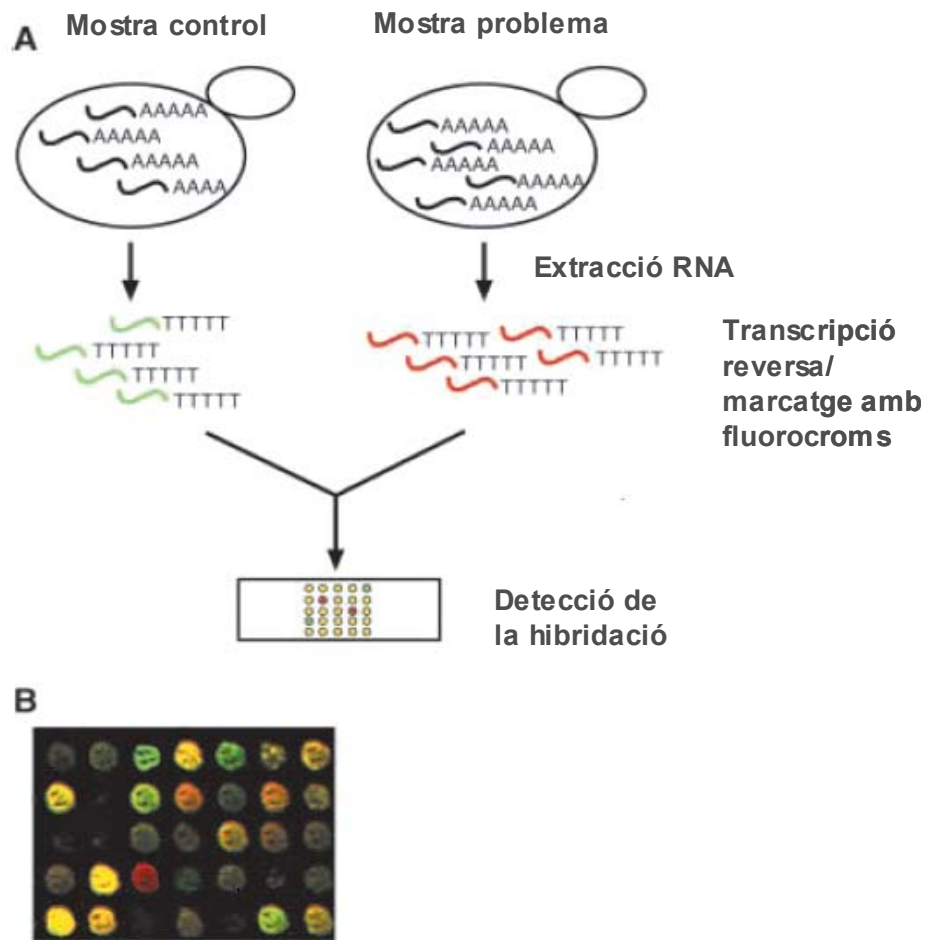


Figura 2. Representació gràfica de la tecnologia de microxips de DNA per a l'estudi de l'expressió gènica diferencial en llevat. Figura modificada de (Horak and Snyder, 2002). **A.** Esquema d'un experiment de microxips de DNA de llevat. **B.** Porció de la imatge obtinguda després de la hibridació d'un microxip de DNA de llevat.

1.1. Disseny experimental

Abans de començar un experiment de microxips és molt important decidir quin és el millor disseny per tal de que l'anàlisi de les dades sigui el més simple possible i que en puguem extreure el màxim d'informació amb el mínim cost segons l'objectiu proposat. Hem de tenir en compte que hi pot haver una limitació del nombre de xips, quantitat de RNA o altres consideracions econòmiques, de manera que cadascuna d'elles afectarà al disseny experimental.

- Tipus de rèpliques utilitzades per validar els resultats

Els resultats obtinguts amb un sol microxip són poc fiables, ja que aquest tipus d'experiments estan sotmesos a diversos tipus de variacions com la existent entre xips, posició de la sonda en el xip, mostres que provenen d'extraccions o d'individus diferents, persona que realitza l'experiment, etc. Per minimitzar totes aquestes variacions és necessari realitzar diversos replicats de l'experiment i així reduir el nombre de falsos positius i negatius (Lee *et al.*, 2000).

La possibilitat de realitzar comparacions directes entre dos mostres en el mateix microxip és una característica exclusiva del sistema basats en el marcatge diferencial. L'avantatge principal d'aquest sistema és que aparellant mostres eliminem les variacions degudes a diferències entre microxips. Tot i això, en la majoria de casos és impossible realitzar totes les combinacions possibles entre mostres, degut a l'elevat cost o a limitacions en la quantitat de mostra. Per tant, un pas important en el disseny d'un experiment és decidir el nombre de rèpliques que volem analitzar i com aquestes seran aparellades en el microxip (Yang and Speed, 2002). Quan parlem de rèpliques ens podem referir a:

- A) Gens dipositats més d'una vegada en el mateix xip.
- B) La hibridació de diferents xips amb la mateixa mostra.
- C) Utilitzar mostres independents (ex: provenen de diferents individus) per hibridar diferents xips.

En el cas de A i B parlem de rèpliques tècniques, mentre que en el tipus C parlem de rèpliques biològiques. Les rèpliques tècniques ens permeten obtenir una mesura més precisa dels valors d'expressió per a cadascun dels gens a partir d'una mostra concreta i elimina la majoria de variacions tècniques introduïdes durant l'experiment. Les rèpliques biològiques fan referència a l'anàlisi de diferents mostres biològiques estadísticament independents. Aquest tipus de rèpliques són particularment importants per obtenir patrons d'expressió representatius de una població davant una condició determinada.

- Reunió de diferents mostres biològiques (*pooling*)

En alguns casos, principalment quan la quantitat de RNA obtinguda és insuficient o per reduir el nombre de xips amb l'objectiu d'abaratir el cost final, s'ajunten diferents mostres de RNA que corresponen a una mateixa condició experimental (*pooling*). Al fer *pools* es disminueix la variabilitat biològica però es perd la possibilitat de mesurar quina és aquesta variació, de manera que si aquesta és molt gran el valor mitjà obtingut no serà representatiu. A més, el disseny basat en *pools* no garanteix necessàriament una reducció del cost (Shih *et al.*, 2004). Una alternativa als *pools*, quan no es té suficient quantitat de mostra, seria realitzar amplificacions lineals d'aquest RNA (Pabon *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2004).

- Marcatge recíproc (*Dye-swap*)

Una manera simple i efectiva per comparar directament dues mostres és realitzar el marcatge recíproc per així minimitzar els efectes deguts a la incorporació diferencial entre fluorocroms (Kerr and Churchill, 2001) (**figura 3 A**). Aquest tipus de disseny utilitza dos microxips per comparar dues mostres. En un microxip, la mostra control es marca amb el fluorocrom 1 (ex: verd), i la mostra problema el fluorocrom 2 (ex: vermell). En canvi, en l'altra microxip s'inverteixen els fluorocroms en cadascuna de les mostres. Aquest tipus de disseny es pot repetir diverses vegades per comparar les mateixes mostres. La repetició del marcatge recíproc entre dues mostres és útil per reduir les variacions tècniques, però no s'ha de confondre amb les rèpliques del marcatge recíproc en les quals es comparen mostres biològiques independents (**figura 3 B**). En aquest últim disseny es té en compte tant les variacions tècniques com les

biològiques, això fa que pugui resultar més difícil d'obtenir resultats estadísticament significatius, sobretot quan la variació biològica és gran. Tot i això és necessari realitzar rèpliques biològiques, ja que, en la majoria d'estudis es volen obtenir resultats representatius de la població que estàs estudiant (Churchill, 2002).

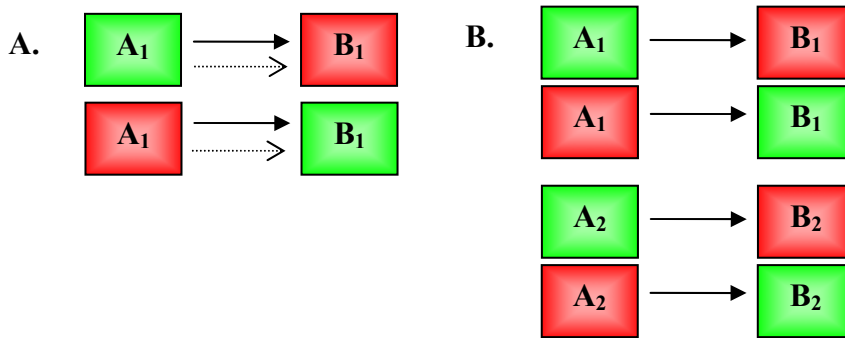


Figura 3. Dissenys experimentals per la comparació directe de dues mostres. Els quadrats representen mostres de mRNA, les quals estan marcades amb dues lletres, A o B indicant que són condicions diferents. Els quadrats de color verd significa que la mostra està marcada amb el fluorocrom Cy3, mentre que els vermells amb Cy5. Els subíndexs indiquen el nombre de rèpliques biològiques independents per un mateix tractament. Les fletxes representen les hibridacions entre mostres de mRNA i el microxip, les fletxes discontinues representen la repetició del mateix experiment. Aquest esquema mostra: **(A)** un marcatge recíproc i una repetició del marcatge recíproc (línies discontinues) i **(B)** una rèplica biològica del marcatge recíproc.

Un dels dissenys experimentals més utilitzats, degut a que el seu anàlisi i interpretació dels resultats és relativament fàcil, és el basat en comparacions directes entre una mostra que es pren com a referència (ex: mostra no tractada, soca salvatge, etc.) i altres mostres diferents (ex: sotmeses a diferents tractaments, presenten diferents mutacions, sotmeses al mateix tractament però en temps diferents, etc.). En aquest tipus de disseny també és necessari realitzar el marcatge recíproc per tal de minimitzar els efectes deguts a la incorporació diferencial entre fluorocroms (**figura 4**).

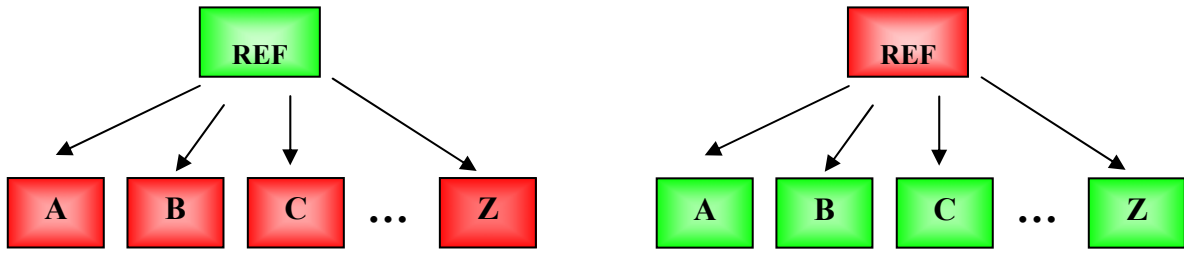


Figura 4. Disseny experimental prenent una mostra de RNA com a referència (REF). Els quadrats representen les mostres de RNA, i les fletxes representen microxips. Els quadrats de color verd significa que la mostra està marcada amb el fluorocrom Cy3, mentre que els vermells estan marcats amb Cy5. A, B, C...Z indiquen les diferents condicions que volem estudiar.

- Disseny multifactorial

Una alternativa més complexa al disseny que pren una mostra com a referència és el disseny multifactorial basat en la comparació d'una mostra amb una altra creant unions en forma de cadena (*loops*) (Yang and Speed, 2002), veure **figura 5 A**. Es poden arribar a crear dissenys més complexes combinant dos o més *loops* (**figura 5 B**). La dificultat que presenta el disseny en *loops* és que els valors d'expressió relativa no són sempre evidents, i això fa que siguin necessaris programes informàtics capaços d'analitzar aquests tipus de disseny, sobretot en aquells dissenys que integren diversos *loops*. En realitat són sistemes poc utilitzats degut a la dificultat de interpretació dels resultats.

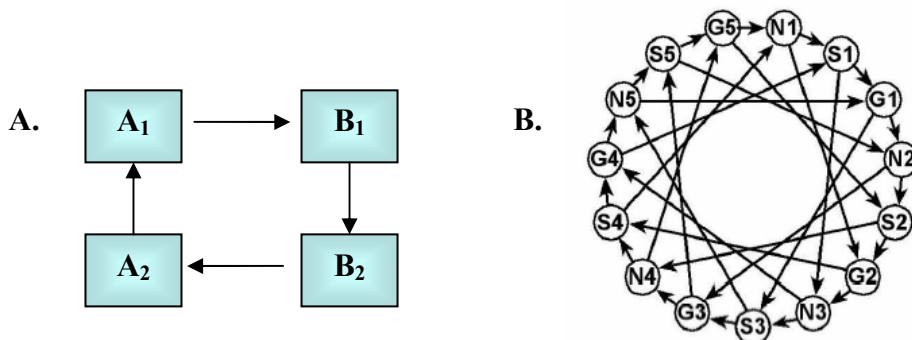


Figura 5. Dissenys experimentals basats en *loops*. Els quadrats representen les mostres de RNA, i les fletxes representen microxip. **A.** disseny basat amb un *loop* simple. **B.** Disseny basat amb diversos *loops*. Figura modificada de Churchill, 2002.

Resumint, hi ha tres punts claus a tenir en compte a l'hora de dissenyar un experiment amb microxips de DNA:

- A part de les rèpliques tècniques és necessari generar rèpliques biològiques independents.
- Realitzar comparacions directes entre les mostres la comparació de les quals sigui de major interès i utilitzar els camins més curts per unir les diferents mostres que vulguem comparar.
- Utilitzar el marcatge recíproc o el disseny amb *loops* per equilibrar els diferents fluorocroms i mostres.
- Tenir present en tot moment l'objectiu del nostre estudi. Els experiments generats per respondre una qüestió en particular solen presentar dissenys més simples i més fàcils d'interpretar.

1.2. Tipus de sonda

Físicament les sondes tenen dues formes diferents: DNA bicatenari corresponent a fragments de DNA de longitud variable, o oligonucleòtids, que poden ser sintetitzats *in situ* o *in vitro* i després units al suport.

L'obtenció de sondes de DNA bicatenari es du a terme per PCR utilitzant oligonucleòtids específics a partir de DNA genòmic, o bé amplificant amb oligonucleòtids universals a partir de biblioteques de cDNA. La longitud d'aquestes sondes pot ser de centenars de parells de bases fins a varies quilobases.

Les sondes corresponents a oligonucleòtids es diferencien de les anteriors en què el nombre de parells de bases és més limitat, de 20 a 70 parells de bases. Algunes empreses com Incyte (<http://www.incyte.com>), Operon (<http://www.operon.com>) i MWG Biotech (<http://www.mwgbio.com>) proporcionen oligonucleòtids de col·leccions ja definides pel fabricant, o bé, dissenyen oligonucleòtids de manera específica a petició del client. En el cas d'utilitzar oligonucleòtids de longitud curta aquests presenten una modificació en l'extrem per tal de facilitar la seva unió a la superfície del porta-objectes modificat (per més informació veure l'apartat 1.5).

1.3. Material de suport

Tradicionalment el substrats sòlids dels xips es divideixen en porosos i no porosos. El suports més utilitzats en els xips porosos són membranes de niló carregades positivament, és el que anomenem macroxip. Mentre que, en els suports dels xips no porosos, el material es troba immobilitzat sobre una superfície que sol ser de vidre.

Tal i com hem comentat anteriorment, tot i que les membranes de niló segueixen utilitzant-se actualment, han estat substituïdes en la majoria dels casos per alternatives que permeten una major resolució dels punts, a més de la utilització de la fluorescència com a mètode de detecció. Tot i això, alguns xips utilitzen membranes o superfícies poroses que recobreixen la superfície d'un vidre, millorant la resolució dels punts.

1.4. Fabricació del microxip

Les tecnologies de col·locació de les sondes sobre el xip més utilitzades són les següents: fotolitografia, microinjecció, “microspotting” i formes combinades d'aquestes.

La fotolitografia utilitza la tecnologia de fabricació de semiconductors per fabricar un microxip sintetitzant els DNAs sonda directament sobre el suport sòlid. Cada pas de síntesi consisteix en l'addició d'un nucleòtid derivatitzat en cadascuna dels milers de cadenes en creixement sobre la superfície del xip. En la fabricació s'utilitzen fotomàscars que dirigeixen la síntesi de DNA sobre el suport sòlid, en concret s'utilitzen els fotons com activadors de versions modificades dels quatre dNTPs utilitzats per la síntesi del DNA. La longitud dels oligonucleòtids sintetitzats sobre un xip sol ser d'uns 20-25 bases (Fodor *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1997; Singh-Gasson *et al.*, 1999).

La microinjecció es basa en la tecnologia piezoelèctrica per col·locar sobre la superfície del microxip quantitats per sota del nanolitre de solució de DNA sense que l'agulla d'injecció arribi a tocar físicament el suport (Fodor *et al.*, 1991; Chee *et al.*, 1996; Hsieh *et al.*, 2004).

El “microspotting” utilitza agulles, capil·lars o micropinces per col·locar les sondes sobre la superfície del microxip per contacte físic directe. El DNA sonda es prepara en microplaques i a través de les agulles és transportat i dipositat sobre el suport sòlid per un robot (Schena *et al.*, 1995; Venkatasubbarao, 2004).

Aquestes tècniques permeten la fabricació de microxips utilitzables en les principals aplicacions en genòmica funcional: detecció de mutacions i estudis d'expressió gènica i permeten un grau de miniaturització suficient per poder representar el genoma humà complert en un sol microxip. Per tant, les tres són vàlides, però existeixen criteris que poden fer inclinar cap a una de les tècniques. Aquests factors són: cost, densitat de les sondes, control de qualitat, flexibilitat d'ús, rapidesa de fabricació i facilitat d'introduir canvis (Schena *et al.*, 1998).

1.5. Immobilització de les sondes

El suport més utilitzat per immobilitzar les sondes és un porta-objecte de vidre modificat (Cheung *et al.*, 1999). La preparació de suports de vidre implica un tractament previ amb grups reactius com ara grups amino o aldehyd, de manera que formin una capa uniforme per evitar unions no específiques de les sondes sobre el suport.

En alguns casos les unions generades entre el DNA i el suport sòlid no són covalents, com ara les interaccions hidrofòbiques (Allemand *et al.*, 1997). En aquests casos el DNA és susceptible a desunir-se de la superfície en condicions d'elevada temperatura o concentracions altes de sals, per aquest motiu és convenient que es transformin en unions covalents. El mètode més utilitzat per generar unions covalents és la irradiació amb llum ultraviolada, la qual forma enllaços entre els residus de timina del DNA i els grups amino de càrrega positiva presents en la superfície sòlida. Tot i això, aquest mètode presenta un petit inconvenient degut a que el nombre de llocs d'unió pot variar per cadascun dels DNAs fixat de manera que les seqüències disponibles per a la posterior hibridació siguin variables. Per aquest motiu s'han creat mètodes alternatius que es basen en la fixació de molècules de DNA en els seus extrems com ara els DNAs carboxilats (Joos *et al.*, 1997) o fosforilats (Rasmussen *et al.*, 1991) que es poden unir

als grups amina dels suports, o bé oligonucleòtids amb grups amino-terminals que es poden unir a diferents tipus de grups reactius presents en el suport (Guo *et al.*, 1994; Lamture *et al.*, 1994; Schena *et al.*, 1996).

Per tant, el mètode emprat per immobilitzar les sondes sobre la superfície del microxip dependrà del tipus de suport utilitzat, el tipus de sondes i de l'aplicació final que li vulguem donar.

1.6. Marcatge de les mostres

Els mètodes més utilitzats pel marcatge de les mostres són els químics o enzimàtics emprant-se majoritàriament el marcatge amb fluorescència a través de diferents fluorocroms (veure **taula 1**). Aquests fluorocroms presenten un rang estret d'emissió i els més utilitzats són les cianines Cy3 i Cy5 (**figura 6**).

Taula1. Diferents fluorocroms utilitzats en el marcatge de les mostres. S'indica el pic d'excitació i d'emissió per a cadascun dels fluorocroms.

Nom	Pic d'excitació (nm)	Pic d'emissió (nm)
Alexa 532	543	570
TAMRA	543	570
Cy3	543	570
Alexa 546	543	570
TMR	543	570
Alexa 568	543	578
BODIPY 630-650	633	660
Cy5	633	670

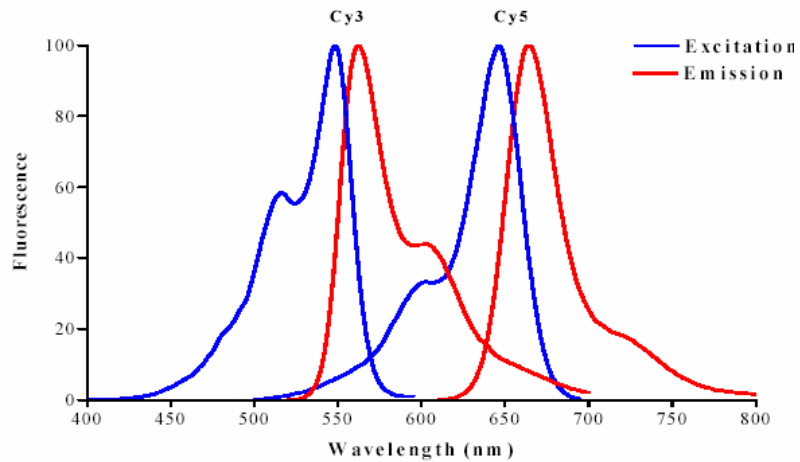


Figura 6. Representació gràfica dels espectres d'excitació i d'emissió dels fluorocroms Cy3 i Cy5. Figura modificada a partir dels protocols d'Amersham Biosciences.

La utilització de fluorocroms permet analitzar varies mostres en el mateix xip, eliminant la variabilitat que es produeix quan es comparen resultats que són producte de la hibridació en xips diferents, a més de la possibilitat de detectar la senyal de múltiples mostres simultàniament; però té l'inconvenient que el patró d'incorporació dels dos fluorocroms no és uniforme i, per aquest motiu, es fa necessari per la validació de resultats fer el marcatge recíproc de cadascun dels experiments.

Fonamentalment existeixen dos tipus de marcatges fluorescents diferents: el marcatge directe i el marcatge indirecte. En el primer, el marcatge de les mostres té lloc per una incorporació directa dels nucleòtids fluorescents (CyDye-dCTP o CyDye-dUTP) durant la reacció de transcripció reversa (RT). En el marcatge indirecte primer s'incorporen nucleòtids modificats amb un grup amino al·lil (AA-dUTP) durant la síntesi del cDNA i després s'incorpora un derivat N-hidroxisuccinimida (NHS) del fluorocrom per reacció química (**figura 7**).

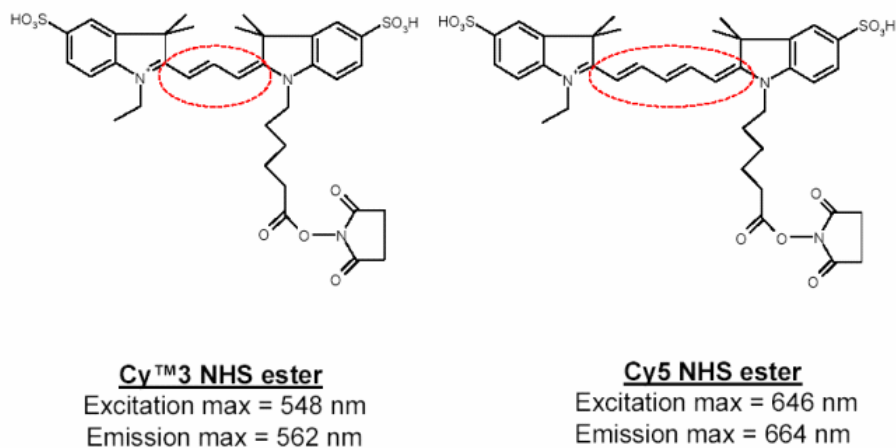


Figura 7. Estructura dels derivats de les cianines N-hidroxisuccinimida dels fluorocroms Cy3 i Cy5. Figura modificada a partir dels protocols d'Amersham Biosciences. Es marca la part de la molècula que dóna lloc a la fluorescència.

Existeixen altres tipus de marcatge no basats en la fluorescència com la utilització de sondes de DNA marcades amb biotina i detectades a través de conjugats enzimàtics de avidina o mètodes basats en la quimioluminiscència entre d'altres (Roda *et al.*, 2004; Bourget *et al.*, 2005).

1.7. Plataformes comercials

En els últims anys els microxips comercials d'oligonucleòtids fabricats per Affymetrix, han esdevingut els més utilitzats per la comunitat científica per tal d'estudiar l'expressió gènica. Més recentment, Agilent, Amersham Biosciences i Applied Biosystems han comercialitzat noves plataformes les quals també estan basades en oligonucleòtids. Totes aquestes plataformes presenten una elevada qualitat, bona resolució i ens permeten obtenir informació gènica avançada en el camp dels microxips. Degut a que aquestes tecnologies acabaran essent estàndards en la recerca és important conèixer-les:

- Affymetrix (GeneChip®)



El sistema per fabricar xips d’Affymetrix consisteix en sintetitzar directament sobre el suport sòlid oligonucleòtids de 25 parells de bases. Aquests xips poden contenir més de 1.000.000 d’oligonucleòtids diferents de manera que presenten densitats extremadament elevades. Les sondes són dissenyades amb l’objectiu d’obtenir la màxima sensibilitat, especificitat i reproductibilitat, permetent una discriminació clara entre senyals específiques i el fons, i entre seqüències diana similars. En cada xip s’hibrida una única mostra marcada amb biotina i detectada a través de conjugats enzimàtics d’avidina. El sistema d’Affymetrix, a més del xip, també ofereix una estació de hibridació, una estació de rentat, un escàner, i tots els softwares d’anàlisi necessaris. El fet de ser un sistema que presenta tots els components necessaris per dur a terme la totalitat del procés pot representar una avantatge per comparar dades obtingudes emprant la mateixa plataforma, ja que les variacions observades només poden ser degudes a la mostra. D’altra banda aquest fet pot representar un inconvenient degut a que el fa un sistema poc flexible que depèn dels xips generats per la casa comercial (<http://www.affymetrix.com>).

- Agilent Technologies (Agilent SurePrint)



Agilent Technologies fabrica microxips d’oligonucleòtids de 60 bases. Utilitzant la tecnologia de la microinjecció es dipositen els monòmers d’oligonucleòtids sense que al injectar arribi a entrar en contacte amb el suport, permetent una síntesi més ràpida dels oligonucleòtids i una uniformitat més elevada entre gotes. Es dipositen volums extremadament petits (picolitres), i aquests s’uneixen al suport través d’una reacció química. Utilitzant la tecnologia d’Agilent Technologies es poden imprimir més de 22.000 oligonucleòtids per xip. El sistema de marcatge utilitzat en aquest sistema es basa en la fluorescència i consisteix en marcar dues mostres que es volen comparar amb fluorocroms diferents i hibridar-les en un mateix xip (<http://www.agilent.com>).

- Amersham Biosciences (CodeLink™)



La plataforma CodeLink ofereix microxips d'elevada densitat. Consisteix en oligonucleòtids de 30 b els quals són sintetitzats per microinjecció en una matriu tridimensional formada per un gel especial. La unió entre les sondes i la matriu es du a terme a través d'una interacció covalent entre el grup amino modificat present en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid i el grup funcional activat de la matriu. La matriu tridimensional dóna un ambient aquós, permetent una màxima interacció entre la sonda i la diana. Aquesta plataforma tridimensional permet augmentar la sensibilitat fins al punt de ser capaç de detectar un transcrit per cèl·lula, i un valor relatiu d'expressió de 1,3 amb un grau de confiança del 95 %. Aquests xips s'hibriden amb dues mostres marcades de manera diferencial utilitzant fluorocroms (<http://www.amersham.com>).

- Applied Biosystems (Expression array system)



El sistema de Applied Biosystems es basa en la quimioluminiscència i utilitza sondes d'oligos de 60 bases. Applied Biosystems també ofereix l'analitzador de quimioluminiscència, els reactius necessaris i el software d'anàlisi. Aquesta tecnologia presenta una sensibilitat i especificitat majors respecte a altres plataformes comercials, requereix menys quantitat de material de partida i és un sistema tancat. La principal limitació d'aquest sistema és que, actualment, només disposen de xips que cobreixen el genoma de ratolí, rata i d'humà (<http://appliedbiosystems.com>).

1.8. Detecció de la hibridació

El sistema de detecció de la hibridació dependrà del tipus de marcatge emprat. Com hem dit anteriorment, el sistema de marcatge més utilitzat és el fluorescent, per tant, en aquest apartat farem referència a la detecció de la fluorescència.

El resultat de la hibridació de mostres marcades amb fluorocroms és detectat per un escàner de fluorescència. La detecció es du a terme a través d'escàners confocals o bé per cameras CCD (charge-coupled device). L'escàner confocal utilitza l'excitació del làser en una regió petita del suport de vidre ($\sim 100 \mu\text{m}^2$), de manera que la totalitat de la

imatge es genera movent el substrat i/o les lents confocals en dues dimensions. La llum emesa per les mostres marcades amb fluorescència del microxip és separada de la llum no desitjada a través d'una sèrie de lents, filtres i miralls, i la llum és convertida en una senyal elèctrica a través d'un fotomultiplicador (PMT). L'escàner confocal només captura la senyal procedent del pla confocal i impedeix que entri la llum d'altres plans situats per sobre o per sota d'aquest. Té l'avantatge que disminueix el soroll de fons i per tant, dóna una relació senyal/fons molt alta. La velocitat d'obtenció de la imatge d'un escàner confocal és molt més ràpida (1-5 min) que l'autoradiografia amb pantalles activables utilitzades en marcatges radioactius (1 a 10 dies).

L'obtenció de la imatge a través d'una camera CCD utilitza molts dels principis de l'escàner confocal, tot i que una sèrie de detalls claus en l'excitació i la detecció són diferents. Una diferència és que l'excitació i la detecció té lloc en una àrea relativament gran (1cm^2) de manera simultània, fet que aporta l'avantatge de no requerir un sistema de moviment i redueix el cost i simplifica el disseny de l'instrument. Una altra diferència consisteix en què la detecció basada en cameras CCD utilitzen fonts d'emissió de longitud d'ona única, de manera que no es necessiten múltiples làsers. Per altra banda, aquest sistema presenta una desavantatge important respecte la utilització de l'escàner confocal ja que és menys sensible i, per tant, la intensitat de senyal obtinguda és menor.

El sistema de detecció converteix l'emissió fluorescent del microxip en una imatge digital (per exemple TIFF de 16 bits) que serà quantificada i analitzada. La quantificació es du a terme per cadascuna de les imatges dels diferents fluorocroms i es dóna un valor per cadascun dels elements del microxip a través d'un software específic. Els valors d'intensitat es poden convertir en dades biològicament rellevants comparant els elements control i problema. Si el mRNA d'un gen en particular predomina en una de les dos mostres, més quantitat del cDNA corresponent hibridarà amb la microgota que representi aquest gen i, per tant, l'emissió del fluorocrom amb el qual ha estat marcat predominarà.

1.9. Anàlisi de les dades

En els últims anys la tecnologia de microxips de DNA ha esdevingut una eina fonamental en els laboratoris de recerca genòmica, ja que ens permet estudiar milers de gens alhora. Aquest fet comporta l'obtenció d'una enorme quantitat de dades de manera que el seu anàlisi és molt complexe. Per obtenir unes dades fiables s'han de tenir en compte una sèrie de passos:

1.9.1. Obtenció de les imatges

El primer pas de l'anàlisi de les dades és la captació de la imatge i la extracció dels valors d'intensitat. Hi ha quatre passos bàsics: captació de la imatge, reconeixement de les gotes, segmentació i extracció de les intensitats i càlcul dels valors relatius (Leung and Cavalieri, 2003).

- **Detecció de la senyal**

L'adquisició de la imatge és un pas molt important en l'anàlisi de les dades, ja que els arxius d'imatge obtinguts són les dades sense processar que utilitzarem en anàlisis posteriors. Un cop hem obtingut la imatge, totes les dades, de qualitat alta o baixa, queden fixades. Una imatge de baixa qualitat requereix més manipulacions, les quals conduiran a una disminució de la qualitat de l'anàlisi. Existeixen dos requisits per obtenir imatges d'elevada qualitat. Primer, ens hem d'assegurar que les imatges no estiguin afectades per contaminacions (ex: pols o brutícia), i que presentin gotes consistents amb senyals elevades respecte el soroll de fons. Segon, la potència de làser i el PMT (tub fotomultiplicador) s'han d'ajustar durant el procés de captació de la imatge per tal d'igualar les intensitats dels dos canals (ex: Cy3 i Cy5) el màxim possible.

Per obtenir una bona imatge també s'ha de tenir en compte que el nombre de senyals que presenta una saturació de píxels ha de ser mínima per tal de maximitzar el rang dinàmic utilitzat per l'escàner.

- Reconeixement de les senyals

El reconeixement de cadascuna de les senyals no representa cap problema per a la majoria de software d'anàlisi, tot i que sovint és necessari ajustar algun punt manualment. A la pràctica molts científics prefereixen inspeccionar les imatges visualment per ajustar les matrius i marcar aquelles senyals de baixa qualitat enlloc de confiar plenament en el reconeixement realitzat pel software.

- Segmentació

La segmentació és un procés que consisteix en separar els pixels corresponents a la senyal d'aquells que pertanyen al soroll de fons. Existeixen diferents algoritmes per la segmentació i la determinació del soroll de fons els quals van associats a diferents software d'anàlisi (Yang *et al.*, 2001). Aquest pas pot representar un problema quan les imatges són de baixa qualitat, ja que la morfologia de les gotes és molt variable i el soroll de fons pot ser molt elevat i, en aquest cas, les senyals corresponents a les gotes i les del soroll de fons podrien estar estimades erròniament. Tot i que els algoritmes poden millorar és crucial obtenir imatges d'elevada qualitat per aconseguir resultats fiables.

- Extracció de les intensitats i càlcul dels valors relatius

Seguidament del procés de segmentació, les intensitats de les senyals i del soroll de fons són extretes de manera separada. Extraient el soroll de fons de les senyals reals s'obté un valor d'intensitat per cadascuna de les gotes calculant la relació entre els dos canals.

1.9.2. Pre-procès i normalització de les dades

Les dades extretes a partir de les imatges han de ser pre-processades per extreure les senyals de baixa qualitat i normalitzades per eliminar el màxim d'errors sistemàtics possibles abans de continuar amb l'anàlisi. A més, els valors d'intensitat han de ser transformats logarítmicament. El més utilitzat és el logaritme en base 2, de manera que

els gens induïts i reprimits estiguin a la mateixa escala i es puguin comparar (Quackenbush, 2002).

L'objectiu del procés de normalització és eliminar els errors sistemàtics igualant les intensitats de fluorescència dels dos canals. Existeixen diferents tipus de normalització com la normalització a partir del total d'intensitat utilitzant tots els gens presents en el xip, la normalització a partir de gens que presenten una expressió constant, o bé la normalització a partir de controls interns en la qual s'utilitzen una sèrie de gens exògens que s'afegeixen durant la hibridació (<http://www.dnachip.org/mged/normalization.html>). Desafortunadament aquests mètodes de normalització no són suficients ja que la incorporació entre diferents fluorocroms no és exactament la mateixa (Ideker *et al.*, 2000; Kerr *et al.*, 2000; Goryachev *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001) i els gens d'expressió constitutiva no s'expressen de manera tant constant com assumim (Lee *et al.*, 2002). La solució a aquest gran problema és realitzar cadascun dels experiments varies vegades intercanviant els fluorocroms (Dobbin *et al.*, 2003).

S'ha demostrat que els valors transformats a logaritme en base 2 poden presentar una dependència sistemàtica pel que fa a la intensitat, la qual apareix com una desviació del zero per aquelles senyals de intensitat baixa (**figura 8 A**). Per aquest motiu s'ha proposat un mètode de normalització que pot eliminar aquesta dependència anomenat LOWESS (Locally weighted scatterplot smoothing) (Cleveland, 1979), veure **figura 8 B**). La majoria de normalitzacions, incloent el LOWESS, es poden aplicar globalment (a tot el conjunt de dades) o localment (a un subgrup de dades). La normalització local té l'avantatge que pot ajudar a corregir errors sistemàtics de localització en el xip, com ara diferències entre les agulles utilitzades per fabricar el xip, variabilitat en la superfície del porta-objectes, i diferències locals pel que fa a les condicions d'hibridació.

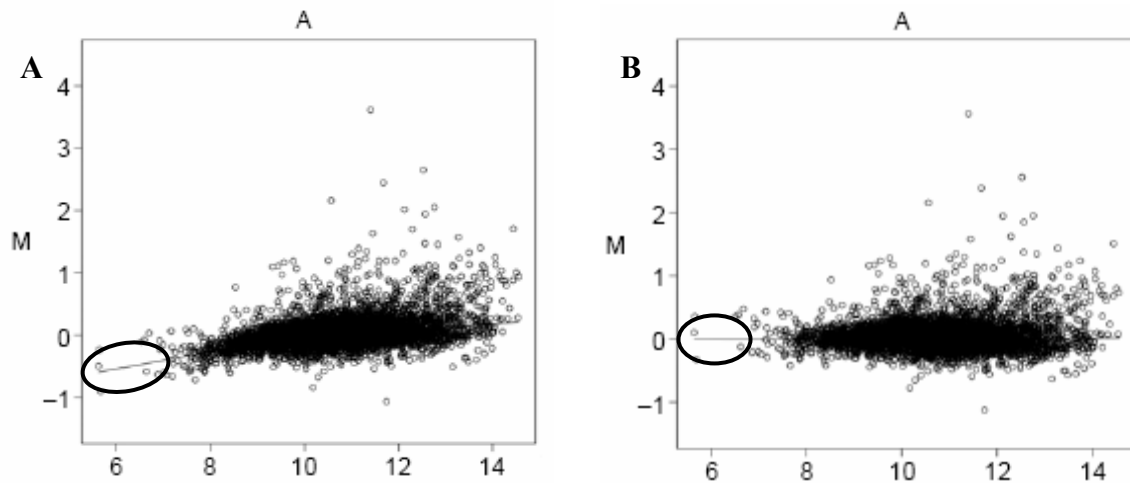


Figura 8. Comparació entre dos mètodes diferents de normalització. En aquests gràfics (MA-plots) hi ha representat el \log_2 del quocient de les intensitats (M) respecte el \log_2 del la mitjana de les intensitats. **A.** Normalització a partir de la mediana. **B.** Normalització a través del LOWESS. Els cercles ens mostren com en la figura A els valors d'intensitat baixa presenten una desviació respecte al zero, la qual es veu corregida en la figura B.

El següent pas per analitzar les dades consisteix en aplicar diferents mètodes estadístics. Tradicionalment, es considera que un gen té una expressió diferencial quan presenta un variació en la seva expressió superior o inferior a un factor de 2, és a dir, valors iguals o superiors a 2 en el cas d'inducció gènica i valors iguals o inferiors a 0,5 en el cas de repressió. La utilització de un valor llindar fix és estadísticament arbitrari, ja que en un experiment hi han moltes variacions que el poden afectar (Pritchard *et al.*, 2001; Novak *et al.*, 2002). S'ha suggerit que cada experiment de microxips s'hauria de fer per triplicat per incrementar la fiabilitat dels resultats (Lee *et al.*, 2000). Tal i com hem comentat anteriorment, el fet d'obtenir mesures precises d'expressió a partir d'una mostra determinada (rèpliques tècniques) no ens resol el problema de la variació biològica. Per tant, és preferible tenir rèpliques biològiques que no pas rèpliques tècniques (Yang and Speed, 2002; Simon and Dobbin, 2003). Per comparar els valors obtinguts en les diferents rèpliques s'utilitzen tests estadístics com la t de Student amb les seves variants i l'ANOVA entre d'altres (Cui and Churchill, 2003).

Les dades estadísticament significatives poden ser analitzades a través d'altres sistemes d'anàlisi que ens permeten obtenir una perspectiva més general dels resultats obtinguts (Quackenbush, 2001; Sherlock, 2001; Valafar, 2002). Aquests mètodes actuen agrupant gens o experiments en funció de diferents patrons (*clustering*). Si un conjunt

de gens estan assignats dins un mateix grup del *cluster* podrien estar co-regulats o involucrats en una mateixa via de senyalització.

Tot i haver-se creat diferents sistemes d'anàlisi d'aquesta enorme quantitat de dades obtingudes, els resultats biològicament més rellevants és convenient que siguin validats per RT-PCR o per Northern blot (Chuaqui *et al.*, 2002).

1.10. Estandardització de la informació generada

Degut a l'existència de diferents protocols i diferents mètodes d'anàlisi de les dades ha estat necessari la creació d'un estàndard per tal de validar els resultats obtinguts (Perou, 2001). Davant d'aquest problema l'organització internacional MGED (Microarray Gene Expression Data) ha proposat un estàndard anomenat MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment). MIAME representa la informació mínima necessària per tal de poder replicar l'experiment amb èxit, verificar la validesa dels resultats, i facilitar la comparació de les dades obtingudes amb experiments similars (Brazma *et al.*, 2001). Actualment la informació mínima inclou sis parts: disseny experimental, disseny del microxip, mostres, hibridació, dades no processades i controls de normalització. Una descripció més detallada de cadascuna de les parts la podem trobar a la pàgina web del MIAME (<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>).

