

Estudio de la adaptación a estrés por etanol en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tesis Doctoral presentada por

Elisabet Navarro Tapia

Para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad
de Valencia

Supervisada por:

Dra. Amparo Querol y Dr. Roberto Pérez Torrado



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



La Dra. Amparo Querol Simón, Profesora de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA) y el Dr. Roberto Pérez Torrado, investigador postdoctoral del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA).

CERTIFICAN, que la presente memoria “ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN A ESTRÉS POR ETANOL EN CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.” constituye la tesis doctoral de Doña Elisabet Navarro Tapia para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universitat de València. Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo como su redacción.

Dra. Amparo Querol Simón

Dr. Roberto Perez Torrado

*A mis padres,
Rafael y M^a Angustias*

AGRADECIMIENTOS

Muchos años han pasado desde que me reuní con Amparo en aquella sala junto al laboratorio con el deseo de incorporarme a su equipo, llegué sin financiación, sin referencias, ni siquiera me había dado clases en la Universidad. Ella, sin conocerme de nada, apostó por mí y me permitió desarrollar esta tesis doctoral. Cada idea o inquietud que se me presentaba la escuchaba y me animaba a seguir adelante, permitiéndome en todo momento realizar aquellos estudios que me parecieran oportunos, desarrollando así mi capacidad investigadora. Por todo ello, mis primeros agradecimientos son para mi directora de tesis, Amparo, gracias de corazón por tu optimismo, por apoyarme en los momentos difíciles y hacerme crecer como profesional. A Roberto, mi compañero de batallas, por los incontables debates que hemos tenido en el despacho, por sus críticas (siempre constructivas), por no cortarme las alas nunca, por su confianza en mi trabajo, por aguantar mis estufidos cuando no tenía por qué y por permitirme “okupar” su despacho...siempre os llevaré conmigo.

A mis compañeros del 307, a Clara, por saber qué me pasaba con tan solo mirarme y por dar un nuevo sentido a las canciones de Fito. A Lauri, por su paciencia y sus explicaciones magistrales (y por descubrirme las manzanas Fuji, claro). A David, por ser un gran profesional, por su infinita generosidad y por haberme transmitido la calma que necesitaba cuando las cosas no “fluían”. A Jifí, te deseo lo mejor en esta nueva etapa, estoy segura de que conseguirás todo lo que te propongas gracias al gran cuidado, responsabilidad y dedicación que pones en el trabajo. A Peris, por transmitirme su ilusión y pasión por la ciencia y por tantos buenos momentos vividos. A Jordi, por haberme enseñado tanto, y a Amparo G., por iniciarme en el “apasionante” mundo de los *microarrays*. Gracias también a Javi, muchísima fuerza y ánimo, ya verás que pasa volando, así que disfruta del camino.

Me faltarían páginas para agradecer todo el cariño y apoyo recibido de mis compañeros de planta, mil gracias a Ricardo, Fani, Adri, Anto, Aurora y Sara por tantos momentos de complicidad y risas (cuanto añoraré esas infusiones junto a vosotros). Gracias también a Andrew y Marga por sus buenos consejos y a Jose Antonio y Paqui por ayudarme siempre que lo he necesitado. Gracias Sergi, por la dedicación, ilusión y atención que pones cada día en el laboratorio y que transmites a tu equipo, siempre serás mi ejemplo a seguir. Gracias también a Paloma y Carmela por vuestro ánimo y apoyo incondicional.

Gracias a María Jesús por las interminables horas junto al citómetro siempre con una sonrisa y a Ana Cris por su profesionalidad, seriedad y calidad en su trabajo.

Gracias a aquellas personas que pasaron por el 307 y dejaron huella en mí, a Bene, por su alegría, sensibilidad y por el amor que sientes hacia los perretes, hace falta más gente como tú. A Rebeca, por tu valiosísima ayuda, por tu optimismo y capacidad de superación (nos vemos por Barna). Gracias también a Ángela, mi compi de Master y fatigas, te llevaré en mi corazón siempre.

Gracias a mis amigos, a los que son y los que fueron porque todos formáis parte de lo que soy ahora. Gracias especialmente a Pili, mi germaneta, porque sabes lo importante que eres para mí, gracias por todos estos años de risas y complicidades y estar a mi lado siempre...como te echo de menos! A Oscar, que lleva aguantándome desde la Uni y aun así busca un hueco cada vez que viene de Madrid. A Gonzalo, por estos 16 años de amistad (¿o son más?), por estar ahí siempre que lo he necesitado, gracias por tu cariño y comprensión. Mil Gracias a Irene, Sol, Carlos y Amparo, por ser mi oasis de paz, y a Alberto, por recordarme quien soy, os quiero.

A Keko, por estos 10 años juntos, por animarme en esos momentos en que quieres dejarlo todo (durante la tesis hay varios) y alentarme a seguir luchando. Por su infinita paciencia y comprensión, por creer siempre en mí y no dejar de luchar por un futuro mejor. Gracias cariño por intentar siempre sacarme una sonrisa y estar a mi lado, te quiero. Y por supuesto a Morita, por encontrarme cuando más lo necesitaba.

Gracias a toda mi familia y a mi hermano, por ser los pilares fundamentales de mi vida, a mis padres, porque soy lo que soy gracias a ellos y les debo todo, gracias por vuestro apoyo y amor infinito y por educarme de la forma en lo que habéis hecho, gracias por enseñarme a no desistir nunca en mis metas, al fin lo he conseguido y vosotros sois parte de ello.

Finalmente quisiera recordar a todos aquellos que me dejaron demasiado pronto, en especial a mi abuela Teresa, sé que le hacía muchísima ilusión ir a la defensa, y aunque desgraciadamente no nos han dado más tiempo sé que ese día estará allí conmigo. Esta tesis va por vosotros.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.

INTRODUCCIÓN	1
1. Notas históricas sobre la investigación en levaduras y fermentación.	3
2. Utilización de <i>S. cerevisiae</i> como organismo modelo.	4
3. Características generales de <i>S. cerevisiae</i> .	5
3.1. El género <i>Saccharomyces</i> .	5
3.2. Cinética del crecimiento de las levaduras en la fermentación.	8
3.3. Diferencias genéticas entre cepas aisladas de fermentaciones y cepas de laboratorio.	9
3.4. Importancia de las levaduras en la industria.	10
4. Fermentación alcohólica.	12
4.1. El problema de las levaduras durante la fermentación y procesos asociados.	15
4.2. La respuesta a estrés en <i>S. cerevisiae</i> .	16
4.2.1. Ruta general de respuesta a estrés.	16
4.2.2. Respuesta a estrés térmico.	19
4.2.3. Respuesta a estrés osmótico.	20
4.2.4. Respuesta a estrés oxidativo.	21
4.2.5. Respuesta a proteínas desplegadas.	24
4.2.5.1. Activación de la ruta UPR.	25
4.2.5.1.1. Activación de la UPR por privación de inositol.	29
5. Toxicidad del etanol en <i>S. cerevisiae</i> .	34

5.1. Efectos del etanol sobre la estructura y función de la membrana plasmática.	36
5.2. Efectos del etanol sobre la bomba de protones de la membrana plasmática: H ⁺ -ATPasa.	38
6. Tolerancia a etanol: la respuesta de <i>S. cerevisiae</i> al estrés por etanol.	40
6.1. Cambios en la composición de la membrana en respuesta a estrés por etanol.	40
6.1.1. Ácidos grasos insaturados.	40
6.1.2. Ergosterol.	42
6.2. Aminoácidos.	44
6.3. Papel de la vacuola en la respuesta a estrés por etanol.	45
6.4. Trehalosa.	47
6.5. Proteínas asociadas con tolerancia a etanol.	48
6.6. Inositol .	49
7. Factores de transcripción y elementos de respuesta a estrés asociados a estrés por etanol .	52
8. Respuestas moleculares de señalización ante estrés por etanol en <i>S. cerevisiae</i> .	54
9. Genómica funcional y análisis del transcriptoma de la respuesta a etanol en <i>S. cerevisiae</i> .	55
9.1. Análisis de genómica funcional en la tolerancia a etanol en <i>S. cerevisiae</i> .	55
9.2. Expresión génica global bajo condiciones de estrés por etanol.	60
10. Mejora de la tolerancia a etanol en <i>S. cerevisiae</i> .	65
OBJETIVOS	69

MATERIAL Y MÉTODOS	73
1. Cepas utilizadas.	75
2. Medios de cultivo.	80
2.1. GPY.	80
2.2. Medio SC.	80
2.3. Medio SD-Ura.	81
2.4. Medio SD-Ura-His.	81
2.5. Medio LB.	81
2.6. Medio SOC.	81
2.7. Medio LB ampicilina + X-Gal + IPTG.	82
3. Oligonucleótidos.	82
4. Plásmidos utilizados.	85
4.1. Obtención de plásmidos.	85
4.1.1. pRS-HAC1.	85
4.1.2. pPM47-KanMX6.	87
5. Obtención de <i>E. coli</i> DH10B electrocompetentes y electroporación.	90
6. Monitorización del crecimiento de levaduras a OD ₆₀₀ .	90
7. Análisis fenotípico de la levadura frente a agentes estresantes.	91
7.1. Análisis de crecimiento por goteo en placa.	91
7.2. Análisis de crecimiento mediante SPECTROstar.	92
7.2.1. Tasa máxima de crecimiento (μ_{max}).	92
7.2.2. Área bajo la curva y área fraccional (fa).	93
7.2.3. Concentración no inhibitoria y mínima inhibitoria.	94
8. Análisis de protección cruzada.	95
9. Análisis de correlación entre tolerancia a etanol y otros estreses.	95
10. Análisis de correlación entre tolerancia a etanol e intensidad en la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) bajo estrés por etanol en distintas especies de <i>Saccharomyces</i> .	96

11. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>HAC1</i> en la cepa BY4741.	98
12. Ensayos con reporteros fluorescentes por citometría de flujo.	99
12.1. Análisis de la presencia de proteínas desplegadas en el RE utilizando la proteína Ero-GFP.	99
12.2. Ensayo sobre el efecto del inositol en la inducción UPR y sobreexpresión de Kar2p bajo estrés por etanol.	100
12.3. Análisis por citometría de flujo de la activación de la UPR en base a la fluidez de la membrana.	101
13. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.	103
13.1. Estimación estereológica de la longitud del RE y área vacuolar.	104
14. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.	107
14.1. Obtención de DNA.	107
14.1.1. DNA genómico de levaduras.	107
14.1.2. DNA plasmídico.	107
14.2. Obtención de RNA.	108
14.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	109
14.4. RT-PCR.	110
14.5. Ensayos de restricción.	112
14.6. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.	112
14.7. Purificación y control de calidad de los ácidos nucleicos.	113
15. Transformación de levaduras mediante el método del acetato de litio.	113
16. Ensayo β -galactosidasa para medir la actividad UPR.	114
17. Análisis transcriptómico mediante <i>microarrays</i> de DNA.	117
17.1. Condiciones de crecimiento y selección de tiempo de muestreo.	117
17.2. Extracción de RNA total, síntesis de aa-cDNA y marcaje con Cy3 y Cy5.	117

17.3. Hibridación y lavado de los <i>microarrays</i> .	119
17.4. Adquisición y análisis de imágenes.	120
17.4.1. Análisis y tratamiento de los datos.	121
18. RT- PCR cuantitativa (RT-qPCR).	122
18.1. Validación de los resultados obtenidos por transcriptómica.	123
18.2. Análisis RT-qPCR de genes diana UPR.	125
19. Análisis bioinformáticos.	126
20. Acceso a datos.	126
RESULTADOS	127

1. Estudio transcripcional de las diferencias adaptativas bajo estrés por etanol en cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aisladas de fermentaciones tradicionales.	129
1.1. Crecimiento de las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 bajo estrés por etanol.	131
1.2. Análisis de la expresión global en respuesta a estrés por etanol.	132
1.2.1. Genes sobreexpresados tras una hora de estrés por etanol.	133
1.2.2. Genes sobreexpresados durante la fase diaúxica bajo estrés por etanol.	135
1.2.3. Genes sobreexpresados en ambos tiempos durante estrés por etanol.	139
1.3. Análisis de las secuencias promotoras de los genes sobreexpresados tras estrés por etanol.	141
1.4. Validación de los datos de transcriptómica mediante RT-qPCR.	143
1.5. Relación entre tolerancia a etanol y pH ácido.	145
1.6. Conclusiones.	147

2. Estudio de la activación y causas de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente a estrés por etanol.	149
2.1. <i>Screening</i> de mutantes sensibles al etanol mediante goteo en placa y análisis de su región promotora.	150
2.2. Estudio de la activación de la UPR durante estrés por etanol en la cepa BY4741.	156
2.2.1. Estudio del <i>splicing</i> de HAC1 en presencia de etanol y expresión de IRE1 y HAC1 por RT-qPCR.	156
2.2.2. Medida de la activación de la UPR a partir del ensayo β -galactosidasa.	159
2.3. Análisis RT-qPCR de genes diana UPR.	160
2.4. Estudio de protección cruzada frente a estrés por etanol.	163
2.5. Importancia del factor de transcripción Hac1p en la tolerancia a etanol.	167
2.6. Importancia de los genes <i>HAC1</i> , <i>IRE1</i> , <i>YAP1</i> , <i>MSN2</i> , <i>MSN4</i> y <i>GCN4</i> a la tolerancia a etanol.	169
2.7. Análisis de las causas de la activación de la UPR por etanol.	171
2.7.1. Análisis de la presencia de proteínas desplegadas en el RE durante estrés por etanol.	171
2.7.1.1. Análisis ultraestructural de la célula bajo estrés por etanol.	172
2.7.1.2. Análisis de la inducción de autofagia tras estrés por etanol.	182
2.7.1.3. Estudio del estado redox del RE in vivo tras estrés por etanol.	184
2.7.2. Efecto del inositol en la activación de la UPR bajo estrés por etanol.	186
2.7.3. Activación de la UPR en <i>S. cerevisiae</i> por aumento en la fluidez de la membrana tras estrés por etanol.	191

2.7.4. Conclusiones.	195
3. Relación entre la respuesta a proteínas desplegadas y tolerancia a etanol en levaduras del género <i>Saccharomyces</i>.	197
3.1. Tolerancia al 2-mercaptoetanol en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26.	197
3.2. Análisis de correlación entre tolerancia a etanol y distintos agentes estresantes en diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> .	200
3.3. Estudio de la relación entre la resistencia a etanol y activación de la UPR en levaduras del género <i>Saccharomyces</i> .	202
3.3.1. Análisis de la tolerancia a etanol en levaduras del género <i>Saccharomyces</i> .	202
3.3.2. Activación de la UPR y estudio de su relación con la tolerancia al etanol.	203
3.4. Análisis de las variaciones aminoacídicas de la proteína Hac1p en el género <i>Saccharomyces</i> .	209
3.5. Conclusiones.	211
DISCUSIÓN	213
CONCLUSIONES	231
BIBLIOGRAFÍA	235
TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS	267
Tabla S1	269
Tabla S2	297
Tabla S3	299
Tabla S4	329
Tabla S5	331

Tabla S6	337
Tabla S7	347
Tabla S8	353
Tabla S9	355
Tabla S10	367
Tabla S11	369
Figura S1	371
Figura S2	373

ABREVIATURAS

De sus siglas en inglés

μ_{\max}	Tasa máxima de crecimiento	Maximum specific growth rate
Adh	Alcohol deshidrogenasa	Alcohol dehydrogenase
AG	Ácidos grasos	Fatty acids
AMPc	AMP cíclico	Cyclic AMP
Asr1p	Proteína 1 PDH/Ring	Alcohol sensitive Ring/PDH finger 1 protein
ATJ	Jugo de <i>Agave tequilana</i>	<i>Agave tequilana</i> juice
BME	2-mercaptoetanol	2-mercaptoethanol
BSA	Albúmina de suero bovino	Bovine serum albumin
CTT1	Catalasa citosólica T	Cytosolic catalase T
DEPC	Diethylpirocarbonato	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Dimetil sulfóxido	Dimethyl sulfoxide
DPPC	1,2-dipalmitoilfosfatidicolina	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DTT	Ditiotreitol	Dithithreitol
EDTA	Ácido etildiaminotetracético	Ethylenedinitrilo tetra-acetic acid
ERAD	Degradación asociada a retículo endoplasmático	ER-associated degradation
ESR	Respuesta a estrés ambiental	Environmental stress response
ET	Cepa tolerante a etanol	Ethanol-tolerant strain

fa	Área fraccional	Fractional area
FDR	Tasa de descubrimientos falsos	False discovery rate
GAP	Permeasa general de aminoácidos	General amino acid permease
GFP	Proteína fluorescente verde	Green fluorescent protein
GO	Ontología génica	Gene ontology
GPX2	Glutatión peroxidasa	Glutathione peroxidase
GPY	Extracto de levadura glucosa peptona	Glucose peptone yeast extract
GSH1	Gamma glutamylcisteina sintasa	Gamma glutamylcysteine synthetase
GSSG	Glutatión oxidado	Oxidized glutathione
gTME	Ingeniería de maquinaria de transcripción global	Global transcription machinery engineering
GTT1	Glutatión transferasa	Glutathione transferase
HOG	Alta osmolaridad por glicerol	High osmolarity glycerol
HSE	Elemento de choque térmico	Heat shock element
HSF	Factor de transcripción de choque térmico	Heat shock factor
HSP	Proteína de choque térmico	Heat shock protein
IPTG	Isopropil- β -d-1-tiogalactopiranosido	Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside
LB	Medio Luria Bertani	Luria Bertani medium
LD	Gotas lipídicas	Lipid droplets

MAPK	Proteín quinasa activada por mitógeno	Mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdehído	Malondialdehyde
MIC	Concentración mínima inhibitoria	Minimum inhibitory concentration
MnSOD	Superóxido dismutasa mitocondrial	Mitochondrial superoxide dismutase
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados	Monounsaturated fatty acids
NES	Señal de exportación nuclear	Nuclear export signal
NIC	Concentración no inhibitoria	Non-inhibitory concentration
NLS	Señal de localización nuclear	Nuclear localization signal
OD	Densidad óptica	Optical density
ONPG	Orto-Nitrofenil- β -Galactósido	Ortho-Nitrophenyl-B-Galactoside
ORFs	Pautas de lectura abiertas	Opening reading frame
PAM	Membrana asociada a membrana plasmática	Membrane associated to plasma membrane
PBS	Tampón fosfato salino	Phosphate buffered saline
PC	Fosfatidilcolina	Phosphatidylcholine
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
PEG	Polietilenglicol	Polyethylenglicol
pH _v	pH vacuolar	Vacuolar pH
PI	Fosfatidilinositol	Phosphatidylinositol
PKA	Proteín quinasa A	Protein kinase A
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados	Polyunsaturated fatty acids

QTL	Loci de características cuantitativas	Quatitative trait loci
RE	Retículo endoplasmático	Endoplasmic reticulum
SC	Medio completo sintético	Synthetic complete medium
SDS	Dodecilsulfato sódico	Sodium lauryl sulfate
SGD	Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i> genome database
SOD1	Superóxido dismutasa	Superoxide dismutase
STRE	Elemento de respuesta a estrés	Stress responsive element
S-UPR	Súper-UPR	Super-UPR
TAG	Triacilgliceroles	Triacylglycerols
TEM	Microscopia electrónica de transmisión	Transmission electron microscopy
Tm	Tunicamicina	Tunicamycin
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TRR1	Tiorredoxina reductasa	Thioredoxin reductase
TRX2	Tiorredoxina reductasa	Thioredoxin
UFAs	Ácidos grasos insaturados	Unsaturated fatty acids
UMF	Factor modulador de la UPR	UPR modulatory factor
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas	Unfolded protein response
UPRE	Elemento UPR	UPR Element
UV	Ultravioleta	Ultraviolet

X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranósido	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galacto-pyranoside
YPD	Levadura peptona dextrosa	Yeast peptone dextrose

INTRODUCCIÓN

1. Notas históricas sobre la investigación en levaduras y fermentación.

Desde tiempos remotos, las bebidas y alimentos fermentados producidos por la acción de las levaduras han contribuido notablemente al avance la sociedad, considerándose la domesticación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como un evento esencial en la Historia de la Humanidad [1]. Los arqueólogos ya encontraron evidencias de bebidas fermentadas pertenecientes al periodo Neolítico (8500-4000 a.C) en China, Irán y también Egipto, gracias a la profusión de jeroglíficos y figuritas de bronce procedentes de Asiria en la que se pueden ver las diversas operaciones de recogida y molienda de cereales [2, 3]. La producción de bebidas y alimentos fermentados apareció en paralelo con el comienzo de la agricultura, proveyendo sustento a la población y motivando el establecimiento de asentamientos y la conversión de una vida nómada a otra basada en la agricultura [4]. Este cambio sentaría las bases para el desarrollo de nuevos atributos sociales y económicos en el progreso de la sociedad [5, 6].

El papel de los microorganismos en la fermentación fue descubierto por primera vez en 1860 por el químico Louis Pasteur (1822-1895). Pasteur fue el primero en demostrar experimentalmente que las bebidas fermentadas son el resultado de la transformación de la glucosa en etanol por la acción de levaduras vivas y que este proceso ocurría en ausencia de oxígeno [7, 8]. Pasteur realizó exhaustivos análisis cuantitativos en sus fermentaciones, confirmando y ampliando las observaciones realizadas previamente en su artículo de 1857 [8] y descartando de esta manera las teorías imperantes de la época, promulgadas por los químicos Jöns Berzelius, Justus von Liebig y Friedrich Wöhler, en contra de las levaduras como organismos vivos.

Pasteur también introdujo el concepto de condiciones asépticas y cultivos puros para ayudar a resolver problemas de “malas” fermentaciones, y distinguió entre fermentaciones alcohólicas y crecimiento aeróbico de levaduras. Además también propuso que las levaduras vínicas podían encontrarse en la superficie de las uvas, proporcionando una fuente de inoculación en los mostos.

La obtención del primer cultivo puro utilizado en la producción de bebidas alcohólicas se remonta a 1888, de la mano de Emil Christian Hansen (1842-1909) del departamento de fisiología de la Fundación Carlsberg en Copenhague, mientras que en 1890 Müller-Thurgau obtuvo un cultivo puro de levaduras vínicas

en Geisenheim, Alemania [9]. Anteriormente a estos sucesos, las fermentaciones se consideraban procesos espontáneos, donde las levaduras se iban transfiriendo, inconscientemente, de infusión en infusión en vasijas de fermentación o a partir de remanentes que se guardaban para comenzar una nueva fermentación. No fue hasta finales del 1800 cuando se comenzó a indagar en el metabolismo de las levaduras, permitiendo estudios detallados del metabolismo y descubrimientos fundamentales en el campo de la bioquímica y biología celular [10, 11] así como la descripción de *Saccharomyces cerevisiae* como la responsable de llevar a cabo la fermentación alcohólica en el mosto al imponerse a otros microorganismos en un ambiente caracterizado por la presencia creciente de etanol [12].

2. Utilización de *S. cerevisiae* como organismo modelo.

S. cerevisiae presenta una importante similitud en cuanto a función y organización celular con otros organismos más complejos, con un 60% de sus genes homólogos con el ser humano, un tiempo de generación corto (1,5-3 horas) y un crecimiento reproducible y genéticamente estable junto con una manipulación genética sencilla, han sido utilizadas como sistema modelo para el estudio de múltiples fenómenos de relevancia en la biología humana a nivel molecular [13-15].

La importancia de *S. cerevisiae* como organismo modelo derivó en parte del logro histórico de la secuenciación del genoma completo de la cepa S288C que se dio a conocer el 24 de abril de 1996 y constituyó el resultado de un enorme esfuerzo en el que participaron más de 600 científicos de 96 laboratorios, en un programa mundial encabezado por André Goffeau [16, 17]. Doce millones de bases fueron secuenciadas en un verdadero esfuerzo internacional, que involucró laboratorios europeos, americanos, canadienses y japoneses. Aun cuando la secuencia completa del genoma de la levadura representa solamente una fracción pequeña de la información que se encuentra actualmente en las bases de datos, ha constituido un recurso de gran valor para el análisis de la función y arquitectura genómica. Esta experiencia facilitó y propició el desarrollo de proyectos involucrados en la secuenciación de genomas de una variedad de organismos eucariotas, incluyendo el proyecto del genoma humano. *S. cerevisiae* fue el primer eucariota secuenciado, y todavía hoy sigue siendo uno de los más empleados [16, 18]. Los modelos de enfermedades en levaduras presentan

aspectos clave de la patología celular y proporcionan nuevas conexiones gen-ambiente y dianas terapéuticas en una escala sin precedentes, logrando, por ejemplo, magníficos modelos en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Alzheimer y Huntington [19-21]. En el año 2011, un estudio puso a prueba la levadura *S. cerevisiae* como organismo modelo mediante el análisis de similitud entre conjuntos de proteínas implicadas en un proceso específico en 704 organismos de diversos phyla [22]. Los resultados determinaron que los animales en general y *Homo sapiens* en particular, son algunos de los organismos no fúngicos para los que *S. cerevisiae* es un buen modelo para estudiar un gran número de procesos biológicos comunes [22].

La biotecnología en levaduras ha ido incorporando durante las últimas décadas nuevas disciplinas como la genómica funcional, metabolómica, ingeniería metabólica y biología de sistemas, ofreciéndonos la oportunidad de explotar al máximo las propiedades de determinadas levaduras con gran relevancia industrial.

3. Características generales de *S. cerevisiae*.

3.1. El género *Saccharomyces*.

A lo largo del siglo XX, el género *Saccharomyces* ha sido revisado varias veces. Los investigadores han añadido y eliminado muchos taxones que actualmente se han colocado en otros géneros relacionados con *Saccharomyces* ("*Saccharomyces sensu lato*" en contraste con "*Saccharomyces sensu stricto*", que son actualmente los taxones asignados al género *Saccharomyces*) [23], y también se describieron nuevas especies de *Saccharomyces* basadas en pruebas de asimilación del nitrógeno y carbono, muchas de las cuales resultaron ser divergentes fenotípicamente de las especies descritas previamente [24, 25].

A lo largo del siglo XXI, la mayoría de las especies de *Saccharomyces* conocidas provenían de fermentaciones asociadas a la actividad humana. *Saccharomyces paradoxus* fue aislada de la savia exudada de un árbol en Rusia y fue la primera levadura *Saccharomyces* reconocida como especie natural [26]. A principios del siglo XXI, los investigadores describieron las especies de origen natural *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* y *Saccharomyces mikatae*. Estas dos últimas, aisladas del suelo y

hojas marchitas, se describieron a partir de una colección de cultivos japonesa [27]. Unos años más tarde se aisló *S. arboricola* en la corteza de árboles caducifolios en China [28]. *S. eubayanus*, la especie de *Saccharomyces* más recientemente descubierta, es uno de los parentales de la especie híbrida cervecera *Saccharomyces pastorianus* junto con *S. cerevisiae*, con una similitud mayor del 99% con la porción no *S. cerevisiae* del híbrido [29]. Anteriormente al descubrimiento de *S. eubayanus*, los taxónomos consideraban tanto a *S. uvarum* como a *S. bayanus* (híbrido entre *S. uvarum* y *S. eubayanus*) variedades de las especies *S. bayanus* (*S. bayanus* var. *uvarum* y *S. bayanus* var. *bayanus*, respectivamente), ya que eran fenotípica y genéticamente similares.

Actualmente el género *Saccharomyces* está compuesta por siete especies puras: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* and *S. uvarum* y algunos híbridos (Figura I.1)

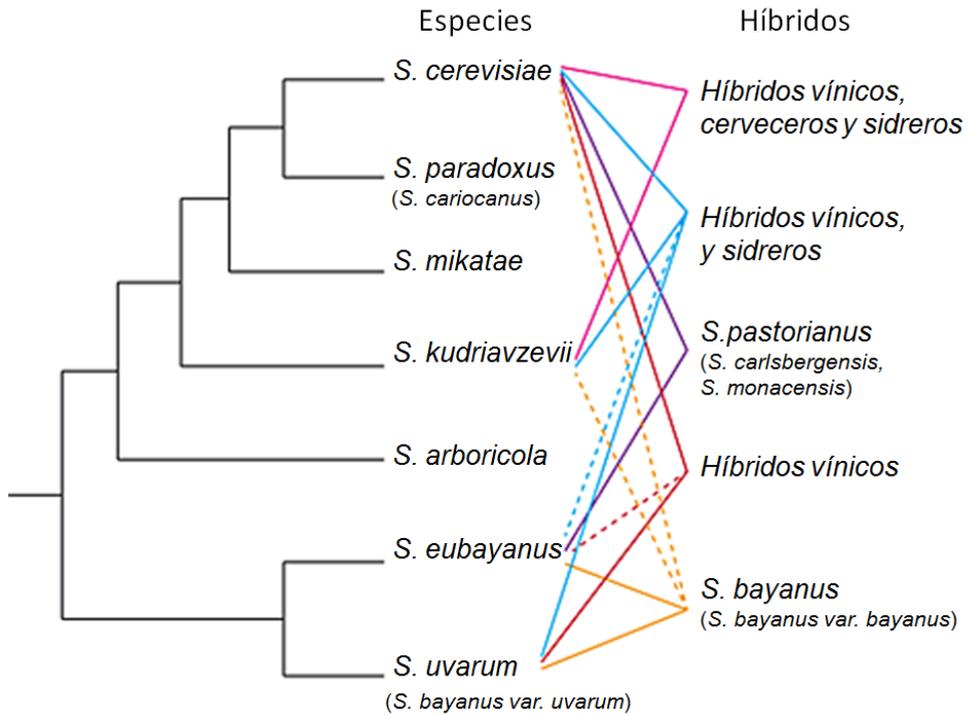


Figura I.1. Cladograma esquemático que representa las relaciones filogenéticas entre las especies de *Saccharomyces* e híbridos frecuentemente aislados. Las líneas discontinuas representan introgresiones de una tercera o cuarta especie en un híbrido. Los sinónimos se indican entre paréntesis. Tomado de Boynton y Greig (2014) [30].

3.2. Cinética del crecimiento de las levaduras en la fermentación.

El crecimiento poblacional en las levaduras es el resultado de la división celular y la progresión del ciclo celular. Bajo condiciones de crecimiento adecuadas, la cinética de crecimiento en las levaduras responde a una curva de crecimiento microbiana típica, que comprende cuatro fases principales: fase de latencia, fase exponencial, fase diáuxica y fase estacionaria (Figura 1.2).

La fase de latencia (lag) refleja el tiempo requerido en las levaduras para adaptarse a su nuevo entorno, sintetizando ribosomas y enzimas necesarios para generar una mayor tasa de crecimiento. La duración de esta fase dependerá tanto del tamaño poblacional inicial como de la idoneidad de las condiciones ambientales presentes. Una vez las células comienzan a metabolizar activamente, comienza la replicación del DNA y poco después las células se dividen. Este momento determinará la segunda fase de crecimiento, la fase exponencial, periodo en el cual las células se dividen con su mayor tasa de crecimiento específico (μ_{max}). El tiempo que necesita la población para doblar su número se denomina "tiempo de generación" y se halla profundamente influenciado por el medio de crecimiento, la temperatura y el tipo de cepa empleada, aunque generalmente ronda los 90-120 minutos en condiciones favorables. La tercera fase del crecimiento de las levaduras es la fase diáuxica, un periodo de crecimiento lento en el cual la levadura cambia de un metabolismo fermentativo a otro respiratorio a causa de la falta de azúcares en el medio, convirtiéndose el etanol en la principal fuente de carbono. Finalmente, y debido al agotamiento de los nutrientes en el medio u otros factores ambientales como la presencia de metabolitos tóxicos o altas temperaturas, el metabolismo celular se ralentiza y la división celular se detiene, entrando la célula en su última fase, la fase estacionaria. Aunque bien es cierto que las células pueden sobrevivir en esta fase durante largos periodos de tiempo gracias a modificaciones en su pared celular, al almacenamiento en su citoplasma de reservas de carbono (trehalosa y glucógeno) o a una ralentización dramática en su transcripción y traducción, las células terminarán autolisándose y muriendo si las condiciones ambientales óptimas no se restablecen.

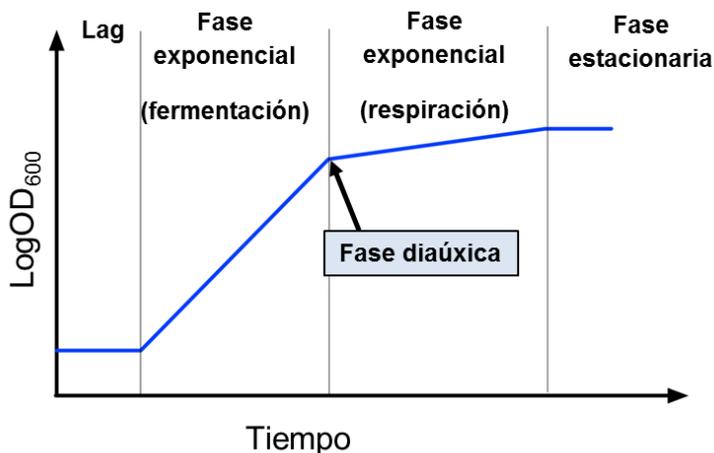


Figura I.2. Representación de las cuatro fases de crecimiento en *S. cerevisiae*.

3.3. Diferencias genéticas entre cepas aisladas de fermentaciones y cepas de laboratorio.

El genoma de las cepas de laboratorio y las de tipo salvaje de la levadura *S. cerevisiae* presentan una variabilidad genética significativa. Las cepas industriales de *S. cerevisiae* son organismos altamente especializados, que han evolucionado para crecer en distintos ambientes o nichos ecológicos provistos por la actividad humana. Estas cepas presentan una gran capacidad de reorganización genómica a través de reestructuraciones cromosómicas [31, 32], promoviendo una adaptación rápida a los cambios ambientales. Esta especialización se ha asociado a algunas características genómicas que abarcan una amplia gama de rasgos fenotípicos, como un genoma diploide con presencia de aneuploidias o poliploidias, polimorfismos en la longitud cromosómica, homotalismo o alta heterocigosis [33] así como translocaciones intra o intercromosómicas, mediadas por secuencias relacionadas con transposones [34, 35]. La presencia de trisomías y tetrasomías en algunos cromosomas deriva en una capacidad de esporulación muy variable (0-75%), con una viabilidad de esporas también variable (0-98%) [36-38]. Hace unos pocos años se demostró que la variación natural en la eficiencia de esporulación entre las diferentes levaduras industriales también se debe a la variación alélica en tres factores

transcripcionales (*IME1*, *RME1* y *RSF1*) aumentando las fuentes de diversidad fenotípica entre las especies de levadura [39].

Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de diversas fuentes geográficas y ecológicas demuestran una divergencia genética más asociada al tipo de hábitat que el origen geográfico [1, 40-43]. Las cepas de *S. cerevisiae* relacionadas con viñedos y la producción de vino, denominadas cepas vónicas, forman a menudo un grupo genéticamente diferenciado que está separado de las cepas salvajes, aisladas del suelo y robles, y de las cepas de otras fermentaciones, como el vino de palma y el sake [1, 41-43]. La divergencia genética entre cepas vónicas y no vónicas junto con una reducción en la diversidad genética dentro de las cepas vónicas sugiere que estas últimas fueron domesticadas a partir de una *S. cerevisiae* salvaje. [41].

Se ha propuesto que la ploidía de las levaduras vónicas podría conferir ventajas en la adaptación a ambientes externos cambiantes o un aumento en genes claves en la fermentación [36, 44]. Recientemente la secuenciación de la levadura vónica EC1118 reveló la presencia de transferencia horizontal de genes implicados en la adaptación al entorno industrial [45]. Las cepas industriales de *S. cerevisiae* presentan fenotipos importantes en procesos comerciales, como la completa y rápida fermentación de azúcares, mayor resistencia y producción de etanol, síntesis de aromas y sabores deseados, mayor capacidad floculante o menor generación de espumas [9], que probablemente vienen dados por adaptaciones a los ambientes industriales, como cervecerías, bodegas y panaderías, así como su uso continuado en procesos industriales [25, 41, 46]. En cambio las cepas de laboratorio, aunque pueden también adaptarse a las condiciones cambiantes del medio, normalmente por cambios puntuales [47] suelen ser haploides o diploides heterotáticas y tienen un juego definido de 16 cromosomas de longitud fija. Además contienen de forma artificial auxotrofías para algunos aminoácidos o bases nitrogenadas y derivan de aislados naturales, como la cepa S288c, derivada de un diploide heterotático aislado de un higo podrido en california en el año 1938 [48].

3.4. Importancia de las levaduras en la industria.

S. cerevisiae, junto con otras especies de levaduras, es probablemente el organismo biotecnológico más importante. Las levaduras participan en la producción de la mayor cantidad de productos biotecnológicos a nivel mundial,

superando tanto en producción como en ingresos económicos a cualquier otro grupo de microorganismos industriales. La producción de biomasa anual mundial de *S. cerevisiae* supera el millón de toneladas, un nivel que excede la producción conjunta de otros microorganismos industriales en dos órdenes de magnitud.

El valor económico de bebidas y alimentos fermentados relacionados con levaduras es enorme. Se estima que la producción anual de cerveza en 2013 ha sido de 2000 millones de hl, siendo China el mayor productor con 500 millones de hl [49]. El sector cervecero es de gran importancia para la Unión Europea, generando en 2012 ingresos de 53 mil millones de euros en los gobiernos de los estados miembros y 2 millones de puestos de trabajo [50]. En cuanto a la producción mundial de vino, va en aumento con 276.000 hl producidos durante el 2014 y 240.000 hl consumidos en 2013. España, junto con Italia y Portugal, representan el 47% de la producción mundial de vino, siendo España el principal país productor (42.000 hl) [51]. Por otro lado, el mercado de la levadura panadera alcanzó los 3000 millones de dólares en 2013, previéndose un crecimiento próximo a los 5000 millones de dólares en el 2019 [52].

Debido a la disminución de recursos, factores ambientales, y la necesidad de fuentes de energía renovables, las levaduras han atraído durante los últimos años un renovado interés en la producción de alcohol-carburante, con Estados Unidos a la cabeza como mayor productor de bioetanol. Se prevé que el etanol seguirá siendo el biofuel dominante en 2018, con una producción de 1,8 millones de barriles al día [53], por lo que cada vez son más numerosas las investigaciones llevadas a cabo para mejorar la tolerancia al producto, obtención de mayores rendimientos y una productividad del alcohol más específica [54]. Las levaduras además son una importante fuente de enzimas para el mercado tradicional, incluyendo alimentación, piensos y agricultura, así como biocatalizadores específicos en la industria farmacéutica y química para la producción de enzimas heterólogas o nativas, claves en la generación de nuevos fármacos y productos químicos (Tabla I.1). Debido a sus interesantes propiedades fisiológicas, a los métodos de manipulación genética establecidos, y a que muchas de sus cepas son consideradas organismos GRAS (del inglés, *Generally Recognized as Safe*), *S. cerevisiae* continuará siendo el principal organismo elegido para su uso en alimentación y productor de proteínas recombinantes y nativas.

Tabla I.1. Productos industriales producidos por levaduras.

Producto	Ejemplos
Bebidas	Bebidas alcohólicas: cerveza, vino, sidra, sake, y bebidas destiladas (whisky, ron, ginebra, vodka).
Alimentación humana y animal	Levadura panadera, extractos de levaduras, suplementos dietéticos, factores de crecimiento para animales, levadura para forraje.
Químicos	Bioetanol, CO ₂ , glicerol, vitaminas, aromas.
Proteínas recombinantes	Hormonas, vacunas virales, anticuerpos, factores de crecimiento, interferones, proteínas sanguíneas, enzimas.

4. Fermentación alcohólica.

La principal característica fisiológica de las levaduras utilizadas en la elaboración de bebidas fermentadas tales como el vino o la cerveza es su capacidad para degradar carbohidratos, generalmente moléculas de seis carbonos (C₆) como la glucosa a compuestos de dos carbonos (C₂) como el etanol, sin oxidarlos completamente a CO₂. Incluso en presencia de oxígeno, esta conversión se realiza a través de la fermentación alcohólica, cuya reacción se resume en:



En la fermentación alcohólica el 90-95% de los azúcares se convierten en etanol y dióxido de carbono y solamente un 1-2% en material celular y un 4-9% en metabolitos secundarios como glicerol, ácido acético, alcoholes superiores y ésteres [55].

Las levaduras pueden degradar los azúcares por dos rutas metabólicas: fermentativa y oxidativa. En la glicolisis, común en ambos procesos, los azúcares se metabolizan a piruvato. Posteriormente, en la ruta fermentativa, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y este es reducido a etanol, mientras que en la ruta respiratoria, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa en presencia de la coenzima A dentro de la mitocondria. La respiración puede tener lugar en bajas

concentraciones de azúcar y en presencia de oxígeno. Sin embargo, en presencia de altas concentraciones de azúcar, las levaduras metabolizan los azúcares además por la ruta fermentativa incluso en presencia de oxígeno. Este fenómeno se conoce como efecto Crabtree [56]. Las levaduras, como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, que son capaces de acumular etanol incluso en presencia de oxígeno, se denominan levaduras Crabtree-positivas, mientras que aquellas que degradan azúcares a CO₂, como *Kluiveromyces lactis* y *Candida albicans* se denominan Crabtree-negativas [57]. Durante la producción de etanol, la energía necesaria para el crecimiento se obtiene de la glicolisis y rutas fermentativas, más que por respiración oxidativa (Figura 1.3). Tras el agotamiento de la glucosa y la acumulación del etanol, el metabolismo de las levaduras Crabtree-positivas cambia y el etanol se convierte en sustrato, degradándose en presencia de oxígeno.

Durante la fermentación (aeróbica o anaeróbica), la levadura recicla en NADH en la conversión de acetaldehído a etanol, reacción llevada a cabo por la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh), que puede catalizar la reacción en ambas direcciones (acetaldehído a etanol y etanol a acetaldehído), aunque con distintas eficiencias catalíticas. En *S. cerevisiae*, la actividad Adh está codificada por dos genes que surgieron por un evento de duplicación génica, *ADH1* se expresa constitutivamente, mientras que *ADH2* se expresa solamente cuando la concentración de azúcar es muy baja. Esta capacidad de *S. cerevisiae* y de sus parientes más cercanos para fermentar la glucosa y acumular etanol incluso en presencia de oxígeno forjaron las bases de la estrategia de producción de etanol “hacer-acumular-consumir”, que proporcionó al antepasado de la levadura *Saccharomyces* una ventaja sobre sus competidores ya que el etanol es tóxico para la mayoría de microorganismos. *Saccharomyces* podrá así matar a sus competidores produciendo etanol, imponerse en el medio y consumir ese etanol más adelante cuando los requerimientos nutricionales lo precisen [58].

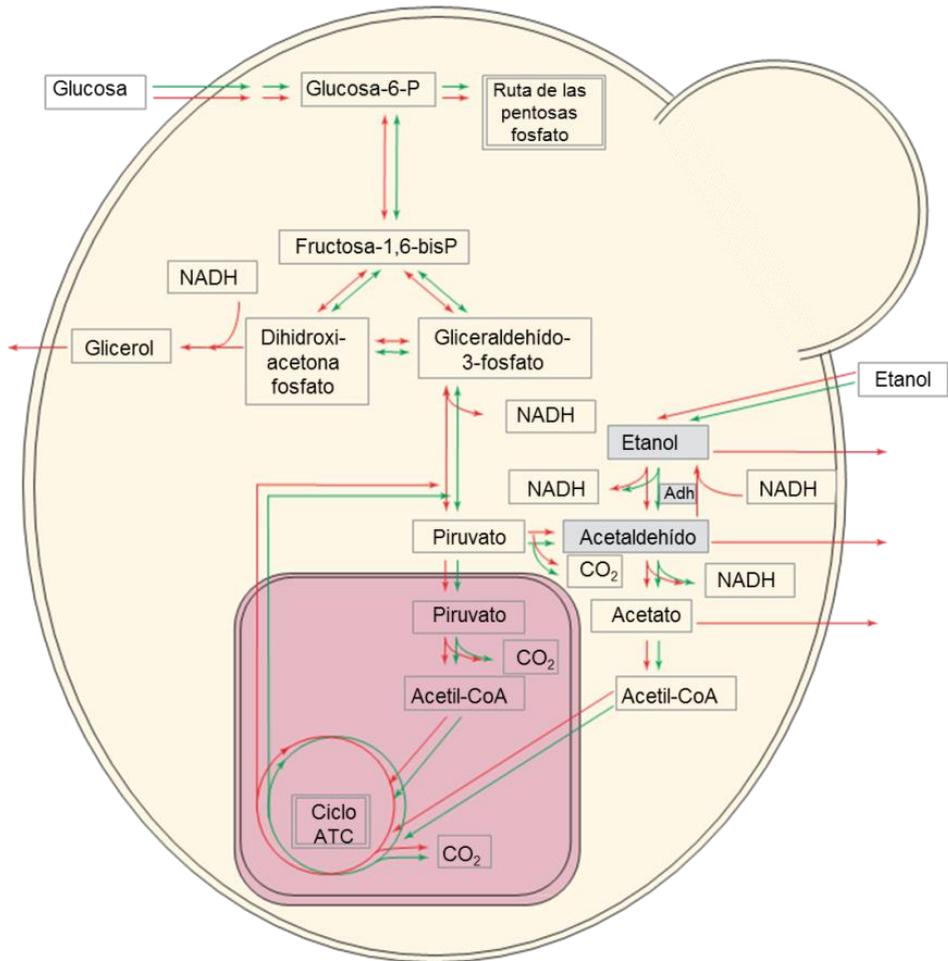


Figura I.3. Esquema de las rutas implicadas en la asimilación de la glucosa y el etanol bajo condiciones aeróbicas en levaduras Crabtree-positivas (flechas rojas), que pueden acumular etanol y Crabtree-negativas (flechas verdes), que degradan directamente las hexosas a CO₂. La conversión entre acetaldehído y etanol, catalizada por la alcohol deshidrogenasa (Adh) está marcada en gris. Adaptado de Piskur y col. (2006).

4.1 El problema de las levaduras durante la fermentación y procesos asociados.

Aunque *S. cerevisiae* es el microorganismo productor de etanol por excelencia por su inherente tolerancia al etanol, alcanzando tolerancias de hasta un 15% (v/v) dependiendo de la cepa, la presencia de este compuesto en un rango de concentración del 4–6% (v/v) en el ambiente disminuye su tasa de crecimiento en un 50% [59], convirtiéndose en un factor de estrés importante durante la fermentación. Por lo tanto, concentraciones relativamente bajas de etanol pueden inhibir el crecimiento celular, disminuyendo la viabilidad y la tasa de fermentación, limitando así la productividad del proceso y obteniendo menores rendimientos de etanol [60, 61].

De particular interés para la industria cervecera y el vino son las paradas de fermentación [62] y las fermentaciones lentas [63], en las cuales la fermentación tarda más tiempo del habitual o se detiene antes de tiempo y deja en el medio una gran concentración de azúcares residuales que pueden provocar contaminaciones posteriores. En ambos casos se aumenta el tiempo de procesamiento y puede llevar al fracaso del proceso de fermentación. Aunque muchos factores pueden contribuir a estas fermentaciones subóptimas se cree que la presencia de etanol en el medio es la principal causa [64-66]. De hecho, Ivorra y col. (1999) observaron una correlación inversa entre la resistencia a estrés de las levaduras y su propensión a estancarse durante la fermentación, es decir, que cuanto más tolerante es una cepa al estrés, menos probable es que cause una parada o una fermentación lenta [67].

Por todo ello se hace necesaria una mejor comprensión de los efectos que el etanol ejerce sobre las levaduras y de los mecanismos de respuesta a estrés asociados a él, ya que esto permitirá, por ejemplo, obtener mayores tasas de producción de etanol, minimizar el riesgo de fermentaciones subóptimas o extender la vida de las levaduras reutilizadas en las cervecerías.

4.2 La respuesta a estrés en *S. cerevisiae*.

Todos los organismos vivos necesitan adaptarse a condiciones cambiantes del medio ambiente para sobrevivir. En la naturaleza, en las condiciones recreadas en el laboratorio, así como en los procesos industriales, *S. cerevisiae* atraviesa por diferentes situaciones adversas para su crecimiento que afectan principalmente a las estructuras celulares y a diferentes macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función [68].

Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, las levaduras responden rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés y adaptarse a las nuevas condiciones (Fig 1.4). En una definición bastante amplia, todos los cambios ambientales que provocan una respuesta adaptativa se califican con el término “estrés”. En consecuencia, la respuesta molecular y fisiológica de un organismo a los cambios en el medio ambiente se refiere como “respuesta a estrés”, mientras que la capacidad de soportar condiciones externas cambiantes o desfavorables se define como “resistencia a estrés” o “tolerancia a estrés”.

El estudio de varios organismos, entre ellos *S. cerevisiae*, ha puesto de manifiesto que la exposición a un estrés leve genera una mejora en la resistencia a futuras exposiciones más extremas del mismo estrés u otros estreses distintos. Estos fenómenos han sido definidos como “resistencia a estrés adquirida” o “protección cruzada”, respectivamente [69]. Así por ejemplo, cuando las células de un cultivo de levaduras son sometidas a un tratamiento moderado de calor, estas son capaces de resistir un choque de peróxido de hidrógeno que de otro modo sería letal [70].

4.2.1 Ruta General de Respuesta a Estrés.

Una forma de explicar este fenómeno es la existencia de un mecanismo integrador que detecta y responde ante diferentes formas de estrés, la denominada **Ruta General de Respuesta a Estrés** (Figura 1.4). En los promotores de distintos genes implicados en la respuesta general a estrés, como el gen de la catalasa T citosólica, *CTT1*, inducida bajo múltiples condiciones de estrés, se identificó una secuencia consenso (AGGGG), funcional en ambas orientaciones y responsable de la inducción de este gen, a la cual se le denominó

STRE (del inglés, *STress Responsive Element*) [71, 72]. Entre los genes que presentan secuencias STRE en sus promotores nos encontramos con diversos tipos de genes que codifican transportadores, proteasas o proteínas que protegen de diferentes tipos de estrés [73, 74], aunque no todos los genes que contienen STREs funcionales en su promotor se inducen por las mismas condiciones de estrés, y sus cinéticas y niveles de expresión son variables [75]. El elemento STRE es reconocido por dos factores de transcripción similares en tamaño y composición de aminoácidos que comparten un 41% de identidad, aunque no completamente redundantes en función, denominados Msn2p y Msn4p [76, 77]. Estos factores regulan la expresión de unos 200 genes en respuesta a una amplia variedad de estreses, incluyendo choque por calor, choque osmótico, estrés oxidativo, bajo pH, limitación de glucosa en el medio y altas concentraciones de etanol [64, 77-79]. La expresión génica por uno u otro factor dependerá del contexto del promotor, permitiendo una regulación muy fina de los genes, dependiendo del estrés implicado [80, 81]. Así, mientras los mutantes simples de *MSN2* y *MSN4* no presentan un fenotipo obvio, el doble mutante *MSN2/MSN4* es hipersensible a la limitación de fuente de carbono, choque térmico, y estrés oxidativo y osmótico [74], mientras que la sobreexpresión de estos factores disminuye la sensibilidad a la falta de nutrientes y estrés térmico. La capacidad de Msn2p/Msn4p para activar la transcripción está ligada a su localización celular. Varios estudios indican que la ruta de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (ruta AMPc-PKA) actúa directa e indirectamente sobre la localización subcelular de Msn2p/Msn4p [82].

En condiciones de crecimiento exponencial en presencia de glucosa y en ausencia de estrés, se induce la producción de AMPc por la activación de la enzima adenilato ciclasa Cyr1p, que previamente ha sido activada por Gpr1/2p, un receptor acoplado a la proteína G o a Ras1/2p. El AMPc activa la proteinquinasa A (PKA) e inhibe la respuesta a estrés general regulada por Msn2/4p, y respuestas específicas de estrés reguladas por Yap1p y Skn7p [76, 83]. Sin embargo, bajo distintas condiciones de estrés, los niveles de AMPc y la actividad de la PKA disminuyen, por lo que Msn2/4p es transportado rápidamente al núcleo [84].

La ruta de señalización de la diana de rapamicina (TOR) también puede cambiar la localización de Msn2p. Bajo estrés osmótico, térmico o bajo deficiencia de nitrógeno (pero no de glucosa), TORp se inactiva, permitiendo que la proteína fosfatasa 2A (PP2Ap) desfosforile a Msn2/4p, permitiendo su entrada al

núcleo y la transcripción de genes de respuesta a estrés [84]. Además, se piensa que ambos reguladores transcripcionales Msn2/4p también se encuentran bajo el control de la ruta HOG-MAPK, a través de la proteína Hog1p que es una de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Cuando hay estrés osmótico, Hog1p media la translocación de Msn2/4p al núcleo, que se unirá a los lugares STRE de sus genes diana, y la transcripción de genes de respuesta a estrés [79].

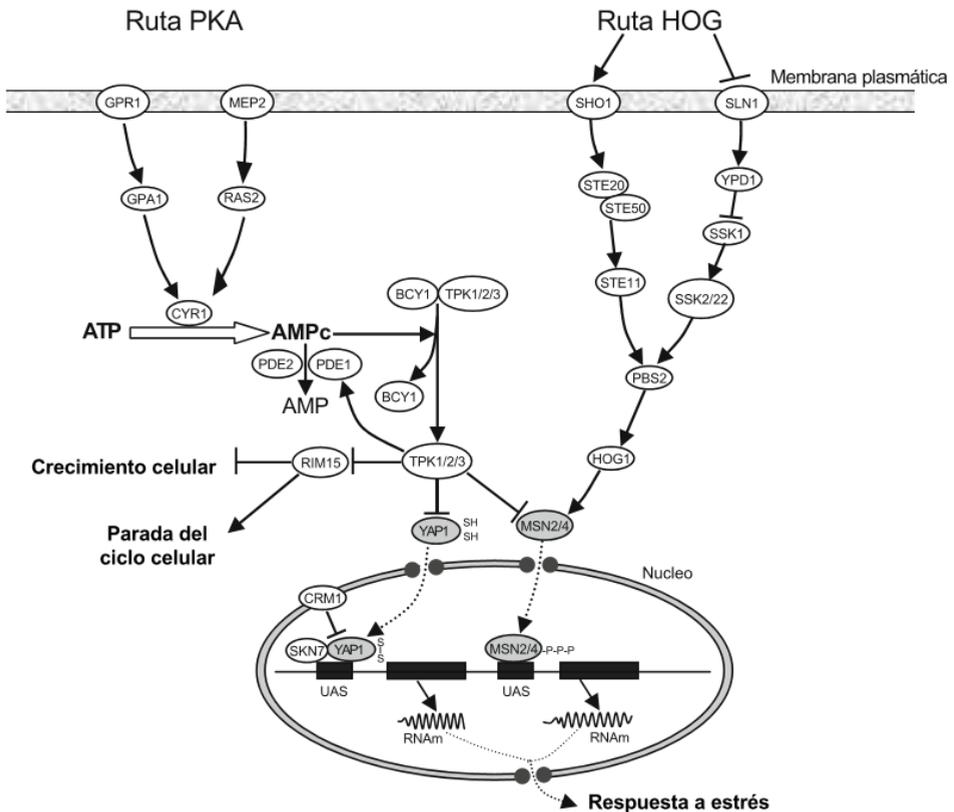


Figura I.4. Esquema de las rutas HOG y PKA, relacionadas en la interacción entre los factores de transcripción Msn2/4p y los lugares STRE en *S. cerevisiae*. Las flechas indican interacción positiva mientras que las líneas con barra muestran interacción negativa. Adaptada de Ma y Liu (2010) [85].

Esta vía de respuesta a estrés general permite a las levaduras responder frente a estreses muy diversos (osmótico, térmico, oxidativo y otros), desarrollando así diversos mecanismos de respuesta a estrés interconectados que permiten disminuir el gasto energético en situaciones de estrés mediante la activación de factores transcripcionales generales (Figura I.5).

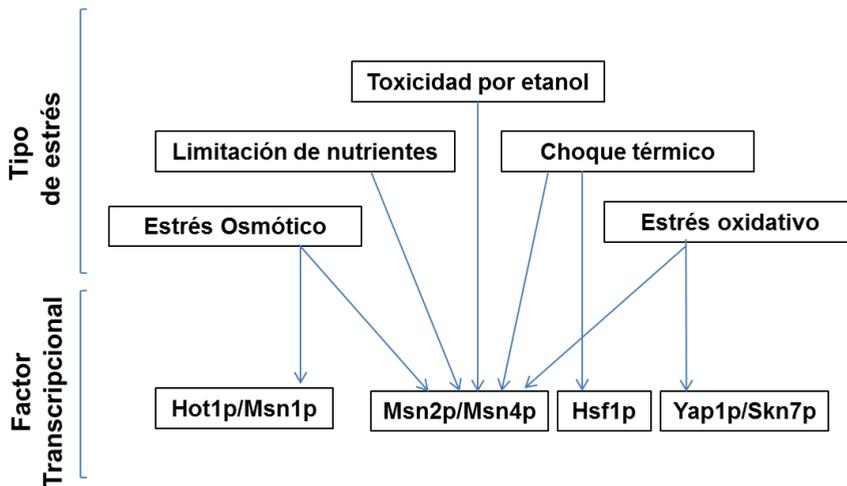


Figura I.5. Esquema representativo de los mecanismos de protección cruzada en la levadura *S. cerevisiae*. Adaptado de Bauer y Pretorius, (2000).

4.2.2. Respuesta a estrés térmico.

Además de poseer una ruta general de respuesta a estrés, las levaduras han desarrollado mecanismos de respuesta específicos para los principales estreses ante los que se encuentran, con el fin de integrar las diferentes respuestas y mejorar su adaptación al medio. En el **estrés térmico**, por ejemplo, se ha observado que participan numerosas proteínas denominadas Proteínas de Choque Térmico (del inglés, *Heat Shock Proteins*, HSP) [86, 87] como las familias de Hsp70p y Hsp100p, implicadas en impedir la desnaturalización o inducir el correcto plegamiento de proteínas desnaturalizadas, la degradación de proteínas mal plegadas, y la disgregación de agregados proteicos causados por desnaturalización [88-91]. La transcripción de estos genes depende de los elementos reguladores STRE y, además, de los elementos específicos HSE

(*Heat Shock Element*, secuencia consenso nGAAn) a los cuales se une el factor transcripcional Hsf1p (*Heat Shock Factor*) [80, 92]. No obstante, las dianas de Hsf1p pueden ser muy diversas ya que activa a otras proteínas relacionadas con la resistencia a tóxicos, el control del ensamblaje del proteasoma y con la respuesta a estrés oxidativo [93], hecho que pone de manifiesto el entrecruzamiento entre las diferentes respuestas a estrés.

Además, es importante mencionar que aunque la principal respuesta reguladora al choque térmico se produce a nivel transcripcional, también hay modulación a través del ajuste de la estabilidad del mRNA de un conjunto específico de genes. Estos cambios en la estabilidad del mRNA son mayoritariamente homodireccionales a los de la tasa de transcripción y son llevados a cabo por proteínas de unión a RNA [94].

4.2.3. Respuesta a estrés osmótico.

Por otro lado, el **estrés osmótico** generado por la disminución en el potencial hídrico del ambiente también posee su propia ruta específica, denominada ruta de respuesta de glicerol a elevada osmolaridad (*High Osmolarity Glycerol Pathway*, HOG) [95, 96]. Dos factores esenciales de esta vía son el osmosensor Sln1p-Ypd1p, que actúa como regulador negativo y Sho1p que actúa como regulador positivo. Estos sensores localizados en la membrana plasmática transmiten la señal de estrés osmótico activando una cascada de MAP quinasas [97], que finalmente activan por fosforilación a la quinasa Hog1p, que se translocará al núcleo y transducirá la señal de hiperosmósis a través de al menos ocho factores transcripcionales: Msn2p/Msn4p, Smp1p, Sko1p, Gcn4p, Hot1p y Msn1p [98]. Esta cascada de señalización conduce a la síntesis o degradación de solutos compatibles que puedan contrarrestar la presión osmótica, como es el glicerol, la trehalosa, también relacionada con la respuesta a estrés térmico [99], y el glucógeno como carbohidrato de reserva [100]. Durante la aclimatación al nuevo ambiente la célula experimentará otros cambios, como la reestructuración del citoesqueleto, la parada del ciclo celular y la reprogramación metabólica. Una vez se alcanza la adaptación celular, Hog1p es desactivada por la acción de Ser/Thr fosfatasa (Ptc1p, Ptc2p y Ptc3p) y Tyr fosfatasa (Ptp2p y Ptp3p), bajo condiciones fisiológicas esta desactivación es esencial ya que la activación constitutiva de *HOG1* es letal [101].

4.2.4. Respuesta a estrés oxidativo.

En cuanto al **estrés oxidativo**, las levaduras también han desarrollado sistemas de respuesta específicos que les permiten combatir de forma concreta la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas tanto por estreses exógenos (compuestos químicos, radiación ionizante, metales pesados) como por factores endógenos derivados de la generación de ROS por el propio metabolismo celular.

Las ROS dañan las células a través de la carbonilación de proteínas, peroxidación de lípidos y alteraciones en el DNA [102], activando mecanismos de envejecimiento, apoptosis y muerte celular. En un ambiente extracelular predominantemente oxidante, las células necesitan mantener un entorno intracelular reductor para preservar su integridad funcional [102]. Por ello las levaduras han desarrollado diversos mecanismos de defensa enzimáticos, como reductasas, deshidrogenasas y peroxidasas, y moléculas antioxidantes no enzimáticas como el glutatión, las tiorredoxinas y las glutarredoxinas [103]. Se han identificado 115 proteínas de levadura cuya expresión aumenta tras el tratamiento con H₂O₂, incluyendo un gran número de HSPs y proteínas antioxidantes como la superóxido dismutasa, tioperoxidasa ó la glutatión reductasa dependiente de NADPH [104]. En la inducción de estas proteínas intervienen diversos factores transcripcionales como Msn2/4p, Yap1p y Skn7p, aunque también se ha visto que los factores Sko1p y Hsf1p pueden intervenir en la señalización por H₂O₂ [105].