1.11. Bases de dades de microxips

Una de les grans conseqüències que ha tingut l'enorme capacitat de generar dades utilitzant la tecnologia de microxips ha estat el desenvolupament de grans bases de dades d'expressió gènica les quals poden ser privades (per exemple Gene Express de Gene Logic que és una base de dades generada utilitzant els GeneChips de Affymetrix), o bé públiques com per exemple, ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) del European Bioinformatics Institute (EBI), el Center for Information Biology Gene Expression database (CIBEX) i el Gene Expression Omnibus (GEO, <http://ncbi.nlm.nih.gov/geo>) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) en el National Institutes of Health (Stoeckert *et al.*, 2002). Dipositar les dades en aquestes bases és una condició per poder publicar en moltes revistes científiques. Els

projectes de creació de bases de dades públiques estan necessàriament lligats als processos d'estandardització del treball amb microxips. En aquest sentit és molt important l'estandardització dels controls interns utilitzats en els experiments, els formats en què són presentades les imatges per ser emmagatzemades i l'anotació de l'informació del material dipositat en cada punt del xip.

Per tal que les dades dipositades tinguin sentit, la informació dels experiments ha de contenir: quins transcrits estan representats en el xip (en quina posició i la seva seqüència), els detalls de les mostres utilitzades i els tractaments i la informació sobre altres factors que poden haver influenciat en els resultats (com ara qui ha fet l'experiment, quan es va fer i com es va dur a terme). A més, s'ha de subministrar informació sobre els passos utilitzats en el processament de les dades. Degut a que les diferents bases de dades no presenten la mateixa estructura, es fa difícil traspasar la informació entre bases de dades diferents. Per tant, tot i que s'ha fet un pas important en la creació de bases de dades per emmagatzemar l'enorme quantitat de dades obtingudes a través de la tecnologia de microxips de DNA, encara queda un gran pas per acabar d'estandarditzar les dades incorporades, de manera que hi hagi un protocol únic per entrar les dades en les diferents bases públiques.

2. *Saccharomyces cerevisiae* COM A MODEL GENÒMIC

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* és un organisme eucariota unicel·lular que ha estat utilitzat com a model per l'anàlisi d'organismes eucariotes més complexes per dues raons principals: la seva manipulació genètica és fàcil i econòmica i existeix una identitat relativament elevada entre els gens de llevat i els de mamífer (Botstein *et al.*, 1997). Al ser un organisme unicel·lular l'estudi de la cèl·lula representa l'estudi de tot l'organisme i, a més, al presentar un creixement ràpid permet realitzar estudis els quals serien molt més difícils i costosos en organismes pluricel·lulars.

La longitud del genoma de llevat és relativament petita, de 12 Mb, i s'ha predit que només codifica 6200 gens aproximadament. A més, els gens d'eucariotes superiors solen contenir introns, mentre que només 263 dels gens de llevat en presenten. Aquest fet simplifica el procés d'identificació dels gens per anàlisi computacional. Totes aquestes avantatges de *S. cerevisiae* respecte a altres eucariotes superiors han fet que la genètica, la bioquímica i la biologia molecular d'aquest llevat hagin arribat a uns nivells de coneixement molt elevats difícils d'aconseguir en un altre organisme, fins al punt de ser el primer organisme eucariota seqüenciat (Goffeau *et al.*, 1997). Existeixen una gran quantitat de soques de llevat, de vectors d'expressió i de tècniques genètiques que permeten que l'experimentació amb aquest organisme sigui extraordinàriament ràpida. Una de les característiques més interessants de la biologia del llevat és la capacitat de integrar fragments de DNA exògens en el genoma per recombinació homòloga, facilitant així la clonació i la generació de mutants.

Tot i la popularitat del llevat com un sistema model, només es coneixia la funció d'un terç dels gens quan es va seqüenciar la totalitat del genoma. Actualment, 3780 gens de llevat han estat caracteritzats funcionalment i 560 presenten similitud amb gens de funció coneguda d'altres organismes, però uns 1900 gens encara presenten una funció desconeguda. Per tant, esdevé necessària una millor caracterització funcional de la totalitat dels gens de *S. cerevisiae*.

La seva fàcil manipulació ha suposat que *S. cerevisiae* també hagi estat escollit com a sistema model en la implantació de noves tecnologies a gran escala, les quals permeten un millor estudi funcional. Una de les tecnologies pioneres que permeten

l'anàlisi simultani de milers de gens i que ha utilitzat *S. cerevisiae* com a organisme model són els microxips de DNA.

En aquest treball hem utilitzant la tecnologia de microxips de DNA per realitzar una millor caracterització de la resposta transcripcional enfront a una situació d'estrès com és la exposició a pH alcalí. La resposta enfront a situacions d'estrès és de gran importància en microorganismes, degut a que el seu entorn és molt variable, i diferents condicions com la temperatura, l'osmolaritat, el pH i la disponibilitat de nutrients presenten fluctuacions importants. *Saccharomyces cerevisiae* també ha estat utilitzat com a punt de partida per estudiar la resposta de les cèl·lules eucariotes enfront a situacions d'estrès i determinar la funció específica del conjunt de proteïnes induïdes. A més, l'elevat grau de conservació en les vies de senyalització d'estrès entre el llevat i eucariotes superiors fa que el llevat sigui utilitzat com a sistema model per a la caracterització d'aquesta resposta en organismes més complexes.

3. LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL A pH ALCALÍ DE *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1. Resposta a diferents tipus d'estrès en *S. cerevisiae*

Tots els organismes estan exposats contínuament a diferents condicions d'estrès. Per fer front a aquestes condicions adverses, les cèl·lules han desenvolupat respostes moleculars ràpides per reparar els danys i protegir-se de posteriors exposicions al mateix tipus d'estrès o a altres de diferents. Tot i que els mecanismes post-transcripcionals poden tenir un paper important en la resposta enfront a situacions d'estrès, en molts casos, el procés d'adaptació inclou un canvi en la expressió gènica el qual està mediat per induccions o repressions, més o menys específiques, d'una sèrie de gens (Estruch, 2000).

Quan les cèl·lules es troben davant una situació d'estrès presenten una disminució del creixement que indueix la parada de cicle en la fase G1 de manera transitòria (Rowley *et al.*, 1993; Belli *et al.*, 2001). Sota aquestes condicions s'ha observat una disminució en l'expressió dels gens implicats en la biosíntesi d'aminoàcids i purines, el que comporta una reducció de la maquinària biosintètica de la cèl·lula associada a una disminució del creixement.

S'han estimat un gran nombre de gens que es veuen alterats com a conseqüència de diferents tipus d'estrès com són les elevades temperatures, l'estrès osmòtic, l'estrès oxidatiu, la disminució del pH o la limitació de glucosa, entre d'altres (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). Aquest conjunt de gens presenten un element comú en els seus promotors anomenat STRE (Ruis and Schuller, 1995). S'han identificat dos factors de transcripció, Msn2 i Msn4, capaços de reconèixer i unir-se als elements STRE dels gens activant la seva transcripció (Winderickx *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 1998). La presència d'elements STRE en els promotors no implica que tots aquests gens presentin un patró d'expressió uniforme, ja que la regulació d'aquest conjunt de gens pot estar modulada per altres factors. Alguns d'aquests gens inclouen en els seus promotors altres seqüències reguladores involucrades en la resposta induïda per determinades condicions d'estrès. Per tant, tot i haver-hi un sistema de

regulació comú en la resposta general a estrès, també existeixen altres sistemes de regulació més específics per a cada tipus d'estrès.

3.1.1. Resposta enfront a dany a la paret cel·lular

Una via de senyalització molt comú en les cèl·lules eucariotes enfront a diferents tipus d'estrès són les cascades de MAPK. En *S. cerevisiae* la Pkc1 participa en el manteniment de la integritat cel·lular i respon a diversos tipus d'estrès com són les elevades temperatures (Kamada *et al.*, 1995), la disminució de la osmolaritat del medi extracel·lular (Davenport *et al.*, 1995), la presència de feromones (Errede *et al.*, 1995) o la disponibilitat de nutrients (Torres *et al.*, 2002), i tots aquells que provoquin danys en la paret. Els sensors situats en la superfície cel·lular transmeten la senyal a diferents quinases fins a activar a la Pkc1, la qual actua sobre una cascada de MAPK. L'efector final d'aquesta cascada és Slk2/Mpk1. Les dianes de Slk2 són el factor de transcripció Rlm1 implicat en l'activació de gens que codifiquen proteïnes que formen part de la paret cel·lular (Watanabe *et al.*, 1997; Dodou and Treisman, 1997; Jung *et al.*, 2002) i el factor de transcripció SBF (Swi4-Swi6 Binding-Factor) (Baetz *et al.*, 2001). En dos estudis recents (Lagorce *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004) s'ha caracteritzat mitjançant la tecnologia de microxips de DNA la resposta transcripcional induïda per alteracions en la paret cel·lular. Aquests autors han identificat 178 gens la expressió dels quals està incrementada, com a mínim, 1,9 vegades després de l'exposició a Congo Red o zimoliasa. A més, han identificat en els promotors d'aquests gens seqüències consens per a diferents factors de transcripció com ara Rlm1, Crz1, SBF (Swi4-Swi6), Msn2/Msn4, Ste12 i Tec1, suggerint una regulació complexa en la resposta a dany a paret amb la implicació de diverses vies de senyalització.

3.1.2. Resposta a elevades temperatures

En situacions d'elevades temperatures i altres tipus d'estrès s'activa l'expressió d'un conjunt de gens a través del factor transcripcional HSF (heat shock factor) (Hahn *et al.*, 2004). El HSF està codificat per una còpia del gen Hsf1, el qual és indispensable per la viabilitat de la cèl·lula (Sorger and Pelham, 1988; Wiederrecht *et al.*, 1988). Aquest factor de transcripció s'uneix a elements concrets dels promotors, els *heat shock elements* (HSE) (Young and Craig, 1993; Santoro *et al.*, 1998; Sakurai and Fukasawa,

2001). Com a conseqüència s'expressen les *heat shock proteins* (HSP), les quals actuen majoritàriament com a xaperones involucrades en el plegament, tràfic, maduració i degradació de proteïnes (Feder and Hofmann, 1999). Els HSFs no només actuen sobre la transcripció de les HSP, si no que també regulen la transcripció d'una sèrie de gens implicats en diferents processos cel·lulars com la degradació proteica, destoxificació, generació d'energia, metabolisme de carbohidrats, i manteniment de la integritat de la paret cel·lular (Yamamoto *et al.*, 2005). Mitjançant la tecnologia de microxips de DNA s'ha descrit un conjunt de gens que s'indueixen en situacions d'elevades temperatures (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001).

La majoria de dianes dels HSFs són gens que formen part de la resposta general a estrès i un subgrup està també regulat per Msn2 i Msn4 (Amoros and Estruch, 2001; Grably *et al.*, 2002). Molts dels gens activats per HSF també presenten inducció per altres tipus d'estrès, indicant la presència d'altres sistemes de regulació i/o l'activació del HSF per un mecanisme similar a estrès per elevades temperatures o per vies de transducció de la senyal diferents (Gasch *et al.*, 2000; Hahn *et al.*, 2004).

3.1.3. Resposta a estrès osmòtic

L'exposició de cèl·lules de llevat a condicions d'elevada osmolaritat en el medi produeix una pèrdua ràpida d'aigua intracel·lular (Hohmann, 2002). Per adaptar-se a aquest augment de l'osmolaritat les cèl·lules sintetitzen petites molècules orgàniques (ex: glicerol) amb l'objectiu d'equilibrar la pressió osmòtica (Albertyn *et al.*, 1994). Per contrarestar aquests efectes les cèl·lules de llevat desencadenen una resposta adaptativa a través d'una cascada de MAPKs anomenada via HOG (high osmolarity glicerol). Aquesta via de senyalització és activada per dos mecanismes independents que activen Ssk2, Ssk22 i Ste11 respectivament (Maeda *et al.*, 1994). En el primer mecanisme el receptor de membrana que transmet la senyal és Sln1, mentre que en el segon és la proteïna Sho1 (Maeda *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1995). Aquestes dues vies independents culminen amb la fosforilació de la MAPK Hog1 provocant la seva translocació al nucli a on modula la transcripció d'una sèrie de gens (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999; Posas *et al.*, 2000). Hog1 actua sobre els factors de transcripció Msn2/Msn4 (Martinez-Pastor *et al.*, 1996), de manera que molts dels gens activats per estrès osmòtic també ho estan per diversos tipus d'estrès (Gasch *et al.*,

2000). Hog1 també actua sobre altres factors com són Hot1 (Rep *et al.*, 2000), Sko1 (Proft and Serrano, 1999) i Smp1 (de Nadal *et al.*, 2003) modulant així la transcripció d'una sèrie de gens de forma més específica. Tot i que Hog1 és un factor essencial en la resposta enfront a estrès osmòtic s'ha demostrat que hi ha una sèrie de gens que responen a aquest tipus d'estrès de forma independent de Hog1 (Posas *et al.*, 2000), suggerint l'existència d'altres vies de senyalització les quals intervenen en la resposta a aquest tipus d'estrès.

3.1.4. Resposta a estrès oxidatiu

Les cèl·lules de llevat que creixen en condicions aeròbiques estan sotmeses a estrès oxidatiu degut a la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), com ara el peròxid d'hidrogen, radicals hidroxil o ions superòxid. Davant la presència d'agents oxidants en el medi les cèl·lules de llevat desencadenen una resposta transcripcional ràpida i generalment transitòria (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). El factors transcripcionals responsables de la inducció d'aquest conjunt de gens com a resposta a l'estrès oxidatiu són Yap1, Skn7 i Msn2/4 (per una revisió veure Toledano *et al.*, 2003). Yap1 sembla ser més important en la resposta adaptativa induïda per concentracions moderades de peròxid d'hidrogen, mentre que Msn2/4 estaria preferentment implicat en la recuperació a una exposició elevada de l'agent oxidant (Hasan *et al.*, 2002). En un estudi molt recent (Vilella *et al.*, 2005) s'ha demostrat que la Pkc1, implicada en el manteniment de la integritat cel·lular, també seria essencial per la supervivència de les cèl·lules tractades amb agents oxidants.

3.2. Resposta a estrès per pH alcalí

Saccharomyces cerevisiae creix bé en un rang de pH relativament ampli, tot i que creix més ràpidament a pH àcid. Per tant, l'exposició a un pH lleugerament alcalí es pot considerar una situació d'estrès. En llevat, el pH extracel·lular actua sobre l'expressió de diferents bombes de ions i transportadors que promouen la adaptació a canvis de pH (Haro *et al.*, 1991; Lamb *et al.*, 2001; Causton *et al.*, 2001). A més, el pH extracel·lular regula el creixement haploide invasiu i l'esperulació (Su and Mitchell, 1993), de manera que aquests estan inhibits en condicions de pH àcid i afavorits en

condicions de pH alcalí. El pH extracel·lular és, per tant, una senyal ambiental clau que influeix en el creixement, fisiologia i diferenciació cel·lular.

Un factor important per mantenir l'acidesa del medi extracel·lular és la H⁺-ATPasa de membrana Pma1, que hidrolitza ATP per expulsar protons a l'exterior (van der Rest *et al.*, 1995). Aquesta activitat genera un gradient de protons que s'utilitza pel transport de diversos nutrients i cations (McCusker *et al.*, 1987; van der Rest *et al.*, 1995; Serrano, 1996; Nass *et al.*, 1997). En condicions de pH neutre o alcalí intervenen dos bombes de ions diferents vitals pel creixement: l'ATPasa de sodi Ena1 (Garcia-deblas *et al.*, 1993); i l'ATPasa de protons vacuolar (Stevens and Forgac, 1997). Ena1 hidrolitza ATP per expulsar sodi a l'exterior de la cèl·lula i el gradient de sodi creat permet la captació d'altres cations. L'ATPasa vacuolar és necessària per l'acidificació de la vacuola, un procés que, a pH alcalí, no pot tenir lloc per endocitosi.

Les respostes moleculars produïdes per variacions del pH extracel·lular han estat poc estudiades en *Saccharomyces cerevisiae* a diferència d'altres fongs com *Aspergillus nidulans* (per una revisió veure Denison, 2000; Penalva and Arst, 2002), *Candida albicans* (Davis, 2003; Bensen *et al.*, 2004) o *Yarrowia lipolytica* (Lambert *et al.*, 1997; Zvyagilskaya *et al.*, 2004).

3.2.1. Estrès per pH alcalí en *Aspergillus nidulans*

Un punt clau de les investigacions va ser la identificació del factor de transcripció del tipus dits de zinc PacC d'*Aspergillus nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995), que és necessari per generar la resposta a pH alcalí (Caddick *et al.*, 1986). PacC és necessari per activar els gens que intervenen en la resposta de pH alcalí i reprimir la transcripció dels gens activats sota condicions de pH àcid (Espeso and Penalva, 1996; Espeso and Arst, 2000). La proteïna PacC, de 72 KDa, s'acumula de forma inactiva a l'interior de la cèl·lula quan aquesta es troba creixent en condicions de pH àcid. L'activació de PacC només té lloc quan el pH extracel·lular s'alcalinitza donant lloc a la proteòlisi de la seva regió COOH-terminal. En la proteòlisi de PacC hi intervenen un conjunt de gens anomenats Pal: PalA (interacciona amb PacC), PalB (proteasa del tipus calpaina que actua sobre residus de cisteïna), PalC (funció desconeguda), PalF (funció desconeguda), PalH i PalI (proteïnes transmembrana). La forma processada de PacC, de

27 KDa, actua activant els gens que s'expressen sota condicions de pH alcalí i reprimint aquells que s'expressen a pH àcid (Arst and Penalva, 2003).

Existeixen dos formes de PacC, la forma oberta i la tancada. El pas de la forma tancada a oberta requereix una primera proteòlisi que té lloc a través de la *via pal*, la qual depèn del pH i es crea un producte intermediari el qual serà sotmès, de manera pH independent, a una segona proteòlisi obtenint així la forma activa de PacC (Diez *et al.*, 2002), (figura 9).

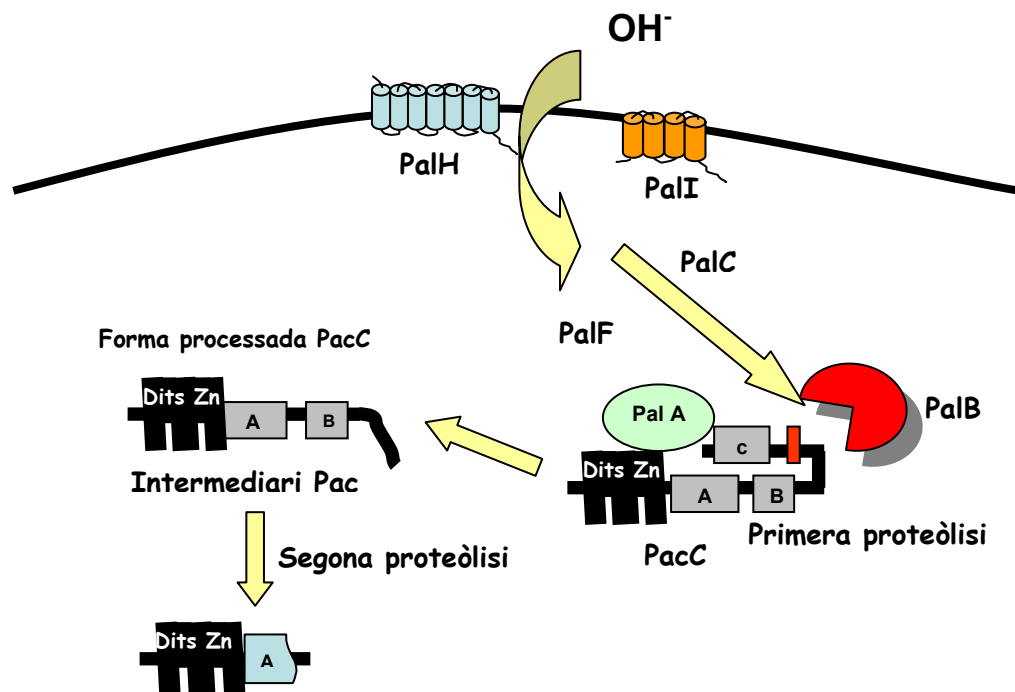


Figura 9. Esquema de l'activació de PacC seguint el model de doble proteòlisi. La primera proteòlisi requereix la senyal produïda en condicions de pH alcalí a través de la *via pal* i dona lloc a un intermediari el qual serà processat independentment del pH del medi. Figura modificada de Penalva and Arst, 2002.

3.2.2. Estrès per pH alcalí en *Candida albicans*

Candida albicans és un fong dimòrfic el qual pateix transicions morfològiques entre formes levaduriformes (unicel·lular) i formes filamentoses com a resposta a diverses senyals ambientals, incloent canvis de temperatura i pH. En condicions òptimes de temperatura (37 °C), la forma filamentosa està afavorida a un pH pròxim a la neutralitat, mentre que la forma unicel·lular predomina de manera quasi exclusiva a pH 4 (Buffo *et al.*, 1984.). L'estudi de com el pH extracel·lular controla les transicions morfològiques en *Candida albicans* ha estat de gran interès degut a que la seva patogeneïtat està en funció de la morfologia que presenta. S'ha identificat un homòleg de PacC en *Candida albicans*, CaRIM101/PRR2. CaRim101, igual que PacC (Tilburn *et al.*, 1995) és necessària per la repressió del conjunt de gens que s'expressen en condicions de pH àcid i per l'activació dels gens que s'expressen a pH alcalí (Davis *et al.*, 2000; Fonzi, 1999). També s'han caracteritzats dos homòlegs de la via pal: CaRIM8/PPR1 (homòleg de palF) i CaRIM20 (homòleg de pal A), (Davis *et al.*, 2000; Porta *et al.*, 2002). Aquestes evidències ens mostren que la via de senyalització en resposta a pH alcalí en *Candida albicans* està conservada respecte a la via pal descrita per *Aspergillus nidulans*.

3.2.3. Estrès per pH alcalí en *Saccharomyces cerevisiae*

Es coneix un homòleg de PacC en *S. cerevisiae*, Rim101 (Tilburn *et al.*, 1995) el qual actua com a regulador positiu de la meiosi i de la esporulació (Su and Mitchell, 1993). Rim101 forma part d'un complex que també inclou Rim20, Rim13, Rim8, Rim21 i Rim9 (Xu and Mitchell, 2001), que són els homòlegs en llevat de PalA, PalB, PalF, PalH i PalI en *A. nidulans* respectivament (**taula 2**). A l'igual que PacC, Rim101 s'activa mitjançant la proteòlisi de la regió COOH-terminal, però per la seva activació només és necessària una sola proteòlisi. Per tant, alguns aspectes dels mecanismes de regulació en *A. nidulans* no es reproduïen de manera completa en altres fongs. Encara més, la proteòlisi de Rim101 té lloc tant en condicions de pH alcalí com de pH àcid (Li and Mitchell, 1997) i també es coneixen, al igual que en *C. albicans*, vies independents de Rim101 en la resposta a pH alcalí (Davis *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002).

Taula 2. Homòlegs de la via de senyalització pal de *A. nidulans* en *S. cerevisiae*.

<i>A. nidulans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Funció
PalA	Rim20	Interacciona amb Rim101/PacC
PalB	Rim13	Calpain-like cysteine protease
PalC	-----	Desconeguda
PalF	Rim8	Desconeguda
PalH	Rim21	Proteïna de membrana 7 TM
PalI	Rim9	Proteïna de membrana 4 TM

Una altra diferència important entre *A. nidulans* i *S. cerevisiae* és que mentre que PacC actua directament com a activador transcripcional en els promotors dels gens que responen a pH alcalí, Rim101 actua positivament però de manera indirecte reprimint la expressió de gens que codifiquen repressors transcripcionals, principalment *NRG1* i *SMP1* (Lamb and Mitchell, 2003). Nrg1 és un repressor transcripcional que regula la transcripció de diversos gens en presència de glucosa i, conjuntament amb el seu homòleg Nrg2, regula negativament el creixement invasiu (Park *et al.*, 1999; Vyas *et al.*, 2001; Zhou and Winston, 2001). S'ha descrit una altra funció per Nrg1 que consisteix en regular negativament *ENA1* (Lamb and Mitchell, 2003), la bomba que expulsa sodi i liti a l'exterior, la qual és crítica pel creixement en condicions d'alcalinitat o presència d'elevades concentracions d'aquests ions en el medi (**figura 10**).

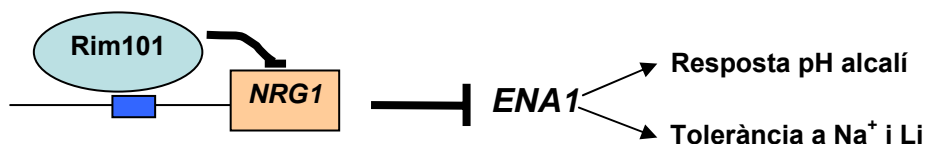


Figura 10. Rim101 és capaç d'associar-se a regions del promotor del gen *NRG1* causant la seva repressió. Nrg1 actua reprimint *ENA1*, el qual és necessari pel creixement en condicions de pH alcalí i d'elevades concentracions de sodi i Liti. Figura modificada de (Lamb and Mitchell, 2003).

S'ha demostrat que Pal A d'*Aspergillus nidulans* és capaç d'unir-se directament a motius YPXL/I del factor de transcripció PacC i aquesta unió és necessària per l'acció de la proteasa (Vincent *et al.*, 2003). Existeixen dos homòlegs de PalA en *S. cerevisiae*, Rim20 i Bro1, però només Rim20 participa en la regulació per pH (Xu and Mitchell, 2001). A més, s'ha demostrat que Rim20 és capaç d'interaccionar amb Snf7/Vps32 i Vps34 (Uetz *et al.*, 2000; Kranz *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001), les quals regulen el tràfic vesicular mitjançant la formació de MVBs (multivesicular bodies). El fet que existeixi una relació entre Rim101 i la maquinaria de formació de MVBs demostra que el pH extracel·lular a més d'intervenir en el processament de Rim101 també regula el tràfic vesicular (Xu *et al.*, 2004).

Quan es va iniciar aquest treball de recerca el nombre de gens de *Saccharomyces cerevisiae* momés es coneixien tres gens que presentaven una resposta a pH alcalí: *ENA1*, que codifica un ATPasa de sodi essencial per la destoxicació de sodi (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994), *SHC1* i *SCY1* (Hong *et al.*, 1999). Gràcies a estudis posteriors ha anat augmentant la informació sobre la resposta transcripcional a pH alcalí de *Saccharomyces cerevisiae* (Lamb *et al.*, 2001; Causton *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002). En el treball realitzat per Lamb *et al.*, 2001 van trobar un conjunt de gens que presentaven una activació transcripcional en cèl·lules creixudes a pH alcalí, utilitzant microxips que contenien els ORFs de llevat. Van identificar 71 gens la transcripció dels quals estava incrementada 2,1 cops en cèl·lules creixudes a pH 8,0 durant 2 hores respecte a les creixudes a pH 4,0. Aquesta llista inclou, a més de la coneguda ATPasa de sodi *Ena1*, una sèrie de gens involucrats en la captació de fòsfor, coure i ferro. A més, es va realitzar el mateix estudi en soques mutants *rim101* i es va observar que alguns gens activats per pH alcalí són totalment o parcialment independents de Rim101. Aquest fet ens demostra que en aquest llevat no tots els gens que responen a pH alcalí ho fan a través de Rim101. En un altre estudi (Causton *et al.*, 2001) es va analitzar la resposta transcripcional al passar de pH 6,0 a pH 7,9 al llarg del temps (de 10 a 100 minuts). Utilitzant la tecnologia de microxips de DNA es van identificar uns 500 gens induïts com a mínim 3 vegades. En el nostre laboratori es va realitzar un estudi (Serrano *et al.*, 2002) mitjançant microxips de DNA de la resposta de cèl·lules de llevat enfront a un pH extracel·lular moderadament alcalí (7,6) a temps més curts (5, 25 i 45 minuts) obtenint un augment dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades en 150 gens. Entre aquests 150 gens hi havia un nombre significatiu de

gens involucrats en el transport de fosfat arribant a la conclusió que el pH alcalí genera una resposta transcripcional similar a l'obtinguda per la falta de fosfat. També es va veure que una altra funció clarament afectada pel pH alcalí és la homeostasi de ions ferro i coure. La causa seria una disminució de la solubilitat d'aquests ions en un medi alcalí provocant l'augment de l'expressió dels transportadors d'aquests ions (Serrano *et al.*, 2004).

3.3. La via de la calcineurina com un possible mediador de la resposta transcripcional en condicions d'estrès per pH alcalí.

Els mecanismes de senyalització per calci són utilitzats per totes les cèl·lules eucariotes per regular un rang molt ampli de processos cel·lulars i l'expressió de determinats gens. Augments transitoris del calci lliure del citosol, deguts a una obertura dels canals de calci de la membrana plasmàtica i/o procedent de compartiments interns, dóna lloc a l'activació de proteïnes d'unió a calci com la calmodulina, la qual actua modulant l'expressió de determinats enzims (Klee *et al.*, 1998). Una de les dianes del complex Ca^{+2} /calmodulina és la calcineurina, una serin-treonin proteïn fosfatasa. En mamífers la calcineurina regula diferents processos com l'activació de les cèl·lules T (O'Keefe *et al.*, 1992; Clipstone and Crabtree, 1992), quimiotaxis de neutròfils (Hendey *et al.*, 1992; Lawson and Maxfield, 1995), apoptosi (Wang *et al.*, 1999), hipertròfia cardíaca (Molkentin *et al.*, 1998), memòria (Mansuy *et al.*, 1998) i angiogènesi (Graef *et al.*, 2001). Totes aquestes respostes fisiològiques són produïdes per la calcineurina a través de la regulació de factors de transcripció de la família NFAT (nuclear factor of activated T cells) (Crabtree, 2001), la qual cosa demostra que els mecanismes transcripcionals són un aspecte important en la regulació d'una gran varietat de funcions dependents de la calcineurina.

De manera similar, en *Saccharomyces cerevisiae* s'ha descrit una via de senyalització dependent de la calcineurina. En llevat, com en altres organismes, la calcineurina és un heterodímer format per una subunitat catalítica (A) i una subunitat reguladora (B). La subunitat catalítica està codificada per dos gens: *CNA1* i *CNA2* (Cyert and Thorner, 1992), mentre que la subunitat reguladora està codificada pel gen *CNBI* (Kuno *et al.*, 1991). La calcineurina de llevat pot ser inactivada *in vivo* mutant els

dos gens de la subunitat catalítica, el gen de la subunitat reguladora, o bé per addició del compost FK506 (Liu, 1993).

En llevat, la calcineurina és activada per un augment del calci intracel·lular produït per una varietat de condicions d'estrès com l'exposició a altes temperatures, l'exposició prolongada al factor α i canvis en ions extracel·lulars com el sodi i el calci (per una revisió veure Aramburu *et al.*, 2000; Cyert, 2001; Aramburu *et al.*, 2004). Aquest increment de calci pot provenir de l'entrada de calci de l'exterior o bé de la sortida de compartiments interns, com ara la vacuola donant lloc a l'activació de la calcineurina. Per exemple, en situacions d'estrès en el reticle endoplasmàtic degudes a una insuficient glicosilació, processament, plegament o ensamblatge de proteïnes es produeix una entrada de calci provinent del medi extracel·lular mitjançant els transportadors de calci d'elevada afinitat Cch1 i Mid1 (Bonilla *et al.*, 2002), mentre que davant d'una situació d'estrès salí l'origen del calci és encara motiu de discòrdia, ja que s'ha definit d'origen vacuolar mediat pel transportador de baixa afinitat Yvc1 (Denis and Cyert, 2002), o d'origen extracel·lular i importat a l'interior de les cèl·lules pels canal Mid1 i Cch1 (Matsumoto *et al.*, 2002).

La calcineurina activada desfosforila i activa la proteïna Crz1/Tcn1/Hal8 (Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999), un factor de transcripció amb estructura de dits de zinc (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos and Cyert, 1997). Quan Crz1 és activada, s'uneix a un element dels promotors anomenat CDRE i actua sobre una gran varietat de gens (**figura 11**).

S'ha determinat la seqüència CDRE del promotor FKS2, demostrant que és suficient i necessària per activar la transcripció a través de la via calcineurina/Crz1 (Stathopoulos and Cyert, 1997). També s'han establert dos seqüències d'unió a Crz1 en el promotor de *ENAI* (Mendizabal *et al.*, 2001). La primera, 5'-GAATGGGCTG-3', és un lloc d'unió de baixa afinitat i, s'assembla menys a la seqüència consens que la segona seqüència identificada, 5'-GGGGTGGCTG-3', en la qual Crz1 s'hi uneix amb una afinitat més alta. Posteriorment, el grup de Martha Cyert ha realitzat un estudi global per tal determinar la seqüència consens a la qual s'uneix Crz1 en els promotors dels gens (Yoshimoto *et al.*, 2002). A través d'experiments d'interferència per metilació i seleccionant els llocs d'unió i amplificant-los han identificat residus de la regió CDRE

que són crítics per la unió de Crz1. Aquests anàlisis han permès establir la seqüència 5'-GNGGC(G/T)-3' com la seqüència consens d'unió a Crz1. En aquest estudi han determinat mitjançant la tecnologia de microxips de DNA un conjunt de gens l'expressió dels quals és dependent de la calcineurina en la seva resposta enfront a l'exposició de ions sodi i calci extracel·lulars i, mitjançant un anàlisi computacional dels seus promotors, han obtingut una seqüència comú (5'-GAGGCTG-3') la qual és similar a la determinada experimentalment (5'-GNGGC(G/T)CA-3'). Si es comparen aquestes dues seqüències, els elements comuns entre elles ens permetent obtenir la seqüència consens 5'-GNGGC(G/T)-3'.

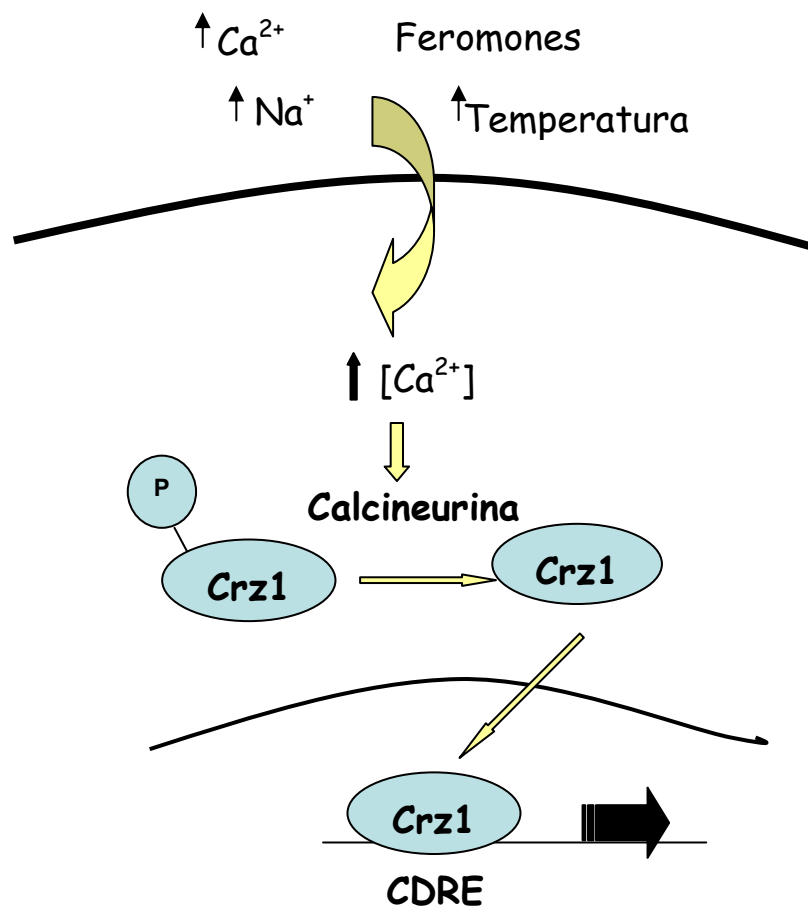


Figura 11. Esquema de la via de senyalització calcineurina/Crz1 en *S. cerevisiae*. La calcineurina s'activa sota determinades condicions ambientals (elevades concentracions de calci i sodi, augment de la temperatura i per la presència de feromones) generant un augment dels nivells de calci en el citoplasma de la cèl·lula. Aquest calci pot ser d'origen extracel·lular o vacuolar. Aquest augment de calci dona lloc a la activació de la calcineurina, la qual desfosforila Crz1 regulant la seva localització i activitat. Crz1 s'uneix a elements CDRE dels promotors d'alguns gens, activant la seva transcripció.

La calcineurina controla l'activitat de Crz1 regulant la seva localització subcel·lular. Quan l'activitat de la calcineurina és baixa Crz1 està fosforilada i resideix en el citosol. Quan la calcineurina és activada desfosforila Crz1, provocant la ràpida translocació d'aquesta cap al nucli. Aquest canvi de localització és degut a l'increment de la importació cap al nucli i a la disminució de l'exportació de Crz1 (Boustany and Cyert, 2002). S'han descrit dues quinases capaces de fosforilar Crz1 i, per tant, regular negativament la seva activitat. La primera quinasa que es va descriure va ser un homòleg de la casein quinasa I, Hrr25 (Kafadar *et al.*, 2003). La casein quinasa I és una família conservada de quinases que regulen processos molt diversos com ara la resposta enfront el dany del DNA (Hoekstra *et al.*, 1991; Ho *et al.*, 1997), la meiosi (Hoekstra *et al.*, 1991) o el tràfic vesicular (Murakami *et al.*, 1999). En un estudi posterior (Kafadar and Cyert, 2004) es va identificar una altra quinasa que fosforila Crz1, la PKA (cAMP-dependent protein kinase). La PKA i la calcineurina són dues molècules de senyalització conservades que transmeten multitud de senyals en eucariotes des de fongs fins a mamífers (Aramburu *et al.*, 2000; Griffioen and Thevelein, 2002; Rakhia., 2004). Aquestes dues molècules actuen com a reguladors positiu i negatiu, respectivament, de la funció de Crz1 en llevat.

L'activació de la calcineurina s'ha considerat tradicionalment el resultat d'un increment dels nivells de calci citoplasmàtic (Hilioti *et al.*, 2004), però la regulació funcional de la fosfatasa és força més complexa. Per exemple, l'activitat de la calcineurina pot estar regulada per membres de la família de proteïnes RCN (regulators of calcineurin), també anomenades calcipressines (Gorlach *et al.*, 2000; Kingsbury and Cunningham, 2000), representades en llevat pel gen *RCN1* (Kingsbury and Cunningham, 2000). L'efecte de Rcn1 sobre l'activitat de la calcineurina depèn del seu estat de fosforilació. Per tal que les RCNs actuïn estimulants l'activitat d'aquesta via és necessària la fosforilació a través de la quinasa Mck1, la qual forma part de la família de quinases GSK-3 (Hilioti *et al.*, 2004). Les RCNs també poden actuar com a reguladors negatius d'aquesta via quan són desfosforilades per l'acció de la pròpia calcineurina. Per tant, els cicles de desfosforilació i refosforilació de les RCN regularien la via de senyalització de la calcineurina per un procés de retroalimentació. Per altra banda, la localització subcel·lular i l'activació del principal efector de la calcineurina, el factor de transcripció Crz1, també està regulat per l'estat de fosforilació d'aquest (Stathopoulos-

Gerontides *et al.*, 1999, Kafadar *et al.*, 2003). Per tant, la via de senyalització de la calcineurina probablement integra diverses senyals a diferents nivells.

L'augment transitori del calci intracel·lular degut a diferents situacions d'estrès produeix l'activació de la calcineurina la qual és capaç d'activar l'expressió d'una sèrie de gens a través de la desfosforilació del factor de transcripció Crz1. Entre els gens regulats per la calcineurina trobem *FKS2/GSC2* que codifica l'enzim β -1,3-glucan sintasa, *PMCI*, *PMRI* i *ENAI/PMR2*, els quals codifiquen ATPases del tipus P necessàries en diferents aspectes de l'homeostasi iònica. *PMCI* codifica una ATPasa de calci responsable de segrestar calci en la vacuola (Cunningham and Fink, 1994) i *PMRI* transporta de manera similar calci i magnesi a l'aparell de Golgi (Durr *et al.*, 1998; Mandal *et al.*, 2000). El calci indueix la transcripció tant de *PMCI* com de *PMRI* de manera dependent de la calcineurina, i l'expressió d'aquests gens és necessària pel creixement del llevat en elevades concentracions de calci en el medi (Cunningham and Fink, 1996). L'expressió de *ENAI* s'indueix en presència de sodi i liti de manera dependent de la calcineurina i per estrès osmòtic a través de la via HOG (Mendoza *et al.*, 1994; Marquez and Serrano, 1996). En un estudi mencionat prèviament (Yoshimoto *et al.*, 2002) s'ha examinat, utilitzant la tecnologia de microxips de DNA, l'expressió de tots els ORFs de *S. cerevisiae* exposant les cèl·lules de llevat a elevades concentracions extracel·lulars de calci o sodi en una soca salvatge i una soca mutant *cnb1* i en presència i absència de FK506 amb l'objectiu d'identificar les dianes de la via de senyalització calcineurina/Crz1 en llevat. S'han identificat 163 gens dependents de la calcineurina i entre ells podem trobar diversos gens que codifiquen proteïnes que intervenen en el transport de petites molècules o en l'homeostasi de ions (*MEP1*, *ENB1*, *PHO84*, *PHO89*, *KHA1*, *TPO4* i les ATPases del tipus P, *PMCI* i *ENAI*, *ENA2* i *ENA5*), així com altres gens que contribueixen a la síntesi i al manteniment de la paret cel·lular, al metabolisme de lípids i esterols i al transport vesicular.

La comparació de la resposta transcripcional per un augment dels nivells de calci i/o sodi extracel·lulars obtinguda en mutants *cnb1* i *crz1*, indica que en la majoria de casos l'absència de *CRZ1* dona lloc a una disminució en la resposta similar a la observada en una soca *cnb1* (Yoshimoto *et al.*, 2002). Aquest fet indica que Crz1 és el principal mediador de la resposta transcripcional dependent de la calcineurina.