El factor transcripcional Yap1p es el de mayor relevancia y el mejor caracterizado dada su implicación en la activación de numerosos genes de respuesta a estrés oxidativo como los que codifican la tiorredoxina (*TRX2*), tiorredoxina reductasa (*TRR1*), catalasa (*CTT1*), superóxido dismutasa (*SOD1*), glutatión sintetasa (*GSH1*), glutatión transferasa (*GTT1*) y glutatión peroxidasa (*GPX2*), entre otros muchos [81, 106]. La actividad transcripcional de Yap1p está regulada por su localización celular. La región N-terminal contiene una señal de localización nuclear (NLS) mientras que su región C-terminal contiene una señal de exportación nuclear (NES). En ausencia de estrés oxidativo, Yap1p se exporta desde el núcleo, vía exportina nuclear Crm1p, a través de la interacción con su dominio NES. En condiciones de estrés oxidativo, Gpx3p (glutatión peroxidasa) actúa como sensor del estrés junto con la participación de Ybp1p (proteína de unión a Yap) [107]. Gpx3p se oxida e interacciona con Yap1p formando un

punto de disulfuro entre las cisteínas C-303 (extremo C-terminal) y C-598 (extremo N-terminal) de Yap1p, de manera que la señal NES queda enmascarada, impidiendo su interacción con Crm1p y permitiendo su acumulación en el núcleo [108-111] (Figura I.6). Yap1p está regulada negativamente por el sistema de la tiorredoxina, formada por la tiorredoxina reductasa 1 (*TRR1*) y tiorredoxina 2 (*TRX2*), que reducirán el puente disulfuro necesario para la acumulación nuclear de Yap1p. Aunque se han propuesto múltiples mecanismos para la activación de Yap1p ya que la exposición a la diamida causa la acumulación de Yap1p en el núcleo sin formación del puente disulfuro [112].

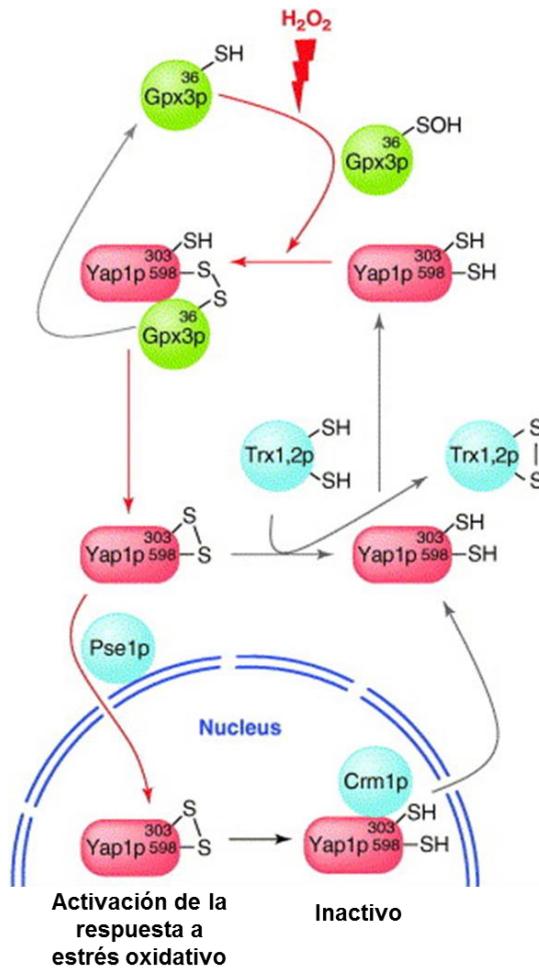


Figura I.6. Mecanismo de activación/desactivación del factor transcripcional Yap1p en la respuesta a estrés oxidativo. Las flechas rojas representan el mecanismo de translocación de Yap1p al núcleo en presencia de H₂O₂ y la activación de los mecanismos antioxidantes. Los residuos de cisteína en Yap1p y Gpx3p se indican con números. Trx1p y Trx2p son tioredoxinas, mientras que Pse1p y Crm1p están involucrados en la importación y exportación de Yap1p del núcleo, respectivamente. Las flechas grises indican los mecanismos para la restauración del estado inactivo. Adaptado de Temple y col. (2005) [111].

Es importante destacar que la inducción de estrés oxidativo y la activación de genes antioxidantes en la levadura en respuesta a la exposición a etanol ha sido ampliamente demostrada [113-115]. En esas condiciones, las principales dianas del etanol son las membranas, pero además la entrada de etanol en la célula provoca, entre otros efectos que se verán más adelante, la degeneración de la mitocondria y, por consiguiente, un desacople entre la cadena de transporte de electrones y la ATPasa que se traducirá en un aumento de ROS.

Costa y col. (1993) ya propusieron que la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) jugaba un papel importante en la adquisición de tolerancia a etanol en células de levadura creciendo en fase exponencial, al observar un aumento de su actividad en presencia de etanol en el medio [116]. Años más tarde observarían como mutantes deficientes en respiración aumentaban su resistencia a etanol debido a la incapacidad de generación de ROS [117]. Ogawa y col. (2000) también reportaron una sobreexpresión de la catalasa citosólica en un cepa de sake mutante tolerante a etanol respecto a su parental bajo condiciones de estrés por etanol [118]. A su vez, Du y Takagi (2007) encontraron que las células de levadura presentaban niveles de ROS aumentados en presencia de etanol, y que la N-acetyltransferasa Mpr1p estaba relacionada con la resistencia a estrés por etanol al reducir los niveles de ROS intracelular, llegando incluso a compensar la función de los enzimas antioxidantes Cta1p, Ctt1p y Gpx1p en sus correspondientes mutantes bajo estrés oxidativo [119].

4.2.5. Respuesta a proteínas desplegadas (UPR).

En células eucariotas, todas las proteínas que entran en la vía secretora deben pasar a través del retículo endoplasmático (RE) para ser modificadas y plegadas correctamente. Cuando la necesidad de plegamiento en el RE excede la capacidad del compartimento, las proteínas mal plegadas se acumulan y activan la respuesta a proteínas desplegadas (del inglés *Unfolded Protein Response*, UPR). La respuesta UPR será más o menos acusada dependiendo de la concentración del compuesto e inducirá un amplio programa transcripcional de sobreexpresión de componentes de degradación y activación de la maquinaria de plegamiento de proteínas existentes en el RE [120], así como la expansión del RE para poder albergar una gran cantidad de proteínas desplegadas y disminuir la concentración de las mismas en el RE, aliviando el estrés y restaurando el correcto funcionamiento del RE [121].

4.2.5.1. Activación de la ruta UPR.

La respuesta UPR en *S. cerevisiae* se inicia a través del sensor transmembrana de RE, Ire1p, identificada inicialmente como una enzima clave en células crecidas en un medio sintético sin inositol [122], de ahí sus siglas en inglés *Inositol Requiring Enzyme* [122]. Un año más tarde, los grupos de Kazu Mori [123] y Peter Walter [124] mostraron como células de levaduras sin el gen *IRE1* no podían crecer bajo agentes como tunicamicina (Tm) o ditiotreitolo (DTT), que inducen la acumulación de proteínas desplegadas bloqueando la N-glicosilación o evitando la formación de puentes disulfuro en las proteínas, respectivamente.

Ire1p se localiza en la membrana del RE, con su dominio N-terminal, que detecta la acumulación de proteínas desplegadas, orientado en el lumen del RE y un dominio quinasa y ribonucleasa en el citoplasma, responsable de transmitir la señal de la presencia de proteínas desplegadas (Figura I.7).

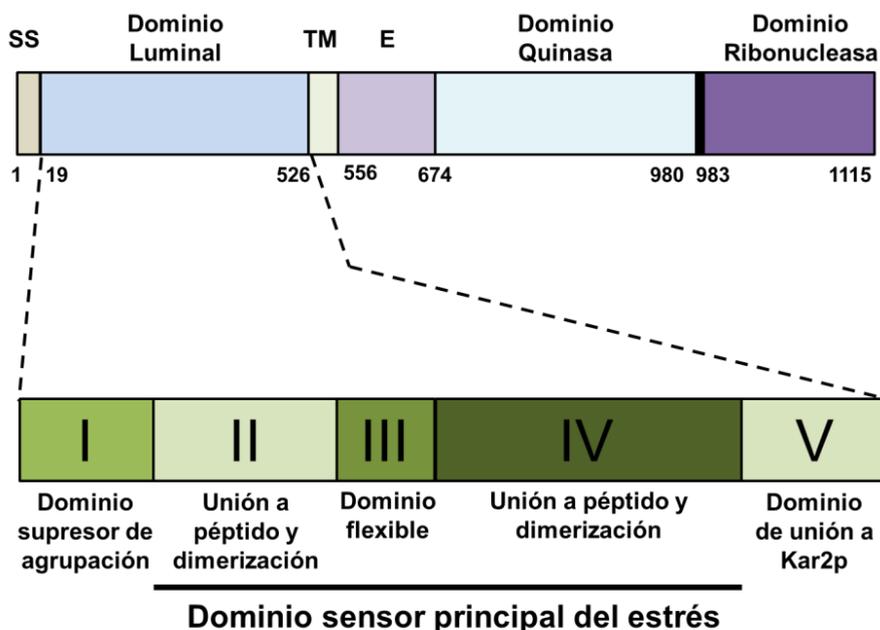


Figura I.7. Representación esquemática de la proteína sensora Ire1p y la localización de cada dominio funcional. La fosforilación del dominio quinasa se produce mayoritariamente en los residuos serina. SS: secuencia señal; TM: dominio transmembrana; E: dominio extensor.

La proteína sensora Ire1p se une a una chaperona, Kar2p, una ATPasa que trabaja en conjunción con co-chaperonas, para unirse a proteínas secretoras desplegadas y nacientes evitando su salida del RE y posterior daño en los orgánulos de la ruta de secreción [125]. La sobreexpresión de *KAR2* protege contra la activación de la UPR, mientras que bajos niveles de la proteína aumentan la sensibilidad al estrés [126, 127]. Por lo que Kar2p podría ser clave en la regulación de la UPR.

Kar2p se disocia de Ire1p en el lumen del RE conforme se acumulan las proteínas desplegadas, rompiendo la barrera estérica que impide la dimerización entre proteínas Ire1p. La oligomerización entre proteínas Ire1p provoca un cambio conformacional en las subregiones II-IV que fomenta la unión a proteínas desplegadas [128] y la reorientación del dominio citoplasmático para maximizar la actividad ribonucleasa de su extremo COOH-terminal [129]. Tras la autofosforilación del dominio quinasa, Ire1p adquiere actividad endo-RNAsa que provocará la escisión de un intrón de 252 nucleótidos del mRNA de *HAC1*, un factor de transcripción bZIP que regula la transcripción de los genes diana de la UPR (Figura I.8). La eliminación de este intrón y la ligación de los exones por la tRNA ligasa, Rlg1p, produce una forma estable del mRNA de *HAC1*, que se traducirá en el factor de transcripción Hac1p y se translocará al núcleo para activar la transcripción de numerosos genes a través de su unión a ciertas regiones promotoras con una secuencia de DNA denominada elemento UPR (UPRE) [128].

Algunos de los 400 genes diana de la UPR incluyen chaperonas residentes en el RE, como *KAR2*, *PDI1* y *FKB2*, enzimas clave en la biosíntesis de lípidos [130], miembros de la maquinaria de degradación asociada a RE (ERAD), y otros componentes del sistema de secreción [120].

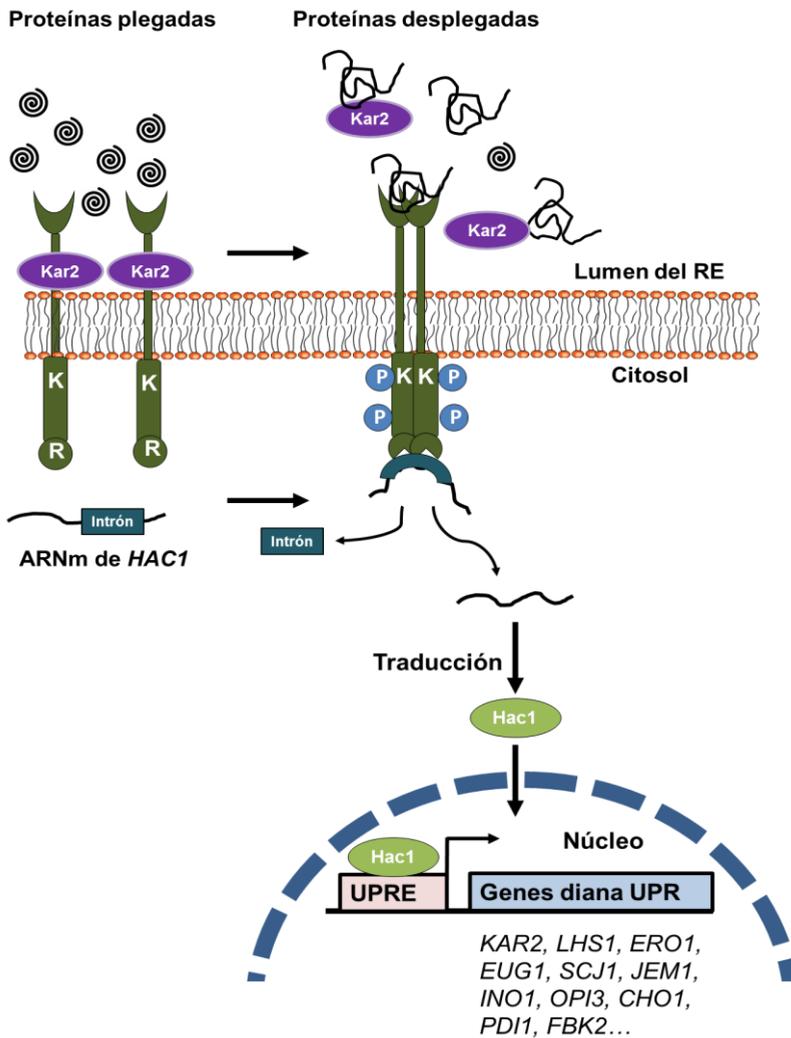


Figura I.8. La respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en la levadura *S. cerevisiae*. En condiciones normales Ire1p está presente en la membrana del RE en forma de monómero asociado a la chaperona Kar2p. Bajo estrés en el RE, Kar2p se disocia de Ire1p causando la oligomerización, transautofosforilación del dominio quinasa (K) y activación de la actividad ribonucleasa (R) en Ire1p. La activación de Ire1p inicia una reacción de corte y empalme no convencional en el mRNA del gen *HAC1*, provocando la traducción de una proteína Hac1p y la expresión de los genes diana de la UPR.

La UPRE se definió originariamente como una secuencia de 22 pares de bases del promotor *KAR2/BiP* [131], siendo posteriormente modificada para llegar a una secuencia palindrómica consenso de siete nucleótidos, CAGNGTG [132]. Seis años más tarde, una aproximación bioinformática reveló que otros genes diana de la UPR presentaban motivos de unión a Hac1p diferentes al descrito hasta la fecha, definiendo así dos UPREs adicionales (UPRE-2 y UPRE-3) [133]. Este resultado sugiere que Hac1p se une al DNA de manera distinta dependiendo de la UPRE presente en el promotor, en combinación con otros factores de transcripción, como Gcn4p, que junto con Hac1p, se unen a las dos nuevas UPREs descritas, además de a UPRE-1 en forma de heterodímero, pudiendo incluso activar la respuesta UPR en ausencia de Hac1p en UPRE-2 si está sobreexpresado. Los autores concluyen que Gcn4 y su activador Gcn2p juegan un papel muy importante en la UPR, contribuyendo significativamente a la sobreexpresión de un gran número de dianas UPR, siendo incluso limitante en la magnitud de la respuesta transcripcional. También observaron cómo mutantes de levadura $\Delta gcn4$ son incapaces de inducir la transcripción del mRNA de *HAC1* [133]. Desconocemos si la utilización de las tres UPREs proporciona un control adicional de la UPR o si existen otros mecanismos de regulación, ya que se sabe que las tres UPREs activan solamente la mitad de los genes diana de la UPR, por lo que la complejidad de la regulación de la activación de la ruta sigue siendo un misterio.

Independientemente del tipo de UPRE utilizada, Gcn4p participa en numerosas respuestas a estrés, incluyendo limitación de glucosa, carencia de aminoácidos y radiación ultravioleta (UV) [134, 135], por lo que el reclutamiento de Gcn4p puede utilizarse para ajustar finamente la UPR. Por ejemplo, bajo depleción de aminoácidos los niveles de Gcn4p son muy altos, por lo que las células que tienen proteínas desplegadas en el RE pueden degradarlas incluso a niveles por debajo de la UPR.

Aunque durante la inducción de la UPR los niveles de Hac1p no cambian, se ha visto que cuando las células están bajo un estrés fuerte, como la combinación de estrés en el RE junto con altas temperaturas o carencia de inositol, se produce una sobreexpresión de *HAC1* independientemente de la presencia del sensor de proteínas desplegadas Ire1p [136]. Esta respuesta aumentada se le conoce como super-UPR (S-UPR) y provoca una respuesta transcripcional cualitativamente diferente a la UPR convencional, estableciéndose tres grupos de genes dependiendo de la diferencia en su inducción bajo UPR y S-UPR. Leber y

col. (2044) observaron que el aumento en la concentración de la proteína Hac1p no era suficiente para alcanzar los valores de sobreexpresión de algunos genes diana de la UPR bajo S-UPR por lo que era necesaria la presencia de un activador transcripcional adicional, al que denominaron UMF (factor modulador de la UPR), de naturaleza desconocida. Los autores exponen así un nuevo mecanismo de vigilancia del RE en las levaduras que modula la UPR, resultante en un nuevo estado fisiológico al que llaman S-UPR, donde las células ajustan la cantidad de mRNA de *HAC1*, en respuesta a una señal bipartita transmitida desde el RE por una ruta independiente de Ire1p con el fin de modular muy finamente la activación de dianas específicas para producir una respuesta adecuada al cambio ambiental [136].

4.2.5.1.1. Activación de la UPR por privación de inositol.

Además de la acumulación de proteínas desplegadas en el RE, varios autores han observado la activación de la UPR en condiciones de carencia de inositol o por delección en genes de biosíntesis de lípidos [137]. Bajo depleción por inositol, el disparo de la UPR es más lento que la provocada por proteínas desplegadas y no necesita del dominio III de unión a péptidos de Ire1p, aunque al igual que la UPR clásica si se produce sobreexpresión de Kar2p y liberación de la chaperona (aunque sin unión a proteína) al lumen del RE [137, 138]. Promlek y col. (2011) sugieren a partir del estudio de mutantes Δ III Ire1p que la delección de ciertos genes de biosíntesis de metabolismo de lípidos como *ARV1*, *OPI3*, *SCS3*, *ISC1* y *MGA2* y la depleción de inositol dan lugar a aberraciones relacionadas con lípidos y membrana, perturbando su homeostasis y dando lugar a la activación de Ire1p incluso sin interacción con proteínas desplegadas [137]. Este estudio, sugiere además por primera vez, que Ire1p puede sentir el estrés en sus dominios citosólico y transmembrana.

Aunque *IRE1* y *HAC1* son esenciales para el crecimiento de la levadura bajo depleción de inositol [122], la relación entre Ire1p y la ruta del inositol, regulada por la transcripción del gen *INO1* (inositol-3-fosfato sintasa), no está clara. Los fosfolípidos que contienen inositol son un importante componente de las membranas en las levaduras, siendo el fosfatidilinositol (PI) el fosfolípido mayoritario en la membrana del RE. La síntesis de fosfolípidos está regulada por el nivel intracelular de inositol libre, de forma que una disminución del mismo provoca la inducción transcripcional de genes que codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis de fosfolípidos, incluyendo *INO1* (que codifica la

inositol-1-fosfato sintasa), *CHO1* (fosfatidilserina sintasa), *OPI3* (que codifica una metiltransferasa de fosfolípidos, necesaria para la síntesis de la fosfatidilcolina) y permeasas de inositol como *ITR1* [139]. Estos genes contienen por lo menos una copia en su promotor de una secuencia de 10 pares de bases denominada UAS_{INO} , al que se le une constitutivamente el heterodímero activador de la transcripción Ino2p-Ino4p y a él un represor de la transcripción, Opi1p, que reprime la transcripción de estos genes cuando hay suficiente inositol en el medio (Figura I.9). En condiciones de depleción de inositol, Opi1p se inactiva, permitiendo la transcripción de los genes regulados por inositol [140].

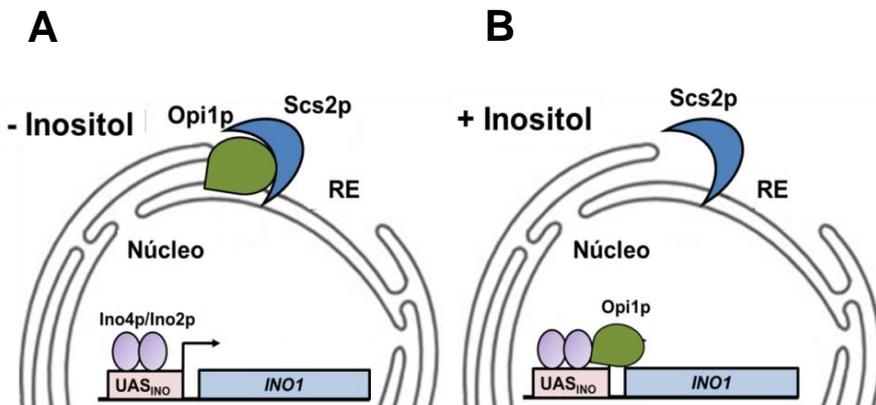


Figura I.9. Respuesta transcripcional de *INO1* a los niveles de inositol en el medio. (A) En condiciones de carencia de inositol, el represor Opi1p está anclado a la membrana del RE/núcleo mediante interacciones con Scs2p, permitiendo la expresión de *INO1* por el complejo activador Ino2p/Ino4p y la síntesis de inositol. Por el contrario, la presencia de inositol en el medio provoca la liberación del represor Opi1p de la proteína de membrana de RE Scs2p y su unión al promotor UAS_{INO} , evitando la transcripción del gen *INO1* (B).

Cox y col. (1997) demostraron la conexión entre el metabolismo del inositol y la UPR al observar que mutantes $\Delta Ire1$ y $\Delta Hac1$ eran auxótrofos para el inositol [130], presentando además niveles de mRNA de *INO1* mucho menores que la cepa silvestre, la presencia de Hac1p en células crecidas en ausencia de inositol, llevó a la conclusión de que de alguna manera Ire1p mediaba en la inducción de *INO1* a través de Hac1p, coordinando la síntesis de proteínas residentes en el RE con la biogénesis de membrana (Figura I.10).

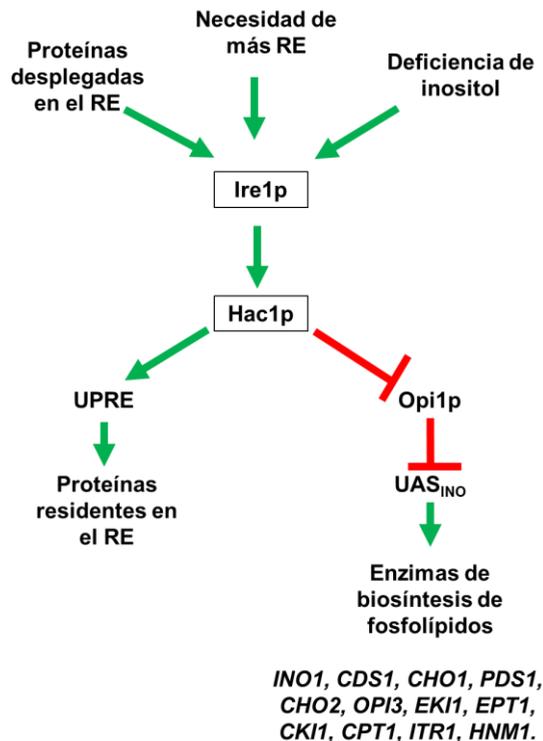


Figura I.10. Ire1p y Hac1p coordinan la UPR y la respuesta a deficiencia de inositol. Ambas rutas convergen en Ire1p y Hac1p, Ire1p también puede activarse tras la sobreexpresión de proteínas de RE, dando lugar a la necesidad de más membrana de RE. La activación de Ire1p da lugar a la modificación del mRNA de *HAC1*, generando una proteína Hac1p funcional que activará la transcripción dependiente de UPRE tras su unión directa. La transcripción dependiente de UAS_{INO} se dará por la inactivación del represor Opi1p por Hac1p.

Años más tarde, el mismo grupo, liderado por Peter Walter, dio con la clave para la activación del dímero Ino2p/Ino4p y la posterior transcripción de los genes regulados por UAS_{INO} . La represión por Opi1p se anula gracias a la acción de Hac1p tras la inducción de la UPR, de manera que, junto con la proteína integral de membrana nuclear y de RE Scs2p, promueven la disociación del regulador negativo del dímero Ino2p/Ino4p (Figura I.11). Los autores proponen que Hac1p actuaría promoviendo la disociación con Ino2p/Ino4p mientras que Scs2p mantendría a Opi1p secuestrado en la membrana nuclear, evitando que vuelva a unirse a Ino2p/Ino4p [141]. Un hecho que corrobora esta hipótesis es que Hac1p se ubiquitina utilizando los mismos enzimas (Ubc4p y Ubc5p) que Opi1p cuando los niveles de inositol caen, por lo que la heterodimerización puede promover la degradación de Opi1p por el proteasoma [142].

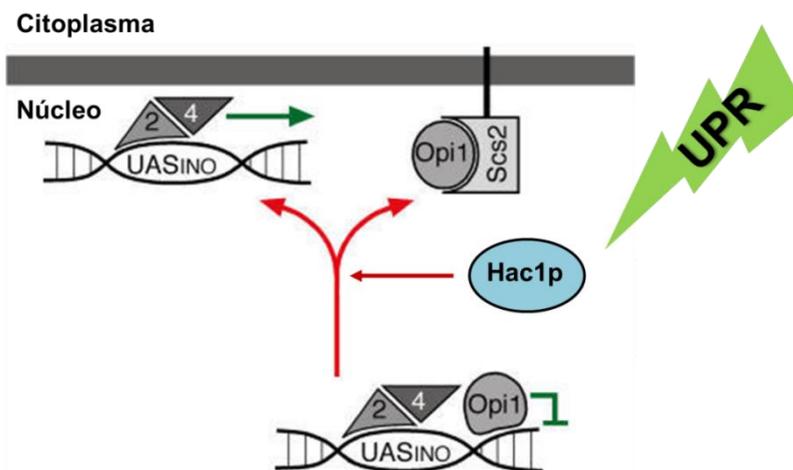


Figura I.11. Modelo de disociación de Opi1p y activación transcripcional de *INO1*. Ino2p (2) e Ino4p (4) se unen constitutivamente al promotor *INO1*. En condiciones de represión, Opi1p se asocia con la secuencia UAS_{INO} del promotor *INO1* para prevenir su activación. La síntesis de Hac1p en condiciones de activación de la UPR promueve la disociación de Opi1p de la cromatina y su unión a Scs2p en la membrana del RE/núcleo, activando la transcripción de *INO1*. Modificado de Brickner y Walter (2004) [141].

Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen estudios posteriores donde se observa que células que expresan constitutivamente Hac1p presentan una represión de *INO1* por Opi1p en presencia de inositol en el medio [143] y que *INO1* puede activarse por cambios en el metabolismo de lípidos en ausencia de una respuesta UPR funcional [144]. Por lo que es importante remarcar que la UPR no parece estar relacionada directamente en la regulación transcripcional de genes diana *Ino2p/Ino4p*, pero sí que es necesaria la UPR para que las células sobrevivan a la condición estresante de ausencia de inositol. Es decir, que la respuesta transcripcional de la ruta UPR y los genes diana *Ino2p/Ino4p* están regulados de forma separada [143, 145].

A día de hoy sigue sin resolverse el modelo por el cual Ire1p es activado bajo privación de inositol. Algunas de las posibles explicaciones que se barajan son (1) que una proteína integral de membrana o asociado a ella sienta el cambio en lípidos o metabolitos y active a Ire1p estimulando su oligomerización, (2) que una detección directa de los cambios de inositol por parte de Ire1p provoque un cambio conformacional de su dominio citoplasmático y aumente la afinidad para oligomerizar con otras proteínas Ire1p y (3) que la limitación de PI cause un retardo en la salida de proteínas del RE y por tanto una activación de la UPR. Alternativamente, el crecimiento en ausencia de inositol podría dar lugar a cambios en las propiedades biofísicas de la membrana del RE, provocando la oligomerización y activación de Ire1p [143, 146]. Aunque como hemos comentado se necesitan nuevos estudios para esclarecer las causas de la activación de Ire1p bajo limitación de inositol en la célula.

Es importante finalmente remarcar que la ruta UPR es sensible a los niveles de PI en particular, la disminución de niveles celular de otros fosfolípidos como la fosfatidilcolina (PC) no la inducen [147]. Por lo que activación es sensible a niveles generales de PI, que afectan a los niveles de síntesis de otros componentes que contienen inositol, como lípidos de glicosilfosfatidilinositol y esfingolípidos, y puede influir en los niveles de fosfoinosítidos e inositol polifosfato.

Otra condición de estrés de gran interés y que aborda la presente tesis es la relacionada con la presencia de etanol en el medio, que será revisada con detalle en el siguiente apartado.

5. Toxicidad del etanol en *S. cerevisiae*.

La eficiencia de fermentación y la tolerancia a niveles relativamente altos de etanol son rasgos que han hecho de *S. cerevisiae* la piedra angular de las actuales industrias de fermentación. Mientras la fermentación avanza y los nutrientes se van agotando, el etanol continúa acumulándose en el medio, difunde libremente a través de las membranas biológicas y genera efectos negativos en las funciones celulares. Estos efectos disminuirán la viabilidad y tasa de fermentación de las levaduras, limitando la productividad de la fermentación y generando pérdidas económicas.

El etanol, debido a su pequeño tamaño y su grupo hidroxilo, es soluble tanto en ambientes acuosos como lipídicos, permitiéndole atravesar la membrana plasmática y aumentar su fluidez y permeabilidad. El etanol además daña las mitocondrias, reduce la tasa respiratoria y niveles de ATP y provoca la formación de ROS y acetaldehído, generando daños en el DNA, peroxidación de lípidos y estrés oxidativo [83, 148, 149]. El trabajo llevado a cabo por Ma y col. (2013) [150] determinó un aumento intracelular de malondialdehído (MDA) en presencia de etanol en el medio. El MDA es uno de los principales productos de la peroxidación de la membrana plasmática y puede oxidar lípidos asociados, ácidos nucleicos, proteínas y grupos SH, fundamentales en el mantenimiento de proteínas y la membrana celular. La disminución de la función de los grupos SH generará daños en la membrana plasmática y un aumento de su permeabilidad, dando lugar a la pérdida de componentes intracelulares y una mayor entrada de etanol a la célula [151]. El etanol también inhibe la actividad de algunas enzimas glicolíticas, induce la producción de HSPs, aumenta la frecuencia de mutaciones *petite* y causa acidificación vacuolar por la entrada de protones a través de la membrana celular dañada [152-155]. Otros de los efectos directos del etanol es la inhibición exponencial no competitiva del transporte de nutrientes a través de la membrana, afectando el sistema de transporte de la glucosa, maltosa y amonio, así como a la permeasa general de aminoácidos (GAP) por la interacción entre el alcohol y las regiones hidrófobas de la membrana plasmática, que desestabilizarán, en última instancia, todas las proteínas embebidas en ella [156]. Los principales efectos del etanol en las levaduras se resumen en la tabla I.2.

Tabla I.2. Principales efectos directos del etanol sobre la fisiología de las levaduras.

Función celular	Efecto del etanol
Viabilidad celular y crecimiento	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibición del crecimiento, división celular y viabilidad [157]. - Disminución en el volumen celular [158].
Metabolismo	<ul style="list-style-type: none"> - Disminución de mRNA y niveles de proteínas [152, 159]. - Disminución en la producción de glicerol, etanol y acetato [160]. - Actividad reducida de enzimas glicolíticas. - Disociación entre la ATPasa y la cadena de transporte electrónico y aumento de la cantidad de ROS [160, 161]. - Aumento del flujo en el ciclo de Krebs [160].
Estructura celular y función de membrana	<ul style="list-style-type: none"> - Morfología vacuolar alterada y tasa de transporte vesicular reducida [162]. - Pérdida del gradiente electroquímico de membrana y fuerza protón-motriz [160, 163]. - Aumento de la fluidez de membrana y pérdida de iones celulares [164]. - Disminución del pH intracelular [155, 165]. - Inhibición de procesos de transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática [156]. - Aumento del contenido de MDA, disminución del contenido de grupos SH intracelulares [150]. - Degeneración de la mitocondria y disminución del grosor de la pared celular [150].

Muchos de los cambios inducidos por la presencia de concentraciones estresantes de etanol en las levaduras son similares a los causados por estrés térmico [166, 167], y las respuestas generadas ante ambos estreses muestran un alto paralelismo [168]. Por ejemplo, las proteínas Hsp90p y Hsp70p, inducidas por la presencia de etanol son idénticas a aquellas inducidas por calor [167].

Ambos estreses también tienen efectos similares en la inducción de las dos principales proteínas integrales de membrana, ATPasa y Hsp30p [167]. De hecho, ambos estreses ejercen un efecto sinérgico sobre la respuesta a choque térmico en las células, ya que los alcoholes median en la reducción de las temperaturas máximas y mínimas requeridas para la inducción de la respuesta a estrés en *S. cerevisiae* [169].

A continuación pasaremos a detallar algunos efectos del etanol sobre las principales dianas celulares.

5.1. Efectos del etanol sobre la estructura y función de la membrana plasmática.

La diana principal del etanol en las levaduras es, sin duda, las membranas celulares, especialmente la membrana plasmática. Las membranas celulares son estructuras anfipáticas, con una parte hidrófoba, que repele el agua, y otra hidrofílica, soluble en agua y están compuestas principalmente por una doble capa de fosfolípidos, en la cual están embebidas proteínas y esteroides. Estas bicapas delimitan los distintos compartimentos internos entre sí y entre el citoplasma. Algunos de ellos, particularmente el de la membrana interna mitocondrial, se encargan de la producción de energía, por lo que la integridad de estas membranas es crítica para muchas funciones celulares.

Aunque la membrana plasmática controla el transporte de sustancias dentro y fuera de la célula, no podrá proteger totalmente a la célula contra aquellas sustancias nocivas que difunden pasivamente al interior celular, como el etanol. El etanol es capaz de difundir libremente debido a su carácter anfipático e incorporarse sin dificultad en la bicapa lipídica, disminuyendo la interacción entre las colas de fosfolípidos a través de las fuerzas de van der Waals y aumentando su fluidez [170-172]. Gracias a estudios de anisotropía de fluorescencia [170, 173-175] y resonancia electrónica de spin [170] se ha observado una relación directa entre la fluidez de la membrana plasmática y la concentración de etanol. Este aumento en la fluidez de la membrana generará una pérdida de su integridad estructural y un aumento en su permeabilidad, propiciando el escape hacia el exterior de constituyentes intracelulares, como aminoácidos e iones [173] y perturbando la homeostasis celular. También se ha determinado la permeabilidad de la membrana en varias condiciones de estrés por etanol midiendo el flujo de captación de yoduro de propidio a través de citometría de

flujo, encontrándose una correlación entre la exposición a etanol y la permeabilidad al agente fluorescente [173, 176, 177].

El impacto del etanol sobre la integridad estructural de la membrana plasmática es clave para su función celular. Sin embargo, los cambios físicos en su estructura resultantes de la presencia de etanol en el medio no están completamente descritos. Está ampliamente aceptado que el etanol reemplaza a las moléculas de agua interfaciales al unirse su grupo OH al grupo fosfato de las cabezas lipídicas y su cola hidrófoba al núcleo hidrófobo de la membrana, creando espacios laterales entre las cabezas polares y por tanto, huecos en el núcleo hidrófobo [178]. Estos huecos son energéticamente desfavorables y el sistema minimizará la energía formando una fase interdigitada (Figura I.12), que provocará una disminución en el grosor de la membrana de más del 25% [179, 180]. El adelgazamiento de la membrana celular en la levadura debido al etanol podría llevar a una alteración en las proteínas asociadas a la membrana, y una funcionalidad de membrana comprometida, dando lugar a la inactivación celular durante la fermentación [181].

Se ha demostrado que el espesor de las membranas afectan directamente a la función de las proteínas embebidas en ella, cuya máxima actividad se da con un espesor de membrana determinado [182, 183]. Cambios en el grosor de la membrana pueden dar lugar a una exposición de residuos aminoacídicos hidrófobos en proteínas integrales de membrana dándose el fenómeno conocido como desajuste hidrófobo [181] que provocará la agregación de proteínas de membrana para minimizar la exposición de sus partes hidrófobas al ambiente acuoso [184], este desajuste hidrófobo también puede producir una inclinación en las proteínas de membrana [184].

Estudios basados en modelos de membranas compuestas por fosfatidilcolina (PC) y ergosterol expuestas a concentraciones de etanol presentes en fermentaciones vínicas han demostrado que la composición lipídica determina un efecto protector sobre la membrana al retrasar el comienzo de la fase interdigitada [180, 185].

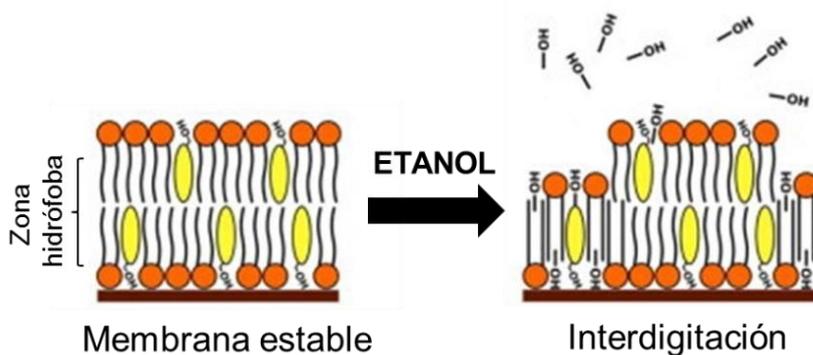


Figura I.12. Interdigitación de las membranas biológicas en respuesta a estrés por etanol. El etanol genera huecos entre las colas hidrófobas de los fosfolípidos provocando una interdigitación de las monocapas de la membrana. La formación de la fase interdigitada se induce por encima de una determinada cantidad de etanol en el medio, que dependerá de la concentración de esteroides. Los lípidos se muestran en naranja y los esteroides en elipses amarillas. Adaptado de Vanegas y col. (2012) [186].

5.2. Efectos del etanol sobre la bomba de protones de la membrana plasmática: H^+ -ATPasa.

La bomba de protones de la membrana plasmática (Pma1p) es la proteína más abundante en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* y presenta dos funciones principales; mantener la fuerza protón-motriz (necesaria para el transporte de nutrientes) y para regular el pH intracelular [187].

Los movimientos de los protones (H^+) al interior celular no están del todo caracterizados, aunque se sabe que pueden transportarse al interior celular por simporte junto con otros sustratos o cruzando la membrana pasivamente a través de la bicapa lipídica (Figura I.13) [188]. Como hemos dicho anteriormente, el etanol incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática, conduciendo a una entrada por difusión pasiva de H^+ y a un desajuste en el gradiente electroquímico de protones. A bajas concentraciones de etanol (<3% v/v), la H^+ -ATPasa es capaz de eliminar el exceso de H^+ de la célula, manteniendo la homeostasis del pH intracelular [154, 189], observándose un aumento de la actividad H^+ -ATPasa en respuesta a estrés por etanol, unido a un fuerte descenso en la disponibilidad de ATP para otros procesos que requieren energía

en la célula [154, 190]. Sin embargo, a concentraciones inhibitorias del etanol, la función de la H^+ -ATPasa se ve afectada, provocando una afluencia pasiva de H^+ dando lugar a una acidificación intracelular [155, 156, 165, 191].

Madeira y col. (2010) evaluaron el efecto del etanol sobre el movimiento de los H^+ y observó un aumento significativo de su difusión al interior celular cuanto mayor era la temperatura y la concentración de etanol, concluyendo que por encima de un umbral de temperatura y de concentración de etanol determinado, la célula es invadida por H^+ , corroborando la idea de que el efecto deletéreo del etanol se potencia a altas temperaturas. Madeira [192] y otros autores [191], atribuyen a la interdigitación de la membrana este cambio masivo en la entrada de protones en una determinada concentración de etanol.

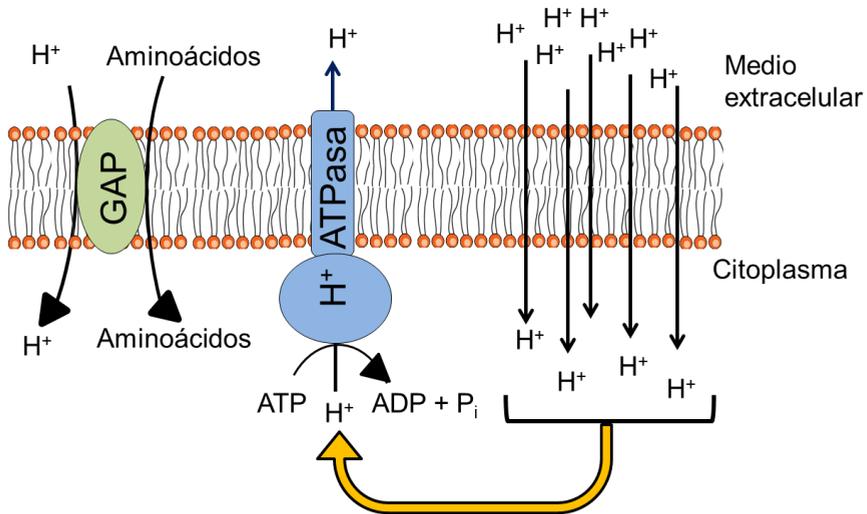


Figura I.13. Movimientos de los protones al interior celular mediante transporte simporte y difusión pasiva. La bomba de protones de la membrana plasmática (H^+ -ATPasa) regula el pH intracelular y el potencial de membrana bombeando protones al exterior.

6. Tolerancia a etanol: la respuesta de *S. cerevisiae* al estrés por etanol.

La respuesta a estrés en la levadura es una reprogramación transitoria de actividades celulares que aseguran la supervivencia en condiciones difíciles, protege los componentes celulares esenciales y permiten la reanudación de las actividades celulares “normales” durante la recuperación. La respuesta de la levadura al estrés ambiental es compleja, participan numerosos aspectos de detección celular, transducción de señales, transcripción, control postranscripcional, acumulación de protectores y aumento en la actividad de las funciones de reparación [193]. La eficiencia de estos procesos en una determinada cepa de levadura determinará su robustez y, en gran medida, su capacidad para un buen desempeño en procesos industriales. Una mejor comprensión de las consecuencias celulares del estrés por etanol y de los mecanismos de defensa relacionados será fundamental en la mejora del rendimiento de las cepas de levadura durante el estrés.

A continuación detallaremos los principales mecanismos de respuesta a estrés por etanol en *S. cerevisiae*, cuyo resumen se puede consultar al final del apartado en la tabla I.3.

6.1. Cambios en la composición de la membrana en respuesta a estrés por etanol.

Como hemos comentado anteriormente, el aumento gradual del contenido de etanol en el medio durante la fermentación puede reducir gradualmente la viabilidad celular al producir un impacto negativo en las membranas celulares. Numerosos estudios sugieren que cambios en la composición de la membrana celular pueden antagonizar el efecto del etanol al aumentar su estabilidad y aumentar la tolerancia al mismo.

6.1.1. Ácidos grasos insaturados (UFAs).

Existe una correlación ampliamente documentada entre la tolerancia a etanol y un mayor grado de insaturación en los ácidos grasos de los lípidos de la membrana [164, 176, 194-197].

La composición de UFAs en *S. cerevisiae* consiste principalmente en los ácidos monoinsaturados: ácido palmitoleico ($C_{16:1}$) y oleico ($C_{18:1}$), siendo este último el mayoritario. Ambos son producidos por la formación de un doble enlace entre los átomos C_9 - C_{10} de los ácidos palmítico y esteárico, respectivamente, a través de una sola desaturasa de membrana codificada por el gen *OLE1*, a través de una desaturación dependiente de NADH y oxígeno. En *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, *OLE1* es la única desaturasa, por lo que no se producen ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), como en *Candida*, *Pichia* y *Rhodotorula*, en los que se producen ambos. Sin embargo, *S. cerevisiae* es más resistente a estrés por etanol que las demás especies, sugiriendo un importante papel de los MUFAs en la adquisición de tolerancia a etanol.

Thomas y col. (1978) determinaron los efectos de la suplementación con ácido palmitoleico y oleico en la viabilidad celular a concentraciones letales de etanol. Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones anaerobias ya que la presencia de oxígeno es necesaria para la biosíntesis de UFAs [198, 199]. Los autores observaron que el ácido oleico suplementado era incorporado a la membrana plasmática, aumentando la viabilidad bajo estrés por etanol [200]. Con el fin de entender la relación entre los UFAs y la tolerancia a etanol en la levadura, se construyó un mutante de delección del gen *OLE1* que se suplementó con tres mono-UFAs sintéticos distintos [195], el resultado mostró que aquellas células suplementadas con ácido oleico eran más tolerantes a la presencia de etanol en el medio (5% v/v) que las crecidas con ácido vaccénico o ácido palmítico, proporcionando pruebas convincentes de que proporciones elevadas de ácidos grasos monoinsaturados de 18 carbonos, especialmente el ácido oleico, confieren tolerancia al etanol. Además, el aumento en la proporción de ácido oleico ($C_{18:1}$) observado en cultivos celulares en presencia de etanol está acompañado de una disminución en ácido palmitoleico ($C_{16:1}$), sugiriendo que el etanol aumenta la proporción en ácidos grasos insaturados de cadena más larga [197]. Chi y Arneborg (1999) observaron que las cepas de levadura más tolerantes a etanol presentaban proporciones ligeramente más altas de ácidos grasos monoinsaturados respecto a las menos tolerantes, y sugirieron también que los ácidos grasos de cadena más larga jugarían un papel destacado en la tolerancia a etanol [201]. Por otra parte, Aguilera y col. (2006) determinaron que el ácido oleico, ácido palmitoleico y el ergosterol estaban altamente correlacionados con la actividad H^+ -ATPasa y la tolerancia a etanol. Además, la diferencia en tolerancia a etanol entre cepas estaba adscrita a la capacidad de

disminuir la fluidez de la membrana y contrarrestar el efecto fluidificante del etanol, ayudando a mantener la funcionalidad de la membrana plasmática y la actividad ATPasa [60].

Sin embargo, el mecanismo de aumentar los UFAs bajo estrés por etanol puede resultar en una fluidez de membrana todavía mayor. Algunos autores sugieren que el aumento de los UFAs en respuesta a etanol se produce para antagonizar el efecto estereoquímico producido por la región hidrófila del etanol sobre las cabezas polares de los fosfolípidos y que el aumento en la longitud de las cadenas acílicas permitirá establecer interacciones más estables entre cadenas vecinas, aumentando la temperatura de transición y disminuyendo su permeabilidad. Este aumento de grosor de la capa hidrófoba de la membrana ayudará a restaurar su función de barrera protectora [202].

En vista de las observaciones anteriores, no es sorprendente que aquellas cepas tolerantes a etanol presenten elevados niveles de expresión de *OLE1* comparados con cepas no tolerantes a etanol en presencia del agente estresante [203, 204]. Aunque es importante destacar también que hay otros autores que por el contrario observaron un aumento en la represión del gen *OLE1* conforme aumentaba el tiempo tras el estrés por etanol [159, 205].

Es importante remarcar que las membranas de otros microorganismos como la bacteria etanológica *Zymomonas mobilis*, adaptada a altas concentraciones de etanol, contiene altos niveles de ácido vaccénico, mientras que *Lactobacillus homohiochii* y *L. heterohiochii*, capaces de crecer a concentraciones de etanol del 18% (v/v) sufren un aumento en la cantidad de ácidos grasos insaturados y una mayor longitud de sus cadenas acílicas (C₂₀-C₂₄) [206, 207], corroborando la importancia de los ácidos grasos insaturados en la tolerancia a etanol.

6.1.2. Ergosterol.

Bien es sabido que el ergosterol aumenta la rigidez de la membrana y retrasa la aparición de la fase interdigitada en presencia de etanol al intercalarse entre las cadenas de los ácidos grasos de los fosfolípidos y producir, probablemente, un impedimento estérico debido a su naturaleza planar y rígida [180, 185, 208, 209].

Swan y col. (1998) observaron que la suplementación con ergosterol en las fermentaciones mejoraba la viabilidad celular y la tasa de crecimiento bajo estrés

por etanol. Además el efecto del ergosterol en las membranas es específico ya que la disrupción del gen *ERG1* no influyó en la composición de ácidos grasos [210]. Por su parte, Dickey y col. (2009) observaron una correlación entre el aumento del ergosterol en la membrana y una disminución de su permeabilidad en vesículas con 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholina (DPPC) bajo estrés por etanol, probablemente por la competencia con el ergosterol por los sitios de unión dentro de la bicapa [211]. Además, como hemos citado anteriormente [60], se ha visto que la actividad de la H^+ -ATPasa correlaciona positivamente con el aumento de la cantidad de ergosterol en *S. cerevisiae* en presencia de etanol, por lo que el ergosterol podría aliviar, en parte, algunos de los efectos nocivos del etanol sobre la actividad de la H^+ -ATPasa. Sin embargo, se necesitan más evidencias directas para corroborar esta idea ya que todavía se desconoce si la presencia de ergosterol previene la acidificación intracelular resultante del estrés por etanol.

Ya que la presencia del ergosterol tiene un impacto positivo sobre el crecimiento celular bajo estrés por etanol, no es sorprendente observar la sobreexpresión de genes relacionados con su biosíntesis en cepas de sake [204, 209] y en mutantes tolerantes a etanol [212] en presencia del estresante.

Sin embargo, algunos de estos genes como *ERG25*, *ERG3* o *ERG2* se mostraron reprimidos en los estudios de Chandler y col. (2004) tras la exposición de las levaduras a un 5% (v/v) de etanol en la cepa de laboratorio PMY1.1 [159], al igual que Li y col. (2010), que encontraron reprimidos genes de biosíntesis de ergosterol durante procesos de fermentación en continuo y en fed-batch para la producción de bioetanol [213], aunque sí observaron una sobreexpresión de los genes *SUT1* y *DAN1*, relacionados con la captación de esteroides en la cepa industrial CGMCC2758 tras someterla a estrés por etanol [189]. Finalmente Rossignol y col. (2003) monitorizaron la expresión génica de la cepa industrial EC1118 durante la fermentación alcohólica en mosto sintético bajo condiciones anaerobias, registrando una represión en aquellos genes relacionados también en la biosíntesis de ergosterol. Según los autores, el ergosterol suplementado al medio junto a las condiciones anaerobias del cultivo previno la síntesis de ergosterol. Sin embargo, en condiciones industriales, con mostos naturales que pueden tener un bajo contenido de esteroides, la capacidad de sintetizar ergosterol puede ser esencial para proteger la levadura contra el estrés por etanol [214].

En resumen, se considera que el ergosterol contrarresta, al menos, algunos de los efectos tóxicos del etanol mediante el aumento de la estabilidad de la membrana y prevenir así la interdigitación. En cepas muy tolerantes al etanol, como las de sake, los genes de síntesis de ergosterol están sobreexpresados, o por lo menos, no reprimidos, permitiendo la generación de membranas con mayor contenido en ergosterol. Estas observaciones pueden explicar por qué la suplementación de ergosterol en medios de crecimiento aumenta la capacidad de las células para tolerar mayores concentraciones de etanol [215].

6.2. Aminoácidos.

La presencia de ciertos aminoácidos en el medio puede ayudar a la célula a hacer frente al estrés por etanol. Algunos investigadores han observado que cuando las levaduras son expuestas a un 20% (v/v) de etanol durante 9 horas a 30°C, todas mueren. Sin embargo, un 57% de las células pueden permanecer viables si el medio contiene tres aminoácidos: isoleucina, metionina y fenilalanina, que se incorporarán a la membrana plasmática y contrarrestarán la fluidez otorgada por el etanol [216]. De forma similar, la L-prolina, el principal aminoácido libre en los zumos y bebidas alcohólicas fermentadas, como el vino o la cerveza, parece ser un aliado eficaz en la protección de las células contra congelación, desecación y estrés oxidativo [217, 218] a través del aumento en la estabilidad de las proteínas y la membrana e inhibiendo la agregación de proteínas en ambientes con baja actividad de agua o alta temperatura [219]. Takagi y col. (2005) confirmaron el aumento en la viabilidad celular de cepas acumuladoras de L-prolina (mutantes para la prolina oxidasa *PUT1*) con respecto a su cepa parental bajo estrés por etanol [220]. Sin embargo, años más tarde observaría como el aumento en los niveles de prolina intracelular tras la exposición de las células a un 9% (v/v) de etanol no se debía a la sobreexpresión de genes relacionados con su biosíntesis, como *PRO1*, *PRO2* y *PRO3*, sino a la inducción de la permeasa de prolina de alta afinidad *PUT4p*, en cuyo promotor se encuentran lugares *STRE* para la unión de *Msn2/4p* [221]. Es importante destacar que hoy en día sigue sin esclarecerse la forma en que la L-prolina interactúa con los fosfolípidos de la membrana y las proteínas para ejercer su acción defensiva y que una sobreacumulación intracelular se asocia a un retraso en el crecimiento de la levadura en presencia de etanol [222].

Además de la prolina, el triptófano es otro aminoácido que contribuye a la tolerancia al etanol, la delección en alguno de los genes de biosíntesis de

triptófano (*TRP1*, *TRP2*, *TRP3*, *TRP4* y *TRP5*) dará lugar a respuestas sensibles a etanol [59, 223-225] y su sobreexpresión se ha observado en levaduras cerveceras en comparación con las cepas de laboratorio [224].

Tanto la suplementación de triptófano en el medio de cultivo como la sobreexpresión de cualquiera de sus genes de biosíntesis o la permeasa de triptófano (*TAT2*) provocarán en la levadura un aumento en la tolerancia a etanol. Aunque el papel de la biosíntesis del triptófano en la mejora de la tolerancia al etanol no está claro, algunos estudios sugieren que la sobreexpresión de aminoácidos complementaría el daño causado por el etanol a los transportadores de aminoácidos de membrana [225, 226].

6.3. Papel de la vacuola en la respuesta a estrés por etanol.

Como mencionamos anteriormente, el etanol provoca una entrada masiva de protones al interior celular, provocando su acidificación y un desajuste en el gradiente electroquímico de protones. Las vacuolas de las levaduras y los lisosomas de mamíferos son los orgánulos celulares más ácidos, cuyo pH varía entre <5-6,5 dependiendo de las condiciones de crecimiento. La acidificación vacuolar es llevada a cabo por una bomba de protones, la H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa), que acopla la hidrólisis de ATP con el transporte de H^+ desde el citosol a la vacuola (Figura I.14), y es el mayor contribuidor en la regulación del pH en los orgánulos, específicamente entre el citosol y el lumen vacuolar [227-229].

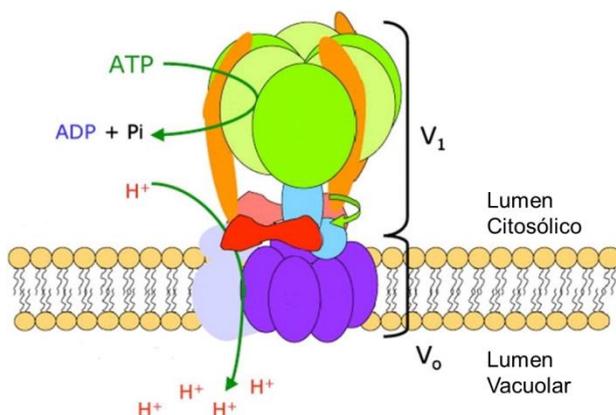


Figura I.14. H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa). La V-ATPasa es una bomba de protones compuesta de un sector de unión a membrana (V_0) y un sector citosólico (V_1). La hidrólisis de ATP en el sector citosólico promueve la traslocación de protones al interior de la vacuola a través del sector V_0 . Adaptado de Li y Kane (2009) [230].

La translocación de H^+ es considerada como una respuesta de tolerancia al etanol y está respaldada por ensayos de delección de genes relacionados con el complejo V-ATPasa. La delección de 14 genes estructurales de la V-ATPasa, incluyendo *VMA1*, *VMA2*, *VMA4*, *VMA5*, *VMA6*, *VMA8*, *VMA9*, *VMA10*, *VMA11*, *VMA13*, *VMA16*, *VPH1* y *CUP5* mostraron un fenotipo sensible a la presencia de etanol en el medio respecto al parental [59, 223, 225, 231, 232].

Dado que el estrés por etanol afecta la H^+ -ATPasa de membrana, es posible que la célula intente controlar el pH intracelular utilizando la vacuola. Posiblemente la V-ATPasa compense la disminución en el pH intracelular causado por la toxicidad del etanol. Además esto es particularmente relevante en las fermentaciones con alta concentración de azúcares (30% p/v), donde la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática está transitoriamente inhibida [233]. Teixeira y col. (2009) determinó además que el pH vacuolar (pH_v) disminuye de manera dependiente de dosis en células expuestas durante una hora a concentraciones de etanol de 6 y 8% (v/v) [231]. Es remarcable que a pesar de la importancia de la V-ATPasa en la tolerancia a etanol no se haya observado la sobreexpresión de genes relacionados con su biosíntesis tras un choque por etanol o durante la fermentación en distintos estudios transcriptómicos [159, 204, 212, 224, 234-238].

El estrés por etanol además, induce cambios en la morfología vacuolar; la vacuola pasará de vesículas segregadas (vacuolas fragmentadas) a un único gran orgánulo [150, 162, 230, 239]. Esta maquinaria de regulación en la morfología vacuolar está conservada entre las cepas de laboratorio, las de sake y las vónicas [239]. Aunque todavía se desconoce si este cambio es un efecto directo del etanol, si se ha visto que una vez eliminado el etanol del medio la vacuola tiende a segregarse, aunque el tiempo de recuperación es considerablemente largo [162] ya que se necesita una eliminación total del etanol de la bicapa lipídica de la membrana vacuolar.

6.4. Trehalosa.

La trehalosa es un disacárido producido por *S. cerevisiae* como carbohidrato de reserva. Sin embargo, cuando la levadura está expuesta a estrés osmótico, térmico, oxidativo o por etanol, se induce su acumulación intracelular [240-242], pudiendo representar más del 25% del peso seco de la célula [96]. Las células incapaces de acumular trehalosa presentan un crecimiento retardado en presencia de etanol [118, 221, 243]. En presencia de concentraciones subletales de etanol se ha observado la sobreexpresión de genes relacionados con su síntesis, incluyendo *TPS1*, *TPS2*, *PGM2* y *UGP1* [118, 148, 159, 244], cuyos promotores contienen una o más copias de elementos STRE, dianas de los factores de transcripción generales Msn2/4p [245].

Sin embargo, el papel de la trehalosa en la tolerancia a etanol sigue siendo controvertido, con algunos estudios que le confieren un efecto positivo sobre la tolerancia a etanol [246-248] y otros que aseguran que su presencia no tiene impacto en la tolerancia al estrés [248, 249] [223]. Kubota y col. (2004) encontraron un fenotipo sensible en los mutantes *TPS1* y *TPS2* a un 11% de etanol, pero no al 8% en la cepa de laboratorio W303 [59]. La pérdida de consenso entre las investigaciones puede ser debida a la diferencia en el fondo genético entre las cepas utilizadas. Los experimentos que comparan los niveles de trehalosa y la correspondiente tolerancia a etanol a través de cepas distintas son incapaces de distinguir los efectos de la trehalosa de aquellos intrínsecos de la cepa que ayudan a hacer frente al etanol, como las HSPs ó diferencias de composición en la membrana plasmática; la influencia de estos factores sobre la tolerancia a etanol variará de cepa a cepa. Bandara y col. (2009) arrojó algo de luz sobre el problema observando que la trehalosa juega un papel importante en la tolerancia a etanol solamente a concentraciones letales de etanol (10-18%), no

subletales, y que diferencias en el contenido de trehalosa intracelular del 20-40% no proporcionaron ninguna ventaja en las células incubadas en presencia de concentraciones subletales de etanol. Sin embargo, en concentraciones letales, la tasa de mortalidad en las cepas que contienen mayor concentración intracelular de trehalosa disminuyó [250]. Por lo tanto, la concentración de etanol parece influir en el impacto de la trehalosa sobre la tolerancia a etanol.

6.5. Proteínas asociadas con tolerancia a etanol.

Las HSPs son las proteínas protectoras más comunes, con función similar a la trehalosa. Bajo condiciones estresantes, las HSPs pueden mediar el correcto plegamiento de otras proteínas para prevenir daños futuros y reparar el daño intracelular [251]. Actualmente, la relación entre las HSPs y la respuesta a estrés térmico ha sido ampliamente investigada, aunque su papel exacto en la tolerancia a etanol sigue sin esclarecerse.