3.4. Dependència a calci de la resposta a pH alcalí

En diferents estudis s'ha observat que un conjunt de gens són activats a través de la via de la calcineurina sota diverses condicions d'estrès com l'exposició a concentracions elevades de ions (Ca^{2+} , OH^- , Mn^{2+} , Na^+/Li^+), a feromones (factor α), a altes temperatures, o en mutants els quals està afectada la integritat de la paret cel·lular (Cyert and Thorner, 1992; Mendoza *et al.*, 1994; Garrett-Engele *et al.*, 1995; Farcasanu *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1996; Withee *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 2002). Aquestes observacions ens suggereixen que altres condicions d'estrès també podrien estar regulades per la via de la calcineurina.

Recentment, s'ha observat en el nostre laboratori que la calcineurina podria estar involucrada en la tolerància enfront a pH alcalí (Serrano *et al.*, 2002). Es va demostrar que una part significativa de la resposta a pH alcalí del promotor *ENAI* i pràcticament la totalitat de la resposta de *PHO89* (codifica una permeasa Na^+/Pi) estava bloquejada per l'inhibidor de la calcineurina FK506 i també en absència de *Cnb1* o *Crz1* suggerint que la resposta transcripcional d'una sèrie de gens enfront a l'acalinització del medi podria ser, com a mínim en part, dependent de la calcineurina. El fet que dos dels quatre gens estudiats més exhaustivament presentessin dependència a calcineurina en la seva resposta enfront a pH alcalí ens va fer pensar que un nombre important de gens de llevat podrien respondre a pH alcalí a través d'aquesta via de senyalització.

En aquest treball confirmem i ampliem aquesta hipòtesis definint, utilitzant la tecnologia de microxips de DNA, un conjunt de gens la resposta transcripcional dels quals està regulada per la via de la calcineurina (Viladevall *et al.*, 2004).

III. OBJECTIUS

Quan es va iniciar aquest treball les respostes moleculars produïdes per variacions del pH extracel·lular estaven molt poc estudiades en *Saccharomyces cerevisiae*. Evidències recents en el nostre laboratori van demostrar que la calcineurina estava implicada en la resposta transcripcional enfront a pH alcalí en dos dels quatre gens analitzats (*PHO89* i *ENAI*). En el present treball ens vàrem plantejar aprofundir en l'estudi de la resposta transcripcional per l'exposició a pH alcalí al llarg del temps utilitzant microxips de DNA que contenien tot el genoma de llevat generats en el propi laboratori. També es va investigar mitjançant la tecnologia de microxips de DNA el nombre de gens del genoma de *S. cerevisiae* que responien a pH alcalí a través de la via de senyalització de la calcineurina. Per tant, els objectius concrets han estat:

1. GENERAR MICROXIPS DE DNA QUE CONTINGUÉSSIN TOT EL GENOMA DE *S. cerevisiae*. Aquest objectiu es va centrar en:

1.1. Amplificar per PCR els aproximadament 6000 ORFs del genoma de *S. cerevisiae* en col·laboració amb el laboratori del Dr. José Enrique Pérez-Ortín (Universitat de València) i del Dr. Javier Arroyo (Universitat Complutense de Madrid).

1.2. Posar a punt la tecnologia de microxips de DNA: les tècniques de deposició de les sondes, el marcatge de les mostres, la prehibridació, l'hibridació i els rentats.

2. REALITZAR UN ESTUDI MÉS DETALLAT DE LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL ENFRONT A UNA SITUACIÓ D'ESTRÈS PER pH ALCALÍ AL LLARG DEL TEMPS. Aquests objectius es va centrar en:

2.1. Identificar el nombre de gens que presentaven una expressió gènica diferencial en cadascun dels temps analitzats (10, 20 i 45 minuts) i analitzar les principals categories afectades.

2.2. Conèixer si la implicació de la calcineurina en la resposta transcripcional a pH alcalí es produïa de manera generalitzada. Ens vam proposar identificar el conjunt de gens que presentaven una dependència total o parcial a la calcineurina i/o a Crz1 en la resposta enfront a una situació d'estrès per pH alcalí.

IV. MATERIALS I MÈTODES

1.- SOQUES UTILITZADES I CONDICIONS DE CREIXEMENT

Les cèl·lules de llevat es van créixer a 28 °C en medi YPD (10 g/l d'extracte de llevat, 20 g/l de peptona i 20 g/l de dextrosa) o, en casos determinats, en medi SD (synthetic dextrose), CM (complete minimal) descrits per Adams *et al.*, 1997 o bé en medi SC-URA el qual conté 0,17 % base de nitrogen sense aminoàcids (Difco), 0,5 % sulfat d'amoni, 2 % glucosa i 0,077 % CSM-URA (complete supplement mixture without uracil, BIO 101).

El genotip rellevant de les soques utilitzades en aquest estudi es troben en la **taula 3**. La delecció de *CRZ1* es va realitzar reemplaçant tot l'ORF exactament com està descrit per Stathopoulos and Cyert, 1997. Es va amplificar per PCR el locus deleccionat present en la soca *crz1* generada per Guldener *et al.*, 1996. Aquest fragment amplificat va ser utilitzat per transformar la soca salvatge DBY746 emprada en aquest treball. Per deleccionar els gen *CNB1* es va amplificar per PCR el locus mutant present en la soca *cnb1* generada per Winzeler *et al.*, 1999 mitjançant els oligonucleòtids 5'-GAT CGC GAA GAC GCT ATG-3' i 5'-GAT GGT CTG TCT CCT AGC AT-3' i es va utilitzar aquest fragment per transformar la soca la soca salvatge DBY746 (Serrano *et al.*, 2002).

Taula 3. Soques de llevat utilitzades en aquest treball.

Nom	Genotip rellevant	Font / Referència
DBY746	<i>MATa ura3-52 leu2-3112 his3-Δ1 trp-Δ239</i>	D. Botstein
EDN92	<i>DBY746 crz1::KAN</i>	Serrano <i>et al.</i> , 2002
MAR15	<i>DBY746 cnb1::KAN</i>	Serrano <i>et al.</i> , 2002
FY1679	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 trp1Δ63/TRP1 leu2Δ 1/LEU2 his3Δ200/HIS3</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
EJ758	<i>MATα his3-Δ200 leu2-3,112 ura3-52 pep4::URA3</i>	Martzen <i>et al.</i> , 1999

2. FABRICACIÓ DELS MICROXIPS DE DNA

2.1. Generació de les sondes

La obtenció de les sondes es va realitzar amplificant per PCR, total o parcialment, els ORFs de llevat seguint tres estratègies diferents (**figura 12**). La primera estratègia consistia en l'amplificació de tots els ORFs de llevat continguts en una biblioteca d'expressió (Yeast Exclones, Research Genetics) utilitzant uns oligonucleòtids universals (eYGUF, eYGUR). Aquestes amplificacions van ser sotmeses a una segona ronda d'amplificacions utilitzant uns oligonucleòtids més interns (YGUF, YGUR) per tal d'homogeneïtzar el rendiment de tots els productes. La segona estratègia es va generar per aquells ORFs que presentaven una longitud superior a 3 Kb, ja que els resultats obtinguts de les amplificacions no eren satisfactoris (no s'observava amplificació o bé aquesta presentava una concentració molt baixa). Aquesta estratègia consistia en generar un oligonucleòtid intern per a cadascun d'aquests ORFs, de manera que el producte a amplificar fos de menor longitud. La tercera estratègia es va crear per amplificar alguns ORFs que continuaven donant un resultat negatiu en la seva amplificació o bé per amplificar un conjunt de ORFs que no estaven presents en la biblioteca d'expressió Yeast Exclones. L'estratègia es basava en l'amplificació d'aquests ORFs a partir de DNA genòmic utilitzant una parella d'oligonucleòtids específics (GenePairs) per a cadascun d'ells.

2.1.1. Estratègia general

La estratègia general consistia en l'amplificació per PCR de cadascun dels ORFs complets insertats en un plasmidi de la col·lecció Yeast Exclones de Research Genetics. Aquesta col·lecció va ser originalment generada pel laboratori de Eric Phyzicky i presentava 6080 clons. Cada clon contenia un ORF diferent de llevat insertat en el plasmidi d'expressió pYEX4T-1 de Clontech, veure **figura 13** (Martzen *et al.*, 1999). Aquest plasmidi estava modificat per 140 nucleòtids corresponents al fragment de recombinació (**figura 14**). Per generar aquesta col·lecció es van amplificar per PCR els 6080 ORFs de *S. cerevisiae* utilitzant una parella d'oligonucleòtids específics per a cada gen. Cadascun dels oligonucleòtids presentava una cua comú en l'extrem 5' (de 22 bases en els oligonucleòtids *Forward* i de 20 bases en els *Reverse*). Aquest extrem

comú permetia la reamplificació de tots els productes de PCR utilitzant una sola parella de oligonucleòtids més llargs (70 bases). Aquestes 70 bases que flanquejaven cadascun dels ORFs reamplificats van ser utilitzades per clonar cadascun dels ORFs en el vector linearitzat pYEX-4T per recombinació homòloga (<http://www.dbsr.duke.edu/yeast/Genome%20Libraries/exclones.htm>).

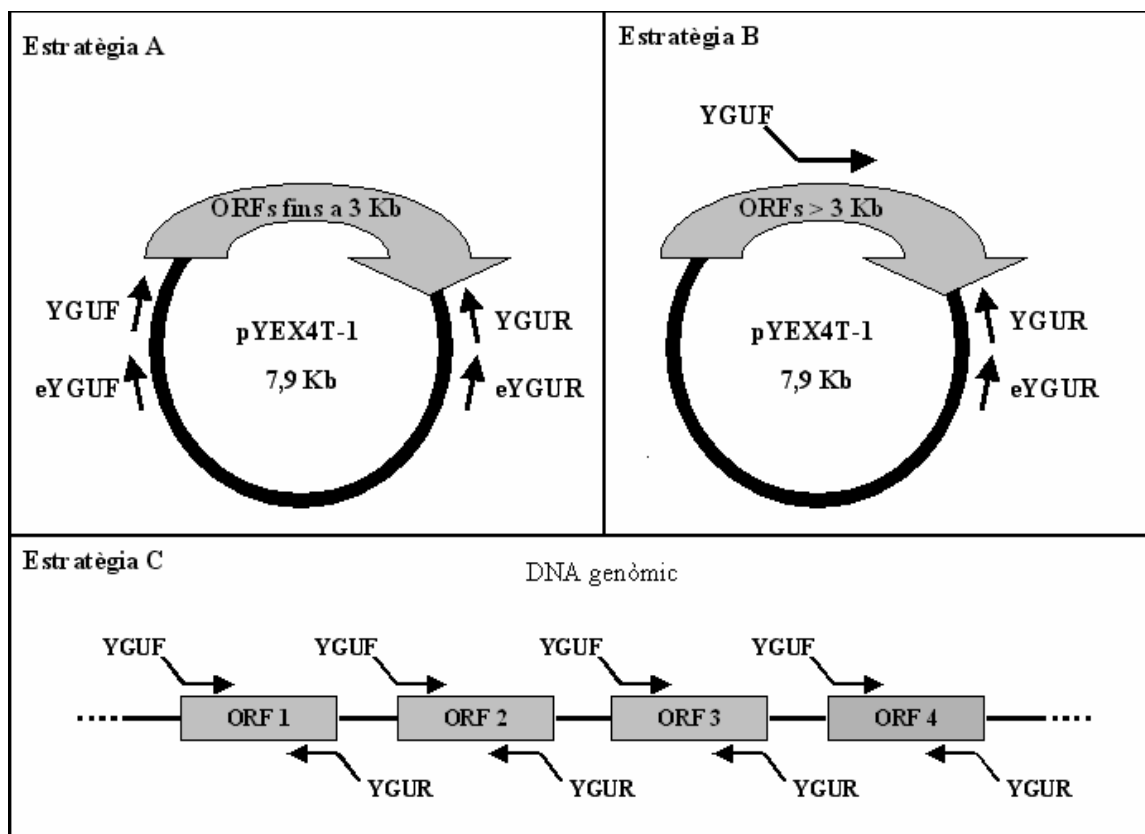


Figura 12. Tres estratègies utilitzades per amplificar i reamplificar totes les sondes dipositades en el microxip de llevat. **Estratègia A:** ORFs inserits en el pYEX4T-1 i oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació. **Estratègia B:** utilitzada per amplificar 466 inserts de longitud major o igual 3 Kb. **Estratègia C:** utilitzada per amplificar el clons negatiu de les estratègies A i B. Es va amplificar a partir de DNA genòmic a través del oligonucleòtids GenePairs (Research Genetics), els quals presenten 20 bases específiques per cadascun dels ORFs en l'extrem 3', i cues en 5' YGUF o YGUR per amplificar la totalitat del ORF (Alberola *et al.*, 2004).

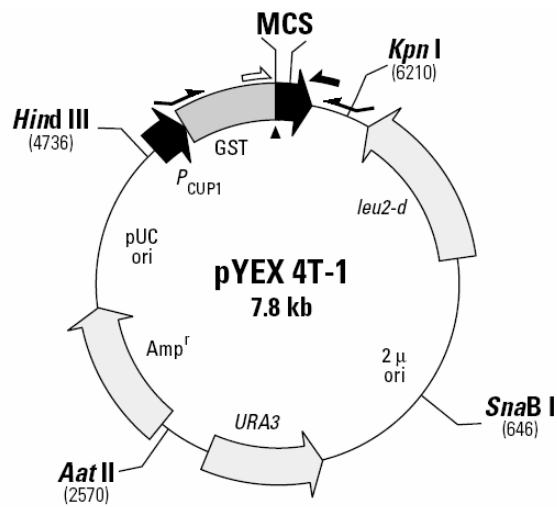
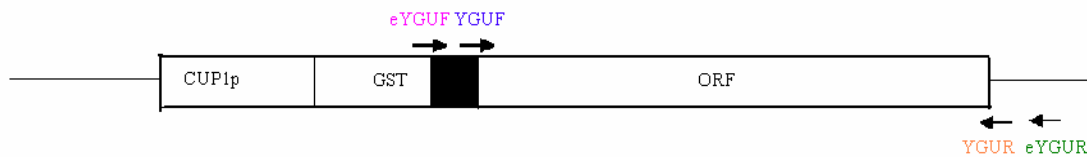


Figura 13. Vector pYEX4T-1 i les dianes de restricció del MCS (multiple cloning site). **B.** Mapa de restricció i MCS del pYEX4T-1. Les dianes de restricció úniques estan indicades amb negreta.

A



B

```

1051  AGTATATAGC ATGGCCTTTG CAGGGCTGGC AAGCCACGTT TGGTGGTGGC GACCATCCTC CAAAATCGGA
      TCATATATCG TACCGGAAAC GTCCCGACCG TTCGGTGCAA ACCACCACCG CTGGTAGGAG GTTTTAGCCT

      Zona reconeixement trombina                                eYGUF
1121  TCATCTGGTT CCGCGTGGAT C[GAACATATC ATTCGATGAT GAAGATACC CACCAAACCC AAAAAAAGAG
      AGTAGACCAA GGCGCACCTA G[CTTGATAG TAAGCTACTA CTTCTATGGG GTGGTTTGGG TTTTTTCTC

      YGUF                                lloc d'inserció de l'ORF
1191  ATCGAATTC AGCTGACCAC C▼ATGGCATT CCCGGGGATC CGTCGACCTG CAGAGATCTA TGAATCGTAG
      TAGCTTAAGG TCGACTGGTC G▼TACCGTAA GGGCCCCTAG GCAGCTGGAC GTCTCTAGAT ACTTAGCATC
                                YGUR                                eYGUR

1261  ATACTGAAAA ACCCCGCAAG] TTCACTTCAA CTGTGCATCG TGCACCATCT CAATTTCTTT CATTTATACA
      CATGACTTTT TGGGGCGTTC] AAGTGAAGTT GACACGTAGC ACGTGGTAGA GTTAAAGAAA GTAAATATGT
  
```

Figura 14. Esquema de l'estratègia seguida per amplificar els ORFs a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones. En **A** Es mostra la disposició general dels oligonucleòtids utilitzats en la primera amplificació (eYGUF/eYGUR) i en la reamplificació (YGUF/YGUR); mentre que en **B** s'observen les seqüències específiques de cadascun d'ells, el fragment de recombinació [], i el lloc d'inserció de l'ORF ▼.

Les cèl·lules de llevat que contenien cadascun dels ORFs insertats en el plasmidi pYEX-4T es van créixer a 30°C durant tota la nit en plaques de 96 pous (MJ Research) en 100 µl de medi SC-URA. Les cèl·lules van ser recuperades per centrifugació, resuspeses en 50 µl d'aigua destil·lada i es van congelar per utilitzacions posteriors.

Es va realitzar una primera ronda d'amplificació per PCR per amplificar els inserts partint de 8 µl de cèl·lules descongelades utilitzant la parella d'oligonucleòtids externs eYGUF (5'-ATTCGATGATGAAGATACC-3') i eYGUR (5'-ACGATTCATAGATCTCTGC-3') en un volum final de 100 µl. La barreja de la reacció consisteix en 1x tampó (Biotools), 3 mM MgCl₂ (Biotools), 0,2 mM de cadascun dels dNTPs (Amersham) 0,5 µM de cadascun dels primers i 4 unitats de la DNA polimerasa (Biotools). Les reaccions es van dur a terme en un termociclador PTC-100 (MJ Research) utilitzant el protocol següent: 10 min a 94 °C per lliurar les cèl·lules i desnaturalitzar el DNA, 30 cicles a 94 °C durant 30 s, 50 °C durant 30 s i 72 °C durant 2-4 min (depenent de la longitud del ORF), seguit per un pas final de 72 °C durant 10 min. En una segona ronda d'amplificacions es va realitzar a partir de 0,1-1µl de la mostra amplificada en la primera ronda utilitzant una parella de oligonucleòtids més interns: YGUF (5'-CGAATTCCAGCTGACCACCATG-3') i YGUR (5'-GATCCCCGGGAATTGCCATG-3'). En aquesta segona amplificació es va utilitzar la mateixa Taq polimerasa, barreja de reacció i termociclador seguint els passos següents: un cicle a 94 °C durant 1 min, 30 cicles a 94 °C durant 30 segons, 60 °C durant 30 segons i 2 minuts a 72 °C i un pas final a 72 °C durant 10 min (**figura 12A**).

2.1.2. Estratègia per a ORFs superiors a 3Kb

Per a aquells ORFs que presentaven una longitud superior a 3 Kb es va utilitzar una segona estratègia (**Figura 12B**). Es va dissenyar un oligonucleòtid intern compatible amb l'eYGUF utilitzant el programa Pride (Haas *et al.*, 1998) o el programa de disseny d'oligonucleòtids del SGD segons les condicions indicades en la **taula 4**. Cadascun d'aquests oligonucleòtids presentava una cua YGUF en 5' per tal de permetre una segona ronda d'amplificació. Les condicions d'amplificació van ser les mateixes seguides en la estratègia general.

Taula 4. Paràmetres utilitzats en el programa de disseny d'oligonucleòtids.

Valors dels paràmetres utilitzats	
Longitud producte amplificat	600-1200 parells de bases
T _m (melting temperature)	43-47 °C (òptim a 45 °C)
Longitud de l'oligonucleòtid	18-20 parells de bases (òptim a 18 pb)
% GC	41-50 % (òptim a 45 %)
Hibridació entre oligonucleòtids	8-10 parells de bases

2.1.3. Estratègia per a ORFs inferiors a 3 Kb d'amplificació negativa i ORFs afegits no presents en la col·lecció Yeast Exclones

Les amplificacions negatives per aquells gens de longitud inferior a 3 Kb i alguns ORFs inclosos en el CYGD (Comprehensive Yeast Genome Database, <http://mips.gsd.de/genre/proj/yeast/index.jsp>, del juliol del 2001), però no presents en la col·lecció de Phyzycky, van ser amplificats per PCR utilitzant els oligonucleòtids comercials GenePairs (Research Genetics) a partir de DNA genòmic extret de la soca FY1679 de *S. cerevisiae* (Hoffman, 1997), veure **figura 12C**. El protocol utilitzat va ser el següent: un cicle a 94 °C durant 3 min, 30 cicles a 94 °C durant 30 s, 50 °C durant 30 s i 72 °C durant 3 minuts i un pas final de 72 °C durant 10 min. Una segona ronda d'amplificació es va dur a terme igual que en la estratègia general.

2.1.4. Comprovació i purificació de les amplificacions

En tots els casos (les tres estratègies i les dos rondes de PCR), els productes de PCR van ser analitzats en gels d'agarosa al 1 % utilitzant TAE 1x (0,04 M Tris-acetat i 0,001 M EDTA) com a tampó d'electroforesi i el marcador de pes molecular de 1Kb (Gibco). La longitud de les mostres es va estimar per inspecció visual dels gels tenyits amb bromur d'etidi comparant amb les diferents bandes de DNA del marcador de longitud similar.

Posteriorment es van purificar els productes de la segona ronda d'amplificacions utilitzant el sistema MultiScreen-PCR (Millipore). Utilitzant un pipeta multicanal es van dipositar 100 µl de cadascun dels productes de PCR en el filtre de la placa Millipore. Es va col·locar la placa en el sistema de buit de Millipore i es va deixar filtrant aproximadament 10 minuts a 667 milibars fins a assecar-se. Es van afegir 50 µl d'aigua MilliQ amb la pipeta multicanal i es va filtrar a 667 milibars fins a quedar sec. Es va repetir aquest últim pas per assegurar l'eliminació de les restes de salt. Es va retirar la placa del sistema de buit i es van afegir 60 µl d'aigua MilliQ en cadascun dels pous. Es va sacsejar vigorosament la placa durant 10 minuts a 700 rpm mitjançant un agitador orbital (IKA-WERKE) per tal de resuspendre el DNA. Finalment, es va retirar el producte de PCR purificat de cadascun dels pous utilitzant la pipeta multicanal, es va dipositar en una placa de 96 pous nova i es va guardar a -20 °C sellada amb una tapa d'alumini especial per a plaques (Costar, 6570).

Es va mesurar la concentració d'algunes mostres purificades representatives (almenys dues per placa) per comprovar que l'absorbància a 260 nm (Biophotometer, Eppendorf) fos superior o igual a 200 ng/µl. Finalment es van seqüenciar aproximadament un 5 % dels gens purificats utilitzant el Kit DYEnamic (Amersham) partint de 0,5 µl de DNA purificat, 1 µl de l'oligonucleòtid YGUR (5 µM) i 3 µl de la barreja del Kit en un volum final de 8 µl, i es van amplificar per PCR seguint el protocol següent: 24 cicles a 95 °C durant 20 s, 50 °C durant 15 s i 1 min a 60 °C. Seguidament, es va precipitar el producte de PCR en 0.8 µl d'una solució d'acetat sòdic/EDTA (1,5 M acetat sòdic, 250 mM EDTA) i 32 µl d'etanol al 100 % durant 13 min a -20 °C, es va centrifugar a màxima potència en una microcentrífuga durant 10 minuts per recuperar el DNA, es va rentar amb 500 µl d'etanol al 70 % i es va deixar assecar a temperatura ambient. Finalment es van resuspendre les mostres amb 3 µl de tampó de càrrega i es va realitzar l'electroforesi en un gel d'acrilamida-urea al 4,5 % en un seqüenciador automàtic (ABI 373A).

2.2. Deposició del DNA sonda sobre porta-objectes modificats

El primer pas per a la generació dels microxips va ser la preparació del DNA sonda. Es van redistribuir 10 μl dels productes de PCR purificats en plaques de 384 pous (Nunc, 242757) amb 10 μl de DMSO (Sigma, 2650). Les sondes es van resuspendre en DMSO a una concentració del 50 % per evitar l'evaporació durant el procés de deposició i, a més, perquè desnaturalitza el DNA permetent una hibridació millor. Les plaques de 384 que contien el DNA sonda amb DMSO al 50 % es van guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per utilitzacions posteriors en les quals es descongelaven, es sacsejaven durant 2 minuts a 700 rpm i es centrifugaven 1 minut a 1500 rpm (Centrifugue 5810, Eppendorf) utilitzant un rotor que permet centrifugar plaques (A-4-62, Eppendorf).

El DNA sonda es va col·locar sobre porta-objectes modificats amb grups amina CMT-Ultragaps (Corning) i Genorama SA-1 (Asper Biotech), utilitzant el robot MicroGrid II (Biorobotics). Els microxips es van generar utilitzant 8 agulles (microspot 2500, veure **figura 15**) en una configuració de 4x2, les quals formaven 32 matrius de 15x15 deixant un espai entre gotes de 0,350 mm. Aquestes agulles es van netejar abans i després de la seva utilització mitjançant un aparell d'ultrasons (Branson 2000). Un cop dipositades totes les sondes, aquestes es va unir als porta-objectes per irradiació amb llum ultraviolada (1200 μJoules) en un equip Stratalinker (Stratagene). Per a cada lot de fabricació es va comprovar la qualitat d'un o dos microxips utilitzant una tinció amb SyberGreen (1:10000) durant 5 minuts seguit de dos rentats amb aigua MilliQ. Finalment es va detectar la senyal mitjançant l'escàner de fluorescència ScanArray 4000 (Perkin-Elmer) el qual excita les molècules de SyberGreen incorporades al DNA amb el làser que excita el fluorocrom Cy3 (543 nm).

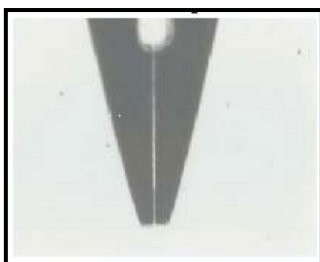


Figura 15. Agulla per la fabricació de microxips. Aquesta agulla conté un canal que per capilaritat s'omple del DNA sonda (0,1-2 μl) i per contacte directe amb el suport sòlid diposita una gota.

El microxip generat contenia 6073 ORFs diferents de *S. cerevisiae*, a més de 286 duplicats corresponents a gens que responen sota diferents condicions d'estrès i 40 gens seleccionats a l'atzar. També contenia una sèrie de controls positius (3 còpies del gen RPL28 que codifica una proteïna ribosomal) i negatius (tres còpies d'un fragment del promotor del gen *ENAI*, tres cDNAs de ratolí i 349 mostres que només contenien DMSO al 50%).

Els microxips fabricats es guardaven al buit en un dessecador (Afora). Vam comprovar que es conservaven en perfecte estat en aquestes condicions durant, com a mínim, 6 mesos.

3. EXTRACCIÓ DEL RNA TOTAL

Es van créixer les soques DBY746, MAR15 i EDN92 en medi YPD (20 mM TAPS, pH 6,2) fins a una densitat òptica de 0,8. Després de centrifugar es van resuspendre en medi YPD (20 mM TAPS, pH 7,6) per permetre la inducció i es va continuar la incubació prenent mostres de 10 ml als 10, 20 i 45 minuts de cadascun dels tipus cel·lulars, o bé en YPD (20 mM TAPS, pH 6,2) per utilitzar-los com a controls. Seguidament es van centrifugar les cèl·lules durant 5 minuts a 3000 rpm i el RNA total es va extreure utilitzant el mètode del *Hot-Phenol* (Kohrer and Domdey, 1991). Es van obtenir aproximadament 200 µg de RNA. Es va comprovar l'estat del RNA mitjançant electroforesi en gel d'agarosa-formaldehid al 0,8 %.

3.1. Comprovació de la integritat del RNA utilitzant l'equip Bioanalyzer

La integritat de les mostres de RNA és essencial per dur a terme un anàlisi d'expressió gènica mitjançant la tecnologia de microxips de DNA, per aquest motiu es va comprovar la integritat d'alguns RNAs a través de l'aparell Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). El Bioanalyzer és una excel·lent alternativa als gels d'electroforesi convencionals ja que els resultats obtinguts són més objectius, és un procés automatitzat i més ràpid. Aquesta tecnologia està basada amb un sistema de capil·lars a on té lloc l'electroforesi de la mostra marcada fluorescentment i la seva detecció té lloc a temps real. El protocol utilitzat per dur a terme la reacció de marcatge fluorescent del RNA ha estat el recomanat per la casa comercial (per més informació

veure la pàgina web <http://www.chem.agilent.com>). Per analitzar les mostres de RNA total vam utilitzar el Kit RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies) el qual ens permet detectar mostres que presenten un rang de concentració entre 25 i 500 ng/μl, els xips RNA 6000 Nano Chips (Agilent technologies) i el marcador de pes molecular RNA 6000 (Ambion). En el cas de mostres provinents d'eucariotes superiors o procariotes, el sistema ens permet calcular automàticament la relació entre les bandes ribosomals del RNA total, però en el cas del llevat no hi ha un protocol creat de manera que s'ha de fer manualment.

4. SÍNTESI DE cDNA I MARCATGE DE LES MOSTRES

Per marcar el cDNA generat a partir del RNA total es van utilitzar dos tipus de marcatge diferents: el marcatge directe i el marcatge indirecte. En general es van seguir els protocols suggerits per la casa comercial.

4.1. Marcatge directe

Pel marcatge directe es va partir de 15 μg de RNA total utilitzant els reactius del First Strand Labelling Kit (Amersham) i els fluorocroms Cy3-dUTP i Cy5-dUTP (Amersham). Per obtenir la cadena de cDNA marcada corresponent al mRNA es va utilitzar el mètode d'extensió a partir de oligo(dT) incorporant Cy3-dUTP o Cy5-dUTP en un volum final de reacció de 20 μl. L'RNA va ser eliminat amb NaOH a una concentració final 0,25 M i la solució va ser neutralitzada amb una solució de HEPES a una concentració final 1 M. Finalment es va purificar el cDNA marcat utilitzant el CyScribe GFX purification Kit (Amersham), se'n va extreure una alíquota per la seva comprovació (10 % del volum) i es va assecat mitjançant una centrífuga evaporadora (Concentrador 5301, Eppendorf).

4.2. Marcatge indirecte

Vam partir de 12 μg de RNA total utilitzant el CyScribe Post-Labelling Kit (Amersham) el qual ja inclou els fluorocroms Cy3 i Cy5. El marcatge indirecte consisteix en dos passos principals: el primer pas consisteix en la incorporació del AA-dUTP durant la síntesi del cDNA utilitzant com a cebador oligo(dT), aquest es purifica

utilitzant el CyScribe GFX purification Kit i s'elueix el cDNA amb 60 µl de bicarbonat sòdic (0,1 M, pH 9.0); en el segon pas s'incorporen els derivats hidroxisuccinimida (NHS) dels fluorocroms sobre els grups aminoal·lil del cDNA i es segueixen els mateixos passos que en el marcatge directe: es purifica el cDNA marcat, se'n extreu una alíquota per la seva comprovació i s'asseca en la centrífuga evaporadora.

4.3. Comprovació del marcatge

En alguns casos es va comprovar la incorporació dels fluorocroms Cy3 i Cy5 utilitzant un espectrofotòmetre, NanoDrop (Nucliber). Aquest sistema porta associat un software d'anàlisi específic per la detecció d'aquests dos fluorocroms. Per mesurar la incorporació de marcatge vam partir de 12 µl (10 %) del cDNA marcat i purificat abans de ser assecat en la centrífuga evaporadora. Seguidament es va dessecar (Concentrador 5301, Eppendorf) i es va resuspendre amb 1,5 µl de la solució d'elució del CyScribe GFX purification Kit (Amersham). Aquests 1,5 µl es col·loquen directament en l'aparell per realitzar la mesura, obtenint un pic a Abs 260 nm corresponent a la concentració de cDNA i un altra pic a 570 o 670 nm segons si estem analitzant la mostra marcada amb Cy3 o Cy5 respectivament.

5. HIBRIDACIÓ

Abans de la hibridació pròpiament dita cal realitzar un pas previ que consisteix en prehibridar els porta-objectes modificats amb una solució que conté BSA per apantallar tots els grup reactius i evitar que s'hi uneixin substàncies no desitjades. Un cop finalitzat el procés d'hibridació s'han de dur a terme una sèrie de rentats per eliminar totes aquelles seqüències que no s'han unit a cap DNA sonda present en el xip. Els protocols utilitzats per realitzar els processos de prehibridació, hibridació i rentats han estat extrets dels protocols del TIGR (The Institute for Genomic Research) (Hegde *et al.*, 2000).

5.1. Prehibridació

Els microxips es van incubar en la solució de prehibridació que contenia 5x SSC (Saline-Sodium Citrate), 0,1 % SDS i 1 % BSA (Sigma A3803) durant 45 minuts a 42 °C. Seguidament es va procedir a realitzar dos rentats seqüencials amb aigua MilliQ. Finalment, es van assecar per centrifugació durant 1 minut a 1500 rpm en una centrífuga (Centrifuge 5810, Eppendorf) utilitzant un rotor que permet centrifugar plaques (A-4-62, Eppendorf).

5.2. Hibridació

Els residus secs que contenien el cDNA marcat es van resuspendre en 9 µl de tampó d'hibridació en el cas de la utilització dels cassetes d'hibridació i en 35 µl si s'emprava l'equip Bioanalyzer. La solució d'hibridació està formada per 50 % formamida, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM citrat sòdic, pH 7,0) i 0,1 % SDS. Es va ajuntar el cDNA marcat amb Cy3 i el marcat amb Cy5 i es van afegir 0,4 µl de DNA d'esperma de salmó (10 mg/ml). Es va desnaturalitzar la barreja durant 3 minuts a 95 °C en un termociclador i es va deixar refredar en gel.

5.2.1. Hibridació mitjançant cassetes

El porta-objecte prehibridat es va disposar en la camera d'hibridació (Hybridation Cassette, ArrayIt) i es van afegir els cDNAs marcats. Abans de tancar la camera d'hibridació es disposen dues gotes d'aigua MilliQ per mantenir la humitat ambiental i es deixà en un bany amb aigua a 42 °C durant tota la nit.

5.2.2. Hibridació mitjançant l'equip ArrayBooster

En les últimes hibridacions realitzades es va utilitzar l'hibridador automàtic ArrayBooster AB410 (Advalytix) el qual disposa de quatre cameras d'hibridació independents. L'avantatge principal és que disposa d'un sistema d'ultrasons el qual manté en moviment les sondes marcades de manera que la probabilitat de que trobin el ser DNA sonda complementari és major. En la utilització de l'ArrayBooster calen uns

sistemes especials a on es col·loca la mostra anomenats *Advacards* (Advalytix) els quals poden presentar diferents mides en funció de l'àrea del xip en el qual hi ha dipositades les sondes. Per aquest estudi es van utilitzar els *Advacards* de mida intermèdia (AC2B Advalytix) que ens permeten cobrir, com a màxim, una àrea d'aproximadament 13 cm². Aquests *Advacards* requereixen un sistema de rentat just abans i després de ser utilitzats que consisteix en esbandir seqüencialment amb SDS al 0,5 %, aigua MilliQ, etanol absolut, acabant amb aigua MilliQ i finalment assecant-los amb aire comprimit (Sigma, Z379522-1EA). Un cop tenim els *Advacards* nets i secs omplim les banyeres de cadascuna de les cameres d'hibridació que anem a utilitzar amb una solució de formamida al 50 % per mantenir la humitat. El primer pas consisteix en col·locar el microxip prehibridat i sec a l'interior de la camera amb l'*Advacard* i es deixa fins a assolir una temperatura de 42 °C. Un cop assolits els 42 °C es comprova que l'*Advacard* s'ha col·locat correctament i si és així es procedeix a començar el programa de temperatura, temps i nivell de vibració a través d'ultrasons que nosaltres haguem escollit. En el nostre cas vam utilitzar una temperatura de 42 °C durant 16 hores i el nivell de vibració que dóna per defecte l'aparell.

5.3. Rentats

Es van realitzar tres rentats per eliminar les hibridacions no específiques utilitzant vasos de precipitats i agitant amb nuclis magnètics durant 4 minuts. Pel primer rentat es va utilitzar una solució 1x SSC i 0,2 % SDS a 42 °C. La composició de la segona solució de rentat era 0,1x SSC i 0,2 % SDS. La tercera solució només contenia 0,1x SSC. Els dos últims rentats es varen fer a temperatura ambient. Finalment, es realitzen dos rentats amb aigua MilliQ i es centrifuguen els microxips durant 1 minut a 1500 rpm (Centrifugue 5810, Eppendorf) per assecar-los.

6. DETECCIÓ DE LA HIBRIDACIÓ

Per detectar la fluorescència es va utilitzar l'escàner ScanArray 4000 (Packard) dotat de dos làsers. És un escàner de fluorescència basat en la microscopia confocal que mesura la intensitat de fluorescència de cada senyal i genera una imatge virtual que indica la intensitat de fluorescència en cada punt del microxip. També presenta un software específic per la captació i quantificació de les dades (QuantArray).

Es va introduir el microxip rentat i sec dins l'escàner per a realitzar un anàlisi ràpid d'aquest a baixa resolució (50 µm) amb l'objectiu d'ajustar tots els paràmetres (àrea analitzada, potència del làser i sensibilitat del fotomultiplicador). Inicialment es va utilitzar una potència de làser del 80 % i un valor del fotomultiplicador del 70 % i s'ajustava en funció de la intensitat de la imatge obtinguda i del fons. Seguidament es va procedir a un anàlisi de la mostra a una resolució alta (10 µm) i la imatge obtinguda amb cadascun dels làsers quedava guardada com a arxius TIFF i BMP.

Els microxips hibridats es guarden al buit a la foscor en un dessecador (Afora) per si és necessària una lectura posterior. En el nostre laboratori s'ha comprovat que microxips hibridats guardats en el dessecador i en foscor durant aproximadament 4 mesos, la intensitat de senyal obtinguda amb l'escàner de fluorescència és pràcticament igual a la realitzada just després dels rentats.

7. ANÀLISI DE LES DADES

Les imatges guardades com a TIFF generades amb el programa ScanArray van ser analitzades a través del programa QuantArray (Packard). El QuantArray ens permet, a través d'una sèrie de passos, quantificar la intensitat de fluorescència de les diferents senyals del microxip. El primer pas consisteix en la creació d'un protocol per tal d'identificar la posició de cadascuna de les senyals i assignar-li el nom del gen corresponent. Un cop localitzades cadascuna de les senyals es determina el soroll de fons de les regions circumdants per a cadascuna d'elles. La informació generada descriu la intensitat de fluorescència de cada senyal restant-li el valor corresponent al soroll de fons. Aquestes dades poden ser exportades i analitzades en una fulla de càlcul Excel.

Les dades generades requereixen un anàlisi més exhaustiu abans d'identificar els gens que presenten una expressió diferencial. El primer pas és la normalització de les intensitats de fluorescència relatives de cadascun dels fluorocroms analitzats. En aquest estudi vam realitzar la normalització a partir de la totalitat d'intensitat de senyal dels dos canals, ja que en una situació d'estrès esperem que variï l'expressió d'un tan per cent baix respecte el total de gens presents en el microxip, i per tant, la relació entre els dos canals hauria de ser aproximadament 1. Després de la normalització les dades

van ser analitzades amb més detall utilitzant el software SimpliFly i ChipInspector creat per nosaltres mateixos. El SimpliFly en permet introduir una sèrie de condicions per eliminar aquelles senyals artefactuals com són una àrea i una intensitat mínima de senyal, una relació intensitat/fons superior a 5, etc., mentre que el programa ChipInspector ens permet visualitzar les senyals dels dos canals per a cadascun dels gens per acabar d'eliminar els falsos positius.

Els resultats obtinguts de diferents experiments (cinc per a cadascun del temps analitzats en el cas de la soca salvatge i el mutant *cnb1* i tres en el cas del mutant *crz1*) es van combinar i es va calcular la mitjana per a cadascun d'ells. Un gen determinat es considerava induït o reprimat quan la relació entre una situació estrès/no estrès era major o igual a 2,0 o inferior o igual a 0,5 respectivament, com a mínim en tres (en la soca salvatge i *cnb1*) o dos experiments (en la soca *crz1*) i que a més, no hi hagués cap valor d'expressió que s'allunyés de manera estadísticament significativa de la resta per a una condició determinada. Els valors relatius d'expressió van ser transformats logàritmicament en base 2 per un posterior anàlisi estadístic. Es considerava un valor tant induït com reprimat estadísticament significatiu quan la hipòtesi nul·la del test de la *t* de Student donava un valor del logaritme en base 2 diferent de zero. Un valor de *p* menor de 0,1 es va considerar positiu per una selecció inicial de gens. Les diferències entre les tres soques (*wt*, *cnb1* i *crz1*) per a cadascun dels gens seleccionats es va analitzar a través del test ANOVA de mesures repetides, seguit a posteriori del test de Tukey per comparar les tres parelles de soques *cnb1-wt*, *crz1-wt* i *cnb1-crz1* seleccionant aquells gens que presentaven una significació estadística amb un valor de *p* inferior a 0,05. Aquest anàlisi es va dur a terme amb el programa estadístic SAS/STAT release 8,1 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

7.1. Anàlisi mitjançant els programes Cluster i TreeView

S'ha realitzat una agrupació jeràrquica de les dades utilitzant el programa Cluster (Eisen *et al.*, 1998) disponible a la pàgina web <http://rana.stanford.edu>. Es va calcular la mediana dels cinc experiments realitzats en una soca salvatge per a cadascun dels temps analitzats (10, 20 i 45 minuts). Es van seleccionar el conjunt de gens que presentaven una relació entre estrès/no estrès major o igual que 2,0 com a mínim en tres dels cinc experiments realitzats i que no hi hagués cap valor d'expressió que s'allunyés

de manera significativa de la resta. Els valors obtinguts es van transformar logarítmicament en base 2 i es van agrupar en funció de la similitud en els patrons d'expressió entre els diferents gens amb el programa Cluster utilitzant una agrupació jeràrquica i centrada. El *cluster* resultant va ser visualitzat mitjançant el programa TreeView.