Inicialmente, Watson y Cavicchioli (1983) mostraron que un pretratamiento térmico de las levaduras, llevando consigo un aumento de las HSPs, daba lugar a aumento significativo de la tolerancia a etanol, implicando una relación entre la inducción de las HSPs y la tolerancia a este estrés [252]. Años más tarde, Alexandre y col. (2001) mediante el análisis de la expresión global en *S. cerevisiae* revelaron una expresión entre 4-20 veces mayor en más de 14 miembros HSPs en presencia de etanol [148], esta sobreexpresión de HSPs en presencia de etanol puede verse en otros trabajos posteriores [159, 212, 253]. Estudios de mutantes en levadura indicaron que a pesar de la gran cantidad de genes HSPs sobreexpresados durante estrés por etanol solamente los genes *HSP12*, *HSP30*, *HSP26* y *HSP104* conferían un fenotipo sensible en la cepa bajo el estrés [225, 244]. *HSP12p* es una proteína asociada a membrana que aumenta su integridad frente a la desecación y el etanol mediante la unión a moléculas de agua e interacción con las proteínas de membrana y glicolípidos [254]. Sales y col. (2000) encontraron que el mutante de delección $\Delta hsp12$ presentaba una tasa de crecimiento menor respecto a la cepa salvaje tras 24 horas de crecimiento bajo un 10% de etanol y una inhibición completa del crecimiento al 12% [254]. Por otra parte, Sánchez y col. (1992) demostraron la importancia de la *HSP104p* al observar que la cepa *W303a* $\Delta hsp104$ pretratada con un 17-19% de etanol moría 100 veces más rápido que la cepa silvestre [255]. Piper y col. (1997) obtuvieron resultados similares al mutar el gen *HSP30* y observar una disminución en el rendimiento de la biomasa y un aumento en el

tiempo de la adaptación en presencia de un 10% de etanol, además de demostrar que la HSP30p puede disminuir la activación por estrés de la H⁺-ATPasa, limitando un consumo excesivo de ATP durante un estrés prolongado [256]. Otros genes que codifican chaperonas como *SSA1*, *SSA2*, *SSA3*, *SSA4* y *APJ1* también se sobreexpresan en presencia de altos niveles de etanol.

Aunque existan estudios que impliquen la sobreexpresión de genes *HSP* bajo estrés por etanol, Izawa y col. (2008) observaron que el nivel de proteína no es lo suficientemente elevado respecto a su expresión en presencia de etanol, sugiriendo que el etanol reduce la eficiencia de la exportación nuclear de los mRNA de las HSPs, causando retención nuclear en la mayoría de los transcritos, a pesar de que su transcripción se encuentre activa [257]. Los RNAs mensajeros de las HSPs se encuentran retenidos en el núcleo bajo estrés por etanol a causa de una hiperadenilación en su extremo 3'. Izawa (2010) sugiere que estas pruebas podrían indicar que la activación transcripcional inducida por etanol no siempre está regulada intencionadamente, sino que puede ser una respuesta no específica al estrés [258].

6.6. Inositol.

El inositol actúa como el precursor de fosfolípidos que contienen inositol, ésteres de inositol y especies fosforiladas de inositol, que juegan un papel central en la integridad de la membrana, señalización celular y tráfico vesicular.

El fosfatidilinositol (PI), cuya estructura se representa en la figura I.15, se sintetiza a partir del CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) y el inositol, por la acción de la PI sintasa (Pis1p), siendo el inositol uno de los factores reguladores clave en la biosíntesis del PI [259]. Se ha demostrado que el PI influye positivamente en la tolerancia a etanol. Por ejemplo, Chi y col. (1999) demostraron que la adición de inositol en el medio aumentó los niveles de PI a expensas de la fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), que disminuyeron, y que las células con alto contenido en PI morían más lentamente tras someterlas a un 18% de etanol que aquellas con menor contenido en PI. Además acumularon y produjeron etanol más rápidamente que estas últimas [260]. Estas observaciones fueron las primeras en reportar la importancia del PI en la producción y tolerancia al etanol ya que hasta ese momento solamente se consideraba a la PC como fosfolípido clave en la tolerancia a etanol [261]. Los autores sugirieron que altas concentraciones de PI podrían proteger la integridad de las proteínas de

membrana, incluyendo la H^+ -ATPasa ya que la conformación de las proteínas de membrana dependen de la estructura lipídica.

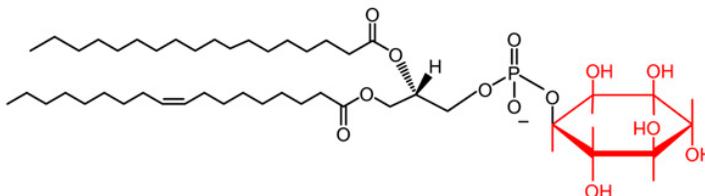


Figura I.15. Estructura del fosfatidilinositol. La región hidrófila (inositol) anclada a la estructura básica del fosfolípido se muestra en rojo. Los cuatro ácidos grasos más frecuentemente esterificados a la columna de glicerofosfato son el ácido palmítico ($C_{16:0}$), palmitoleico ($C_{16:1}$), esteárico ($C_{18:0}$) y oleico ($C_{18:1}$). Las cantidades relativas de fosfolípidos, así como la composición de las cadenas acíclicas variarán dependiendo de la cepa y la condición de crecimiento.

La biosíntesis de PI requiere la expresión de *INO1*, que codifica la inositol-3-fosfato sintasa. Análisis adicionales llevadas a cabo por Furukawa y col. (2004) en cepas de sake suplementadas con bajas (L) y altas (H) concentraciones de inositol revelaron que las células L presentaban menor viabilidad, una menor extrusión de H^+ por parte de la ATPasa y liberaban más rápidamente componentes intracelulares (nucleótidos, fosfato y potasio) que las células H, concluyendo que la capacidad del inositol para mejorar la viabilidad celular puede ser debida a una disminución en la permeabilidad de la membrana. Los autores además muestran como la disminución por falta de inositol en la actividad de la H^+ -ATPasa se debe a la reducción de glicerofosfolípidos de inositol, como el PI, en el ambiente lipídico que rodea a la proteína. Además, la disrupción de *INO1*, aumentó la sensibilidad al etanol [262].

El aumento de la concentración intracelular de inositol a partir de cepas mutantes del gen *OPI1*, que codifica un factor regulador negativo del gen *INO1*, en combinación con un suplemento exógeno de inositol también generó mayor tolerancia a etanol (18%) en comparación con la cepa control suplementada (15%) [263]. Aunque la suplementación de inositol sin adición de etanol originó una disminución en la tasa de crecimiento de la cepa mutante, debido probablemente a la toxicidad por sobreacumulación en la célula.

Tabla I.3. Factores relacionados con la tolerancia al etanol en *S. cerevisiae* y sus funciones en la célula durante estrés por etanol.

Factores	Función	Referencia
Ácidos grasos insaturados	-Aumento de la estabilidad de la membrana y antagonizar en efecto fluidificante del etanol	[164, 176, 194, 197, 264]
Alargamiento en la cadena de AG	-Aumento en grosor y disminución de la permeabilidad en la membrana plasmática	[197, 201]
Ergosterol	-Aumento en la rigidez de la membrana	[59, 225, 265]
Aminoácidos	-Aumento en la rigidez de la membrana. -Protección frente estrés oxidativo y baja actividad de agua. -Complementación del daño a los transportadores de aminoácidos en la membrana.	[216, 221, 224, 225, 266]
Inositol	-Activación H ⁺ -ATPasa. -Disminución de la permeabilidad de membrana.	[260, 262, 263]
H ⁺ -ATPasa	-Extrusión de H ⁺ al exterior celular y mantenimiento del pH	[60, 155, 189]
Trehalosa	-Estabilización de membrana plasmática y de proteínas desplegadas. -Protección frente a la inhibición de la endocitosis.	[250, 267]
HSP	-Estabilización de membrana. -Mantenimiento energético. -Reparación proteica.	[167, 254, 255]
V-ATPasa	-Mantenimiento del pH intracelular.	[59, 225, 227]

7. Factores de transcripción y elementos de respuesta a estrés asociados a estrés por etanol.

Se ha observado que una gran parte de los genes sobreexpresados bajo estrés por etanol comparten motivos de unión para los factores de transcripción Msn2p, Msn4p, Yap1p y Hsf1 en sus promotores [205, 268].

Ma y Liu (2010) analizaron los promotores de alrededor de 200 genes sobreexpresados bajo estrés por etanol en varios trabajos de transcriptómica y observaron que casi un 30% de ellos estaban regulados por los tres factores de transcripción (Figura I.16). El mutante de delección de *HSF1* reprime la expresión de genes diana inducidos por etanol [269] y el factor de transcripción Msn2p está aceptado como regulador positivo de *HSP12* y muchos genes *HSP* para mejorar la tolerancia a etanol [270, 271], por lo que su sobreexpresión aumenta la tolerancia a etanol [272]. Además, una mutación doble *msn2/msn4* provoca una hipersensibilidad a etanol [74]. Ma y Liu (2010) observaron además un aumento en la expresión del gen *MSN4* a lo largo del tiempo distinta a *MSN2*, *HSF1* y *YAP1*, sugiriendo un papel clave de Msn4p en la respuesta dinámica a la tolerancia a etanol distinta a Msn2p [205].

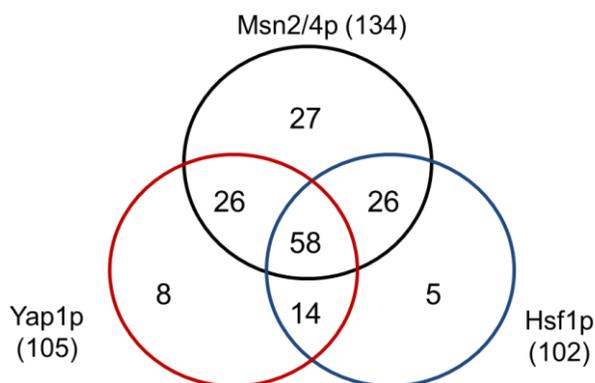


Figura I.16. Diagrama de Venn mostrando factores de transcripción compartidos entre distintos genes sobreexpresados bajo estrés por etanol. Los datos han sido tomados de distintos estudios transcriptómicos [118, 148, 159, 205, 234, 238].

Como comentábamos anteriormente, el estrés oxidativo es un efecto más del estrés por etanol. Yap1p es un factor de transcripción clave para la tolerancia a estrés oxidativo [112, 113], uniéndose a los motivos TTAATMA y TTAGTMAGC de los promotores de genes inducidos por etanol. Bleoblanca y col. (2013) observaron como el estrés por etanol y el oxidativo producían una rápida acumulación de Yap1p en el núcleo en cepas de laboratorio y cerveceras, activando las defensas antioxidantes [273]. Aunque las funciones de Yap1p en la tolerancia a etanol no están por ahora bien documentadas.

Aunque Hsf1p se aisló originariamente como un factor de transcripción de choque térmico, responde a una gran variedad de condiciones estresantes, incluyendo altas temperaturas, estrés oxidativo, deficiencia de glucosa y estrés por etanol [274, 275]. Hsf1p se encuentra constitutivamente en el núcleo, donde está unido a los elementos de choque térmico (HSE), y juega un papel esencial en la proliferación celular, incluso en condiciones normales de crecimiento. En respuesta a estrés, sin embargo, Hsf1p se activa mediante un cambio conformacional e induce la transcripción de cientos de genes diana relacionados con el plegamiento de proteínas, detoxificación, generación de energía, metabolismo de carbohidratos y organización de la pared celular [276]. Mutantes de *HSF1* muestran, por lo tanto, fenotipos pleiotrópicos y sensibilidad a la temperatura. Existen evidencias de que el etanol activa a Hsf1p [277] y además, se ha observado que un mutante de delección *HSF1* reprime genes diana inducidos normalmente por etanol [269]. Además de las HSPs, Hsf1p también puede regular la expresión de otros genes de estrés, como la oxidorreductina de retículo endoplasmático *ERO1*, sobreexpresada por Hsf1p bajo estrés por etanol [269].

8. Respuestas moleculares de señalización ante estrés por etanol en *S. cerevisiae*.

Aunque la respuesta de la levadura a estrés por etanol está asociado con mecanismos de respuesta general a estrés, estudios en esta área han identificado nuevas respuestas específicas a etanol [278, 279]. Takemura y col. (2004) observaron que el estrés por etanol, así como el estrés por calor, provoca una exportación selectiva de mRNA con el fin de adaptarse rápidamente al estrés [278]. Bajo estrés por calor, los transcritos inducidos por estrés como los RNAs mensajeros de las HSPs se exportan eficientemente al citosol, mientras que la mayoría de mRNA poliadenilado se acumula en el núcleo, dando prioridad a la traducción de estas proteínas y, por tanto, una producción urgente de HSPs. En presencia de concentraciones mayores del 6% de etanol, la mayoría de mRNA poliadenilado también quedó retenido en el núcleo.

Los autores encontraron que la localización nuclear de la helicasa de RNA Rat8p, que facilita la liberación de mRNA poliadenilado al citoplasma y que se encuentra en la cara citoplasmática de la envuelta nuclear, cambió rápida y reversiblemente en respuesta a estrés por etanol, acumulándose en el núcleo y reteniendo el mRNA poliadenilado en su interior. Esta acumulación de Rat8p en el núcleo no se observa tras la exposición a choque térmico o estrés osmótico, sugiriendo que el cambio en la localización de Rat8p es una respuesta específica del etanol para regular la exportación de transcritos al citoplasma [278].

En otro estudio, Betz y col. (2004) identificaron una proteína, Asr1p (*Alcohol Sensitive Ring/PHD finger 1 protein*), que en condiciones normales viaja de forma constitutiva entre el núcleo y el citoplasma, pero que se acumula en el núcleo exclusivamente bajo estrés por etanol [279] y proponen que Asr1p puede estar funcionalmente unido a un sistema de señalización que percibe cambios en la fluidez de la membrana, aunque no actuaría como factor de transcripción ya que no presenta dominios de unión a DNA y su acumulación nuclear se debería a una inhibición de la exportación nuclear por homo o heterodimerización, que ocultaría las señales de exportación de Asr1p. Izawa y col. (2006) confirmaron la localización nuclear de Asr1p durante estrés por etanol, pero no pudieron detectar los efectos de una deficiencia en *ASR1* en la vinificación y en la producción de sake, ni la hipersensibilidad en mutantes *ASR1* al etanol, concluyendo que Asr1p no es importante en el estrés por etanol y sugiriendo que

la acumulación de Asr1p en el núcleo se debe a un fallo en la maquinaria de exportación nuclear bajo condiciones de estrés [280].

Recientes descubrimientos de Daulny y col. (2008) demostraron que Asr1p es una ligasa de ubiquitina que se une directamente a la RNA polimerasa II y ubiquitina dos subunidades de la enzima, Rpb1 y Rpb2 provocando la liberación del heterodímero Rpb4/Rpb7 e inactivando su función. Estos datos apoyan la importancia de la ubiquitinación en la maquinaria transcripcional y por ende, la actividad génica, pero no relacionan a Asr1p con la tolerancia a etanol, necesiéndose más estudios sobre la relación exacta entre la función de Asr1p y la respuesta a estrés por etanol [281].

9. Genómica funcional y análisis del transcriptoma de la respuesta a etanol en *S. cerevisiae*.

La aparición de la tecnología de matriz génica y la disponibilidad de una colección de mutantes de delección han permitido hacer estudios globales sobre la respuesta celular a distintos estímulos externos [79]. Los siguientes apartados son un resumen de aquellos estudios llevados a cabo utilizando esta tecnología y sus respectivos resultados en el campo de la respuesta a etanol.

9.1 Análisis de genómica funcional en la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*.

La finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* en 1996 [17], dio lugar al desarrollo de colecciones de mutantes de delección en las cepas BY4743 (diploide homocigota) y en la BY4741 (haploide), ambas descendientes de la cepa de laboratorio S288C. Estas colecciones de mutantes de delección se construyeron reemplazando las distintas pautas de lectura abiertas (ORFs) con un casete portador del gen de resistencia a la geneticina (KanMX). Estas colecciones permitieron la identificación de genes clave en la tolerancia a etanol. En la tabla I.4 se muestran aquellos genes más frecuentes cuya delección otorgaban fenotipos sensibles tras un choque por etanol en varios estudios [59, 223, 225, 231, 232, 244, 282-284]. Los 897 genes observados a lo largo de los trabajos citados se encuentran en la tabla suplementaria S1.

Tabla I.4. Genes identificados requeridos para la supervivencia bajo estrés por etanol. La tabla muestra los genes más frecuentes asociados a tolerancia a etanol, los recuadros en rojo muestran en que trabajos aparecen. La función celular de cada uno de ellos se encuentra detallada en la tabla suplementaria S2.

GEN	Kubota y col. (2004)	Fujita y col. (2006)	Van Voorst y col. (2006)	Kumar y col. (2008)	Yoshikawa y col. (2008)	Auesukaree y col. (2009)	Teixeira y col. (2009)
ARD1							
ATP15							
BEM2							
BRO1							
BUB1							
BUD27							
CUP5							
CWH36							
DOA4							
GCN5							
GIM4							
GIM5							
PAC10							
PEP3							
RAD27							
RPB9							
SEC66							
SIT4							
SLG1							
SMI1							
SNF7							
SNF8							
SOD2							
SRB2							
SSD1							
STP22							
THP2							
TOM5							
TPD3							
TPS1							
TRS33							
UME6							
VMA21							
VMA22							
VMA6							
VMA8							
VPS20							
VPS34							
VPS36							
VPS4							
YKL037							
W							

Los primeros estudios de genómica funcional en la tolerancia a etanol se remontan a los estudios de Takahashi y col. (2001) a partir de una colección de 7000 mutantes generados por transposones en la cepa YPH499 [284]. Los autores seleccionaron cinco mutantes que no crecían en presencia de un 6% de etanol y que correspondían a mutaciones en los genes: *BEM2*, *PAT1*, *ROM2*, *VPS34* y *ADA2*. Es importante destacar que el gen *BEM2* también resultó ser un gen esencial en la tolerancia a etanol en otros trabajos sucesivos en los cuales se utilizaron cepas distintas [59, 223, 225].

En la tabla I.5 se resumen las principales funciones de estos cinco genes. Los autores admitieron que el número de genes relacionados con la tolerancia a etanol debía ser mayor pero su estudio requeriría un análisis de por lo menos 35000 mutantes para cubrir todo el genoma de la levadura.

Tabla I.5. Genes observados en los estudios de Takahashi y col. (2001) cuya mutación provoca sensibilidad a etanol.

Gen	Función
<i>BEM2</i>	Organización del citoesqueleto, y morfogénesis celular. Requerida para la aparición de la yema.
<i>PAT1</i>	Proteína asociada a la topoisomerasa II, requerido para la transmisión de cromosomas.
<i>ROM2</i>	Factor de intercambio GDP/GTP para Rho1p yRho2p
<i>VPS34</i>	Síntesis del fosfatidilinositol 3-fosfato. Relacionada con la localización de proteínas vacuolares, endocitosis y formación de cuerpos multivesiculares.
<i>ADA2</i>	Acetilación de histonas.

De forma alternativa, también se han hecho estudios de sensibilidad a etanol a partir de las colecciones de mutantes de la cepa diploide BY4743 y sus derivados haploides BY4741 y BY4742 [59, 223, 225, 231, 232, 244, 282, 283]. Kubota y col. (2004) identificaron un total de 256 genes esenciales para la tolerancia a etanol en la cepa haploide BY4741 bajo un 11% de etanol. Entre ellos se encontraban genes relacionados con la biosíntesis, ciclo celular, citoesqueleto, mitocondria, morfogénesis, unión a ácidos nucleicos, actividad proteasa, vacuola, transducción de señales, transcripción y transporte. Los

autores además observaron como el etanol es capaz de perturbar el citoesqueleto de F-actina y retrasar ciclo celular, aumentando en el tamaño celular [59].

Fujita y col. (2006), a partir de colección de mutantes en la cepa diploide BY4743, detectaron 137 genes cuya delección confería sensibilidad a un 10% de etanol. Aquellos genes relacionados con la V-ATPasa eran los mayoritarios, poniendo de manifiesto una vez la importancia del mantenimiento del pH intracelular en presencia de etanol [223]. Más recientemente, Auesukaree y col. (2009) utilizaron la colección de mutantes en la cepa haploide BY4742 bajo un 10% de etanol e identificaron 95 genes relacionados con la V-ATPasa, biogénesis del citoesqueleto e integridad de la pared celular cuya mutación conferían sensibilidad al etanol. Además también observaron un solapamiento parcial entre aquellos genes necesarios para la tolerancia a etanol y aquellos requeridos para la termotolerancia [282].

Es importante remarcar que la variación en el número y genes identificados cuya mutación confiere sensibilidad al etanol es debida probablemente a diferencias en las cepas y la concentración de etanol utilizada en los distintos estudios, así como la propia variación introducida en los estudios de goteo en placa.

Van Voorst y col. (2006) propusieron que el mecanismo de la sensibilidad a etanol podría ser también dependiente de la concentración, al observar que ninguno de los 22 genes mitocondriales señalados por Kubota y col. (2004) como esenciales para el crecimiento bajo un 11% de etanol generaban un fenotipo sensible bajo un 6% de etanol [232].

Una alternativa a este tipo de estudio es un análisis cuantitativo de alta resolución midiendo la tasa de crecimiento para cada mutante en presencia y ausencia de etanol en un medio líquido. Yoshikawa y col. (2009) observaron 446 genes esenciales para la tolerancia a etanol, siendo los mutantes *LDB19*, *MEH1*, *PRO2*, relacionados con la endocitosis, acidificación vacuolar y síntesis de prolina, respectivamente, los más sensibles al etanol [225].

A pesar de las diferencias en los resultados, es evidente la importancia en el control transcripcional, remodelación de la pared celular, biosíntesis de aminoácidos, acidificación de la vacuola y función mitocondrial en la tolerancia a etanol, así como la endocitosis y transporte vacuolar en la renovación y ubicación

de proteínas transmembrana y la función peroxisomal en la lucha contra ROS y en la síntesis y degradación de los fosfolípidos de membrana. En la tabla I.6 se presenta una comparación entre las distintas categorías funcionales obtenidas en los distintos estudios mencionados.

Tabla I.6. Clasificación funcional de los genes asociados a tolerancia a etanol a lo largo de los estudios descritos en la tabla I.4.

Clasificación funcional	Referencia
Transporte vacuolar/lisosomal	[59, 223, 225, 232] [231, 282]
Señalización, clasificación y translocación de proteínas	[59, 225, 231, 232, 282]
Homeostasis de protones	[59, 223, 283] [282] [231]
Vacuola o lisosoma	[59, 231]
Transporte de ATPasas	[59, 223, 231, 282]
Biosíntesis de triptófano	[59]
Unión a proteínas	[59]
Elongación de la transcripción	[223]
Transporte de cationes (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ ...)	[223, 231, 282]
Transporte de electrones	[223]
Pared celular	[232]
Modificación por acetilación, desacetilación	[232]
Mitocondria	[225]
Proteínas ribosomales	[225]
Ensamblaje de complejos proteicos	[225]
Citoesqueleto de actina	[231, 282]
Peroxisoma	[231]
Actividades de transcripción general	[231]
Endocitosis	[231]
Regulación de compuestos de carbono y metabolismos de carbohidratos	[231]

Hasta ahora hemos comentado aquellos trabajos en los cuales se estudiaba la sensibilidad de la levadura frente a un choque por etanol dependiendo de la delección de un gen concreto. Sin embargo, recientemente se ha publicado un estudio llevado a cabo por Walker y col. (2014) en el cual a partir de fermentaciones experimentales a escala de laboratorio con mutantes de delección de la cepa BY4743, determinaron 93 genes esenciales para la fermentación, a los que se refieren como “Fermentoma” [285]. Estos 93 genes se compararon con dos bases de datos distintas, una realizada a partir de la compilación de genes relevantes para la fermentación provenientes de estudios previos y la otra proveniente de la SGD (*Saccharomyces* Genome Database). Cabe destacar que de los 92 genes que conforman el fermentoma, 44 coincidieron con genes de tolerancia a etanol en estudios previos [223, 231, 232, 282] relacionados mayoritariamente con acidificación vacuolar y síntesis de trehalosa, proponiendo una vez más la función vacuolar como mecanismo clave de la respuesta celular durante las condiciones de estrés impuestas durante la fermentación (pH ácido, alta osmolaridad, aumento en la cantidad de etanol y elevada temperatura).

9.2. Expresión génica global bajo condiciones de estrés por etanol.

A lo largo de la pasada década, numerosos estudios transcriptómicos con *microarrays* se han llevado a cabo para comprender un poco más los mecanismos de respuesta al estrés por etanol en la levadura, comparando directamente los transcriptomas de levaduras estresadas y no estresadas durante una exposición subletal de etanol en diferentes puntos temporales o a lo largo de la fermentación (Tabla I.7).

Tabla I.7. Estudios sobre expresión génica mediante *microarrays* relacionados con tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*. ND: no definido.

Cepa	Origen	Condición del estudio	Etanol (% v/v)	Toma de muestra	Ref
S288C	Laboratorio	YPD, 28°C	7	0,5 h	[148]
S288C AR5	Laboratorio Tequila	YPD, 30°C ATJ, 30°C	7	0,5 h	[286]
FY834 A1	Laboratorio Laboratorio	YPD, 30°C	10	Fase exponencial	[238]
CGMCC275 8 2758-1 2758-2	ND	YPD, 30°C	3; 7	Fase exponencial	[189]
W303-1A	Laboratorio	YPD, 30°C	6,5	1 h	[236]
CAT-1 PE-2	Industrial	Mosto azúcar de caña, 33°C	0	0; 3 y 9 h	[287]
FY834 IFO2347	Laboratorio Sake	YPD, 30°C	5	0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3 h	[224]
PMY1.1	Laboratorio	YNB, 30°C	5	1; 3 h	[159]
EC1118	Vínica	Mosto sintético, 24°C	0	Etapas 1-6	[235]
K9 X2180-1A	Sake Laboratorio	YPD, 30°C	0	Fase exponencial	[204]
VIN13	Vínica	Mosto de uva	0	24; 48; 60; 120; 340 h	[234]
W303-1A CM1 SM1	Laboratorio	YPD, 30°C	6,5	1 h	[212]
Kyokai n° 701	Sake	Moromi, 15°C	0	2; 3; 4; 5; 6; 8; 11; 14; 17 días	[288]
S288C	Laboratorio	YPD, 25°C	9	2 h	[253]
S288C YPS163 M22	Laboratorio Roble Bodega	YPD	5	0,15; 0,5; 0,75 y 1 h	[289]

Sus resultados muestran una considerable superposición entre los datos, con un gran número de genes que se comportan de manera similar frente al agente estresante. La tabla I.8 muestra los genes sobreexpresados más frecuentes en aquellos trabajos en los que la levadura era sometida a un choque por etanol. Los restantes genes se encuentran recopilados en la tabla S3.

Aunque los investigadores utilizaron distintas cepas y concentraciones de etanol, y hay diferencias en cuanto a la expresión de algunos genes individuales, las categorías GO (Ontologías Génicas) afectadas por el etanol son comparables. Las categorías GO con una expresión génica aumentada tras un choque por etanol estaban relacionadas con mecanismos de transporte, metabolismo de lípidos, respuesta general a estrés, metabolismo de la trehalosa, homeostasis de iones, además de la expresión de un gran número de genes relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la glucólisis. Así mismo, la célula tenderá a reducir la expresión de aquellos genes asociados con procesos anabólicos que consumen energía, como síntesis y procesamiento de RNA, proteínas, metabolismo de aminoácidos y nucleótidos, dando lugar a un aumento en la fase de latencia [148, 159, 212, 213, 223].

Es importante resaltar en este apartado la importancia del aumento en la actividad mitocondrial para el suministro de NAD^+ en la célula para la estimulación de la glicólisis, debido probablemente a la disminución de la tasa de oxidación del NADH por la pérdida de acetaldehído a través de la membrana plasmática desestructurada por el etanol. El trabajo de Stanley y col. (2010) muestra como cepas más tolerantes a etanol presentan un aumento en la actividad mitocondrial y un restablecimiento del balance redox NAD^+/NADH , traduciéndose en la sobreexpresión de genes de la glucólisis, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*TDH1*) que utilizan el NAD^+ como cofactor. Este aumento del flujo glucolítico proporcionará ATP y un suministro de cofactores NADH y NADPH, claves en el metabolismo y biosíntesis de aminoácidos, lípidos y nucleótidos. Esta hipótesis sería posteriormente corroborada a través de los estudios de Yang y col. (2012) y Dinh y col. (2009) [160, 238].

Alexandre y col. (2001) fueron de los primeros en utilizar los *microarrays* de DNA para investigar la respuesta de las levaduras frente a estrés por etanol. Tras media hora de estrés por etanol (7%), los autores encontraron la sobreexpresión de genes relacionados con la homeostasis de iones, protección frente a calor, síntesis de trehalosa, defensa frente a estrés oxidativo y metabolismo energético.

Sorprende sin embargo que los autores no detecten sobreexpresión en genes relacionados con metabolismo de lípidos o remodelación de la pared celular.

Chandler y col. (2004) ampliaron el trabajo realizado por Alexandre y colaboradores analizando la expresión génica en distintos momentos del crecimiento bajo estrés por etanol en la cepa haploide de laboratorio PMY 1.1, observando que una vez la levadura se aclimata al agente estresante, la sobreexpresión transitoria de genes relacionados con una amplia variedad de funciones celulares desaparece, dando lugar a perfiles de expresión similares a las de una célula no estresada. Los autores postulan así que la respuesta a un choque por etanol en la levadura está más focalizada en la modificación celular (cambio en el metabolismos, estructuras celulares...) que en la detoxificación del etanol [159].

El trabajo de Li y col. (2010) al igual que el de Chandler y col. (2004) remarca la importancia que comprender mejor el comportamiento de la levadura una vez se aclimata al etanol. Sus resultados muestran como células crecidas con un 7% de etanol en fase exponencial (y por tanto con un patrón transcripcional estable) sobreexpresan genes relacionados con la transcripción, la traducción, regulación de lípidos y síntesis de ácidos grasos (*FAA1* y *FAA3*), captación de ergosterol (*SUT1* y *DAN1*) y síntesis de inositol (*INO1*, *INO2*, *INO4* y *INM1*). Estos resultados distan parcialmente de los trabajos en los que se estudia la respuesta inmediata al etanol [148, 212, 253]. Por otro lado también observaron como el transcriptoma entre las cepas diploide y haploide diferían bajo estrés por etanol, pudiendo explicar el hecho de que la cepa diploide sea más tolerante al estrés [189].

Tabla I.8. Genes más comúnmente sobreexpresados en levadura tras choque por etanol utilizando *microarrays* de DNA. Los recuadros en rojo muestran su presencia en los distintos trabajos. La función celular de cada uno de ellos se encuentra detallada en la tabla suplementaria S4.

GEN	Alexandre y col. (2001)	Chandler y col. (2004)	Fujita y col. (2004)	Li y col. (2010)	Stanley y col. (2010)
ARG4					
CIT2					
CTT1					
DAK1					
DDR2					
DLD3					
ERO1					
GLK1					
GPM2					
GRE3					
GRX1					
GSP2					
GSY2					
HOR7					
HSP104					
HSP12					
HSP26					
HSP30					
HSP31					
HSP78					
HSP82					
HXK1					
OPI3					
PBI2					
PGM2					
PIC2					
PYC1					
SNZ1					
SPI1					
SSA4					
TDH1					
UBI4					
YGP1					

Finalmente, para terminar con este punto es importante mencionar que aunque nos hemos centrado en los estudios con *microarrays* debido a la temática de la presente tesis doctoral, cada vez son más numerosos los trabajos en los cuales se utilizan otros mecanismos de análisis del transcriptoma, tales como los loci *de* características cuantitativas (QTLs), que se basan en el estudio de regiones cromosómicas que contienen genes que influyen en un determinado rasgo cuantitativo [290] o qRT-PCR, permitiendo identificar nuevos genes candidatos para la tolerancia a etanol [205].

Todos estos estudios han proporcionado valiosa información en la respuesta celular al etanol, indicando que la tolerancia al etanol es una respuesta muy dinámica, compleja y que relaciona muchos aspectos del metabolismo celular. Bien es sabido que el etanol induce genes con más de una función por lo que se hace imprescindible revisar el concepto tradicional de “un gen una función”, no pudiendo pasar por alto la complicada interacción entre genes al diseccionar los mecanismos de tolerancia a etanol en las levaduras.

10. Mejora de la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*.

Uno de los factores más importantes para la producción de etanol es que la cepa presente altos rendimientos de etanol en presencia de altas dosis en el medio del estresante. El desarrollo de este tipo de cepas presenta un gran valor económico para las industrias relacionadas con la fermentación, destilación y refinación del etanol, por lo que se han llevado a cabo numerosos estudios para la obtención de cepas más resistentes al etanol.

Aunque la genómica funcional y el análisis de expresión global han identificado cientos de genes relacionados con la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*, existen numerosas publicaciones basadas en técnicas en ingeniería evolutiva para mejorar esta característica. Por ejemplo la adaptación progresiva a etanol y tratamientos de congelación/descongelación permiten aumentar los niveles de tolerancia al etanol en comparación con los parentales [291]. La manipulación de un único gen también se utiliza como sistema para mejorar la tolerancia a etanol, en la tabla I.9 se identifican algunos genes asociados a este fenotipo.

Tabla I.9. Genes cuya manipulación genera un aumento en la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*.

GEN	Función	Estrategia	Finalidad	Ref
<i>ATH1</i>	Degradación de trehalosa	RNA antisentido	Reducir los niveles de degradación de trehalosa	[292]
<i>TRP1-5</i>	Biosíntesis de triptófano	S	Aumentar los niveles de triptófano	[224]
<i>TAT2</i>	Permeasa de triptófano	S	Aumentar los niveles de triptófano	[224]
<i>URA7</i>	Biosíntesis de fosfolípidos	MN	Aumento de ácido oleico y remodelación de la pared celular	[293]
<i>GAL6</i>	Respuesta a antibióticos	MN	Aumento de ácido oleico y remodelación de la pared celular	[293]
<i>MPR1</i>	Protección frente estrés oxidativo	S	Disminución los niveles de ROS intracelular	[149]

S: Sobreexpresión; MN: Mutación nula

Otro método alternativo para generar cepas tolerantes al etanol es la ingeniería de maquinaria de transcripción global en la cual se crean distintas copias mutadas al azar de un factor transcripcional general para seguidamente introducir las en la levadura y seleccionar el fenotipo deseado.

Esta aproximación fue utilizada por primera vez para crear una cepa tolerante al etanol a partir de mutaciones en el gen *SPT15*, que codifica un factor transcripcional esencial de unión a TATA [294]. Aunque años más tarde se confirmó que ese mutante (*spt15-300*) era más tolerante al etanol por una mayor captación de leucina en un medio pobre en nutrientes y su uso por tanto no era una opción en condiciones industriales [295], las mutaciones en *SPT15* alteran el perfil transcriptómico de la levadura, induciendo la expresión de distintos grupos de genes. Yang y col. (2011) obtuvieron de una forma similar a la de Alper y col. (2006) cinco cepas con una mayor tolerancia y rendimientos de etanol en un medio rico y que generaban un 25% más de etanol que su cepa parental [244].

Especial mención merece un estudio publicado recientemente por Lam y col. (2014) en el cual muestran que un aumento en el pH y el potasio (K^+) extracelular al medio genera un incremento en la actividad de las bombas de exportación de H^+ y de importación de K^+ , mejorando la tolerancia a alcoholes superiores y etanol bajo condiciones industriales [296]. Esta sobre regulación de las bombas de K^+ y H^+ mejoró incluso el rendimiento de etanol en la cepa de laboratorio S288C, presentando títulos de etanol prácticamente idénticos a dos cepas

industriales. Los autores sugieren en su trabajo un modelo de toxicidad en que los alcoholes no afectan a la viabilidad a partir de concentraciones umbral que solubilizan la membrana plasmática, sino que concentraciones más bajas aumentan la permeabilidad de la membrana plasmática y disipa el gradiente iónico de membrana, empleado en muchos procesos de intercambio célula/ambiente. Este gradiente iónico se desequilibraría cada vez más conforme se acumula el etanol por la fermentación, requiriendo una cantidad de energía cada vez mayor para restablecer el equilibrio iónico (200-300 mM de K^+ y pH 7). Este trabajo abre las puertas a la posibilidad de modificar genéticamente la levadura para reforzar la actividad de las bomba de potasio (TRK1p) y H^+ -ATPasa (Pma1p) y aumentar el rendimiento en la fermentación, sin tener que alterar el medio de crecimiento.

OBJETIVOS

Los mecanismos de tolerancia a etanol han sido ampliamente estudiados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* debido a su importancia en el sector industrial de bebidas fermentadas y obtención de biocombustibles, siendo las cepas de laboratorio las más utilizadas en los estudios experimentales. A pesar del gran número de estudios llevados a cabo, nuestra comprensión de la respuesta transcripcional y fisiológica al etanol continúa siendo limitada debido al uso de cepas no adecuadas para este fin y la gran disparidad en las condiciones utilizadas. Además se ha dejado de lado el estudio de ciertas rutas de respuesta a estrés en levaduras, como la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), cuya activación puede proporcionarnos nuevas revelaciones en el comportamiento de las levaduras frente al etanol. Por todo ello, se consideraron los siguientes objetivos principales:

1. Comprender las bases genéticas que explican las diferencias adaptativas bajo estrés por etanol entre cepas de la misma especie de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de distintos procesos fermentativos y con diferencias de tolerancia al etanol.

1.1. Análisis transcriptómico de la respuesta a etanol tanto en etapas tempranas como tardías del estrés.

1.2. Identificación de genes no relacionados anteriormente con tolerancia a etanol.

1.3. Estudio de la relación entre tolerancia a ambientes ácidos y el etanol en diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

2. Estudiar el papel de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en *S. cerevisiae* en presencia de etanol.

2.1. Estudio de la activación de la UPR en *S. cerevisiae* y su importancia en la tolerancia a etanol.

2.2. Determinación de las causas de activación de la UPR tras estrés por etanol en levaduras.

3. Estudiar el grado de activación de la UPR tanto dentro de la especie *S. cerevisiae* como en especies poco adaptadas al etanol, como *S. paradoxus*, *S. uvarum* y *S. kudriadzevii*.

3.1. Análisis de la relación entre activación de la UPR y la tolerancia a etanol dentro del género *Saccharomyces*.

3.2. Análisis de la variabilidad en la activación de la UPR entre cepas de *S. cerevisiae* de origen natural y de ambiente fermentativo.

3.3. Análisis de la secuencia aminoacídica del factor de transcripción Hac1p en el género *Saccharomyces*.

Con el fin de cumplir los objetivos citados, el proyecto fue dividido en tres capítulos conforme al siguiente esquema:

CAPÍTULO 1. Estudio transcripcional de las diferencias adaptativas bajo estrés por etanol en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de fermentaciones tradicionales.

CAPÍTULO 2. Estudio de la activación y causas de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en *Saccharomyces cerevisiae* frente a estrés por etanol.

CAPÍTULO 3. Relación entre la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y la tolerancia a etanol en levaduras del género *Saccharomyces*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas de levaduras.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los análisis de expresión global, CECT 10094 y Temohaya-26, pertenecen a nuestra colección y fueron aisladas de vino de flor y de fermentación del agave, respectivamente. La cepa de laboratorio parental BY4743 (MAT α /MAT α *his3 Δ 0*/*his3 Δ 0*; *leu2 Δ* /*leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0*/MET15; *LYS2*/*lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*/*ura3 Δ 0*) y 38 mutantes derivados de ella se utilizaron para la tolerancia a etanol en ensayos de goteo en placa. La cepa parental BY4741 (MAT α ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *met15 Δ 0*; *ura3 Δ 0*), el mutante de delección Δ *hac1* y la cepa sobreexpresante Hac1p se utilizaron en los estudios del papel de Hac1p en la resistencia a estrés por etanol. Las cepas utilizadas en el estudio de correlación entre los distintos estresantes y la relación entre tolerancia a etanol y respuesta a proteínas desplegadas pertenecen, en parte, a propia colección, mientras que la cepa YPL004 (KAR2-GFP; UPR-mCherry) nos fue generosamente donada por el Dr. Eric Lee Snapp (Escuela Albert Einstein de Medicina, Universidad Yeshiva, NY.USA). Las cepas utilizadas a lo largo de la presente tesis se encuentran reflejadas en la tabla M1.

Tabla M1. Cepas de levadura utilizadas en el presente proyecto.

Nombre de la cepa	Origen	Especie	Fuente
60 *	Aislado clínico (España)	<i>S. c</i>	Colección propia
BMV58 ^c +pPM47-KanMX6 ξ	Fermentación vínica (España)	<i>S. u</i>	Esta tesis
BY4741	Cepa de laboratorio	<i>S. c</i>	Euroscarf
BY4741 + pRS426	Cepa de laboratorio	<i>S. c</i>	Esta tesis
BY4741 eroGFP	Cepa de laboratorio	<i>S. c</i>	Esta tesis
BY4741 Δ HAC1+ pRS426	Cepa de laboratorio	<i>S. c</i>	Esta tesis
BY4741 + pRS316-GFPAtg8	Cepa de laboratorio	<i>S. c</i>	Esta tesis
BY4741 Δ HAC1+ pRSHAC1	Cepa de laboratorio	<i>S. c</i>	Esta tesis

BY4743 *	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 + pMCZ-Y	Cepa de laboratorio	S. c	Esta tesis
BY4743 $\Delta ADE4$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta ARF1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta ATP1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta BUG1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta CIR1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta CTR2$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta DOS2$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta ERP2$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta FAT1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta FMP34$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta HAL1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta HLJ1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta HSP31$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta LHS1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta MPD1$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta NCA3$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta PHB2$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta PIC2$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta PIN3$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta PUT4$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 $\Delta QCR6$	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf

BY4743 Δ RG11	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ RVS161	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ SAT4	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ THI12	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ VMA8	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YCR016W	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YDR026C	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YIL060W	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YKR023W	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YLR297W	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YPR148C	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ MSN2	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ MSN4	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ GCN4	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ HAC1	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ IRE1	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
BY4743 Δ YAP1	Cepa de laboratorio	S. c	Euroscarf
CECT 11001 *	Cerveza Lager (Bélgica)	S. c	CECT
CECT 12600 + pPM47-KanMX6 ξ	Mistela (España)	S. u	Esta tesis
CECT 1939+ pPM47-KanMX6 ξ	Suelo (Sudáfrica)	S. p	Esta tesis
CECT 1942 *	Cerveza Ale (Países bajos)	S. c	CECT
CECT 1942 + pPM47-KanMX6 ξ	Cerveza Ale (Países bajos)	S. c	Esta tesis

CHR9 * ◦	corteza de roble (España)	S. c	Colección propia
CHR9+ pPM47-KanMX6 ⚗	Suelo forestal (Hungría)	S. c	Esta tesis
CHR96.2 * ◦	Corteza de roble (España)	S. c	Colección propia
CHR96.2 + pPM47-KanMX6 ⚗	Corteza de roble (España)	S. c	Esta tesis
CPE7 * ◦	Fermentación caña de azúcar (Brasil)	S. c	Colección propia
CR89+ pPM47-KanMX6 ⚗	Roble (España)	S. k	Esta tesis
D14 * ◦	Suplemento alimenticio	S. c	Colección propia
EC1118 ^{C*}	Champán (Francia)	S. c	Colección propia
EC1118 ^C + pPM47-KanMX6 ⚗	Champán (Francia)	S. c	Esta tesis
GB Flor-C * ◦	Fermentación vínica (España)	S. c	Colección propia
Lalvin T73 ^{C*} ⚗	Fermentación vínica (España)	S. c	Colección propia
Lalvin T73 ^C + pPM47-KanMX6 ⚗	Fermentación vínica (España)	S. c	Esta tesis
CECT 10094 * ◦	Vino de flor (España)	S. c	Colección propia
CECT 10094 + pPM47-KanMX6 ⚗	Vino de flor (España)	S. c	Esta tesis
RVA ^{C*} ◦	Fermentación vínica (España)	S. c	Colección propia
Temohaya-26 * ◦	Fermentación Agave (México)	S. c	Colección propia
Temohaya-26+ pPM47-KanMX6 ⚗	Fermentación Agave (México)	S. c	Esta tesis

UWOPS05 227.2 + pPM47-KanMX6 ξ	Abeja (Malasia)	S. c	Esta tesis
W303 *	Cepa de laboratorio	S. c	Colección propia
BY4741 Δ ERG2 + pPM47	Cepa de laboratorio	S. c	Esta tesis
BY4741 + pPM47	Cepa de laboratorio	S. c	Esta tesis
YPL004	Cepa de laboratorio	S. c	Prof. Erik L. Snapp

^c Cepa comercial.

(*) Cepas utilizadas en experimentos de correlación entre tolerancia a estrés por etanol (14% v/v) y otros estreses.

(ξ) Cepas utilizadas en experimentos de correlación entre tolerancia a estrés por etanol (10% v/v) e intensidad de la respuesta UPR.

(\circ) Cepas utilizadas en experimentos de correlación entre tolerancia a pH ácido y estrés por etanol (10% v/v).

NCYC: Colección Nacional de Cultivo de Levaduras (UK).

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (ES).

S.c: *Saccharomyces cerevisiae*; S.u: *S. uvarum*; S.k: *S. kudriavzevii*; S. p: *S. paradoxus*.

2. Medios de cultivo.

Todos los medios se esterilizaron por autoclave a 121°C durante 20 minutos a menos que se especifiquen otras condiciones.

2.1. GPY (Extracto de Levadura Glucosa Peptona).

Glucosa	20 g
Peptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Agar *	20 g
Agua destilada	1000 mL

Llevar el pH hasta 6,5. En los estudios de correlación entre acidez y tolerancia a etanol se disminuyó el pH con HCl hasta 3,5.

* Preparación de GPY sólido: Una vez el medio alcanza los 70°C, puede verterse en condiciones estériles directamente en placas Petri, alcanzando 1/3 de su capacidad.

En el caso de utilización de GPY con antibiótico (G418) esperar a que la mezcla haya alcanzado los 55°C y añadir el antibiótico a una concentración final de 200 µg/mL. Estas placas con antibiótico suelen ser estables unos 2-3 a 30°C. Para evitar la presencia de falsos positivos es preferible resembrar las células crecidas en nuevas placas frescas.

En el caso de añadir etanol al medio habrá que esperar a que el medio esté lo suficientemente frío como para evitar al máximo la evaporación del alcohol sin que llegue a solidificar ya que el reparto del etanol por la placa no sería uniforme.

2.2. Medio SC.

Glucosa	20 g
Yeast Nitrogen Base sin aa´s (con sulfato de amonio)	6.7 g
Suplemento medio completo (CSM)	0,69 g
Agar *	20 g
Agua destilada	1000 mL

2.3. Medio SD-Ura.

Glucosa	20 g
Yeast Nitrogen Base sin aa's (con sulfato de amonio)	6.7 g
Drop-out-Ura	0,77 g
Agar *	20 g
Agua destilada	1000 mL

2.4. Medio SD-Ura-His.

Glucosa	20 g
Yeast Nitrogen Base sin aa's (con sulfato de amonio)	6.7 g
Drop-out-Ura-His	0,75 g
Agar *	20 g
Agua destilada	1000 mL

2.5. Medio LB.

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar *	20 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH del medio a 7 antes de autoclavar.

En el caso de añadir antibiótico esperar a que el medio alcance los 55°C para evitar su degradación. La concentración final de ampicilina en el medio es de 100 µg/mL.

2.6. Medio SOC.

Triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,186 g
MgSO ₄	2,4 g
Glucosa	3,6 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH del medio a 7 antes de autoclavar. Los componentes del medio no deben autoclavarse juntos ya que la alta temperatura puede causar que la glucosa reaccione con los aminoácidos y pierda propiedades por lo que es recomendable añadir la glucosa una vez el medio esté autoclavado hasta obtener una concentración final de 20 mM, la solución stock de glucosa se filtrará previamente con un filtro de 0.22 µm.

2.7. Medio LB ampicilina + X-GAL + IPTG.

Se prepara del mismo modo que las placas sólidas de LB con ampicilina pero una vez solidificadas añadiremos 40µL de IPTG (stock 0,1M) y de X-Gal (stock 20mg/mL en DMSO) en la superficie de la placa ayudándonos de un asa de siembra y las dejaremos secar 30 minutos.

3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en la presente tesis fueron sintetizados por la casa comercial Isogen Life Science, y se diseñaron a mano, midiendo sus características a través de la herramienta web Oligo Calc. Las secuencias, escritas en orientación 5'-3', y su uso concreto, se describen en la Tabla M2.

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados durante la presente tesis.

Oligo	Secuencia	Utilización
HAC1-F	GAGCCCCGATTTAGAGCTTGA CGGGGAAAGCCGGAAAATGCTT GATGAGTTAG	Amplificación del promotor y gen de HAC1 de la cepa CECT 10094 para la obtención del plásmido pRS-HAC1 y secuenciación.
HAC1-R	CAATTAACCCTCACTAAAGGGA ACAAAAGCTGGTCATGAAGTGA TGAAGAAATC	Amplificación del promotor y gen de HAC1 de la cepa CECT 10094 para la obtención del plásmido pRS-HAC1 y secuenciación.
KanMX-F	CTTAACCCAACCTGCACAGAACA AAAACCTGCAGGAAACGAAGAT AAATCATGGTACGCTGCAGGTC GAC	Amplificación del gen KanMX6 para la obtención del plásmido pPM47-KanMX6
KanMX-R	GCTCTAATTTGTGAGTTTAGTAT ACATGCATTTACTTATAATACAG TTTTACTAGTGGATCTGATATC	Amplificación del gen KanMX6 para la obtención del plásmido pPM47-KanMX6
CompHAC 1-F	CCAAGGCTTTAACTCAGTGTC	Secuenciación HAC1 en plásmido pRS-HAC1
HAC1N-R	CCA ATT GTC AAG ATC AAT TG	Secuenciación HAC1 en plásmido pRS-HAC1

K2	GGGACAATTCAACGCGTCTG	Comprobación plásmido pPM47-KanMX6
K3	CCTCGACATCATCTGCC	Comprobación plásmido pPM47-KanMX6
M13-F	GTAAAACGACGGCCAG	Comprobación plásmido pPM47-KanMX6
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	Comprobación plásmido pPM47-KanMX6
ACS1-F	ATCCAATTGTGGCCGAGTGT	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
ACS1-R	GTTGCGGTGGACCAACTAGA	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
ERO1-F	TGAAGGAGGCAGGCAAATCG	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR y expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
ERO1-R	TACCGTTAGAGGGCCTTGGA	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR y expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
OPI3-F	CCCATGTACCAGGGTCCAC	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
OPI3-R	TGGCCTTATCACGTTAGCG	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
TFS1-F	TACGAAGGGCTCGAACACAC	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
TFS1-R	ACATATCTGTGGGGACCGGA	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
ALD4-F	GGCTGCTGGTATTACACCT	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
ALD4-R	ACATTTCCCTGCCAAACCA	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
HSC82-F	ACTCTGCCTTCGCTAAGAACAT	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
HSC82-R	GGCGTCCAAGAATGGAGACT	Comprobación <i>microarrays</i> RT-qPCR
HAC1-F	GTACAATGGAGCCTGCGACT	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
HAC1-R	GGCCACCGCATCAAACAAAT	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
HLJ1-F	ATTTGGGCCTTCTGCTTCCA	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
SPHAC1-F	AGGAAAAGGAACAGCGAAGG	Comprobación del <i>splicing</i> de <i>HAC1</i>
SPHAC1-R	TTCAAATGAATTCAAACCTGACT	Comprobación del <i>splicing</i> de <i>HAC1</i>
HLJ1-R	TGCTTGTTGTTGCTGCTGTC	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
LHS1-F	GCTCGTCAGGAGTTGCGTAT	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
LHS1-R	AGTAAAAGCCAAACGGCTGC	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
MPD1-F	CCCCAATGAGGGTCCTTTT	Ver expresión tras exposición a etanol por

		RT-qPCR
MPD1-R	TCGTCGTGCTTGTTTCCTGA	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
IRE1-F	AAGGCATCCGTTGTTTGGC	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
IRE1-R	AGTCAGAACCGGCGTCAAAT	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
ITR1-F	GCAACTGCTACAACTGGGC	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
ITR1-R	TCCCGCGAAAAAGGCAAATG	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
INO1-F	AGAGATTGCTCCTCCACGA	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
INO1-R	ACTTGGTTTGTCCGACTTG	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
ITR2-F	TTTATGCCCTCGGTATCGGC	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR
ITR2-R	GCAGTAGCGTAGGATGTCCC	Ver expresión tras exposición a etanol por RT-qPCR

4. Plásmidos utilizados.

A lo largo de la presente tesis se han utilizado distintos plásmidos para lograr los objetivos propuestos, en la tabla M3 se muestra la relación de plásmidos utilizados. Aquellos creados en el laboratorio serán descritos más detalladamente en el punto 4.1.

Tabla M3. Plásmidos utilizados en la presente trabajo.

Nombre	Descripción	Referencia
pRS426	ori(f1) - lacZ – promotor T7 - MCS (KpnI-SacI) - T3 promoter - lacI - ori(pMB1) - ampR - ori (2 micron) - URA3.	[297]
pRS-HAC1 *	ori(pMB1) - ampR - ori (2 micron) - URA3- Promotor y gen <i>HAC1</i> de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT 10094.	Este estudio
pPM47	4xUPRE-mCherry - CEN/ARS - URA3 – ampR - ori(f1) - ori(pMB1).	[298]
pPM47-KanMX6 *	4xUPRE-mCherry - CEN/ARS – KanMX6 – ampR - ori(f1) - ori(pMB1).	Este estudio
pPM28	Ori (f1) - ori(pMB1) - EroGFP - CEN/ARS - URA3 – AmpR	[298]
pFA6a-KanMX6	AmpR – KanmMX- Ori	[299]

* Plásmidos creados en nuestro estudio.

4.1. Obtención de los plásmidos.

4.1.1. pRS-HAC1.

Se procedió a amplificar la región promotora y del gen *HAC1* de la cepa tolerante al etanol CECT 10094 con los siguientes cebadores, ambos conteniendo colas complementarias (en negrita) a los extremos de los sitios de restricción SacI/NaeI (Takara Bio Inc. Japón) del vector multicopia pRS426:

HAC1-F:

**GAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGAAAATGCTTGATGAG
TTAG**

HAC1-R:

**CAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGTCATGAAGTGATGAAGAA
ATC**

La amplificación se llevó a cabo con la polimerasa de alta fidelidad “Phusion High-Fidelity DNA polymerase” (Thermo Scientific, UK) de acuerdo con las siguientes condiciones:

98°C	30 s	} 30 ciclos
98°C	10 s	
60°C	25 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

La recombinación homóloga entre el amplificado de 1,7 Kb y el plásmido digerido se llevó a cabo dentro de la cepa BY4741 mediante la transformación por acetato de litio [300], seleccionándose los transformantes en medio SD-Ura. Los plásmidos se extrajeron de las colonias positivas y se extrajeron de acuerdo a Robzyk, K y Kassir, Y. (1992) [301], se amplificaron en células electrocompetentes *Escherichia coli* DH10B mediante electroporación, preparadas previamente de acuerdo a Sambrook J. y Russell D. (2001) [302] y se hicieron crecer en un medio LB con ampicilina + X-Gal + IPTG para descartar los plásmidos recircularizados sin inserto y que por tanto tenían su gen *LacZ* intacto. Las colonias positivas se crecieron durante toda la noche en medio LB ampicilina a 37°C para extraer el plásmido a partir del kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos fueron confirmados por restricción con la enzima PstI (Roche) análisis PCR y secuenciación. La figura M1 representa los pasos para obtener el vector pRS-HAC1.

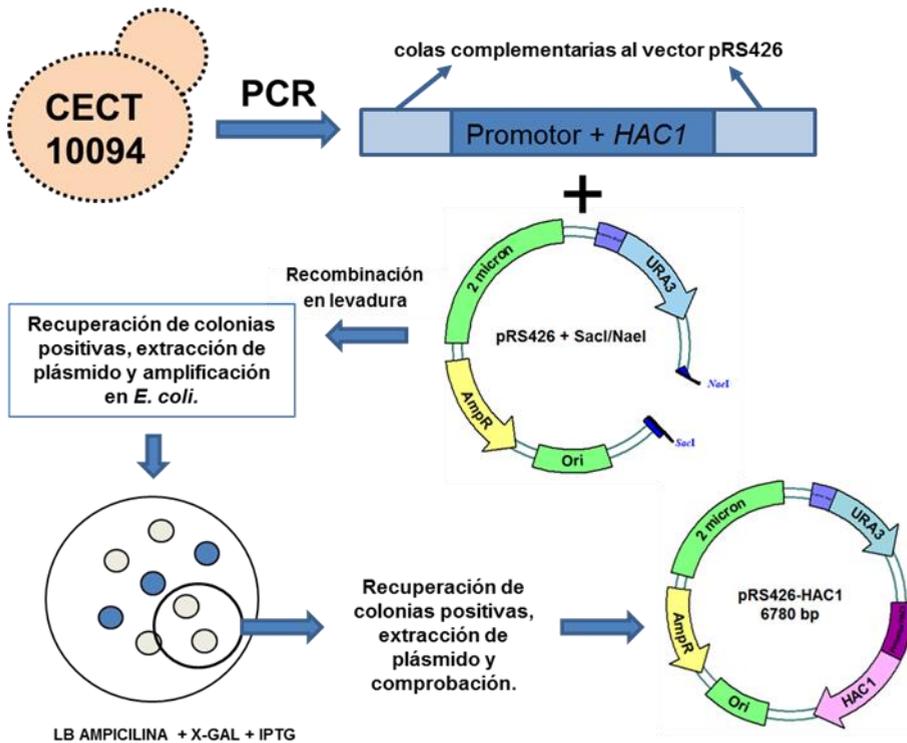


Figura M1. Esquema del plásmido pRS426 y su derivado sobreexpresante de HAC1p, pRS-HAC1.

4.1.2. pPM47-KanMX6.

A partir del plásmido comercial pPM47 (UPR-RFP CEN/ARS URA3) de Addgene (nº plásmido 20132) se llevó a cabo en intercambio del marcador de selección URA3 por el del antibiótico G418 (KanMX6), con el fin de poder utilizarlo en estudios de expresión de UPR bajo estrés por etanol en distintas especies del género *Saccharomyces*. Este plásmido contiene el gen reportero mCherry, que codifica una proteína roja fluorescente regulada por un promotor mínimo *CYC1* y cuatro elementos de respuesta a proteínas desplegadas en tándem (4xUPRE) donde se une el factor de transcripción de la UPR Hac1p.

Se procedió a la digestión del plásmido pPM47 con la enzima de restricción EcoRV (Biolabs) y la posterior amplificación del casete KanMX6 del plásmido

pFA6a-KanMX6 [299] de Addgene (n° plásmido 39296) a partir de cebadores con colas *URA3* en sus extremos (en negrita), con el fin de inducir una recombinación homóloga entre el plásmido cortado pPM47 y el inserto KanMX6 en la levadura:

KanMX-F:

**CTTAACCCAACTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCA
TGGTACGCTGCAGGTCGAC**

KanMX-R:

**GCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACATGCATTTACTTATAATACAGTTTTACT
AGTGGATCTGATATC**

La amplificación se llevó a cabo con la polimerasa Takara Taq (Chemicon®) de acuerdo con las siguientes condiciones:

95°C	5 min	} 30 ciclos
95°C	30 s	
50°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	10 min	

La recombinación homóloga entre el casete KanMX6 y el plásmido cortado con EcoRV se llevó a cabo en la cepa BY4741 por el método de la transformación por acetato de litio [300], seleccionándose los transformantes en medio GPY con 250 µg/mL de G418 (Sigma-Aldrich). Las colonias positivas se pasaron a nuevas placas frescas de medio con antibiótico para descartar falsos positivos, dejándolas crecer a 28°C durante un día. Los plásmidos de las colonias positivas se extrajeron de acuerdo a Robzyk, K y Kassir, Y. (1992) [301], se amplificaron en células electrocompetentes *Escherichia coli* DH10B mediante electroporación, preparadas previamente de acuerdo a Sambrook J. y Russell D. (2001) [302] y se crecieron durante toda la noche en medio LB ampicilina a 37°C para extraer el plásmido a partir del kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos fueron confirmados por análisis PCR, restricción mediante la enzima HindIII (Roche) y microscopía de fluorescencia. La figura M2 esquematiza los pasos para la obtención del plásmido.

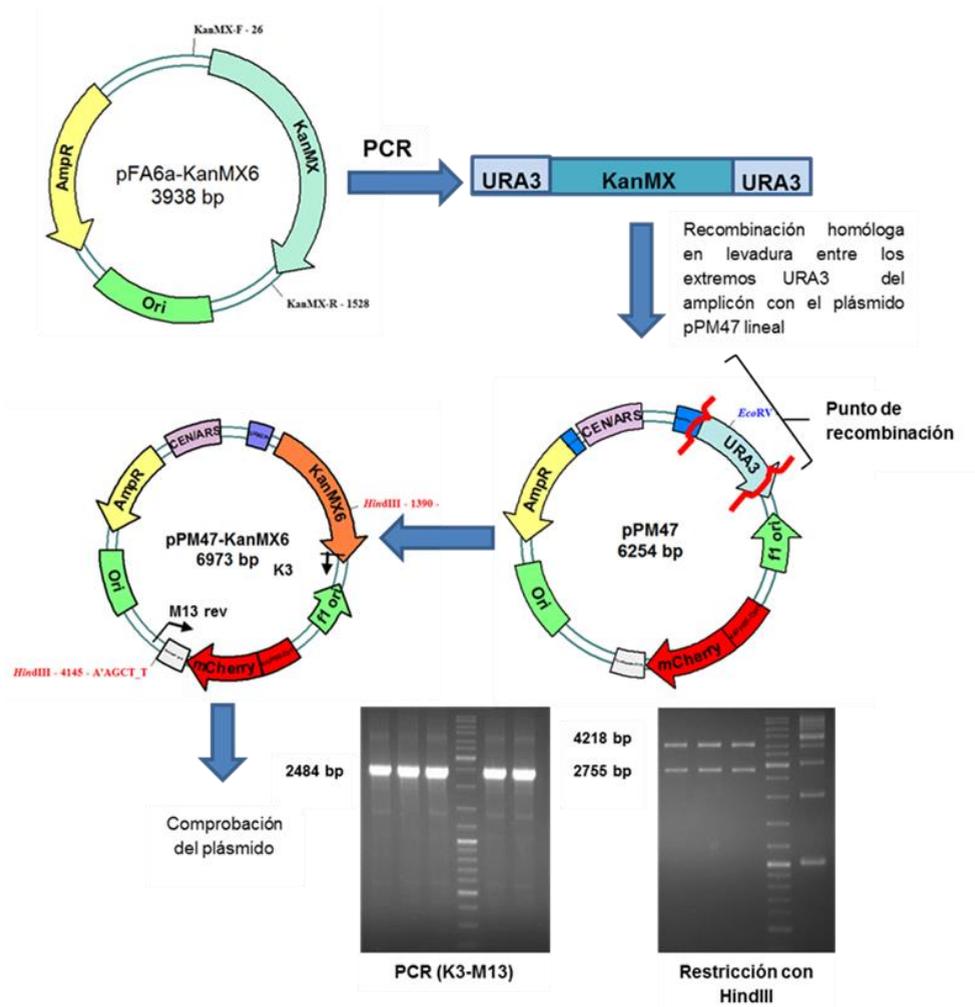


Figura M2. Obtención del plásmido pPM47-KanMX6.

5. Obtención de *Escherichia coli* DH10B electrocompetentes y electroporación.

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH10B a lo largo de la tesis para la amplificación de plásmidos. Esta cepa presenta una alta eficiencia de transformación, capacidad de captar y mantener grandes plásmidos de forma estable y es muy útil en el análisis de colonias mediante α -complementación de la enzima β -galactosidasa (*lacZ*). Con el fin de utilizarlas para la amplificación de plásmidos, las células electrocompetentes se obtuvieron a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial (OD_{600} ente 0.5-1) en medio LB a 37°C, induciendo la competencia por glicerol al 10% a 4° C según describe Sambrook *et al.* (2001) [302]. La transformación se llevó a cabo utilizando un electroporador 2510 (Eppendorf) y se utilizaron cubetas de electroporación con una anchura de 0,1 cm (Eppendorf) enfriadas en hielo para obtener mayores rendimientos en la transformación. Para cada transformación se utilizó 50 μ L de células electrocompetentes y 1 μ L del plásmido, evitando siempre la formación de burbujas ya que pueden generar chispas durante la electroporación. Se utilizó un voltaje de 1700V (17000 V/cm) e inmediatamente se añadieron 300 μ L me medio SOC para la recuperación de las células y se incubaron durante al menos 1 hora en agitación a 37° C para que se expresase el gen de resistencia al antibiótico. A continuación se sembraron en placas de LB con el antibiótico de selección (ampicilina en nuestro caso) y se dejaron crecer durante toda la noche. Al día siguiente las colonias crecidas se crecieron en medio líquido LB con ampicilina (100 μ g/mL) para la amplificación y recuperación del plásmido.

6. Monitorización del crecimiento de levaduras a OD_{600} .

La densidad óptica es un método fácil, rápido y ampliamente utilizado para estimar el número de células en un cultivo. Se define como el logaritmo en base 10 de la proporción ente la luz incidente y la luz transmitida. La OD se define como:

$$OD = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Donde I_0 es la intensidad de la luz incidente e I la intensidad de la luz transmitida. La densidad óptica de los cultivos celulares se determinó a 600 nm

utilizando un espectrofotómetro UV visible Shimadzu mini-1240 con cuvetas semi-micro de 1,5 mL, 360-700 nm. El dispositivo hará pasar la luz a través de una suspensión celular, detectando la cantidad de luz no dispersada, siendo la densidad óptica proporcional al número de células. El espectrofotómetro se calibró siempre con el mismo medio en el que hicieron crecer las células para descartar el ruido de fondo. En cultivos de alta densidad se procedía a diluir la muestra hasta obtener rangos de absorbancia entre 0,1-0,7 con el fin de no perder la linealidad en las lecturas.

7. Análisis fenotípico de la levadura frente a agentes estresantes.

7.1. Análisis de crecimiento por goteo en placa.

Con el fin de analizar la diferente susceptibilidad al etanol en la cepa parental BY4347 y distintos mutantes de la colección Euroscarf, se pasaron estas cepas crecidas durante 48 horas en placas sólidas de GPY a 5 mL de medio líquido con el fin de obtener preinóculos, que se dejaron crecer durante toda la noche a 28 °C en agitación. Al día siguiente, los cultivos se ajustaron a una OD_{600} de 0,3, diluyendo con medio GPY fresco y se dejaron crecer a 28°C en agitación hasta que las células hubieran completado dos divisiones celulares con el fin de recoger las células en el mismo momento del crecimiento y generar resultados comparables. Las células crecidas se volvieron a diluir en agua estéril hasta alcanzar una OD_{600} de 0,3 y se sembraron 5 μ L de una dilución seriada 1/5 en placas de GPY sólidas con un 10% (v/v) de etanol. Todas las placas se crecieron en ambiente aeróbico a 28°C y se observó el crecimiento cada día durante 96 horas, con el fin de descartar crecimiento debido a la evaporación del alcohol. Este ensayo se realizó tanto en GPY como en medio SC para detectar diferencias en el crecimiento en base al medio de cultivo utilizado. Para asegurar que la concentración de etanol era constante se utilizaron placas frescas, hechas el mismo día. En todos los casos se utilizó un control positivo de crecimiento a partir de placas sin agente estresante y en cada placa con etanol se sembró la cepa BY4743 para evitar sesgos entre placas. Con el fin de evitar errores experimentales, el análisis de goteo en placa, tanto en GPY como en SC se llevó a cabo 3 veces, es decir, una cepa se sembraba en tres placas distintas de medio con etanol.

7.2 Análisis de crecimiento mediante SPECTROstar®.

A lo largo de la tesis se realizaron numerosos análisis de crecimiento en distintas cepas de *Saccharomyces* bajo distintos medios de crecimiento. Aunque más adelante se amplíen los detalles para cada uno de los experimentos, de manera general y a menos que se indique lo contrario los análisis de crecimiento en el espectrofotómetro SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Alemania) se realizaron del siguiente modo. Los inóculos se preparan introduciendo una colonia del cultivo puro a analizar en 5 mL de medio GPY en tubos de plástico de 15 mL (Falcon), dejándolo crecer en agitación toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se diluye en medio fresco hasta una OD_{600} de 0,2 y se deja crecer hasta una OD_{600} de 1 para garantizar que la célula haya llevado a cabo por lo menos dos divisiones. Seguidamente se inoculará 10 μ L del precultivo en 250 μ L del medio a estudiar en placas de poliestireno estériles de 96 pocillos de fondo plano (Sarstedt, Alemania) con el fin de que la lectura inicial del aparato se encuentre entre 0,15-0,2. La curva de densidad óptica se medirá calculando la turbidez del medio cada 30 minutos a 600 nm y 28°C. El movimiento de la placa dentro del aparato será constante y se realizará una agitación extra de 40 segundos a 400 rpm antes de cada ciclo de lectura. El experimento se dará por finalizado una vez las células lleguen a fase estacionaria. Todos los experimentos se llevarán a cabo por triplicado en la placa y se utilizará un blanco para restar el ruido de fondo de los resultados. Así mismo, en aquellos experimentos en los cuales el medio se ha modificado con etanol se sellará la placa con Parafilm M® con el fin de evitar al máximo la evaporación del etanol y se evitará inocular aquellos pocillos más cercanos al borde superior y lado izquierdo ya que hemos comprobado que es donde mayor evaporación se da por el efecto del mecanismo de ventilación del aparato.

Una vez obtenidas las curvas de crecimientos se puede obtener información sobre parámetros relacionados con el crecimiento celular, como la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}), área fraccional (fa), concentración no inhibitoria (NIC) y concentración mínima inhibitoria (MIC). A continuación describiremos brevemente la forma en que hemos obtenido estos datos en la presente tesis.

7.2.1 Tasa máxima de crecimiento.

Los datos de crecimiento se exportaron del lector de microplacas SPECTROstar Omega para ser procesados en Excel (Microsoft Office 2010). La obtención de la

tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) se llevó a cabo mediante una macro creada por Jonas Warringer y Anders Blomberg [303]. De manera resumida, los valores de OD se corrigieron restando el ruido de fondo generado por el medio de cultivo, obteniendo la OD corregida y se transformaron a \log_{10} . Seguidamente se calculó la pendiente por cada tres medidas consecutivas a lo largo de toda la curva de crecimiento y de las siete pendientes más altas se descartaron las dos más altas para proporcionar un margen de seguridad, calculándose la media para las cinco restantes.

Es importante destacar que se puede obtener el periodo de duplicación dividiendo el $\log_{10}(2)$ por la μ_{max} .

7.2.2 Área bajo la curva y área fraccional (fa).

El área bajo la curva de crecimiento que relaciona la OD con el tiempo es una medida del crecimiento total de la levadura, debido a su relación con los parámetros de crecimiento biológicos [304]. Este parámetro está relacionado inversamente con la fase de latencia pero linealmente relacionado tanto con el nivel máximo de población como con la tasa de crecimiento máximo de las levaduras. Conforme aumenta la cantidad de inhibidor, el efecto sobre el crecimiento del microorganismo también aumenta, dando lugar a una reducción cada vez mayor del área bajo la curva conforme aumente la concentración de inhibidor. Sin embargo, si la sustancia tiene un efecto estimulante, se producirá un aumento del área respecto a la curva control.

Es importante comparar los valores de área utilizando siempre el mismo periodo de tiempo ya que dependiendo de la duración del experimento el área bajo la curva será distinta. Las áreas bajo la curva fueron calculadas por integración utilizando el programa OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Por otra parte, a partir de estos datos se puede calcular el área fraccional (fa), que representará el crecimiento relativo del organismo respecto a la condición control y se representa mediante la siguiente fórmula:

$$fa = \left(\frac{\text{área}_{test}}{\text{área}_{control}} \right)$$

7.2.3. Concentración no inhibitoria (NIC) y concentración mínima inhibitoria (MIC).

Lambert y Pearson (2000) desarrollaron un método sencillo y valioso para la estimación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración no inhibitoria (NIC) de un compuesto utilizando medidas de densidad óptica. El MIC está relacionado con la resistencia o tolerancia del microorganismo al compuesto, y representa la concentración más baja a la cual el microorganismo ya no puede crecer. Por el contrario, el NIC está relacionado con la susceptibilidad al compuesto y representa la concentración mínima en la que el compuesto comienza a tener un efecto negativo en el crecimiento.

En la presente tesis se hicieron crecer las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 en concentraciones crecientes (0-45 mM) del agente desnaturizante de proteínas 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) en GPY, tal y como se describe en el apartado 6.2. La base de la técnica para estimar los parámetros NIC y MIC fue la representación de las áreas fraccionales (f_a) de los distintos crecimientos con el \log_{10} de la concentración de β -mercaptoetanol (BME) utilizado en cada caso. Esta representación genera una curva sigmoidea ajustable a la función de Gompertz modificada para el decaimiento [305]:

$$f_a = A + C e^{-e^{B(x-M)}}$$

Donde A es la asíntota inferior de f_a (aproximadamente 0), B es la pendiente, C es la distancia entre la asíntota superior e inferior (aproximadamente 1) y M es el \log_{10} de la concentración de BME en el punto de inflexión. Estos parámetros se obtuvieron por un procedimiento de regresión no lineal minimizando la suma de los cuadrados de la diferencia entre los datos experimentales y el modelo ajustado. Esta tarea se realizó utilizando el módulo no lineal del programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) y su opción Quasi-Newton. Los parámetros NIC y MIC se estimaron de acuerdo a [305]:

$$NIC = 10^{[M-(1,718/B)]} \quad MIC = 10^{[M+(1/B)]}$$

8. Análisis de protección cruzada.

Con el fin de averiguar si el crecimiento bajo un estrés débil a un agente desnaturante de proteínas puede generar una posterior ventaja frente a etanol, se creció un precultivo de la cepa de laboratorio BY4741 durante toda la noche en 5 mL de medio SC en un tubo de plástico estéril de 15 mL (Formedium) en agitación constante a 28°C. Al día siguiente, a una OD₆₀₀ inicial de 0,001 en 30 mL de medio SC (Formedium™) en agitación constante a 150 rpm a 28°C. Al día siguiente, las células fueron divididas en tres cultivos: dos de ellos con una dosis suave de estrés (0,1 y 0,2 µg/mL de tunicamicina), mientras que el tercer cultivo se utilizó como control, sin añadirle ningún agente estresante. Cada cultivo se creció en un volumen total de 30 mL de SC a 28°C y 150 rpm. Una vez los cultivos alcanzaron la fase exponencial (comprobado por seguimiento de la curva de crecimiento), las células se recogieron se hicieron crecer en placas de 96 pocillos tal y como se describe en el apartado 7.2. Se utilizó para su crecimiento medio SC ó SC modificado con 6%, 8% y 10% (v/v) de etanol, inoculando 6 pocillos para cada condición con el fin de minimizar al máximo el error experimental.

9. Análisis de correlación entre tolerancia a etanol y otros estreses.

Analizamos el crecimiento de 15 cepas de *S. cerevisiae* de distintos orígenes (ver tabla M1) en medio GPY modificado con distintos estresantes: 1µg/mL de tunicamicina (Sigma-Aldrich), 14% (v/v) de etanol (Scharlau Chemie S.A, España), 30 mM de BME (Sigma-Aldrich), 3 mM de peróxido de oxígeno (Merck Millipore), 8% (v/v) de DMSO (Merck Millipore), NaCl (1,25 mM) y medio GPY a pH 10. El crecimiento en SpectroStar fue monitorizado de acuerdo al punto 7.2, obteniéndose 315 curvas de crecimiento (15 cepas x 3 réplicas x 7 condiciones). Con el fin de correlacionar la tolerancia a etanol con otros tipos de tolerancia (a proteínas desplegadas, estrés oxidativo...) se determinó el área fraccional para cada condición, incluyendo la condición control (sin agente estresante) tal y como se explica en el apartado 7.2.2. El análisis de correlación se llevó a cabo a través del test de Spearman y utilizando un intervalo de confianza del 95% utilizando el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU).

10. Análisis de correlación entre tolerancia a etanol e intensidad en la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) bajo estrés por etanol en distintas especies de *Saccharomyces*.

Se analizó la respuesta UPR en distintas especies de *Saccharomyces*, incluyendo *S. bayanus* variedad *uvarum* y variedad *bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus* y *S. cerevisiae*. A su vez, distintas cepas de *S. cerevisiae* también fueron analizadas (tabla M1). Para ello, se transformaron las distintas levaduras con el plásmido pPM47-KanMX6, generado expresamente para este estudio y descrito anteriormente en el punto 4.1.2. a través del método del acetato de litio descrito por Gietz & Woods (2002) [300]. Es importante destacar que la cepa de *S. kudriavzevii* se creció a 25°C tanto en la transformación como en el experimento de respuesta a UPR bajo estrés por etanol al ser su temperatura de crecimiento óptima, evitando así la presencia de otros estreses distintos al etanol [306]. Los transformantes fueron seleccionados en medio sólido GPY con 250 µg/mL de G418 (Sigma-Aldrich). Las células transformadas fueron comprobadas de manera visual con un microscopio de fluorescencia Eclipse 90i (Nikon Instruments Inc.) tras ser expuestas a al agente desnaturalizante de proteínas DTT (5 mM) durante una hora.

El análisis del crecimiento de las distintas cepas bajo estrés por etanol (8% v/v), se realizó de acuerdo al apartado 7.2, mientras que la obtención del área fraccional de crecimiento de cada cepa bajo estrés por etanol se obtuvo de acuerdo al apartado 7.2.2. Por otro lado, para la cuantificación de la expresión de la UPR mediante citometría de flujo, las cepas se crecieron durante toda la noche en 5 mL de GPY a 28°C y agitación constante en tubos de plástico estériles de 15 mL (Falcon). Al día siguiente las células se inocularon a una $OD_{600} \sim 0,001$ en 250 mL de GPY líquido con geneticina (250 µg/mL), y se dejaron crecer a 28°C a 190 rpm durante toda la noche, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial temprana (aproximadamente una $OD_{600} \sim 0,4$). Para la especie *S. kudriavzevii* el crecimiento fue realizado a 25°C. Seguidamente, el cultivo se dividió en dos tubos de polipropileno de 250 mL estériles (Dry-Spin), y se centrifugaron en una centrífuga Sorvall® Superspeed Centrifuge RC-5B con un rotor FiberLite F14 6x250ml durante 5 minutos a 4000 rpm, desechándose el sobrenadante. Seguidamente se añadió medio GPY o medio GPY con etanol (8% v/v), ambos con el antibiótico G418 para evitar la pérdida de plásmido. Las células fueron incubadas durante 8 horas a una temperatura de 28°C a 190 rpm,

tomando muestra cada 2 horas. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 3500 rpm y el sedimento congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su análisis. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Para el análisis por citometría de flujo, las muestras fueron resuspendidas en tampón fosfato salino, PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) y analizadas empleando el citómetro de flujo (LSR Fortessa; BD) equipado con un láser de 561 nm, con un filtro de paso de banda 610/20 para la detección de la proteína mCherry y el programa FACS DIVA para recopilar archivos .fcs. Los archivos fueron analizados por el software FlowJo (Tree Star Ashland, OR). Se obtuvieron las medias de las intensidades de fluorescencia de los triplicados por cada tiempo y condición y los datos se normalizaron dividiendo la media obtenida en cada tiempo entre la media obtenida a tiempo 0 en la misma condición para cada cepa, seguidamente se obtuvo el área bajo la curva de activación de la UPR y se calculó al área fraccional dividiendo el área bajo la curva en presencia de etanol con el área bajo la curva en medio no modificado para obtener el incremento de la activación del reportero respecto al medio control. Finalmente se llevó a cabo un análisis de correlación entre los datos de las áreas fraccionales pertenecientes al crecimiento bajo un 10% de etanol de las distintas cepas con las áreas fraccionales de la intensidad de la mCherry en presencia de etanol. El análisis de correlación entre los datos se llevó a cabo a través del test no paramétrico de Spearman y utilizando un intervalo de confianza del 95%. La figura M3 resume los pasos realizados.

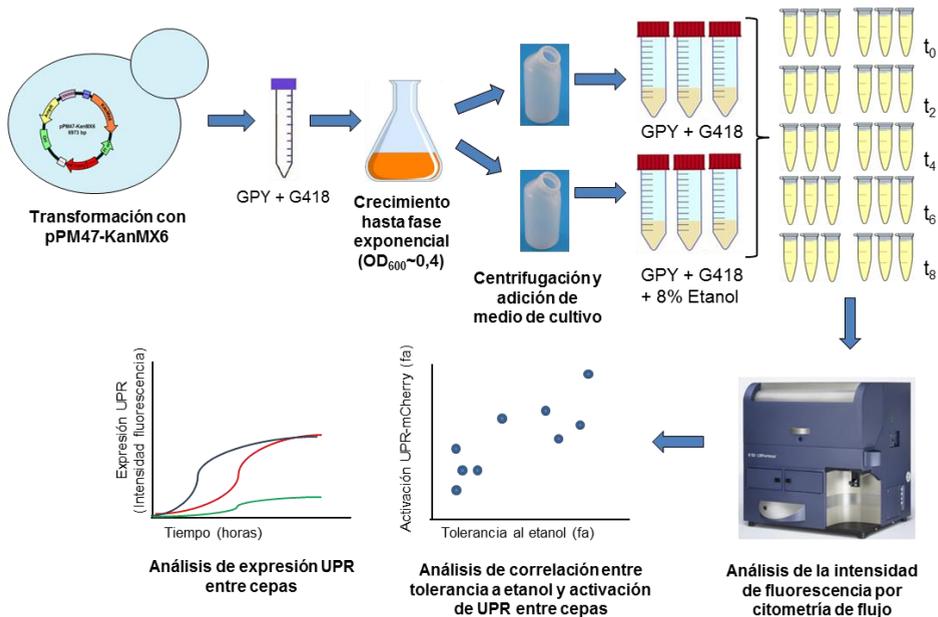


Figura M3. Esquema del análisis por citometría de flujo de la expresión del plásmido pPM47-KanMX6 en las distintas especies de *Saccharomyces*.

11. Análisis de la sobreexpresión del gen *HAC1* en la cepa BY4741.

Para analizar el efecto de la sobreexpresión del factor de transcripción Hac1p en la tolerancia a etanol, se creció la cepa parental BY4741 (control), BY4741 $\Delta hac1$ (mutante) y la cepa BY4741 con el plásmido pRS-HAC1 (sobreexpresante) en medio SD-ura y medio SD-ura modificado con un 8% y 10% de etanol (v/v). El crecimiento de las cepas y la monitorización de su crecimiento se llevaron a cabo de acuerdo al apartado 7.2 durante 40 horas (hasta que las células alcanzaron la fase estacionaria). Las tasas máximas de crecimiento (μ_{max}) de las curvas de crecimiento se obtuvieron de acuerdo al apartado 6.2.1 y se realizó un test de Dunnett de comparación múltiple para comparar la cepa parental BY4741 con la cepa mutante y sobreexpresante de Hac1p para cada concentración de etanol, utilizando un intervalo de confianza del 99%. Los experimentos se realizaron por triplicado y tanto la cepa parental BY4741 como el mutante $\Delta hac1$ fueron transformadas por el método del acetato de litio [300] con el plásmido episomal vacío pRS426 para evitar sesgos en el crecimiento.

12. Ensayos con reporteros fluorescentes mediante citometría de flujo.

12.1. Análisis de la presencia de proteínas desplegadas en el RE utilizando la proteína Ero-GFP.

Se llevó a cabo un estudio del estado redox *in vivo* del RE con el fin de detectar proteínas desplegadas en el mismo. Para ello, utilizamos una proteína GFP sensible al estado redox del RE (ero-GFP) [298] insertada en el plásmido comercial pPM28 (Ori (f1)-ori(pMB1)-EroGFP-CEN/ARS-URA3–AmpR). El plásmido se introdujo en la cepa BY4741 por el método del acetato de litio [300] y los transformantes se seleccionaron en medio sólido SD-Ura (Formedium™). Las células se crecieron a 28°C en 500 mL de medio SD-Ura hasta fase logarítmica ($OD_{600} \sim 0,4$) y se centrifugaron y se pasaron a 40 mL de medio SD-Ura fresco, medio SD-Ura modificado con un 8% de etanol y medio SD-Ura con DTT (3mM) como control positivo de la desnaturalización de proteínas y modificación de la estructura de la ero-GFP. Cada condición se realizó en triplicado y se recogieron muestras de 13 puntos temporales durante las 10 horas de crecimiento. Las muestras fueron centrifugadas durante 1 minuto a 3500 rpm y el sedimento congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su análisis. Las muestras se resuspendieron en PBS y se midió la fluorescencia de la GFP a 405 nm y 488 nm por citometría de flujo utilizando el modelo BD FACSVerser™ (BD Biosciences). Seguidamente se obtuvo para cada punto temporal el ratio eroGFP, definido como el ratio de fluorescencia de la excitación a 488nm respecto a la de 405 nm expresado en \log_2 y normalizado respecto al control. Estos resultados se representaron mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU). La figura M4 resume los pasos realizados en este experimento.

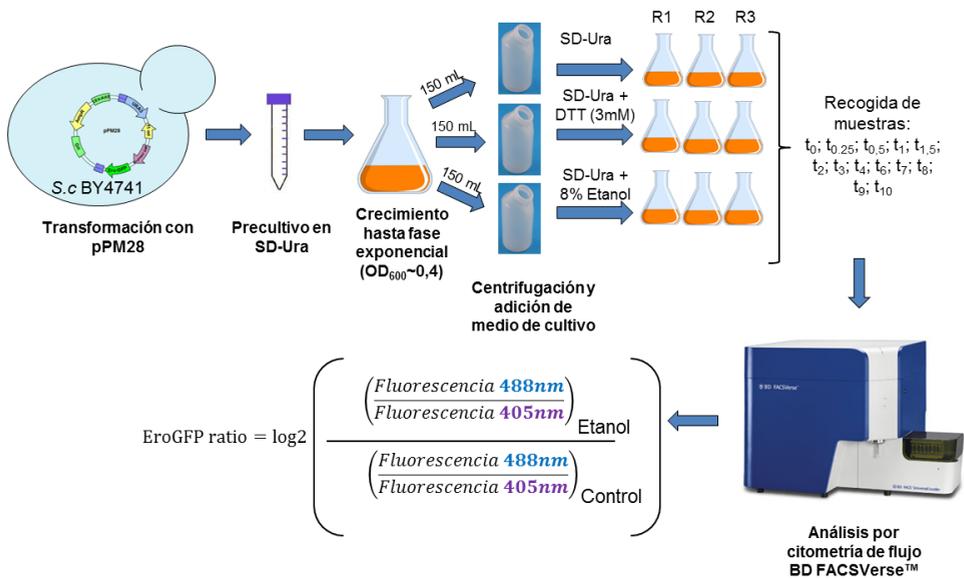


Figura M4. Esquema del procedimiento para la detección de proteínas desplegadas en el RE utilizando la proteína Ero-GFP en la cepa BY4741 bajo estrés por etanol.

12.2. Ensayo sobre el efecto del inositol en la inducción UPR y sobreexpresión de Kar2p bajo estrés por etanol.

Con el fin de estudiar la influencia del inositol sobre la activación de la UPR en la cepa BY4741 bajo estrés por etanol se utilizaron dos reporteros para medir la actividad UPR bajo estrés por etanol en una cepa BY4741 modificada. La cepa presenta una variante fluorescente de la chaperona Kar2p integrada en el genoma en el locus *KAR2* (Kar2p-sfGFP) y un plásmido reportero denominado UPR-mCherry que codifica la proteína fluorescente roja mCherry, bajo un promotor mínimo *CYC1* y cuatro elementos UPRE dispuestos en tandem [138, 298]. Esta cepa, denominada YPL004 fue cedida por Eric Lee Snapp (Albert Einstein College of Medicine, NY, EEUU). Las células se crecieron durante toda la noche en medio SD-Ura-His a 28°C hasta alcanzar la fase logarítmica para el análisis ($OD_{600} \sim 0,4$). Seguidamente las células fueron divididos en tubos estériles, se centrifugaron y se hicieron crecer en medio SD-Ura-His (control), SD-Ura-His con un 8% (v/v) de etanol y medio SD-Ura-His con DTT (1mM)

(control positivo), para cada una de las categorías se analizó el crecimiento de la cepa bajo distintas concentraciones de inositol en el medio (0, 11, 90 y 400 μ M), tomándose muestra cada dos horas. En el caso de células crecidas sin inositol en el medio se procedió a realizar cuatro lavados con agua destilada estéril para eliminar el inositol residual que pudiera quedar en el medio de cultivo. Para los ensayos de carencia (sin inositol) y en los medios con 90 y 400 μ M de inositol, el medio SD-Ura-His se preparó utilizando YNB sin aminoácidos y sin inositol (Formedium TM), suplementado con los aminoácidos necesarios y añadiendo, en cada caso, la cantidad de mioinositol (Sigma-Aldrich) necesaria. Para conseguir un medio con 11 μ M de inositol simplemente se utilizó YNB sin aminoácidos, ya que esa es su cantidad basal de mioinositol. Finalmente las muestras se resuspendieron en tampón PBS y analizaron en el citómetro de flujo (LSR Fortessa; BD) equipado con un láser de 488nm un filtro de paso de banda 525/50 para la detección de sfGFP y un láser de 561nm con un filtro de paso de banda de 610/20 para la detección de mCherry. Se utilizó el programa FACS DIVA para recopilar archivos .fcs. y los datos fueron analizados por el programa FlowJo (Tree Star Ashland, OR). Se calculó, para cada canal, la mediana de las intensidades de fluorescencia (MFI) y los resultados fueron representados mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU). Cada experimento fue realizado por triplicado.

12.3. Análisis por citometría de flujo de la activación de la UPR en base a la fluidez de la membrana.

Con el fin de estudiar la influencia de la fluidez de la membrana en la activación de la UPR en la cepa BY4741 se utilizó la cepa transformada con el plásmido pPM47 (4XUPRE, CEN/ARS, URA3) a través del método del acetato de litio descrito por Gietz & Woods (2002) [300]. Las células se crecieron durante toda la noche en medio SD-Ura a 28°C hasta alcanzar la fase logarítmica para el análisis (OD₆₀₀ ~0,4). Seguidamente las células se dividieron en matraces con un volumen final de 60 mL, representando cada uno de ellos una condición distinta que afectaba a la fluidez de la membrana plasmática. En la tabla M4 se resumen las condiciones y su efecto sobre la fluidez de la membrana plasmática.

Tabla M4: condiciones utilizadas en el estudio y efecto de los compuestos sobre la membrana plasmática.

Condición	Efecto sobre la fluidez de la membrana
SD-Ura 28°C	Control
SD-Ura + 8% (v/v) Etanol	Aumento
SD-Ura + 650 µM Ácido palmitoleico (16:1) + 1% (v/v) tergitol	Aumento
SD-Ura + 650 µM Ácido oleico (18:1) + 1% (v/v) tergitol	Disminución
SD-Ura + 1% (v/v) tergitol	Aumento
SD-Ura + Alcohol bencílico (20 mM)	Aumento
SD-Ura + 650 µM Ácido palmitoleico (16:1) + 650 µM Ácido oleico (18:1) + 1% (v/v) tergitol	Mixto
SD-Ura+ Alcohol bencílico (20 mM) + 650 µM Ácido oleico (18:1) + 1% (v/v) tergitol	Mixto
SD-Ura + 650 µM Ácido oleico (18:1) + 1% (v/v) tergitol + 8% (v/v) Etanol	Mixto
SD-Ura + DMSO (250 mM)	Aumento

Cada uno de los matraces se dividió a su vez en tres tubos falcon de 50 mL con 20 mL de cultivo con el fin de obtener triplicados biológicos para cada condición. Las células se crecieron a 28°C a 150 rpm y se recogió 1 mL de muestra a los 30 minutos, 1, 2, 4, 6 y 8 horas de crecimiento. Cada tubo se centrifugó durante 1 minuto a 3500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se congeló en nitrógeno líquido hasta su análisis. Finalmente las muestras se resuspendieron en tampón PBS y analizaron en el citómetro de flujo (LSR Fortessa; BD) equipado con un un láser de 561nm con un filtro de paso de banda de 610/20 para la detección de mCherry. Se utilizó el programa FACS DIVA para

recopilar archivos .fcs. y los datos fueron analizados por el programa FlowJo (Tree Star Ashland, OR). Se calculó, para cada muestra la mediana de las intensidades de fluorescencia (MFI) y los datos se normalizaron respecto al punto de 30 minutos para cada condición. El incremento de la intensidad UPR para cada condición se obtuvo sumando las diferencias en intensidad de cada punto respecto al punto inicial. Los resultados fueron representados mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU).

A su vez, y con el mismo fin, también se utilizó el mutante $\Delta erg2$ de la cepa BY4741 transformado con el mismo plásmido pPM47, este mutante es incapaz de sintetizar ergosterol y su mayor fluidez de membrana ya ha sido demostrada por anisotropía de fluorescencia [307]. En este caso, la cepa se hizo crecer en 120 mL de medio SC-Ura hasta alcanzar la fase logarítmica para el análisis ($OD_{600} \sim 0,4$) y seguidamente las células se pasaron a un tubo Corning de 50 mL de forma que su volumen final con un 8% (v/v) de etanol o sin etanol fuera de 20 mL. El crecimiento, obtención y análisis de las muestras se realizó de la misma manera.

13. Análisis por microscopía electrónica de transmisión.

Con el fin de analizar los cambios ultraestructurales de las células en respuesta a estrés por etanol, se hizo crecer la cepa BY4741 durante toda la noche en medio SC a 28°C para, seguidamente, transferirla a 500 mL de medio fresco SC y dejar que creciera hasta fase logarítmica ($OD_{600} \sim 0,4$). A continuación se recogieron 150 mL del cultivo en 3 tubos de polipropileno de 250 mL estériles (Dry-Spin), y se centrifugaron en una centrífuga Sorvall® Superspeed Centrifuge RC-5B con un rotor FiberLite F14 6x250ml durante 5 minutos a 4000 rpm, desechándose el sobrenadante. El cultivo recogido por centrifugación se dividió en tres matraces de 250 mL, los cuales contenían medio SC fresco (condición control), medio SC con un 8% de etanol y medio SC con DTT (1mM) como control positivo en el aumento de la longitud del RE por presencia de proteínas desplegadas en el RE, tal y como describieron Bernales *et al.* (2006) [121]. Se recogieron 10 unidades de OD por centrifugación a las 0, 3 y 6 horas tras la adición del estresante, se eliminó el sobrenadante y se fijaron las células con glutaraldehído al 2,5% en PBS 0,1 mol/L (pH 7,2-7,4). Las muestras fijadas se lavaron tres veces con PBS 0,1 mol/L y se tiñeron con tetraóxido de osmio (OsO_4) a 4°C durante una hora

para proveer contraste a la imagen. Tras una deshidratación a través de un gradiente de etanol y la inclusión de la muestra en resina (LR-White resin, Sigma-Aldrich), las muestras se seccionaron con una cuchilla de diamante (DiATOME) en un ultramicrotomo EM UC6 (Leica Microsystems). Las secciones ultrafinas de 70 nm se tiñeron con citrato de plomo y se visualizaron y fotografiaron con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1010 TEM (JEOL Ltd., Japón) con una cámara XR-80 TEM (Advanced Microscopy Techniques, Corp. Woburn, Massachusetts). Las imágenes se procesaron y analizaron utilizando ImageJ (W. S. Rasband: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

13.1. Estimación estereológica de la longitud del RE y área vacuolar.

La estimación estereológica se basa en la intersección observable entre sondas geométricas y el objeto de interés. En nuestro caso, con el fin de obtener la longitud del RE en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica se utilizó el principio de “las agujas de Buffon”. Este principio postula que, si se dejan caer agujas al azar sobre una hoja en la que se ha dibujado un conjunto de líneas paralelas equidistantes una distancia **d**, la probabilidad (**p**) de que una aguja de longitud **L** toque una línea paralela es:

$$p = \frac{L}{d} * \frac{2}{\pi}$$

El factor $2/\pi$ se refiere a las intersecciones isotrópicas entre las líneas y la aguja, de este modo se considera todas las posibles orientaciones del segmento respecto a las líneas del test. Si desarrollamos la ecuación de modo que despejamos **L** y sustituimos **p** por la proporción de veces que las agujas tocan la intersección (**n**) durante **N** veces que hacemos el experimento, obtenemos la siguiente fórmula:

$$L = \frac{\pi}{2} * \frac{n}{N} * d$$

Que nos permitirá estimar la longitud de las agujas de manera experimental, contando el número de intersecciones entre agujas y líneas paralelas. Si realizamos la medida una sola vez, **N=1**, simplificando la expresión y quedando finalmente la siguiente fórmula:

$$L = \frac{\pi}{2} * n * d$$

De acuerdo al principio de Buffon, y para que estimación estereológica fuera metodológicamente imparcial, la cuadrícula se colocó aleatoriamente, de manera que las intersecciones entre las líneas de la cuadrícula y la membrana del RE ocurrieran al azar, y posteriormente se procedió a contar el número de intersecciones entre el RE y la cuadrícula, tanto entre líneas horizontales y verticales, obteniendo posteriormente una media entre ambas. La longitud del RE se calculó a partir de 30 imágenes para cada tiempo y condición, tal como describe Bernales *et al.* (2006) [121]. Finalmente, los resultados fueron representados mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU) y se realizó un test de Dunnett de comparación múltiple para comparar la longitud del RE para cada condición y tiempo con la cepa control a tiempo cero, utilizando un intervalo de confianza del 99%. Para evitar sesgos en los resultados, los datos de longitud del RE se normalizaron respecto al área de corte de la célula.

Por otro lado, también se analizó en las mismas células el área vacuolar, para ello y tras escalar en el ImageJ la imagen proporcionada por el microscopio electrónico, se procedió a sumar el área de las vacuolas en la imagen, normalizarla respecto al área de corte y dividir finalmente esa área normalizada entre el número de vacuolas existente en la imagen, para obtener la proporción celular ocupada por vacuola. Finalmente, los resultados fueron representados mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU) y se realizó un test de Dunnett de comparación múltiple para comparar el área vacuolar para cada condición y tiempo con la cepa control a tiempo cero, utilizando un intervalo de confianza del 99%.

Es interesante destacar que se realizaron pruebas para comparar el método de Buffon y el método de trazado convencional con el fin de encontrar diferencias entre los dos tipos de análisis. La aproximación estereológica consumió menos tiempo, es más sencilla y en definitiva más eficiente que el trazado manual, obteniéndose resultados prácticamente idéntica, tal y como ya observaron Ronn *et al.* (2000) [308]. La figura M5 resume los pasos realizados en este experimento:

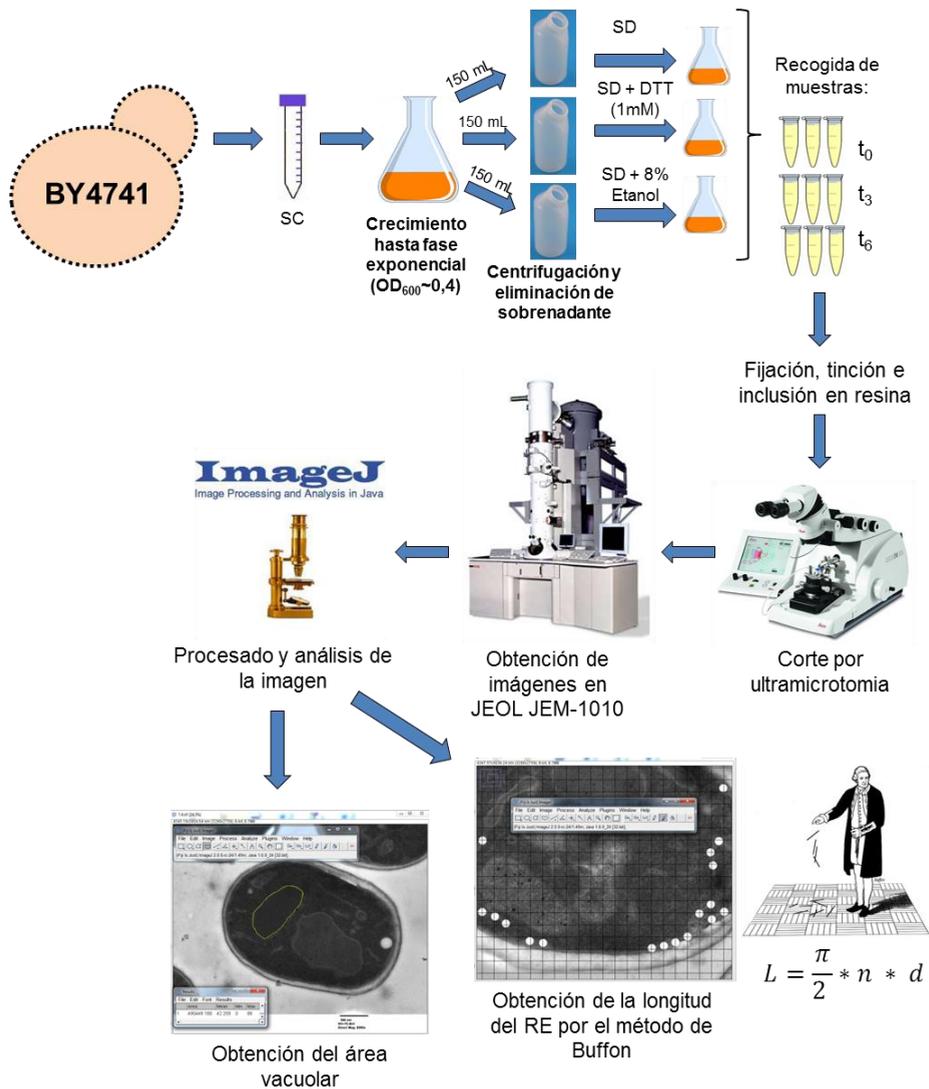


Figura M5. Pasos realizados para el análisis de los cambios ultraestructurales de la cepa BY4741 en respuesta a estrés por etanol utilizando microscopía electrónica de transmisión y análisis estereológicos.

14. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

14.1 Obtención de DNA.

14.1.1 DNA genómico de levaduras.

Se utilizó el método de aislamiento de DNA genómico según el método descrito por Sherman *et al.* (1986) [309] y adaptado por Querol *et al.* (1992) [310]. Las células de levadura se crecieron en 1 ml de GPY a 28°C en agitación durante toda la noche y se recogieron por centrifugación a 12000 rpm durante 3 min. El sedimento de células se resuspendió en 0,5 ml de solución 1 (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA a pH 7.5). A esta solución se le añadieron 30 µL de Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japón) a una concentración de 1 mg/mL y se incubó a 37°C durante 40 minutos en agitación con el fin de obtener protoplastos, que se recogieron tras una centrifugación a 12000 rpm durante 3 minutos. Los protoplastos se resuspendieron en 0,5 mL de solución 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 20 mM EDTA, pH 7.4) y se añadieron 13 µL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% para posteriormente incubarlos a 65°C durante 5 minutos con el fin de romper las células. Seguidamente, se añadieron 0,2 mL de acetato potásico 5 M y las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 minutos para precipitar las proteínas. Tras la incubación se llevó a cabo una centrifugación de 15 minutos a 4°C y el DNA contenido en el sobrenadante se precipitó mediante la adición e incubación con 0,7 mL de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. El DNA obtenido por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos se lavó dos veces con 0,5 mL etanol al 70% (v/v). Finalmente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y el etanol se decantó, para seguidamente secarse mediante vacío en un concentrador SpeedVac® Plus SC110A (Savant™). Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 15 µL de agua milliQ estéril y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

14.1.2 DNA plasmídico.

Para la obtención de plásmidos de *E.coli* se utilizaron varias técnicas, por un lado y con el fin de economizar recursos, se utilizó el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich) cuando el número de clones para la extracción era bajo. Este procedimiento se basa en una lisis alcalina-SDS unido a la adsorción del DNA en una columna de sílice en presencia de un alto contenido

en sales para finalmente recuperar el DNA por elución con tampón Tris-EDTA [311]. La utilización del kit se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, cuando el número de extracciones era demasiado alto, la extracción de los plásmidos se realizó a través del método de Robzyk y Kassir (1992) [301] con algunas modificaciones, el cual no utiliza solventes orgánicos ni materiales costosos como zimoliasa o kits de purificación. De forma resumida, las células se crecieron durante toda la noche a 37°C en 5 mL de LB con ampicilina para el mantenimiento del plásmido y se centrifugó 1,5 mL del cultivo durante 5 minutos a 6000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µL de tampón STET (8% sacarosa; 5% triton X-100; 50 mM TrisHCl pH:8; 50 mM) junto con 0,2 g de perlas de vidrio de 0,45 mm y las células se rompieron en un homogeneizador Mini-Bead-Beater (Bio-Spec), alternando 30 segundos de rotura con 30 segundos en hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Seguidamente se adicionó 100 µL de tampón STET y se llevó a ebullición en un baño de agua durante 3 minutos. Las muestras se enfriaron en hielo y se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm a 4°C, y se trasladó 100 µL del sobrenadante a un nuevo tubo con 100 µL de acetato amónico 7,5 M para precipitar DNA residual, RNA e impurezas que pueden inhibir la transformación en *E.coli*. Tras una hora a -20°C para favorecer la precipitación de productos indeseables, las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C y 100 µL del sobrenadante se pasó a un nuevo tubo con 200 µL de etanol absoluto frío para precipitar el DNA plasmídico que se recuperará por centrifugación. Finalmente el sedimento del tubo que contiene el plásmido se lavará un par de veces con etanol al 70% (v/v) y se resuspenderá en 20 µL de agua. Para transformar *E.coli* se utilizará 1 µL de la solución del plásmido.

14.2. Obtención de RNA.

La obtención del RNA de levadura para llevar a cabo los experimentos de *microarrays* de expresión y PCR cuantitativa (RT-qPCR) para corroborar los datos de los *microarrays*, ambas técnicas explicadas en el apartado 17, se realizó acorde a García-Martínez *et al.* (2004) [312] con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras recogidas para su posterior análisis fueron centrifugadas a 3000 rpm y lavadas en agua dietilpirocarbonato (DEPC) con el fin de inactivar posibles RNAsas de la muestra que podrían interferir con la

extracción. Seguidamente, las células se resuspendieron en 500 μL de tampón LETS (0,1 M LiCl; 10 mM EDTA; 0,2% SDS; 10 mM TrisHCl pH:7,4) junto con 500 μL de fenol-tris (AMRESCO; pH 4,5) y se rompieron en un homogeneizador Mini-Bead-Beater (Bio-Spec), alternando 30 segundos de rotura con 30 segundos en hielo para evitar el calentamiento de la muestra. Las muestras se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se volvió a mezclar con fenol-Tris y centrifugar en frío. Se recogió el sobrenadante y se extrajo con fenol-cloroformo 5:1 (Sigma-Aldrich) tres veces para eliminar las proteínas y el DNA, que quedarán en la fase orgánica, hasta que finalmente se llevó a cabo una extracción con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 que actuará como antiespumante (Fluka). El sobrenadante tras la centrifugación se recuperó y se mezcló con 500 μL de LiCl 5M, dejándose el RNA toda la noche precipitar a -20°C. Al día siguiente se procedió a centrifugar en frío la muestra a 13000 rpm y lavar el sedimento con 500 μL de etanol al 70% (v/v). Una vez seco el sedimento, se resuspende en 500 μL de agua con DEPC y se añade 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, la mezcla se deja a -80°C durante 2-3 horas y finalmente se centrifuga a 4°C durante 30 minutos a 13000 rpm y se lava el RNA con etanol al 70% (v/v) para seguidamente secarse mediante vacío en un concentrador SpeedVac® Plus SC110A (Savant™). La calidad de las muestras de RNA se comprobaron mediante un gel de agarosa y su pureza y cantidad mediante NanoDrop™ 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware).

14.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó la PCR para la construcción de plásmidos y comprobación de las diferentes modificaciones genéticas realizadas en las cepas de levadura. Las reacciones de PCR se realizaron con dos tipos de Taq polimerasas distintas. En el caso de necesitar una secuencia de DNA fiel al molde para la clonación de ciertos genes se utilizó la polimerasa de alta fidelidad “Phusion High-Fidelity DNA polymerase” (Thermo Scientific, UK), con una tasa de erros 50 veces más baja que una Taq DNA polimerasa convencional. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μL , con 50-250 ng de DNA molde genómico o 1 pg-10 ng de DNA plasmídico, 1X tampón Phusion HF, 200 μM de dNTP’s, 0,5 μM de cada cebador, 3% DMSO y 1U de enzima. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 30 s a 98°C, 30 ciclos compuestos de 10 s a 98°C, 25 s a la temperatura óptima de hibridación para cada par de nucleótidos y un tiempo variable (15-30 s

por Kb) a 72°C, y finalmente un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. En ambos casos se utilizó el termociclador Eppendorf Mastercycler personal (Eppendorf).

En el caso de comprobación de cepas y construcciones génicas se utilizó la enzima Taq polimerasa de Takara, de uso más versátil en aplicaciones estándar de PCR. En su caso, para una reacción general de 50 μ L se utiliza: 0,25 μ L de enzima, 5 μ L de tampón 5X, 4 μ L de dNTP's (concentración final de 2,5mM cada uno), <500 ng de DNA molde y 0,2-1 μ M de cada cebador. Las condiciones generales de reacción fueron: 1 ciclo de 5 min a 95°C, 30 ciclos compuestos de 30 s a 95°C, 1 min a la temperatura óptima de hibridación para cada par de nucleótidos, un tiempo variable (1 min por Kb) a 72°C para la extensión, y finalmente un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

14.4. RT-PCR.

Con el fin de obtener el patrón de activación de la UPR por *splicing* del mRNA de *HAC1* en presencia de etanol, se llevó a cabo un ensayo RT-PCR y observación de las bandas pertenecientes a *HAC1* modificado (activo, de 584 pb) y *HAC1* no modificado (inactivo, de 836 pb) en gel de agarosa. Para ello se hizo crecer la cepa BY4741 durante toda la noche en medio SC a 28°C para, seguidamente, transferirla a 1,7 L de medio fresco SC y dejar que creciera hasta fase logarítmica ($OD_{600} \sim 0,4$). A continuación se repartieron 850 y 782 mL del cultivo en dos matraces, portando el segundo 68 mL de etanol para que la concentración alcanzará un 8% (v/v). Seguidamente cada matraz se dividió en tres matraces con 280 mL del medio y se hicieron crecer a 28°C a 150 rpm. Se recogieron 50 mL de cultivo mediante centrifugación durante 8 horas de crecimiento, obteniendo 7 puntos temporales pertenecientes a t_{5min} ; $t_{0,50}$; t_1 ; t_2 ; t_4 ; y t_6 horas. Las muestras se lavaron con agua libre de RNAsas, se pasaron a tubos de rosca de 2 mL y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. La obtención del RNA se realizó mediante kit comercial Nucleospin RNA de Macherey-Nagel según las instrucciones del fabricante.

La concentración y pureza del RNA se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 y la integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la síntesis de cDNA de simple cadena se utilizó la transcriptasa reversa EuroScript de EuroGentec, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante:

Para cada reacción de 20 μ L:

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
Molde RNA total	400 ng	
10x tampón	2 μ L	1x
25 mM MgCl ₂	4 μ L	5 mM
2,5 mM dNTP	4 μ L	500 μ M de cada dNTP
Oligo dT ₁₅ VN	0,5 μ L	1,25 μ M
Random Nonamer	0,5 μ L	1,25 μ M
Inhibidor RNAsas	0,4 μ L	0,4 U/ μ L
EuroScript RT	0,5 μ L	1,25 U/ μ L
Agua libre RNAsas	hasta 20 μ L	

Las etapas de la reacción de transcripción reversa, se llevaron a cabo en un termociclador TECHNE (Bibby Scientific Limited), en el que se programaron los siguientes ciclos, siguiendo las recomendaciones para el kit:

- Etapa inicial: 10 min a 25°C
- Etapa de Transcripción Reversa: 45 min a 48°C
- Etapa de inactivación del enzima: 5 min a 95°C

Los productos de la reacción de retrotranscripción se utilizaron para la amplificación de las bandas pertenecientes a *HAC1* activo/inactivo de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y sometidos a 25 ciclos de PCR de 94°C durante 30 s, 54°C durante 30 s, y 72°C durante 60 s.

Tampón PCR 10X	2,5 µL
Agua	16,37 µL
Producto de PCR	2 µL
Cebador SPHAC1-F	1 µL
Cebador SPHAC1-R	1 µL
dNTP mix (2,5 mM,cada uno)	2 µL
Polimerasa TAKARA Taq (5U/uL)	0,13 µL

Finalmente el producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 2% de acuerdo a las instrucciones del apartado 14.6.

14.5. Ensayos de restricción.

A lo largo de la presente tesis se han llevado a cabo reacciones con enzimas de restricción con el fin de obtener los fragmentos deseados para generar los plásmidos anteriormente descritos y para su posterior confirmación. Una reacción de digestión típica puede llevarse a cabo de la siguiente manera:

Enzima de restricción	1 µL (10 unidades es suficiente)
DNA	1 µg
Tampón 10X	5 µL (1X)
BSA	100 µg/mL (si es necesario)
Volumen total	50 µL
Tiempo de incubación	1 hora
Temperatura de incubación	Depende del enzima

En el caso de digestiones con varios enzimas de restricción se deberá optar por el tampón más óptimo para obtener la máxima actividad de cada enzima y evitar siempre una concentración de glicerol mayor al 5% del volumen de la reacción para evitar cortes inespecíficos en la muestra.

14.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo en geles horizontales de agarosa a una concentración variable (0,8-1,2% (p/v)) según el tamaño de los fragmentos a separar, preparados en tampón TBE 0.5X (Tris-HCl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM), que también fue utilizado como tampón de

electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% (p/v), xilen cianol 0,25% (p/v), glicerol 30%) y las electroforesis se realizaron a voltaje constante entre 2-10 V/cm según la concentración de agarosa y la resolución requerida. Para la detección del DNA se añadió al gel de agarosa 5µL de RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRION Biotech.) como alternativa no mutágena ni tóxica al bromuro de etidio. Las imágenes de los geles se capturaron con una cámara CCD COHU Modelo 4912-5010 y se visualizaron y exportaron a través del programa Scion Image para Windows.

14.7. Purificación y control de calidad de los ácidos nucleicos.

La purificación de los ácidos nucleicos se llevó a cabo utilizando el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de la recuperación de fragmentos determinados tras una reacción de restricción se aislaron los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa recortando con un escalpelo la banda de interés y se utilizó el mismo kit.

La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante NanoDrop™ 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware).

15. Transformación de levaduras mediante el método del acetato de litio.

Se utilizó el protocolo de transformación DNA/PEG LiAc/SS-*carrier* para introducir un plásmido específico o para generar recombinación homóloga entre un amplificado y un plásmido previamente cortado con extremos compatibles para la obtención de nuestro plásmido de interés [300]. De forma breve, se recogen las células por centrifugación a 3500 rpm durante 3 minutos tras asegurarnos que han completado por lo menos dos divisiones desde una OD₆₀₀ inicial de 0,2 y tenerlas por tanto en fase exponencial, permitiendo una mejor entrada del material genético al interior celular. Seguidamente y tras lavar con agua estéril, las células se resuspenden en 1 mL de acetato de litio 0,1 M, se vuelven a centrifugar y se resuspenden en 0,5 mL de acetato de litio 0,1 M, transfiriéndose 50 µL de la muestra en un nuevo tubo con la mezcla de transformación, que contiene:

Polietilenglicol (PEG)	240 μ L
Acetato de litio (LiAc)	36 μ L
SS-carrier DNA	50 μ L
Plásmido (0,5-1 μ g) + agua	34 μ L
Volumen total	360 μ L

Tras resuspender la mezcla con la pipeta incubaremos la reacción de transformación durante 40 minutos a 42°C y tras este tiempo centrifugaremos las células, las resuspenderemos en 100 μ L de agua destilada estéril y las sembraremos en el medio de selección adecuado. En el caso de selección por antibiótico dejaremos las células crecer en medio GPY durante unas 3 horas a 28°C para que exprese la resistencia e inocularemos la placa de GPY con antibiótico, dejando crecer las colonias durante 24-48 horas. Las colonias crecidas se pasarán a una nueva placa con antibiótico para evitar falsos positivos.

Es importante remarcar que en la transformación de *S. kudriavzevii* la transformación por este método difiere ligeramente debido a una menor tolerancia térmica que *S. cerevisiae*. Tras añadir la mezcla de transformación se incubarán las muestras a 30°C durante 30 minutos y seguidamente se le dará un choque térmico en un baño de agua a 42°C durante 20-25 minutos. Finalmente las células se recogerán por centrifugación y se sembrarán en el medio correspondiente.

16. Ensayo β -galactosidasa para medir la actividad UPR.

Las células BY4743 que contenían en plásmido multicopia pMCZ-Y (UPRE-LacZ) se crecieron durante toda la noche en medio SD-Ura a 28°C hasta alcanzar la fase logarítmica para el análisis ($OD_{600} \sim 0,4$). Seguidamente, las células se dividieron en matraces de 250 mL y se añadieron de forma separada 2mM de DTT y un 6% de etanol (v/v) en un volumen de medio SD-Ura total de 150 mL para cada matraz, con el fin de medir la inducción del gen LacZ en la célula bajo distintos estreses, actuando el DTT como control positivo del ensayo. Tras 1, 2 y 4 horas tras el estrés, se recogieron 15 unidades de OD_{600} de cada cultivo y tras lavar con agua destilada estéril, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido

hasta su posterior uso. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniendo tres réplicas biológicas por condición. La preparación de los extractos celulares y el ensayo de la actividad β -galactosidasa se llevó a cabo según Torres-Quiroz *et al.* (2010) [313]. Brevemente, las células congeladas se rompieron en un homogeneizador Bead Beater Mill Mix 20 (DOMEL®), añadiendo 500 μ L de tampón Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl y 1 mM MgSO_4) junto con 0,2 g de perlas de vidrio de 0,45 mm, alternando 30 segundos de rotura con 30 segundos en hielo para evitar el calentamiento de la muestra durante 5 ciclos. Tras centrifugar 2 minutos a 12000 rpm y recoger el sobrenadante se procedió a mezclar 5 μ L del extracto crudo, 495 μ L de tampón Z con BME (27 μ L por cada 10mL tampón Z) y 100 μ L de orto-nitrofenil- β -galactósido (ONPG), dejando actuar la hidrólisis enzimática durante 20 minutos a 30°C. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 250 μ L de 1M Na_2CO_3 y se midió la actividad de la enzima tras leer la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu). Se midió la cantidad de proteína en la muestra utilizando la técnica de Bradford a través del ensayo de proteínas de Bio-Rad y la actividad β -galactosidasa (U/mg proteína) se normalizó respecto a la concentración de proteína en la muestra a través de la fórmula:

$$\text{Actividad} = 100 * \frac{A_{420} * V_{\text{total}} (\mu\text{L})}{\epsilon_{\text{oNPG}} (420\text{nm}) * V_{\text{valorado}} (\mu\text{L}) * t (\text{min}) * \text{mg/mL proteína}}$$

Donde V total es el volumen total de la reacción (850 μ L), $\epsilon_{\text{oNPG}} (420\text{nm})$ es el coeficiente de extinción molar del oNPG (4,5 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$), V valorado es la cantidad de muestra utilizada en la reacción, t (min) es el tiempo de la reacción (20 min) y mg/mL de proteína es la cantidad de proteína en la muestra obtenida por el ensayo de Bradford.

Destacar que para cada medida de absorbancia a 420 nm se le restará el ruido de fondo a la muestra, para ello prepararemos un blanco que contendrá 5 μ L de tampón Z, 495 μ L de tampón Z con BME y 100 μ L de orto-nitrofenil- β -galactósido (ONPG), este blanco también se incubará en las mismas condiciones que las muestras. La figura M6 esquematiza el experimento realizado.

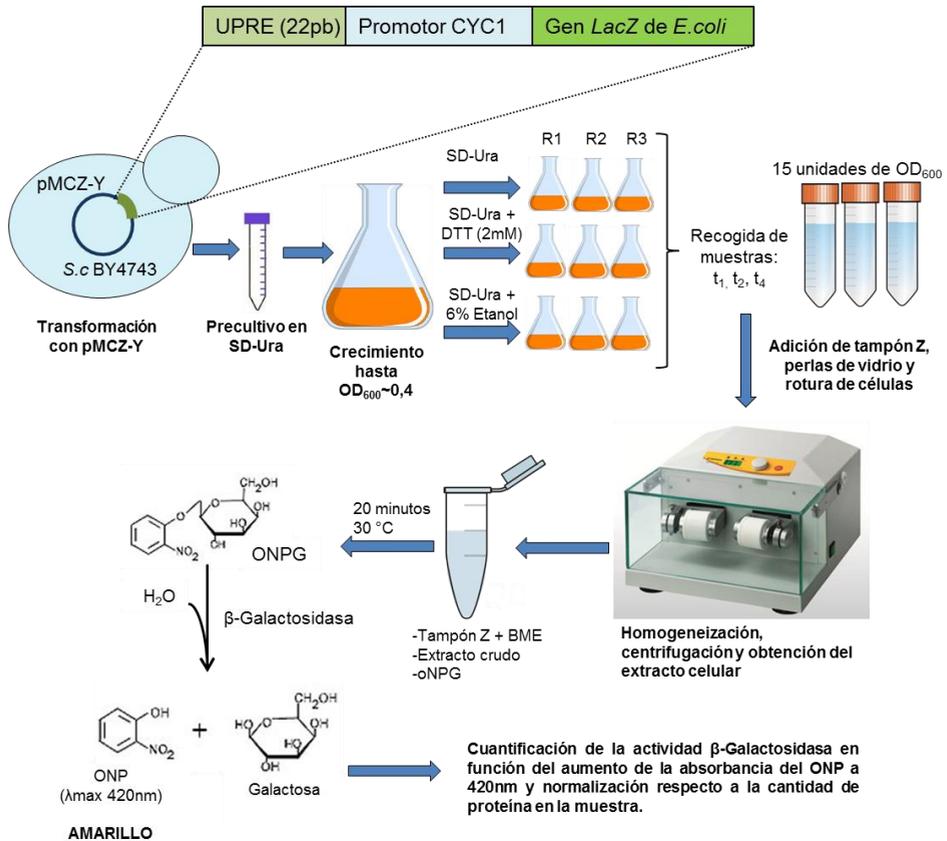


Figura M6. Pasos realizados para llevar a cabo la cuantificación de la UPR bajo estrés por etanol mediante el ensayo de la β -galactosidasa.

17. Análisis transcriptómico mediante micromatrices de DNA.

17.1. Condiciones de crecimiento y selección del tiempo del muestreo.

Se tomó una única colonia de capa cepa, CECT 10094 y Temohaya-26, a partir de las placas de GPY crecidas durante 24 horas a 28°C. Ambas cepas fueron incubadas de forma separada durante toda la noche en tubos estériles de 12 mL con 5 mL de GPY en un agitador orbital a 150 rpm a 28°C. Estos cultivos en fase exponencial se utilizaron para inocular 100 mL de GPY a una concentración inicial de 5×10^6 células/mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapones de algodón en ausencia y presencia de un 10% (v/v) de etanol. Se tomaron 50 mL de cada muestra para la extracción de RNA tras una hora de la inoculación en el matraz (respuesta temprana al estrés) y a las 10 horas en medio sin estresante (medio control) en ambas cepas y a las 28 horas y 40 horas en medio con etanol en la cepa CECT 10094 y Temohaya-26, respectivamente, coincidiendo con la etapa diauxica. Las muestras se recogieron de acuerdo a observaciones previas en las mismas condiciones de crecimiento para ambas cepas. Los cultivos se crecieron cabo por triplicado y se incubaron a 28°C a 150 rpm, monitorizando el crecimiento utilizando un espectrofotómetro (Eppendorf). Las muestras se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua DEPC y se pasaron a tubos de rosca de 2 mL, posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C para su posterior utilización.