7.2. Anàlisi mitjançant el programa GEPAS (CNIO)

Durant la realització d'aquest treball va sorgir una nova eina d'anàlisi de les dades obtingudes mitjançant la tecnologia de microxips de DNA, el programa GEPAS del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas). Es van seleccionar el conjunt de gens que presentaven un valor relatiu d'expressió major o igual a 2 en tres dels cinc experiments realitzats en una soca salvatge per a cadascun dels temps i es va calcular la mediana per aquests gens. Aquests valors van ser transformats logarítmicament en base 2 i van ser agrupats utilitzant el programa SOTA (Self-Organising Tree Algorithm) (Herrero *et al.*, 2001), disponible en la pàgina web <http://bioinfo.cnio.es/sotarray>. Els *clusters* resultants van ser visualitzats mitjançant el programa SotaTree del CNIO.

7.3. Anàlisi dels promotors

Es van analitzar els promotors del conjunt de gens que presentaven un increment dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades en condicions de pH alcalí (pH 8,0) i que la regulació dels quals tenia lloc, en més o menys grau, per la via de senyalització de la calcineurina. Es van buscar les seqüències consens d'unió a Crz1 descrites prèviament com a GAGGCT i les seves dues variants GNGGCKCA i GWGGCTG (Yoshimoto *et al.*, 2002) en les dues cadenes de les regions -1 fins a la -800 per a cadascun d'aquests gens utilitzant un algoritme capaç de reconèixer patrons de DNA (van Helden *et al.*, 2000), el qual es pot trobar a la pàgina web *Regulatory Sequence Analysis Tools* (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>). Per altra banda, es va realitzar una cerca de possibles seqüències consens presents en les dues cadenes de les regions -1/-800 del conjunt de gens identificats com a dependents a la calcineurina en aquest treball. Es va utilitzar un programa d'anàlisi, Pattern Discovery Oligo-analysis (words), basat en la detecció d'oligonucleòtids sobre-representats en la regió promotora (van

Helden *et al.*, 1998) disponible a la pàgina web <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> (*Regulatory Sequence Analysis Tools*). Els paràmetres utilitzats van ser els que dona per defecte el programa realitzant una cerca d'oligonucleotids amb una longitud de 4.

8. COMPROVACIÓ DELS RESULTATS PER ALTRES TÈCNiques

8.1. Northern blot

Pel Northern blot es va realitzar una electroforesi de RNA total (15 µg/carril) en un gel d'agarosa-formaldehid al 0,8 % i es va transferir en una membrana de niló carregada positivament (Roche) a través del buit. Les sondes van ser marcades utilitzant el random primed DNA labelling kit (Roche). Les membranes es van hibridar a 65°C amb un tampó d'hibridació (700 mM NaCl, 40 mM NaH₂PO₄, pH 7,6, 4 mM EDTA, 0,2 % polivinilpirrolidona, 0,2% Ficoll, 0,1% SDS, 0,2 mg/ml de DNA d'esperma de salmó) i 10⁶ cpm/ml del fragment de DNA de 0,65 Kb corresponent a la regió codificant del gen *PNCL* marcat amb ³²P. Els filtres van ser rentats amb SSC 1x (150 mM NaCl, 15 mM citrat sòdic, pH 7,0) i SDS al 0,8 % a 68 °C.

8.2. PCR quantitativa a temps real

A partir de 1 µg de RNA total es va sintetitzar el cDNA per transcripció reversa utilitzant el Reverse Transcription System (Invitrogen). L'anàlisi de l'expressió dels gens *PNCL*, *SPI1*, i *PRB1* utilitzant la PCR quantitativa a temps real es va realitzar a través del programa ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). El gen *RPL28*, l'expressió del qual no s'indueix a pH alcalí, va ser utilitzat com a control. En la reacció d'amplificació es van utilitzar 2 µl d'una dilució 1/100 del producte de cDNA obtingut, 2x SYBRGreen Universal Master Mix (Applied Biosystems), i 900 nM de la parella de primers (ISOGEN Bioscience) dissenyats a través del software Primer Express (Applied Biosystems). Les parelles d'oligonucleòtids utilitzats en l'amplificació van ser els següents: PNC1-Fw, 5'-CAC CCT TCC AGA CAT ATT TCG TT-3', i PNC1-Rw, 5'- ATA CCC TCT TGC GTG GAA TCA T-3'; SPI1-Fw, 5'- CTA GTT CCT CTG TAA TCG TGG TAC CAT-3', i

SPI1-Rw, TGC AGT AGC AGT CGA GTT GTA GAA TAT T; PRB1-Fw, 5'-TGC TTT GGT CAT CCC AAA TCT-3', i PRB1-Rw, 5'-TCT GGG TCT CTC GTG GTG ATC-3'; i RPL28-Fw, 5'-GTT ATC GTC AAA GCT AAA GCT AGA TTC G-3', i RPL28-Rw, 5'-ACC AGC AGC TCT GAT TTT T-3'. Els paràmetres utilitzats en la reacció són els següents: 2 minuts a 50 °C, 10 minuts a 95 °C, i 40 cicles de 15 segons a 95 °C i 1 minut a 60 °C.

9. MICROSCOPIA DE FLUORESCÈNCIA

El plasmidi pLMB127 (Boustany and Cyert, 2002) el qual conté tres còpies en tàndem de la proteïna GFP fusionades amb la regió N-terminal de Crz1 va ser utilitzat per transformar les soques de llevat wt, *cnb1* i *crz1*.

Els cultius en fase exponencial que expressaven la proteïna GFP (OD_{660} de 0.4-0.5) es van créixer fins a una OD_{660} de 1-1,5 a 21 °C en medi sintètic substituint el sulfat d'amoni per clorur d'amoni per reduir la precipitació del $CaCl_2$ i del KOH, i en absència de metionina per induir un alt nivell d'expressió del promotor *MET25* del vector pLMB127 (Stathopoulos-Gerontides *et al*; 1999). Les cèl·lules es van concentrar entre 10 i 20 vegades i es va afegir KOH fins a tenir un pH d'aproximadament 8,0, com a control negatiu es va afegir la mateixa quantitat de KCl i com a control positiu es va utilitzar $CaCl_2$ a una concentració final de 200 mM. Es van col·locar 10 µl a sobre un porta-objectes i seguidament es va visualitzar fent un seguiment al llarg del temps (dels 10 minuts fins a les 2 hores) a través del microscopi de fluorescència Nikon 3800 Eclipse i les imatges van ser capturades a través de la camera integrada Color View 12.

V. RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. AMPLIFICACIÓ D'APROXIMADAMENT 6000 GENS DE *S. cerevisiae* PER A LA CREACIÓ DE MICROXIPS QUE CONTINGUIN LA TOTALITAT DEL SEU GENOMA.

1.1. Generació de les sondes

L'amplificació de tots els ORFs del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* es va realitzar mitjançant tres estratègies diferents. La estratègia inicial (estratègia A) consistia en amplificar els ORFs de llevat a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones de Research Genetics (Martzen *et al.*, 1999) utilitzant els oligonucleòtids universals eYGUF i eYGUR. Es va escollir aquesta biblioteca d'expressió degut a que el seu cost era significativament menor respecte a la utilització d'altres biblioteques que contenien tots els ORFs de llevat amplificats per PCR (De Risi *et al.*, 1997; Hauser *et al.*, 1998). La segona estratègia (B) va venir forçada per l'elevada taxa d'amplificacions negatives obtinguda d'aquells ORFs que presentaven una longitud superior o igual a 3 Kb. L'amplificació d'aquests ORFs es va realitzar a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones dissenyant oligonucleòtids interns a aquests gens de manera que el producte a amplificar presentés una longitud entre 600 i 1200 pb. La tercera estratègia (C) es basava en l'amplificació dels ORFs a partir de DNA genòmic mitjançant els oligonucleòtids comercials GenePairs (Research Genetics) i es va utilitzar per amplificar el conjunt d'ORFs que havien donat un resultat negatiu seguint les estratègies anteriors, a més de 56 ORFs nous descoberts per comparacions globals del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* amb altres espècies de llevat (Blandin *et al.*, 2000). Tots els productes obtinguts van ser reamplificats utilitzant la parella d'oligonucleòtids universals més interns YGUF i YGUR, observant una major homogeneïtat en el rendiment dels productes amplificats.

Les tres estratègies descrites per dur a terme la primera ronda d'amplificacions es van realitzar en col·laboració amb el laboratori de José Enrique Pérez-Ortín de la Universitat de València i el laboratori de Javier Arroyo de la Universitat Computense de Madrid, mentre que les segones rondes d'amplificacions es van realitzar en cadascun dels laboratoris amb l'objectiu que tots disposéssim de les aproximadament 6000 sondes corresponents a tot el genoma de llevat.

1.1.1. Amplificació d'aproximadament 2000 ORFs de llevat en el nostre laboratori

En el nostre laboratori es va amplificar 1/3 del genoma de llevat seguint l'esquema que es mostra en la **figura 16**. El principal problema que ens vam trobar al amplificar els aproximadament 2000 ORFs de llevat va ser que aquells amb una longitud superior 3 Kb donaven un resultat negatiu. Aquest fet era degut a que en les condicions emprades, on la font de DNA era una suspensió de cèl·lules de llevat, la Taq polimerasa no era capaç d'amplificar fragments tant llargs. Per aquest motiu es va decidir dissenyar oligonucleòtids *Forwards* interns a aquests gens de manera que el producte a amplificar fos menor (600-1200 pb). Tot i això alguns gens continuaven donant un resultat negatiu que podria ser degut a l'absència de l'insert o bé a que simplement no estaven presents en la biblioteca, de manera que es va dissenyar un nou oligonucleòtid *Reverse* per a cadascun d'aquests gens per amplificar-los així a partir de DNA genòmic. Per amplificar el conjunt de gens inferiors a 3 Kb que no havien donat un producte satisfactori es va crear una nova estratègia que consistia en l'amplificació a partir de DNA genòmic mitjançant els oligonucleòtids comercials GenePairs.

Els resultats obtinguts de les amplificacions utilitzant les estratègies descrites anteriorment han estat classificats en tres categories diferents. La primera categoria correspon a les amplificacions considerades correctes (OK), és a dir, aquelles que presenten el tamany esperat, no presenten bandes addicionals, i la seva concentració és superior o igual a 200 ng/ μ l. En la segona categoria s'hi han inclòs aquells productes d'amplificació que no eren del tot òptims (R): això significa que presentaven una concentració inferior a 200 ng/ μ l o bé hi havia bandes addicionals en quantitats minoritàries. Finalment, la tercera categoria (N) es corresponia a les reaccions a on el producte obtingut no era detectable, o bé que la longitud de la banda no era l'esperada. Cal destacar que un tant per cent important dels ORFs que havien donat un resultat negatiu o subòptim en la primera ronda d'amplificacions passaven a donar una banda correcte al ser reamplificats, com es pot observar en la **figura 17**.

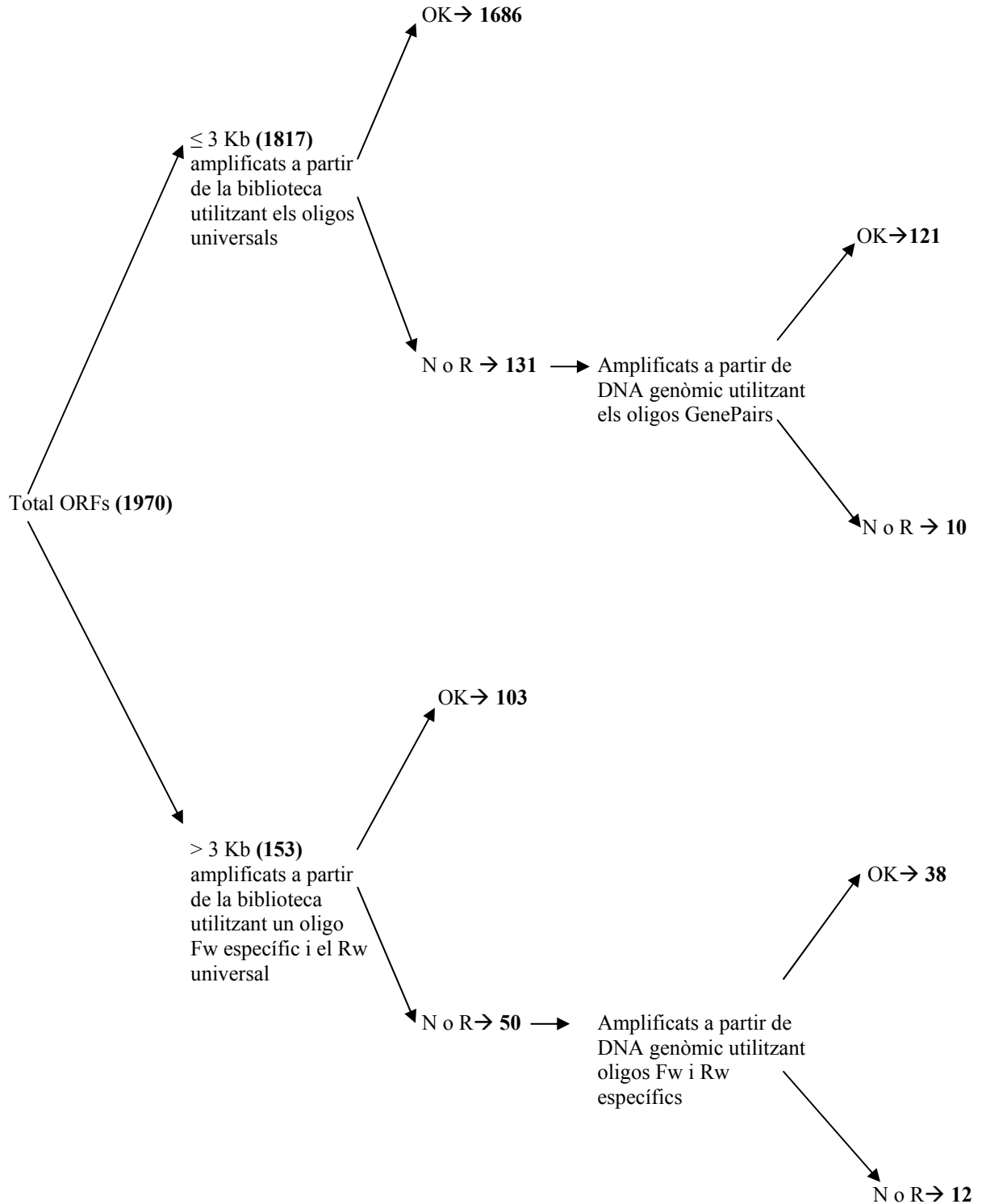


Figura 16. Esquema de les diferents estratègies utilitzades i els resultats obtinguts de l'amplificació de 1970 ORFs de *Saccharomyces cerevisiae*. Els resultats presentats en aquesta figura fan referència als productes obtinguts de les segona ronda d'amplificacions i es representen amb els símbols: OK (amplificació correcta), R (producte amplificat de baixa concentració o que presenta bandes addicionals minoritàries) i N (amplificació negativa).

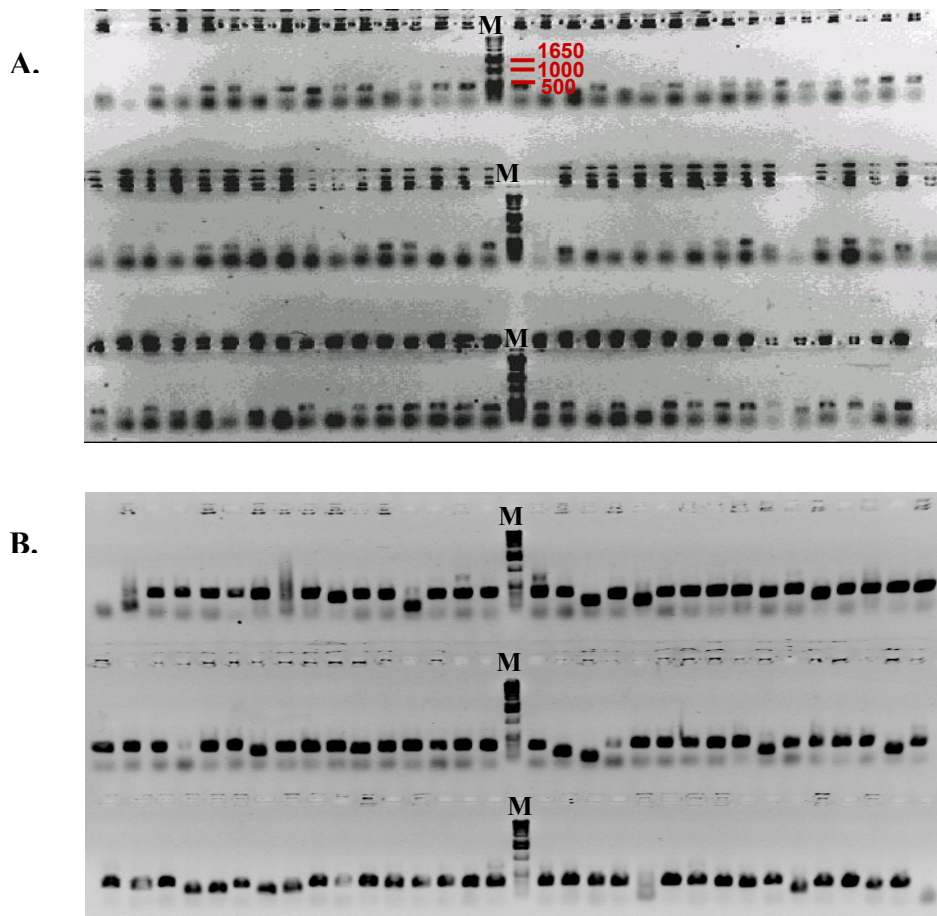


Figura 17. Amplificació a partir de la biblioteca Yeast Exclones de 94 ORFs que presenten un rang de longituds entre 300 i 500 pb. A. Es mostra el resultat de la primera ronda d'amplificacions. **B.** Es mostra el resultat de la segona ronda d'amplificacions. El marcador de pes molecular (1Kb, Gibco) es mostra amb la lletra M i en color vermell s'indica la longitud en pb d'algunes de les bandes.

Els resultats obtinguts de la primera i segona ronda d'amplificacions realitzades a partir de la biblioteca Yeast Exclones amb els oligonucleòtids eYGUF i eYGUR es mostren en la **figura 18**. Dels 1970 ORFs que ens havíem proposat amplificar es va obtenir un producte satisfactori en les primeres amplificacions de 1537 (78 %). Aquests productes van ser sotmesos a una segona ronda d'amplificacions utilitzant una parella oligonucleòtids més interns (YGUF i YGUR) augmentant el percentatge d'èxit fins a un 86 % (1686 ORFs d'un total de 1970).

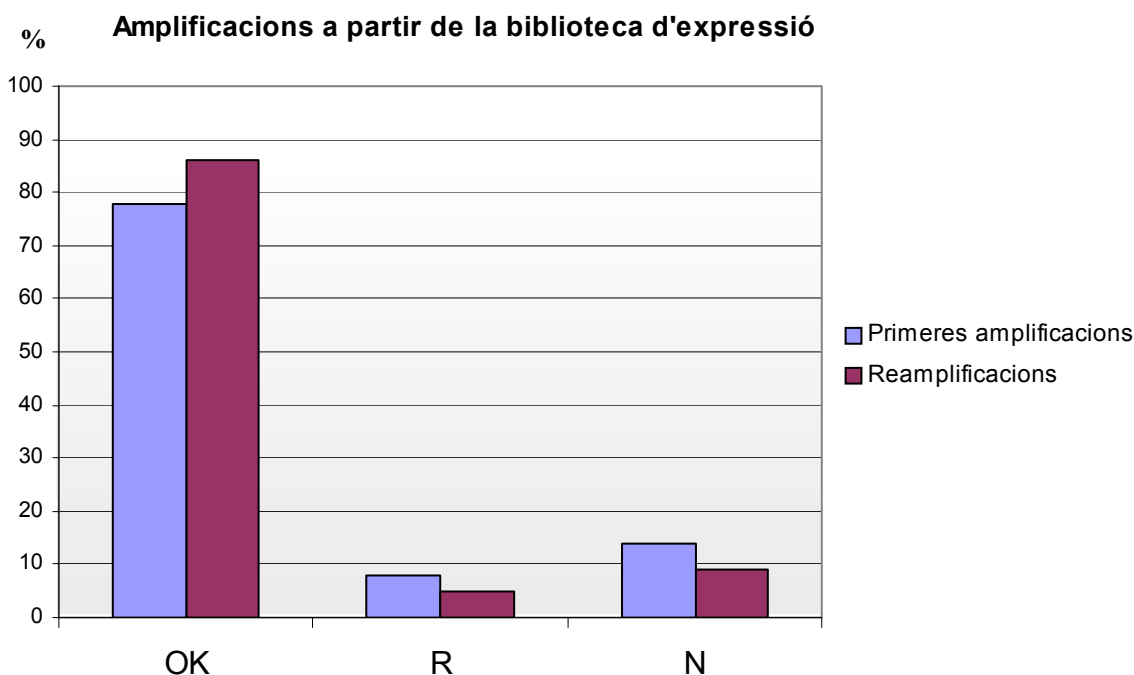


Figura 18. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'amplificació a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones. Resultats de les primeres amplificacions: 78 % OK, 8 % R i 14% N. Resultats de les reamplificacions: 86 % OK, 5 % R i 9% N.

És interessant comentar que al reamplificar alguns ORFs que presentaven una primera amplificació correcte (**figura 19 A**) s'obtenia un producte que migrava de manera molt heterogènia (*smear*), (**figura 19 B**). Aquest fet era degut a que la concentració dels productes de la primera amplificació era massa elevada, ja que diluint 1/100 el material de partida i reduint la concentració de Taq polimerasa (1 unitat) en la reacció, les bandes obtingudes passaven a ser correctes (**figura 19 C**). També es van observar alguns casos en què el producte de l'amplificació donava lloc a fragments molt petits just per sobre de la banda corresponent als oligonucleòtids, fet que creiem podria ser degut a l'absència de l'insert en el plasmidi.

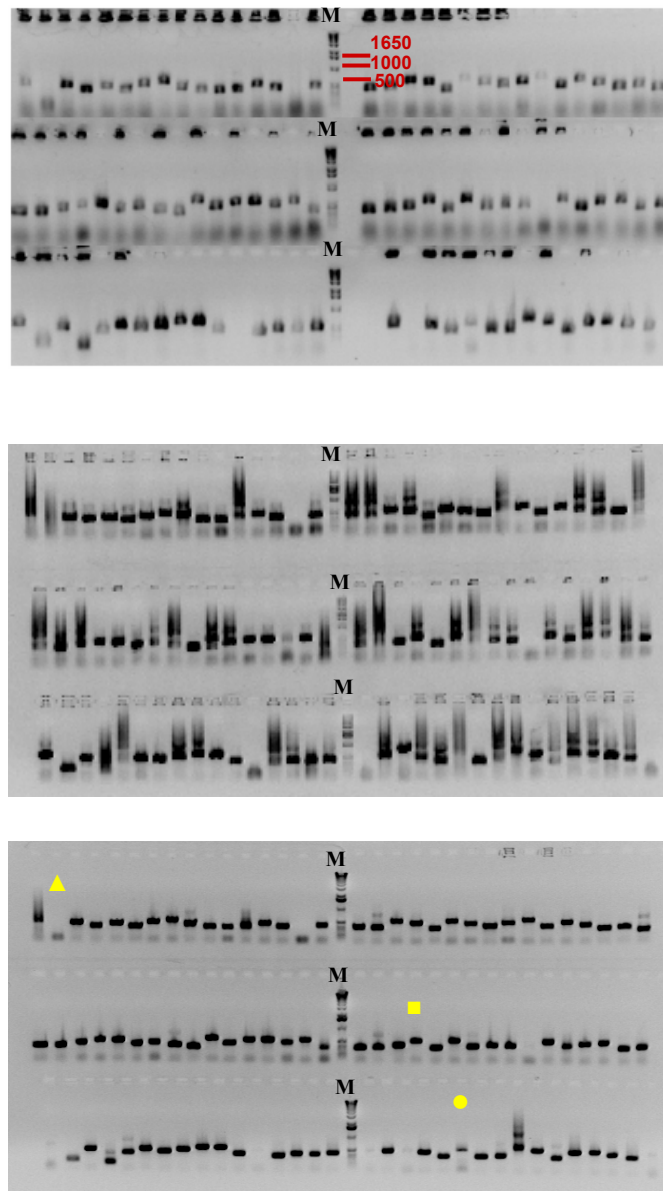


Figura 19. Exemples dels resultats obtinguts de la primera i segona ronda d'amplificacions de 95 ORFs seguint la estratègia A. A. Resultats de la primera ronda d'amplificacions **B.** Reamplificació utilitzant les condicions estàndards. **C.** Reamplificació diluint 1/100 i disminuint la quantitat de Taq Polimerasa a 1 unitat per reacció. Amb el símbol d'un quadrat es mostra un exemple d'una amplificació correcta, amb un triangle es mostra un exemple d'absència d'insert en el plasmidi i amb un cercle es mostra un cas d'amplificació subòptima (concentració inferior a 200 ng/ μ l). El marcador de pes molecular (1kb, Gibco) s'indica amb la lletra M i es mostra la longitud en pb d'algunes de les bandes en vermell.

En alguns casos es va observar que a part de la banda de longitud esperada s'amplificaven bandes addicionals. Aquestes bandes van ser seqüenciades i es va comprovar que la majoria corresponien a fragments del gen de longitud inferior o a multimers de la seqüència original. Per tant, aquestes reaccions es van considerar positives ja que no suposaven cap problema a l'hora de ser utilitzades com a sondes per a generar microxips de DNA. En alguns casos, aquestes bandes presentaven una seqüència diferent de l'esperada i, per tant, van ser considerades com a amplificacions negatives les quals van ser posteriorment amplificades a partir de DNA genòmic amb els oligonucleòtids comercials GenePairs (Research Genetics). Per altra banda, es van seqüenciar un 5 % dels productes positius de PCR seleccionats a l'atzar i en tots ells les seqüències obtingudes van ser correctes.

Els ORFs inferiors a 3 Kb que no van poder ser amplificats a partir de la biblioteca d'expressió es van amplificar a partir de DNA genòmic utilitzant els oligonucleòtids comercials GenePairs (Research Genetics). Dels 131 clons que van ser amplificats seguint aquesta estratègia, es va obtenir un producte correcte de la primera amplificació de 83 ORFs (63 %), mentre que l'eficiència de les reamplificacions va ser significativament major obtenint reamplificacions correctes de 121 ORFs (92 %), veure **figura 20**. El fet que es recuperessin pràcticament un 30 % dels ORFs (38 d'un total de 131) es podria atribuir a que en la primera amplificació obteníem una banda de concentració molt baixa que no visualitzàvem per electroforesi en gel d'agarosa utilitzant les condicions estàndard (2,5 µl de mostra carregada i 0,1 de nivell d'integració en un equip Gel Doc 2000, Bio Rad), mentre que al ser sotmeses a una segona ronda d'amplificacions passaven a donar una banda visible i satisfactòria.

% Clons amplificats a partir de DNA genòmic amb oligonucleòtids Genepairs

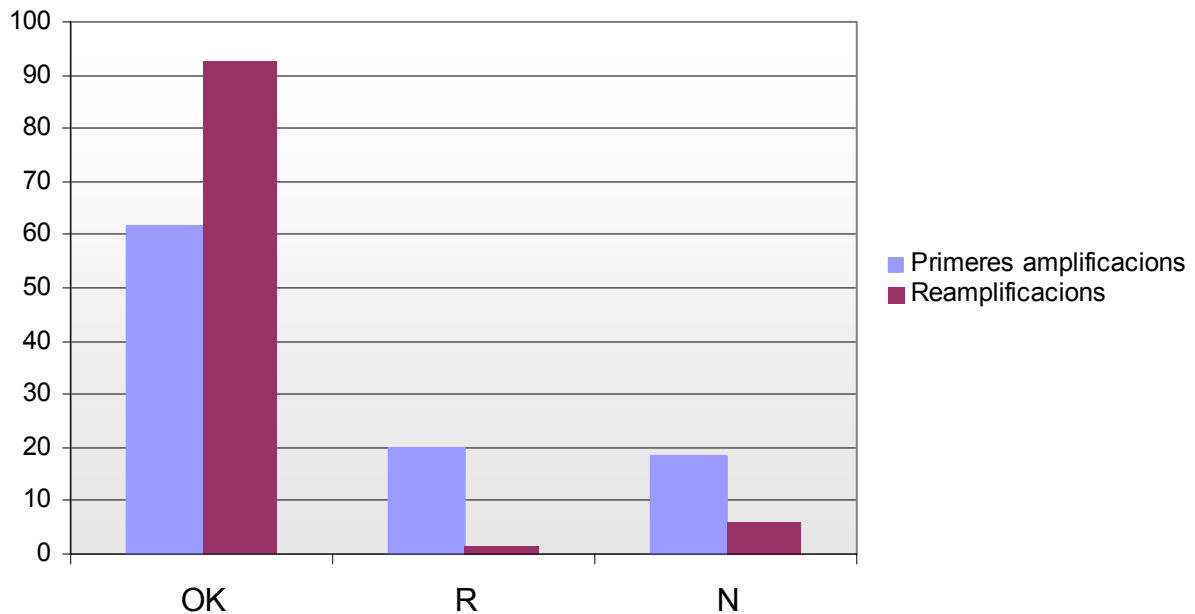


Figura 20. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'amplificació a partir de DNA genòmic utilitzant els oligonucleòtids GenePairs (ResearchGenetics). Resultats de les primeres amplificacions: 63 % OK, 20 % R i 17 % N. Resultats de les reamplificacions: 92 % OK, 1 % R i 7 % N.

Com a conseqüència de l'experiència negativa obtinguda al amplificar ORFs de longitud superior a 3 Kb a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones es van generar oligonucleòtids específics per aquests gens amb una cua YGUF en l'extrem 5', de manera que el producte a amplificar, fent servir eYGUR com a segon oligonucleòtid, presentés una longitud de 600 a 1200 parells de bases i pogués ser reamplificat amb els oligonucleòtids estàndards YGUF i YGUR. Tal i com es mostra en la **figura 21**, el percentatge aparent d'èxit obtingut en la primera amplificació utilitzant aquesta nova estratègia va ser molt baix (12 %), mentre que els productes obtinguts en la reamplificació ha estat d'un 67 % (103 d'un total de 153). Aquest fet podria ser degut a que cadascun dels ORFs es va amplificar a partir d'un oligonucleòtid *Forward* específic diferent i en canvi, les condicions d'amplificació van ser les mateixes per a tots ja que es realitzaven conjuntament en plaques de 96 pous o bé, tal i com s'ha comentat anteriorment, per l'absència de l'insert en el plasmidi.

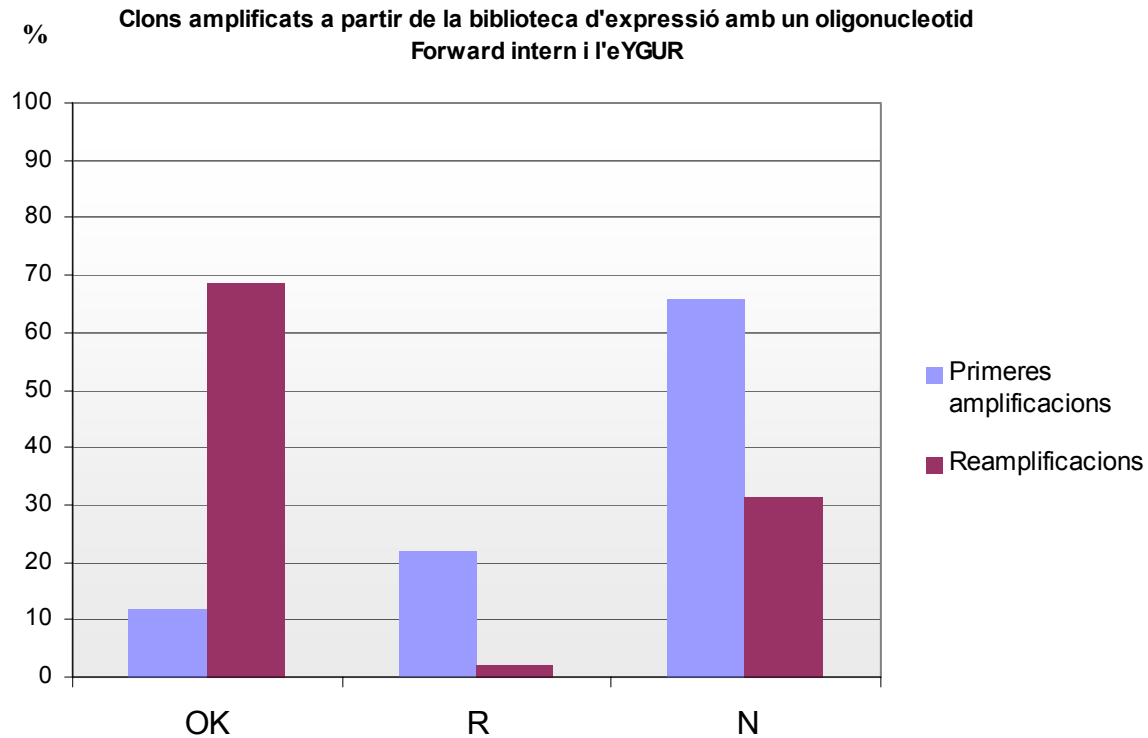


Figura 21. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'amplificació a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones dels ORFs que presenten un tamany major de 3 Kb. Resultats de les primeres amplificacions: 12 % OK, 22 % R i 66 % N. Resultats de les reamplificacions: 67 % OK, 2 % R i 31 % N.

Finalment, tots aquells ORFs de més de 3 Kb que no van poder ser amplificats a partir de la biblioteca d'expressió utilitzant un oligonucleòtid intern al gen i l'eYGUR es van amplificar a partir de DNA genòmic utilitzant el mateix oligonucleòtid *Forward* i un nou oligonucleòtid *Reverse* de la regió 3' del gen. Els resultats en la primera ronda d'amplificacions van ser l'obtenció d'un producte satisfactori de 33 gens d'un total de 50 (66 %) i en la segona ronda d'amplificacions es va obtenir un producte correcte de 38 ORFs (76 %), veure **figura 22**.

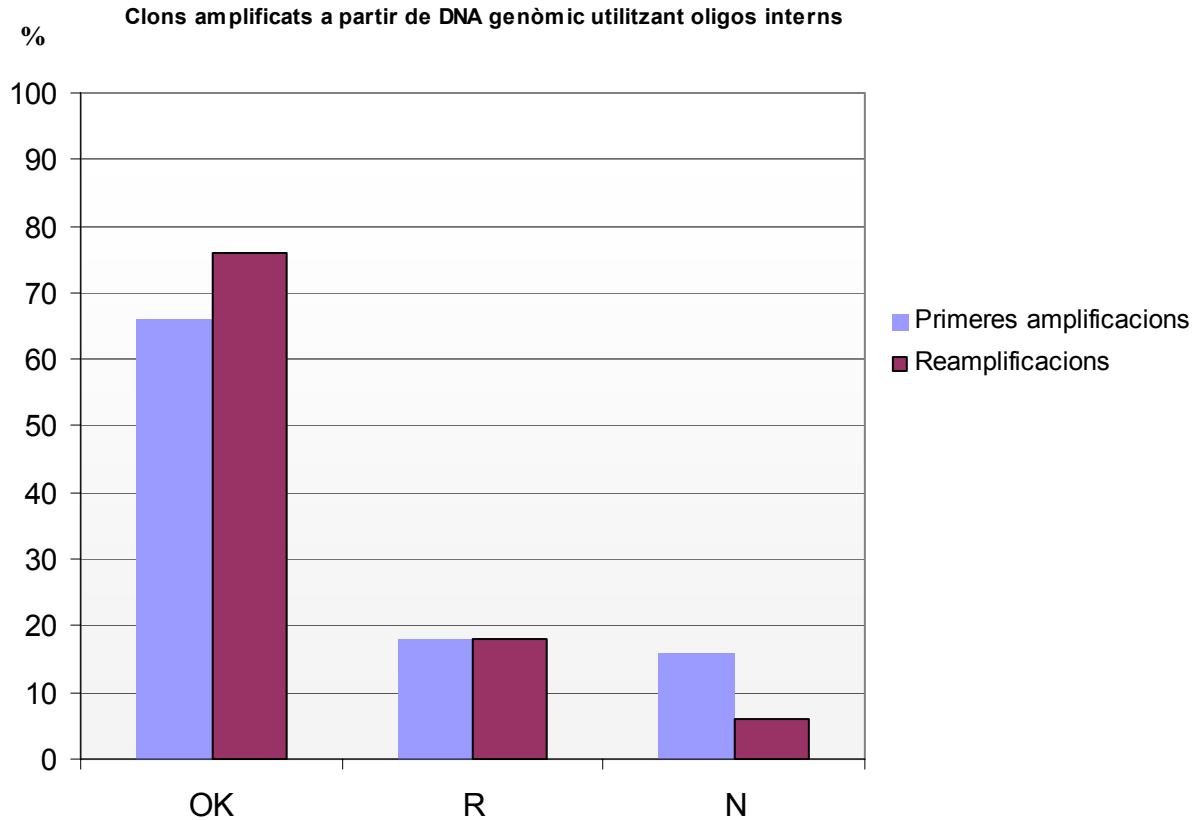


Figura 22. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'amplificació dels ORFs majors de 3 Kb a partir de DNA genòmic utilitzant un oligonucleòtid *Forward* intern al gen i un *Reverse* de la regió 3'. Resultats de les primeres amplificacions: 66 % OK, 18 % R i 16 % N. Resultats de les reamplificacions: 76 % OK, 18% R i 6 % N.

El resultat final obtingut en els nostre laboratori utilitzant les diferents estratègies mostrades ha estat que dels 1970 ORFs que ens havíem proposat amplificar es va obtenir un producte correcte (OK) de 1948 (99 %), un producte subòptim (R) de 6 i un total de negatius (N) de 16 gens. Davant d'aquests resultats podem concloure que les diferents estratègies creades com a conseqüència dels problemes observats al amplificar els ORFs a partir de la biblioteca Yeast Exclones (Research Genetics) ens ha permès amplificar 1/3 del genoma de llevat obtenint un percentatge d'èxit final del 99 %.

1.1.2. Amplificació de tot el genoma de llevat en col·laboració amb altres laboratoris

Els resultats obtinguts de l'amplificació dels aproximadament 6000 ORFs de llevat amb la col·laboració dels laboratoris de José Enrique Pérez-Ortín (UV) i el laboratori de Javier Arroyo de la (UCM) es mostren en la **figura 24**. En aquesta figura es mostra el percentatge d'èxit obtingut utilitzant l'estratègia inicial en la qual s'amplificaven els ORFs de llevat a partir de la biblioteca d'expressió Yeast Exclones utilitzant els oligonucleòtids eYGUF/eYGUR (estratègia A), l'amplificació dels ORFs ≥ 3 Kb utilitzant un oligonucleòtid intern al gen (estratègia B), o bé amplificant els ORFs a partir de DNA genòmic mitjançant els oligonucleòtids GenePairs (ResearchGenetics), estratègia C.

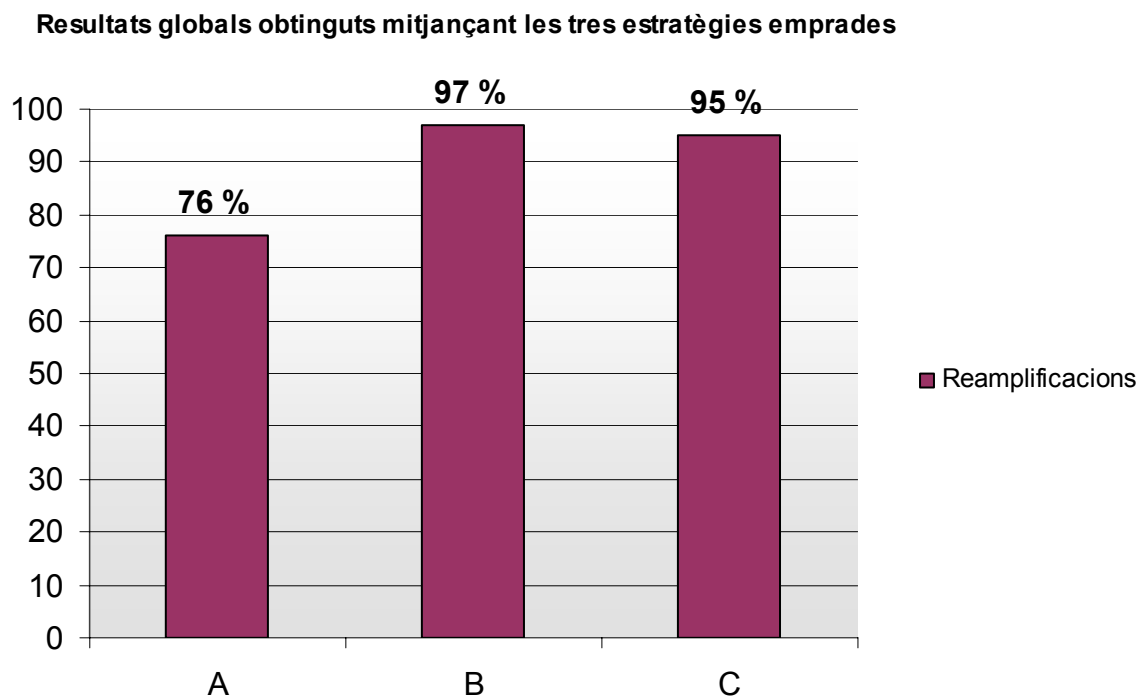


Figura 23. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'amplificació de 6073 ORFs de llevat. A. Amplificació utilitzant la biblioteca Yeast Exclones (Research Genetics). **B.** Amplificació dels ORFs ≥ 3 Kb utilitzant oligonucleòtids interns a partir de la biblioteca Yeast Exclones. **C.** Amplificació a partir de DNA genòmic utilitzant els oligonucleòtids comercials GenePairs (ResearchGenetics).