17.2. Extracción de RNA total, síntesis de aa-CDNA y marcaje con Cy3 y Cy5.

La extracción del RNA se basó en tratamientos consecutivos con fenol-Tris, fenol-cloroformo (5:1) y cloroformo alcohol isoamílico (24:1), con una precipitación final con acetato de sodio, tal y como hemos descrito previamente en el apartado 14.2. La pureza y concentración de RNA se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware) y su integridad se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA complementario marcado fluorescentemente (cDNA) se llevó a cabo con el sistema SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System (Life Technologies™). Se mezclaron 20 µg de RNA total con 2,5 µg de oligo (dT)₂₀ (Invitrogen) en 16 µL de agua DEPC. La solución se calentó a 70°C durante 5

minutos y seguidamente se pasó a hielo durante 1 minuto. La transcripción reversa se llevó a cabo a 50°C en un horno de hibridación tras añadir al RNA anterior 12,5 µL de la siguiente mezcla de retrotranscripción:

Tampón 5X	6 µL
0,1 M DTT	1,5 µL
Mezcla dNTP+ aa-dUTP	2 µL
Inhibidor de ribonucleasas (10 U/µL)	1 µL
SuperScript III RT (200 U/µL) (400 U)	2 µL

De esta manera se sintetiza la primera cadena de cDNA a partir del RNA total utilizando nucleótidos modificados como el aminoalil-dUTP para una posterior incorporación del fluoróforo y marcaje indirecto de la sonda. El oligo (dT)₂₀ es una mezcla de 12 cebadores, cada con una cola poliT de 20 residuos de longitud seguidos de dos nucleótidos adicionales que permitirá al cebador hibridar solamente en el extremo 5' de la cola poli(A) del mRNA, dando lugar a una síntesis más eficiente de CDNA. Tras la reacción de retrotranscripción y con el fin de hidrolizar el RNA original, la muestra se incubó a 70°C durante 15 minutos con 10 µL de NaOH 1M y 10 µL de EDTA 0,5M pH 8. Finalmente el pH se neutralizó con 10 µL de HCl 1M, alcanzando un volumen final de 60 µL.

La purificación de aminoalil-cDNA (aa-cDNA) se llevó a cabo con el kit comercial MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, pero con la siguiente modificación: se empleó como tampón de lavado KPO₄ 5 mM a pH 8,5 y etanol al 80% en lugar de Tris para evitar interferencias en la unión de los fluoróforos al extremo amino de la cadena aminoalil. Seguidamente, se comprobó la eficiencia de la síntesis del aa-cDNA en el NanoDrop® ND-1000 (Programa Nucleic Acids, ssDNA, constante 37). Se obtuvo alrededor de 1-2 µg de cDNA. Por último, se concentró el aa-cDNA en el SpeedVac® Plus SC110A (Savant™) y se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

Cada muestra de aa-cDNA, que contenía entre 1,5-2 µg, se resuspendió con 3 µL de los fluoróforos NHS-Cy3 o NHS-Cy5 (Amersham GE Healthcare™, Amersham, UK) y 7 µL de agua y se añadió 1 µL de 0,2 M Na₂CO₃ a pH 9, para formar enlaces covalentes con los grupos aa-cDNA. Todas las muestras se marcaron con el fluoróforo Cy5, mientras que una mezcla de referencia preparada por una mezcla equimolar de todos los RNA extraídos de todas las

muestras se marcó con Cy3, permitiendo así la comparación de la expresión entre todas las muestras [79]. Las muestras se incubaron 2 horas a 25°C (temperatura ambiente) y en oscuridad para permitir la incorporación de los fluoróforos mediante un acoplamiento covalente. Esta forma de marcaje indirecto permitirá eliminar sesgos estéricos en la incorporación de un fluoróforo respecto al otro en la transcripción reversa, disminuyendo el ruido en los ratios de expresión medidos a baja intensidad. Finalmente se añadieron a las reacciones de marcaje 5 µL de acetato de sodio 100 mM pH 5,2 para detener la reacción de acoplamiento y la purificación de los Cy's-cDNA se realizó con el kit de purificación MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La eficiencia y calidad del marcaje de las muestras se llevó a cabo con el NanoDrop® ND-1000 (Programa Microarrays, constante 37), dándonos la concentración de cDNA y los nucleótidos incorporados marcados (pmoles). Solamente aquellas muestras con marcajes mayores a 100 pmoles se utilizaron en el ensayo. No se utilizó *dye-swap* (cambio de fluoróforos entre las muestras) ya que la proporción de genes con un sesgo en la incorporación de los fluoróforos ronda el 0,1%, siendo este problema más común en los marcajes directos que en los indirectos [314].

Para determinar la frecuencia de incorporación (FOI) se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{FOI: } [\text{Nucleótidos incorporados} \times 324.5] / [\text{A260} \times 37 \times \text{Volumen } (\mu\text{L})]$$

El valor debe estar comprendido entre el 50-100 %, solamente se compararon muestras con niveles de FOI similares para evitar sesgos en la intensidad de señal.

17.3. Hibridación y lavado de las micromatrices.

Las micromatrices se incubaron en solución de prehibridación (3X SSC; SDS 0,1 % (p/v); 0,1 mg/ml de BSA) a 42°C durante 60 min para minimizar el ruido de fondo y eliminar las sondas no incorporadas. Transcurrido este tiempo, se transfirieron a un contenedor portaobjetos con agua milliQ estéril durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se transfirieron consecutivamente, por periodos de 2 segundos, primero a un contenedor con isopropanol y más tarde a un contenedor con agua milliQ. Finalmente, se secaron por centrifugación a 1300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La hidridación competitiva se

llevó a cabo manualmente utilizando la misma cantidad de muestra marcada (100-200 pmol), concentradas en un Concentrator Plus (Eppendorf™, Hamburg, Alemania). La mezcla se resuspendió en solución de hibridación (formamida al 50% (v/v), 5X SSC; SDS 0,1% (p/v); 0,1 mg/mL de DNA de esperma de salmón), ajustándose a un volumen final de 60 µL con agua milliQ estéril. Posteriormente, las sondas se desnaturalizaron calentando a 95°C durante 1 min, se centrifugaron y se atemperaron 5 min a temperatura ambiente y la muestra se depositó en la micromatriz Yeast 6.4K Array (Microarray Centre, UHN, Toronto, Canadá) y se cubrió con un cubreobjetos Hybri-slip (60x40 mm; Grace Bio-Labs, Sigma), evitando a toda costa la formación de burbujas. La hibridación se llevó a cabo durante 16 horas utilizando cámaras AHC (ArrayIt Corporation, CA, EEUU) y se introdujo en un baño a 42°C. Tras la hibridación, las micromatrices se separaron de los cubreobjetos por inmersión durante 5 min a 42°C en la solución 1 [2X SSC; SDS 0,1% (p/v)] y seguidamente se sometieron a varios lavados consecutivos: 2 lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente en la solución 2 (0,1X SSC; SDS 0,1% (p/v)) 5 lavados de 1 min cada uno a temperatura ambiente en la solución 3 (0,1X SSC) y 10 segundos a temperatura ambiente en la solución 4 (0,01X SSC). Las micromatrices se secaron inmediatamente centrifugando a 1300 rpm durante 10 min y se guardaron en un recipiente protector del polvo y la luz hasta su escaneado. Cada micromatriz provino de una réplica biológica, obteniéndose un total de 24 cristales.

17.4. Adquisición y análisis de imágenes.

Una vez lavada la micromatriz, se escaneó inmediatamente, para minimizar la pérdida de señal con el tiempo, en un escáner con láser confocal GenePix 4100A (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., EEUU). Se utilizaron las longitudes de onda de 635 nm y 532 nm, correspondientes a los fluoróforos Cy3 y Cy5 respectivamente. Durante el escaneado se ajustaron las ganancias para que el cociente de las intensidades totales fuera lo más cercano a 1. El escaneado se llevó a cabo con una resolución de 10 µm realizando tres pases de lector y obteniendo una imagen en formato TIFF. Las imágenes de hibridación se capturaron y cuantificaron con el programa GenePix Pro 6.1 (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., EEUU). La normalización y el procesamiento de los datos se llevaron a cabo mediante el programa Acuity 4.0 (Axon Instruments, Molecular DevicesCorp., EEUU).

17.4.1. Análisis y tratamiento de los datos.

Se eliminaron manualmente del análisis todos los puntos defectuosos o de baja calidad y se llevó a cabo la eliminación del ruido de fondo utilizando el programa GenePix Pro 6.1 (Axon Instruments, Molecular Devices Corp., EEUU). Además también se eliminaron del análisis aquellos puntos cuya intensidad estaba muy cercana al ruido de fondo, quedándonos con aquellos puntos cuya relación señal/ruido (SNR) fuera mayor de 3 en ambos canales. Los valores de expresión que por defecto proporciona el programa es la media del logaritmo en base 2 del ratio (635/532) para cada punto del microarreglo. Al utilizar logaritmos del ratio (635/532) en lugar de la proporción directa (635/532) obtenemos datos distribuidos de una forma normal y podemos tratar los genes sobreexpresados y regulados a la baja de forma equivalente. En nuestro caso utilizamos la mediana ya que es menos sensible a valores extremos de intensidad del punto y obtenemos un valor representativo de la mayoría de los números del conjunto de datos. Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de los dos fluoróforos se normalizó basándose en el ratio, de forma que la media del ratio de las medianas fuera lo más próximo a 1. Este tipo de normalización a diferencia de la normalización tipo Lowess (basado en la intensidad de la señal) normaliza todos los puntos por igual. Los datos de las réplicas biológicas de cada condición (cada una representada por un microarreglo) se combinaron, considerándose por lo menos dos réplicas para obtener el dato de expresión. Para identificar aquellos genes cuya variación era debida al etanol, se realizó una comparación indirecta entre *microarrays* provenientes de muestras estresadas y no estresadas en el mismo punto temporal y para la misma cepa. Aquellos genes diferencialmente expresados con un nivel de confianza del 95% se identificaron como aquellos cuyo ratio de intensidades cambió en al menos 1,96 desviaciones estándar de la media [314], tras la normalización y sustracción entre *microarrays* provenientes de muestras estresadas y no estresadas (para la misma cepa y punto temporal), teniendo en cuenta que la varianza tras la resta de *microarrays* es de $2\sigma^2$. Se aplicó una tasa de descubrimientos falsos (False Discovery Rate, FDR) del 5% para corregir la aparición de falsos positivos.

El estudio de las ontologías génicas en los genes sobreexpresados se realizó mediante el uso de la herramienta web GO-Term finder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>), utilizando una corrección de Bonferroni y un p-valor umbral de 0,05. Con el fin de resumir y eliminar términos

GO redundantes, se utilizó el servidor web REViGO [315], que utiliza un algoritmo de agrupamiento basado en medidas de similitud semántica.

18. RT-PCR cuantitativa.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real precedida por la transcripción reversa (RT-qPCR) es una herramienta de detección y cuantificación de mRNA de gran sensibilidad y buena reproducibilidad, que sustituye a otras técnicas como el Northern-blot, para validar los resultados de transcriptómica (*microarrays*). La PCR en tiempo real difiere de la PCR clásica en que permite la detección en continuo de la amplificación del DNA a medida que va teniendo lugar. En esta técnica, además de los reactivos de la PCR convencional, se requiere de un compuesto marcado con un fluorocromo. La amplificación se lleva a cabo en un termociclador con capacidad para excitar el fluorocromo y detectar la fluorescencia emitida. Este compuesto fluorescente puede emplearse de dos formas, bien unido a un oligonucleótido específico que hibride con el producto de PCR a monitorizar o bien un compuesto que se una inespecíficamente y de forma dependiente del número de copias a todo ácido nucleico de doble cadena de la mezcla.

En el presente trabajo se empleó SYBR-Green, perteneciente al segundo grupo y que se une al surco menor del DNA, aumentando su fluorescencia conforme exista más cantidad de DNA al que unirse. La cantidad de amplicón producido en cada ciclo de amplificación es proporcional al número de moléculas de DNA/RNA inicial. Aquellas muestras con mayor cantidad de DNA/RNA inicial alcanzarán en un menor número de ciclos el umbral de detección de fluorescencia (Ct) que es el valor que se utilizará en la cuantificación y para comparar las distintas muestras entre sí. El complejo resultante entre el DNA y SYBR Green presenta el pico de absorción en $\lambda = 498$ nm y el de emisión en $\lambda = 522$ nm, correspondiente a la zona verde del espectro, de ahí su nombre.

La cuantificación puede realizarse en términos absolutos o relativos. En el primer caso, la estrategia es relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido en DNA empleando una curva de calibrado. En el segundo, utilizado en la presente tesis, se expresa el cambio en los niveles de expresión de mRNA, es decir, utilizamos un método de cuantificación relativa que no necesita curva de calibrado y compara el nivel de expresión del gen a estudiar con el de un gen de referencia (*housekeeping*, en inglés) cuya expresión no varía en las condiciones

del experimento, pudiendo así comparar entre múltiples experimentos de RT-qPCR. En nuestro caso se utilizaron dos genes como controles endógenos: el gen *RDN18-1* y *ACT1*.

18.1. Validación de los resultados obtenidos por transcriptómica.

La tecnología de los *microarrays* de expresión es la herramienta ideal para el estudio de patrones de expresión de miles de genes de forma simultánea. Sin embargo existe gran variabilidad de resultados atribuible a los aspectos técnicos y de análisis estadístico.

Los resultados de este estudio han permitido detectar diferencias de expresión de algunos genes de interés, pero también la necesidad de realizar estudios complementarios que confirmen las diferencias de expresión reveladas a través de la tecnología de los *microarrays*.

Para la validación de los resultados de los experimentos con *microarrays* se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real con las mismas muestras de RNA y siguiendo siempre las recomendaciones de la guía MIQE (del inglés, *minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*) [316]. Los cebadores específicos para amplificar los genes de interés se diseñaron a partir de las secuencias del GenBank mediante el programa PrimerBlast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y fueron sintetizados por Isogen Life Science (Ver tabla M2). El programa informático permite seleccionar la temperatura de fusión de los cebadores (alrededor de 60°C) y el tamaño deseado para el amplicón (entre 100 y 200 pb). De esta manera se pueden emplear las mismas condiciones en el termociclador para todas las muestras de un experimento.

El protocolo de extracción de RNA de las muestras se explica en el apartado 14.2. El RNA extraído con fenol se sometió a una etapa extra de limpieza mediante paso por una columna de un kit comercial (RNeasy Mini, Qiagen, Cat. nº 74104). La concentración y pureza del RNA se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 y la integridad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para la síntesis de cDNA de simple cadena se utilizó la transcriptasa reversa EuroScript de EuroGentec, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante:

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
Molde RNA total	400 ng	
10x tampón	2 µL	1x
25 mM MgCl ₂	4 µL	5 mM
2,5 mM dNTP	4 µL	500 µM de cada dNTP
Oligo dT ₁₅ VN	0,5 µL	1,25 µM
Random Nonamer	0,5 µL	1,25 µM
Inhibidor RNAsas	0,4 µL	0,4 U/µL
EuroScript RT	0,5 µL	1,25 U/µL
Agua libre RNAsas	hasta 20 µL	

Las etapas de la reacción de transcripción reversa, se llevaron a cabo en un termociclador TECHNE (Bibby Scientific Limited), en el que se programaron los siguientes ciclos, siguiendo las recomendaciones para el kit:

- Etapa inicial: 10 min a 25°C
- Etapa de Transcripción Reversa: 45 min a 48°C
- Etapa de inactivación del enzima: 5 min a 95°C

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se llevaron a cabo en un LightCycler® 480 96 System II, en placas blancas multipocillo de 96 de Roche. Cada reacción de 10 µL se compuso de:

SYBR Green I Master 2x	5 µL
Cebador directo (10 µM)	0,25 µL
Cebador reverso (10 µM)	0,25 µL
Agua calidad PCR	2,5 µL
cDNA diluido 1/10	2 µL

De cada pareja de cebadores se preparó un mix de reacción en cantidad suficiente para todas las muestras que se quisieran analizar, y se distribuyeron en la placa a razón de 8 µL por pocillo. Posteriormente se alicuotaron 2 µL de cada CDNA molde por pocillo.

Atendiendo a las recomendaciones del kit de reacción y del equipo, así como a la temperatura de fusión de los cebadores y tamaño del amplicón, se utilizó un programa de amplificación con las siguientes etapas:

- Preincubación: 5 min a 95°C
- Amplificación: 45 ciclos con tres etapas
 - Desnaturalización: 10 s a 95°C
 - Anillado: 10 s a 57°C
 - Extensión: 12 s a 72°C
- Curva de fusión para descartar amplificaciones inespecíficas
- Enfriamiento: a 4 °C

El software utilizado fue el LightCycler 480 v1.5.1.62 con la función de análisis Advanced Relative Quantification, la cuantificación relativa se llevó a cabo por el E-method de Roche Applied Science, capaz de generar datos de cuantificación relativa más precisos por compensación de las diferencias de eficiencia de amplificación del gen de referencia y el diana.

18.2. Análisis RT-qPCR de genes diana UPR.

Además de la validación de los datos de transcriptómica, también se utilizó la RT-qPCR para analizar la expresión de genes diana de la UPR en la cepa de laboratorio BY4741 bajo estrés por etanol (*INO1*, *ERO1*, *LHS1*, *MPD1*, *HLJ1*, *IRE1* y *HAC1*) y los genes *ITR1* e *ITR2*. Para ello se hizo crecer la cepa BY4741 durante toda la noche en medio SC a 28°C para, seguidamente, transferirla a 1,7 L de medio fresco SC y dejar que creciera hasta fase logarítmica ($OD_{600} \sim 0,4$). A continuación se repartieron 850 y 782 mL del cultivo en dos matraces, portando el segundo 68 mL de etanol para que la concentración alcanzará un 8% (v/v). Seguidamente cada matraz se dividió en tres matraces con 280 mL del medio y se hicieron crecer a 28°C a 150 rpm. Se recogieron 50 mL de cultivo mediante centrifugación durante 6 horas de crecimiento, obteniendo 6 puntos temporales pertenecientes a t_{5min} , $t_{0,50}$, t_1 , t_2 , t_4 , y t_6 horas. Las muestras se lavaron con agua libre de RNAsas, se pasaron a tubos de rosca de 2 mL y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su posterior uso. La obtención del RNA se realizó

mediante kit comercial Nucleospin RNA de Macherey-Nagel según las instrucciones del fabricante y el análisis RT-qPCR conforme a lo explicado en el anterior apartado. Tanto los experimentos de crecimiento como el análisis mediante RT-qPCR se hicieron por triplicado.

19. Análisis bioinformáticos.

Se estudió la región promotora de aquellos genes sobreexpresados en la cepa Temohaya-26 y CECT 10094 bajo estrés mediante la herramienta web Retrieve-seq [317] a través de la interfaz <http://fungi.rsat.eu/>, con ella se obtuvo la región promotora de gen, evitando el solapamiento con genes vecinos. Una vez obtenida la región promotora, se analizó utilizando YEASTRACT con el fin de contabilizar los lugares de unión a los factores de transcripción Msn2/4p, Hac1p, Hsf1p y Yap1p. Únicamente las regulaciones documentadas por datos publicados entraron en el análisis. Del mismo modo, se estudió el porcentaje de genes que portaban en su región promotora la secuencia consenso AGGGG (secuencia STRE).

En el caso del estudio aminoacídico de la proteína Hac1p se obtuvo la secuencia codificante de las cepas a estudiar a partir de los datos de Liti y col. (2003) [42] y Kellis y col. (2003) [318], disponibles en las siguientes direcciones web:

http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/sgrp/blast_original/

<http://www.yeastgenome.org/>

Las secuencias de DNA se pasaron a secuencia de aminoácidos utilizando el programa MEGA 5.0 (disponible en <http://www.megasoftware.net/>) y se analizaron los cambios aminoacídicos entre las cepas.

20. Acceso a datos

Los datos originales de los *microarrays* de la presente tesis doctoral están disponibles en la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de acceso GSE44863.

RESULTADOS

1. Estudio transcripcional de las diferencias adaptativas bajo estrés por etanol en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de fermentaciones tradicionales.

Actualmente el interés por las levaduras ha aumentado considerablemente debido a su amplia gama de aplicaciones, incluyendo la industria química, alimentaria, biomédica y ambiental, siendo el etanol el principal producto biotecnológico derivado de ellas. Aunque *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo productor de etanol por excelencia por su inherente tolerancia al etanol, su presencia en el medio puede convertirse en un importante factor de estrés durante la fermentación, limitando la productividad de los procesos fermentativos. Una alta tolerancia al etanol es una característica deseable en levaduras ya que permite al organismo dominar en un ambiente rico en azúcares e imponerse sobre otros organismos competidores. Además, la utilización de levaduras altamente tolerantes al etanol en la industria fermentativa contribuirá a disminuir el riesgo de paradas en la fermentación, causa de grandes pérdidas económicas en las empresas.

Por todo ello se hace necesario una mejor comprensión de los efectos que el etanol ejerce sobre las levaduras y de los mecanismos de respuesta a estrés asociados a él, pudiendo así desarrollar nuevas estrategias para mejorar la tolerancia microbiana a este compuesto.

Nuestra comprensión de la respuesta transcripcional y fisiológica al etanol es limitada ya que muchos estudios de transcriptómica se centran en cepas de laboratorio. Durante el proceso de adaptación a ambientes antrópicos, distintas cepas de *S. cerevisiae* se han visto sometidas a procesos selectivos generados por su uso inconsciente en la fermentación alcohólica, generando diferencias adaptativas entre ellas [33]. Así, cepas de *S. cerevisiae* aisladas de ambientes naturales o de diferentes fermentaciones presentan claras diferencias en sus propiedades, y es ahora cuando comenzamos a apreciar su diversidad fisiológica.

El presente capítulo se centra en comprender las bases genéticas que explican las diferencias adaptativas bajo estrés por etanol entre cepas de la misma especie de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de distintos procesos fermentativos. En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio [319] se emplearon técnicas de modelado estadístico para determinar los efectos del etanol sobre el crecimiento de diferentes especies y cepas de *Saccharomyces* aisladas de ambientes naturales y fermentativos. La metodología empleada permitió estimar la concentración de etanol a partir de la cual se observa una reducción del crecimiento de las levaduras (NIC) así como la concentración a partir de la cual ya no son capaces de crecer (MIC). A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas de ambientes fermentativos en base a sus diferentes respuestas frente al etanol. Se seleccionó una cepa bien adaptada a altas concentraciones de etanol, la cepa CECT 10094 cuyos valores de NIC y MIC son 4,7 % y 18 % (v/v), respectivamente, aislada de fermentación de velo de una fermentación estilo “Jerez”, y por otra parte la cepa Temohaya-26, aislada de la fermentación del jugo de las piñas de agave duranguense previamente cocidas para la obtención del mezcal y cuya tolerancia es mucho menor, con valores de NIC y MIC de 6 % y 12 %, respectivamente.

Con el fin de detectar diferencias adaptativas frente al etanol e identificar nuevos genes relacionados con su tolerancia en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26, se analizó el transcriptoma durante el crecimiento de las levaduras en ausencia y frente a un choque de un 10% de etanol mediante micromatrices de DNA. Las muestras se tomaron tras una hora de estrés, para observar los cambios tempranos en la respuesta a etanol y en la fase diaúxica. Esta fase se caracteriza por la escasez de nutrientes y la acumulación de metabolitos tóxicos en el medio, así como la utilización de etanol como fuente de carbono y la acumulación de glucógeno como fuente de polisacáridos [320]. Debido a que es una etapa de grandes cambios fisiológicos, el estudio del efecto del etanol sobre ella nos pareció de gran interés, además, si bien es cierto que hay numerosos estudios transcriptómicos centrados en las etapas tempranas tras choque por etanol, hasta ahora no existen estudios sobre el comportamiento transcripcional de las levaduras en este punto temporal. Además, al tratarse de cepas cuyo transcriptoma no se ha estudiado anteriormente, se intentará descubrir nuevos perfiles de expresión relacionados con el etanol que nos

puedan ayudar a reconocer genes relacionados con la respuesta a estrés y que no habían sido descritos anteriormente.

1.1. Crecimiento de las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 bajo estrés por etanol.

Aunque estudios previos en nuestro laboratorio ya detectaron diferencias en crecimiento de las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 bajo estrés por etanol en medio mínimo en microcultivos con placas multipocillo, se llevó a cabo la evaluación del crecimiento de ambas cepas en medio GPY (Figura 1.1A) y medio GPY con un 10% de etanol (Figura 1.1B). Nuestros resultados muestran una disminución de la tasa de crecimiento (μ) y un aumento la fase de latencia en ambas cepas en presencia de etanol. En presencia del estrés, la cepa CECT 10094, más tolerante al etanol, presentó un tiempo de duplicación 1,6 veces superior a la de la cepa Temohaya-26 (3,8 y 6,3 horas, respectivamente), y una fase de latencia menor (7 horas respecto a 13 horas en Temohaya-26). Estos resultados corroboran aquellos obtenidos previamente por nuestro grupo y demuestran que la cepa CECT 10094 presenta una capacidad de crecimiento mayor bajo estrés por etanol, pudiendo llegar a tolerar concentraciones del 18% (v/v) [319].

En vista de los resultados, la selección de CECT 10094 y Temohaya-26 es una opción adecuada para estudiar las diferencias transcripcionales bajo estrés por etanol en etapas tempranas y tardías del crecimiento. Los cultivos sin etanol no presentaron fase de latencia apreciable, con un tiempo de duplicación de 1,2 horas para ambas cepas. Estos perfiles de crecimiento tan similares nos garantizará para los siguientes estudios la ausencia de sesgos debidos a deficiencias basales del crecimiento entre las dos cepas.

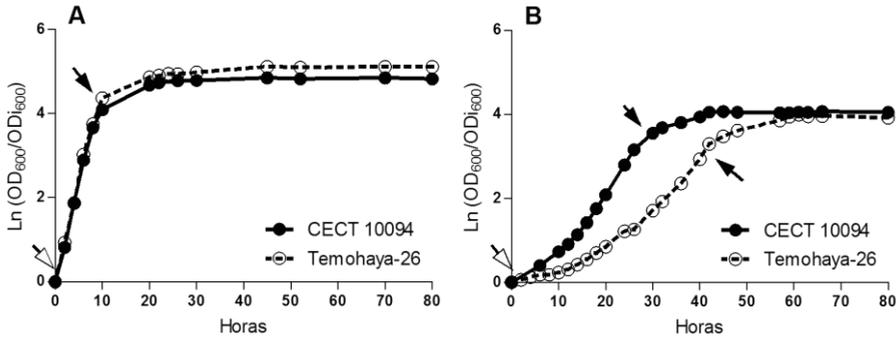


Figura 1.1. Crecimiento de *S. cerevisiae* CECT 10094 (●) y Temohaya-26 (○) en medio líquido GPY en ausencia (A) y en presencia de un 10% (v/v) de etanol (B). Las células fueron inoculadas a una densidad celular inicial de 5×10^6 células/mL. Las flechas indican el punto de muestreo para el estudio transcriptómico a una hora (flecha blanca) y en fase diaúxica temprana (flechas negras). Los cultivos se hicieron por triplicado y se incubaron a 28°C a 150 rpm.

1.2. Análisis de la expresión global en respuesta a estrés por etanol.

Con el fin de medir cambios globales en los niveles de expresión de cepas tolerantes y sensibles al etanol en etapas tempranas y tardías del estrés, se hicieron crecer las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 bajo un 0% y un 10% de etanol en GPY, comparándose el perfil transcriptómico para una misma cepa a un tiempo dado en presencia y ausencia de etanol, con el fin de obtener variaciones en la expresión debidas únicamente al efecto del etanol en el medio. Tras el filtrado, normalización y análisis de los datos (ver apartado 17.4.1 de material y métodos), se obtuvo una amplia lista de genes sobreexpresados o reprimidos en ambos puntos temporales (Ver tablas S5 y S6).

Como hemos citado anteriormente, nuestro objetivo es determinar aquellos genes sobreexpresados en la cepa más tolerante al etanol con el fin de dilucidar las características génicas que confieren tal tolerancia, es por ello que a pesar de presentar los resultados de transcriptómica de la cepa Temohaya-26, nuestros resultados se centraron en los datos reportados por la cepa CECT 10094, comparando nuestros resultados con anteriores trabajos y presentando genes cuya sobreexpresión bajo estrés por etanol no se ha descrito hasta la fecha.

1.2.1. Genes sobreexpresados tras una hora de estrés por etanol.

Durante la respuesta temprana a estrés por etanol, un total de 178 genes se expresaron de forma diferencial en ambas cepas (Figura 1.2), de ellos, 46 genes fueron sobreexpresados en la cepa más tolerante, siendo 26 exclusivos de dicha cepa. Algunos de estos genes sobreexpresados únicamente en la cepa CECT 10094 están relacionados con la respuesta a estrés oxidativo (*YDL124W*, *GRE3* y *NCE103*), transporte y utilización de prolina (*PUT4* y *PUT1*), síntesis de ácidos grasos monoinsaturados (*OLE1*), chaperonas moleculares como *HSP104* y *HSP32*, plegamiento de proteínas (*MPD1*) o procesos metabólicos de reserva de energía (*RGI1*), que ya han sido previamente descritos como genes clave en la tolerancia a etanol.

Ambas cepas compartieron la sobreexpresión de 20 genes, la mayoría de ellos relacionados con proteínas de choque térmico (*HSP42*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP31* y *HSP36*), biosíntesis de acetil-CoA, glicolisis y utilización del nitrógeno. En la cepa Temohaya-26, la mayoría de sus 31 genes sobreexpresados específicamente en esa cepa estaban relacionados con respuesta a estrés (*DDR2* y *ALD3*), esporulación, organización de la pared celular y genes con función desconocida. Como se esperaba, el estrés por etanol provocó la represión de genes que codifican componentes de la maquinaria de síntesis proteica. Este grupo representó el 64,3% y el 70.5% de todos los genes reprimidos en CECT 10094 y Temohaya-26, respectivamente.

Todos los genes cuya expresión varió de forma significativa en ambas cepas tras una hora de estrés por etanol se encuentran compilados en la tabla suplementaria S5. Los genes sobreexpresados respondieron a aquellos con un *fold change* mayor o igual 3,0 y 2,97 en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26, respectivamente, mientras que los genes reprimidos respondieron a aquellos con un *fold change* mayor o igual -2,30 y -3,10 en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26, respectivamente.

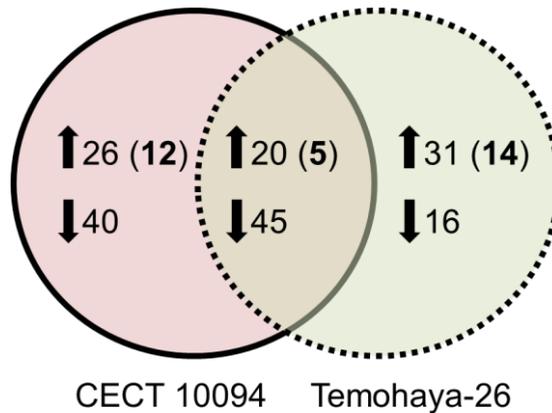


Figura 1.2. Diagrama de Venn mostrando el número de genes sobreexpresados (flecha hacia arriba) y reprimidos (flecha hacia abajo) en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 tras una hora de estrés por etanol. Los números en negrita indican los genes sobreexpresados no vistos en anteriores trabajos de expresión génica bajo estrés con etanol. Para más detalles consultar la tabla suplementaria S7.

Cabe destacar que algunas de las categorías GO (*Gene Ontology*) identificadas por análisis GO-TermFinder tras una hora de estrés por etanol estaban relacionadas con la respuesta a estrés oxidativo, metabolismo de la prolina, y procesos de biosíntesis de tiamina, a diferencia de la cepa Temohaya-26, que no presentó términos GO relacionados con mecanismos de tolerancia a etanol conocidos (Tabla 1.1). En cuanto a las categorías funcionales representativas de aquellos genes reprimidos por etanol para ambas cepas, la mayoría correspondían a procesos de biosíntesis y procesado y traducción del mRNA (Tabla S8).

Tabla 1.1. Enriquecimiento de categorías funcionales de genes sobreexpresados tras una hora de estrés por etanol en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26. Las categorías GO se analizaron utilizando la herramienta web GO-TermFinder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>), empleándose una corrección por Bonferroni y un p-valor de 0,05. Los términos redundantes se eliminaron utilizando el servidor web REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>).

Proceso Biológico	p-valor	Genes sobreexpresados	Genes que componen la GO
Cepa CECT 10094			
Respuesta a estrés oxidativo	0,0052	6	91
Metabolismo de las pentosas	0,0170	3	14
Procesos de óxido-reducción	0,0001	14	450
Procesos metabólicos de pequeñas moléculas	0,0054	17	49
Biosíntesis de compuestos con tiamina	0,0259	3	16
Metabolismo de la prolina	0,0393	2	9
Cepa Temohaya-26			
Procesos de óxido-reducción	0,0001	15	450
Catabolismo de carbohidratos	0,0048	7	120
Catabolismo de monosacáridos	0,0214	5	66

1.2.2. Genes sobreexpresados durante la fase diaúxica bajo estrés por etanol.

Durante la fase diaúxica en presencia de etanol, un total de 389 genes se expresaron de forma diferencial en ambas cepas (Figura 1.3), de ellos 178 genes fueron sobreexpresados en la cepa tolerante CECT 10094, siendo 159 exclusivos de dicha cepa. Algunos de ellos estaban relacionados con el plegamiento de proteínas (*ERO1*, *LHS1*, *SBA1* y *SSE2*), síntesis de ATP (*ATP1-4*, *ATP7* y *ATP20*), síntesis de ergosterol (*ERG5* y *ERG20*), proteínas de choque térmico (*HSP104*, *HSP31* y *HSP82*), transporte de ácidos grasos de cadena larga (*FAT1*), síntesis de fosfatidilcolina (*CHO2*), acidificación vacuolar (*VMA8* y *VMA10*), transposición (*YMR051C*, *YJR028W*, *YAR009C*, *YJR026W*, *YML045W*, *YML040W*, *YMR046C*, *YAR010C* e *YCL020W*), eliminación de radicales

superóxido (CUP1-1) y degradación de proteínas (CDC34, PRE1, PRE4, PRE6, PRE7, PUP2, RPN12, RPN5, RPN8, RPT4, RPT5, SCL1 y UBC).

Ambas cepas compartieron la sobreexpresión de 19 genes que estaban mayoritariamente relacionados con la respuesta a estrés (HSC82, YHB1 y MSN4), organización y biogénesis de la pared celular (YGP1 y ECM4) y transporte de aminoácidos (BAP2 y TAT1). En la cepa Temohaya-26 se sobreexpresaron específicamente 29 genes, algunos de ellos relacionados con el proceso metabólico del alcohol (ADH6), proteínas de choque térmico (HSP12) y esporulación (UBX6 y DIT1). Todos los genes cuya expresión varió de forma significativa en ambas cepas durante la fase diaúxica en presencia de etanol se encuentran compilados en la tabla suplementaria S6.

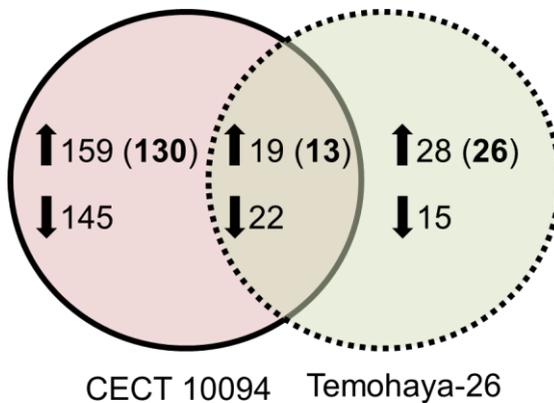


Figura 1.3. Diagrama de Venn mostrando el número de genes sobreexpresados (flecha hacia arriba) y reprimidos (flecha hacia abajo) en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 en fase diaúxica en presencia de etanol. Los números en negrita indican los genes sobreexpresados no vistos en anteriores trabajos de expresión génica bajo estrés con etanol. Para más detalles consultar la tabla suplementaria S9.

Los genes sobreexpresados respondieron a aquellos con un *fold change* mayor o igual 0,89 y 1,85 en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26, respectivamente, mientras que los genes reprimidos respondieron a aquellos con un *fold change* mayor o igual -1,94 y -2,30 en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26, respectivamente.

Algunas de las categorías GO (Gene Ontology) identificadas por análisis GO-TermFinder durante la fase diaúxica bajo estrés por etanol en la cepa CECT 10094 estaban relacionadas con procesos catabólicos independientes de ubiquitinación, transposición mediada por RNA, síntesis de ATP acoplado a transporte de protones, plegamiento de proteínas y transporte de protones.

Del mismo modo que el análisis GO tras una hora de estrés por etanol en la cepa Temohaya-26, no encontramos términos GO relacionados con mecanismos de tolerancia al estrés (Tabla 1.2). En cuanto a las categorías funcionales representativas de aquellos genes reprimidos durante la fase diaúxica, la cepa CECT 10094 presentaba GOs relacionadas con la biosíntesis de valina y procesos de óxido-reducción, mientras que la categoría funcional relacionada con el ciclo de asimilación del nitrógeno resultó estar reprimida en la cepa Temohaya-26 (Tabla S10).

Tabla 1.2. Enriquecimiento de categorías funcionales de genes sobreexpresados en fase diaúxica en presencia de etanol en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26. Las categorías GO se analizaron utilizando la herramienta GO-TermFinder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>), empleándose una corrección por Bonferroni y un p-valor de 0,05. Los términos redundantes se eliminaron utilizando el servidor web REViGO (<http://revigo.irb.hr/>).

Proceso Biológico	p-valor	Genes sobreexpresados	Genes que componen la GO
Cepa CECT 10094			
Proceso catabólico de proteínas independiente de ubiquitin proteasoma	0,0005	6	14
Transposición	0,0053	13	114
Transposición, mediada por RNA	0,0190	12	110
Procesos de óxido-reducción	0,0105	28	450
Transporte mitocondrial de electrones	0,0031	5	11
Transporte de electrones acoplado a síntesis de ATP	0,0062	7	30
Plegamiento de proteínas	0,0037	5	17
Cadena de transporte de electrones	0,0036	10	64
Transporte de protones	0,0293	7	42
Cepa Temohaya-26			
Biosíntesis de GMP	0,0007	3	5
Transporte de pirimidina	0,0118	2	2
Metabolismo de los nucleósidos monofosfato	0,0418	4	42
Biosíntesis de nucleósidos	0,0271	5	70

Es llamativo el hecho de que aunque se sobreexpresarán una gran cantidad de genes en la fase diaúxica en presencia de etanol (207 genes en total), solamente un 17,96% de ellos se habían asociado previamente con el estrés por etanol en estudios con *microarrays*, mientras que la sobreexpresión de un 59,74% de los genes tras una hora de estrés por etanol (77 genes en total) ya ha sido previamente descrita (para más detalles consultar tabla S7 y S9). Es probable que esto se deba a que la mayoría de los estudios de *microarrays* realizados hasta la fecha se han centrado en las etapas tempranas de la respuesta al estrés por etanol.

1.2.3. Genes sobreexpresados en ambos tiempos durante estrés por etanol

Además de estudiar la sobreexpresión génica tanto a una hora como en fase diaúxica nos pareció interesante observar aquellos genes que seguían sobreexpresándose más allá del inicio del estrés, es decir, aquellos genes sobreexpresados tanto a hora como en fase diaúxica ya que pueden tener una gran importancia no solamente para la respuesta temprana al estrés sino a lo largo de todo el crecimiento de la cepa. En la tabla 1.3 se muestra la descripción de aquellos genes comunes sobreexpresados en una misma cepa, tanto a una hora como en fase diaúxica, en presencia de etanol.

Tabla 1.3. Genes cuya sobreexpresión se mantuvo a lo largo del crecimiento en presencia de etanol. Los genes en negrita representan aquellos genes cuya sobreexpresión ya se ha observado en presencia de etanol en anteriores estudios de transcriptómica.

Gen	Función	Referencia
Cepa CECT 10094		
OYE3	Respuesta a estrés oxidativo; resistencia a acroleína; proceso apoptótico	[30]
YGP1	Ensamblaje de la pared celular	[30-32]
HSP31	Resistencia a estrés oxidativo y a niveles de nutrientes	[31-34]
HSP104	Plegamiento de proteínas en el retículo endoplasmático	[148, 159, 205, 253]
NCA3	Regulación de la expresión de las subunidades 6 y 8 de la Fo-F1 ATP sintasa	
PIC2	Transportador de cobre y fosfato inorgánico a la mitocondria	[148, 159, 212, 244, 253]
YMR090W	Desconocida	[32]
YML131W	Desconocida	[32]
Cepa Temohaya-26		
RCK1	Proteín quinasa relacionada con la respuesta a estrés oxidativo	
HSP12	Organización de la membrana plasmática durante condiciones de estrés	[30-36]
ECM4	Glutación transferasa	

1.3. Análisis de las secuencias promotoras de los genes sobreexpresados tras estrés por etanol

Se llevó a cabo un análisis bioinformático mediante análisis de secuencias utilizando la herramienta web RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools (ver apartado 19 de Material y Métodos) de los promotores de aquellos genes sobreexpresados exclusivamente en las dos cepas con el fin de obtener una visión global de su interacción con los principales factores transcripcionales implicados en la respuesta a estrés general (Msn2/4p), respuesta a calor (Hsf1p), respuesta a proteínas desplegadas (Hac1p) y estrés oxidativo (Yap1p). La razón de utilizar únicamente aquellos genes sobreexpresados que no eran comunes en las dos cepas fue la de intentar detectar una presencia mayoritaria de genes con lugares de unión para un determinado factor transcripcional en la cepa más tolerante, para así poder correlacionar más adelante ese tipo de respuesta a estrés con una mayor tolerancia al etanol. En la tabla 1.4 se exponen los resultados de dicho análisis.

Tabla 1.4. Análisis de la región promotora de los genes sobreexpresados exclusivamente en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 tras la adición de etanol. Los análisis se hicieron con la herramienta web YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com/>) y solamente aquellas regulaciones documentadas apoyadas por datos publicados se utilizaron en el análisis.

Factor Transcripcional	CECT 10094		Temohaya-26	
	1 hora	Fase Diaúxica	1 hora	Fase Diaúxica
Msn2p	65,4%	32,5%	90,3%	35,7%
Msn4p	65,4%	28%	87,1%	42,9%
Hsf1p	61,5%	17,2%	48%	17,9%
Hac1p	19,2%	5,7%	0,0%	0,0%
Yap1p	53,9%	29,3%	45,2%	39,3%

Así mismo, también se estudió el porcentaje de genes que portaban en su región promotora la secuencia consenso AGGGG (secuencia STRE), reconocida por los factores de transcripción Msn2/4p y que activan la ruta general de respuesta a estrés. Este estudio se realizó a partir de todos los genes sobreexpresados en una u otra cepa con el fin de observar el comportamiento de este tipo de respuesta y determinar si la respuesta general a estrés se mantiene a lo largo del crecimiento bajo la presencia de etanol o por el contrario disminuye una vez la célula ha reaccionado frente al estímulo. Los resultados se presentan en la figura 1.5.

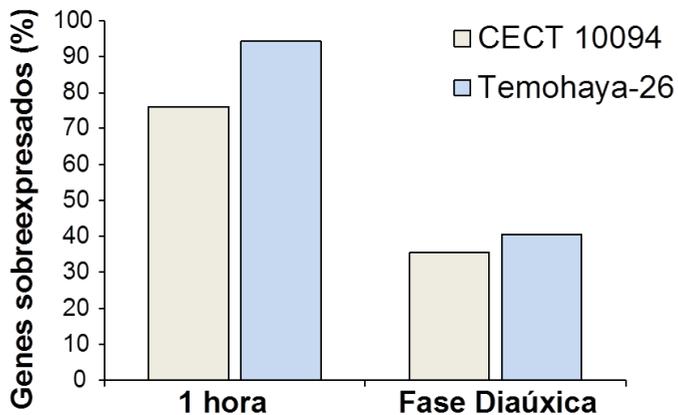


Figura 1.5. Porcentaje de genes sobreexpresados tras estrés por etanol que contienen elementos de respuesta a estrés (STREs) en sus regiones promotoras y han sido implicados en la respuesta a estrés general en levadura. La detección del patrón génico AGGGG se llevó a cabo utilizando la herramienta RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat>), restringiendo la búsqueda a aquellas regiones promotoras que contuvieran la secuencia en una de las dos posibles orientaciones y localizada entre los pares de bases -100 y -600.

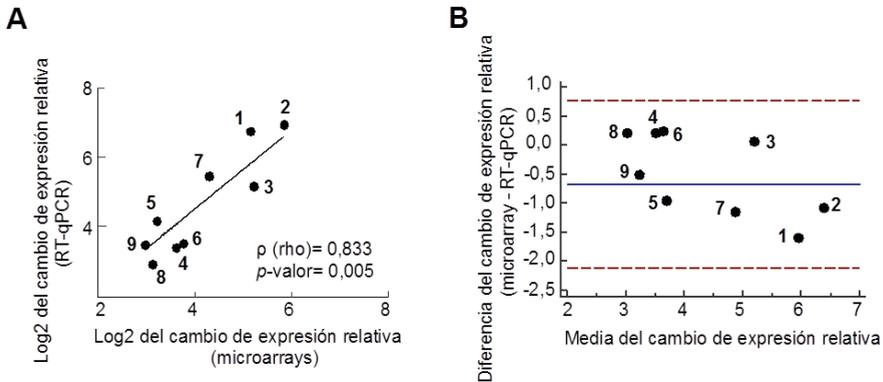
1.4. Validación de los datos de transcriptómica mediante RT-qPCR.

Los *microarrays* de DNA nos proporcionan una capacidad en el estudio del perfil genómico completo de la levadura como nunca antes se había visto, sin embargo, la calidad de los datos de expresión génica obtenidos pueden variar dependiendo de la plataforma y los procedimientos utilizados. Por ello, y con la intención de validar los perfiles de expresión obtenidos mediante el análisis por *microarrays*, se midió la expresión de varios genes cuya abundancia en mRNA aumentaba significativamente en presencia de etanol mediante RT-qPCR, utilizándose los genes *ACT1* y el gen ribosomal 18S como referencia. La elección de estos dos genes de referencia se debe a su utilización en la validación de *microarrays* mediante RT-qPCR en trabajos de estrés por etanol [159, 189, 221, 321] y en la observación mediante Northern Blot de la expresión constante de *ACT1* tras un choque de etanol del 8% (v/v) en la cepa S288C [322].

En general, existe una gran interdependencia entre los datos de *microarrays* y los datos de RT-qPCR, obteniéndose un coeficiente de correlación de Spearman (ρ) de 0,833 (p -valor = 0,0053) (Figura 1.6A). Hay que destacar que el estudio de correlación se llevó a cabo con genes en los que se observó una sobreexpresión tras estrés por etanol, de acuerdo con las indicaciones de anteriores trabajos de validación de *microarrays*, ya que la utilización de genes con poca variación en su expresión, así como con bajas intensidades (p.e: genes reprimidos) son inadecuados, ya que generan una alta variabilidad y por lo tanto una baja correlación [323, 324].

Debido a que una alta correlación no implica que exista una buena concordancia entre los dos métodos ya que simplemente mide la intensidad de la asociación entre dos variables, se analizó la concordancia entre las mediciones por *microarrays* y RT-qPCR mediante el método de Bland-Altman para evaluar si las diferentes técnicas producen resultados similares al aplicarse a la misma muestra (Figura 1.6B). Este tipo de análisis ha sido ampliamente utilizado en la comparación de resultados de transcriptómica entre varias plataformas (Affymetrix, Agilent, Illumina...) para evaluar su fiabilidad [325] así como en la comparación de resultados de expresión obtenidos mediante *microarrays* y RT-qPCR [326]. El gráfico muestra que todos los niveles de expresión están dentro

de los límites de un intervalo de confianza del 95%, sugiriendo una concordancia razonable en los niveles de expresión obtenidos con ambos métodos.



Número	Gen	Cepa	Muestra
1	ACS1	CECT 10094	1 hora
2	ACS1	Temohaya-26	1 hora
3	ALD4	CECT 10094	1 hora
4	OPI3	CECT 10094	1 hora
5	OPI3	Temohaya-26	1 hora
6	TFS1	CECT 10094	1 hora
7	TFS1	Temohaya-26	1 hora
8	HSC82	CECT 10094	Diaúxica
9	ERO1	CECT 10094	1 hora

Figura 1.6. Validación de datos de transcriptómica. (A) Análisis de correlación de los valores obtenidos por *microarrays* y RT-qPCR. Los datos de expresión relativa de la RT-qPCR para tres réplicas biológicas, provenientes del mismo RNA utilizado para los *microarrays*, se expresaron en log2 y se utilizó su media para el análisis de correlación junto con los datos de expresión de los *microarrays*, utilizándose también la media de la expresión en log2 de esas mismas réplicas. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ) para datos no paramétricos debido al bajo número de muestras. (B) Gráfica de Bland-Altman de concordancia de métodos. El eje X representa la media del cambio de expresión para ambos métodos, mientras que el eje Y es su diferencia (microarray-RT-qPCR). La línea continua ($y = -0,52$) es la media de las diferencias en el cambio de expresión de todas las muestras. Las dos líneas discontinuas representan dos desviaciones estándar de la media de las diferencias.

1.5. Relación entre tolerancia a etanol y pH ácido.

En vista de los resultados obtenidos por transcriptómica, donde observamos la sobreexpresión de genes relacionados con la acidificación vacuolar (*VMA6*, *VMA8* y *VMA10*) y cuya delección supone una mayor sensibilidad al etanol [59, 223], intentamos relacionar la tolerancia a bajo pH con el etanol, si el etanol causa acidificación citosólica por la entrada de protones a través de la membrana plasmática y esto dispara la acidificación vacuolar vía V-ATPasa para restaurar el pH intracelular [231], tiene sentido pensar que las cepas tolerantes a etanol son también más tolerantes al crecimiento en pH ácidos. Por lo tanto llevamos a cabo un análisis del crecimiento de las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 en medio GPY modificado con un 8% y un 10% de etanol y diferente pH (Figura 1.7).

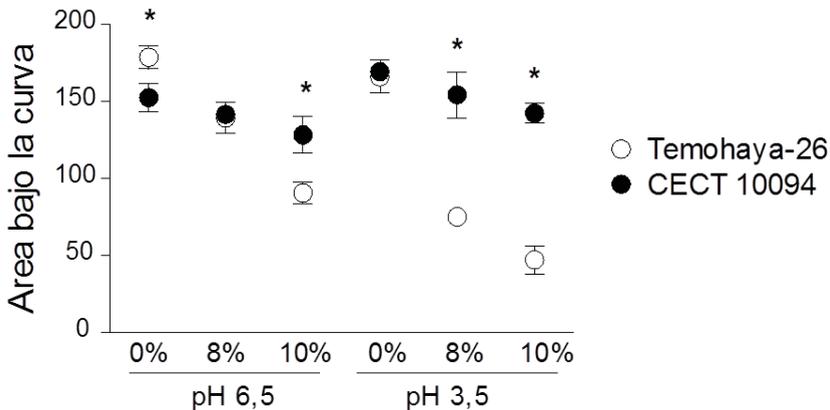


Figura 1.7. Comparación del área bajo la curva OD₆₀₀/tiempo entre las cepas Temohaya-26 y CECT 10094 en ausencia y presencia de etanol (8% y 10%) en medio GPY a pH 6,5 y 3,5. Las lecturas se tomaron cada media hora en placas multipocillo durante 4 días a 28°C y el área bajo la curva se obtuvieron por el método trapezoidal utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San diego California USA). Los asteriscos indican diferencias de crecimiento entre cepas (p -valor<0.05). Los experimentos se realizaron por triplicado.

La cepa Temohaya-26 alcanzó una OD máxima en medio GPY superior que la cepa CECT 10094 en condiciones no estresantes a pH 6,5, tal y como ya observamos en la figura 1.1, con un área bajo la curva de $178,70 \pm 7,50$ y $152,60 \pm 9,29$, respectivamente. Sorprendentemente, la cepa Temohaya-26 cambió su comportamiento dependiendo del pH bajo estrés por etanol. A pH 6,5,

ambas cepas mostraron una tolerancia similar bajo un 8% de etanol, al contrario que con un pH más ácido (3,5), donde el área de la cepa menos tolerante se redujo casi a la mitad. Bajo una concentración de etanol del 10% la diferencia entre las áreas de las dos cepas aumentó desde 1,42 a pH 6,5 hasta 3 veces en condiciones ácidas, siendo en todos los casos CECT 10094 más tolerante al etanol. El hallazgo más interesante fue que la cepa más tolerante mostró un mejor crecimiento bajo condiciones ácidas que en un medio GPY estándar, incluso en presencia de etanol. Por el contrario, la cepa Temoahay-26 redujo su crecimiento en un 72% bajo la acción sinérgica del etanol y pH ácido en comparación con un medio GPY estándar modificado con etanol.

Por otra parte, y para corroborar los resultados anteriores, crecimos de forma adicional 6 cepas más de *S. cerevisiae* (ver tabla M1 de material y métodos para más información) en medio GPY a pH 3,5 en ausencia y en presencia de un 10% de etanol para determinar si hay correlación entre una mayor tolerancia a pH ácido con mayor tolerancia a etanol (Figura 1.8). Tras el análisis de Shapiro–Wilk para analizar la normalidad de los datos se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson para contrastar la independencia de las variables, obteniendo un coeficiente de correlación (r) 0,933 y un p-valor de 0,0007, mostrando una correlación significativa.

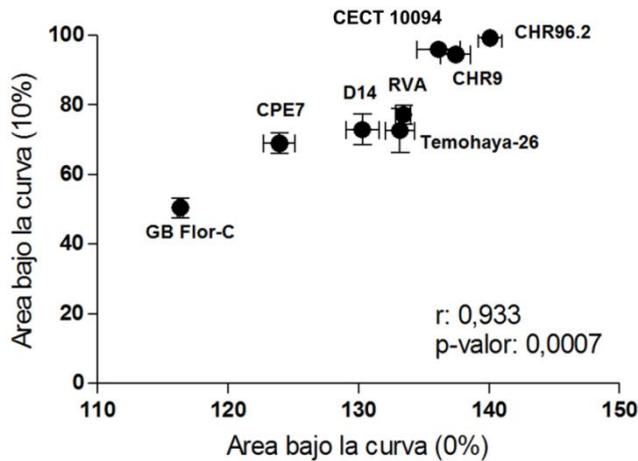


Figura 1.8. Comparación del área bajo la curva OD_{600} /tiempo entre diferentes cepas de *S. cerevisiae* en ausencia y presencia de etanol en medio GPY a pH 3,5. Los experimentos se realizaron por triplicado en placas multipocillo y las lecturas se analizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San diego California USA). Se utilizó el análisis de correlación de Pearson para contrastar la independencia de las variables, obteniéndose un coeficiente de correlación (r) de 0,933 (p -valor: 0,0007).

1.6 Conclusiones.

Los *microarrays* de DNA son una potente herramienta para el estudio de los cambios en el estado intracelular de la levadura tras su exposición a un agente estresante. Nuestros resultados muestran la importancia de la acumulación de prolina, síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, chaperonas moleculares y respuesta a estrés oxidativo y proteínas desplegadas para una mayor tolerancia al etanol y arrojan nuevos datos sobre la sobreexpresión de genes no observados previamente frente a este estrés abriendo nuevos estudios en la tolerancia a este metabolito. Especial mención tiene el gen *YNL134C*, que aunque en nuestro caso no llegamos a estudiarlo en profundidad no cabe duda de su importancia frente a este estrés y su posible rol como detoxificante de aldehídos es realmente interesante. Nuestro estudio ha servido además para demostrar la correlación existente entre una alta tolerancia a ambientes ácidos y el etanol en diferentes cepas de *S. cerevisiae* y nos ha dado pie al estudio de la

respuesta a proteínas desplegadas (UPR), el cual se abordará en los siguientes capítulos de la presente tesis. Finalmente es importante mencionar el gran dinamismo generado por el estrés en cuanto a la gran cantidad de genes cuya expresión varía a lo largo del tiempo, muy pocos se mantuvieron sobreexpresados en ambos puntos temporales, mostrando como la tolerancia a etanol es un procedimiento de numerosos eventos interactuando a lo largo del tiempo, siendo esta red de genes inducidos más importante para la adaptación al estrés que el efecto de un único gen.

2. Estudio de la activación y causas de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en *Saccharomyces cerevisiae* frente a estrés por etanol.

El disparo de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático (RE) en *S. cerevisiae* se produce por diversos factores, como la presencia de proteínas desplegadas en el lumen del mismo, falta de inositol en el medio, daños en la pared celular y recientemente se ha visto en mamíferos la activación de la UPR en membranas con una composición lipídica alterada, donde predominan ácidos grasos saturados que afectan al comportamiento de los dominios transmembrana de Ire1p al alterar las propiedades biofísicas de la membrana [327-329].

Aunque durante la realización de la presente tesis doctoral han salido a la luz varios trabajos que también apuntan al etanol como un activador de la UPR en *S. cerevisiae* [287, 330], poco se sabe acerca de las causas de dicha activación. Mientras que hay autores que opinan que la UPR se dispara por el desplegamiento de proteínas generado por el etanol en la célula [330], existen trabajos que afirman que la desnaturalización de proteínas en presencia de etanol ocurre a concentraciones mucho mayores de las que hasta ahora se han visto que activan la UPR [331-333], además el pH intracelular de la célula (alrededor de 6,5) dificulta todavía más la desnaturalización, necesiándose más cantidad de etanol [332]. Debido a su naturaleza anfipática, el etanol es capaz de difundir libremente e incorporarse sin dificultad en la bicapa lipídica, al unirse su grupo OH al grupo fosfato de las cabezas lipídicas y su cola hidrófoba al núcleo hidrófobo de la membrana, disminuyendo la interacción entre las colas de fosfolípidos a través de las fuerzas de van der Waals, aumentando su fluidez y disminuyendo la fuerza de unión entre las proteínas embebidas en la membrana y los fosfolípidos adyacentes [334], este hecho podría ser clave en la activación de la respuesta y será una de las hipótesis sobre las que trabajaremos en este capítulo.

Nuestros objetivos en esta parte de la tesis se centran en estudiar la activación de la UPR tras estrés por etanol en la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* BY4741, establecer la importancia de la ruta en la tolerancia frente al estrés y

finalmente determinar las causas de su activación. Nuestros resultados arrojan luz sobre los verdaderos motivos de la activación de la UPR bajo estrés por etanol y dejan a un lado, creencias generales sobre los efectos del etanol en las células.

2.1. *Screening* de mutantes sensibles al etanol mediante goteo en placa y análisis de su región promotora.

De acuerdo con los datos de *microarrays* presentados en el capítulo 1 de la presente tesis, se seleccionaron 32 mutantes de delección pertenecientes a la colección EUROSCARF (Frankfurt, Alemania) junto con su fenotipo silvestre BY4743 con el fin de estudiar la sensibilidad a altas concentraciones de etanol. Este ensayo se realizó por triplicado tanto en GPY como en medio SC para detectar posibles diferencias en el crecimiento en base al medio de cultivo utilizado. Los 32 genes se seleccionaron en base al cambio de la intensidad de fluorescencia (*fold change*) entre la cepa CECT 10094 y Temohaya-26 (Tabla 2.1), escogiéndose aquellos genes cuya expresión en la cepa más tolerante a etanol era mucho mayor que en la cepa sensible.

Tabla 2.1. Genes seleccionados para el estudio de tolerancia al etanol mediante goteo en placa en mutantes BY4743. Los genes en negrita indican aquellos genes cuya delección provocó sensibilidad frente al etanol y un asterisco a su lado indica lugares UPRE en su región promotora. Aquellos genes cuya delección provoca sensibilidad al etanol observados previamente aparecen subrayados [59, 223, 225, 244, 283].

GEN	Fold change CECT 10094	Fold change Temohaya- 26	Diferencia de fold change	Función
Sobreexpresados tras 1 hora de estrés por etanol				
<i>THI12</i>	4,30	0,55	3,75	Biosíntesis de tiamina
<i>MPD1</i>	3,31	0,35	2,96	Plegamiento de proteínas
<i>RGI1</i>	3,22	0,37	2,85	Proceso metabólico de reserva de energía
<i>CTR2</i>	3,69	1,08	2,61	Transporte intracelular de cobre
<i>NCA3</i>	3,60	1,49	2,11	Organización de la mitocondria
<i>PUT4</i>	3,30	1,30	2,01	Transporte de prolina
<i>FMP34</i>	3,11	1,36	1,76	Desconocida
<i>PIN3</i>	3,10	1,42	1,68	Organización y biogénesis del citoesqueleto de actina
<i>PIC2</i>	3,60	2,02	1,58	Transporte de fosfato
Sobreexpresados en fase tardía de estrés por etanol				
<i>YDR026C</i>	2,07	-1,00	3,07	Silenciamiento de la cromatina en rDNA
<i>DOS2</i>	1,62	-0,84	2,46	Desconocida
<i>RVS161*</i>	1,68	-0,64	2,32	Polarización del citoesqueleto de actina, respuesta a estrés osmótico.
<i>ATP1</i>	1,24	-1,01	2,25	Síntesis ATP
<i>YKR023W</i>	1,90	-0,30	2,20	Desconocida
<i>YCR016W</i>	1,01	-1,11	2,12	Desconocida
<i>YIL060W</i>	1,65	-0,37	2,02	Desconocida
<i>FAT1</i>	1,29	-0,70	1,99	Transporte de AG de cadena larga
<i>ERP2</i>	1,71	-0,23	1,94	Transporte del RE a Golgi
<i>YPR148C</i>	1,42	-0,43	1,86	Desconocida
<i>HAL1*</i>	2,32	0,54	1,78	Tolerancia a sal
<i>YLR297W</i>	1,63	-0,13	1,76	Desconocida
<i>ARF1*</i>	1,63	-0,09	1,71	Transporte del RE a Golgi
<i>HLJ1*</i>	1,40	-0,31	1,71	Catabolismo de proteínas dependiente de ubiquitina asociado al RE
<i>PHB2</i>	1,74	0,06	1,68	Plegamiento de proteínas
<i>CIR1</i>	1,29	-0,38	1,67	Desconocida
<i>VMA8</i>	1,41	-0,20	1,61	Acidificación vacuolar
<i>ADE4*</i>	1,98	0,37	1,61	Biosíntesis de purinas
<i>QCR6*</i>	2,00	0,39	1,61	Fosforilación oxidativa
<i>SAT4</i>	2,32	0,82	1,49	Tolerancia a sal
<i>LHS1*</i>	1,15	-0,32	1,47	Respuesta a proteínas desplegadas
<i>BUG1</i>	1,38	-0,07	1,44	Transporte del RE a Golgi
<i>HSP31</i>	1,69	0,26	1,44	Respuesta a estrés oxidativo y nutrientes

Entre las 23 cepas mutantes analizadas pertenecientes a los genes sobreexpresados durante la fase tardía de estrés, 10 cepas (44%) fueron

incapaces de crecer en todas las diluciones probadas con un 10% de etanol (Figura 2.1). La susceptibilidad al etanol se observó en las cepas que tenían deletados los genes *RVS161*, *ATP1*, *HAL1*, *ARF1*, *HLJ1*, *VMA8*, *ADE4*, *QCR6*, *LHS1* y *HSP31*, genes relacionados mayoritariamente con la respuesta a proteínas desplegadas, respuesta a estrés, acidificación vacuolar y síntesis de ATP. Cuatro de estos genes (*HAL1*, *ARF1*, *HLJ1* y *HSP31*) que se relacionan con la respuesta a estrés salino, transporte desde RE a Golgi por vesículas, procesos catabólicos de proteínas asociados a RE y respuesta a estrés oxidativo y nutrientes, respectivamente, no han sido propuestos como mutantes sensibles a etanol en anteriores trabajos. Curiosamente, ninguno de los 9 mutantes cuyo gen estaba sobreexpresado tras una hora de estrés por etanol mostró fenotipo sensible. Resultados similares fueron observados en medio sintético completo (datos no mostrados). Los resultados de los goteos de los 32 genes en sus placas originales pueden verse en la figura 2.2.

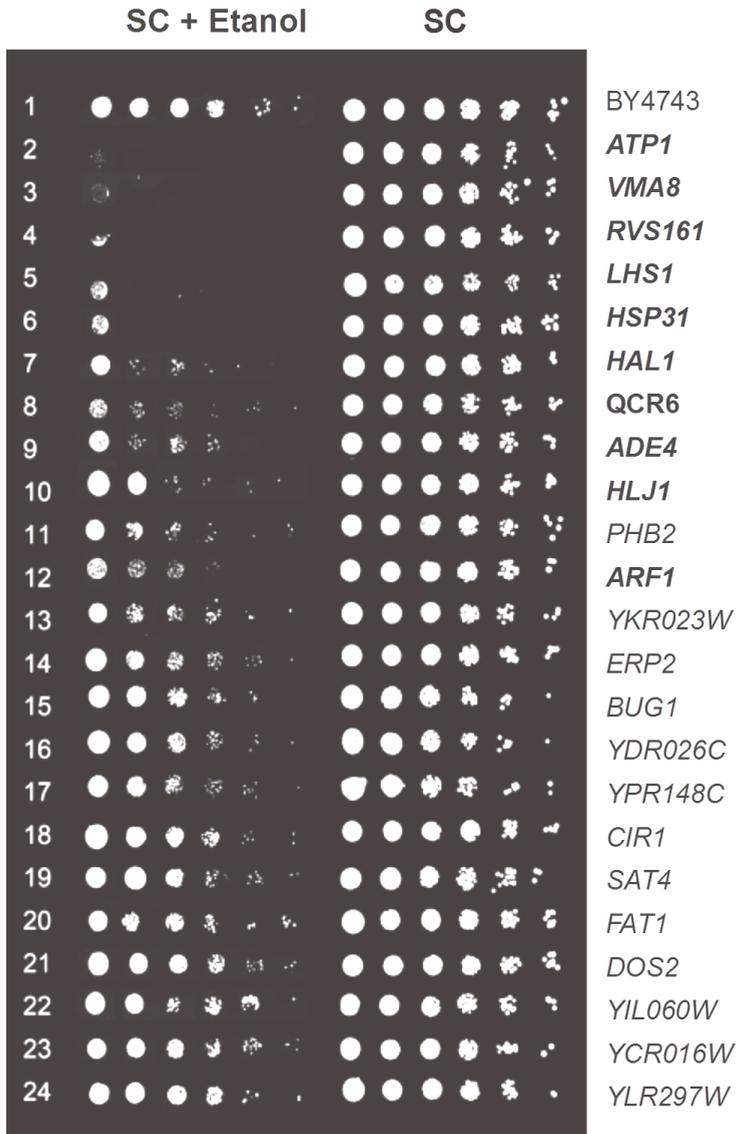


Figura 2.1. Sensibilidad al etanol de mutantes *S. cerevisiae* BY4743. Los clones de delección correspondientes a 23 genes sobreexpresados en la cepa CECT 10094 bajo estrés por etanol durante fase tardía de estrés se obtuvieron de la colección EUROSCARF. Las cepas se crecieron hasta fase exponencial en medio líquido SC y se realizaron goteos en placas SC sin etanol (columna derecha) y con un 10% de etanol

(columna de la izquierda), incubándose durante 4 días a 30°C. La cepa parental BY4743 se utilizó como control. Los genes en negrita indican mutantes susceptibles a etanol. Los experimentos se realizaron por triplicado y la disposición de las cepas en la imagen proviene de una reordenación de acuerdo al grado de sensibilidad al etanol.

El análisis de las secuencias promotoras mediante la herramienta web YEASTRACT (ver apartado 19 de Material y Métodos), de los 10 genes cuya delección provoca sensibilidad al etanol mostraron que la mitad de ellos (*RVS161*, *HAL1*, *HLJ1*, *QCR6* y *LHS1*) contenían lugares de unión para el factor de transcripción Hac1p, sugiriendo una vez más la importancia de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) con la tolerancia a etanol.

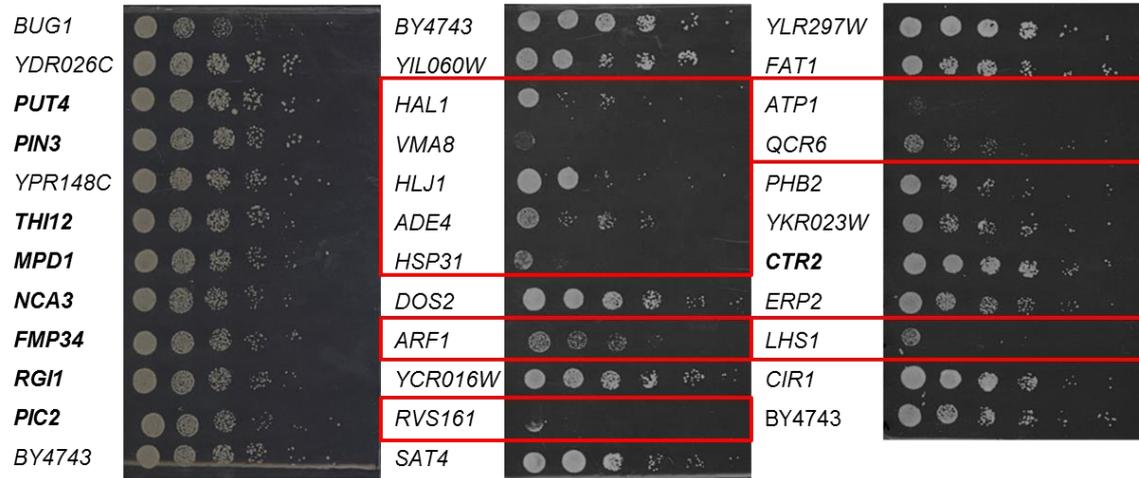


Figura 2.2. Sensibilidad al etanol de mutantes *S. cerevisiae* BY4743. Los clones de delección correspondientes a 32 genes sobreexpresados en la cepa CECT 10094 tras una hora y durante fase tardía de estrés por etanol se crecieron hasta fase exponencial en medio líquido SC y se realizaron goteos en placas SC sin etanol y con un 10% (v/v) de etanol, incubándose durante 4 días a 30°C. La cepa BY4743 se utilizó como control en cada una de las placas. Los genes en negrita corresponden a los sobreexpresados tras una hora de estrés y aquellos cuya delección provocó un fenotipo sensible en presencia de etanol se muestran dentro de un rectángulo rojo. No se observaron diferencias de crecimiento entre las cepas en el medio control. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2. Estudio de la activación de la UPR durante estrés por etanol en la cepa BY4741.

2.2.1. Estudio del *splicing* de *HAC1* en presencia de etanol y expresión de *IRE1* y *HAC1* mediante RT-qPCR.

Con el fin de obtener un perfil cualitativo del disparo de la respuesta a proteínas desplegadas tras la exposición a etanol, se llevó a cabo un análisis RT-PCR en la cepa de laboratorio BY4741 crecida en medio SC en presencia y ausencia de un 8% de etanol a lo largo de 7 puntos temporales que engloban un total de 8 horas de crecimiento (ver apartado 14.4 de Material y Métodos), obteniendo un patrón de bandas representado en la figura 2.3. Como puede observarse, el *splicing*, la activación de la respuesta UPR en la levadura en presencia de etanol se produce de manera muy rápida, ya que prácticamente tras la adición de etanol, la respuesta a proteínas desplegadas se dispara, observándose la banda de 584 pb correspondiente a la forma activa del factor de transcripción (*HAC1*^l) a los 5 minutos tras la adición de etanol, para ir disminuyendo en intensidad hasta prácticamente desaparecer más allá de las 4 horas de estrés. Por el contrario, no se observó prácticamente activación de *HAC1* en el grupo control (sin etanol), manteniendo la forma inactiva (*HAC1*^u) de forma constante a lo largo del estudio (nótese un error de carga en la carrera número 3, pero que no afecta al resultado ni a la interpretación de estos).

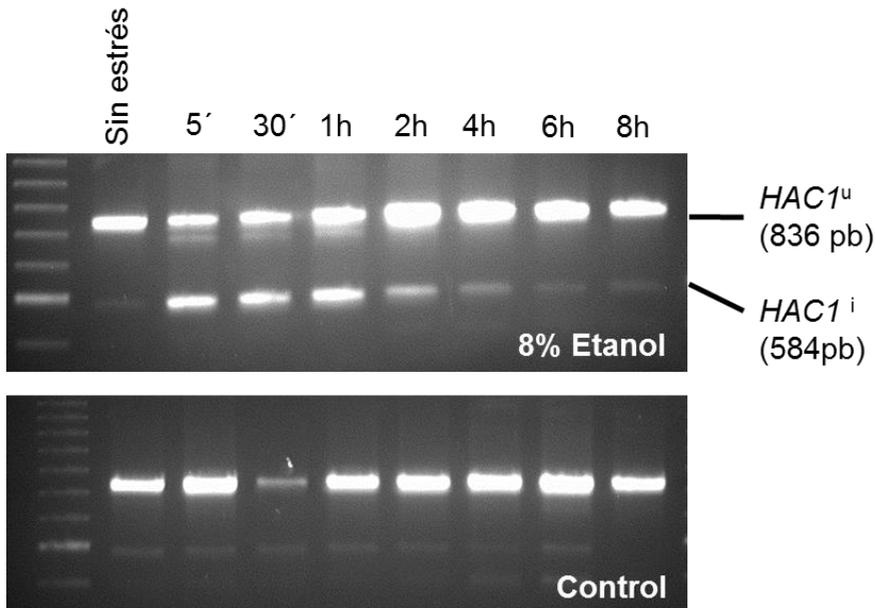


Figura 2.3. Activación de la UPR tras estrés por etanol. La cepa BY4741 se hizo crecer exponencialmente en medio SC (carrera 1) y fue estresada por adición de etanol hasta una concentración final del 8% (v/v) e incubada durante 8 horas, tomando muestras a los tiempos indicados. Las muestras de RNA se sometieron a RT-PCR utilizando cebadores específicos de *HAC1* que permitieran observar la forma inactiva ($HAC1^i$) y activa ($HAC1^u$) del factor de transcripción.

Posteriormente se realizó un análisis mediante RT-qPCR de la expresión relativa de los genes *HAC1* e *IRE1* en las mismas muestras, para comprobar lo que parecía ser un aumento de la expresión de *HAC1* en presencia de etanol (obsérvese el aumento en intensidad de la banda de $HAC1^u$ tras 2 horas de estrés por etanol). Los resultados muestran un ligero aumento de la expresión de *HAC1* tras 5 minutos de estrés comparado con la muestra control, hasta alcanzar su máximo punto a las 2 horas, con una expresión de *HAC1* tres veces mayor que la muestra control (Figura 2.4), estos resultados coinciden con los vistos en la figura 2.3 y muestran una disminución de la expresión de *HAC1* a partir de este punto, alcanzando valores basales a las 6 horas.

Sorprendentemente, la expresión de *IRE1* comenzó a aumentar en el momento en que los niveles de *HAC1* cayeron, este hecho abre la puerta a la necesidad de una recuperación del sensor *Ire1p* en el RE tras la activación de la UPR, dañado de algún modo tras su activación.

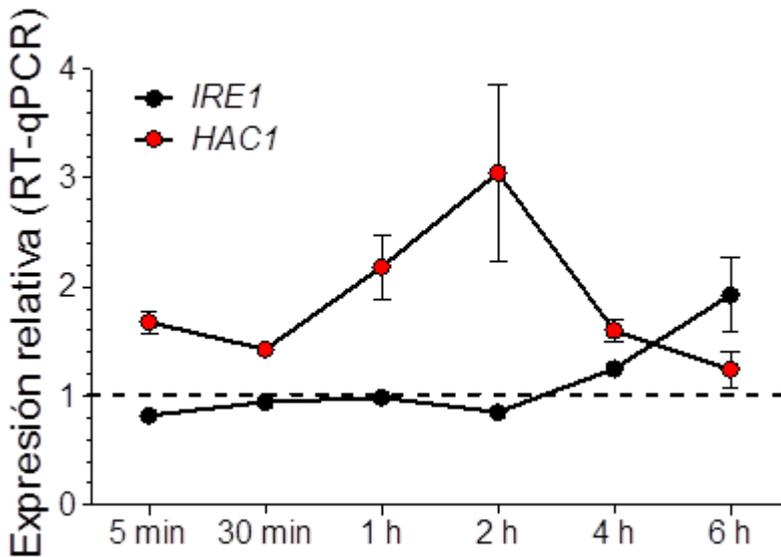


Figura 2.4. Expresión relativa de genes *IRE1* y *HAC1* bajo estrés por etanol en la cepa BY4741. El análisis se realizó mediante RT-qPCR a lo largo de 6 horas de exposición a un 8% de etanol. Las barras de error representan la medida de triplicados biológicos.

2.2.2. Medida de la activación de la UPR a partir del ensayo β -galactosidasa.

Por otro lado, y para obtener una medida cuantitativa del disparo de la UPR en presencia de etanol, se utilizó el plásmido reportero multicopia pMCY-Z que contiene un elemento UPRE de 22 pb junto a un promotor mínimo CYC1 que permite la expresión de la enzima β -galactosidasa una vez se le une el factor de transcripción Hac1p [335]. La medida de la actividad enzimática se llevó a cabo para determinar la inducción de la UPR en ausencia y presencia de un 6% (v/v) de etanol a distintos tiempos tras el tratamiento (ver apartado 16 de Material y Métodos). Como se esperaba, se observó un aumento de la actividad β -galactosidasa tras la adición del agente desnaturizante de proteínas DTT (2 mM). Además, también se produjo un aumento significativo de la actividad enzimática en células estresadas con etanol durante las primeras etapas del estrés en comparación con las células no tratadas, esta activación, al contrario que con el DTT, se mantuvo constante a lo largo del experimento, no observándose una desviación significativa de las medias entre los grupos, aunque se percibe una tendencia a disminuir la activación de la UPR más allá de las 4 horas de estrés (Figura 2.5). Estos resultados confirman una vez más la activación de la UPR bajo estrés por etanol, incluso a concentraciones por debajo del 8% como en el apartado anterior. Es importante mencionar que a pesar de que se utilizara una concentración adicional del 10% de etanol para ampliar el estudio, no obtuvimos reacción enzimática del gen reportero, debido probablemente al daño directo del etanol en la célula.

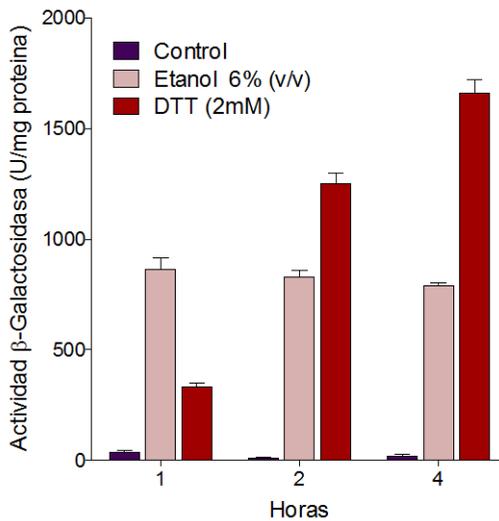


Figura 2.5. Activación de la señal UPR bajo estrés por etanol. La cepa de levadura BY4743 se transformó con un vector reportero multicopia pMCZ-Y con el fin de medir la actividad β -galactosidasa expresada por el gen UPRE-CYC1-*lacZ* a lo largo de 4 horas bajo estrés por etanol. La significancia estadística para comparar la actividad β -galactosidasa en muestras estresadas y no estresadas se determinó por un test-t, obteniendo p-valores menores a 0,001 en todos los puntos temporales. Los datos representan el valor medio de tres experimentos independientes.

2.3. Análisis RT-qPCR de genes diana UPR.

Para corroborar los resultados anteriores y verificar si efectivamente el etanol dispara la expresión de genes específicos de la respuesta a proteínas desplegadas (ver apartado 18.2 de Material y Métodos para más información sobre el diseño experimental), se procedió al análisis mediante RT-qPCR de la expresión de varios genes ya descritos como dianas específicas de la respuesta UPR [120, 336] en la cepa BY4741 tras un choque de un 8% de etanol. Además también se analizó la expresión del gen *HLJ1*, que a pesar de no aparecer en los dos artículos mencionados sí que observamos un fenotipo sensible a etanol tras su delección (ver punto 2.2.1 del presente capítulo) y lugares UPRE en su promotor, por lo que fue señalado como posible gen diana de la UPR. En la tabla 2.2 aparece una descripción de los genes utilizados en el estudio.

Tabla 2.2. Genes analizados mediante RT-qPCR en presencia de un 8% de etanol en el medio.

Gen	Función
<i>INO1</i>	Síntesis de fosfatos de inositol y fosfolípidos que contienen inositol
<i>ERO1</i>	Plegamiento oxidativo de proteínas en el retículo endoplasmático mediante generación de puentes disulfuro
<i>HLJ1</i>	Procesos catabólicos de proteínas dependientes de ubiquitina asociados a RE (ERAD)
<i>LHS1</i>	Plegamiento, estabilización y translocación de proteínas desnaturalizadas en el RE
<i>MPD1</i>	Plegamiento de proteínas que contienen puentes disulfuro.

Los resultados mostraron la sobreexpresión de todos los genes estudiados a los pocos minutos de la adición del etanol, obteniendo una sobreexpresión máxima tras una hora de estrés (Figura 2.6), el gen *INO1*, con una expresión 18 veces mayor que en condiciones sin etanol tras una hora de estrés fue, con diferencia, el que presentó una expresión relativa mayor frente a la muestra control (Figura 2.6A), esta característica se mantuvo a lo largo de las 6 horas de estudio. Por otro lado destacar la división de los resultados en dos grupos, uno para el cual la expresión fue disminuyendo gradualmente con el tiempo (*INO1*, *HLJ1* y *MPD1*) y otro en el cual la sobreexpresión se mantuvo constante más allá de las 2 horas (*ERO1* y *LHS1*), si bien en el primer caso la expresión relativa disminuye desde 8, tras una hora de estrés, hasta 4 y se mantiene constante, en el caso del gen *LHS1* observamos una expresión relativa de alrededor de 2,3 que prácticamente se mantiene desde la primera hora de estrés hasta las 6 horas que finaliza la observación.

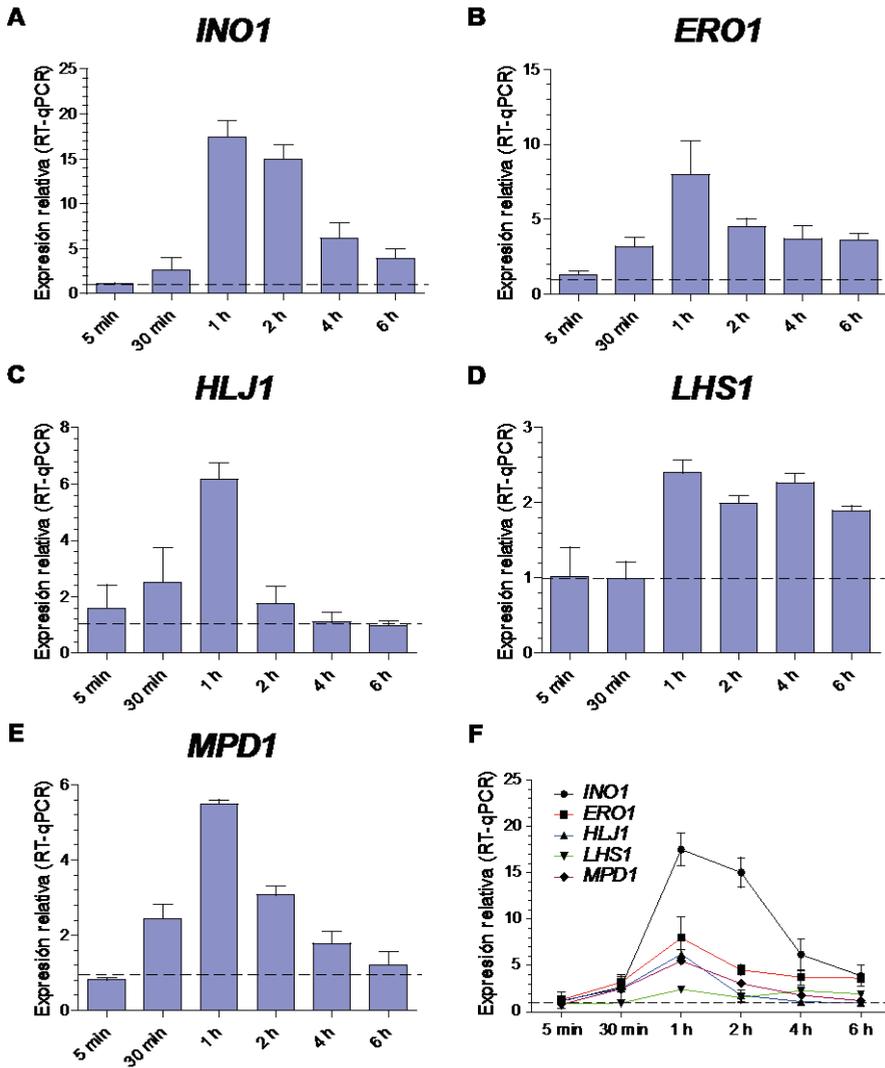


Figura 2.6. Expresión relativa de genes diana de UPR bajo estrés por etanol en la cepa BY4741. Se analizó la expresión relativa de los genes *INO1*, *ERO1*, *HLJ1*, *LHS1* y *MPD1* (A-E) mediante RT-qPCR a lo largo de 6 horas de exposición a un 8% de etanol. La expresión relativa conjunta de los genes estudiados se representa en la última gráfica (F). Las barras de error representan la medida de triplicados biológicos.

2.4. Estudio de protección cruzada frente a estrés por etanol.

Aunque estudios previos en *S. cerevisiae* han puesto de manifiesto que la exposición a un estrés leve genera una mejora en la resistencia a futuras exposiciones más extremas del mismo estrés u otros estreses distintos, como puede ser el caso de la adquisición a mayores tolerancias a estrés oxidativo tras una leve exposición a sales, calor o DTT [337], no todos los estresantes generan una protección cruzada contra otros factores de estrés, y poco se sabe sobre el efecto que un agente estresante distinto al etanol puede ejercer sobre la adquisición de una mayor tolerancia a este compuesto.

Siguiendo nuestro estudio sobre la relación de la ruta de señalización UPR con el estrés por etanol decidimos llevar a cabo un ensayo de protección cruzada, teniendo en cuenta que el etanol dispara la respuesta UPR y que esta respuesta a su vez, también es activada por la presencia de agentes desnaturizantes de proteínas como el DTT y la tunicamicina, tiene sentido pensar que de algún modo una preexposición a un estrés suave de la levadura a estos agentes podría generarle una mayor tolerancia a un posterior choque por etanol. De este modo, se sometió a la cepa BY4741 al crecimiento bajo varias concentraciones de tunicamicina (que no perturbaban en gran medida su crecimiento) hasta su fase exponencial, y una vez alcanzada esta fase, las células se sometieron a un estrés por etanol del 6%, 8% y 10% (v/v) y sus crecimientos fueron comparados con aquella muestra que no sufrió exposición previa al agente desnaturizante de proteínas.

En general se observa que la preexposición a una concentración de tunicamicina de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ genera respuestas distintas dependiendo de si la cepa es expuesta posteriormente a etanol. Como vemos en la tabla 2.3, el tiempo de duplicación en las células preexpuestas a tunicamicina es significativamente menor que en que en las células no preexpuestas, siempre y cuando se le someta a la célula a un estrés por etanol mayor del 6%, indicando una ventaja en el crecimiento frente a este estrés.

En el caso de las células crecidas con tunicamicina y posteriormente en medio SC sin etanol (medio control), presentaron tiempos de duplicación similares a la no preexpuesta ($1,95 \pm 0,12$ horas), por lo que la preexposición la tunicamicina no genera efectos negativos en el crecimiento una vez pasamos las células a medio fresco.

Tabla 2.3. Tasa de duplicación de la cepa BY4741 bajo estrés por etanol tras preexposición al agente desnaturalizante de proteínas tunicamicina. Los resultados en **negrita** muestran aquellos datos significativamente distintos de su correspondiente control (sin preexposición) utilizando un test de Dunnet de comparaciones múltiples y un intervalo de confianza del 95%. Los valores representan la media de cinco replicas biológicas.

Preexposición [Tunicamicina] (µg/mL)	Condición tras preexposición a Tm (v/v)	Tiempo de duplicación (horas)
0	0% Etanol	1,95 ± 0,12
0,1		1,97 ± 0,10
0,2		2,06 ± 0,04
0	6% Etanol	2,858 ± 0,04
0,1		2,785 ± 0,11
0,2		2,654 ± 0,09
0	8% Etanol	3,21 ± 0,14
0,1		3,33 ± 0,24
0,2		2,74 ± 0,02
0	10% Etanol	4,1975 ± 0,21
0,1		4,120 ± 0,22
0,2		3,739 ± 0,14

Por otro lado también observamos un aumento sensible de la fase de latencia en las células no preexpuestas respecto a las preexpuestas a tunicamicina en un medio sin etanol. Contrario a lo que suponíamos en un principio, donde nos planteábamos un escenario en el cual las células preexpuestas podrían tener periodos de latencia mayores debido al gasto energético que supone tener activas las rutas UPR en un medio en el cual no hay estrés evidente, parece ser que una vez la célula ha activado previamente esta respuesta a estrés su crecimiento mejora al pasarla a un nuevo medio de cultivo, disminuyendo su periodo de latencia no solamente en un medio sin agente estresante, sino también en un medio con etanol, como vemos en la figura 2.7. Además, es importante observar que este periodo de latencia es menor conforme mayor es la

concentración de tunicamicina utilizada para la preexposición y que la diferencia de latencia entre aquellas células no preexpuestas y preexpuestas a un 0,2 µg/mL de tunicamicina aumentaba conforme aumentaba la concentración de etanol en el medio, pasando de una diferencia de 3 horas a un 6% de etanol a 5 horas en presencia de un 8%, demostrando así la importancia de la activación de la UPR en la tolerancia a altas concentraciones de etanol en el medio.

Debido a que la preexposición a tunicamicina genera un menor periodo de latencia en el medio control decidimos calcular el área fraccional de cada muestra y normalizar los datos, asegurándonos así de que un mejor crecimiento en etanol tras preexposición no se debe únicamente a que esa cepa crezca mejor de por sí en comparación con la no preexpuesta. Los resultados obtenidos (Figura 2.7D) confirman los vistos anteriormente y como el área fraccional aumenta conforme utilizamos una mayor cantidad de tunicamicina en la preexposición, indicando por lo tanto que los mecanismos relacionados con la UPR preparan a las células para un posterior estrés por etanol, facilitando su entrada a fase exponencial y disminuyendo su tiempo de duplicación.

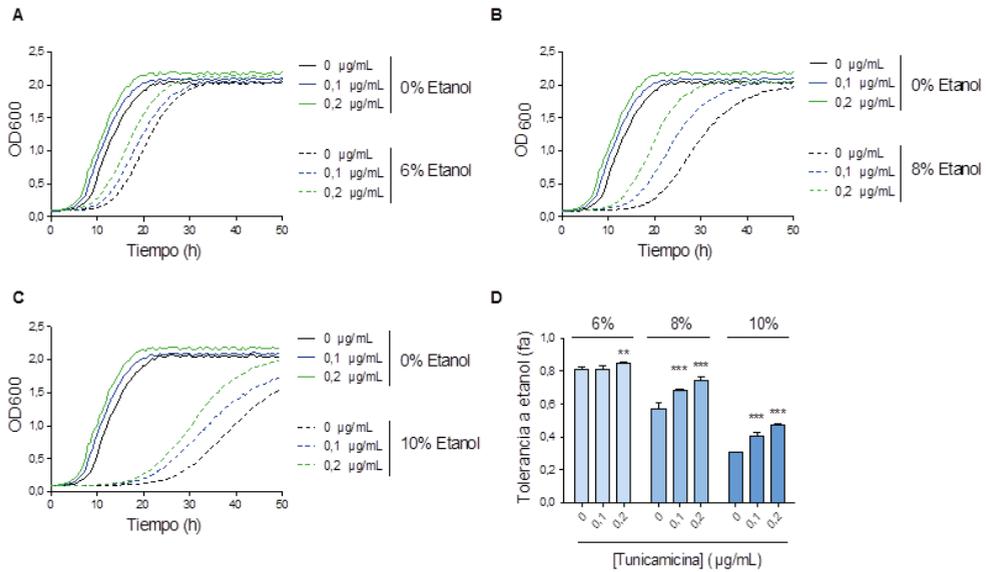


Figura 2.7. Ensayo de protección cruzada en la cepa BY4741. Las células preexpuestas o no a un estrés leve de tunicamicina (0,1 y 0,2 µg/mL) se crecieron en medio SC modificado o no con un 6, 8 y 10% (v/v) de etanol (A-C) y se tomó la OD600 como medida del crecimiento. (D) El área fraccional de cada muestra se obtuvo a partir de la división entre el área de la curva de crecimiento bajo etanol y aquella proveniente del medio control, cada una perteneciente a la misma condición de preexposición. Se utilizó un test de Dunnet de comparaciones múltiples para detectar las muestras cuya área fraccional es significativamente diferente a la muestra no preexpuesta. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

2.5. Importancia del factor de transcripción Hac1p en la tolerancia a etanol.

Posteriormente se analizó el efecto de la delección y la sobreexpresión del gen *HAC1*, el factor de transcripción que dispara la respuesta UPR, en el crecimiento de la cepa BY4741. Para ello se hizo crecer la cepa BY4741, el mutante $\Delta hac1$ y el sobreexpresante de *HAC1* bajo una concentración de etanol del 8 y 10% en medio SD-Ura (Figura 2.8A-B). Tanto la construcción del plásmido sobreexpresante pRS-HAC1 como los detalles del crecimiento y análisis de resultados pueden consultarse en los apartados 4.1 y 11 de la sección Material y Métodos.

La presencia de un 10% de etanol en el medio disminuyó la tasa máxima de crecimiento ($0,137 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$) y aumentó ligeramente la fase de latencia en la cepa $\Delta hac1$ comparado con la cepa salvaje BY4741 ($0,15 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$). Por el contrario, la sobreexpresión del factor de transcripción Hac1p proporcionó a la levadura una fase de latencia más corta y una tasa máxima de crecimiento mucho mayor ($0,19 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$), es decir un tiempo de duplicación de 3,64 horas, 57 minutos menor que la cepa sin la delección (Figura 2.7C). Con un 8% de etanol, la cepa $\Delta hac1$ también mostró una tasa máxima de crecimiento significativamente menor que la silvestre, aunque la sobreexpresión del factor de transcripción no disminuyó su tasa de duplicación, como ocurría a una concentración de etanol mayor. Estos datos confirman el papel protector de Hac1p bajo estrés por etanol al comprometer el crecimiento de la levadura tras su delección, aunque su sobreexpresión mejora el crecimiento únicamente frente a altas concentraciones de etanol (10% v/v). El papel de Hac1p bajo estrés por etanol también se hace evidente al observar que la caída del crecimiento del 8 al 10% en la cepa sobreexpresante (un 5,5%) es mucho menor que en la cepa salvaje y en la delecionada (16,5 y 20%, respectivamente).

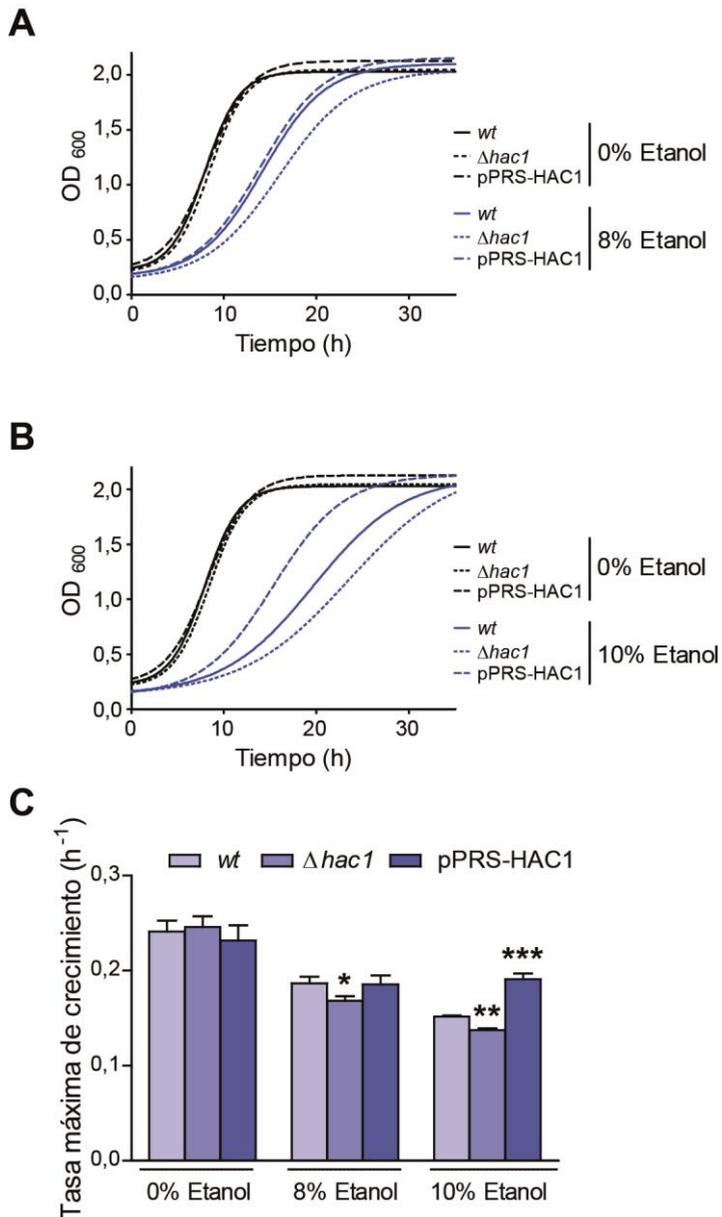


Figura 2.8. Efecto de la sobreexpresión del gen *HAC1* bajo estrés por etanol. El plásmido episomal pRS-HAC1 se introdujo en la cepa BY4741 para sobreexpresar el factor de transcripción Hac1p, tanto a la cepa parental como a la delecionada *Δhac1* se les introdujo

el plásmido episomal vacío pRS426 para evitar sesgos en el crecimiento. Las medidas de densidad óptica se tomaron mediante SPECTRstar Omega a 28°C en medio SD-Ura modificado o no con un 8 y 10% de etanol (A-B). Las tasas máximas de crecimiento (h^{-1}) provenientes de las curvas de crecimiento se representan en el gráfico C. Se llevó a cabo un test de Dunnet de comparaciones múltiples para comparar la cepa parental BY4741 con la cepa mutante y sobreexpresante a cada concentración de etanol. Los asteriscos muestran diferencias significativas dentro del grupo ($p < 0,05$). Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.6. Importancia de los genes *HAC1*, *IRE1*, *YAP1*, *MSN2*, *MSN4* y *GCN4* a la tolerancia a etanol.

Aunque ya determinamos anteriormente la importancia del factor de transcripción Hac1p en la tolerancia a etanol, el siguiente paso fue plantearnos cuál era el papel que jugaban otros componentes relacionados con la respuesta a estrés, como los factores de transcripción que disparan la respuesta a estrés general (Msn2/4p), la respuesta a estrés oxidativo (Yap1p), la proteína sensora transmembrana Ire1p, encargada de mediar en la activación de la UPR al activar el factor de transcripción Hac1p a través de su actividad endorribonucleasa y por último el factor de transcripción Gcn4p, que aunque originariamente se caracterizó como un regulador positivo de genes que se expresan durante limitación de nutrientes, también se ha identificado en los promotores de las dianas UPR, potenciando, tras su sobreexpresión, la transcripción de genes con secuencias UPRE en sus promotores, cuando la UPR está activa e inhibiendo la transcripción en las cepas $\Delta gcn4$, siendo este factor de transcripción limitante en la magnitud de la respuesta transcripcional y necesario junto con Hac1p para la transcripción de genes con regiones UPRE en su promotor, actuando a modo de heterodímero [133].

Se utilizó la cepa salvaje diploide BY4743 y sus derivados mutantes $\Delta msn2$, $\Delta msn4$, $\Delta gcn4$, $\Delta ire1$, $\Delta hac1$ y $\Delta yap1$ para llevar a cabo un crecimiento en medio SC bajo un estrés por etanol del 8 y del 10%. Como vemos en la figura 2.9, y de acuerdo con los resultados anteriores, la mutación en el gen *HAC1* generó una disminución considerable del crecimiento de la célula, tanto al 8 como al 10% de etanol, siendo este mutante el que menor crecimiento presentó de los 6 estudiados, disminuyendo su área fraccional en un 43% y un 62,8% respecto a la cepa salvaje (*wt*) con 8 y 10% de etanol, respectivamente.

Sorprendentemente, no hubo diferencias significativas en tolerancia a etanol con un 8% entre la cepa *wt* y el mutante $\Delta yap1$; Teniendo en cuenta que *YAP1* codifica para el factor de transcripción necesario para la respuesta a estrés oxidativo y el etanol genera este tipo de estrés, esperábamos una disminución más acusada del área fraccional a esta concentración de etanol; aunque sí que observamos una disminución del 30% de su área fraccional con un 10% de etanol respecto al *wt*. Por otro lado, cabe destacar la diferencia de crecimiento en mutantes $\Delta msn2$ y $\Delta msn4$ con un 10% de etanol, este hecho, como comentaremos más adelante, resalta la importancia de *MSN4* en la tolerancia a etanol con respecto a su homólogo.

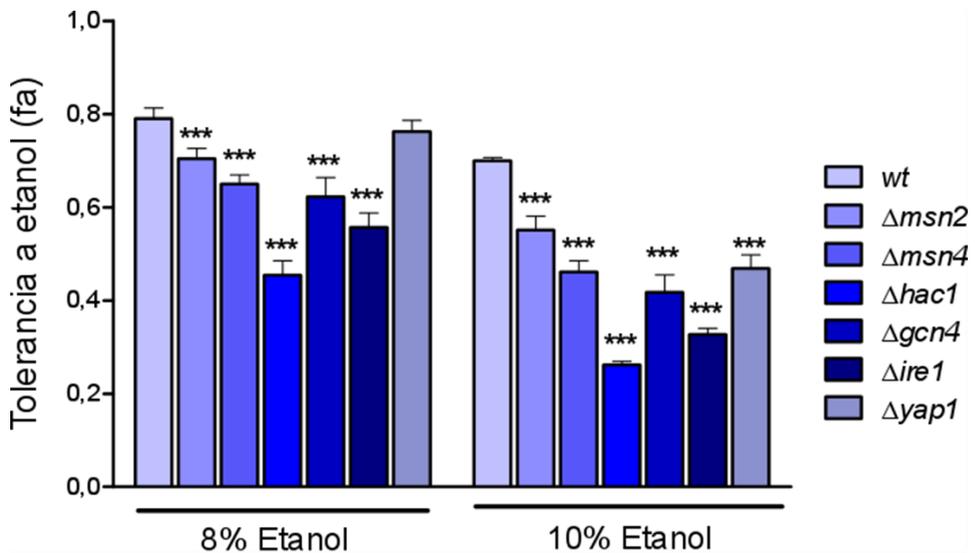


Figura 2.9. Importancia de Ire1p y distintos factores de transcripción en la tolerancia a etanol. El área fraccional de cada muestra se obtuvo a partir de la división entre el área de la curva de crecimiento bajo etanol y aquella proveniente del medio control. Se utilizó un test de Dunnet de comparaciones múltiples para detectar las muestras cuya área fraccional es significativamente diferente de la cepa salvaje (*wt*). Los asteriscos muestran diferencias significativas dentro del grupo ($p < 0,05$). Los valores representan la media de las áreas fraccionales de tres réplicas biológicas.

2.7. Análisis de las causas de la activación de la UPR por etanol.

Una cuestión que permanece sin esclarecer es el mecanismo celular que dispara la respuesta UPR bajo estrés por etanol. A lo largo de los años se han descrito varias causas de activación de la UPR como la acumulación de proteínas desplegadas en el RE, depleción de inositol o daños en la pared celular [124, 137, 138, 338]. Aunque durante la realización de la presente tesis el grupo de Goldman y col. observaron la inducción de la UPR en cepas de fermentación de bioetanol, sugiriendo un papel de la UPR en la tolerancia al etanol [287], las razones por la cual se activa este mecanismo de respuesta a estrés siguen siendo controvertidas.

Durante esta parte del capítulo nuestro objetivo será descubrir la razón principal de la activación de la UPR en *S. cerevisiae* bajo estrés por etanol.

2.7.1. Análisis de la presencia de proteínas desplegadas en el RE durante estrés por etanol.

El factor principal de la activación de la UPR en el RE se da por la acumulación de proteínas desplegadas en el RE, este hecho provoca un colapso en la maquinaria de control de calidad en el RE, constituido por chaperonas y otras proteínas de degradación asociadas al RE (ERAD), traducándose en un disparo de la ruta UPR para contrarrestar esta carga proteica en el lumen del RE [142, 339]. Ya que el etanol produce desnaturalización de proteínas, podríamos pensar que el estrés por la presencia de etanol en el medio puede causar la desnaturalización y acumulación de proteínas en el RE de la levadura y que esto activará el sensor Ire1p. Para poder examinar este fenómeno se llevó a cabo un análisis del cambio de morfología de la membrana del RE, estado redox del lumen del RE y presencia de autofagia en la célula mediante marcadores específicos.

2.7.1.1. Análisis ultraestructural de la célula frente a estrés por etanol.

Está demostrado que un aumento en la concentración de proteína desplegada en el RE provoca una expansión de la membrana del RE para disminuir la concentración de proteína desplegada y promover el autoplegamiento [121]. Por lo tanto, y esperando observar un aumento en el RE por la presencia de proteínas desplegadas debido al etanol, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión una estimación estereológica mediante el software ImageJ de la longitud de la membrana del RE en la cepa BY4741 bajo un 8% de etanol tras 3 y 6 horas de estrés (ver apartado 13 de Material y Métodos para más información). Como vemos en la figura 2.10, la exposición a un 8% de etanol generó cambios dramáticos en la organización celular comparado con las células no estresadas, tales como el aumento del área de la vacuola y una disminución significativa de la longitud total de la membrana del RE. El área ocupada por cada vacuola en las células sin estresar permaneció constante a lo largo del tiempo (alrededor del 6%) con 2-3 vacuolas por célula; mientras que las células estresadas por etanol, mostraron una única gran vacuola cuya área celular comprendía alrededor del 30%, tanto a 3 como a 6 horas de estrés (Figura 2.11A). Sorprendentemente, tras 3 horas de estrés por etanol, las células BY4741 mostraron una reducción a la mitad de la longitud inicial del RE, manteniendo esta reducción hasta las 6 horas de estrés (Figura 2.11B).

De acuerdo con Shuck y col. (2009) y Bernales y col. (2006) [121, 340] el DTT aumentó la longitud del RE tras 3 horas de exposición, debido a su capacidad de reducir puentes disulfuro y provocar, por tanto, la desnaturalización de proteínas y una activación de la UPR. Aunque esta expansión revirtió hasta alcanzar valores similares al control tras 6 horas de estrés, debido probablemente a la adaptabilidad de la célula.

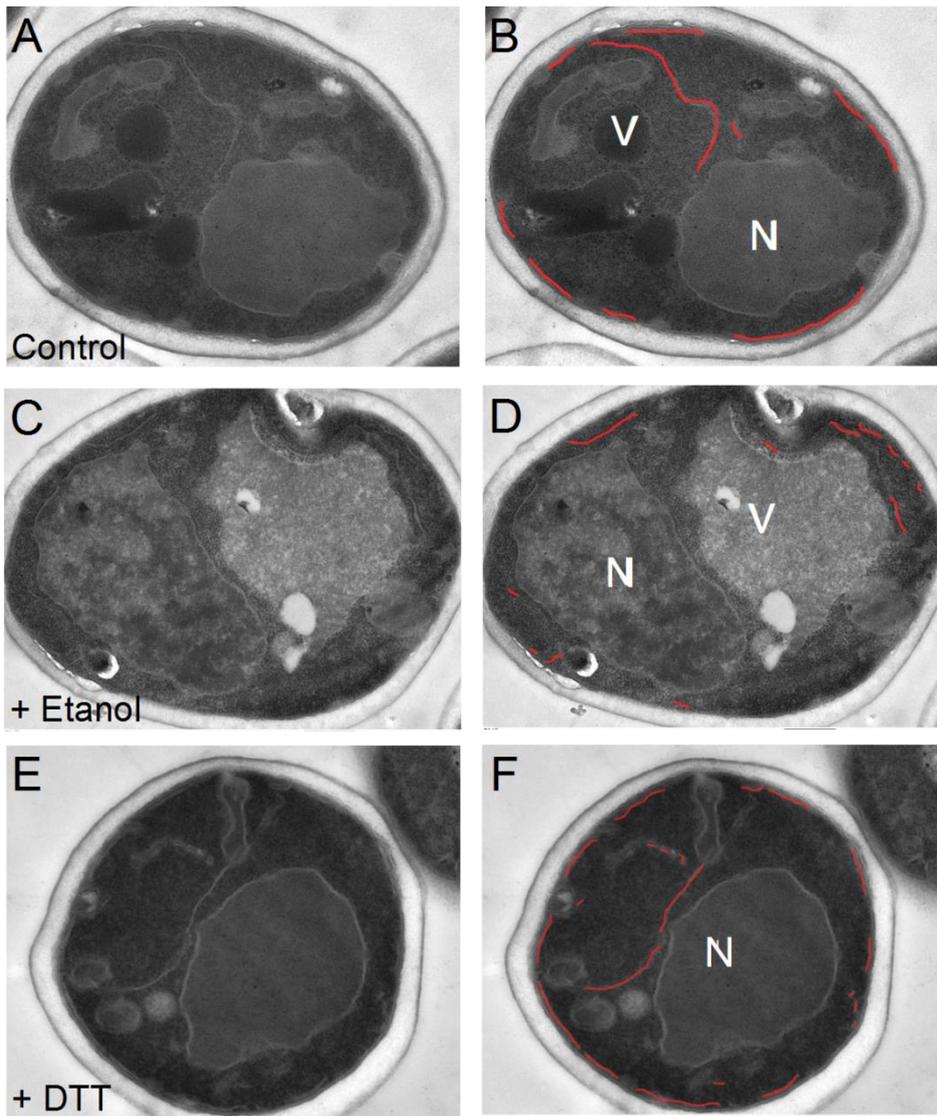


Figura 2.10. Cambios ultraestructurales en la célula frente a etanol. La cepa BY4741 fue sometida a un estrés del 8% de etanol y DTT (1 mM) en medio SC, las imágenes fueron tomadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) tras 3 horas del estrés y analizadas mediante ImageJ. Los trazados en rojo representan el RE. Las vacuolas y el núcleo están indicados como V y N, respectivamente.

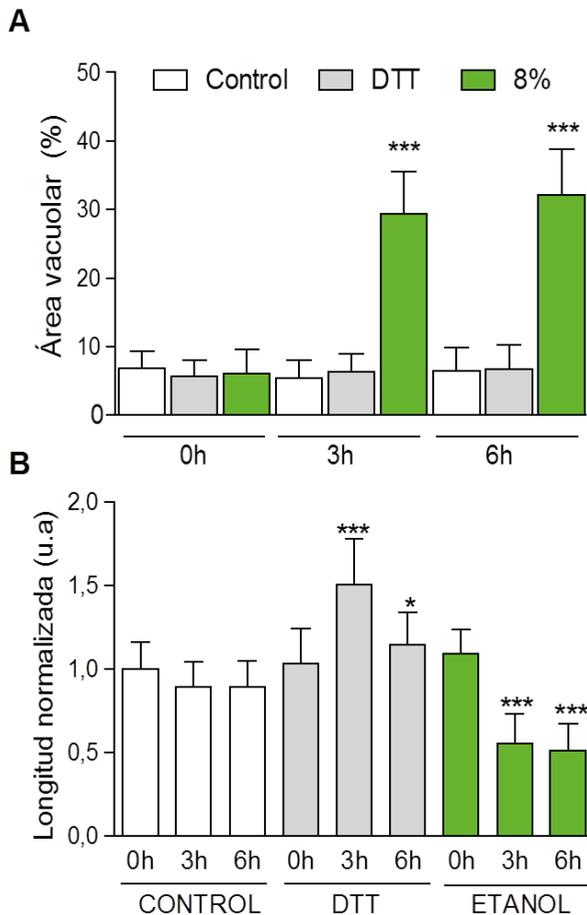
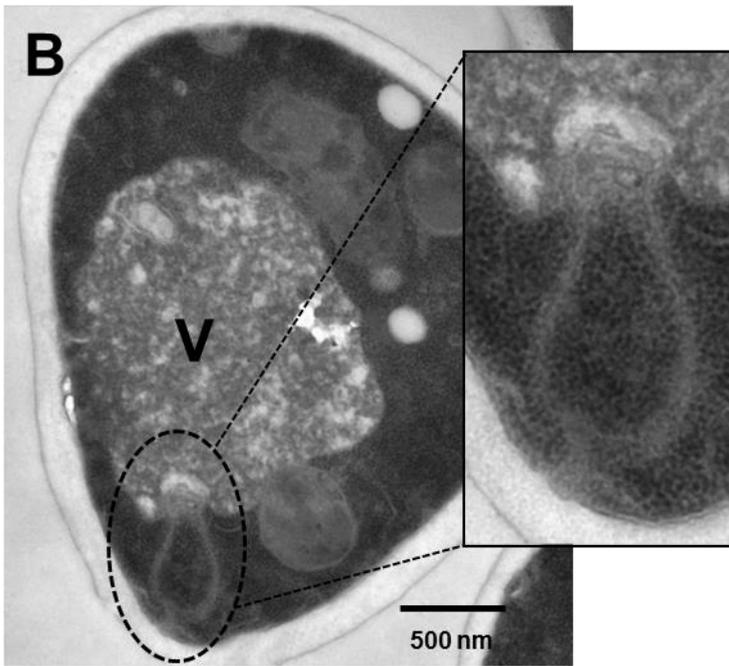
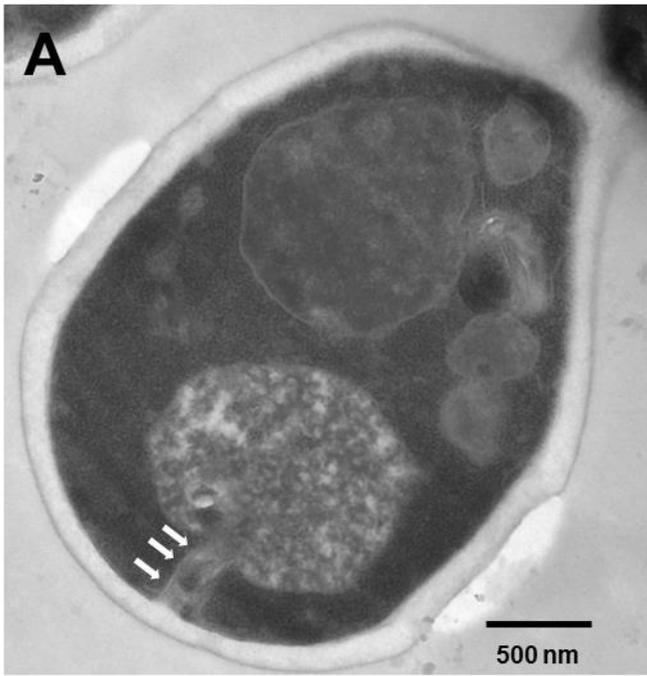
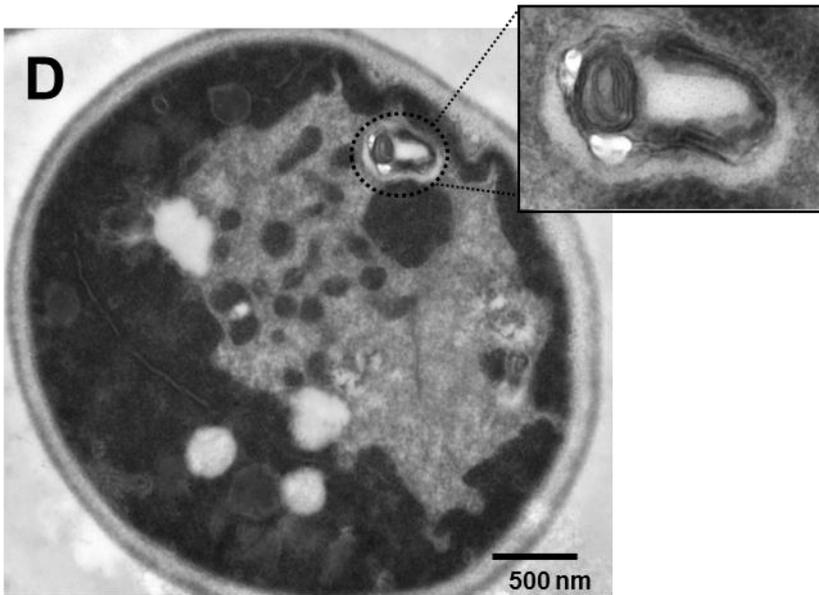
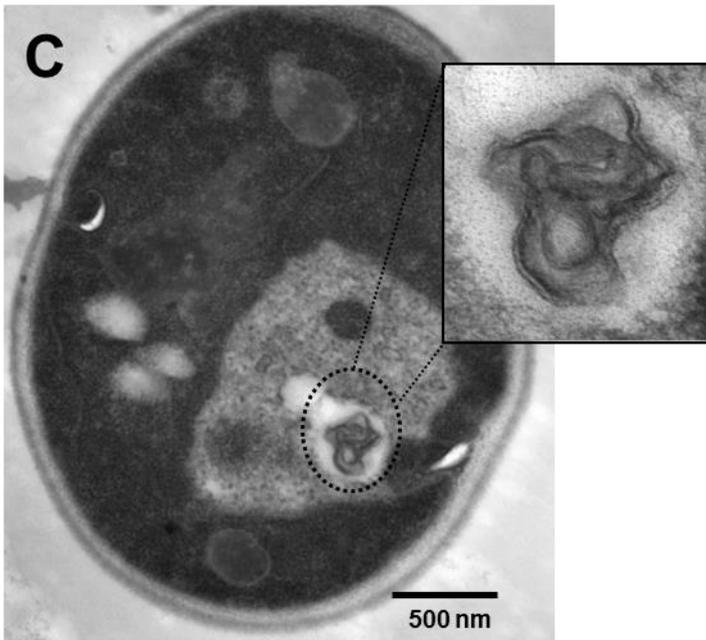
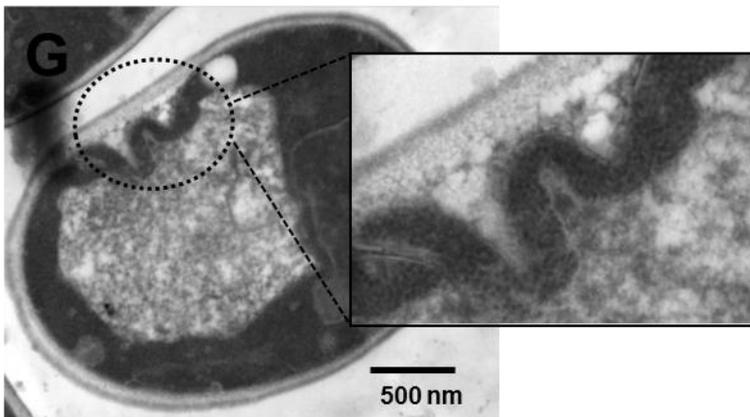
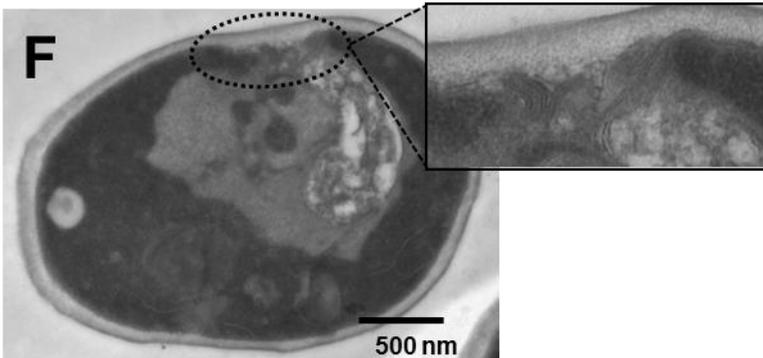
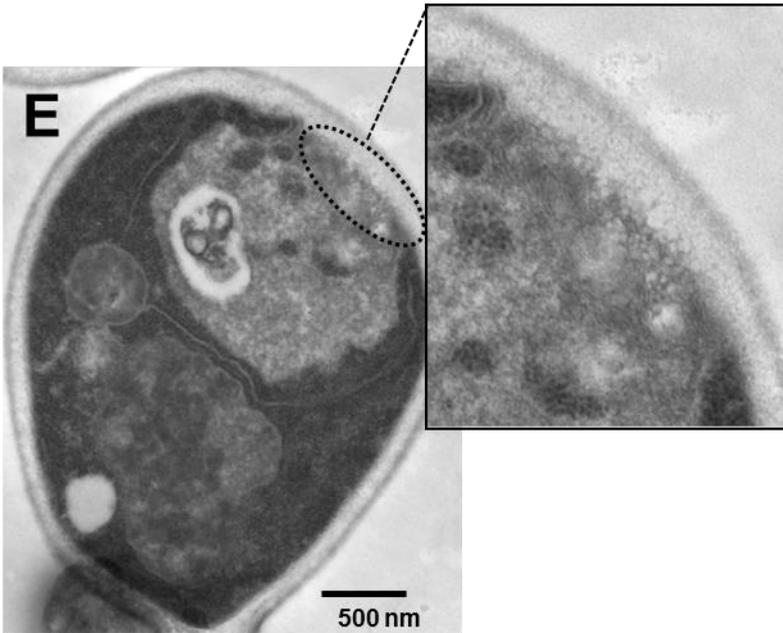


Figura 2.11. Cuantificación del área vacuolar (A) y de la longitud del RE (B) en células estresadas por etanol. Las células fueron sometidas a DTT y etanol para activar la respuesta UPR y recogidas para análisis mediante TEM en los puntos temporales indicados. Se midió la longitud del RE y el área vacuolar de cada célula mediante ImageJ y su valor se dividió por el área de la sección. Los datos del tamaño del RE están normalizados respecto al tiempo cero. Se utilizó un test de Dunnet de comparaciones múltiples para detectar diferencias con respecto a la muestra control a tiempo cero. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,01$). Los valores para cada tiempo corresponden a la media de 30 imágenes de células independientes.

Además, logramos captar en una gran proporción de células estresadas con etanol la entrada directa de RE, sin mediación de vesículas al interior de la vacuola, un fenómeno conocido como ER-fagia, descrito en el año 2014 por Shuck y col. [341] (Figura 2.12), así como uniones directas entre la vacuola y la membrana plasmática, mostrando un posible intercambio directo entre componentes de ambas membranas. Este fenómeno no se pudo observar en las células no estresadas ni en las células tratadas con DTT tras 3 horas de estrés, aunque sí que observamos, en menor proporción, la entrada de RE a las 6 horas en la vacuola (Figura suplementaria S1). Estos resultados nos dieron pie a realizar más estudios para descartar que, a diferencia de lo que pensábamos en un principio, el etanol no provoca por sí mismo un efecto directo en la desnaturalización de las proteínas dentro de la célula.