Dels 6080 clons presents en la biblioteca d'expressió Yeast Exclones es van amplificar satisfactòriament seguint la primera estratègia (A) 4563 ORFs (76 %). Mitjançant la estratègia B es van amplificar satisfactòriament 452 ORFs d'un total de 466 (97 %). Finalment utilitzant la estratègia C es van amplificar 1029 gens d'un total de 1080 (95 %) incloent l'amplificació de 56 ORFs nous no presents en la biblioteca descoberts per comparacions globals del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* amb altres espècies de llevat (Blandin *et al.*, 2000). El resultat global en col·laboració amb els altres laboratoris va ser la obtenció de 6073 sondes (Alberola *et al.*, 2004) les quals van ser posteriorment utilitzades per generar microxips de DNA que contenien el genoma sencer del llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

Comparant els resultats globals amb els obtinguts en el nostre laboratori es pot observar que el percentatge d'èxit obtingut seguint la estratègia A va ser major en les amplificacions realitzades en el nostre laboratori (86 % respecte a un 76 %). En canvi, utilitzant l'estratègia B es va obtenir un 97 % d'amplificacions correctes en els resultats globals, mentre que en el nostre laboratori el percentatge d'èxit va ser del 67 %. Finalment, els percentatges d'èxit obtinguts mitjançant la estratègia C van ser del 95 % en els resultats globals i del 92 % en els resultats obtinguts en el nostre laboratori. Aquest percentatge relativament baix obtingut en el nostre laboratori mitjançant l'estratègia B (67 %) es va millorar fins a un 92 % dissenyant un nou oligonucleòtid *Reverse* per aquells ORFs que havien donat un resultat negatiu i amplificant-los a partir de DNA genòmic. Davant d'aquests resultats podem concloure que els percentatges d'èxit obtinguts en el nostre laboratori són molt similars als obtinguts en la resta de grups col·laboradors.

1.2. Posada a punt de la tecnologia de microxips de DNA

Abans de generar microxips que continguessin tot el genoma de llevat es va decidir crear un microxip amb una selecció de 286 gens els quals, segons estudis previs (Causton *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002), presentaven una augment dels nivells de mRNA a temps relativament curts enfront a aquesta condició d'estrès. Aquest xip també contenia una sèrie de controls positius (tres còpies del gens gen *RPL28* que codifica una proteïna ribosomal) i negatius (tres còpies del fragment dels promotors dels gens *ENAI* i *PHO84*, tres cDNAs de ratolí i 28 mostres que només contenien DMSO al 50 %).

L'objectiu de la creació d'aquest microxip va ser posar a punt les tècniques de deposició de les sondes, marcatge de les mostres, prehibridació, hibridació i rentats.

La tecnologia seleccionada per dipositar el DNA sonda va ser el *microspotting* utilitzant el robot MicroGrid II (BioRobotics). En aquest estudi les sondes van ser redistribuïdes en plaques de 384 pous i dipositades mitjançant les agulles Microspot 2500 (BioRobotics). Es va decidir resuspendre les sondes en DMSO a una concentració del 50 % degut a que ofereix una sèrie d'avantatges respecte a les solucions d'elevada concentració salina, com són la desnaturalització del DNA permetent una millor unió al porta-objectes i la disminució de l'evaporació durant el procés de deposició de les sondes gràcies a les seves propietats higroscòpiques. Es van realitzar algunes proves variant la concentració de DMSO observant que és un factor determinant en el tamany de les microgotes: a una concentració del 30 % de DMSO el diàmetre de les gotes dipositades era menor a l'obtingut una concentració del 50 %. Es va decidir utilitzar DMSO a una concentració del 50 % degut a que suposa una major protecció enfront a l'evaporació i a que per a la deposició d'aproximadament 6000 gens no representava un problema d'espai entre gotes. Es va comprovar que després de diversos cicles de congelació i descongelació de les sondes no s'observava una evaporació significativa.

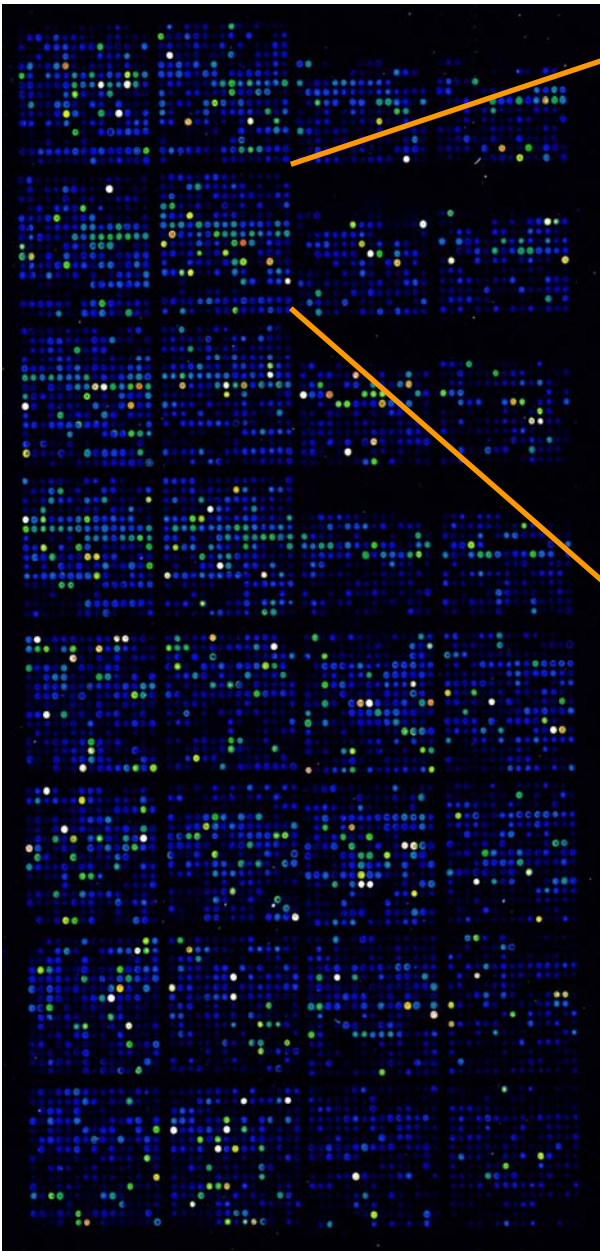
Les sondes han de ser dipositades sobre un porta-objectes de vidre modificat, principalment amb grups amina o aldehyd. S'ha demostrat que la utilització de porta-objectes modificats amb grups amina donen com a resultat una major intensitat de senyal (Hedge *et al.*, 2000). Per aquest motiu es van fer diverses proves dipositant les sondes en porta-objectes que presentessin aquest tipus de modificacions (SuperAmine, ArrayIt; Genorama SA-1, Asper Biotech; CMT-Ultragaps, Corning). Utilitzant els porta-objectes SuperAmine (ArrayIt) s'obtenia una imatge amb un bon fons, però la majoria de gotes presentaven forma de *donut*. En canvi, els CMT-Ultragaps (Corning) i els Genorama SA-1 (Asper Biotech) presentaven una major uniformitat en la morfologia de les gotes i també un bon fons. Per dipositar les sondes es van utilitzar 8 agulles amb una configuració de 4x2 degut a que el nombre de sondes a dipositar era relativament reduït i, a més, la zona impresa quedava més compactada.

Un altra punt a tenir en compte a l'hora de realitzar experiments amb microxips de DNA és la elecció del marcatge directe o indirecte de les mostres de RNA total. Per aquest motiu es van realitzar proves amb un Kit de marcatge directe (RPN6200, Amersham) i un d'indirecte (RPN5660, Amersham). Els resultats obtinguts utilitzant el Kit de marcatge directe van ser que 245 gens dels 286 presentaven un augment dels nivells transcripcionals de dues o més vegades després de 10 minuts d'exposició a pH alcalí, mentre que utilitzant el marcatge indirecte el nombre de gens que van presentar un increment dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades va ser de 227 dels quals 221 es trobaven en la llista anterior. Degut a que les diferències observades entre aquests dos tipus de marcatge no eren significatives i que el protocol pel marcatge directe de les mostres és més ràpid es va decidir continuar aquest treball utilitzant el Kit de marcatge directe.

Els protocols utilitzats per realitzar els processos de prehibridació, hibridació i rentats van ser extrets dels protocols del TIGR (The Institute for Genomic Research), (Hegde *et al.*, 2000) amb lleugeres modificacions (veure apartat 5 de Materials i Mètodes).

Un cop posada a punt la tecnologia de microxips de DNA es van generar els microxips que contenien tot el genoma de llevat, a més d'aquests 286 gens els quals estaven duplicats, un conjunt de 40 gens seleccionats a l'atzar i una sèrie de controls positius i negatius (veure **figura 24**).

A.



B.

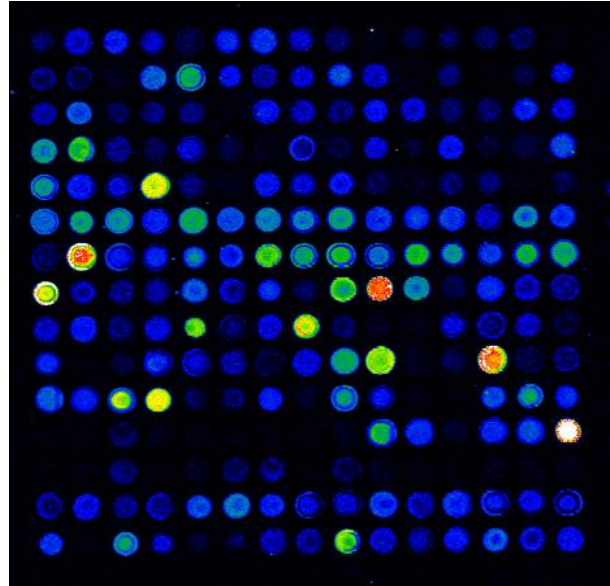


Figura 24. **A.** Resultat obtingut de la hibridació del microxip generat en el nostre laboratori mitjançant l'escàner ScanArray 4000 (Packard). Aquesta imatge correspon a una mostra de RNA marcada amb el fluorocrom Cy5. **B.** Ampliació d'un dels blocs de la figura A. La configuració de cadascun dels blocs és de 15 x 15 deposicions amb una distància entre elles de 0,285mm.

2. ESTUDI DE LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL DE *S. cerevisiae* A pH ALCALÍ.

El pH extracel·lular és una senyal ambiental clau que influeix en el creixement, fisiologia i diferenciació cel·lular. *Saccharomyces cerevisiae* creix bé en un rang de pH relativament ampli, tot i que creix més ràpidament a pH àcid. Per tant, en aquest organisme l'exposició a pH lleugerament alcalí es pot considerar una situació d'estrès. Quan es va iniciar aquest treball la resposta transcripcional a estrès per pH alcalí en aquest llevat estava molt poc estudiada. Per aquest motiu i aprofitant el desenvolupament de la tecnologia de microxips de DNA en el nostre laboratori ens vam proposar realitzar un anàlisi exhaustiu de la resposta transcripcional de *S. cerevisiae* a pH alcalí utilitzant aquesta tecnologia. Durant la realització d'aquest treball altres laboratoris també es van interessar en l'estudi de la resposta a pH alcalí, ampliant així l'escassa informació que es tenia fins al moment (Causton *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001).

S'ha demostrat que les respostes transcripcionals presenten diferències significatives en funció del temps d'exposició a la condició d'estrès (Posas *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001; Gash *et al.*, 2000), per aquest motiu es va decidir realitzar un anàlisi de la resposta transcripcional de *S. cerevisiae* a diferents temps enfront a l'exposició a pH alcalí. Els temps analitzats van ser 10, 20 i 45 minuts, ja que en estudis previs s'havia observat que la resposta transcripcional davant d'aquesta condició era relativament ràpida (Serrano *et al.*, 2002; Causton *et al.*, 2001). Aquests anàlisis mitjançant la tecnologia de microxips de DNA ens ha permès conèixer el conjunt de gens del genoma de llevat que presenten canvis significatius en els nivells d'expressió i estudiar com varia aquesta resposta al llarg del temps. A més, s'ha comparat la resposta transcripcional obtinguda en cèl·lules mutants *cnb1* i *crz1* respecte a l'obtinguda en cèl·lules salvatges. Degut a l'elevada quantitat d'informació generada, només els aspectes més rellevants es presentaran en aquesta tesi. La totalitat de les dades es presenten *on line* a la pàgina web <http://quiro.uab.es/jarino>.

2.1. Disseny experimental utilitzat per realitzar els experiments amb microxips de DNA.

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 1.1 de la introducció, abans de començar qualsevol experiment amb microxips de DNA és necessari escollir un bon disseny experimental. Aquest disseny dependrà principalment de l'objectiu del nostre estudi, però també del nombre d'experiments que es poden realitzar en funció de la disponibilitat econòmica i de la quantitat de mostres que disposem. En aquest estudi l'objectiu que volíem assolir era conèixer el nombre de gens que responien davant d'una situació d'alcalinització intensa del medi extracel·lular, a més d'estudiar la variació d'aquesta resposta transcripcional al llarg del temps. Es va utilitzar un disseny que pren una mostra com a referència (RNA extret a partir de cèl·lules salvatges crescudes a pH 6,2) la qual s'utilitza com a control per comparar-la amb la resta de mostres que volem analitzar (extraccions de RNA a partir de cèl·lules salvatges exposades a pH 8,0 durant 10, 20 i 45 minuts), veure **figura 25** (Churchill, 2002; Yang and Speed, 2002).

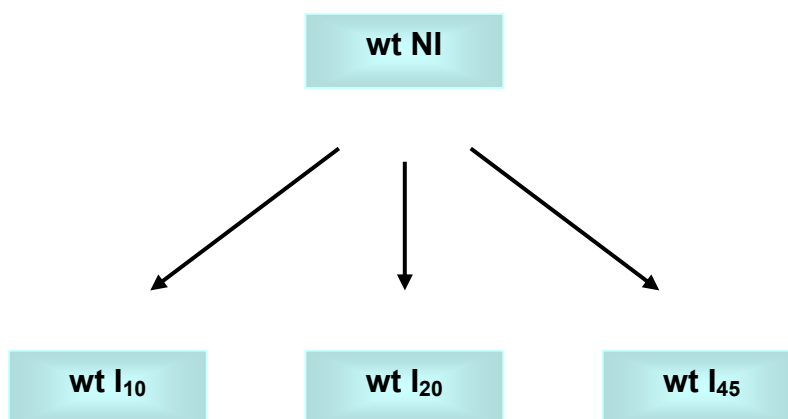


Figura 25. Disseny experimental utilitzat per analitzar la resposta transcripcional a pH alcalí a diferents temps (10, 20 i 45 minuts). Aquest disseny pren com a referència la mostra corresponent al RNA extret de la soca salvatge crescuda a pH 6,2 (indicat com a wt NI). La mostra de referència es compara (indicat amb les fletxes) amb les mostres de RNA obtingudes a partir d'aquesta mateixa soca exposada a pH 8,0 durant 10, 20 i 45 minuts respectivament (indicat com a wt I₁₀, wt I₂₀ i wt I₄₅).

Per altra banda, un bon disseny experimental també inclou un nombre de rèpliques tècniques i biològiques, a més de la necessitat de realitzar el marcatge recíproc per eliminar les diferències d'incorporació observades entre els diferents fluorocroms (Lee *et al.*, 2000; Yang and Speed, 2002; Kerr and Churchill, 2001) . En aquest estudi es van realitzar 5 experiments per a cadascun dels temps: tres corresponien a rèpliques biològiques (mostres que provenen d'extraccions de RNA diferents), mentre que els altres dos corresponien a rèpliques tècniques (mostres que provenen de la mateixa extracció de RNA) en les quals s'havia realitzat el marcatge recíproc (**figura 26**).

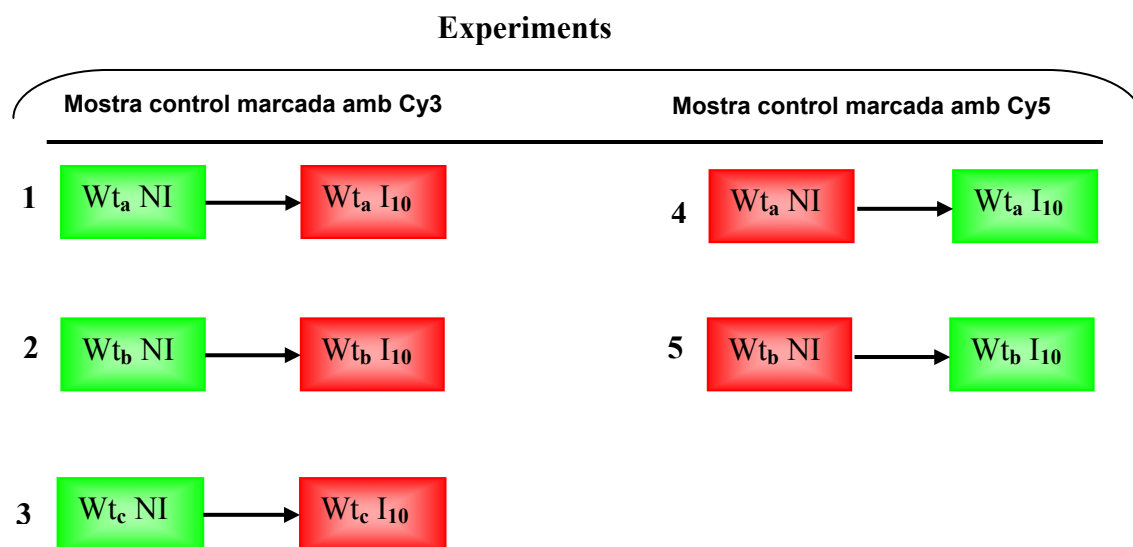


Figura 26. Esquema de les cinc rèpliques realitzades als 10 minuts d'inducció per pH alcalí (indicades com **1, 2, 3, 4 i 5**). Els subíndexs **a, b i c** ens mostren les diferents extraccions de RNA. Els quadrats representen les diferents condicions analitzades en cadascun dels experiments, **wt NI** (soca salvatge crescuda en condicions normals i **wt I₁₀** (soca salvatge sotmesa durant 10 minuts a pH alcalí). En color verd s'indica la mostra marcada amb el fluorocrom Cy3, mentre que en vermell s'indica la mostra marcada amb Cy5. Les fletxes indiquen les dues mostres que es comparen en cadascun dels experiments. Els experiments **1, 2 i 3** serien rèpliques biològiques, mentre que **4 i 5** es correspondrien als marcatges recíprocs de **1 i 2** respectivament. Aquest mateix esquema es pot aplicar en la exposició a 20 i 45 minuts a pH alcalí.

A través d'aquest disseny experimental obtenim un valor d'expressió per a cadascun dels gens corresponent a la relació entre la mostra problema (induïda durant 10, 20 i 45 minuts per pH alcalí) i la mostra control que prenem com a referència (no sotmesa a un estrès per pH alcalí). El fet d'utilitzar la mateixa mostra com a referència en tots els experiments ens permet comparar directament els valor d'expressió obtinguts en els diferents temps. Es va pensar que aquest podria ser un bon disseny experimental, ja que l'anàlisi i interpretació dels resultats era relativament fàcil en comparació amb altres tipus de disseny (ex: *loops*) i, a més, s'inclouen tant rèpliques tècniques amb biològiques.

2.2. Anàlisi del conjunt de gens que presenten un augment dels nivells de mRNA com a resposta a l'exposició a pH alcalí.

2.2.1. Anàlisi global

Mitjançant un anàlisi estadístic (veure apartat 7 de material i mètodes) dels cinc experiments realitzats s'han identificat 266 gens que presenten un augment en la seva expressió de, com a mínim, dues vegades després de l'exposició a pH alcalí durant 10, 20 i/o 45 minuts (Viladevall *et al.*, 2004). D'aquests 266 gens, 159 presenten un pic màxim d'expressió als 10 minuts (resposta primerenca), 86 als 20 minuts (resposta intermèdia) i només 21 presenten una resposta tardana (pic d'expressió als 45 minuts), veure **taula 5**. Aquests 266 gens es van agrupar utilitzant el programa Cluster i mostrant els resultats obtinguts a través del TreeView (Eisen *et al.*, 1998), veure **figura 27**. Utilitzant aquest sistema d'agrupació es pot veure molt clarament el nivell d'inducció dels diferents gens al llarg del temps.

Taula 5. Gens induïts com a mínim dues vegades després de l'exposició a pH alcalí. Els valors d'expressió corresponen a la inducció màxima observada. La columna temps indica la cinètica de la resposta. Els gens que presenten un pic màxim d'inducció als 10 minuts estan indicats amb la lletra P (primerencs), I (intermedis) indica un pic a als 20 minuts, i T (tardans) correspon als gens que presenten el pic màxim d'expressió després de 45 minuts d'exposició a pH alcalí. Les categories funcionals es van assignar basant-nos en la informació continguda en el MIPS (Mewes *et al.*, 2002) i el SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002). Els gens amb negreta s'ha observat que també estan induïts per pH alcalí en un treball anterior (Serrano *et al.*, 2002).

ORF	Gen	temps	Inc.	ORF	Gen	temps	Inc.	ORF	Gen	temps	Inc.
Metabolisme carbohidrats/Energia				Altres metabolismes				Resposta a estress			
YAL060W	<i>BDH1</i>	P	4.6	YAL044C	<i>GCV3</i>	P	2.0	YBL064C [3]	<i>PRX1</i>	I	5.4
YAL061W [3]		P	13.3	YAR015W	<i>ADE1</i>	P	3.1	YBR001C	<i>NTH2</i>	P	2.4
YBL015W	<i>ACH1</i>	P	2.1	YBL042C	<i>FUI1</i>	T	3.7	YBR006W	<i>UGA2</i>	P	2.5
YBL045C	<i>COR1</i>	P	3.2	YBR035C	<i>PDX3</i>	T	2.1	YBR072W [3]	<i>HSP26</i>	I	2.4
YBR149W [3]	<i>ARA1</i>	P	3.2	YBR177C	<i>EHT1</i>	P	3.1	YBR126C [3]	<i>TPS1</i>	P	2.6
YCL040W [3]	<i>GLK1</i>	P	7.4	YBR256C	<i>RIB5</i>	I	2.9	YBR132C	<i>AGP2</i>	P	6.0
YCR005C	<i>CIT2</i>	I	7.0	YCL030C	<i>HIS4</i>	P	5.9	YBR244W	<i>GPX2</i>	I	2.2
YDL004W	<i>ATP16</i>	I	2.1	YDL080C	<i>THI3</i>	P	2.6	YCL035C [3]	<i>GRX1</i>	I	2.1
YDL022W [1,3]	<i>GPD1</i>	P	4.7	YDR019C	<i>GCV1</i>	P	2.1	YDR074W [1,3]	<i>TPS2</i>	P	3.2
YDR148C	<i>KGD2</i>	P	2.4	YDR368W [3]	<i>YPR1</i>	I	2.6	YDR171W [3]	<i>HSP42</i>	P	4.5
YDR178W	<i>SDH4</i>	P	2.7	YER026C	<i>CHO1</i>	I	2.0	YDR258C [3]	<i>HSP78</i>	P	7.8
YEL011W [3]	<i>GLC3</i>	P	3.3	YER081W	<i>SER3</i>	P	2.1	YDR353W [3]	<i>TRR1</i>	I	3.3
YEL071W	<i>DLD3</i>	I	4.5	YER091C	<i>MET6</i>	I	2.1	YER062C [1,3]	<i>HOR2</i>	I	2.8
YFR015C	<i>GSY1</i>	P	3.6	YGR157W	<i>CHO2</i>	P	2.3	YFL014W [1,3]	<i>HSP12</i>	I	13.4
YFR053C [3]	<i>HXK1</i>	P	10.7	YGR194C [3]	<i>XKS1</i>	P	3.1	YGR209C [3]	<i>TRX2</i>	I	3.1
YGL062W	<i>PYC1</i>	I	3.3	YGR204W	<i>ADE3</i>	P	2.2	YHR104W [1,3]	<i>GRE3</i>	P	3.3
YGL253W	<i>HXK2</i>	P	4.1	YHR018C	<i>ARG4</i>	I	3.9	YJL159W [1]	<i>HSP150</i>	I	6.9
YGR008C [1]	<i>STF2</i>	P	2.4	YJL060W	<i>BNA3</i>	P	2.1	YJR032W	<i>CPR7</i>	T	3.2
YGR032W [1]	<i>GSC2</i>	I	2.7	YJL130C	<i>URA2</i>	T	2.3	YKL150W [3]	<i>MCR1</i>	P	2.0
YGR043C		I	7.1	YJR073C	<i>OPI3</i>	T	2.4	YKR066C	<i>CCP1</i>	P	3.0
YGR244C	<i>LSC2</i>	P	4.2	YKL001C [1,2]	<i>MET14</i>	I	3.2	YLL026W [3]	<i>HSP104</i>	P	9.0
YHR001W-A	<i>QCR10</i>	I	2.1	YKL216W	<i>URA1</i>	T	3.1	YLR109W	<i>AHP1</i>	T	3.2
YKL085W	<i>MDH1</i>	P	3.0	YKR067W	<i>GPT2</i>	P	4.8	YML070W [3]	<i>DAK1</i>	P	2.4
YKL152C	<i>GPM1</i>	P	2.2	YLL062C	<i>MHT1</i>	P	2.2	YMR173W [1,3]	<i>DDR48</i>	I	6.0
YKR080W	<i>MTD1</i>	P	2.7	YLR028C	<i>ADE16</i>	P	2.0	YMR250W	<i>GAD1</i>	P	3.0
YLR081W	<i>GAL2</i>	P	4.4	YLR089C	<i>ALT1</i>	P	3.7	YMR251W-A [3]	<i>HOR7</i>	P	5.6
YLR174W	<i>IDP2</i>	T	2.0	YLR142W [1]	<i>PUT1</i>	P	2.6	YNL160W [1]	<i>YGP1</i>	P	2.7
YLR258W [3]	<i>GSY2</i>	P	2.5	YLR303W [2]	<i>MET17</i>	I	5.4	YOL151W [1,3]	<i>GRE2</i>	P	2.3
YML048W	<i>GSF2</i>	I	4.7	YLR359W [1]	<i>ADE13</i>	P	4.4	YPL240C	<i>HSP82</i>	P	3.0
YMR083W	<i>ADH3</i>	P	2.2	YML004C [3]	<i>GLO1</i>	I	3.0				
YMR105C [3]	<i>PGM2</i>	P	4.2	YMR096W [2]	<i>SNZ1</i>	I	3.3	Funció desconeguda			
YOL059W	<i>GPD2</i>	I	2.6	YMR120C	<i>ADE17</i>	P	4.6	YBR016W		I	2.7
YOL126C	<i>MDH2</i>	P	5.7	YMR300C	<i>ADE4</i>	I	2.4	YBR053C		P	2.0
YOR120W	<i>GCY1</i>	P	3.9	YNL104C	<i>LEU4</i>	I	2.3	YBR056W [3]		P	2.6
YOR136W	<i>IDH2</i>	I	3.8	YNL220W	<i>ADE12</i>	P	2.3	YBR096W		I	2.1
YOR374W [1,3]	<i>ALD4</i>	P	8.1	YNL274C [3]		P	4.4	YBR230C		I	2.4
YPL061W	<i>ALD6</i>	P	7.5	YOL058W	<i>ARG1</i>	I	7.8	YBR287W [2,3]		P	3.8
				YOR184W	<i>SER1</i>	I	5.1	YCL027C-a		P	2.2
				YPL057C [1,2]	<i>SUR1</i>	P	3.2	YCR030C	<i>SYP1</i>	P	2.0
				YPL135W	<i>ISU1</i>	P	3.6	YDL023C	<i>SRF4</i>	P	5.5
								YDL046W	<i>NPC2</i>	I	2.2
								YDT124W [3]		E	4.0
				Degradació/sintesi/mod. proteïnes				YDR251W	<i>PAM1</i>	P	4.0
				YAL005C	<i>SSA1</i>	I	2.2	YDR372C	<i>VPS74</i>	P	2.9
				YBL041W	<i>PRE7</i>	I	2.2	YDR516C [3]	<i>EM12</i>	P	5.7
				YBL078C [1]	<i>ATG8</i>	P	2.2	YEL044W	<i>IES6</i>	P	2.1
				YBR139W [3]		P	2.0	YEL070W		P	2.2
				YBR170C	<i>NPL4</i>	I	2.0	YER067W		P	2.4
				YDL147W	<i>RPN5</i>	I	3.4	YER150W [1,3]	<i>SPI1</i>	I	9.5
				YDR041W	<i>RSM10</i>	P	2.6	YFL015C		P	4.5
				YDR394W	<i>RPT3</i>	I	3.6	YFR017C		P	2.2
				YDR409W	<i>SIZ1</i>	T	2.4	YGL088W		T	3.7
				YEL060C [1,2,3]	<i>PRB1</i>	P	9.1	YGR086C	<i>PIL1</i>	I	6.8
				YGL111W	<i>NSA1</i>	P	4.2	YGR115C		I	2.3
				YHR110W	<i>ERP5</i>	T	2.0	YGR189C [1,2]	<i>CRH1</i>	I	2.1
				YJL172W [2]	<i>CPS1</i>	I	2.5	YGR211W	<i>ZPR1</i>	P	2.8
				YJR045C	<i>SSC1</i>	I	3.1	YGR243W	<i>FMP43</i>	P	2.6
				YJR113C	<i>RSM7</i>	P	2.5				

ORF	Gen	temps	Inc.	ORF	Gen	temps	Inc.	ORF	Gen	temps	Inc.
YJL165C [1]	<i>HAL5</i>	P	2.0	YKL035W	<i>UGP1</i>	I	5.7	YHL021C [3]	<i>FMP12</i>	P	10.2
YJR059W [3]	<i>PTK2</i>	P	2.7	YKL087C	<i>CYT2</i>	I	2.5	YHR087W [1,3]		P	6.4
YJR121W	<i>ATP2</i>	P	3.6	YKL145W	<i>RPT1</i>	I	2.3	YIL136W	<i>OM45</i>	I	3.1
YKR052C	<i>MRS4</i>	P	2.8	YKL201C	<i>MNN4</i>	P	5.3	YJL163C		P	2.7
YLL061W	<i>MMP1</i>	P	7.1	YLR120C [1,2]	<i>YPS1</i>	P	5.3	YJL217W		I	2.2
YML123C [1,2]	<i>PHO84</i>	T	3.9	YLR163C	<i>MAS1</i>	P	3.3	YJR115W		P	2.6
YMR011W	<i>HXT2</i>	P	21.1	YLR178C [2]	<i>TFS1</i>	P	6.6	YKL071W		I	4.8
YNL003C	<i>PET8</i>	I	2.0	YLR248W	<i>RCK2</i>	P	3.0	YKL100C		I	4.0
YOL156W	<i>HXT11</i>	P	2.8	YLR417W	<i>VPS36</i>	P	2.1	YKR016W	<i>FMP13</i>	P	2.4
YOR049C	<i>RSB1</i>	P	3.2	YMR101C	<i>SRT1</i>	I	3.0	YLR012C		T	2.1
YOR382W	<i>FIT2</i>	T	2.2	YNL007C	<i>SIS1</i>	P	2.3	YLR350W [1]	<i>ORM2</i>	P	3.3
YPL078C	<i>ATP4</i>	I	2.2	YNL015W [3]	<i>PBI2</i>	I	2.5	YLR356W		P	2.2
YPL265W	<i>DIP5</i>	I	2.7	YNL029C	<i>KTR5</i>	P	2.5	YLR414C [1,2]		P	2.5
YPL274W		I	2.9	YNR026C	<i>SEC12</i>	I	2.7	YLR424W		I	13.1
Altres				YOL082W [1]	<i>ATG19</i>	P	3.3	YML131W [2,3]		P	2.2
YBR008C	<i>FLR1</i>	P	2.2	YOR187W	<i>TUF1</i>	I	2.9	YMR002W		I	4.3
YBR202W	<i>CDC47</i>	T	2.8	YPL003W	<i>ULA1</i>	I	4.0	YMR090W [3]		P	2.3
YCL020W		P	2.6	YPL097W	<i>MSY1</i>	I	2.1	YMR110C		P	3.0
YCR009C [2]	<i>RVS161</i>	I	2.5	YPL154C [3]	<i>PEP4</i>	I	3.9	YMR173W-a [3]		P	3.0
YDL161W	<i>ENT1</i>	P	2.0	YPR108W	<i>RPN7</i>	I	4.4	YMR195W	<i>ICY1</i>	P	3.0
YDR077W [1]	<i>SED1</i>	P	2.7	YPR149W	<i>NCE102</i>	P	2.9	YMR291W		P	4.8
YDR168W	<i>CDC37</i>	I	2.3	Transcripció i processament RNA				YMR316W [2]	<i>DIA1</i>	P	9.5
YGL037C [1,3]	<i>PNC1</i>	I	6.1	YBR142W	<i>MAK5</i>	T	2.5	YNT036W [3]	<i>NCE103</i>	L	2.2
YGR180C	<i>RNR4</i>	I	2.9	YCR004C [3]	<i>YCP4</i>	P	2.3	YNL179C	<i>SRF6</i>	I	3.6
YHR071W [2]	<i>PCL5</i>	I	4.7	YDL014W	<i>NOP1</i>	P	3.7	YNL208W [1,2,3]		I	2.2
YJL141C [3]	<i>YAK1</i>	P	2.2	YDR463W	<i>STP1</i>	P	2.0	YOL036W		I	2.0
YJR028W		P	7.5	YGR200C	<i>ELP2</i>	P	3.3	YOL053W		P	2.3
YJR135C	<i>MCM22</i>	P	2.2	YKL043W	<i>PHD1</i>	P	6.2	YOR042W	<i>CUE5</i>	I	2.4
YKL193C [3]	<i>SDS22</i>	T	2.8	YLR270W	<i>DCS1</i>	P	3.0	YOR215C		P	4.5
YKR076W [1]	<i>ECM4</i>	P	2.2	YMR064W	<i>AEP1</i>	P	4.9	YOR220W [2]		P	2.3
YML045W		P	9.9	YMR153W	<i>NUP53</i>	I	4.4	YPL004C	<i>LSP1</i>	P	2.4
YML057W	<i>CMP2</i>	P	2.1	YMR302C	<i>PRP12</i>	P	2.2	YPL066W		P	2.1
YML128C [3]	<i>MSC1</i>	P	9.2	YNL016W	<i>PUB1</i>	I	2.4	YPL206C		P	5.5
YMR276W	<i>DSK2</i>	P	2.1	YOL123W	<i>HRP1</i>	P	2.1				
YNR026C	<i>SEC12</i>	I	2.7								

[1] Aquest gen també està induït per dany a la paret cel·lular (Lagorce *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004).

[2] Aquest gen també està induït al afegir calci en el medi (Yoshimoto *et al.*, 2002).

[3] Aquest gen forma part de la resposta general a estrès (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001).

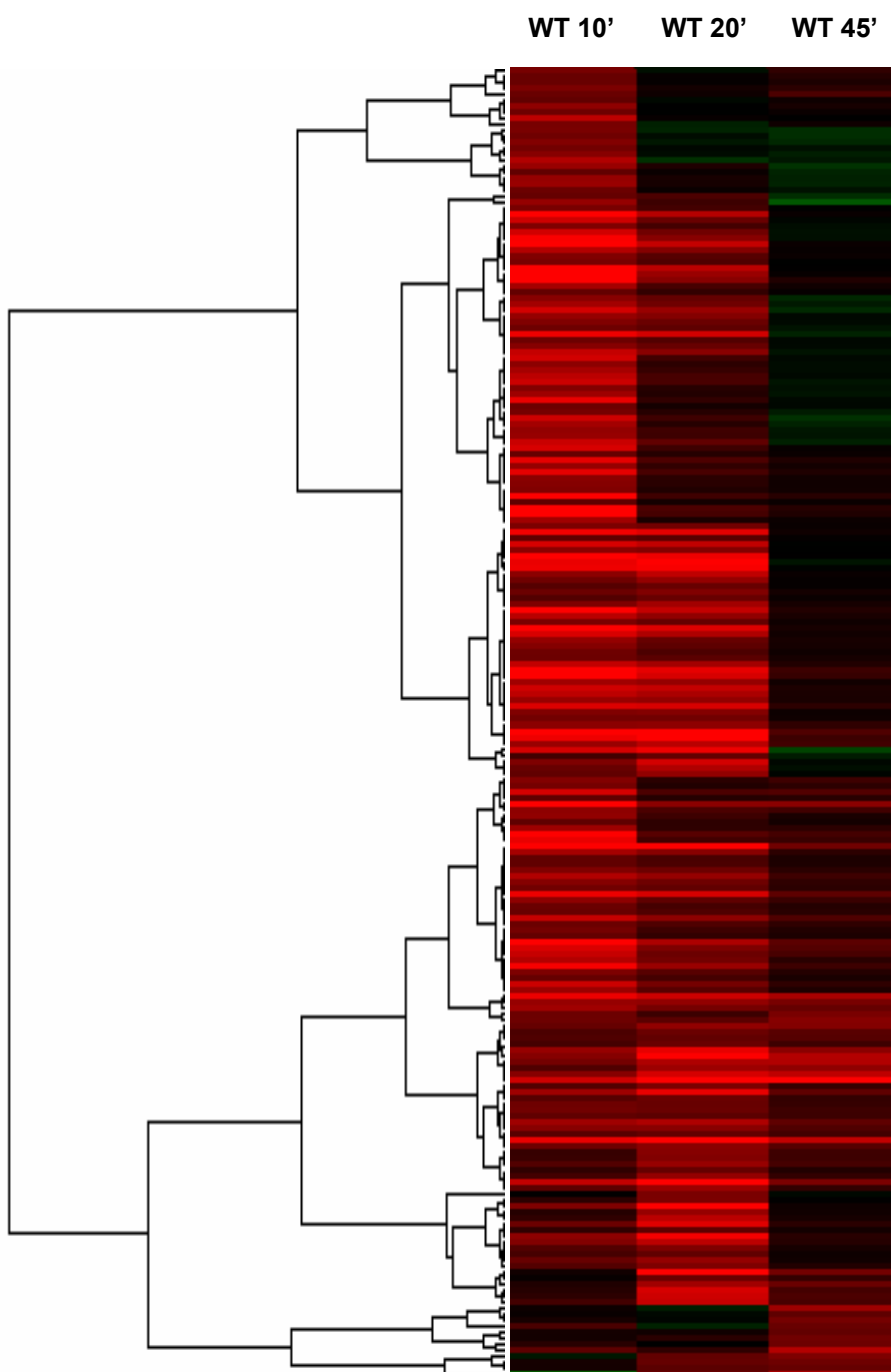


Figura 27. Vista general de l'expressió gènica en llevat després de l'exposició a pH alcalí en la soca salvatges (wt). Els 266 gens que presenten un increment significatiu dels nivells d'expressió es van transformar logarítmicament en base 2 i van ser agrupats jeràrquicament mitjançant el programa Cluster en funció de la similitud en els patrons d'expressió dels diferents gens analitzats i mostrats a través del programa TreeView (Eisen *et al.*, 1998). Cada columna representa la mediana dels 5 experiments realitzats en cada temps (10, 20 i 45 minuts) i cada fila representa els nivells d'expressió de cadascun dels gens en particular. El color vermell indica un nivell d'expressió més elevat en la mostra sotmès a pH alcalí respecte a la mostra control i el color verd significa el cas invers, mentre que el color negre indica que no hi han diferències significatives entre els nivells d'expressió.

Durant el transcurs d'aquest treball va aparèixer una nova eina d'anàlisi de les dades obtingudes a partir d'experiments realitzats amb microxips de DNA, el programa estadístic GEPAS (Gene Expression Pattern Analysis Suite) del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) el qual es pot trobar en la pàgina web <http://gepas.bioinfo.cnio.es/tools.html>. S'ha utilitzat aquest programa per agrupar el conjunt de gens induïts com a mínim dues vegades en funció del patró d'expressió que presenten al llarg del temps (**figura 28**). S'observa que 173 gens presenten una expressió màxima als 10 minuts d'exposició a pH alcalí i una disminució significativa d'aquesta en temps posteriors, principalment als 45 minuts. Davant d'aquests resultats podem arribar a la conclusió que la resposta enfront a una situació d'estrès intens per pH alcalí és, en general, ràpida i transitòria.

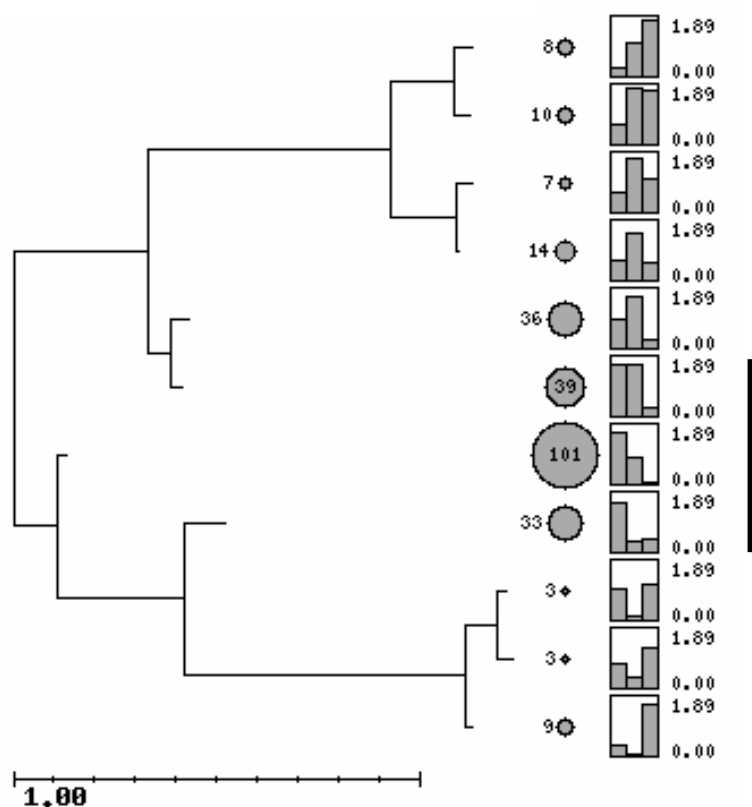


Figura 28. Representació gràfica mitjançant el programa estadístic GEPAS del CNIO dels 266 gens que presenten un augment dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades en els temps analitzats (10, 20 i 45 minuts). Els valors d'expressió han estat transformats logarítmicament en base 2, agrupats mitjançant el programa SOTA (Self-Organising Tree Algorithm) (Herrero *et al.*, 2001) i visualitzats amb el programa SotaTree. S'ha seleccionat visualment el conjunt de gens (línia negra) que presenten un pic màxim d'expressió als 10 minuts i una disminució de la inducció en temps posteriors.

2.2.2. Anàlisi de les principals categories funcionals afectades

Aquest conjunt de gens que responen transcripcionalment a estrès per pH alcalí pertanyen a diferents categories funcionals segons la classificació obtinguda a partir del SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002), veure **figura 29**.

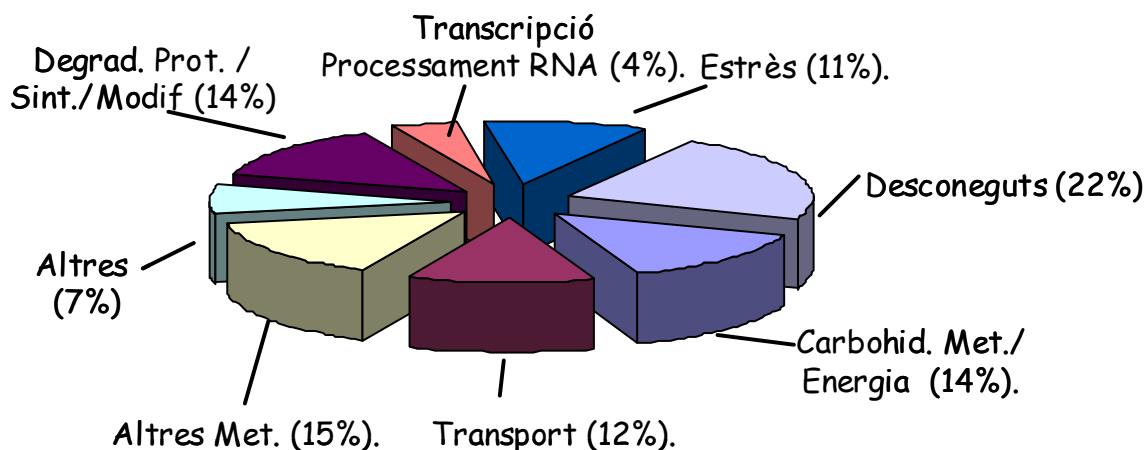


Figura 29. Representació gràfica del conjunt de gens que presenten un augment en la seva transcripció d'acord a la seva classificació funcional (SGD).

És important remarcar que 77 gens (un 29 % del nombre total de gens induïts) estan implicats en diferents vies metabòliques, 37 dels quals intervenen en el metabolisme de carbohidrats o en vies generadores d'energia. Un nombre important de gens relacionats amb la resposta a estrès també són activats com a resposta a pH alcalí. Entre aquest llistat de gens un nombre significatiu estan implicats en la resposta a estrès oxidatiu, com ara *UGA2*, *GRX1*, *HSP12*, *TRX2*, *MCRI*, *GAD1*, *GRE2* o *PRX1* (**taula 6**).

Taula 6. Gens induïts com a mínim dues vegades després de l'exposició a pH alcalí implicats en la resposta a estrès oxidatiu. Es mostren els valors d'inducció als 10, 20 i 45 minuts d'exposició a pH alcalí. La definició de cadascun dels gens ha estat obtinguda de les bases de dades MIPS (Mewes *et al.*, 2002) i SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002).

ORF	Gen	10'	20'	45'	Definició
YBR006W	UGA2	2,5	2,2	1,4	Implicat en la utilització de GABA com a font de nitrogen, succinat semialdehid deshidrogenasa.
YCL035C	GRX1	1,9	2,1	1,6	oxidoreductasa disulfide dependent de glutatió, protegeix les cèl·lules de dany oxidatiu.
YFL014W	HSP12	4,3	13,4	9,5	Proteïna de membrana induïda per diferents tipus d'estrès, regulada per la via HOG i Ras-Pka.
YGR209C	TRX2	1,8	3,1	2,8	Tioredoxina
YKL150W	MCR1	2,0	1,7	1,2	NADH-citocrom b5 reductasa, implicada en la biosíntesi de ergosterol.
YMR250W	GAD1	3,0	2,9	1,7	Glutamat descarboxilasa, converteix el glutamat en àcid gamma-aminobutíric (GABA), implicat en la resposta a estrès oxidatiu.
YOL151W	GRE2	2,3	2,3	1,1	D-lactaldehid deshidrogenasa dependent de NADH, induïda per diferents tipus d'estrès (osmòtic, iònic, oxidatiu, per altes temperatures i metalls pesants); regulat per la via HOG.
YBL064C	PRX1	3,1	5,4	2,4	Peroredoxina mitocondrial amb activitat peroxidasa, implicada en la reducció de hidroperòxids; induïda durant el creixement aeròbic en condicions d'estrès oxidatiu.

Una explicació possible seria que l'exposició a un medi alcalí generés, d'alguna manera, una situació d'estrès oxidatiu. En un estudi realitzat en el nostre laboratori, utilitzant una biblioteca sistemàtica de mutants, s'ha observat que mutacions en enzims claus per a la tolerància a estrès oxidatiu (*sod1*, *sod2* o *ccs1/lys7*) donen lloc a un fenotip d'elevada sensibilitat a pH alcalí (Serrano *et al.*, 2004). També s'ha observat que un percentatge important de cèl·lules exposades a estrès per pH alcalí produeixen una senyal positiva (fluorescent) després de ser incubades amb dihydrorhodamine 123 (un fluorocrom àmpliament utilitzat en la detecció d'espècies reactives de l'oxigen), tot i que la resposta no era tant intensa com la obtinguda utilitzant com a agent oxidant el peròxid d'hidrogen a una concentració de 2 mM (Viladevall *et al.*, 2004). A més, es va

estudiar la resposta a pH alcalí del promotor del gen *PRX1*, el qual es coneix que respon a estrès oxidatiu, i es va observar que la resposta transcripcional estava completament anul·lada en cèl·lules que no presentaven el gen *YAPI*, el qual codifica un factor de transcripció necessari en la tolerància enfront a estrès oxidatiu (per una revisió veure (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). Els resultats obtinguts mitjançant la tecnologia de microxips de DNA, juntament la observació de la incorporació de dihydrorhodamine 123 i l'anul·lació de la resposta en cèl·lules *yap1* del gen *PRX1*, recolzen la idea que part dels efectes fenotípics deguts a la exposició a un pH elevat (incloent part de la resposta transcripcional) poden ser el resultat d'una situació d'estrès oxidatiu.

Una altra conjunt de gens clarament afectats en condicions de pH alcalí estan involucrats en l'augment de la captació dels ions ferro i coure: *SIT1/ARN3*, *ARN1*, *FET5* (transportadors d'alta afinitat de ferro i coure), *FIT2* (mannoproteïna implicada en la retenció del sideròfor) i *MRS4* (transportador de ferro situat a la membrana dels mitocondris), **taula 7**. Cal destacar que la majoria d'aquests gens presenten un pic màxim en la seva resposta a temps més llargs, 20 i/o 45 minuts.

Taula 7. Gens induïts com a mínim dues vegades després de l'exposició a pH alcalí implicats en el transport de ferro i/o coure. Es mostren els valors d'inducció als 10, 20 i 45 minuts d'exposició a pH alcalí. La definició de cadascun dels gens ha estat obtinguda de les bases de dades MIPS (Mewes *et al.*, 2002) i SGD (Issel-Tarver *et al.*, 2002).

ORF	Gen	10'	20'	45'	Definició
YEL065W	<i>SIT1</i>	2,6	6,6	5,0	Ferrioxamina B, membre de la família de transportadors ARN que reconeix específicament els sideròfors units a ferro.
YHL040C	<i>ARN1</i>	0,8	1,5	3,0	Membre de la família de transportadors ARN que reconeix específicament ferro unit a sideròfors.
YFL041W	<i>FET5</i>	1,8	3,0	1,7	Oxidasa, proteïna de membrana similar a Fet3, implicada en el transport de ferro.
YOR382W	<i>FIT2</i>	1,8	1,4	2,2	Mannoproteïna ancorada a la paret cel·lular via glicosilfosfatidilinositol (GPI), implicada en la retenció del complex sideròfor-ferro a la paret cel·lular.
YKR052C	<i>MRS4</i>	2,8	2,0	1,5	Transportador de la família MCF (mitochondrial carrier family), molt similar a Mrs3; induït per baixes concentracions de ferro; pot transportar altres cations a més del ferro.

En altres estudis també s'han identificat un conjunt de gens mitjançant la tecnologia de microxips de DNA implicats en el metabolisme del ferro i també del coure en condicions de pH alcalí com ara *FRE1*, *FET3*, *CTR1*, *ARN1* i *ARN3* entre d'altres (Causton *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002). Aquests fets semblen indicar que l'estrès per pH alcalí pot introduir fortes perturbacions en el metabolisme del coure i el ferro.

El ferro i el coure són metalls implicats en reaccions redox les quals són essencials per a tots els organismes eucariotes, però les seves concentracions intracel·lulars han de ser molt controlades ja que són potencialment tòxics (Askwith and Kaplan, 1998). Hi han diferents mecanismes de captació de ferro: el sistema d'alta afinitat a través del transportador de membrana Ftr1 i la oxidasa Fet3, a través de reductases i mitjançant el sistema de baixa afinitat (per una revisió veure Kosman, 2003). Tots aquests sistemes estan regulats pels factors de transcripció Rsc1/Aft1 o Aft2 (Casas *et al.*, 1997; Blaiseau *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2001). El factor de transcripció Rcs1 actua sobre la família de gens *FIT1*, *FIT2* i *FIT3* els quals codifiquen mannoproteïnes implicades en la retenció dels sideròfors units a ferro a la paret cel·lular. Aquest ferro unit als sideròfors pot ser capturat a l'interior de les cèl·lules a través de dos formes diferents. En el primer cas és necessari l'alliberació del ferro del sideròfor a través dels membres de la família Fre (metaloreductases de membrana) i un cop alliberat és capturat a l'interior de la cèl·lula pel sistema de captació de ferro d'elevada afinitat. En el segon sistema un conjunt de transportadors, Arn1, Arn2/Taf1, Arn3/Sit1 i Arn4/Enb1 reconeixen específicament el ferro unit als sideròfors i són captats a l'interior de la cèl·lula. És important remarcar que el sistema de captació d'alta afinitat de ferro requereix una captació eficient de coure, ja que la maduració de Fet3 en l'aparell secretor implica la incorporació de ions coure mediada per Ccc2 i la xaperona de coure Atx1 (Yuan *et al.*, 1995). Per altra banda s'ha trobat que mutacions en gens necessaris per un transport eficient de ferro i coure confereixen una elevada sensibilitat a pH alcalí i que l'expressió dels gens *FET4* (transportador de baixa afinitat de coure, ferro i zinc) i *CTR1* (transportador d'elevada afinitat de coure), continguts en un plasmidi multicòpia, incrementen la tolerància a un pH elevat (Serrano *et al.*, 2004). Totes aquestes evidències ens indiquen que la exposició de cèl·lules de llevat a pH alcalí genera una resposta transcripcional similar a l'observada en condicions limitants de ferro i coure en el medi. El fet que augmenti l'expressió de gens implicats en

l'homeostasi dels ions ferro i coure en aquestes condicions es pot interpretar si es considera que aquests metalls presenten una disminució de la seva solubilitat de manera que deixen de ser accessibles per la cèl·lula.

En la categoria funcional en la qual s'inclouen els gens implicats en diferents tipus de transport cal destacar la presència d'un nombre important de gens que formen part de la família de transportadors d'hexoses (*HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT6*, *HXT10* i *HXT11*), els quals transporten glucosa a través de la membrana (Bisson *et al.*, 1993; Boles and Holleng, 1997; Kruckeberg, 1996; Ozcan and Johnston 1999). Així com *HXK1* i *GLK1* els productes dels quals catalitzen el primer pas en l'aprofitament de glucosa. L'expressió dels transportadors *HXT1*, *2*, *3*, *4*, *6* i *7* està regulada per la concentració extracel·lular de glucosa (Ozcan and Johnston 1999). Quan s'esgota la glucosa del medi les cèl·lules utilitzen l'etanol acumulat com a nova font de carboni i continuen creixent però més lentament en el que anomenem fase diàuxica. Un gran nombre d'estudis han demostrat que en aquesta fase es produeix un canvi important en el patró d'expressió gènica, observant-se una repressió dels gens que codifiquen components de la via de la glicòlisi i de la maquinària de replicació, i una desrepressió dels gens implicats en el transport i en la síntesi de glucosa (Bataille *et al.*, 1991; Boucherie, 1987; Boy-Marcotte *et al.*, 1987; DeRisi *et al.*, 1997). En canvi, en un estudi recent s'ha demostrat que l'expressió de *HXT5* està regulada per la taxa de creixement de les cèl·lules i no per la concentració extracel·lular de glucosa (Verwaal *et al.*, 2002). A més, s'ha demostrat que la regulació de *HXT5* es produeix mitjançant la via de la PKA i que els factors de transcripció Msn2/4 s'uneixen a elements STRE del promotor activant la seva transcripció (Verwaal *et al.*, 2004; Gash *et al.*, 2000). Davant d'aquests resultats podem concloure que en condicions de pH alcalí es podria generar una situació de limitació de glucosa la qual desreprimiria l'expressió dels transportadors d'hexoses *HXT2*, *4*, *6*, *10* i *11*. En canvi, l'expressió de *HXT5* seria la conseqüència d'una disminució del creixement degut a un estrès intens per pH alcalí.

En aquesta mateixa categoria funcional també és important remarcar la presència dels gens *PHO89* i *PHO84* els quals codifiquen transportadors d'elevada afinitat Na^+/Pi i H^+/Pi respectivament. Aquests dos gens també són activats en situacions limitants de fòsfat. S'ha observat que en el cas de *PHO84* la resposta transcripcional a pH alcalí i per limitació de fòsfat és quantitativament similar, en canvi

PHO89 presenta una resposta enfront a baixes concentracions de fosfat quasi insignificant respecte a l'observada per l'exposició a pH alcalí (Serrano *et al.*, 2002). El fosfat inorgànic és un nutrient essencial necessari en grans quantitats en la biosíntesi d'àcids nucleics i fosfolípids. Els organismes presenten mecanismes de regulació per respondre i adaptar-se a canvis en la disponibilitat de fosfat. En llevat, la via de transducció de la senyal de fosfat (via PHO) regula la expressió de diversos gens implicats en la obtenció de fosfat mitjançant sistemes de captació del fosfat lliure en el medi i per l'excreció de fosfatases que hidrolitzen els enllaços fosfoesters d'alguns components orgànics. En situacions limitants de fosfat, Pho81 inhibeix el complex CDK (cyclin-dependent Kinase) Pho80-Pho85. En aquestes condicions el factor de transcripció Pho4 és defosforilat activant la transcripció d'un conjunt de fosfatases a més dels transportadors d'elevada afinitat Pho84 i Pho89 (per una revisió veure Persson *et al.*, 1999). Amb aquests resultats podem concloure que la exposició a pH alcalí genera una situació de limitació de fosfat la qual explicaria l'activació d'alguns gens implicats en l'obtenció de fosfat inorgànic. A més, aquests resultats coincideixen amb experiments realitzats en diferents condicions de pH alcalí (Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002), de manera que l'expressió de gens implicats en la captació de fosfat en condicions de pH alcalí és una resposta general i que probablement es manté al llarg del temps ja que *PHO84* va ser identificat després de 2 hores d'exposició a pH alcalí (Lamb *et al.*, 2001).

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 3.1.1. de l'introducció en un estudi recent (Garcia *et al.*, 2004) s'ha avaluat la resposta transcripcional per dany a la paret cel·lular identificant 178 gens que responen enfront a aquest tipus d'estrès produït per l'exposició a *Congo Red* o Zimoliasa. Al comparar aquests resultats amb els obtinguts per la exposició a pH alcalí (taula 3), ens va cridar l'atenció que el solapament entre aquests dos estudis fos de 28 gens, quan s'esperaria un solapament de tant sols 8 gens si aquests dos aconteixaments no tinguessin cap tipus de relació entre ells (**figura 30**). Aquests gens comuns inclouen components importants de la paret cel·lular com *GSC2* (component de la β -1,3-glucan sintasa), *CRHI* (una glicosidasa de la paret cel·lular), *SEDI* (una glicoproteïna de la paret cel·lular que participa en la integritat de la paret cel·lular i en la resistència a estrès), o el seu homòleg estructural *SPII* (una proteïna d'anclatge a la paret cel·lular). Cal remarcar que aquests quatre gens també presenten un augment dels seus nivells d'expressió per mutacions en determinats gens relacionats

amb la construcció de la paret cel·lular (Lagorce *et al.*, 2003) i, a més, *SEDI* s'ha demostrat que també és necessari en la tolerància a estrès oxidatiu. Aquests resultats suggereixen que la exposició a pH alcalí podria generar, en més o menys grau, una situació de dany a la paret cel·lular. Aquesta hipòtesi es veu reforçada amb l'observació que mutacions d'elements claus del manteniment de la paret cel·lular com quinases que formen part d'aquesta via de senyalització (*BCK1* i *SLT2*), o diversos components de la paret cel·lular (*SEDI*, *KRE1*, *GAS1*, entre d'altres) donen lloc a un fenotip d'elevada sensibilitat a pH alcalí (Giaever *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2004).

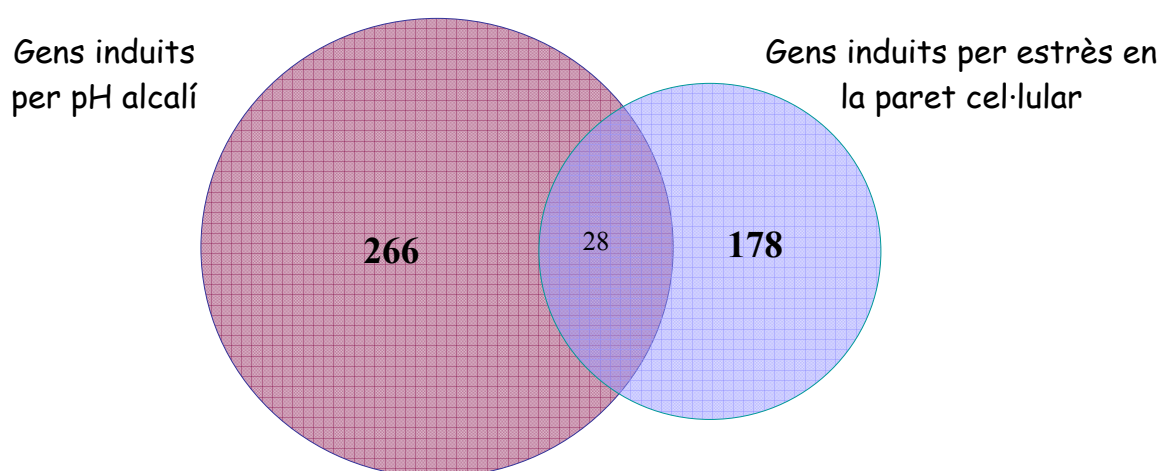


Figura 30. Diagrama de Venn dels gens que presenten un augment dels nivells transcripcionals després de 10, 20 i 45 minuts d'exposició a pH alcalí identificats en aquest treball, i del conjunt de gens que s'indueixen per dany a la paret cel·lular identificats per Garcia *et al.*, 2004.

2.2.3. Comparació dels resultats obtinguts amb altres estudis

En el treball de Serrano *et al.*, 2002 també es va realitzar un anàlisi similar mitjançant la tecnologia de microxips de DNA, encara que menys exhaustiu, amb l'objectiu d'identificar el conjunt de gens que responien a una situació d'estrès lleuger per pH alcalí (pH 7,6). Utilitzant el mateix fons genètic de la soca salvatge, en aquest experiment només 150 gens van presentar un increment en els nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades. La comparació d'aquests resultats amb els obtinguts en aquest treball revela que 46 gens (22 %) també presenten un augment dels nivells d'expressió a pH 8,0. Aquest tant per cent relativament baix de correlació entre aquests

dos estudis suggereix que diferents intensitats d'estrès donen lloc a perfils de respostes transcripcionals diferents. Al comparar les principals categories funcionals afectades per la exposició a pH alcalí lleugera (pH 7,6) o intensa (pH 8,0), veure **figura 31**, s'observa que el nombre de gens implicats en el metabolisme de carbohidrats i obtenció d'energia és significativament menor a pH 7,6 (7 gens respecte als 37 identificats en aquest treball). Una possible explicació podria ser que enfront a un estrès lleuger no s'arribés a produir una situació de falta de nutrients. Per altra banda, el nombre de gens implicats en el metabolisme i transport de fosfats és major a pH 7,6, ja que a part del gens *PHO84* i *PHO89* identificats en aquest treball també hi són presents *PHO12*, una fosfatasa àcida i *VTC1/PHM4*, *VTC3/PHM2* i *VTC4/PHM3* els qual pertanyen a una família de xaperones implicades en la distribució de la H^+ -ATPasa vacuolar (Cohen *et al.*, 1999) i possiblement són responsables de la síntesi de polifosfat a la vacuola (Ogawa *et al.*, 2000). Per tant, tot i que la inducció de gens implicats en la síntesi i captació de fosfat en condicions d'estrès per pH alcalí és una resposta general, el conjunt de gens activats varia en funció de la intensitat d'estrès.

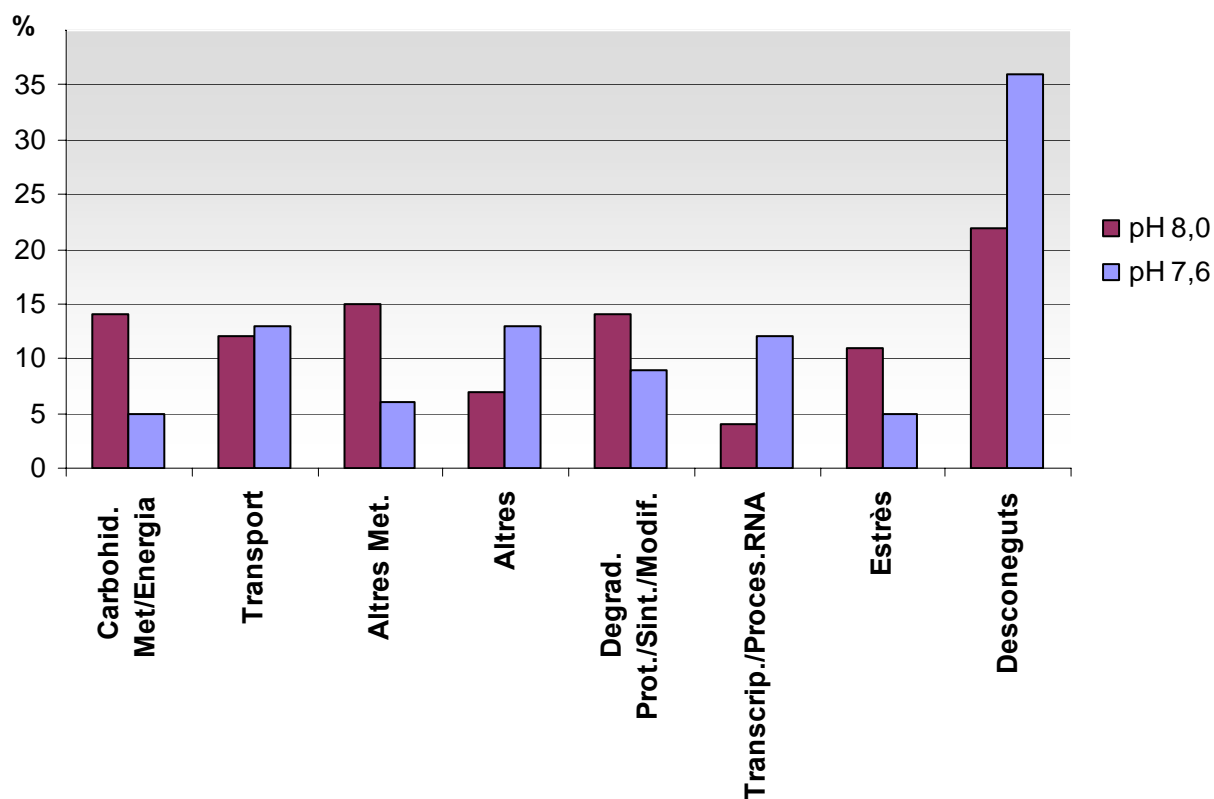


Figura 31. Comparació de les principals categories funcional afectades per un estrès a pH alcalí intens (pH 8,0) i moderat (pH 7,6). **A.** Representació gràfica corresponent als resultats obtinguts en aquest treball (pH 8,0). **B.** Representació gràfica dels resultats obtinguts en el treball de Serrano *et al.*, 2002 (pH 7,6).

Una situació similar es pot observar en el conjunt de gens involucrats en l'augment de la captació dels ions ferro i coure. Dels cinc gens identificats en aquest estudi implicats en la captació de ferro i/o coure (*SIT1/ARN3*, *ARN1*, *FET5*, *FIT2* i *MRS4*), tres també estan induïts davant d'un estrès per pH alcalí més lleuger (*SIT1/ARN3*, *ARN1* i *FIT2*) a més de *CST13*, *FRE1*, *ISU1*, *ARN2*, *FET3* i *CTR1* que només s'indueixen a pH 7,6. La comparació del nombre de gens induïts per un estrès lleuger (pH 7,6) que també estan activats per dany a la paret cel·lular (Lagorce *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004) ens revela que la coincidència és de 26 gens. Anteriorment s'ha comentat que en aquest treball realitzat a pH 8,0 el solapament és de 28 gens. Tot i que el nombre de gens és bastant similar entre els dos estudis realitzats a diferents intensitats d'estrès, només són comuns 12 gens (*ALD4*, *PHO89*, *PHO84*, *PNC1*, *YPS1*, *SPI1*, *YHR087W*, *YLR414C*, *YML131W*, *DDR48*, *YNL208W* i *GRE2*). Aquests resultats suggereixen que a diferents intensitats de pH alcalí es genera una situació de dany a la paret cel·lular, però el conjunt de gens activats difereix en cadascuna de les condicions. Analitzant les principals categories funcionals afectades per una condició d'estrès per pH alcalí lleugera (pH 7,6) i intensa (pH 8,0) podem concloure que la intensitat d'estrès és un factor clau que determina l'activació de múltiples vies de senyalització les quals actuen sobre la transcripció de diferents gens.

La intensitat d'estrès per pH utilitzada en aquest estudi és semblant a la utilitzada per (Causton *et al.*, 2001), en el qual es va analitzar la resposta transcripcional de les cèl·lules al passar de pH 6,0 a 7,9. Aquest canvi va donar lloc a 463 gens amb un increment en la seva expressió de, com a mínim, tres vegades dels 10 als 60 minuts. S'han seleccionat els gens induïts més de tres vegades degut als elevadíssims valors d'inducció obtinguts en aquest treball. Per exemple, el valor màxim d'inducció obtingut és de 270 pel gen *HSP12* als 10 minuts, mentre que per aquesta condició en el nostre estudi el valor d'inducció és de 13,2. Un altre exemple seria el gen *PHO89* el qual presenta un increment de la seva expressió de 59 als 10 minuts, mentre que el valor obtingut en aquest treball és de 4,9. Comparant els nostres resultats amb aquest estudi hem trobat que el solapament és de 113 gens (43 %), un tant per cent més elevat que l'observat al sotmetre les cèl·lules salvatges a pH 7,6 (22 %). Aquests resultats ens corroboren que la resposta transcripcional depèn de la intensitat d'estrès al qual està sotmès la cèl·lula.

Independentment de la concordança observada entre els diferents estudis realitzats sobre la resposta transcripcional a pH alcalí en *S. cerevisiae* es fa difícil realitzar comparacions directes dels resultats, ja que en cadascun dels estudis s'han utilitzat diferents plataformes, mètodes de marcatge, protocols d'hibridació, sistemes de detecció de la senyal, etc. (**taula 8**). Les plataformes utilitzades en els diferents estudis analitzats han estat microxips fabricats en el propi laboratori amplificant els ORFs de llevat per PCR (Lamb *et al.*, 2001; Serrano *et al.*, 2002; Viladevall *et al.*, 2004) o bé utilitzant la plataforma d'Affymetrix a on les sondes són oligonucleòtids (Causton *et al.*, 2001). S'ha demostrat que els resultats obtinguts partint de la mateixa mostra divergeixen considerablement en funció de la plataforma utilitzada (Tan *et al.*, 2003) i, per tant, no és d'estranyar que al comparar els resultats obtinguts a partir de diferents plataformes la correlació no sigui molt elevada.

Taula 8. Comparació entre els principals estudis realitzats sobre la resposta transcripcional de *S. cerevisiae* a pH alcalí.

Estudi	Microxips (plataforma)	pH	Temps (min.)
Lamb <i>et al.</i> , 2001	Fabricats en el propi laboratori sobre membranes de niló (macroxips).	4,0→8,0	120
Causton <i>et al.</i> , 2001	Affymetrix	6,0 →7,9	10 a 60
Serrano <i>et al.</i> , 2002	Fabricats en el propi laboratori sobre porta-objectes de vidre modificats.	6,4→7,6	5, 25 i 45
Viladevall <i>et al.</i> , 2004	Fabricats en el propi laboratori sobre porta-objectes de vidre modificats.	6,2→8,0	10, 20 i 45

Una qüestió important és conèixer el nombre de gens induïts en aquest estudi els quals també estan activats per altres situacions d'estrès com són augment de la temperatura, estrès salí, estrès oxidatiu, etc. (Rep *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). Aquests gens han estat definits en dos estudis independents (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001) com a ESR (enviormental stress response) o CER (common enviormental response). Hem trobat que 56 dels 266 (21 %) gens induïts a pH 8,0 formen part de la resposta general a estrès (marcats amb el

subíndex 3 en la taula 3). Aquests gens estan implicats en diferents funcions com ara el metabolisme de carbohidrats, resposta a estrès, degradació i modificació de proteïnes i transport de metabolits entre d'altres. Molts dels gens que formen part de la ESR o CER ofereixen protecció a la cèl·lula enfront a una gran varietat de condicions d'estrès. El fet que el 21 % dels gens formin part de la ESR o CER no significa que la resta de gens presentin una funció exclusiva en la resposta a pH alcalí, ja que l'expressió de molts d'ells també es veu alterada per altres tipus d'estrès en particular. Per exemple, un 48 % dels gens presents en la taula 3 també estan induïts per estrès salí (Posas *et al.*, 2000). Tot i aquest relativament elevat grau de concordança s'ha demostrat que aquestes dues situacions d'estrès presenten vies independents a través de les quals actuen sobre aquests gens (Serrano *et al.*, 2002; Lamb and Mitchell 2003). Un exemple clar el trobem en el gen *ENAI* el qual és activat per diversos tipus d'estrès com són elevades concentracions de sodi i liti, estrès osmòtic i per pH alcalí (Garcia-deblas *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Marquez and Serrano 1996; Serrano *et al.*, 2002). La resposta transcripcional enfront a una situació d'estrès osmòtic està mediada per la MAPK Hog1 (Marquez and Serrano, 1996). S'ha demostrat, però, que mentre en un mutant Hog1 la resposta a estrès osmòtic s'esvaeix, en condicions de pH alcalí no s'observa una reducció de la resposta (Serrano *et al.*, 2002). Aquest fet demostra que la via activada per estrès osmòtic no està implicada en la inducció de *ENAI* per pH alcalí, tot i l'existència d'altres vies comuns com és la via de senyalització de la calcineurina (Serrano *et al.*, 2004).

2.3. Anàlisi del conjunt de gens que presenten una disminució dels nivells de mRNA com a resposta a l'exposició a pH alcalí

Els nombre de gens que presenten una disminució en els nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades és de 159. Analitzant la resposta transcripcional al llarg del temps d'aquests 159 gens trobem que un 42 % (67 gens) presenten un punt màxim de repressió als 10 minuts d'exposició a pH alcalí i aquest nombre de gens disminueix a 59 (37 %) als 20 minuts i a 30 (19 %) després de 45 minuts d'exposició. Per tant, tal i com hem observat en el cas dels gens que augmenten la seva expressió, el conjunt de gens que presenten una disminució transcripcional de 2 o més vegades també presenten una resposta ràpida però que es manté durant més temps. Aquests gens han estat classificats en diferents categories funcionals (**taula 9**).

Taula 9. Classificació en famílies funcionals d'aquells ORFs que presenten una disminució dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades en qualsevol dels temps analitzats.

Biosíntesi/Modificació de proteïnes

RPS10A, RPS7A, RPL42A, RPL14A, RPL25, RPS16B, VRG4, RPS22A, RPL20B, RPL12B, RPS16A, RPS23B, RPL31A, RPL42B, RPL22A, RPL24A, RPS10B, RPL37B, RPS23A, RPL29, RPS15, RPL27B, RPL14B, RPL33B, RPL32, RPS26A, RPS25B, RPL19B, RPL19A, RPL17B, RPS2, RPS9A, YEF3, PPE1, TAF9, ERV2.

Biogènesi i ensemblament de ribosomes

NHP2, NSR1, NIP7, CBF5, SNU13, MTR4, NOG, GARI, NOP10, RLP7, FPR1, POP4.

Transport

PHO84, KAP123, TPO2, PMP1, GOT1, PTR2, AVT2, CTP1, ACC1, MIM1, YGR046W.

Transcripció i/o processament del RNA

RPO26, POL2, YAP3, PRP18, NIP7, CBF5, SNU13, MTR4, GARI, LHP, IME4.

Metabolisme

GLO4, SDH2, PRS3, HIS2, GLN1, GLT1, ARO9, MUM3, URA7, ERG3.

Metabolisme del DNA

POL1, HHH2, HHH1, HTA2, RNR3, POL12, HHT2, MUM2, HTB2.

Cicle cel·lular

MCD1, HOP2, CLB1, ECO1, MEI5.

Altres funcions

SPA2, YOL155C, TIP41, TAX4, BUD19, ALF1, PHO5, ZEO1, YJL144W, PHO11, PHO12, CTF19, HPT1, DAL2, ATG14, HEM2, MF(ALPHA)2.

Funció desconeguda

YER034W, YPL080C, YJR038C, YMR130W, YLR413W, YJR157W, YKL107W, YPL142C, YPR044C, YNL303W, YJL169W, YHL010C, YAR047C, YKL161C, YBL028C, YBL112C, YPR039W, GAS2, YJR071W, YBL012C, YMR321C, YNL013C, FIN1, YLR352W, YGL007W, YHL018W, MPM1, YMR233W, YIL067C, YKL153W, YNR009W, YOR343C, YMR252C, YRO2, LEE1, YHR139C-A, YJL027C, YBR062C, YGL079W, YIR035C, FYV1, YOR364W, YLR458W, YLF2, YBR025C, YOR385W, YOL166C, YLR257W.

Cal destacar que aproximadament un 30 % (48 gens) d'aquests gens codifiquen proteïnes implicades en la biosíntesi, modificació de proteïnes o en la biogènesi i ensemblament de ribosomes (**figura 32**).

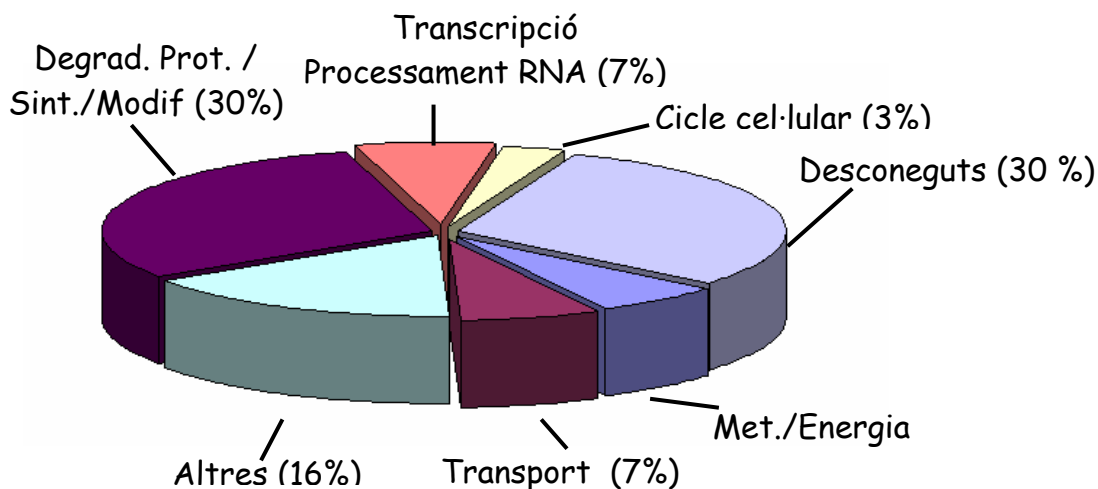


Figura 32. Representació gràfica del conjunt de gens que presenten una disminució dels nivells transcripcionals. Aquests gens han estat agrupats en les categories funcionals segons la classificació del SGD (Saccharomyces Genome Database).

La repressió de gens que codifiquen proteïnes ribosomals també ha estat observada en altres estudis com a conseqüència de diferents tipus d'estrès (Gasch *et al.*, 2000, Causton *et al.*, 2001, Warner, 1999). En la **taula 9** també presenten una disminució en l'expressió les polimerases I i II (*POL1*, *POL2*) i altres gens implicats en la transcripció i/o el processament del RNA. Aquesta disminució en la transcripció de gens que codifiquen proteïnes implicades en el procés de traducció té lloc perquè davant d'una situació d'estrès les cèl·lules han de reconduir la síntesi de proteïnes per potenciar aquelles que estan implicades en la resposta a estrès. La durada de la repressió del conjunt de gens que codifiquen proteïnes implicades en la traducció depèn del tipus d'estrès al qual està sotmès la cèl·lula (Causton *et al.*, 2001). Analitzant els nostres resultats s'ha observat que el 60 % dels gens d'aquest subgrup (29 d'un total de 48) presenten una disminució dels nivells transcripcionals després de 10 minuts d'exposició a pH alcalí i que en temps posteriors, 20 i 45 minuts, el nombre es redueix aproximadament fins al 30 % (13 gens als 20 minuts i 15 als 45 minuts). Per tant, la

repressió d'aquest conjunt de gens com a resposta a una situació d'estrès per pH alcalí es podria considerar relativament ràpida i transitòria en comparació a la majoria de tipus d'estrès avaluats prèviament. Una altra conjunt de gens clarament afectats estan implicats en diferents vies metabòliques: metabolisme d'aminoàcids (*PRS3*, *HIS2*, *GLN1*, *GTL1* i *ARO9*), metabolisme de lípids (*MUM3*, *URA7* i *ERG3*) i metabolisme de carbohidrats (*GLO4* i *SDH2*). També cal destacar aquells gen implicats en la regulació del cicle cel·lular, ja que tal i com hem comentat en una situació d'estrès per a les cèl·lules genera una disminució del creixement degut a una parada de cicle en la fase G1 de manera transitòria (Rowley *et al.*, 1993; Belli *et al.*, 2001). Aquesta parada en el cicle cel·lular també explicaria la disminució en l'expressió dels gens implicats en la biosíntesi d'aminoàcids, ja que una disminució del creixement va associada a una reducció de la maquinària biosintètica de la cèl·lula. La comparació del gens que presenten una disminució dels nivells de mRNA en aquest estudi realitzat a pH 8,0 (**taula 9**) amb un altra realitzat a un pH més lleuger (7,6) (Serrano *et al.*, 2002) ens revela que el nombre de proteïnes ribosomals que presenten una disminució en la seva expressió a un pH més lleuger és pràcticament insignificant (4 respecte les 48 identificades a pH 8,0). Aquests resultats es podrien explicar pel fet que en condicions d'estrès lleuger per pH alcalí no s'observa una aturada del creixement, mentre que enfront a una condició d'estrès més severa es produiria una parada transitòria en G1.

2.4. La via de la calcineurina com a possible mediador de la resposta transcripcional a pH alcalí

Evidències recents en el nostre laboratori ens han suggerit que la calcineurina podria estar implicada en la tolerància enfront a una situació d'estrès per pH alcalí en *Saccharomyces cerevisiae*. S'ha demostrat que en casos específics, com és el cas dels gens *ENA1* o *PHO89* la via de senyalització en la qual està implicada la calcineurina i el factor de transcripció Crz1, activat per la calcineurina, és necessària de manera parcial o total, en la resposta transcripcional enfront a una situació d'alcalinització del medi (Serrano *et al.*, 2002). Per avaluar si la calcineurina és un component que participa de manera general en la resposta transcripcional a pH alcalí es van realitzar experiments amb microxips de DNA comparant la resposta transcripcional de cèl·lules salvatges amb mutants deficientes en la subunitat reguladora de la calcineurina (*cnb1*), i amb cèl·lules que no presenten el factor de transcripció Crz1 (*crz1*) al ser sotmeses a pH alcalí (8,0)

durant diferents períodes de temps (10, 20 i 45 minuts) (Viladevall *et al.*, 2004). Es va reproduir el patró d'experiments realitzats amb una soca salvatge (veure **figura 26**) utilitzant cèl·lules deficientes en la subunitat reguladora de la calcineurina (*cnb1*) i es va comparar de manera directe la resposta transcripcional obtinguda a partir de les cèl·lules mutants *cnb1* amb la obtinguda en cèl·lules salvatges per exposició a pH alcalí al llarg del temps. Finalment, per examinar la implicació del factor de transcripció Crz1 en la via de senyalització de la calcineurina, es va comparar la resposta transcripcional d'una soca *crz1* després de l'exposició a pH alcalí durant 10, 20 i 45 minuts amb la de la soca salvatge (**figura 33**). En el disseny experimental utilitzat en aquest últim cas es van realitzar tres experiments dels quals dos corresponien a rèpliques biològiques, mentre que l'experiment restant era una rèplica tècnica.