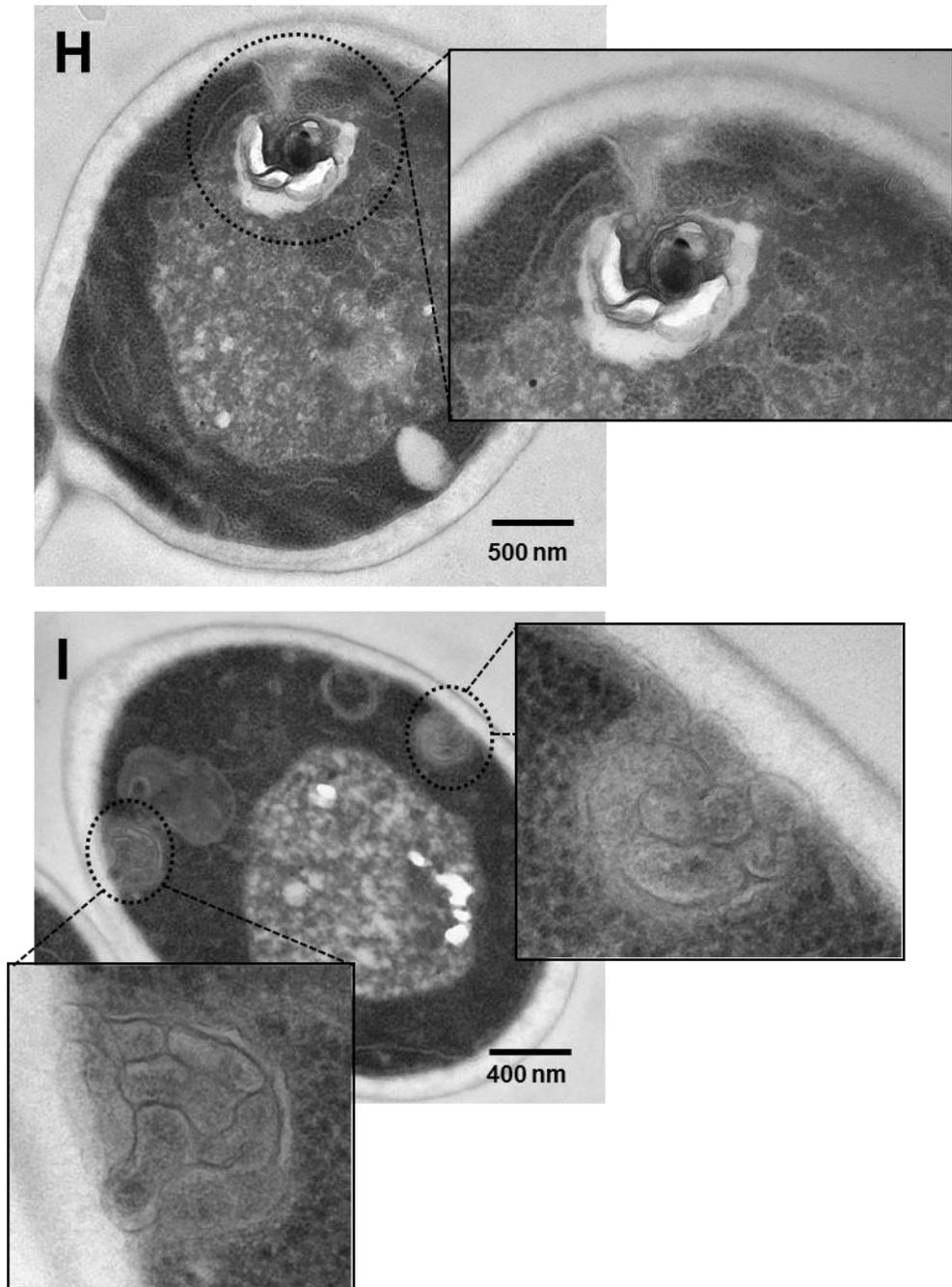


Figura 2.12. El estrés por etanol induce la autofagia del RE. Micrografías electrónicas de la cepa BY4741 tras 6 horas de estrés por etanol (8%). Nótese la inmersión del RE por la

membrana vacuolar y la invaginación de la misma durante el proceso (A-B), las espirales de RE en forma de anillo dentro de la vacuola (C-D), la unión directa entre la membrana del RE y la membrana plasmática (E-G), la entrada del RE a la vacuola (H) y la formación de espirales de RE en el cortex celular (I).

Además de la TEM se utilizó microscopia de fluorescencia para observar *in vivo* cambios morfológicos en el RE, para ello utilizamos la cepa BY4741 transformada con el plásmido pPS1622 (Sec63-sGFP) [342] y se crecieron en las mismas condiciones que las detalladas anteriormente. Las imágenes de fluorescencia (Figura 2.13) muestran, una vez más, un aumento considerable del RE por toda la célula en presencia del agente desnaturizante de proteínas DTT, con el RE cortical representado como una línea continua por debajo de la membrana plasmática, debido al paso de un patrón tubular a laminar expandido. Bajo estrés por etanol se observa un patrón más disperso del RE, más concentrado alrededor del núcleo y con el RE cortical más fragmentado, generando una línea discontinua por debajo de la membrana plasmática. En el caso de las células no estresadas se observó una cantidad de RE mayor que con etanol, apareciendo frecuentemente fragmentos de RE repartidos por todo el citoplasma celular, con una continuidad en la zona cortical mayor que con etanol. Estos datos corroboraran aquellos obtenidos anteriormente por TEM.

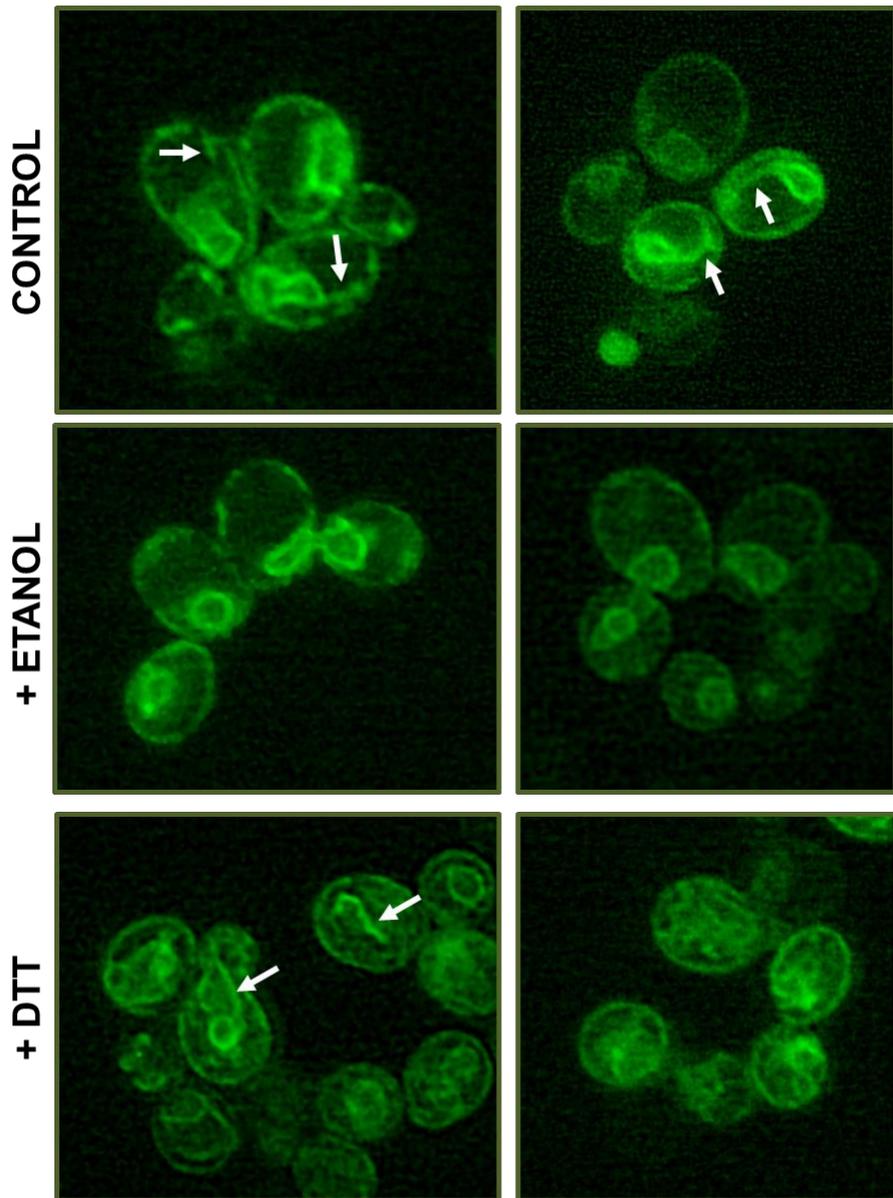


Figura 2.13. Visualización por fluorescencia de un marcador de RE (Sec63-sGFP) tras la inducción de la UPR en células crecidas en medio SD-ura (control) , con un 8% de etanol en el medio y tratadas con el agente desnaturizante de proteínas DTT (+DTT).

Las imágenes se tomaron tras 3 horas de la inducción de la UPR con un microscopio de fluorescencia Eclipse 90i (Nikon Instruments Inc.) y las imágenes fueron sometidas a deconvolución mediante ImageJ para depurar la imagen y obtener más detalle.

2.7.1.2. Análisis de la inducción de autofagia tras estrés por etanol.

La autofagia es un proceso catabólico para la degradación y el reciclaje de proteínas desplegadas, antiguas y orgánulos dañados o innecesarios. A pesar de que la autofagia está generalmente relacionada con la falta de nutrientes [343], en el año 2006 se observó como el estrés en el RE mediante TM y DTT inducía la respuesta autofágica [344] tras la desnaturalización de proteínas. Tras la obtención de los resultados anteriores y ver que no había un aumento en el RE tras estrés por etanol, decidimos observar mediante microscopia de fluorescencia si efectivamente no habían proteínas desplegadas en la célula tras estrés por etanol, como indicaba el anterior estudio. Para ello utilizamos la cepa de levadura BY4741 transformada con el plásmido pRS316-GFPAtg8 [121]. Esta proteína tiene un papel clave en la biogénesis del autofagosoma, siendo ampliamente utilizada como marcador de autofagia. Atg8p es el único marcador autofágico conocido que permanece atrapado dentro de los autofagosomas y es degradado como parte del proceso en las vacuolas [345, 346].

Tras 4 horas de crecimiento en el medio control sin agente estresante, algunas células mostraron la formación de PAS (estructuras preautofágicas) en forma de estructuras punteadas fluorescentes (Figura 2.14A), debido a la activación basal de la ruta Cvt y autofagia, aunque no vimos más de un PAS dentro de la misma célula y siempre adyacentes a la vacuola. En cambio, en presencia de un 8% de etanol (figura 2.14B) el número de células que presentaban autofagosomas se redujo drásticamente, pasando de un 23% en el medio control a un 5%. Tras estrés por DTT (Figura 2.14C) se observaron un gran número de PAS y autofagosomas por célula (5 ± 2 puntos por célula), incluso dentro de la vacuola, cuyo lumen aumentó de intensidad, reflejando la sobreexpresión de *ATG8* y un aumento en la autofagia por la presencia de proteínas desplegadas en la célula. El 62,5% de las células crecidas con DTT presentaban este patrón punteado. Este hallazgo nos condujo una vez más a la idea de que efectivamente el disparo de la UPR en las levaduras tras estrés por etanol no podía deberse al efecto desnaturalizante del mismo en las proteínas.

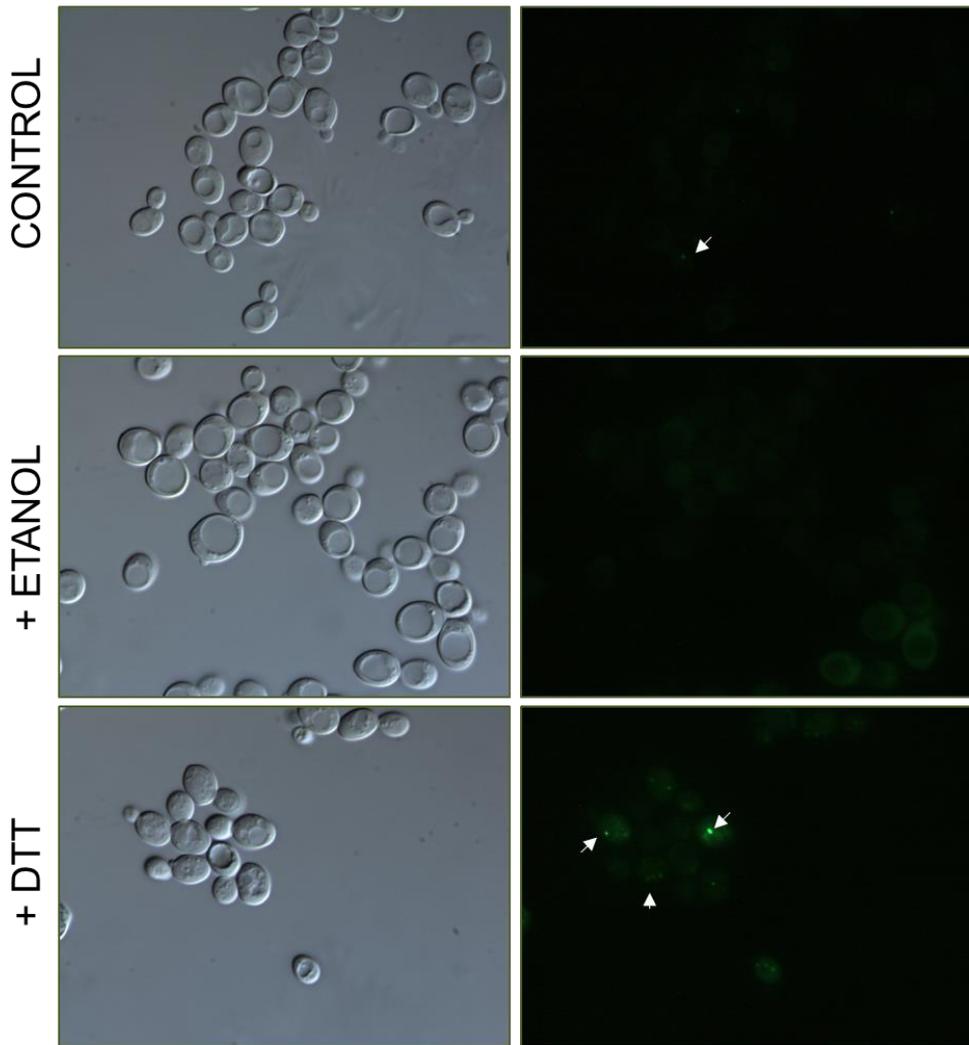


Figura 2.14. Visualización de autofagosomas (indicados por flechas) a partir del marcador fluorescente ATG8-GFP en células sin estresar (A) o bajo un estrés inductor de UPR como el etanol y el DTT (B-C) tras 3 horas de crecimiento. Nótese el aumento de intensidad del lumen vacuolar en las células tratadas con DTT respecto a las no tratadas o tratadas con etanol.

2.7.1.3. Estudio del estado redox del RE *in vivo* tras estrés por etanol.

Finalmente, y para obtener una prueba más de la no intervención de proteínas desplegadas en el disparo de la UPR en la levadura bajo estrés por etanol, estudiamos el estado redox *in vivo* del RE. El lumen del RE presenta un ambiente oxidante comparado con el citosol para el buen funcionamiento de las chaperonas del RE y el correcto plegamiento de proteínas que contienen puentes disulfuro [347]. Recientemente se ha utilizado una proteína GFP sensible al estado redox del RE (eroGFP) para monitorizar el ambiente redox en el lumen del RE de células vivas bajo condiciones control y de estrés en RE [298]. La eroGFP es una variante de la proteína fluorescente verde (GFP) de *Aequorea victoria* con un par de cisteínas modificadas en la parte más superficial de la proteína que provoca la formación de un puente disulfuro entre ellas en condiciones oxidantes. La formación de este enlace reorienta el cromóforo de la GFP, alterando la excitabilidad de fluorescencia de dos máximos: 400 y 490 nm. Cuando se oxida, la excitación a 400 nm aumenta mientras que disminuye a 490 nm, cuando está reducida pasa lo contrario, por lo que el ratio de excitación de fluorescencia entre estas longitudes de onda genera una lectura interna del estado redox de la GFP.

Los inductores químicos de la desnaturalización de proteínas DTT y tunicamicina, así como la sobreexpresión de proteínas mal plegadas (CPY*), alteran el potencial redox del RE en levaduras hacia un estado más reducido [298] debido a que la saturación de la maquinaria de plegamiento oxidativo del RE impide la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento de las proteínas, desviándose su ambiente redox del punto de equilibrio conforme se van acumulando proteínas desplegadas. Por otro lado, la falta de inositol en el medio, a pesar de inducir UPR, no genera un estado redox más reducido, sino que el ratio eroGFP se mantiene constante alrededor de cero debido a la ausencia de proteínas desplegadas en el RE.

Debido por tanto a la eficacia de la eroGFP en medir los cambios redox en el RE por presencia de proteínas desplegadas, se midió mediante citometría de flujo el ratio eroGFP reducido/oxidado ("r/o ratio") en células BY4741 transformadas con el plásmido pPM28 [298] en un medio control SD-ura, modificado con un 8% de etanol y con DTT (3mM) que se utilizó como control positivo del método (ver apartado 12.1 de Material y Métodos para más detalles).

El agente reductor de puentes disulfuro DTT causó un aumento rápido en el ratio eroGFP, alcanzando un pico de 2,29 tras 10 minutos de estrés, que se mantuvo hasta las 6 horas para seguidamente producirse una reoxidación de la proteína tras su adaptación al ambiente, viendo una disminución gradual del ratio eroGFP (Figura 2.15). Por el contrario, no observamos un aumento del ratio eroGFP en las células estresadas con etanol, cuyo valor se mantuvo constante en 0 durante las 3 primeras horas de estrés, debido probablemente a la ausencia de acumulación de proteína desplegada en el RE que lleve a saturar el sistema de plegamiento oxidativo. Se observó, no obstante, una bajada significativa en el ratio eroGFP tras 3 horas de estrés por etanol comparado con las células sin estresar, este aumento en el grado de oxidación en el RE se debe probablemente al estrés oxidativo causado por el etanol. Esta disminución del ratio eroGFP también se ha observado al hacer crecer las células en presencia de H₂O₂ [298].

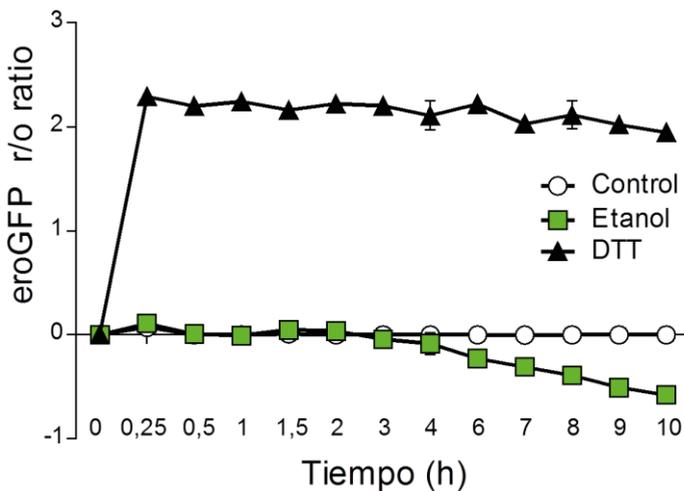


Figura 2.15. Células de levadura BY4741 transformadas con el reportero redox específico de RE, eroGFP, y tratadas con DTT (1mM) o con etanol. El ratio eroGFP (reducido/oxidado) se define como el ratio de fluorescencia, expresado en log2 y normalizado respecto a la muestra control, de la excitación a 488 nm frente a la de 405 nm. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

2.7.2. Efecto del inositol en la activación de la UPR bajo estrés por etanol.

Una de las vías de activación de la UPR independientemente de la unión de proteínas desplegadas al dominio sensor de Ire1p es la falta de inositol en el medio [122]. Tras descartar la presencia de proteínas desplegadas como responsables de la activación de la UPR bajo estrés por etanol, decidimos estudiar la influencia del inositol en la activación en presencia de etanol. Podríamos pensar que el etanol da lugar a una salida masiva de inositol, entre otros componentes, al exterior celular debido al daño generado en la membrana plasmática, así como a los transportadores de inositol en la célula, ITR1 e ITR2, embebidos en la misma. Esta disminución de los niveles de inositol, y por consiguiente de su derivado fosfolipídico, fosfatidilinositol (PI), provocaría una aberración en la membrana plasmática, seguido de un disparo de la respuesta UPR con el fin de sobreexpresar aquellos genes necesarios para su síntesis como *INO1* y transportadores específicos y así contrarrestar el efecto fluidificante del etanol y aumentar la capacidad de extrusión de protones de la H⁺-ATPasa.

Se estudió el efecto del inositol sobre la activación de la UPR mediante el uso de dos tipos de reporteros de UPR fluorescentes en la cepa modificada BY4741, denominada a partir de ahora YPL004, esta cepa presenta una variante fluorescente de la chaperona Kar2p integrada en el genoma en el locus KAR2 (Kar2p-sfGFP) y el plásmido reportero UPR-mCherry que codifica la proteína fluorescente roja mCherry, bajo un promotor mínimo CYC1 y cuatro elementos UPRE dispuestos en tándem [138]. Las células se crecieron durante toda la noche en medio SD-ura-his a 28°C hasta llegar a fase exponencial (OD₆₀₀ ~0,4), e incubaron en distintos medios SD-ura-his que presentaban varias concentraciones de inositol en el medio (0,10, 90 y 400 μM) modificados con DTT (1mM) y 8% de etanol (ver apartado 12.2 de Material y Métodos). En primer lugar se estudió tanto la activación de la UPR (Figura 2.16A) como la expresión de la diana de UPR Kar2p (Figura 2.16B) en ausencia de inositol, en un medio modificado con etanol, DTT y medio sin modificar, si el disparo de la UPR en presencia de etanol es debido únicamente a la pérdida de inositol en la célula por efecto del etanol deberíamos observar un comportamiento similar a aquellas células crecidas en ausencia de inositol en el medio, y que se sabe que disparan la respuesta a UPR, tal y como vemos en los resultados (Figura 2.16A), sorprendentemente, la adición de etanol en el medio disminuyó la activación UPR, obteniendo valores de activación 1,83 y 1,64 veces menores a las 4 y 8

horas de estrés respecto al control, aunque esta activación siguió aumentando más allá de las 8 horas, mostrando un valor 8 veces mayor al inicial en las últimas horas de estrés. En las células control la activación comenzó a disminuir a partir de las 6 horas, debido a la expresión de los genes relacionados con la síntesis de inositol que permitieron retornar a la célula a su condición inicial. En cuanto a la expresión de la chaperona Kar2p también se obtuvo un comportamiento similar, observándose la sobreexpresión de la proteína más allá de las 6 horas tras exposición a etanol, mientras que en medio sin estresante la máxima sobreexpresión se alcanzó a las 4 horas para posteriormente ir disminuyendo (Figura 2.16B). Este hecho pone de manifiesto que el disparo de la ruta UPR en presencia de etanol no se debe a una disminución de inositol en la célula por daños en su membrana sino que existen otros efectos generados por el etanol que disparan esta respuesta.

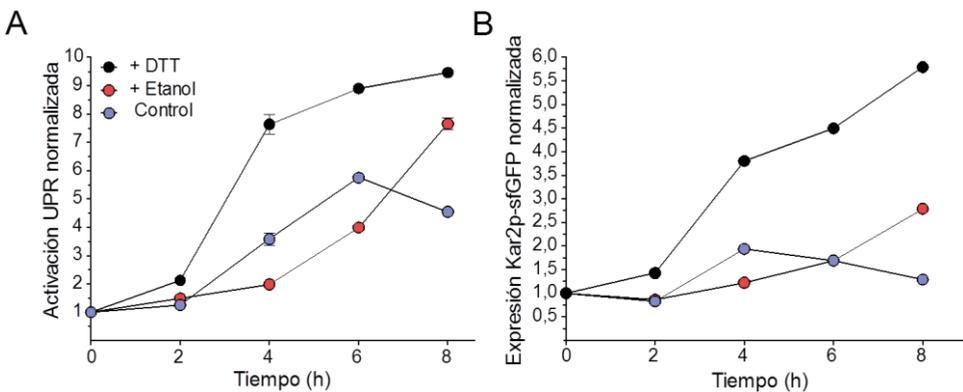


Figura 2.16. Diferencia en la activación de la UPR en medio sin inositol en presencia y ausencia de etanol y DTT. La cepa YPL004 (BY4741 KAR2-sfGFP::HIS; UPR-mCherry::URA) fué sometida a un 8% de etanol y DTT (1mM) en un medio SD-ura-his sin inositol durante 8 horas. Los datos representan la media normalizada respecto al tiempo cero en cada condición de la mediana de las intensidades de fluorescencia de UPR-mCherry (A) y de KAR2-sfGFP (B) de tres réplicas biológicas.

Además se midió mediante RT-qPCR genes relacionados con transportadores de inositol, *ITR1* e *ITR2* (Figura 2.17), si realmente hubiera una falta de inositol en la célula a causa del daño producido por el etanol veríamos una

sobreexpresión del gen *ITR1* (que codifica para un transportador de inositol de alta afinidad) ya que se ha visto que su expresión aumenta en células deficitarias en inositol. En cambio, la presencia de inositol en el medio provoca la inactivación de la actividad transportadora y una disminución transcripcional del gen hasta niveles basales [140, 348, 349]. Por otra parte, utilizamos el gen *ITR2* como control ya que presenta una expresión constitutiva, independientemente de la cantidad de inositol en la célula y no veríamos cambio significativo en la expresión comparado con la muestra control.

Tras medir la expresión relativa de los transportadores de inositol respecto a un medio sin etanol no observamos sobreexpresión de *ITR1* es decir, que la presencia de etanol no contribuye a una disminución del inositol en la célula.

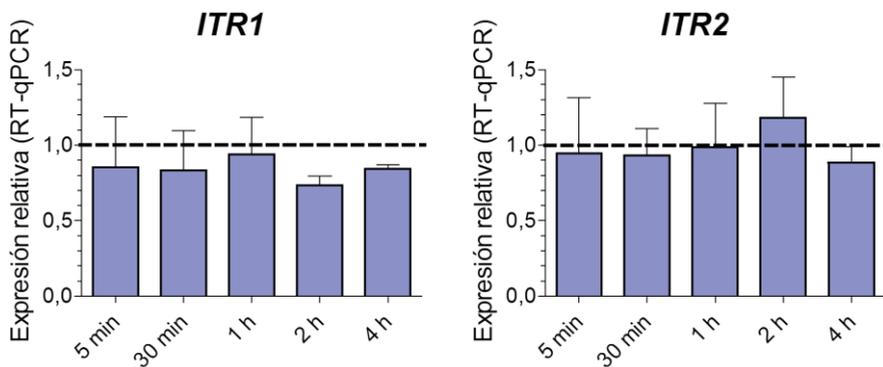


Figura 2.17. Expresión relativa de los transportadores de inositol *ITR1* e *ITR2* mediante RT-qPCR a lo largo de 4 horas de exposición a un 8% de etanol en medio SC. Las barras de error representan la medida de triplicados biológicos, la barra horizontal muestra el punto en el cual la expresión en ambas muestras es la misma.

Tras este resultado decidimos comparar la activación UPR a distintas concentraciones de inositol en el medio (0,10, 90 y 400 μM) bajo estrés por etanol. Aunque la falta de inositol no era la responsable de la activación de la UPR por la distinta naturaleza de activación respecto a aquellas células crecidas en ausencia de inositol, sí que parecía probable que aberraciones en la membrana pudieran desataran esta respuesta, así que probamos distintas concentraciones de inositol, en exceso y en defecto para poder establecer una primera relación entre disparo de UPR y cambios relacionados con la membrana o lípidos de membrana. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la UPR 1,5 veces mayor en aquellas células crecidas en exceso de inositol (400 μM) respecto a aquellas crecidas a 10 μM o sin inositol tras 4 y 6 horas de crecimiento, mientras que el crecimiento con un 90 μM de inositol generó una UPR muy ligeramente superior a estas dos últimas (Figura 2.18A). No observamos variación en la respuesta UPR en aquellas células crecidas en medio control sin etanol, a excepción de aquellas que dispararon su UPR por privación de inositol (Figura 2.18B). Del mismo modo la expresión de la chaperona y diana de UPR Kar2p también fue mayor en las células crecidas bajo exceso de inositol (Figura 2.18C), sin mostrar variación de expresión en medios sin etanol y con inositol (Figura 2.18D).

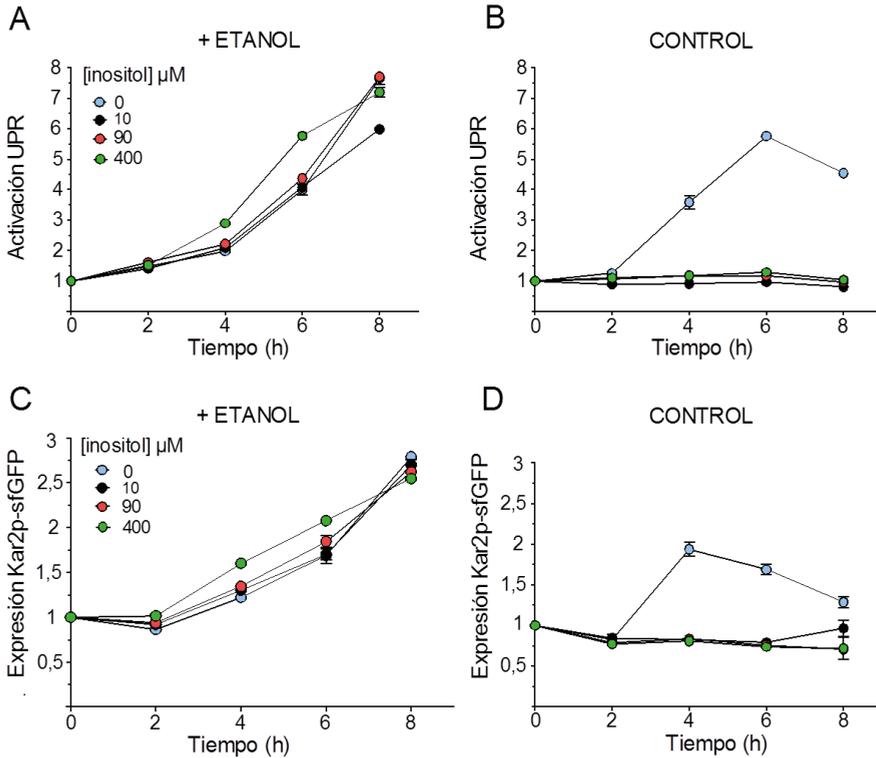


Figura 2.18. Activación de la UPR y expresión de Kar2p a distintas concentraciones de inositol en el medio, en presencia (A y C) y ausencia de etanol (B y D). La cepa YPL004 (BY4741 KAR2-sfGFP::HIS; UPR-mCherry::URA) fue sometida a un 8% de etanol y DTT (1mM) en un medio SD-ura-his durante 8 horas con distintas concentraciones de inositol en el medio (0, 10, 90 y 400 μM). Los datos representan la media normalizada respecto al tiempo cero en cada condición de la mediana de las intensidades de fluorescencia de tres réplicas biológicas.

Aunque más adelante se discutirán estos resultados, es notable el hecho de que aberraciones en la membrana debidas a un exceso de inositol en la célula (400 μM) provocan el disparo de la UPR en presencia de etanol, mientras que, curiosamente, la falta de inositol en un medio con etanol provoca prácticamente la misma activación que a concentraciones de 10 y 90 μM hasta las 6 horas de crecimiento. Este hecho destierra la idea de un efecto aditivo entre la falta de inositol y el efecto del etanol en el disparo de la UPR por lo que no es descartable la idea de que la presencia de etanol puede generar un cambio en la biodisponibilidad del inositol además de un aumento en la fosfatidilcolina (PC) por

la ausencia de inositol, provocando un disparo de la UPR menor de lo esperado por su efecto protector frente al etanol.

2.7.3. Activación de la UPR en *Saccharomyces cerevisiae* por aumento en la fluidez de la membrana tras estrés por etanol.

Estudiamos la influencia de la ordenación de la membrana del RE en la activación de la UPR en la cepa BY4741 transformada con el plásmido pPM47 (4xUPRE-mCherry,CEN/ARS, URA3) a lo largo de 8 horas de crecimiento bajo distintos agentes fluidificantes y rigidificantes de la membrana, así como una mezcla de ambos con el fin de determinar si un aumento en la fluidez de la membrana del RE puede activar a Ire1p y provocar un disparo en la UPR (ver apartado 12.3 de Material y Métodos para más información).

Nuestros resultados muestran un aumento en la activación de la UPR en presencia de etanol, alcohol bencílico, ácido palmitoleico y en menor medida tergitol, un detergente que se utiliza para permitir la entrada en la célula de los ácidos grasos y que utilizamos como control para el ácido palmitoleico y oleico (Figura 2.19). A diferencia del ácido palmitoleico, los restantes compuestos provocan un desorden en el empaquetamiento de los lípidos al intercalarse entre ellos y espaciarlos unos de otros, sin modificar la composición de ácidos grasos de la membrana [350, 351], mientras que el ácido palmitoleico (16:1) provoca un aumento de fluidez de la membrana al presentar cadenas acílicas más cortas que el ácido oleico (18:1), este aumento en la proporción 16:1/18:1 provoca una disminución en las fuerzas hidrofóbicas que mantienen la membrana intacta, aumentando su fluidez [352]. En cambio, una proporción mayor de 18:1 genera el efecto contrario, el aumento en la fuerza de estabilización de la membrana provoca mayor rigidez, obteniendo en los resultados una activación de la UPR menor incluso que el control (crecimiento a 28°C en medio SD-ura), cuya UPR tiende a aumentar ligeramente más allá de las 6 horas debido a la presencia natural de proteínas desplegadas, llegada a fase diaúxica y disminución de glucosa en el medio.

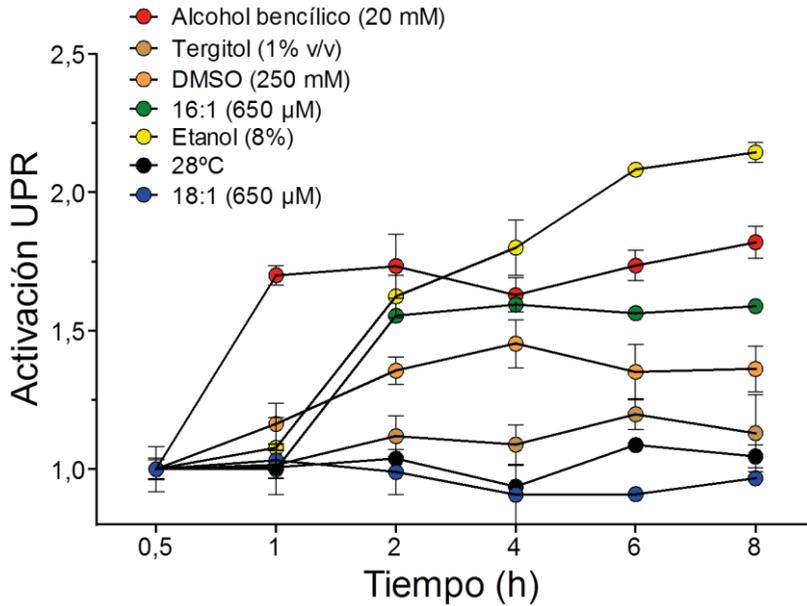


Figura 2.19. Activación de la UPR dependiendo del grado de ordenación de la membrana del RE. Se midió mediante citometría de flujo la intensidad de la proteína fluorescente mCherry bajo el promotor 4xUPRE en presencia de distintos agentes fluidificantes (alcohol bencílico, etanol, ácido palmítoleico y DMSO) y rigidificantes (aumento en la concentración de ácido oleico respecto al palmítoleico) en la cepa BY4741. Los datos se normalizaron respecto al primer punto temporal para cada condición. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y se utilizó el crecimiento a 28°C como control.

Por otra parte, también observamos como la mezcla de compuestos rigidificantes y fluidificantes en la célula provocaba un disparo en la UPR de intensidad intermedia en comparación con los compuestos por separado (Figura 2.20). Estos resultados indican que un aumento en la fluidez en la membrana del RE provoca un disparo en la UPR debido, probablemente, a la mayor movilidad de Ire1p en la membrana y a su oligomerización con proteínas Ire1p vecinas.

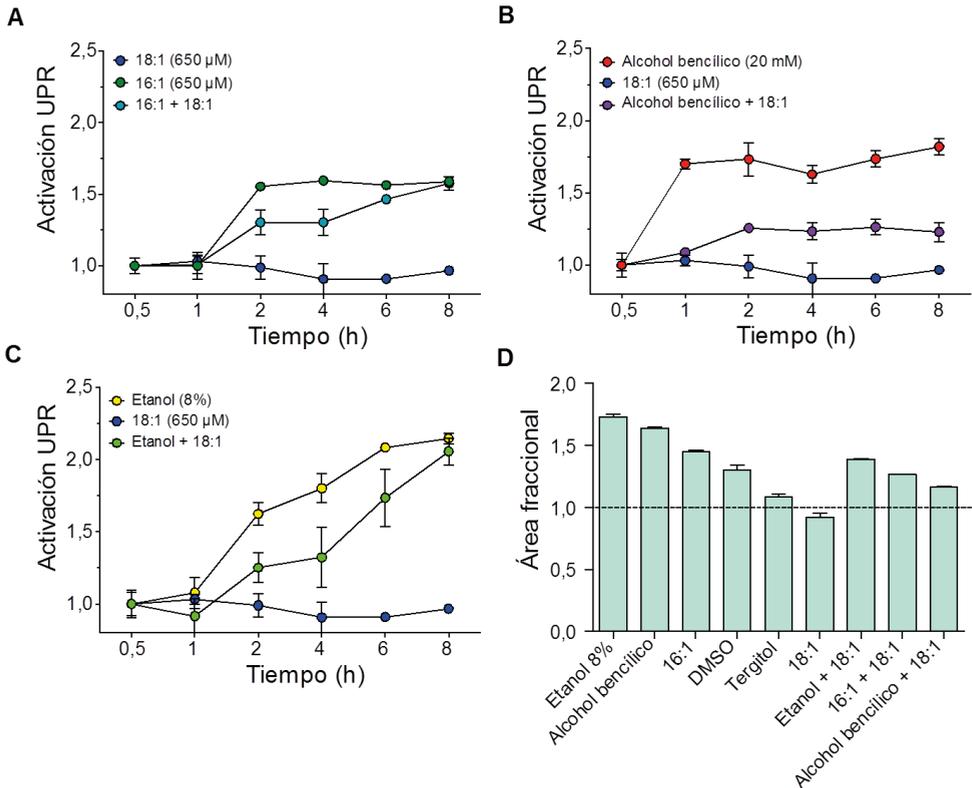


Figura 2.20. Activación de la UPR dependiendo del grado de ordenación de la membrana del RE. Se midió mediante citometría de flujo la intensidad de la proteína fluorescente mCherry bajo el promotor 4xUPRE en la cepa BY4741 tras su crecimiento en un medio SD-ura modificado con distintos agentes que fluidifican o rigidifican la membrana, así como una mezcla de ellos (A-C). También se calculó el área fraccional de la activación UPR para cada compuesto, utilizándose como área control la activación de la UPR a 28°C (D)

Además de utilizar agentes que directamente desestabilizan el ordenamiento de la membrana, también utilizamos el mutante BY4741 $\Delta erg2$, este gen no esencial codifica una isomerasa que actúa en los últimos pasos en la biosíntesis del ergosterol y su mutación genera la acumulación de esteroides con una estructura distinta a la del ergosterol, provocando una disminución del orden de la membrana al impedir el empaquetamiento de las cadenas acílicas de los lípidos y generando huecos [353], provocando también variaciones en la composición de fosfolípidos, con un aumento en el ratio PC/PE y una disminución del ratio esteroil libre/fosfolípido, traduciéndose todo esto en un aumento de la fluidez de la membrana [307].

Los resultados de la activación de la UPR muestran de por sí una activación basal del mutante mayor que la cepa BY4741 silvestre debido, probablemente, a una mayor fluidez de la membrana (Figura 2.21), este efecto se vio potenciado por la presencia de un 8% de etanol en el medio, provocando un efecto aditivo y observándose una activación de la UPR en presencia de etanol mayor que en la cepa silvestre.

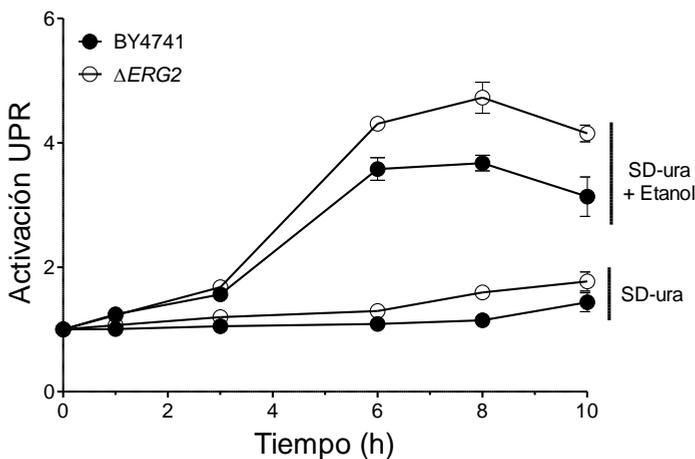


Figura 2.21. Activación de la UPR dependiendo del grado de ordenación de la membrana del RE. Se midió mediante citometría de flujo la intensidad de la proteína fluorescente mCherry bajo el promotor 4xUPRE en la cepa BY4741 y su mutante $\Delta erg2$ en medio SD-ura con y sin etanol (8%). Las barras de error provienen de la medida de tres réplicas biológicas.

A la vista de los resultados podemos concluir que la desestabilización de la membrana generada por el etanol puede dar lugar a una disminución en la fuerza de interacción entre los fosfolípidos de la membrana y las proteínas embebidas en ella, provocando en última instancia la activación de la UPR por oligomerización de los dominios transmembrana de Hac1p, sin necesidad, por tanto, de la presencia de proteínas desplegadas en el lumen del RE.

2.8. Conclusiones.

La UPR representa una ruta de supervivencia general del RE capaz no solamente de evaluar la homeostasis de las proteínas sino también la integridad de la membrana. A diferencia de lo que se creía hasta ahora, es el efecto de desestabilización de la membrana producido por el etanol lo que activa la UPR al disminuir la interacción entre los fosfolípidos y entre fosfolípidos/Ire1p, facilitando el movimiento y por tanto la oligomerización de Ire1p en la membrana del RE, activando en última instancia la UPR. Esta respuesta activará la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de fosfolípidos, organización de la pared celular y ergosterol para contrarrestar el efecto fluidificante del etanol en la membrana, que cesará en el momento en que el ordenamiento de la membrana del RE vuelva a estado inicial. Seguidamente y por el daño oxidativo generado por el etanol, entraría en acción el factor de transcripción Yap1p, responsable de la respuesta a estrés oxidativo, que junto con las chaperonas moleculares ya producidas anteriormente por la UPR actuarían en sinergia para restaurar en el RE aquellas proteínas dañadas por estrés oxidativo. Por lo tanto, nuestro trabajo se aleja de la hasta ahora creencia de que el etanol dispara la UPR por la desnaturalización de proteínas en la célula y subraya la importancia de las propiedades biofísicas de la membrana como primera respuesta a la presencia de etanol en el medio. El presente capítulo presenta además varios genes (*HLJ1*, *HAL1*, *HSP31* y *ARF1*) cuya delección no se había relacionado anteriormente con un aumento en la sensibilidad al etanol, haciéndose necesario un estudio más exhaustivo de los mismos.

3. Relación entre la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y la tolerancia a etanol en levaduras del género *Saccharomyces*.

En los dos capítulos anteriores hemos observado como el etanol dispara la respuesta UPR por cambios en las propiedades biofísicas de la membrana del RE y como esta respuesta era mayor en la cepa CECT 10094, la más tolerante al etanol de las dos utilizadas en el estudio transcripcional. Un paso más allá de nuestro estudio es determinar el grado de activación de la UPR tanto dentro de la especie *S. cerevisiae* como dentro de su género y poder esclarecer si existe algún paralelismo entre una mayor activación de la UPR con una mayor tolerancia al etanol y ver el comportamiento de la UPR en especies poco adaptadas al etanol, como *S. paradoxus*, *S. uvarum* y *S. kudriadzevii*.

En experimentos previos realizados en nuestro laboratorio [319] se emplearon técnicas de modelado estadístico para determinar los efectos del etanol sobre el crecimiento de diferentes especies y cepas de *Saccharomyces* aisladas de ambientes naturales y fermentativos, concluyendo que la tolerancia a etanol es una característica intrínseca de ciertas especies de *Saccharomyces* que apareció antes del proceso de domesticación, permitiéndoles colonizar y dominar en ambientes fermentativos antrópicos. A partir de los datos de tolerancia de este trabajo, junto con el de Belloch y col. [354], utilizamos varias cepas del género *Saccharomyces* con distintas tolerancias a etanol para determinar, como hemos mencionado anteriormente, si efectivamente el grado de activación de la UPR determina una mayor tolerancia a etanol.

3.1. Tolerancia al agente desnaturante de proteínas 2-mercaptoetanol en las cepas de *S.cerevisiae* CECT 10094 y Temohaya-26.

Tras observar en el capítulo 1 como la cepa CECT 10094 sobreexpresaba, bajo estrés por etanol, un mayor número de genes con lugares de unión a Hac1p en su promotor que la Temohaya-26, y que además esta cepa resultó ser más tolerante al etanol, nos planteamos si la cepa CECT 10094 sería más tolerante a

aquellos agentes que disparan la UPR en la célula, pudiendo así relacionar el disparo de la UPR con una mayor tolerancia al etanol. Para ello, estudiamos el crecimiento, en placa y en medio líquido, de las dos cepas bajo distintas concentraciones de 2-mercaptoetanol (BME), que previene la formación de puente disulfuro, y calculamos la concentración no inhibitoria (NIC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC), indicadores de la concentración a la cual el BME comienza a afectar al crecimiento de la célula y la concentración por encima de la cual la cepa no puede crecer, respectivamente [305] (ver apartado 7.2.3 de Material y Métodos). La figura 3.1A muestra la modelización de la curva para ambas cepas con un coeficiente de determinación (R^2) entre 0,96-0,99, dándonos una idea de la fiabilidad o bondad de ajuste del modelo. Las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 presentaron valores de NIC de $6,54 \pm 1,48$ (mM) y $2,8 \pm 0,9$ (mM) y valores de MIC de $36,74 \pm 2,96$ (mM) y $7,29 \pm 2,04$ (mM), estas diferencias fueron significativas con un p-valor de 0,0122 y 0,0001 para los valores de NIC y MIC, respectivamente. Estos resultados concordaron con los experimentos de goteo en placa con concentraciones de BME de 5 y 15 mM, donde la cepa CECT 10094 mostró una mayor tolerancia que la cepa Temohaya-26 (Figura 3.1B).

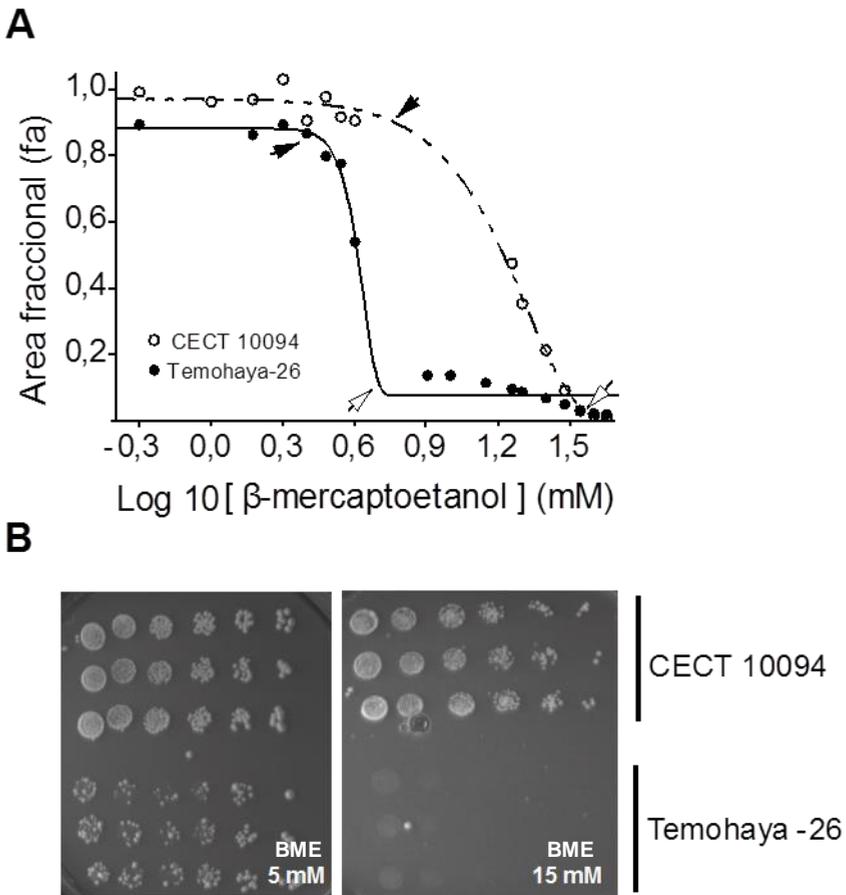


Figura 3.1. Tolerancia de las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 frente al agente activador de la UPR 2-mercaptoetanol. (A) La estimación de la concentración no inhibitoria (flechas negras) y de la concentración mínima inhibitoria (flechas blancas) se realizó calculando el área fraccional del crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de BME y ajustando la curva a una función de decaimiento de Gompertz modificada. Los crecimientos se realizaron por triplicado placas multipocillo, midiendo su densidad óptica cada media hora por un lector automático. (B) Análisis mediante goteo en placa del crecimiento de las cepas en presencia de un 5 y un 15 mM de BME. Las placas se dejaron crecer durante 6 días a 28°C.

3.2. Análisis de correlación entre tolerancia a etanol y distintos agentes estresantes en diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

Con el fin de seguir ahondando en la relación entre la UPR y la tolerancia a etanol, nos preguntamos si las cepas más resistentes a etanol también lo son para aquellos agentes que disparan la UPR por desnaturalización de proteínas, como la tunicamicina y el BME. Hemos visto en el capítulo anterior que el etanol dispara la UPR por aberraciones en la membrana del RE, por lo que una correlación positiva entre estos agentes podría indicarnos que aquellas cepas con una UPR aumentada son más resistentes al etanol. Para ello, analizamos 15 cepas de *S. cerevisiae* (Tabla M1) en medio GPY modificado con distintos estresantes, como tunicamicina, etanol, BME, H₂O₂, NaCl, DMSO así como GPY a pH 10, para poder comparar la correlación con otros tipos de estreses como el oxidativo, osmótico, alto pH y aumento en la fluidez de la membrana.

El análisis de correlación (Tabla 3.1) mostró que la tolerancia a etanol correlacionaba positivamente con aquellos agentes que disparan la UPR, al contrario que otros estreses como el oxidativo y el osmótico. En presencia de DMSO también vimos el mismo comportamiento, probablemente porque, como vimos en el capítulo anterior, el DMSO fluidifica la membrana y promueve la activación de Ire1p. Estos resultados sugieren, de manera general, que aquellas cepas más tolerantes al etanol pueden tener una activación de la UPR mayor que aquellas más sensibles, ya que presentan una mayor resistencia a agentes desencadenantes de UPR. Esta observación se analizará más en profundidad en el siguiente apartado.

Tabla 3.1. Análisis de la correlación entre la tolerancia a etanol y distintos agentes estresantes en 15 cepas de *S. cerevisiae*. Los números en negrita indican aquellas parejas de condiciones que obtuvieron una correlación positiva significativa (*p*-valor < 0.05). Para más información sobre las cepas y condiciones del experimento ver el apartado 9 de material y métodos del presente trabajo.

	Etanol (14%)	NaCl (1,25 mM)	BME (30 mM)	H ₂ O ₂ (3mM)	pH10	TM (1µg/mL)	DMSO (8%)
Etanol (14%)	----	0,989	0,017	0,289	0,05	0,007	0,005
NaCl (1,25 mM)	----	----	0,680	0,556	0,430	0,965	0,265
BME (30 mM)	----	----	----	0,081	0,242	0,007	0,136
H ₂ O ₂ (3mM)	----	----	----	----	0,05	0,117	0,109
pH10	----	----	----	----	----	0,076	0,064
TM (1µg/mL)	----	----	----	----	----	----	0,016
DMSO (8%)	----	----	----	----	----	----	----

3.3. Estudio de la relación entre la resistencia a etanol y activación de la UPR en levaduras del género *Saccharomyces*.

Tras observar que en general las cepas de *S. cerevisiae* parecen ser más tolerantes al etanol por un aumento en su respuesta UPR tras observar una correlación positiva entre la tolerancia a etanol y agentes que provocan el disparo UPR, el siguiente paso fue medir esa respuesta UPR para corroborar nuestras sospechas. Además, también nos planteamos si este comportamiento frente al etanol es el mismo entre cepas fermentativas y las de origen natural, o por el contrario en las primeras el peso de la UPR no sea tan importante en la respuesta al etanol debido a las diferencias adaptativas generadas por los procesos selectivos del hombre en la fermentación alcohólica [355]. Además, también estudiamos la relación de la tolerancia a etanol con los niveles de activación de la UPR en distintas especies del género *Saccharomyces*, como *S. uvarum*, *S. paradoxus* y *S. kudriavzevii*.

3.3.1. Análisis de la tolerancia a etanol en levaduras del género *Saccharomyces*.

Se cuantificó la respuesta de 12 cepas de levadura (ver tabla M1) pertenecientes al género *Saccharomyces* en presencia de un 10% (v/v) de etanol en medio GPY mediante lectura de la densidad óptica en placas multipocillo, tal y como se describe en el apartado 7.2.2 de Material y Métodos de la presente tesis. Los valores de área fraccional (fa) próximos a uno indicarán un crecimiento bajo el agente estresante similar al grupo control, tal y como describe Arroyo-López y col. (201) [319]. Nuestros resultados muestran como las cepas de *S. cerevisiae* presentan altos niveles de tolerancia a etanol, aunque algunas cepas de origen natural como la UWOPSS05 227.2 aislada de abeja (Malasia) o la Temohaya-26, aislada de la fermentación tradicional del agave, tienen niveles moderados de tolerancia a etanol, o incluso son incapaces de crecer, como la cepa cervecera CECT 1942. Las cepas de *S. kudriavzevii*, junto con *S. uvarum* y *S. paradoxus* no presentaron prácticamente crecimiento durante el experimento (Figura 3.2).

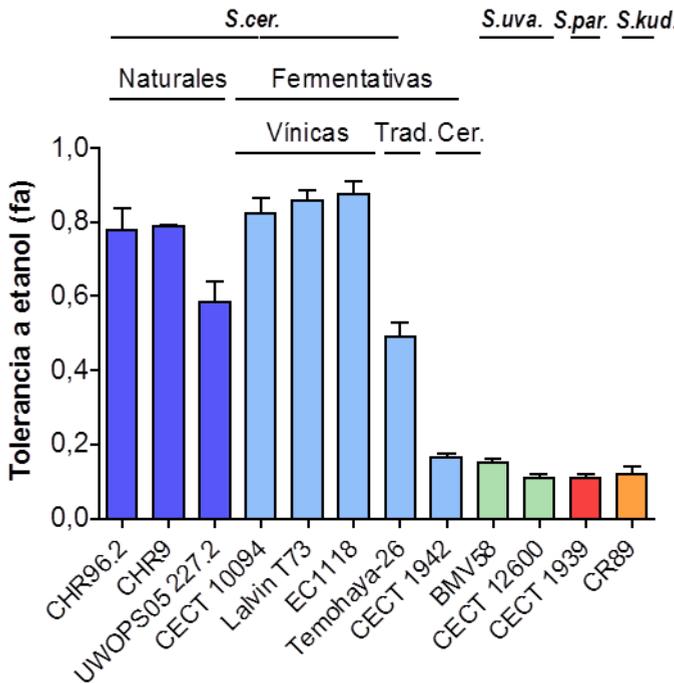


Figura 3.2. Análisis del crecimiento de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* en presencia de etanol. Las células se crecieron en placas multipocillo con medio GPY modificado con un 10% de etanol a 28°C, excepto para *S.kudriavzevii*, que fue de 24°C en base a su temperatura óptima de crecimiento [306]. El área fraccional se obtuvo dividiendo el área bajo la curva de crecimiento en presencia y ausencia de estrés para una misma cepa mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EEUU). S.cer: *S. cerevisiae*, S. uva: *S. uvarum*, S. par: *S. paradoxus*, S. kud: *S. kudriavzevii*. Trad: fermentación tradicional (agave). Cer: cepa cervecera.

3.3.2. Activación de la UPR y estudio de su relación con la tolerancia al etanol.

A continuación quisimos evaluar la activación de la UPR en respuesta a etanol en las mismas cepas, para ello, se utilizó la estrategia utilizada en el apartado 2.7.2 del anterior capítulo, basada en el uso del reportero fluorescente UPR-mCherry. En este caso y debido a que las cepas no presentaban auxotrofia del gen *URA3*, se llevó a cabo el cambio de marcador del gen de selección por el de resistencia

a G418 (ver apartado 4.1.2 de Material y Métodos). La figura 3.3 esquematiza los pasos realizados en este apartado. Para validar el uso del mismo reportero en diferentes cepas y especies de *Saccharomyces*, se confirmó que la región UPRE adyacente al gen reportero también estaba presente en los genes diana UPR de las especies más distantes a *S. cerevisiae*.

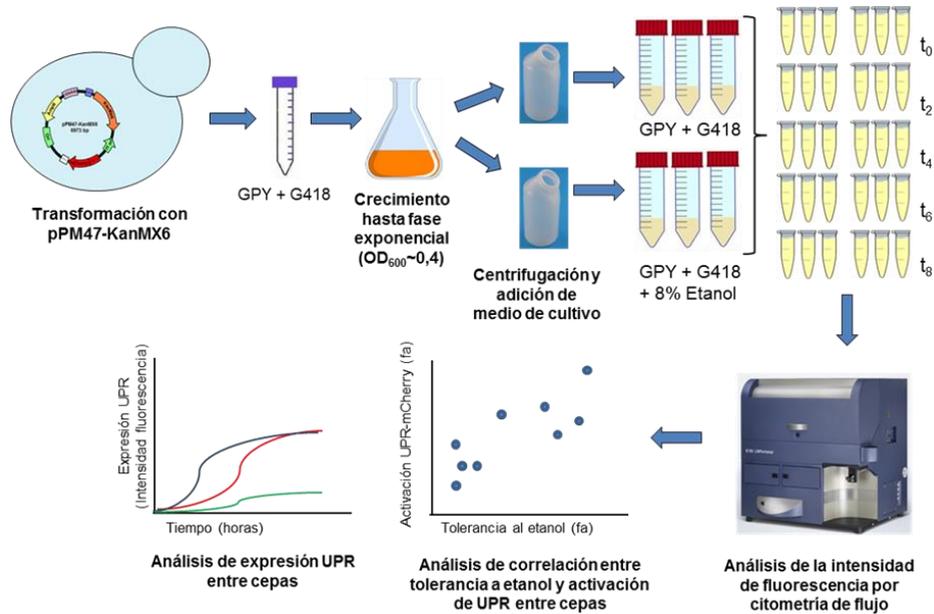


Figura 3.3. Esquema del análisis por citometría de flujo de la expresión del plásmido pPM47-KanMX6 en las distintas especies de *Saccharomyces* en presencia de etanol.

La activación del reportero mCherry en presencia de etanol para todas las cepas fue cuantificada y representada en la figura 3.4A. Sorprendentemente, los resultados mostraron una moderada o alta activación de la UPR en las cepas naturales de *S. cerevisiae* (azul oscuro), mientras que las cepas fermentativas (azul claro) presentaron niveles relativamente inferiores de activación UPR tras un estrés por etanol. Sin embargo es interesante destacar que las levaduras aisladas de fermentaciones vínicas (CECT 10094; T73 y EC1118) presentan una activación mayor de la UPR comparada con las cepas fermentativas, pero no vínicas, Temohaya-26 (aislada de fermentación de agave) y CECT 1942 (aislada de cerveza). En cuanto a las cepas pertenecientes a las especies *S. uvarum*, *S. paradoxus* y *S. kudriavzevii* no se detectó prácticamente diferencias en la

activación de la UPR respecto al medio control sin etanol, concordando con su mayor sensibilidad al etanol. Las figuras 3.4B-C muestran la activación normalizada respecto a tiempo cero de la UPR para cada cepa en presencia (B) y ausencia de etanol (C).