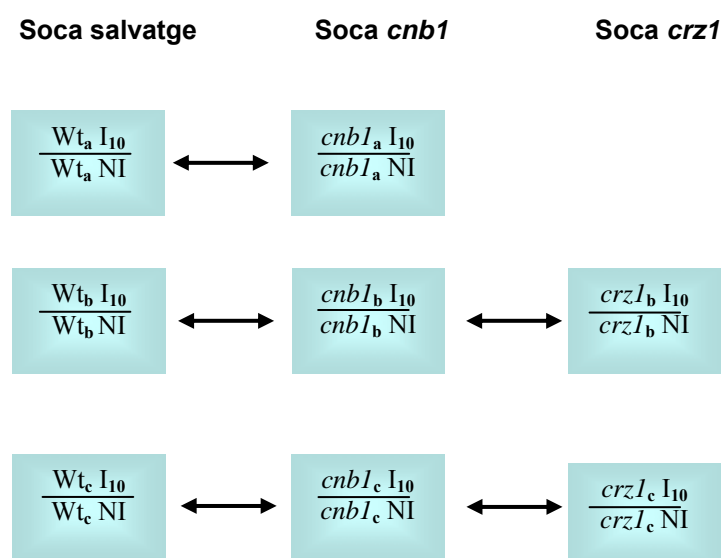


Figura 33. Esquema per avaluar la resposta transcripcional a pH alcalí mediada per la via de senyalització de la calcineurina. Els subíndexs **a**, **b** i **c** indiquen les diferents extraccions de RNA (rèpliques biològiques). Els quadrats representen els valors d'expressió corresponents al quocient entre la soca (**wt**, **cnb1** o **crz1**) exposada a pH alcalí (**I₁₀**) i la mateixa soca no exposada a la condició d'estrès (**NI**). Les fletxes simbolitzen la comparació dels valors d'expressió entre experiments diferents. En les extraccions de RNA **a** i **b** es va realitzar el marcatge recíproc per a cadascun dels experiments, mentre que en el cas de les extraccions de RNA indicades amb el subíndex **c** es va marcar sempre la soca **NI** amb el fluorocrom Cy3 i la **I₁₀** amb Cy5. Aquest mateix esquema es pot aplicar en la exposició a 20 i 45 minuts a pH alcalí.

Es van definir diferents nivells de dependència a la calcineurina a partir de la relació entre els resultats obtinguts amb cèl·lules mutants *cnb1* (*cnb1* I/*cnb1* NI) i cèl·lules salvatges (wt I/wt NI). Una relació *cnb1*/wt < 0,67 es va considerar el valor llindar per definir que un gen presentava, en la seva resposta transcripcional, dependència a la calcineurina. Els gens que presentaven una relació $0,67 > X > 0,50$ es van classificar com a “parcialment dependents”, amb una relació $0,50 > X > 0,25$ es van considerar “fortament dependents”, mentre que aquells gens amb una relació < 0,25 es van definir com a “totalment dependents”. Aquells gens que presentaven un nivell d’inducció superior a 2,5 vegades en cèl·lules salvatges i no estaven induïts en cèl·lules *cnb1* (relació pH8,0/pH6,2 < 1,3) també van ser considerats com a totalment dependents. Aplicant aquests criteris vam obtenir que 27 gens presentaven, en major o menor grau, dependència a la calcineurina en el seu pic màxim d’expressió (**taula 10**). Aquest conjunt de gens regulats per la calcineurina estan implicats en les següents funcions: transport (*PHO89*, *VPS74*, *HXT2* i *RSB1*), la resposta a estrès (*YGP1*, *CP7R* i *HOR2*) metabolisme de carbohidrats (*HXK2*, *GSC2*, *ADH3* i *GPM1*), altres metabolismes (*CHO2*, *ALT1*, *PUT1* i *SUR1*), degradació síntesi i modificació de proteïnes (*SSA1*, *PRB1* i *PEP4*), altres funcions (*YCL020W*, *SEDI* i *PHD1*) i gens de funció desconeguda (*YBR016W*, *YBR287W*, *ZPR1*, *YNL208W*, *YLR012C* i *YOR220W*).

La resposta transcripcional de 21 d’aquests gens (78 %) és total o fortament dependent a la calcineurina, indicant que la via de senyalització de la calcineurina és un component essencial en la seva resposta transcripcional enfront a una situació d’estrès per pH alcalí. La majoria de gens dependents de la calcineurina (81 %) presenten una resposta primerenca i tres d’aquests gens mostren un nivell d’inducció similar després de 10 i 20 minuts d’exposició. Si comparem aquest tant per cent (81 %) amb el nombre de gens que presenten un augment transcripcional als 10 minuts d’exposició (60 %) podem concloure que la resposta transcripcional a través de la via de senyalització de la calcineurina enfront a un estrès per pH alcalí és una resposta comparativament ràpida.

Taula 10. Conjunt de gens que en absència de calcineurina presenten disminuïda la resposta transcripcional respecte a una soca salvatge en condicions de pH alcalí. La resposta transcripcional que presenten aquests gens al llarg del temps està indicat com a resposta primerenca (P), intermèdia (I) o tardana (T) segons presenten el pic màxim d'expressió als 10, 20 o 45 minuts respectivament. Els valors ens indiquen el nivell d'inducció per a cadascuna de les soques al/s temps indicat/s. ND, no dependent, PD, parcialment dependent, FD, fortament dependent, TD, totalment dependents. Veure els text per més detall.

ORF	Temps	wt	cnb1	Dependència calcineurina	crz1	Dependència Crz1	Motiu CDRE
YAL005C (<i>SSA1</i>)	P/I	2.2/2.2	1.1/0.8	FD/FD	1.6/1.7	FD/FD	0
YBR016W	P/I	2.7/2.7	1.5/1.8	PD/PD	1.0/1.1	PD/PD	0
YBR287W	P	3.8	1.9	FD	2.0	FD	1
YBR296C (<i>PHO89</i>)	P	4.9	0.7	TD	1.0	TD	2
YCL020W	P	2.6	1.1	TD	0.9	TD	0
YDR077W (<i>SED1</i>)	P	2.7	1.4	PD	1.7	PD	0
YDR372C (<i>VPS74</i>)	P	2.9	1.2	FD	1.3	FD	1
YEL060C (<i>PRB1</i>)	P	9.1	3.8	FD	4.1	FD	2
YER062C (<i>HOR2</i>)	P/I	2.8/2.8	1.0/1.3	TD/TD	2.5/1.5	ND/PD	0
YGL253W (<i>HXK2</i>)	P	4.1	1.3	FD	1.9	FD	0
YGR032W (<i>GSC2</i>)	I	2.5	0.8	TD	0.9	TD	2
YGR157W (<i>CHO2</i>)	P	2.9	1.3	TD	1.1	TD	0
YGR211W (<i>ZPR1</i>)	P	2.8	1.3	TD	2.0	ND	0
YJR032W (<i>CPR7</i>)	T	3.2	1.3	FD	1.2	TD	0
YKL043W (<i>PHD1</i>)	P	4.1	2.2	PD	2.4	PD	0
YKL152C (<i>GPM1</i>)	P	2.2	1.1	FD	1.0	FD	1
YLR012C	T	2.1	1.0	FD	1.0	FD	0
YLR089C (<i>ALT1</i>)	P	3.7	2.0	PD	2.5	ND	0
YLR142W (<i>PUT1</i>)	P	2.6	1.2	TD	2.4	ND	1
YMR011W (<i>HXT2</i>)	P	21.1	9.7	FD	15.3	ND	0
YMR083W (<i>ADH3</i>)	P	2.2	1.1	FD	0.9	FD	0
YNL160W (<i>YGP1</i>)	P	2.7	1.5	PD	1.1	TD	1
YNL208W	P	3.1	1.8	PD	2.7	ND	0
YOR049C (<i>RSB1</i>)	P	3.3	1.2	TD	2.5	ND	0
YOR220W	P	4.5	1.9	FD	3.0	PD	2
YPL057C (<i>SUR1</i>)	P	3.2	1.4	FD	1.9	PD	2
YPL154C (<i>PEP4</i>)	I	3.9	1.6	FD	2.2	PD	1

S'ha realitzat un anàlisi dels 266 gens induïts més de dues vegades mitjançant el programa GEPAS (Gene Expression Pattern Analysis Suite) del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) per identificar el conjunt de gens que presenten una disminució de l'expressió en mutants *cnb1* i *crz1* respecte a una soca salvatge en cada temps analitzat. S'ha calculat la mediana dels cinc valors d'expressió obtinguts per una soca salvatge (wt I/wt NI), en un mutant *cnb1* (*cnb1* I/*cnb1* NI) i els tres corresponents a cèl·lules *crz1* (*crz1* I/*crz1* NI). Els valors obtinguts han estat transformats logàritmicament en base 2, agrupats mitjançant el programa SOTA (Self-Organising Tree Algorithm) (Herrero *et al.*, 2001) i visualitzats mitjançant el programa SotaTree. S'ha realitzat una selecció dels *clusters* que presenten una disminució de l'expressió en mutants *cnb1* als 10, 20 i/o 45 minuts d'exposició a pH alcalí i s'observa la presència de 25 gens d'un total de 27 identificats en la taula 10 com a dependents de la calcineurina (**figura 34**). Als 10 minuts d'exposició a pH alcalí hi trobem 19 dels 23 gens identificats en la taula 10 com a gens de resposta primerenca (figura 34 A), als 20 minuts hi trobem tots els gens de resposta intermèdia (figura 34 B) i als 45 minuts apareixen els 2 gens que presenten una resposta a pH alcalí tardana (figura 34 C). Cal destacar la presència de *ENAI* en l'anàlisi corresponent als 10 minuts d'exposició a pH alcalí (figura 26 A), ja que aquest gen juntament amb *PHO89* van ser els primers en què es va observar una disminució de la seva resposta transcripcional en absència de Cnb1 o Crz1 (Serrano *et al.*, 2002). En aquest treball es va demostrar que la resposta transcripcional de *PHO89* enfront a un estrès per pH alcalí era totalment dependent de la calcineurina, mentre que en el cas del gen *ENAI* només un 60 % de la resposta tenia lloc mitjançant aquesta via de senyalització. El fet que *ENAI* presenti una resposta transcripcional a pH alcalí a on la via de senyalització de la calcineurina no és el component prioritari explicaria que aquest gen no hagi estat identificat com a dependent a la calcineurina amb els criteris estadístics aplicats (relació *cnb1*/wt < 0,67).

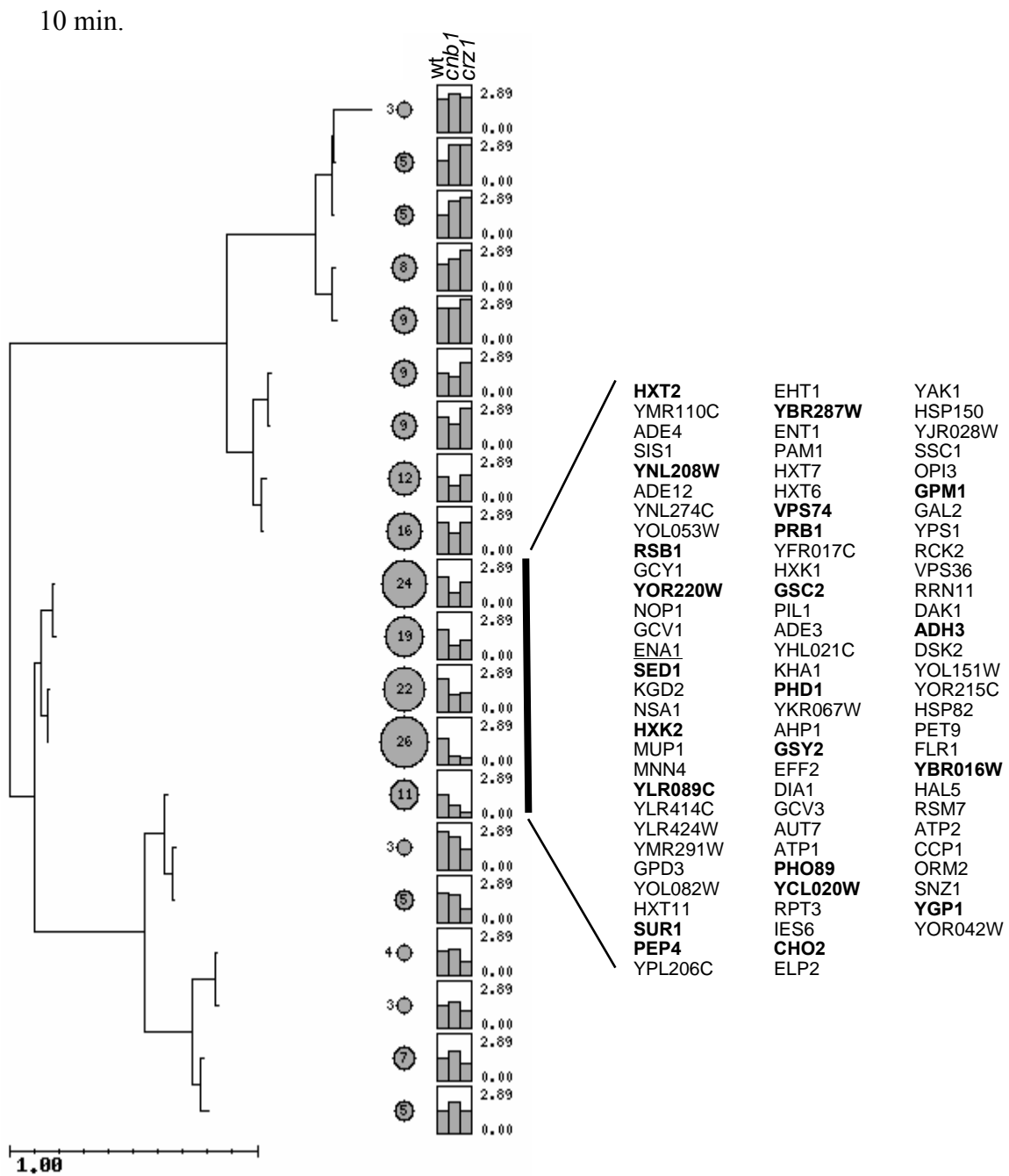


Figura 34 A.

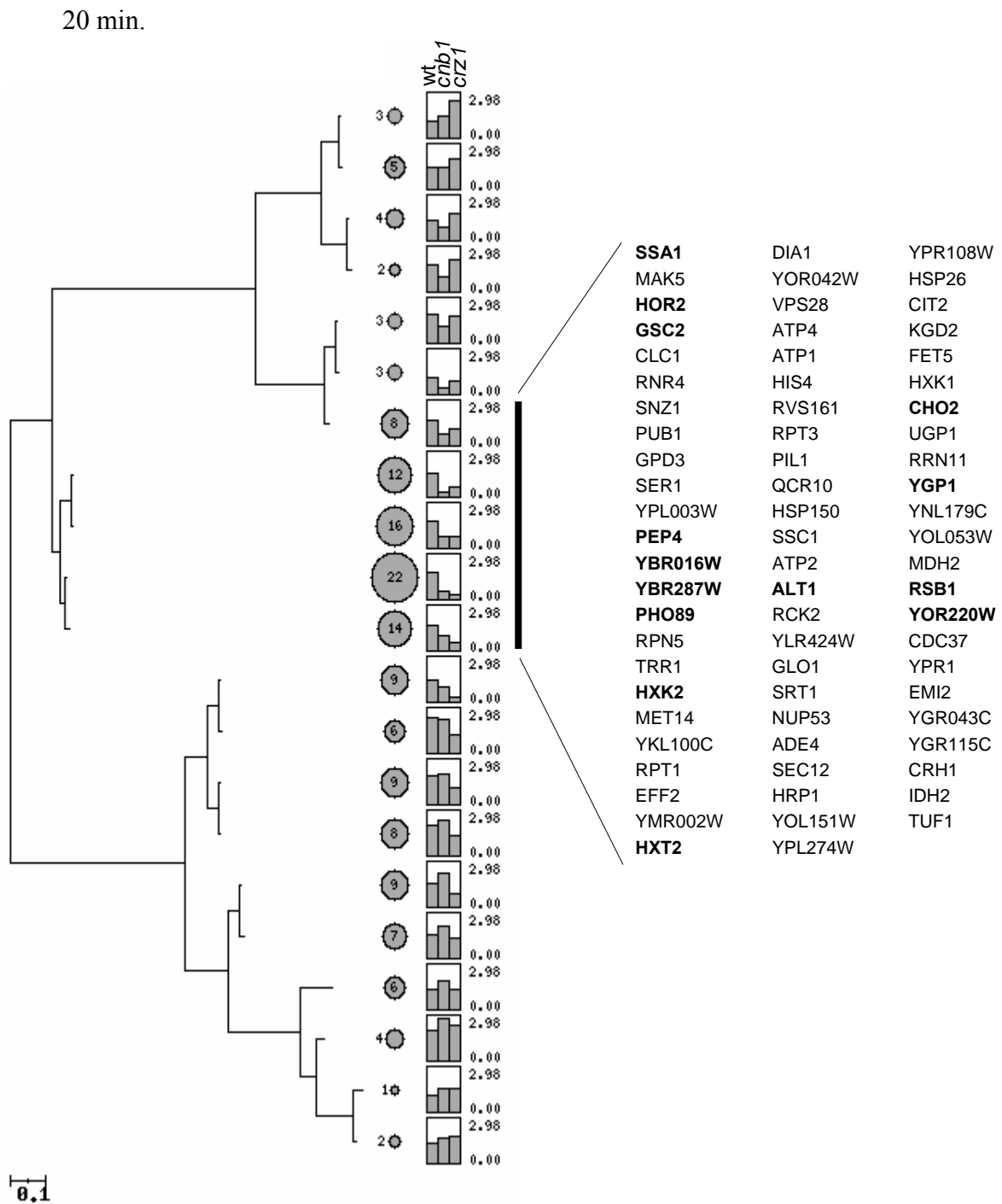


Figura 34 B.

45 min.

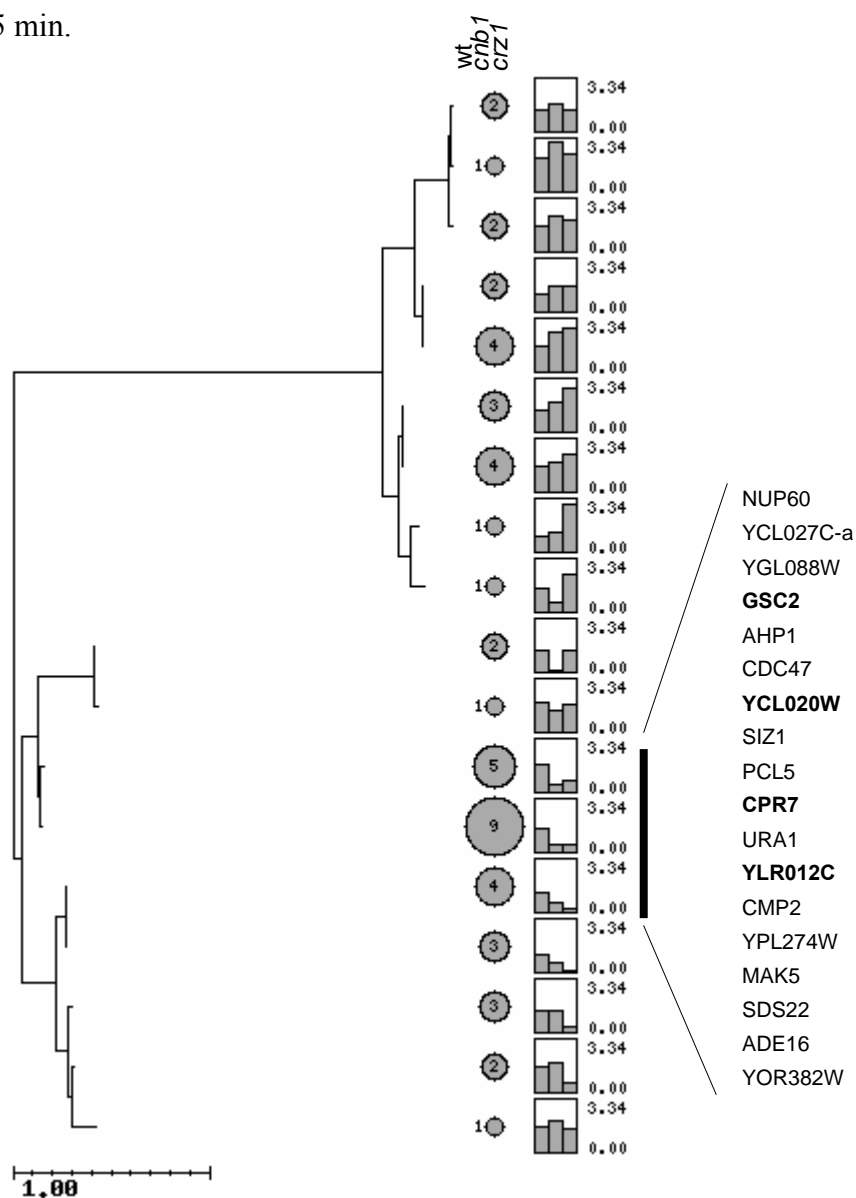


Figura 34 C.

Figura 34. Representació gràfica mitjançant el programa estadístic GEPAS del CNIO del conjunt de gens que presenten un augment dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades en cadascun dels temps (10, 20 i 45 minuts). Es representen els valors d'expressió per a cadascun dels gens en una soca salvatge, un mutant *cnb1* i un mutant *crz1* respectivament. S'ha seleccionat visualment el *cluster* de gens (línia negra) que presenten una disminució dels nivells de mRNA en una soca *cnb1* respecte a la soca salvatge i aquest conjunt de gens han estat ampliats a la dreta de cadascuna de les figures. En negreta s'han marcat els gens que també estan presents en la taula 5.

L'exposició a elevades concentracions de calci dóna lloc a una resposta transcripcional mediada per la calcineurina que suposa l'augment de l'expressió de 153 gens (Yoshimoto *et al.*, 2002). S'ha observat que 22 gens que presenten un augment transcripcional enfront a una situació d'estrès per pH alcalí (**taula 5**) també mostren un increment dels nivells de mRNA per elevades concentracions de calci en el medi. Set d'aquests gens (*YBR287W*, *PHO89*, *PRB1*, *PUT1*, *YNL208W*, *YOR220W* i *SUR1*) també han estat definits com a sensibles a l'absència de calcineurina per Yoshimoto *et al.*, 2002. El fet que el tant per cent de coincidència en la resposta transcripcional en condicions d'estrès per elevades concentracions de calci i per pH alcalí sigui relativament baix (14 %) es podria explicar per la presència d'altres vies, a part de la via de senyalització de la calcineurina, que actuen en condicions de pH alcalí com la via Rim101/Nrg1 i altres que encara han de ser identificades (Lamb *et al.*, 2001; Lamb and Mitchell 2003; Serrano *et al.*, 2002; Viladevall *et al.*, 2004). L'estudi de la resposta transcripcional mediada per la calcineurina com a resposta a l'exposició a elevades concentracions de calci extracel·lular es va realitzar mitjançant un disseny experimental en el qual es comparava directament la resposta transcripcional d'un mutant *cnb1* i *crz1* amb la soca salvatge (wt) exposades a la condició d'estrès (Yoshimoto *et al.*, 2002). Per aquest motiu es va decidir utilitzar aquest altre disseny experimental per identificar el conjunt de gens que presenten una disminució de la seva expressió en mutants *cnb1* i *crz1* als 10 minuts d'exposició a pH alcalí (veure **figura 35**).

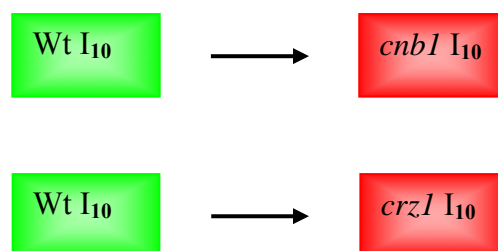


Figura 35. Esquema per identificar el conjunt de gens dependents a la calcineurina i a Crz1 enfront a una situació d'estrès per pH alcalí mitjançant el mateix disseny experimental emprat per elevades concentracions de calci i/o sodi en el medi (Yoshimoto *et al.*, 2002). Els quadrats representen les diferents condicions analitzades en cadascun dels experiments, **wt I₁₀** (soca salvatge sotmesa durant 10 minuts a pH alcalí), **cnb1 I₁₀** i **crz1 I₁₀** (soques mutants sotmeses durant 10 minuts a pH alcalí). En color verd s'indica la mostra control la qual ha estat marcada amb el fluorocrom Cy3, mentre que en vermell s'indica la mostra problema marcada amb Cy5. Les fletxes indiquen les dues mostres que es comparen en cadascun dels experiments.

La comparació dels resultats obtinguts als 10 minuts d'exposició a pH alcalí mitjançant aquest disseny experimental amb els obtinguts anteriorment a on es definien com a dependents de la calcineurina el conjunt de gens que presentaven una relació $cnb1/wt < 0,67$ (taula 5), ens revela que el 76 % (19 gens d'un total de 25 identificats com a primerencs) també presenten, com a mínim, aquest grau de dependència definit com un valor d'expressió $cnb1I_{10}/wtI_{10} < 0,67$.

Taula 11. Comparació dels valors d'expressió dels gens identificats com a dependents a la calcineurina obtinguts mitjançant dos tipus diferents de disseny experimental. En la primera columna (ORF) es mostren els 27 gens identificats com a dependents a la calcineurina utilitzant el primer disseny experimental (figura 33) indicant els temps a on apareix aquesta dependència (per més informació veure taula 5). En la tercera i quarta columna es mostren els valors d'expressió obtinguts amb el nou disseny experimental emprat en el treball de Yoshimoto *et al.*, 2002 (figura 35).

ORF	Temps	Dependència calcineurina		
			$cnb1I_{10}/wtI_{10}$	$crz1I_{10}/wtI_{10}$
YAL005C (SSA1)	P/I	FD/FD	0,64	-
YBR016W	P/I	PD/PD	0,32	0,44
YBR287W	P	FD	0,47	0,45
YBR296C (PHO89)	P	TD	0,09	0,06
YCL020W	P	TD	0,25	0,12
YDR077W (SED1)	P	PD	1,06	0,92
YDR372C (VPS74)	P	FD	0,40	0,63
YEL060C (PRB1)	P	FD	0,22	0,24
YER062C (HOR2)	P/I	TD/TD	0,74	1,49
YGL253W (HXK2)	P	FD	0,57	0,83
YGR032W (GSC2)	I	TD	0,31	0,38
YGR157W (CHO2)	P	TD	0,33	0,38
YGR211W (ZPR1)	P	TD	0,56	1,29
YJR032W (CPR7)	T	FD	1,16	0,68
YKL043W (PHD1)	P	PD	0,52	0,72
YKL152C (GPM1)	P	FD	1,07	1,69
YLR012C	T	FD	1,61	0,69
YLR089C (ALT1)	P	PD	0,56	0,81
YLR142W (PUT1)	P	TD	0,48	0,49
YMR011W (HXT2)	P	FD	0,94	0,81
YMR083W (ADH3)	P	FD	0,84	1,53
YNL160W (YGP1)	P	PD	0,66	0,73
YNL208W	P	PD	0,43	0,68
YOR049C (RSB1)	P	TD	0,59	0,95
YOR220W	P	FD	0,26	0,39
YPL057C (SUR1)	P	FD	0,43	0,52
YPL154C (PEP4)	I	FD	0,73	0,91

En el treball realitzat per Yoshimoto *et al.*, 2002 van identificar un conjunt de gens que s'activaven per elevades concentracions de calci i/o sodi en el medi. A més, van observar que un subgrup de gens presentaven una disminució dels nivells d'expressió en mutants *cnb1*. La gran majoria d'aquests gens tenien marcadament disminuïda la seva inducció en mutants *crz1*. Aquests resultats ens demostren que en condicions d'estrès per elevades concentracions de calci i/o sodi, Crz1 és el principal mediador de la resposta transcripcional que es produeix per la via de la calcineurina. Davant d'aquests resultats ens vàrem plantejar realitzar experiments utilitzant la tecnologia de microxips de DNA, per comprovar si aquest paral·lelisme es mantenia en condicions d'estrès per pH alcalí. Es van realitzar tres experiments per a cadascun dels temps analitzats utilitzant cèl·lules *crz1* i es van identificar 21 gens dependents de Crz1 (veure apartat 7 de Materials i Mètodes). La comparació de la resposta transcripcional davant d'una situació d'estrès per pH alcalí en mutants *cnb1* i *crz1* ens indica que, en la majoria dels casos, l'absència de *CRZ1* dóna lloc a una disminució de la resposta similar a l'observada en una soca *cnb1* (**taula 10**). Els resultats per un estrès a pH alcalí concorden amb els obtinguts per elevades concentracions de calci i/o sodi en el medi, per tant, es corrobora que el factor de transcripció Crz1 és el principal mediador de la resposta transcripcional que té lloc a través de la via de la calcineurina.

Si aquest conjunt de gens identificats en la **taula 10** estan regulats directament per Crz1, haurien de presentar en els seus promotors una seqüència d'unió a aquest factor de transcripció. Aquesta seqüència ha estat identificada experimentalment com a GAGGCT amb algunes variants com són les seqüències GNGGCKCA i GWGGCTG (Yoshimoto *et al.*, 2002; Lagorce *et al.*, 2003). L'anàlisi dels promotors d'aquests gens s'ha realitzat en les dues cadenes de la regió -800/-1 utilitzant un algoritme que ens permet identificar patrons de DNA i està disponible en la pàgina web <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> (*Regulatory Sequence Analysis Tools*). Hem trobat 16 seqüències CDRE en 11 dels gens sensibles a la calcineurina (41 %), veure **taula 10**. Per altra banda, s'ha realitzat el mateix anàlisi pel conjunt de gens identificats com a dependents a la calcineurina en presència d'elevades concentracions de calci i/o sodi en el medi (Yoshimoto *et al.*, 2002) obtenint que, el 61 % presentaven, com a mínim, una de les seqüències d'unió a Crz1. L'anàlisi a nivell de tot el genoma de llevat ens revela que només el 25 % dels gens contenen una o més còpies de les seqüències qüestionades (**taula 12**). Davant d'aquests resultats podem concloure que, tot i que els gens

identificats com a dependents a la calcineurina presenten un excés d'elements CDRE, caldria un anàlisi més exhaustiu per determinar la seqüència consens d'unió a Crz1. Partint de l'observació que aquest conjunt de gens estan co-regulats vàrem pensar que podrien existir elements comuns en els seus promotors i per aquest motiu es va decidir realitzar un anàlisi computacional per extreure aquests possibles elements. El programa d'anàlisi utilitzat, Pattern Discovery Oligo-analysis (words), es basa en la detecció d'oligonucleòtids sobrerrepresentats en la regió promotora d'aquests gens (van Helden *et al.*, 1998) i està disponible en la pàgina web <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/> (*Regulatory Sequence Analysis Tools*). S'ha analitzat la regió -800/-1 obtenint que un 70 % dels gens identificats com a dependents a la calcineurina en la seva resposta a pH alcalí presenten la seqüència consens WGGCTS amb un valor de p de 0,00145. Aquest percentatge és del 63 % quan analitzem el conjunt de gens dependents de la calcineurina en la seva resposta a elevades concentracions de calci i/o sodi. S'ha realitzat un anàlisi similar a nivell de tot el genoma de llevat identificant la seqüència WGGCTS en un 36 % dels gens (**taula 12**). Aquests resultats suggereixen que tot i que el consens WGGCTS definit en aquest treball és força satisfactori, el conjunt de seqüències consens conegudes actualment no representen tots els possibles llocs d'unió a Crz1.

Taula 12. Anàlisi dels promotors dels gens identificats com dependents a la calcineurina en la resposta a pH alcalí i per la presència d'elevades concentracions de calci i/o sodi en el medi (Yoshimoto *et al.*, 2002). A: Percentatge de gens que presenten una o més de les seqüències d'unió a Crz1 identificades en aquest moment (GAGGCT, GNGGCKCA i GWGGCT). **B:** Anàlisi de la presència de la seqüència WGGCTS identificada en aquest treball. Per a cadascuna de les condicions analitzades s'han proposat dues situacions: en la primera s'ha permès el solapament amb els ORFs contigus, mentre que en la segona no. Per avaluar si els resultats obtinguts són significatius s'ha realitzat una cerca a nivell de tot el genoma de llevat per a cadascuna de les condicions analitzades.

A: GAGGCT/ GNGGCKCA/ GWGGCT

	Treball present	Yoshimoto <i>et al.</i>, 2002	Tot el genoma de <i>S. cerevisiae</i>
No solapament	33 %	52 %	15 %
Solapament	41 %	61 %	25 %

B: WGGCTS

	Treball present	Yoshimoto <i>et al.</i>, 2002	Tot el genoma de <i>S. cerevisiae</i>
No solapament	70 %	63 %	36 %
Solapament	81 %	73 %	61 %

La relació entre l'efecte de les mutacions *cnb1* i *crz1* en la resposta a pH alcalí es pot deduir de la **figura 36**. En aquesta figura, la relació entre el nivell d'inducció en un mutant *cnb1* o *crz1* i les cèl·lules salvatge ha estat calculada i s'han representat la transformació logarítmica d'aquests valors.

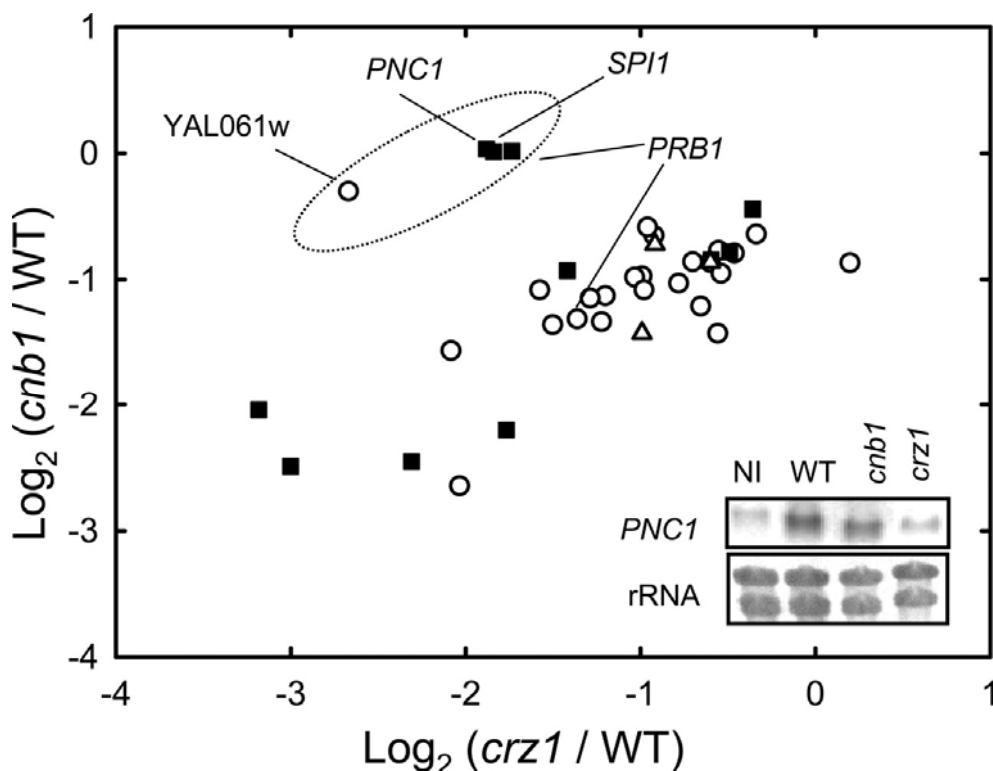


Figura 36. Relació entre la dependència a la calcineurina i la dependència a Crz1 en la resposta transcripcional a estrès per pH alcalí. En aquesta gràfica hi ha representat el log_2 del grau de dependència de la resposta a pH alcalí en mutants deficientes en la subunitat reguladora de la calcineurina (*cnb1/wt*) i mutants *crz1* (*crz1/wt*) per aquells gens que estan afectat de manera significativa com a mínim en una d'aquestes soques mutants després de 10 (cercles), 20 (quadrats) o 45 minuts (triangles) d'exposició a la condició d'estrès. L'elipse dibuixada inclou els gens sensibles a l'absència de Crz1 però no afectats en el mutant *cnb1*. A baix i a la dreta de la figura es presenta l'anàlisi per Northern blot d'un d'aquests gens (*PNC1*). La tinció del rRNA amb blau de metilè s'inclou com a referència per comprovar que la quantitat carregada i l'eficiència de la transferència és aproximadament la mateixa en cadascuna de les condicions estudiades. NI, no induït en cèl·lules salvatges.

L'anàlisi de les dades ens indica que en la majoria dels casos la correlació és bona ($r = 0,81$). Cal destacar l'existència de quatre gens (*YAL061W*, *PNC1*, *SPI1* i *PRB1*) els quals es desmarquen clarament de la majoria de casos i apareixen com a dependents del factor de transcripció Crz1 però no de la calcineurina. Aquesta situació es presenta als 20 minuts d'inducció en els gens *PNC1*, *SPI1* i *PRB1*, mentre que en el cas de *YAL061W* l'efecte s'observa als 10 minuts d'exposició a la condició d'estrès. *PRB1* també presentava un increment en el nivells de mRNA als 10 minuts d'exposició a pH alcalí i en aquest temps la relació entre el nivell d'inducció en un mutant *cnb1* o *crz1* i les cèl·lules salvatges era molt similar (veure figura 26). L'anàlisi per Northern blot d'un d'aquests gens, *PNC1* (veure figura 26 el requadre de baix a la dreta) i l'anàlisi per PCR quantitativa a temps real de tres d'ells (*PNC1*, *PRB1* i *SPI1*) confirmen els resultats obtinguts mitjançant la tecnologia de microxips de DNA (taula 13). L'anàlisi computacional de la regió promotora -800/-1 ens indica que tots quatre gens contenen una (*YAL061W* i *SPI1*) o dues (*PNC1* i *PRB1*) de les seqüències d'unió a Crz1 definides anteriorment.

Taula 13. Avaluació utilitzant la tecnologia de microxips de DNA i per PCR quantitativa a temps real de l'augment transcripcional per pH alcalí dels gens *PNC1*, *PRB1* i *SPI1*. Els números indiquen l'increment dels nivells de mRNA en les soques DBY746 (salvatge), RSC21 (*cnb1*) i EDN92 (*crz1*) i s'inclou la relació entre aquests valors d'expressió obtinguts entre una soca *crz1* i una soca *cnb1* (*crz1/cnb1*). Els resultats obtinguts dels microxips corresponen a la mitjana de 3 experiments diferents (procedent de dues mostres de RNA independents) i els resultats a partir de la PCR a temps real (RT-PCR) són la mitjana d'aquestes dues extraccions de RNA, determinades per duplicat. Cal comentar que els resultats dels microxips per la soca salvatge poden ser diferents dels presentats en la taula 3, els quals són el producte de la integració de 5 experiments de microxips.

Gen	Salvatge		<i>cnb1</i>		<i>crz1</i>		<i>crz1/cnb1</i>	
	<u>Xips</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>Xips</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>Xips</u>	<u>RT-PCR</u>	<u>Xips</u>	<u>RT-PCR</u>
<i>PNC1</i>	4,8	7,6	5,3	11,1	2,8	4,0	0,48	0,36
<i>PRB1</i>	5,7	7,1	7,0	15,0	1,5	2,8	0,21	0,19
<i>SPI1</i>	7,8	13,3	7,7	21,0	2,8	9,3	0,36	0,44

Els valors d'inducció obtinguts per PCR quantitativa a temps reals són, en tots els casos, superiors als obtingut mitjançant la tecnologia de microxips de DNA. Tot i això les relacions obtingudes entre les soques *crz1* i *cnb1* són semblants (**taula 13**) i ens confirmen que els gens *PNC1*, *PRB1* i *SPI1* presenten una disminució en mutants *crz1* i que aquesta disminució no s'observa en mutants *cnb1*. Una possible explicació del sistema de regulació per aquests quatre gens seria que aquest factor de transcripció pogués està regulat per una via de senyalització independent de la calcineurina i que, per tant, una altra fosfatasa podria defosforilar Crz1 produint la seva translocació al nucli a on actuaria activant un conjunt de gens entre els quals hi trobaríem *YAL061W*, *PNC1*, *SPI1* i *PRB1*. La confirmació d'aquests resultats podria suposar un canvi important en el concepte actual sobre la funció de Crz1, ja que a part de mediar la resposta transcripcional de la via de senyalització de la calcineurina podria participar en altres vies de senyalització.

2.5. Translocació del factor de transcripció Crz1 al nucli en condicions d'estrès per pH alcalí

S'ha demostrat que l'exposició de cèl·lules de llevat a elevades concentracions de calci en el medi activa la calcineurina la qual actua fosforilant el factor de transcripció Crz1 i com a conseqüència aquest és translocat cap al nucli de la cèl·lula (Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999) per regular la transcripció d'un conjunt de gens. Per aquest motiu vam decidir examinar la localització de Crz1 en resposta a pH alcalí utilitzant la proteïna GFP fusionada amb Crz1 en cèl·lules salvatges i mutants *cnb1* (**figura 37**). Tant en les cèl·lules salvatges com en les cèl·lules mutants *cnb1* crescudes en condicions estàndards, la proteïna GFP-Crz1 es trobava en el citosol. En canvi, quan les cèl·lules salvatges eren incubades a un pH de 7,9-8,1, la proteïna GFP-Crz1 era translocada al nucli. Com a control positiu es van utilitzar cèl·lules salvatges tractades amb CaCl_2 i com a control negatiu les cèl·lules de llevat es van incubar amb KCl. Aquests experiments es van repetir tres vegades i els resultats obtinguts mostraven que, igual que per elevades concentracions de calci, en condicions de pH alcalí es produeix una translocació de Crz1 al nucli. Per tant, podem concloure que les cèl·lules de llevat exposades a pH alcalí presenten un augment del calci intracel·lular (Viladevall *et al.*, 2004) que produeix l'activació de la calcineurina la qual defosforila Crz1 i com a

conseqüència aquest és translocat el nucli (Viladevall *et al.*, 2004) a on reconeix elements CDRE dels promotors dels gens i actua activant la seva transcripció.

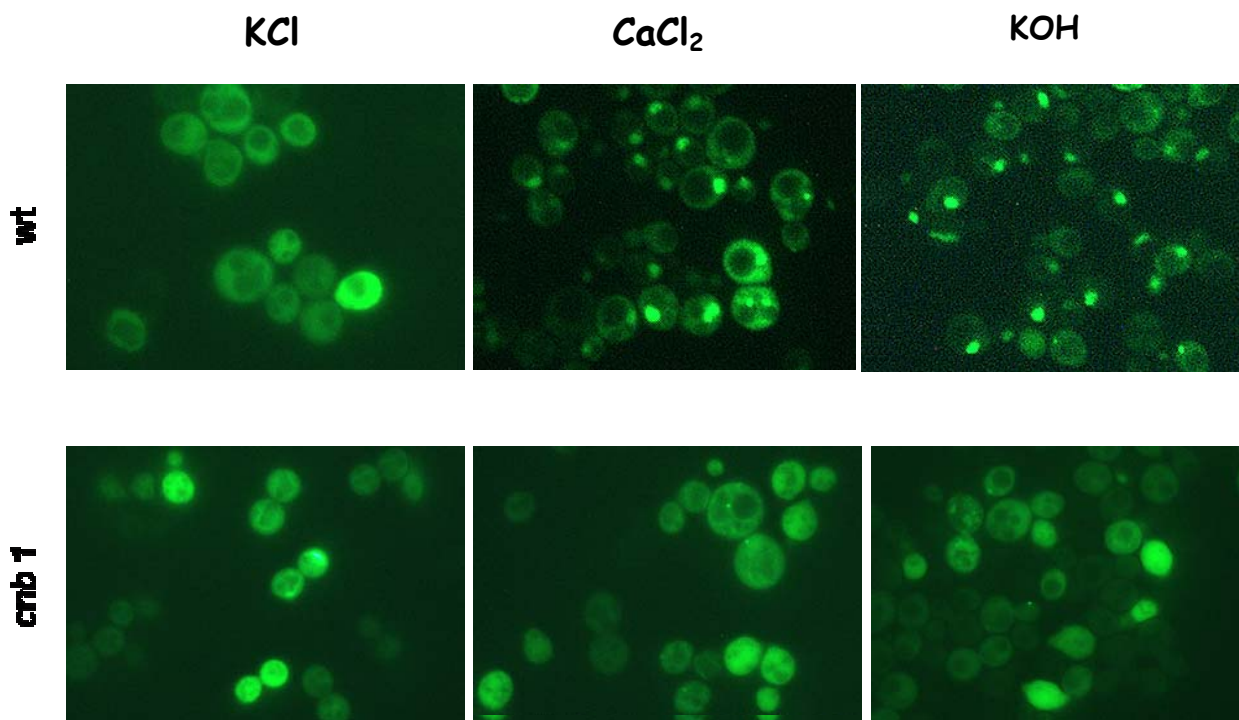


Figura 37. Translocació de Crz1 al nucli en condicions d'estrès per pH alcalí. Les cèl·lules de llevat wt i *cnb1* les qual expressen 3xGFP-Crz1 (LMB127) es van créixer a 21 °C fins a arribar a la fase exponencial. Les cèl·lules van ser tractades durant 30 minuts amb 200 mM de CaCl₂, 16 mM de KOH (pH 8,0) o 16 mM de KCl i van ser visualitzades utilitzant un microscopi de fluorescència amb un augment de 1000 vegades.

VI. CONCLUSIONS

1. S'han amplificat aproximadament 6000 gens de *Saccharomyces cerevisiae* en col·laboració amb els laboratoris de la Universitat de València i la Universitat Complutense de Madrid mitjançant tres estratègies diferents:

- Utilitzant la primera estratègia es van amplificar els ORFs de *S. cerevisiae* a partir de la biblioteca Yeast Exclones obtenint un producte satisfactori de 5563 gens (76 %).
- Per a l'amplificació dels ORFs que presentaven una longitud superior a 3 Kb es van dissenyar oligonucleòtids interns obtenint un percentatge d'èxit del 96,8 %.
- Els ORFs que havien donat un resultat negatiu utilitzant aquestes dues estratègies, més 56 ORFs nous descoberts van ser amplificats a partir de DNA genòmic mitjançant els oligonucleòtids GenePairs (Research Genetics) amplificant el 95,2 % d'aquests.

2. Amb el material amplificat s'han generat microxips de DNA que contenen 6073 ORFs de llevat, 286 gens duplicats que segons estudis previs presenten un augment transcripcional en condicions de pH alcalí, 40 gens seleccionats a l'atzar i una sèrie de controls positius i negatius donant lloc a un total de 6720 deposicions.

3. Dels 6073 ORFs representats en el microxip 266 presenten un increment dels nivells de mRNA de, com a mínim, dues vegades després de l'exposició a pH alcalí durant 10, 20 i/o 45 minuts.

4. D'aquests 266 gens, 159 presenten un pic màxim d'expressió als 10 minuts (resposta primerenca), 86 als 20 minuts (resposta intermèdia) i només 21 presenten una resposta tardana (pic d'expressió als 45 minuts). La majoria dels gens induïts de manera primerenca retornen als nivells basals ràpidament. Podem concloure que la resposta enfront a una situació d'estrès per pH alcalí és, en general, ràpida i transitòria.

5. La divisió en categories funcionals d'aquests 266 gens ens revela que:

- Un nombre important de gens relacionats amb la resposta a estrès oxidatiu també són activats com a resposta a pH alcalí. Part de la resposta transcripcional deguda a l'exposició a un pH elevat podria ser el resultat d'una situació d'estrès oxidatiu.
- En condicions de pH alcalí s'activen un conjunt de gens involucrats en la captació de ferro i coure del medi observant-se una resposta similar a l'obtinguda en condicions limitants d'aquests ions.

- En la categoria funcional on s'inclouen gens relacionats amb el transport cal destacar la presència de transportadors d'hexoses i de fosfat. L'exposició a pH alcalí podria generar una situació limitant de glucosa i fosfat inorgànic.
- Un nombre significatiu de gens identificats en la resposta enfront a una situació de dany a la paret cel·lular també són activats per l'exposició a pH alcalí. La exposició a pH alcalí podria generar, en més o menys grau, una situació de dany a la paret cel·lular.

6. 159 gens presenten una disminució en els nivells de mRNA després de l'exposició a pH alcalí de com a mínim dues vegades. Aproximadament un 30 % d'aquests gens codifiquen proteïnes implicades en la biosíntesi, modificació de proteïnes o en la biogènesi i ensemblament de ribosomes.

7. S'han identificat 27 gens regulats per la via de senyalització de la calcineurina en condicions de pH alcalí. D'aquests, 21 van ser identificats com a dependents de Crz1. S'ha comprovat que es produeix una translocació de Crz1 al nucli en condicions de pH alcalí. Per tant, es corrobora que el factor de transcripció Crz1 és el mediador principal de la resposta transcripcional que té lloc a través de la via de la calcineurina.

8. Només un 41 % dels gens dependents de la calcineurina presenten seqüències CDRE identificades actualment. Aquests resultats suggereixen que aquestes no representen tots els possibles llocs d'unió a Crz1. Hem definit un nou consens d'unió a Crz1, WGGCTS, el qual està present en un 70 % dels gens identificats com dependents a la calcineurina.

9. Cal destacar l'existència de quatre gens (*YAL061W*, *PNC1*, *SPI1* i *PRB1*) que apareixen com a dependents del factor de transcripció Crz1 però no de la calcineurina. Aquests resultats suggereixen que el factor de transcripció Crz1 podria estar regulat per una via de senyalització independent de la calcineurina.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Adams,A., Gottschling,D.E., Kaiser,C.A., Stearns,T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Alberola,T.M., Garcia-Martinez,J., Antunez,O., Viladevall,L., Barcelo,A., Arino,J., Perez-Ortin,J.E. (2004). A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int.Microbiol.* 7, 199-206.
- Albertyn,J., Hohmann,S., Thevelein,J.M., Prior,B.A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol.Cell Biol.* 14, 4135-4144.
- Allemand,J.F., Bensimon,D., Jullien,L., Bensimon,A., Croquette,V. (1997). pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys.J.* 73, 2064-2070.
- Amoros,M., Estruch,F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol.Microbiol.* 39, 1523-1532.
- Aramburu,J., Heitman,J., Crabtree,G.R. (2004). Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.* 5, 343-348.
- Aramburu,J., Rao,A., Klee,C.B. (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr.Top.Cell Regul.* 36, 237-295.
- Arst,H.N., Jr., Penalva,M.A. (2003). Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal.Genet.Biol.* 40, 1-3.
- Askwith,C., Kaplan,J. (1998). Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem.Sci.* 23, 135-138.
- Baetz,K., Moffat,J., Haynes,J., Chang,M., 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.
- Bataille,N., Regnacq,M., Boucherie,H. (1991). Induction of a heat-shock-type response in *Saccharomyces cerevisiae* following glucose limitation. *Yeast.* 7, 367-378.
- Belli,G., Gari,E., Aldea,M., Herrero,E. (2001). Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* 39, 1022-1035.
- Bensen,E.S., Martin,S.J., Li,M., Berman,J., Davis,D.A. (2004). Transcriptional profiling in *Candida albicans* reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol.Microbiol.* 54, 1335-1351.
- Bisson,L.F., Coons,D.M., Kruckeberg,A.L., Lewis,D.A. (1993). Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 28, 259-308.
- Blaiseau,P.L., Lesuisse,E., Camadro,J.M. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 34221-3422.

- Blandin,G., Durrens,P., Tekaia,F., Aigle,M., Bolotin-Fukuhara,M., Bon,E., Casaregola,S., de Montigny,J., Gaillardin,C., Lepingle,A., Llorente,B., Malpertuy,A., Neuveglise,C., Ozier-Kalogeropoulos,O., Perrin,A., Potier,S., Souciet,J., Talla,E., Toffano-Nioche,C., Wesolowski-Louvel,M., Marck,C., Dujon,B. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited. *FEBS Lett.* *487*, 31-36.
- Boles,E., Hollenberg,CP.(1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* *21*, 85-111.
- Bonilla,M., Nastase,K.K., Cunningham,K.W. (2002). Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* *21*, 2343-2353.
- Botstein,D., Chervitz,S.A., Cherry,M. (1997). Yeast as a Model Organism. *Science.* *277*, 1259-1260.
- Boucherie,H. (1987). Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* *161*, 385-392.
- Bourget,C., Trevisiol,E., Bridon,I., Kotera,M., Lhomme,J., Laayoun,A. (2005). Biotin-phenyldiazomethane conjugates as labeling reagents at phosphate in mono and polynucleotides. *Bioorg.Med.Chem.* *13*, 1453-1461.
- Boustany,L.M., Cyert,M.S. (2002). Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.* *16*, 608-619.
- Boy-Marcotte,E.,Garreau,H., Jacquet,M. (1987). Cyclic AMP controls the switch between division cycle and resting state programs in response to ammonium availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* *3*, 85-93.
- Brazma,A., Hingamp,P., Quackenbush,J., Sherlock,G., Spellman,P., Stoeckert,C., Aach,J., Ansorge,W., Ball,C.A., Causton,H.C., Gaasterland,T., Glenisson,P., Holstege,F.C., Kim,I.F., Markowitz,V., Matese,J.C., Parkinson,H., Robinson,A., Sarkans,U., Schulze-Kremer,S., Stewart,J., Taylor,R., Vilo,J., Vingron,M. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat.Genet.* *29*, 365-371.
- Buffo, J., M. A. Herman, and D. R. Soll. 1984. A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*. *Mycopathologia* 85:21-30.
- Caddick,M.X., Brownlee,A.G., Arst,H.N., Jr. (1986). Phosphatase regulation in *Aspergillus nidulans*: responses to nutritional starvation. *Genet.Res.* *47*, 93-102.
- Casas,C., Aldea,M., Espinet,C., Gallego,C., Gil,R., Herrero,E. (1997). *Yeast.* *13*, 621-637.
- Causton,H.C., Ren,B., Koh,S.S., Harbison,C.T., Kanin,E., Jennings,E.G., Lee,T.I., True,H.L., Lander,E.S., Young,R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* *12*, 323-337.

- Chee,M., Yang,R., Hubbell,E., Berno,A., Huang,X.C., Stern,D., Winkler,J., Lockhart,D.J., Morris,M.S., Fodor,S.P. (1996). Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* 274, 610-614.
- Cheung,V.G., Morley,M., Aguilar,F., Massimi,A., Kucherlapati,R., Childs,G. (1999). Making and reading microarrays. *Nat.Genet.* 21, 15-19.
- Chiu,S.K., Hsu,M., Ku,W.C., Tu,C.Y., Tseng,Y.T., Lau,W.K., Yan,R.Y., Ma,J.T., Tzeng,C.M. (2003). Synergistic effects of epoxy- and amine-silanes on microarray DNA immobilization and hybridization. *Biochem.J.* 374, 625-632.
- Chuaqui,R.F., Bonner,R.F., Best,C.J., Gillespie,J.W., Flaig,M.J., Hewitt,S.M., Phillips,J.L., Krizman,D.B., Tangrea,M.A., Ahram,M., Linehan,W.M., Knezevic,V., Emmert-Buck,M.R. (2002). Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat.Genet.* 32 *Suppl.*, 509-514.
- Churchill,G.A. (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat.Genet.* 32 *Suppl.*, 490-495.
- Cleveland,W.S. (1979). Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. *Journal of the American Statistical Association.* 74, 829-836.
- Clipstone,N.A., Crabtree,G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697.
- Cohen,G., Deutsch,J., Fineberg,J., Levine,A. (1997). Covalent attachment of DNA oligonucleotides to glass. *Nucleic Acids Res.* 25, 911-912.
- Cohen,A., Perzov,N., Nelson, H., Nelson, N. (1999). A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *J Biol Chem.* 38, 26885-26893.
- Cox,K.H., Pinchak,A.B., Cooper,T.G. (1999). Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast* 15, 703-713.
- Crabtree,G.R. (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J.Biol.Chem.* 276, 2313-2316.
- Cui,X., Churchill,G.A. (2003). Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.* 4, 210.
- Cunningham,K.W., Fink,G.R. (1994). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J.Cell Biol.* 124, 351-363.
- Cunningham,K.W., Fink,G.R. (1996). Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 16, 2226-2237.
- Cyert,M.S. (2001). Genetic analysis of calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu.Rev.Genet.* 35, 647-672.

- Cyert,M.S., Thorner,J. (1992). Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to
- Davenport,K.R., Sohaskey,M., Kamada,Y., Levin,D.E., 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.
- Davis,D. (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr.Genet.* 44, 1-7.
- Davis,D., Edwards,J.E., Jr., Mitchell,A.P., Ibrahim,A.S. (2000). *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect.Immun.* 68, 5953-5959.
- de Nadal,E., Casadome,L., 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.
- Denis,V., Cyert,M.S. (2002). Internal Ca(2+) release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *Cell Biol.* 156, 29-34.
- Denison,S.H. (2000). pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal.Genet.Biol.* 29, 61-71.
- DeRisi,J.L., Iyer,V.R., Brown,P.O. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science.* 278, 680-686.
- Diez,E., Alvaro,J., Espeso,E.A., Rainbow,L., Suarez,T., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., Penalva,M.A. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21, 1350-1359.
- Dobbin,K., Shih,J.H., Simon,R. (2003). Statistical design of reverse dye microarrays. *Bioinformatics.* 19, 803-810.
- Dodou,E., 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.
- Durr,G., Strayle,J., Plemper,R., Elbs,S., Klee,S.K., Catty,P., Wolf,D.H., Rudolph,H.K. (1998). The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol.Biol.Cell* 9, 1149-1162.
- Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., Botstein,D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 14863-14868.
- Errede,B., Cade,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K., Matsumoto,K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol.Reprod.Dev.* 42, 477-485.

- Espeso,E.A., Arst,H.N., Jr. (2000). On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol.Cell Biol.* *20*, 3355-3363.
- Espeso,E.A., Penalva,M.A. (1996). Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J.Biol.Chem.* *271*, 28825-28830.
- Estruch,F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* *24*, 469-486.
- Farcasanu,I.C., Hirata,D., Tsuchiya,E., Nishiyama,F., Miyakawa,T. (1995). Protein phosphatase 2B of *Saccharomyces cerevisiae* is required for tolerance to manganese, in blocking the entry of ions into the cells. *Eur.J.Biochem.* *232*, 712-717.
- Feder,M.E., Hofmann,G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu.Rev.Physiol* *61*, 243-282.
- Ferrigno,P., Posas,F., Koepf,D., Saito,H., Silver,P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* *17*, 5606-5614.
- Fodor,S.P., Read,J.L., Pirrung,M.C., Stryer,L., Lu,A.T., Solas,D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* *251*, 767-773.
- Fonzi, W. A. 1999. PHR1 and PHR2 of *Candida albicans* encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans. *J. Bacteriol.* *181*:7070-7079.
- Garcia,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Rodriguez-Pena,J.M., Francois,J., Nombela,C., Arroyo,J. (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.
- Garciadeblas,B., Rubio,F., Quintero,F.J., Banuelos,M.A., Haro,R., Rodriguez-Navarro,A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* *236*, 363-368.
- Garrett-Engle,P., Moilanen,B., Cyert,M.S. (1995). Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase. *Mol.Cell Biol.* *15*, 4103-4114.
- Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D., Brown,P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* *11*, 4241-4257.

- Goffeau,A., Aert,R., Agostini-Carboni,M. L., Ahmed,A., Aigle,M., Alberghina,L., Albermannk,K., Albers,M., Aldea,M., Alexandraki,D. (1997) . The yeast genome directory. *Nature (Suppl.)* 387, 5-105.
- Gorlach,J., Fox,D.S., Cutler,N.S., Cox,G.M., Perfect,J.R., Heitman,J. (2000) *EMBO J.* 19, 3618–3629.
- Goryachev,A.B., Macgregor,P.F., Edwards,A.M. (2001). Unfolding of microarray data. *J.Comput.Biol.* 8, 443-461.
- Grably,M.R., Stanhill,A., Tell,O., Engelberg,D. (2002). HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene. *Mol.Microbiol.* 44, 21-35.
- Graef,I.A., Chen,F., Chen,L., Kuo,A., Crabtree,G.R. (2001). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105, 863-875.
- Griffioen,G., Thevelein,J.M. (2002). Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr.Genet.* 41, 199-207.
- Güldener,U.S., Heck,T., Fiedler,J., Beinhauer., J.H. Hegemann. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524.
- Guo,Z., Guilfoyle,R.A., Thiel,A.J., Wang,R., Smith,L.M. (1994). Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.* 22, 5456-5465.
- Haas,S., Vingron,M., Poustka,A., Wiemann,S. (1998). Primer design for large scale sequencing. *Nucleic Acids Res.* 26, 3006-3012.
- Hahn,J.S., Hu,Z., Thiele,D.J., Iyer,V.R. (2004). Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Mol.Cell Biol.* 24, 5249-5256.
- Haro,R., Garciadeblas,B., Rodriguez-Navarro,A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291, 189-191.
- Hasan,R., Leroy,C., Isnard,A.D., Labarre,J., Boy-Marcotte,E., Toledano,M.B. (2002). The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol.Microbiol.* 45, 233-241.
- Hauser,N.C., Vingron,M., Scheideler,M., Krems,B., Hellmuth,K., Entian,K.D., Hoheisel,J.D. (1998). Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1209-1221.
- Hegde,P., Qi,R., Abernathy,K., Gay,C., Dharap,S., Gaspard,R., Hughes,J.E., Snesrud,E., Lee,N., Quackenbush,J.A. concise guide to cDNA microarray analysis (2000). *Biotechniques* 29, 548-562.
- Hendey,B., Klee,C.B., Maxfield,F.R. (1992). Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science* 258, 296-299.

- Herrero, J., Valencia, A., Dopazo, J. (2001). hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* 17, 126-136.
- Hieter, P., Boguski, M. (1997). Functional genomics: it's all how you read it. *Science* 278, 601-602.
- Hilioti, Z., Gallagher, D.A., Low-Nam, S.T., Ramaswamy, P., Gajer, P., Kingsbury, T.J., Birchwood, C.J., Levchenko, A., Cunningham, K.W. (2004). GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev.* 18, 35-47.
- Ho, Y., Mason, S., Kobayashi, R., Hoekstra, M., Andrews, B. (1997). Role of the casein kinase I isoform, Hrr25, and the cell cycle-regulatory transcription factor, SBF, in the transcriptional response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 581-586.
- Hoekstra, M.F., Liskay, R.M., Ou, A.C., DeMaggio, A.J., Burbee, D.G., Heffron, F. (1991). HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* 253, 1031-1034.
- Hoffman, C. S. (1997) Rapid isolation of yeast chromosomal DNA. (1997) *Current Protocols in Molecular Biology*. 13, 11.1-11.4.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66, 300-372.
- Hong, S.K., Han, S.B., Snyder, M., Choi, E.Y. (1999). SHC1, a high pH inducible gene required for growth at alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 116-122.
- Horak, C.E., Snyder, M. (2002). Global analysis of gene expression in yeast. *Funct. Integr. Genomics* 2, 171-180.
- Hsieh, H.B., Fitch, J., White, D., Torres, F., Roy, J., Matusiak, R., Krivacic, B., Kowalski, B., Bruce, R., Elrod, S. (2004). Ultra-high-throughput microarray generation and liquid dispensing using multiple disposable piezoelectric ejectors. *J. Biomol. Screen.* 9, 85-94.
- Ideker, T., Thorsson, V., Siegel, A.F., Hood, L.E. (2000). Testing for differentially-expressed genes by maximum-likelihood analysis of microarray data. *J. Comput. Biol.* 7, 805-817.
- Inoue, Y., Tsujimoto, Y., Kimura, A. (1998). Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. *J. Biol. Chem.* 273, 2977-2983.
- Issel-Tarver, L., Christie, K.R., Dolinski, K., Andrada, R., Balakrishnan, R., Ball, C.A., Binkley, G., Dong, S., Dwight, S.S., Fisk, D.G., Harris, M., Schroeder, M., Sethuraman, A., Tse, K., Weng, S., Botstein, D., Cherry, J.M. (2002). *Saccharomyces* Genome Database. *Methods Enzymol.* 350, 329-346.

- Ito,T., Chiba,T., Ozawa,R., Yoshida,M., Hattori,M., Sakaki,Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 4569-4574.
- Joos,B., Kuster,H., Cone,R. (1997). Covalent attachment of hybridizable oligonucleotides to glass supports. *Anal.Biochem.* 247, 96-101.
- Jung,U.S., Sobering,A.K., Romeo,M.J., Levin,D.E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol.Microbiol.* 46, 781-789.
- Kafadar,K.A., Cyert,M.S. (2004). Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot.Cell* 3, 1147-1153.
- Kafadar,K.A., Zhu,H., Snyder,M., Cyert,M.S. (2003). Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.* 17, 2698-2708.
- Kamada,Y., Jung,U.S., Piotrowski,J., 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.
- Kerr,M.K., Churchill,G.A. (2001). Statistical design and the analysis of gene expression microarray data. *Genet.Res.* 77, 123-128.
- Kerr,M.K., Martin,M., Churchill,G.A. (2000). Analysis of variance for gene expression microarray data. *J.Comput.Biol.* 7, 819-837.
- Kingsbury,T.J., Cunningham,K.W. (2000). *Genes Dev.* 14, 1595-1604
- Klee,C.B., Ren,H., Wang,X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* 273, 13367-13370.
- Kohrer,K., Domdey,H. (1991). Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol.* 194, 398-405.
- Kosman DJ. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. (2003). *Mol Microbiol.* 47,1185-1197.
- Kranz,A., Kinner,A., Kolling,R. (2001). A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. *Mol.Biol.Cell* 12, 711-723.
- Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* 166, 283-92.
- Kumar,A., Larsson,O., Parodi,D., Liang,Z. (2000). Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization. *Nucleic Acids Res.* 28, E71.
- Kuno,T., Tanaka,H., Mukai,H., Chang,C.D., Hiraga,K., Miyakawa,T., Tanaka,C. (1991). cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 180, 1159-1163.

- Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodriguez,C., Martin-Yken,H., Arroyo,J., Hoheisel,J.D., Francois,J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 278, 20345-20357.
- Lamb,T.M., Mitchell,A.P. (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 23, 677-686.
- Lamb,T.M., Xu,W., Diamond,A., Mitchell,A.P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J.Biol.Chem.* 276, 1850-1856.
- Lambert,M., Blanchin-Roland,S., Le Louedec,F., Lepingle,A., Gaillardin,C. (1997). Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol.Cell Biol.* 17, 3966-3976.
- Lamtore,J.B., Beattie,K.L., Burke,B.E., Eggers,M.D., Ehrlich,D.J., Fowler,R., Hollis,M.A., Kosicki,B.B., Reich,R.K., Smith,S.R., . (1994). Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Res.* 22, 2121-2125.
- Lashkari,D.A., DeRisi,J.L., McCusker,J.H., Namath,A.F., Gentile,C., Hwang,S.Y., Brown,P.O., Davis,R.W. (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 13057-13062.
- Lawson,M.A., Maxfield,F.R. (1995). Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 377, 75-79.
- Lee,M.L., Kuo,F.C., Whitmore,G.A., Sklar,J. (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 9834-9839.
- Lee,P.D., Sladek,R., Greenwood,C.M., Hudson,T.J. (2002). Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res.* 12, 292-297.
- Leung,Y.F., Cavalieri,D. (2003). Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet.* 19, 649-659.
- Li,W., Mitchell,A.P. (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* 145, 63-73.
- Liu,J. (1993). FK506 and cyclosporin, molecular probes for studying intracellular signal transduction. *Immunol.Today* 14, 290-295.
- Maeda,T., Takekawa,M., Saito,H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269, 554-558.
- Maeda,T., Wurgler-Murphy,S.M., Saito,H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242-245.

- Mandal,D., Woolf,T.B., Rao,R. (2000). Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport. *J.Biol.Chem.* 275, 23933-23938.
- Mansuy,I.M., Mayford,M., Jacob,B., Kandel,E.R., Bach,M.E. (1998). Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 92, 39-49.
- Marquez,J.A., Serrano,R. (1996). Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* 382, 89-92.
- Martinez-Pastor,M.T., Marchler,G., Schuller,C., Marchler-Bauer,A., Ruis,H., Estruch,F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227-2235.
- Martzen,M.R., McCraith,S.M., Spinelli,S.L., Torres,F.M., Fields,S., Grayhack,E.J., Phizicky,E.M. (1999). A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* 286, 1153-1155.
- Matheos,D.P., Kingsbury,T.J., Ahsan,U.S., Cunningham,K.W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11, 3445-3458.
- Matsumoto,T.K., Ellsmore,A.J., Cessna,S.G., Low,P.S., Pardo,J.M., Bressan,R.A., Hasegawa,P.M. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 277, 33075-33080.
- McCusker,J.H., Perlin,D.S., Haber,J.E. (1987). Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 7, 4082-4088.
- Mendizabal,I., Pascual-Ahuir,A., Serrano,R., de Larrinoa,I.F. (2001). Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol.Genet.Genomics* 265, 801-811.
- Mendoza,I., Rubio,F., Rodriguez-Navarro,A., Pardo,J.M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 269, 8792-8796.
- Mewes,H.W., Frishman,D., Guldener,U., Mannhaupt,G, Mayer,K., Mokrejs,M., Morgenstern,B., Munsterkötter, M., Rudd, S., Weil, B. (2002). MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Research* 30, 31-34.
- Molkentin,J.D., Lu,J.R., Antos,C.L., Markham,B., Richardson,J., Robbins,J., Grant,S.R., Olson,E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Moser,M.J., Geiser,J.R., Davis,T.N. (1996). Ca²⁺-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. *Mol.Cell Biol.* 16, 4824-4831.

- Murakami,A., Kimura,K., Nakano,A. (1999). The inactive form of a yeast casein kinase I suppresses the secretory defect of the sec12 mutant. Implication of negative regulation by the Hrr25 kinase in the vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.* 274, 3804-3810.
- Nass,R., Cunningham,K.W., Rao,R. (1997). Intracellular sequestration of sodium by a novel Na⁺/H⁺ exchanger in yeast is enhanced by mutations in the plasma membrane H⁺-ATPase. Insights into mechanisms of sodium tolerance. *J.Biol.Chem.* 272, 26145-26152.
- Novak,J.P., Sladek,R., Hudson,T.J. (2002). Characterization of variability in large-scale gene expression data: implications for study design. *Genomics* 79, 104-113.
- Ogawa,N., DeRisi,J., Brown,PO. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell.* 12, 4309-4321.
- O'Keefe,S.J., Tamura,J., Kincaid,R.L., Tocci,M.J., O'Neill,E.A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* 357, 692-694.
- Ozcan,S., Johnston,M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63, 554-569.
- Pabon,C., Modrusan,Z., Ruvolo,M.V., Coleman,I.M., Daniel,S., Yue,H., Arnold,L.J., Jr. (2001). Optimized T7 amplification system for microarray analysis. *Biotechniques* 31, 874-879.
- Park,S.H., Koh,S.S., Chun,J.H., Hwang H.J., Kang H.S. (1999). Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2044-2050
- Penalva,M.A., Arst,H.N., Jr. (2002). Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 66, 426-46, table.
- Perou,C.M. (2001). Show me the data! *Nat.Genet.* 29, 373.
- Persson,B.L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A., and Pattison, J. (1999). Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1422, 255-272.
- Posas,F., Chambers,J.R., Heyman,J.A., Hoeffler,J.P., de Nadal,E., Arino,J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J.Biol.Chem.* 275, 17249-17255.
- Porta,A., Wang,Z., Ramón,A., Muhlschlegel,F.A., Fonzi,W.A. (2002). Spontaneous second-site suppressors of the filamentation defect of prr1Δ mutants define a critical domain of Rim101p in *Candida albicans*. *Mol. Genet. Genomics* 266, 624-631.
- Pritchard,C.C., Hsu,L., Delrow,J., Nelson,P.S. (2001). Project normal: defining normal variance in mouse gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 13266-13271.

- Proft,M., Serrano,R. (1999). Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol.Cell Biol.* 19, 537-546.
- Quackenbush,J. (2001). Computational analysis of microarray data. *Nat.Rev.Genet.* 2, 418-427.
- Quackenbush,J. (2002). Microarray data normalization and transformation. *Nat.Genet.* 32 *Suppl.*, 496-501.
- Rakhilin,S.V., Olson,P.A., Nishi,A., Starkova,N.N., Fienberg,A.A., Nairn,A.C., Surmeier,D.J., Greengard,P. (2004). A network of control mediated by regulator of calcium/calmodulin-dependent signaling. *Science* 306, 698-701.
- Rasmussen,S.R., Larsen,M.R., Rasmussen,S.E. (1991). Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Anal.Biochem.* 198, 138-142.
- Reiser,V., Ruis,H., Ammerer,G. (1999). Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* 10, 1147-1161.
- Rep,M., Krantz,M., Thevelein,J.M., Hohmann,S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J.Biol.Chem.* 275, 8290-8300.
- Roda,A., Pasini,P., Mirasoli,M., Michelini,E., Guardigli,M. (2004). Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. *Trends Biotechnol.* 22, 295-303.
- Rodrigues-Pousada,C.A., Nevitt,T., Menezes,R., Azevedo,D., Pereira,J., Amaral,C. (2004). Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett.* 567, 80-85.
- Rowley,A., Johnston,G.C., Butler,B., Werner-Washburne,M., Singer,R.A. (1993). Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 13, 1034-1041.
- Ruis,H., Schuller,C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17, 959-965.
- Rutherford,J.C., Jaron,S., Ray,E., Brown,P.O., Winge,D.R. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14322-14327.
- Sakurai,H., Fukasawa,T. (2001). A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 285, 696-701.
- Santoro,N., Johansson,N., Thiele,D.J. (1998). Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol.Cell Biol.* 18, 6340-6352.

- Schena,M., Heller,R.A., Theriault,T.P., Konrad,K., Lachenmeier,E., Davis,R.W. (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* *16*, 301-306.
- Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W., Brown,P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* *270*, 467-470.
- Schena,M., Shalon,D., Heller,R., Chai,A., Brown,P.O., Davis,R.W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *93*, 10614-10619.
- Schneider,J., Buness,A., Huber,W., Volz,J., Kioschis,P., Hafner,M., Poustka,A., Sultmann,H. (2004). Systematic analysis of T7 RNA polymerase based in vitro linear RNA amplification for use in microarray experiments. *BMC.Genomics* *5*, 29.
- Schulze,A., Downward,J. (2001). Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nat.Cell Biol.* *3*, E190-E195.
- Serrano,R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int.Rev.Cytol.* *165*, 1-52.
- Serrano,R., Bernal,D., Simon,E., Arino,J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J.Biol.Chem.* *279*, 19698-19704.
- Serrano,R., Ruiz,A., Bernal,D., Chambers,J.R., Arino,J. (2002). The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol.Microbiol.* *46*, 1319-1333.
- Shalon,D., Smith,S.J., Brown,P.O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* *6*, 639-645.
- Sherlock,G. (2001). Analysis of large-scale gene expression data. *Brief.Bioinform.* *2*, 350-362.
- Shih,J.H., Michalowska,A.M., Dobbin,K., Ye,Y., Qiu,T.H., Green,J.E. (2004). Effects of pooling mRNA in microarray class comparisons. *Bioinformatics.* *20*, 3318-3325.
- Simon,R.M., Dobbin,K. (2003). Experimental design of DNA microarray experiments. *Biotechniques Suppl.* 16-21.
- Singh,R., Maganti,R.J., Jabba,S.V., Wang,M., Deng,G., Heath,J.D., Kurn,N., Wangemann,P. (2004). Microarray based comparison of three amplification methods for nanogram amounts of total RNA. *Am.J.Physiol Cell Physiol.*
- Singh-Gasson,S., Green,R.D., Yue,Y., Nelson,C., Blattner,F., Sussman,M.R., Cerrina,F. (1999). Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat.Biotechnol.* *17*, 974-978.

- Sorger,P.K., Pelham,H.R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855-864.
- Stathopoulos,A.M., Cyert,M.S. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 11, 3432-3444.
- Stathopoulos-Gerontides,A., Guo,J.J., Cyert,M.S. (1999). Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev.* 13, 798-803.
- Stevens,T.H., Forgac,M. (1997). Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 13, 779-808.
- Stoeckert,C.J., Jr., Causton,H.C., Ball,C.A. (2002). Microarray databases: standards and ontologies. *Nat.Genet.* 32 *Suppl*, 469-473.
- Su,S.S., Mitchell,A.P. (1993). Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* 133, 67-77.
- Tan,P.K., Downey,T.J., Spitznagel,E.L.Jr., Xu,P., Fu,D. Dimitrov, D.S., Lempicki R.A., Raaka,B.M., Cam,M.C. (2003). Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res.* 19, 5676-5684.
- Tilburn,J., Sarkar,S., Widdick,D.A., Espeso,E.A., Orejas,M., Mungroo,J., Penalva,M.A., Arst,H.N., Jr. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* 14, 779-790.
- Toledano,M.B., Delaunay,A., Biteau,B., Spector, D., Azevedo,D. (2003) in *Topics in Current Genetics* (Hohmann, S., and Mager, P.W.H +, eds) Vol.1, pp.241-303, Springer-Verlag, Berlin.
- Torres,J., Di Como,C.J., Herrero,E., De La Torre-Ruiz MA (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J.Biol.Chem.* 277, 43495-43504.
- Tseng,G.C., Oh,M.K., Rohlin,L., Liao,J.C., Wong,W.H. (2001). Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.* 29, 2549-2557.
- Uetz,P., Giot,L., Cagney,G., Mansfield,T.A., Judson,R.S., Knight,J.R., Lockshon,D., Narayan,V., Srinivasan,M., Pochart,P., Qureshi-Emili,A., Li,Y., Godwin,B., Conover,D., Kalbfleisch,T., Vijayadamodar,G., Yang,M., Johnston,M., Fields,S., Rothberg,J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-627.
- Valafar,F. (2002). Pattern recognition techniques in microarray data analysis: a survey. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 980, 41-64.

- van der Rest,M.E., Kamminga,A.H., Nakano,A., Anraku,Y., Poolman,B., Konings,W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol.Rev.* 59, 304-322.
- van Hal,N.L., Vorst,O., van Houwelingen,A.M., Kok,E.J., Peijnenburg,A., Aharoni,A., van Tunen,A.J., Keijer,J. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J.Biotechnol.* 78, 271-280.
- van Helden, J., Andre,B., Collado-Vides,J.(1998). Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J Mol Biol.* 281, 827-842.
- van Helden,J., Andre,B., Collado-Vides,J. (2000). A web site for the computational analysis of yeast regulatory sequences. *Yeast* 16, 177-187.
- Venkatasubbarao,S. (2004). Microarrays--status and prospects. *Trends Biotechnol.* 22, 630-637.
- Verwaal,R., Arako,M., Kapur,R., Verkleij,A.J., Verrips,C.T., Boonstra,J. (2004). HXT5 expression is under control of STRE and HAP elements in the HXT5 promoter. *Yeast.* 21, 747-757.
- Verwaal,R., Paalman,J.W., Hogenkamp,A., Verkleij,A.J., Verrips,C.T., Boonstra,J. (2002). HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 19, 1029-38.
- Viladevall,L., Serrano,R., Ruiz,A., Domenech,G., Giraldo,J., Barcelo,A., Arino,J. (2004). Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 279, 43614-43624.
- Vilella,F., Herrero,E., Torres,J., 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.*
- Vincent,O., Rainbow,L., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr., Penalva,M.A. (2003). YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol.Cell Biol.* 23, 1647-1655.
- Vyas, V. K., S. Kuchin, and M. Carlson. 2001. Interaction of the repressors Nrg1 and Nrg2 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158:563-572.
- Wang,H.G., Pathan,N., Ethell,I.M., Krajewski,S., Yamaguchi,Y., Shibasaki,F., McKeon,F., Bobo,T., Franke,T.F., Reed,J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.
- Wang,X., Ghosh,S., Guo,S.W. (2001). Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucleic Acids Res.* 29, E75.
- Warner,J.R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast.(1999). *Trends Biochem Sci.*24, 437-440.

- Watanabe,Y., Takaesu,G., Hagiwara,M., Irie,K., Matsumoto,K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.* 17, 2615-2623.
- Wiederrecht,G., Seto,D., Parker,C.S. (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54, 841-853.
- Winderickx,J., de Winde,J.H., Crauwels,M., Hino,A., Hohmann,S., Van Dijck,P., Thevelein,J.M. (1996). Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol.Gen.Genet.* 252, 470-482.
- Winston,F., Dollard,C., Ricupero-Hovasse,S.L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11, 53-55.
- Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Veronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* 285, 901-906.
- Withee,J.L., Mulholland,J., Jeng,R., Cyert,M.S. (1997). An essential role of the yeast pheromone-induced Ca²⁺ signal is to activate calcineurin. *Mol.Biol.Cell* 8, 263-277.
- Xu,W., Mitchell,A.P. (2001). Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J.Bacteriol.* 183, 6917-6923.
- Xu,W., Smith,F.J., Jr., Subaran,R., Mitchell,A.P. (2004). Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol.Biol.Cell* 15, 5528-5537.
- Yamamoto,A., Mizukami,Y., Sakurai,H. (2005). Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 280, 11911-11919.
- Yang,Y.H., Buckley,M.J., Speed,T.P. (2001). Analysis of cDNA microarray images. *Brief.Bioinform.* 2, 341-349.
- Yang,Y.H., Speed,T. (2002). Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat.Rev.Genet.* 3, 579-588.

- Yoshimoto,H., Saltsman,K., Gasch,A.P., Li,H.X., Ogawa,N., Botstein,D., Brown,P.O., Cyert,M.S. (2002). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 277, 31079-31088.
- Young,M.R., Craig,E.A. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* HSP70 heat shock elements are functionally distinct. *Mol.Cell Biol.* 13, 5637-5646.
- Yuan,D.S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., Klausner, R.D. (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 2632-2636.
- Zammatteo,N., Jeanmart,L., Hamels,S., Courtois,S., Louette,P., Hevesi,L., Remacle,J. (2000). Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal.Biochem.* 280, 143-150.
- Zhou,H., Winston,F. (2001). NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* 2, 5.
- Zvyagilskaya,R.A., Parkhomenko,O.A., Gordeeva,A.V., Deryabina,Y.I., Persson,B.L. (2004). Bioenergetics of *Yarrowia lipolytica* cells grown at alkaline conditions. *Biosci.Rep.* 24, 117-126.

ANNEXE