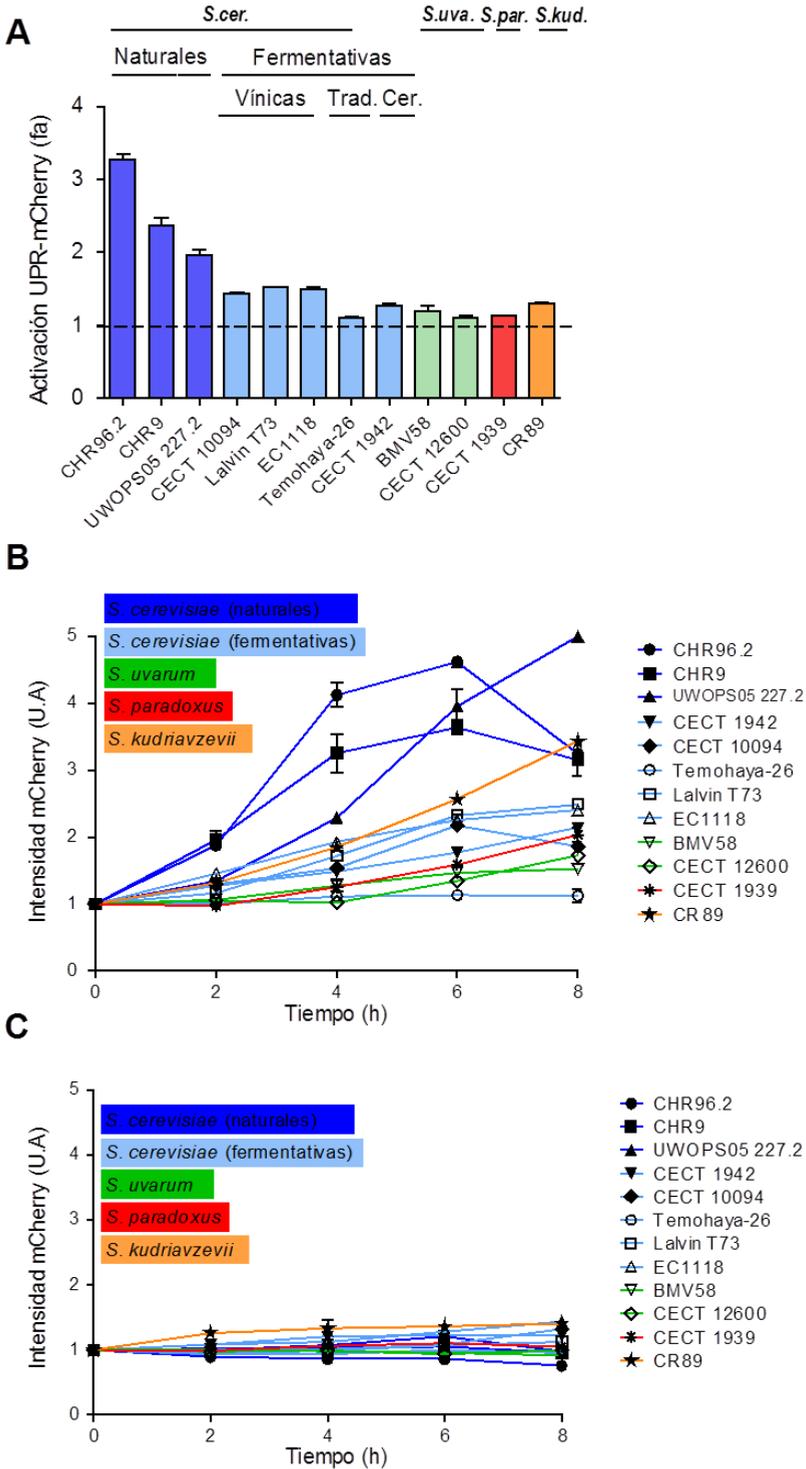


Figura 3.4. Cuantificación de la activación de la UPR mediante el gen reportero fluorescente mCherry en distintas levaduras del género *Saccharomyces* bajo estrés por etanol. (A) Obtención del área fraccional de la intensidad de mCherry a través al cociente entre el área bajo la curva de la intensidad del reportero en medio GPY con etanol (8%) y medio control tras 6 horas de crecimiento. La línea horizontal punteada representa el valor umbral por encima del cual la intensidad de la señal es mayor que en la condición control. (B-C) Cinética de activación del reportero fluorescente UPR para cada cepa en presencia (B) y ausencia de etanol (C) tras 8 horas de crecimiento. Todos los datos de intensidad fueron normalizados respecto a su valor inicial (t_0) y corresponden a triplicados biológicos. S.cer: *S. cerevisiae*, S. uva: *S. uvarum*, S. par: *S. paradoxus*, S. kud: *S. kudriavzevii*. Trad: fermentación tradicional (agave). Cer: cepa cervecera.

Cuando representamos la activación de la UPR frente a la tolerancia a etanol (Figura 3.5), se observa que las cepas naturales de *S. cerevisiae* forman un grupo separado en el cual coincide una alta tolerancia a etanol con un mayor aumento de la UPR, mientras que las cepas pertenecientes a las especies *S. paradoxus*, *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* aparecen en el otro extremo, es decir, baja tolerancia a etanol unido con una activación UPR prácticamente idéntica que en condiciones no estresantes. Si hiciéramos un test de correlación de Spearman con estos grupos veríamos que efectivamente las cepas de levadura más tolerantes a etanol presentan una activación de la UPR mayor, obteniendo una relación muy alta entre las variables (p -valor = 0,0025; r de Spearman = 0,928). Al añadir el grupo de las *S. cerevisiae* fermentativas seguimos obteniendo una correlación significativa (p -valor = 0,016), pero el grado de asociación entre las dos variables es menor (r de Spearman = 0,671). Como vemos, a pesar de que tanto *S. cerevisiae* natural como fermentativa no presentan en general diferencias en los valores de NIC y MIC de etanol [319], las cepas fermentativas presentan valores de activación UPR más bajos, independientemente de que sean más o menos tolerantes al etanol, por lo que muy probablemente las cepas fermentativas presenten otros mecanismos adaptativos de tolerancia a etanol además de la UPR.

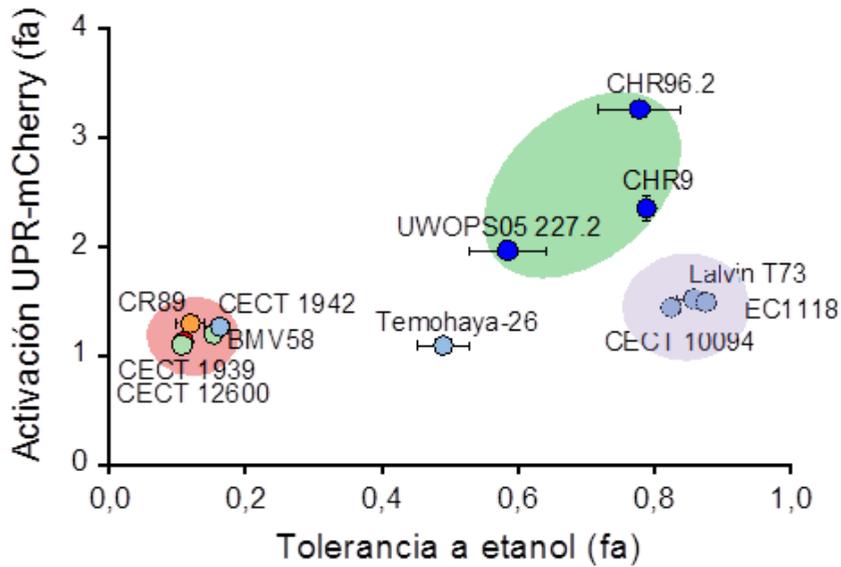


Figura 3.5. Activación de la UPR frente a tolerancia a etanol en diferentes cepas del género *Saccharomyces*. Las cepas de *S. cerevisiae* naturales (azul oscuro) se engloban en aquellas que presentan una alta tolerancia a etanol con una mayor activación UPR (grupo verde), las cepas pertenecientes a *S. paradoxus* (rojo), *S. kudriavzevii* (naranja) y *S. uvarum* (verde) presentaron una baja tolerancia a etanol y actividad UPR (grupo rojo), mientras que las *S. cerevisiae* fermentativas (azul claro) presentaron una baja actividad UPR independientemente de su tolerancia a etanol, aunque las cepas vínicas (grupo morado) eran las más tolerantes al etanol. Se obtuvo un coeficiente de correlación de Spearman de 0,671 con un p-valor de 0,016.

3.4. Análisis de las variaciones aminoacídicas de la proteína Hac1p en el género *Saccharomyces*.

Se procedió al análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hac1p con el fin de hallar variaciones que pudieran explicar las diferencias en cuanto a activación de la UPR entre las distintas especies de levaduras.

Se obtuvo la secuencia de la región codificante de *HAC1* de 17 cepas de *S. cerevisiae* (fermentativas y naturales) y *S. paradoxus* (Tabla 3.2) a partir de los datos de secuenciación de Liti y col. (2009) [42] y sus secuencias aminoacídicas fueron comparadas con las secuencias de *S. kudriadvzevii* y *S. uvarum* obtenidas por Cliften y col. (2003) [356] junto con Kellis y col. (2003) [318].

Tabla 3.2. Cepas de *S. cerevisiae* (marcadas con asterisco) y *S. paradoxus* utilizadas en el estudio. Para más información sobre su origen consultar el trabajo de Liti y col. (2009) [42].

Cepa	Origen
UWOPS83-787.3 *	Nopal tunero costero (<i>Opuntia stricta</i>)
DBVPG1373 *	Suelo
SK1 *	Suelo
DBVPG1788 *	Suelo
UWOPS87-2421 *	Cladodio (<i>Opuntia megacantha</i>)
BC187 *	Barril de fermentación
L-1374 *	Fermentación mosto
L-1528 *	Fermentación mosto Cabernet
Yllc17_E5 *	Vino
K11 *	Shōchū
K9 *	Ragi (similar al sake)
CBS432	Corteza de <i>Quercus spp</i>
FPN3828	Corteza de <i>Quercus robur</i>
KPN3829	Corteza de <i>Quercus robur</i>
IFO1804	Corteza de <i>Quercus spp</i>
Y7	Corteza de <i>Quercus spp</i>
Z1	Corteza de <i>Quercus spp</i>

Los cambios aminoacídicos de la proteína Hac1p entre las distintas especies del género *Saccharomyces* están representados en la tabla 3.3. No se observaron cambios aminoacídicos en la secuencia de Hac1p entre las cepas fermentativas y naturales de *S. cerevisiae*. En cambio es remarcable el hecho de que aparezcan dos cambios aminoacídicos en las posiciones 115 y 154 exclusivas de *S. cerevisiae*, este hecho será discutido más adelante.

Tabla 3.3. Cambios aminoacídicos y posición dentro de la proteína Hac1p dentro del género *Saccharomyces*. Los aminoácidos en negrita en las posiciones 115 y 154 muestran cambios exclusivos de *S. cerevisiae*. Las equivalencias cada letra por su aminoácido correspondiente se puede consultar en la tabla suplementaria S11.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. kudriavzevii</i>	<i>S. bayanus</i>	Posición	
N	N	N	D	11	BÁSICO
L	L	L	S	16	APOLAR
N	N	D	D	82	POLAR
D	D	G	E	88	ÁCIDO
H	H	H	R	89	
E/K	K	E	E	90	
T	T	N	A	94	
S	G	G	S	96	
H	H	R	R	97	
S	S	S	H	103	
S	S	S	C	112	
G	D	D	D	115	
A	A	T	T	116	
T	A	T	A	120	
M	M	L	L	140	
L	L	M	L	145	
A	S	S	S	154	
V	I	L	I	171	
P	P	P	Q	172	
S	S	S	P	174	
T/K	T	T	A	175	
T	T	T	V	176	
D	D	E	D	181	
N	N	N	D	182	
D	D	D	H	187	
A	A	T	T	188	
A	A	A	V	194	
D	D	D	G	199	
A	A	A	G	202	
G	G	E	E	203	

Por otro lado vemos como el número de variaciones aminoacídicas con respecto a *S. cerevisiae* aumenta conforme aumenta la distancia filogenética entre especies (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Número de cambios de aminoácidos en la proteínas Hac1p en las especies *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii* y *S. uvarum*, respecto a *S. cerevisiae*. Nótese el aumento en el número de cambios conforme aumenta la distancia filogenética entre especies.

	Número de cambios
<i>S.cerevisiae</i> - <i>S. paradoxus</i>	5
<i>S.cerevisiae</i> - <i>S. kudriavzevii</i>	13
<i>S.cerevisiae</i> - <i>S. uvarum</i>	26

3.5. Conclusiones.

Los datos aportados en el presente capítulo abren nuevos caminos en la investigación de la adaptación de las levaduras al etanol. Nuestros resultados muestran claras diferencias adaptativas entre *S. cerevisiae* fermentativas y naturales bajo estrés por etanol a pesar de que pueden llegar a tolerar la misma cantidad de estresante [319]. Si una UPR potente provoca un aumento en la tolerancia a etanol, como se ve en las cepas naturales, y las cepas fermentativas no disparan tanto esa señal debido, probablemente, a una adaptación de la membrana para contrarrestar el aumento de fluidez generado por el etanol, sería interesante diseñar estrategias para mejorar la tolerancia a etanol en las cepas fermentativas a través de un aumento de la respuesta UPR. Estas diferencias en composición de membrana entre cepas vínicas y naturales han quedado patentes en varios trabajos en los que se observa como cepas vínicas presentan una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que saturados y una mayor concentración de ácido oleico [319, 357].

Por otra parte, nuestro trabajo pone de manifiesto la importancia de la estructura del factor de transcripción Hac1p en la respuesta a etanol y la necesidad de futuros estudios para determinar los distintos mecanismos moleculares que determinan la tolerancia a etanol en las cepas fermentativas y naturales, ya que solamente obteniendo una visión conjunta de ambas respuestas podremos establecer mecanismos globales de respuesta al etanol.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron las distintas respuestas frente al estrés por etanol en dos cepas que difieren en tolerancia a etanol en dos etapas distintas del crecimiento. De acuerdo al análisis transcriptómico, en etapas tempranas de estrés, la cepa más tolerante al etanol mostró una sobreexpresión de genes relacionados con el transporte y la utilización de prolina (*PUT4* y *PUT1*), síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, chaperonas moleculares como *HSP32* y *HSP104* y una respuesta a estrés oxidativo que no aparecía en la cepa Temohaya-26, la más sensible al etanol. Algunos de estos genes han sido previamente descritos como genes clave en la tolerancia al etanol al contrarrestar el efecto fluidificante sobre las membranas y disminuir las especies reactivas de oxígeno (ROS) bajo estrés oxidativo, uno de los efectos más importantes del estrés por etanol [148, 159, 204, 205, 253].

Es importante destacar que durante las fases tempranas de respuesta a estrés, muchos de los genes relacionados con las etapas de regeneración del NADH/NADPH estaban sobreexpresados en la cepa CECT 10094, incluyendo los genes *ZWF1*, *SOL4* y *ALD4*, el NADPH actúa como cofactor de la glutatión reductasa y la tiorredoxina reductasa, elementos clave para contrarrestar el estrés oxidativo. Además, el NADPH es clave en la desaturación dependiente de NADH del ácido esteárico en ácido oleico por la desaturasa Ole1p, ácido graso insaturado determinante en la tolerancia al etanol en *S. cerevisiae* [264], este gen *OLE1* también se sobreexpresó en la cepa CECT 10094.

A pesar de la sobreexpresión del gen *OLE1* en etapas tempranas de estrés por etanol, no se observaron cambios significativos de abundancia de mRNA del gen *OLE1* en los trabajos llevados a cabo por Chandler y col. (2004) y Ma y Liu (2010) [159, 205]. En cambio, Shobayashi y col. (2007) si observaron en la cepa de sake altamente tolerante al etanol K-9 una sobreexpresión del gen *OLE1* tanto en crecimiento estático como en agitación en comparación con la cepa de laboratorio X2180-1A [204]. Cabría esperar que no solamente la estabilidad del mRNA, los niveles de traducción y las reacciones enzimáticas con las fuentes de carbono y oxígeno regularan la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, tal y como proponen Martin y col. (2007) [358], sino que los niveles de transcripción juegan un papel más importante de lo que se pensaba y a diferencia de los resultados obtenidos por Alexandre y col. (2001) es posible que aquellos genes relacionados con la biogénesis de la pared celular y metabolismo de lípidos constituyan un proceso de adaptación durante los primeros momentos de estrés y no a largo plazo como ellos proponen [148].

Por otro lado, se observó la sobreexpresión de genes relacionados con la degradación del glicerol, como *GUT2* y *GCY1* en la cepa Temohaya-26 tras una hora de estrés por etanol. Bien es sabido que el estrés por etanol en el género *Saccharomyces* promueve la síntesis de glicerol, ya no tanto como por un requerimiento del metabolito, sino como un medio alternativo de regeneración del NAD^+ , ya que la exposición a etanol causa una disminución del 60% del NAD^+ intracelular por la actividad inversa de la alcohol deshidrogenasa [359]. En nuestro caso, no solamente no encontramos genes como *GPD1*, relacionados con la síntesis de glicerol, sino que la cepa sobreexpresaba genes para su catabolismo, pudiendo este hecho formar parte de las razones por las que la cepa Temohaya-26 es más sensible al etanol que la cepa CECT 10094.

En ambas cepas se observó la sobreexpresión de la acetil-CoA sintasa, codificada por el gen *ACS1*, esta sobreexpresión podría aumentar el flujo de carbono hacia la ruta del mevalonato, mejorando la tolerancia al etanol en *S. cerevisiae* y aumentando el contenido de ATP [360]. Hasta la fecha la sobreexpresión de este gen en *S. cerevisiae* no ha sido vista en trabajos de *microarrays* de expresión bajo estrés por etanol.

Como hemos mencionamos anteriormente, el etanol induce ROS mediante daños en la integridad de la membrana de la mitocondria, imponiéndose el estrés oxidativo como otro efecto más generado por la presencia de etanol en el medio [117]. A diferencia de la cepa Temohaya-26, la cepa CECT 10094 mostró términos GO relacionados con esta respuesta a estrés tras una hora de exposición al etanol, por lo que esta cepa podría contrarrestar el daño producido al DNA, lípidos, proteínas y membranas producidas por ROS de una forma más efectiva que la cepa menos tolerante al etanol.

Además, es importante mencionar la sobreexpresión en ambas cepas de los genes *HSP42*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP31* y *HSP33*, así como de manera exclusiva los genes *HSP104* y *HSP32* en la cepa CECT 10094. A pesar de que muchas HSP funcionan como chaperonas moleculares que protegen a las proteínas de la agregación y el desplegamiento frente altas temperaturas, respuesta conocida como Respuesta a Estrés por Calor (HSR) y se ha aceptado de forma general que el etanol puede desplegar las proteínas celulares por su efecto en la solvatación de los grupos hidrofóbicos de las proteínas, es importante destacar el estudio llevado a cabo por Godon y col. (1998), en el cual observó la inducción de 115 proteínas como respuesta adaptativa al estrés oxidativo [104]. Entre ellas

se incluyen numerosas HSP y proteínas relacionadas con rutas de degradación de proteínas. Coincidiendo con nuestros datos, las proteínas HSP104p, HSP42p, HSP12p y HSP26p se encuentran entre ellas, por lo que es probable que su sobreexpresión se deba al efecto postraducciona que el estrés oxidativo ejerce sobre las proteínas, como la carbonilación, oxidación de las cadenas laterales, pérdida de estructura y agregación, más que por la presencia de proteínas desplegadas por el efecto directo del etanol, presentando así una importante actividad proteolítica en la degradación de proteínas oxidadas.

Es sorprendente, además, que veamos en la cepa CECT 10094 la sobreexpresión de las proteínas pertenecientes a la superfamilia DJ-1 (*HSP31-HSP33*), cuyos homólogos en humanos están relacionados con enfermedades neurodegenerativas y cáncer. En levaduras, sin embargo, su papel no está del todo claro. Miller-Fleming y col. (2014) han descubierto recientemente que aunque la delección de estos genes provocan una acumulación de ROS, alta sensibilidad al estrés oxidativo y una pared celular más delgada, su sobreexpresión era mayor bajo limitación de glucosa y nitrógeno que por estrés oxidativo con H₂O₂ (2 mM) [361], por lo que es probable que la sobreexpresión de estos genes en nuestro estudio se deba mayoritariamente a una respuesta ante la deficiencia de nutrientes generada por el daño directo del etanol sobre los transportadores de membrana.

La presencia de ontologías génicas (GO) asociadas a procesos de síntesis de tiamina en la cepa más resistente a etanol también es interesante. Recientes estudios llevados a cabo por Wolak y col. (2014) han determinado la importancia de la tiamina en el mantenimiento redox de la levadura bajo estrés oxidativo, disminuyendo significativamente la oxidación de proteínas y la presencia de ROS [362], este hecho vuelve a poner de manifiesto una respuesta más marcada frente al estrés oxidativo en la cepa CECT10094. La sobreexpresión de genes relacionados con la síntesis de tiamina también se observó en fermentaciones con cepas de sake [204].

Finalmente la sobreexpresión del gen *YNL134C* en ambas cepas merece especial mención ya que su función ha sido recientemente descubierta por Zhao y col. (2015). Esta reductasa aldehído dependiente de NADH controlada por Yap1p y Msn2/4p está relacionada con la detoxificación del furfural, uno de los principales aldehídos generados durante la hidrólisis del material lignocelulósico para la obtención de bioetanol y con un gran poder oxidativo [363]. En nuestro

caso, ya intuimos la importancia que este gen podría tener sobre la tolerancia al etanol y observamos que su delección en la cepa de laboratorio BY4743 provocaba una disminución significativa de su crecimiento a concentraciones de etanol del 10% y 12% respecto a la cepa salvaje. Es posible que la presencia de etanol genere aldehídos citotóxicos por peroxidación de lípidos, como el malondialdehído (MDA) ó acroleína [150], que incrementan la fluidez de la membrana y oxidan los grupos sulfhidrilo de las proteínas y que esto dispare la expresión de la reductasa aldehído, o que, por otro lado, la presencia de etanol en el medio aumente la cantidad de acetaldehído en la célula generando más estrés oxidativo y una disminución de NAD^+ en la célula [364]. En este escenario la presencia de la aldehído reductasa dependiente de NADH aseguraría un aporte de NAD^+ para mantener el equilibrio redox en la célula y a su vez disminuiría el estrés oxidativo generado por los aldehídos. La sobreexpresión del gen *OYE3*, en la cepa CECT 10094 en ambas etapas del crecimiento podría indicar que la expresión de *YNL134C* se da con el fin de disminuir la cantidad de aldehídos citotóxicos ya que su sobreexpresión va ligada a la presencia de acroleína en la célula, permitiendo aumentar su tolerancia al aldehído [365]. En cualquier caso se hace necesario un estudio más profundo del papel de esta proteína y su relación con la detoxificación bajo estrés por etanol.

Durante la fase diaúxica, observamos en la cepa más tolerante la sobreexpresión de genes relacionados con la generación de energía (*ATP1*, *ATP3*, *ATP4*, *ATP7* y *ATP20*), indicando que bajo condiciones de estrés por etanol, un aumento en la cantidad de ATP podría ayudar en la síntesis de proteínas y el transporte de protones a través de la membrana plasmática. Este hecho es consistente con la sobreexpresión de genes *VMA* (*VMA10* y *VMA8*) que codifican una H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa), un bomba de protones relacionada con la acidificación vacuolar y por lo tanto en la compensación de la entrada de H^+ inducida por el etanol a través de una membrana plasmática comprometida [223].

Un mayor contenido en ergosterol en las levaduras ha sido asociado con mayores tolerancias al etanol al prevenir la interdigitación y proporcionar un grosor de membrana óptimo. Nosotros observamos también durante en la fase diaúxica en la cepa CECT10094, la sobreexpresión de genes relacionados con la ruta de síntesis del ergosterol (*ERG5*, *ERG11*, *ERG20*) no vistos previamente en anteriores trabajos realizados con *microarrays* [148, 159, 204, 231], así como la sobreexpresión de *MCR1*, una reductasa mitocondrial dependiente de NADH

relacionada tanto en la síntesis de ergosterol como en la respuesta frente a estrés oxidativo.

Es remarcable el hecho de que genes relacionados con la organización del citoesqueleto de actina como *RDI1*, *RHO1*, *ARC19* y *ARP2* estaban sobreexpresados en la cepa más tolerante al etanol. De acuerdo con Kubota y col. (2004), la organización espacial del citoesqueleto de F-actina se perturba de forma transitoria tras la adición de etanol [59], por lo que se podría esperar que la cepa CECT 10094 contrarrestara la despolarización de la F-actina más eficientemente que la cepa menos tolerante con el fin de obtener una mayor tasa de crecimiento bajo condiciones estresantes.

Por otra parte, nuestros resultados revelaron categorías GO relacionadas con la retrotransposición en la cepa CECT 10094. Se conoce más bien poco acerca de la expresión de retrotransposones en células de levadura estresadas con etanol, probablemente debido a la ausencia de anotación de genes de retrotransposones y categorías GO asociadas en plataformas web como FunSpec [236]. Permanece sin esclarecer la idea de que un aumento en la expresión de genes Ty durante estrés por etanol tenga algún tipo de importancia adaptativa, aunque en nuestro trabajo también observamos la sobreexpresión de *GCN4*, cuya proteína Gcn4p se ha sugerido como activador de Ty1 durante estrés [366]. Además, el análisis de las regiones promotoras de los 12 genes pertenecientes a la transposición mostraron lugares de unión para factores de transcripción relacionados con varias respuestas a estrés, como Msn2/4p para estrés general (16,66%), Hac1p para respuesta a proteínas desplegadas (33,33%), Hsf1 para estrés por calor (16,66%) y Yap1p para estrés oxidativo (41,66%). Son necesarios futuros trabajos para determinar si existe algún tipo de asociación entre los retrotransposones y la respuesta a estrés en levaduras.

Un punto muy interesante en los resultados es que, a diferencia de la cepa Temohaya-26, la cepa más tolerante al etanol sobreexpresó durante la fase diaúxica en presencia de etanol genes cuyas ontologías génicas estaban relacionadas con el catabolismo y plegamiento de proteínas, sugiriendo que la cepa CECT 10094 presenta un mecanismo más eficiente que la cepa Temohaya-26 en la eliminación y plegamiento de proteínas desnaturalizadas a fin de mantener su conformación funcional. Además, también es remarcable la sobreexpresión de 32 genes de función desconocida en la cepa CECT 10094 no

vistos anteriormente en trabajos de estrés por etanol y cuya función debería ser analizada más en profundidad.

En cuanto al análisis de las regiones promotoras de los genes sobreexpresados tras una hora de estrés por etanol vemos como la cepa CECT10094 presenta un mayor número de genes con lugares de unión a factores de transcripción de estreses concretos (Hac1p para respuesta a proteínas desplegadas, Hsf1p para estrés por calor y Yap1p para estrés oxidativo) que en la cepa menos tolerante, por lo que la cepa CECT 10094 puede presentar un mecanismo de reacción mucho más específico frente al agente estresante que la cepa menos tolerante al etanol durante las primeras horas de estrés. El hecho de que la gran mayoría de genes sobreexpresados (alrededor del 90%) en la cepa Temohaya-26 durante este periodo contengan secuencias para la respuesta a estrés general (Msn2/4p) corrobora nuestra hipótesis y muestra que durante las primeras etapas del estrés, la cepa menos tolerante podría utilizar mayoritariamente un mecanismo de respuesta a estrés general. Por otro lado, llama la atención que ninguno de los 59 genes sobreexpresados exclusivamente en la cepa menos tolerante contenga lugares de unión a Hac1p, el factor de transcripción responsable de la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el retículo endoplasmático, esta respuesta, que puede ser disparada por carencia de inositol en la célula, daños en la pared celular o presencia de proteínas desplegadas en el RE podría ser una de las razones de la mayor tolerancia a etanol en la cepa CECT 10094.

A lo largo del capítulo 1 nuestros resultados mostraron además como la cepa más tolerante al etanol es capaz de crecer mejor en un medio más ácido, incluso en presencia de etanol, comparado con la cepa menos tolerante, sugiriendo que aquellas cepas capaces de crecer mejor a pH más ácidos son también más tolerantes al etanol debido, posiblemente, a su capacidad para expulsar protones hacia el exterior celular a través de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática y a confinarlos en la vacuola via ATPasa vacuolar (V-ATPasa), acidificándola y consiguiendo así una homeostasis del pH intracelular [231]. De hecho se sabe que la bomba de protones de la membrana plasmática se activa tanto por pH ácido para regular el pH interno [367] como con etanol, a concentraciones de entre 3-10% (v/v), aumentando hasta 3 veces su actividad [154]. Esta relación entre una mayor tolerancia a pH ácido y mayor tolerancia a etanol fué corroborada con el análisis del crecimiento de más cepas de *S. cerevisiae* en las mismas condiciones, obteniendo los mismos resultados.

Tanto la sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en la cepa CECT 10094 como el aumento en la sensibilidad al etanol en cepas mutantes de genes cuyo promotor presenta lugares de unión a Hac1p (RVS161, HAL1, HLJ1, QCR6 y LHS1), hizo plantearnos la importancia de la respuesta UPR frente al estrés por etanol en levaduras. Este fenómeno, muy conservado en vertebrados ha sido ampliamente estudiado en células humanas y ratones en presencia de etanol [368, 369], pero poco se sabe de su activación bajo estrés por etanol en levaduras.

Esta respuesta en levaduras parece desencadenarse prácticamente en el momento de añadir etanol al medio, tal y como demuestran nuestros resultados de activación por *splicing* de *HAC1*, esta activación supone a su vez un aumento en la transcripción de *HAC1* por autorregulación a través de la unión de la proteína Hac1p a las regiones UPRE de su promotor [370] y una sobreexpresión de la proteína sensora Ire1p una vez la activación de *HAC1* disminuye, este hecho nos parece interesante en el sentido de que no se había descrito previamente una recuperación de la proteína Ire1p una vez cesa la respuesta UPR. Por otro lado, la presencia en la muestra sin estresar de una pequeña cantidad de mRNA de *HAC1* activado apoya las observaciones de Bicknell y col. (2007), en la cuales demuestran la necesidad de una activación mínima basal de la UPR para un correcto funcionamiento de la citocinesis [371]. Es importante comentar que también se detectó la activación inmediata de la UPR en la cepa diploide BY4743 utilizando una concentración de etanol del 6% (v/v) mediante el plásmido reportero pMCZ-Y, esta activación se mantuvo constante hasta las 4 horas de estrés mientras que la activación del mRNA de *HAC1* comenzó a disminuir a las 2 horas, debido probablemente a la presencia residual de la enzima β -galactosidasa en la célula.

Aunque la activación de la UPR tanto en fermentación [287] como por choque con etanol [330] ha sido descrita recientemente, las causas de la misma no han sido estudiadas en profundidad. Nuestros resultados contradicen los obtenidos por Miyagawa y col. (2014), que establecen la desnaturalización de proteínas como único activador de la UPR en presencia de un 16% de etanol. Los autores observan, además del *splicing* de *HAC1* a esta concentración de etanol, la unión de Kar2p a agregados de proteínas y una disminución del *splicing* de *HAC1* en células con la zona de unión a proteínas desplegadas en Ire1p mutada (Δ III). Aunque se ha visto cierta desnaturalización de proteínas en la levadura a concentraciones de etanol del 15%, también se ha visto que a concentraciones

del 10% de etanol no existe desnaturalización de ninguna de estas enzimas glicolíticas, incluso enzimas como la alcohol deshidrogenasa, la fosfoglucosa isomerasa, la triosa fosfato isomerasa o la fosfoglicerato mutasa no presentaron prácticamente desnaturalización a concentraciones de etanol del 20% [333]. Estos datos coinciden con los nuestros en el sentido de que a un 8% de etanol no detectamos proteínas desplegadas en el RE que pudieran dar lugar a un disparo en la UPR, esta afirmación se hace en base a la utilización de tres estrategias distintas, la utilización del sensor eroGFP, capaz de detectar proteínas desplegadas en el RE por cambios en su estado redox [298], la observación mediante microscopia electrónica de transmisión de la variación en la longitud del RE, que se ha demostrado que aumenta para albergar proteínas desplegadas y atenuar así la UPR [121] y la utilización del marcador de autofagia ATG8-GFP para observar mediante microscopia de fluorescencia vesículas autofágicas, necesarias en el proceso catabólico de la degradación y el reciclaje de proteínas desplegadas y muy abundantes tras estrés en el RE por DTT y TM [121, 344].

Aunque ciertamente el etanol puede desnaturalizar proteínas y disparar la UPR a concentraciones muy altas, tal y como demuestra el trabajo de Miyagawa y col. (2014), cabe destacar que también observan una activación transitoria a los 30 minutos de *HAC1* tras un choque del 8% de etanol, pero los autores pasan por alto este hecho y aumentan la concentración hasta un 16%, obteniendo así desnaturalización de las proteínas. Hubiera sido interesante haber analizado la agregación de proteínas a Kar2p y el *splicing* de *HAC1* en mutantes ΔIII a esta concentración de etanol, para determinar la presencia de otras causas en la activación de la UPR.

El estudio de la expresión de ciertos genes dianas de la UPR por RT-qPCR permitió determinar que todos ellos alcanzaban su máxima expresión tras 1 hora de estrés, coincidiendo efectivamente con uno de los momentos de mayor activación de *HAC1*, además todos ellos excepto el gen *HLJ1* presenta en su región promotora dominios de unión documentados donde Hac1p actúa como activador de la transcripción, por lo que aunque *HLJ1* se expresa durante estrés por etanol no podemos englobarlo dentro del grupo de genes diana de la UPR. Es destacable que solamente los genes *ERO1* y *LHS1*, cuya activación además de por Hac1p también está regulada por Yap1p (responsable de la respuesta a estrés oxidativo) permanezcan sobreexpresados a lo largo del tiempo, mientras que los demás reduzcan su expresión coincidiendo con la reducción del *splicing*

de *HAC1*. Bien es sabido que el etanol genera daños en las mitocondrias y provoca la formación de ROS, cuya principal diana son los ácidos grasos insaturados, su peroxidación genera lípidos reactivos y radicales de ácidos grasos que pueden atacar otros ácidos grasos provocando reacciones oxidativas en cadena [372]. Los lípidos oxidados se vuelven inestables y se convierten en productos de degradación tan tóxicos como ROS, como son el malondialdehído (MDA) y la acroleína, que aumentarán la fluidez de la membrana y oxidarán los grupos SH de las proteínas, afectando a su función de manera reversible al crear puentes disulfuro intra e intermoleculares y también podrán carbonilarlas, modificándolas irreversiblemente y generando agregados [373, 374]. Además, los radicales libres también pueden atacar los enlaces peptídicos, provocando proteólisis al oxidar los residuos de prolina de las proteínas. Es posible que aunque la presencia de proteínas desplegadas no sea el causante del disparo inicial de la UPR tras estrés por etanol, sí que se produzca horas más tarde un estrés oxidativo, tal y como demuestran nuestros resultados al medir el estado redox del RE con la eroGFP, y esto provoque daños en las proteínas que acabarán viajando al RE para ser reparadas. Por lo tanto la expresión del factor de transcripción Yap1p por etanol podría generar proteínas relacionadas con el plegamiento y transporte de proteínas al RE aunque la activación de *HAC1* haya cesado, de hecho nuestros resultados muestran una disminución en la tolerancia a etanol en mutantes $\Delta Yap1$ bajo un en presencia de un 10% de etanol.

También hemos puesto de manifiesto la importancia del factor transcripcional Gcn4p en la tolerancia a etanol, relacionado con tolerancia específica a H_2O_2 , además de a la falta de aminoácidos en el medio [375]. También se ha visto que Gcn4p es necesario para la transcripción de genes con cualquier UPRE en su promotor actuando a modo de heterodímero con Hac1p, incluso puede activar por ella misma genes con UPRE-2 en su promotor, sin necesidad de la presencia de Hac1p, si está en alta concentración [133]. Nuestros resultados respecto a la importancia de Msn4p frente a etanol en comparación con Msn2p también parecen coincidir con los obtenidos en trabajos anteriores, donde observaron un patrón de expresión mayor de *MSN4* respecto a *MSN2* en presencia de etanol en una cepa más tolerante a etanol [205], advirtiendo así distintas funciones reguladoras entre los dos factores de transcripción.

Por otro lado, los estudios de protección cruzada con tunicamicina muestran como la activación temprana de la UPR prepara a la célula para un futuro estrés por etanol, al sobreexpresar genes que también son necesarios para

contrarrestar el efecto del etanol, como los relacionados con la biogénesis y organización de la pared celular, transporte de proteínas, organización de la membrana, biosíntesis de lípidos, respuesta a estrés oxidativo y proteínas desplegadas [336]. La adaptación al etanol en levaduras se ha relacionado con la acción coordinada de los factores de transcripción Msn2/4p, Yap1p y Hsf1p [85, 205]. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de Hac1p bajo estrés por etanol aumenta la tolerancia a este estrés, pero solamente en presencia de altas concentraciones de etanol (10%). Por lo que nuestros resultados presentan a Hac1p como un regulador clave digno de futuros estudios en la tolerancia al etanol en levaduras. Como hemos advertido anteriormente, durante la preparación de este trabajo, Brown NA y col. (2013) [287] mostraron que Hac1p se activaba durante la producción de bioetanol, relacionando la UPR con una mayor tolerancia al etanol en una cepa industrial. Estas observaciones apoyan nuestros resultados.

Nuestros resultados muestran modificaciones en la ultraestructura de la célula en presencia de etanol, como una única gran vacuola y una pared celular de grosor no uniforme, tal y como ya se ha visto en anteriores trabajos [150, 239]. Aunque hasta la fecha no se ha podido dar ninguna explicación del motivo del aumento del volumen de la vacuola en presencia de etanol, sí que hemos visto la entrada directa del retículo endoplasmático a la vacuola tras el disparo de la UPR por etanol. Esta nueva modalidad de reticulofagia ha sido descubierta muy recientemente por Shuck y col. (2014) [341], hasta ese momento solamente se había observado la reticulofagia a través de autofagosomas con fragmentos de RE en su interior en células sometidas a inanición [376]. Los autores ya observaron previamente una expansión del RE en presencia de proteínas desplegadas tras la activación de la UPR [121] y describen este método como un nuevo mecanismo para lograr un tamaño adecuado del RE una vez cesa el estrés, degradando la membrana sobrante. Este fenómeno no requiere mecanismos relacionados con la autofagia y puede darse en ausencia de proteínas desplegadas. En nuestro caso observamos que el etanol disminuía la longitud del RE, ya hemos comentado que según nuestros resultados el etanol no genera inicialmente proteínas desplegadas y que la causa de la activación de la UPR se debe a otro tipo de efecto producido por el etanol, pero la observación de un RE más reducido ha sido un hallazgo realmente sorprendente. Podríamos relacionar un aumento de la vacuola bajo estrés por etanol con una entrada directa del RE aunque con DTT no observamos aumento de la vacuola,

probablemente porque hemos utilizado puntos temporales donde el RE comienza a disminuir y no ha dado tiempo a aumentar su volumen. Si comparamos con el trabajo de Shuck y col. (2014) vemos como aparece una gran vacuola al igual que a nosotros, además ellos utilizan una cantidad de DTT 8 veces superior por lo que la reticulofagia podría estar más potenciada. Aunque no hemos podido determinar la razón de la entrada de RE en la vacuola bajo estrés por etanol, se sabe que existen regiones del RE asociados a membrana plasmática (PAM) cuyo contenido en PC, PE y PI es mayor y estos dominios pueden actuar suministrando estos lípidos directamente a la membrana plasmática sin utilizar la ruta de secreción [377]. Observando las imágenes de TEM nos dimos cuenta que la porción de RE que desaparecía bajo estrés por etanol era aquella juxtapuesta a la membrana plasmática y que por lo tanto pertenecía a la PAM, aunque son necesarios futuros estudios es posible que el daño en la membrana generado por etanol dispare la reticulofagia en la vacuola con el fin de reorganizar la membrana y obtener una fuente rápida de lípidos como el PI, que disminuye la permeabilidad generada por el etanol y estimula la actividad de extrusión de H^+ de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática [262].

Otra causa del aumento del volumen vacuolar podría ser una mayor presencia de gotas lipídicas en la célula en presencia de etanol (*lipid droplets*, LD), que almacenan ácidos grasos en forma de triacilgliceroles (TAG) y esterilesteres, y cuya monocapa de fosfolípidos formada mayoritariamente por PC y PI proviene del RE, permaneciendo asociados a él para el intercambio de lípidos y proteínas entre los dos orgánulos [378, 379]. En el año 2014 se observó en *Saccharomyces cerevisiae* que los LD pueden ser movilizados a las vacuolas en un proceso similar a la microautofagia, generando una ruta adicional en el mantenimiento de la homeostasis de los ácidos grasos y lípidos, utilizando este reservorio en la síntesis de membranas [380]. Nuestras observaciones por TEM y microscopia de fluorescencia abalan la presencia de LD en la vacuola en presencia de etanol en el medio, otorgándole el color blanquecino característico de los lípidos bajo microscopía electrónica, así como un mayor número de LD en el citosol comparado con el crecimiento en un medio SC control (Figura suplementaria S2). La proliferación y el aumento de tamaño de los LD por consumo de etanol es conocida en mamíferos, como la esteatosis en ratones sometidos a la ingesta crónica de etanol [381] y cuya causa se relaciona con el metabolismo lipídico hepático, estrés oxidativo y peroxidación de lípidos, todo ello derivado del efecto del etanol sobre las células. Aunque por ahora no sabemos

con exactitud las causas de la disminución del RE y el aumento del volumen vacuolar en presencia de etanol, la observación de reticulofagia y lipofagia en el presente trabajo es un buen comienzo en el estudio de este fenómeno totalmente desconocido.

Tras descartar la acumulación de proteínas desplegadas como causa inicial de la activación de la UPR en la levadura en presencia de etanol, el siguiente paso era comprobar el papel del inositol bajo estrés por etanol, ya que se sabe que la falta de inositol provoca el disparo de la UPR por aberraciones lipídicas de la membrana [137]. Varios datos confirman que el etanol no produce una disminución de inositol en la célula y que por lo tanto no es la causante del disparo de la UPR. En primer lugar, nuestros datos mostraron una activación de la UPR en presencia de etanol menor que en la muestra control, ambas en ausencia de inositol en el medio. Si el etanol provocara una salida de inositol en la célula a través de una membrana plasmática comprometida observaríamos una activación de la UPR similar o incluso mayor al control por una pérdida de inositol más rápida y nuestros datos no muestran eso, sino que la combinación etanol y ausencia de inositol disminuye la activación de la UPR, por lo que el etanol debe afectar a la biodisponibilidad del inositol en la célula. Es posible, utilizando los resultados obtenidos anteriormente por TEM, que el etanol promueva una movilización rápida de lípidos, entre ellos el PI, desde el RE a la vacuola y que de allí se transporten a la membrana plasmática para hacer frente a la desestabilización por etanol, este mecanismo de defensa inicial generaría un disparo de la ruta más leve que en células sin etanol en el medio, que no presentan reticulofagia y que por lo tanto no tienen otra forma de conseguir el PI que mediante la transcripción de genes específicos activando la UPR.

Además también vimos como la expresión del transportador de inositol de alta afinidad ITR1 no aumentaba en presencia de etanol en medio SC, de hecho parece incluso disminuir con el tiempo de exposición al etanol, corroborando que el etanol no genera una disminución de inositol en la célula.

Tras comprobar que un exceso de inositol en el medio (400 μM) en presencia y ausencia de etanol provocaba un disparo de la UPR mayor que a concentraciones más bajas de inositol, comenzamos a sospechar que podría existir una relación entre variaciones en las propiedades físicas de la membrana del RE y el disparo de la UPR ya que concentraciones de inositol en el medio por encima de 100 μM inhibe la expresión de genes relacionados con la síntesis de

ergosterol como *ERG3*, *ERG5*, *ERG20*, síntesis de ácidos grasos como *FAS1* y *FAS2* y la desaturasa *OLE1* [382], variando las propiedades físicas de la membrana del RE y disparando la UPR.

Los resultados de activación de la UPR obtenidos por la utilización de agentes que provocan, al igual que el etanol, un desorden en el empaquetamiento de los lípidos de membrana, como el tergitol, el DMSO y el alcohol bencílico, ponen de manifiesto como el etanol al disminuir la fuerza de interacción fosfolípido/fosfolípido y fosfolípido/proteína al intercalarse en la estructura de la membrana, y crear espacios laterales entre las cabezas polares de los fosfolípidos y huecos en el núcleo hidrófobo de la membrana, puede modificar las propiedades biofísicas de las membranas e influenciar en el comportamiento de los péptidos transmembrana embebidos en ella. Una menor fuerza relativa en estos dos tipos de interacción podrán influir en el estado oligomérico de los péptidos transmembrana, por lo que la proteína sensora Ire1p podría oligomerizar con otras proteínas vecinas y activarse, sin necesidad de la presencia de proteínas desplegadas, únicamente por cambios en la fluidez de la membrana y a través del dominio de inserción transmembrana en la bicapa del RE. Este efecto se ha visto en la proteína apoptótica de mamíferos Bax, cuya oligomerización en la membrana mitocondrial aumenta en presencia del alcohol bencílico, un fluidificante de membranas, mientras que un aumento de colesterol la inhibe [383].

Del mismo modo, la variación en la relación 18:1/16:1 en membrana generó los resultados esperados, ya que una mayor proporción de 16:1 provoca una mayor fluidez de la membrana debida y una menor fuerza de interacción entre las propias cadenas acílicas (por ser más cortas) y con los péptidos transmembrana respecto al 18:1 [352], esta variación en la longitud de las cadenas acílicas ya se ha descrito en *S. cerevisiae* en respuesta a cambios en la temperatura de crecimiento [384]. En nuestro caso vimos cómo, efectivamente, una mayor proporción de 16:1 respecto a 18:1 provocaba la activación de la UPR debido a un aumento en la fluidez de la membrana, mientras que en el caso contrario la activación de la UPR era nula por el efecto rigidificante al aumentar la longitud de las cadenas acílicas y por consiguiente, las interacciones entre fosfolípidos y fosfolípido/proteína. Nuestra teoría se refuerza además con la activación de la UPR obtenida con el mutante BY4741 Δ *ERG2*, su membrana plasmática, más fluida que la del parental BY4741 ha sido estudiada previamente por acumular esteroides en la membrana con estructura distinta al ergosterol, siendo más

sensible a la cicloheximida por su difusión pasiva a través de la membrana [385], de hecho, mutantes auxótrofos para la síntesis de esteroides pierden totalmente la rigidez de la membrana [386]. Estos mutantes presentan una proporción esteroles libre/fosfolípido más bajo que la cepa silvestre, así como un ratio PC/PE mucho mayor [307], que también aumentará la fluidez de la membrana.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar las estrategias celulares que provocan una mayor tolerancia al etanol en *S. cerevisiae* con el fin de aplicar estos conocimientos en la industria fermentativa, poniendo de manifiesto el carácter multifactorial de la tolerancia a etanol y su complejidad fenotípica [118, 159, 176, 296]. A pesar de estos estudios, ha sido en los últimos años cuando la activación respuesta UPR se ha relacionado con un posible aumento de la tolerancia al etanol [287], nuestros datos confirman el disparo de la UPR en presencia de etanol en *S. cerevisiae*, la especie más tolerante a etanol dentro del género *Saccharomyces* [319, 354]. Aunque nuestros resultados muestran que en general una mayor tolerancia a etanol correlaciona con un mayor disparo de la UPR, las cepas fermentativas (especialmente las vónicas) parecen no seguir esta premisa, por lo que parece que la UPR no lo utilizan como único mecanismo adaptativo a este estrés. Así, a pesar de que las cepas de *S. cerevisiae* naturales y fermentativas no presenten diferencias en la cantidad máxima de etanol que pueden soportar (MIC) [319] sí que parece que utilizan distintas respuestas a la hora de hacer frente a la presencia de etanol en el medio. Una de las posibles explicaciones puede ser que la adaptación a ambientes fermentativos por acción del hombre haya provocado la domesticación de algunas propiedades fenotípicas como la composición de la membrana, con el fin de que la célula ya esté preparada para contrarrestar la acción fluidificante del etanol, al igual que se ha visto con la resistencia a sulfito [387]. Este hecho se demuestra en varios trabajos en los que se ve una mayor proporción de UFA/SFA y 18:1 en las levaduras vónicas T73 y QA23 con respecto a la cepa BY4743, cepa derivada principalmente de la cepa natural EM93, aislada de un higo en descomposición procedente de California [48, 319, 357], generando como hemos visto en el capítulo 2 una mayor interacción fosfolípido/Ire1p dificultando su oligomerización y disminuyendo la tasa de activación de la UPR. Aunque son necesarios estudios más exhaustivos de la composición la membrana entre las distintas cepas (naturales/fermentativas) para contrastarlo.

Por otra parte, variaciones en la secuencia de aminoácidos del factor de transcripción Hac1p podrían explicar la disminución en la activación UPR en

aquellas cepas menos resistentes al etanol, pertenecientes a las especies *S. uvarum*, *S. paradoxus* y *S. kudriavzevii*. Aunque estas cepas presentan el mismo dominio de unión de Hac1p que *S. cerevisiae*, puede ser que una estructura distinta a la de *S. cerevisiae* provoque una pérdida de intensidad de activación, resultando en una respuesta UPR, y por tanto, una tolerancia a etanol menor. De hecho, Arroyo-López y col. (2010) observaron como la máxima concentración de etanol que podían soportar las levaduras (MIC) era mayor en *S. cerevisiae*, seguida de *S. paradoxus*, *S. uvarum* y por último *S. kudriadzevii* [319], si nos fijamos en los cambios aminoácidos de Hac1p y utilizamos sus datos de tolerancia a etanol podemos observar que cuanto más se parece la estructura de Hac1p a la de *S. cerevisiae* mayor tolerancia a etanol presenta, por lo que sería interesante averiguar si la utilización de Hac1p de *S. cerevisiae* puede provocar un aumento en la tolerancia a etanol en otras especies del genero menos tolerantes. En el caso de las *S.cerevisiae* fermentativas y naturales no se obtuvieron diferencias en la estructura de Hac1p, esto concuerda con que presenten una tolerancia a etanol similar, por lo que la hipótesis de que sus diferencias en activación de la UPR se deban a cambios en la estructura de la membrana cobra más sentido.

Los resultados obtenidos en la presente tesis revelan como la respuesta al estrés por etanol en las levaduras responde más a una serie de eventos metabólicos dinámicos que a una respuesta transitoria al agente estresante, y subraya la importancia de las propiedades biofísicas de las membranas como primera barrera en la defensa de la célula frente al etanol. Este hallazgo es realmente interesante ya que, a diferencia de lo que se pensaba, la fluidez de la membrana juega un papel muy importante en el disparo de la UPR en presencia de etanol, dejando a un lado la teoría imperante de que es el propio efecto desnaturalizante del etanol es el que promueve la activación de la ruta. Además nuestros resultados han permitido iniciar nuevos proyectos como por ejemplo el estudio de las diferencias en composición de membrana entre *S. cerevisiae* aisladas de ambientes naturales y fermentativos y profundizar en los mecanismos de resistencia a etanol en cepas vínicas.

CONCLUSIONES

1. Existe una gran diferencia en el transcriptoma tanto a una hora como en fase tardía del estrés por etanol en ambas cepas. Siendo la cepa CECT 10094, la cepa más resistente a etanol, la que presentaba mayores categorías funcionales (GO) y genes sobreexpresados relacionados con tolerancia a estrés por etanol.

2. La cepa CECT 10094 mostró también una mayor respuesta transcripcional en genes relacionados con respuesta a estrés oxidativo y a proteínas desplegadas (UPR), no observadas en la cepa menos tolerante. Este hecho, junto con el análisis de las regiones promotoras de los genes sobreexpresados en ambas cepas, pone de manifiesto que la cepa CECT 10094 es capaz de defenderse del efecto pleiotrópico del etanol más eficientemente que la cepa Temohaya-26 en los primeros momentos de estrés mediante la activación de respuestas específicas a estrés.

3. Se ha demostrado la correlación entre una alta tolerancia a ambientes ácidos con tolerancia a etanol en distintas cepas de *S. cerevisiae*, esta característica podría ser una buena herramienta adicional en la selección de cepas resistentes a etanol.

4. La UPR representa una ruta de supervivencia general del retículo endoplasmático capaz no solamente de evaluar la homeostasis de las proteínas y deficiencia de inositol, sino también la integridad de la membrana. Nuestros resultados muestran como el efecto desestabilizante del etanol en la membrana del retículo endoplasmático activa la UPR al disminuir la interacción entre los fosfolípidos y entre fosfolípidos/dominios transmembrana de Ire1p, facilitando el movimiento, y por tanto la oligomerización de Ire1p en la membrana del RE. Este hecho descarta que el efecto desnaturizante del etanol es el causante directo de la activación de la UPR en levaduras, como hasta ahora se pensaba.

5. En general, existe correlación entre una mayor tolerancia a etanol y mayor activación de la UPR dentro del género *Saccharomyces*, aunque existen claras diferencias en la activación entre *S. cerevisiae* vínicas y naturales, a pesar de que pueden llegar una cantidad de etanol similar. Este hecho podría explicarse por una composición de membrana en las cepas vínicas distinta, rica en ácidos grasos insaturados y adaptada por tanto a la presencia constante de etanol en el medio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F: Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular ecology* 2007, 16(10):2091-2102.
2. Cavalieri D, McGovern PE, Hartl DL, Mortimer R, Polsinelli M: Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of molecular evolution* 2003, 57 Suppl 1:S226-232.
3. Ulber R, and K. Soye: From wine to penicillin - 5000 years of biotechnology. *Chemie Unser* 2004, 38:172-180.
4. Katz SH, and M.M Voigt: Beer and beer. *Expedition* 1989, 28(2):23-24.
5. McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nuñez A, Butrym ED, Richards MP, Wang C-s *et al*: Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(51):17593-17598.
6. Underhill AP: Craft production and social change in northern China. *Kluwer, New York* 2002.
7. Barnett JA: A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast (Chichester, England)* 2000, 16(8):755-771.
8. Pasteur L: Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Compt Rend* 1857, 45:1032-1036.
9. Dequin S: The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Applied microbiology and biotechnology* 2001, 56(5-6):577-588.
10. Bennet JW, and H.J. Phaff: Early biotechnology: the Delf connection. *ASM news* 1995, 59:401-404.
11. Lachance MA: The Phaff school of yeast ecology. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2003, 6(3):163-167.
12. Boulton R, Singleton V, Bisson L, Kunkee R: Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation. In: *Principles and Practices of Winemaking*. Springer US; 1999: 102-192.
13. Castrillo JI, Oliver SG: Yeast as a touchstone in post-genomic research: strategies for integrative analysis in functional genomics. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2004, 37(1):93-106.
14. Oliver SG: Functional genomics: lessons from yeast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2002, 357(1417):17-23.
15. Smith MG, Snyder M: Yeast as a model for human disease. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L Haines [et al]* 2006, Chapter 15:Unit 15.16.
16. Dolinski K, Botstein D: Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. *Genome research* 2005, 15(12):1611-1619.

17. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M *et al*: Life with 6000 genes. *Science* 1996, 274(5287):546, 563-547.
18. Fisk DG, Ball CA, Dolinski K, Engel SR, Hong EL, Issel-Tarver L, Schwartz K, Sethuraman A, Botstein D, Cherry JM: *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast (Chichester, England)* 2006, 23(12):857-865.
19. Bharadwaj P, Martins R, Macreadie I: Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS yeast research* 2010, 10(8):961-969.
20. Franssens V, Bynens T, Van den Brande J, Vandermeeren K, Verduyck M, Winderickx J: The benefits of humanized yeast models to study Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013, 2013:760629.
21. Pereira C, Bessa C, Soares J, Leao M, Saraiva L: Contribution of yeast models to neurodegeneration research. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 2012:941232.
22. Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R: *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE* 2011, 6(2):e16015.
23. Kurtzman CP: Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizomyces*. *FEMS yeast research* 2003, 4(3):233-245.
24. Naumov G: Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology* 1996, 17(3-4):295-302.
25. Vaughan-Martini A, Martini A: Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology* 1995, 14(6):514-522.
26. AA. B: Entwicklungsgeschichte und Kultur des neuen Hefepilzes *Saccharomyces paradoxus*. *J Microbiol Epidemiol Immunobiol* 1914, 1:231-247.
27. Naumov GI, James SA, Naumova ES, Louis EJ, Roberts IN: Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2000, 50 Pt 5:1931-1942.
28. Wang SA, Bai FY: *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2008, 58(Pt 2):510-514.
29. Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio JP: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, 108(35):14539-14544.

30. Boynton PJ, Greig D: The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast (Chichester, England)* 2014, 31(12):449-462.
31. Bidden C, Blondin B, Dequin S, Vezinhet F: Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 1992, 22(1):1-7.
32. Puig S, Querol A, Barrio E, Perez-Ortin JE: Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and environmental microbiology* 2000, 66(5):2057-2061.
33. Querol A, Fernandez-Espinar MT, del Olmo M, Barrio E: Adaptive evolution of wine yeast. *International journal of food microbiology* 2003, 86(1-2):3-10.
34. Dunham MJ, Badrane H, Ferea T, Adams J, Brown PO, Rosenzweig F, Botstein D: Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99(25):16144-16149.
35. Perez-Ortin JE, Querol A, Puig S, Barrio E: Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome research* 2002, 12(10):1533-1539.
36. Bakalinsky AT, Snow R: The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 1990, 6(5):367-382.
37. Codón AC, Gasent-Ramírez JM, Benítez T: Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Applied and environmental microbiology* 1995, 61(2):630-638.
38. Mortimer RK, Romano P, Suzzi G, Polsinelli M: Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast (Chichester, England)* 1994, 10(12):1543-1552.
39. Gerke J, Lorenz K, Cohen B: Genetic interactions between transcription factors cause natural variation in yeast. *Science* 2009, 323(5913):498-501.
40. Borneman AR, Forgan AH, Pretorius IS, Chambers PJ: Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS yeast research* 2008, 8(7):1185-1195.
41. Fay JC, Benavides JA: Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics* 2005, 1(1):66-71.
42. Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, Davey RP, Roberts IN, Burt A, Koufopanou V *et al*: Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 2009, 458(7236):337-341.
43. Schacherer J, Shapiro JA, Ruderfer DM, Kruglyak L: Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2009, 458(7236):342-345.

44. Salmon J: Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *JFerment Bioeng* 1997, 83:253-260.
45. Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, Cambon B, Legras J-L, Wincker P, Casaregola S *et al*: Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, 106(38):16333-16338.
46. Mortimer R, Polsinelli M: On the origins of wine yeast. *Research in microbiology* 1999, 150(3):199-204.
47. Ferea TL, Botstein D, Brown PO, Rosenzweig RF: Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(17):9721-9726.
48. Mortimer RK, Johnston JR: GENEALOGY OF PRINCIPAL STRAINS OF THE YEAST GENETIC STOCK CENTER. *Genetics* 1986, 113(1):35-43.
49. Statista [<http://www.statista.com/>]
50. The contribution made by beer to the European economy [[http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/EY_-_The_Contribution_made_by_Beer_to_the_European_Economy/\\$FILE/EY-The-Contribution-made-by-Beer-to-the-European-Economy.pdf](http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/EY_-_The_Contribution_made_by_Beer_to_the_European_Economy/$FILE/EY-The-Contribution-made-by-Beer-to-the-European-Economy.pdf)]
51. State of the vitiviculture world market: Balance is restored to the wine sector [http://www.oiv.int/oiv/info/en_le_secteur_du_vin_retrouve_son_equilibre?lang=en]
52. Yeasts, Yeast Extracts, Autolysates and Related Products: The Global Market [<http://www.reportlinker.com/p0236237-summary/Yeasts-Yeast-Extracts-Autolysates-and-Related-Products-The-Global-Market.html>]
53. IEA Predicts Global Ethanol Production Increase. In: *Ethanol producer magazine*. 2013.
54. Den Haan R, Kroukamp H, Mert M, Bloom M, Görgens JF, van Zyl WH: Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for next generation ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2013, 88(6):983-991.
55. Boulton RB, Singleton, V.L., Bisson, L.F., and Kunkee, R.E.: Principles and practice of winemaking.; 1996.
56. J. R-G: Trattato di enologia; 1975.
57. Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP: Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 1996, 12(16):1607-1633.
58. Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C: How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in genetics : TIG* 2006, 22(4):183-186.
59. Kubota S, Takeo I, Kume K, Kanai M, Shitamukai A, Mizunuma M, Miyakawa T, Shimoi H, Iefuji H, Hirata D: Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence

- of ethanol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004, 68(4):968-972.
60. Aguilera F, Peinado RA, Millan C, Ortega JM, Mauricio JC: Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *International journal of food microbiology* 2006, 110(1):34-42.
61. Ansanay-Galeote V, Blondin B, Dequin S, Sablayrolles J-M: Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters* 2001, 23(9):677-681.
62. Fleet GH: Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology* 2003, 86(1-2):11-22.
63. Pizarro F, Varela C, Martabit C, Bruno C, Perez-Correa JR, Agosin E: Coupling kinetic expressions and metabolic networks for predicting wine fermentations. *Biotechnology and bioengineering* 2007, 98(5):986-998.
64. Alexandre H, Charpentier C: Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J Ind Microbiol Biotech* 1998, 20(1):20-27.
65. Bisson LF: Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 1999, 50(1):107-119.
66. Santos J, Sousa MJ, Cardoso H, Inacio J, Silva S, Spencer-Martins I, Leao C: Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. *Microbiology (Reading, England)* 2008, 154(Pt 2):422-430.
67. Ivorra C, Perez-Ortin JE, del Olmo M: An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and bioengineering* 1999, 64(6):698-708.
68. Hohmann S, and Mager, W.H.: Yeast stress responses.: Springer, Heidelberg.; 2003.
69. Ruis H, Schuller C: Stress signaling in yeast. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1995, 17(11):959-965.
70. Steels EL, Learmonth RP, Watson K: Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology (Reading, England)* 1994, 140 (Pt 3):569-576.
71. Kobayashi N, McEntee K: Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 1993, 13(1):248-256.
72. Marchler G, Schuller C, Adam G, Ruis H: A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *The EMBO journal* 1993, 12(5):1997-2003.
73. Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M: Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 1998, 180(5):1044-1052.

74. Moskvina E, Schuller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H: A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast (Chichester, England)* 1998, 14(11):1041-1050.
75. Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Van Dijk P, Thevelein JM: Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Molecular & general genetics : MGG* 1996, 252(4):470-482.
76. Estruch F: Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* 2000, 24(4):469-486.
77. Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F: The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal* 1996, 15(9):2227-2235.
78. Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA: Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 2001, 12(2):323-337.
79. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO: Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell* 2000, 11(12):4241-4257.
80. Amoros M, Estruch F: Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Molecular microbiology* 2001, 39(6):1523-1532.
81. Gasch AP: Yeast genomic expression studies using DNA microarrays. *Methods in enzymology* 2002, 350:393-414.
82. Garreau H, Hasan RN, Renault G, Estruch F, Boy-Marcotte E, Jacquet M: Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)* 2000, 146 (Pt 9):2113-2120.
83. Costa V, Moradas-Ferreira P: Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine* 2001, 22(4-5):217-246.
84. Gorner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schuller C: Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & development* 1998, 12(4):586-597.
85. Ma M, Liu ZL: Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 87(3):829-845.

86. Parsell DA, Taulien J, Lindquist S: The role of heat-shock proteins in thermotolerance. In: *Molecular Chaperones*. Edited by Ellis RJ, Laskey RA, Lorimer GH: Springer Netherlands; 1993: 23-30.
87. Becker J, Craig EA: Heat-shock proteins as molecular chaperones. *European Journal of Biochemistry* 1994, 219(1-2):11-23.
88. Glover JR, Lindquist S: Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 1998, 94(1):73-82.
89. Glover JR, Tkach JM: Crowbars and ratchets: hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 2001, 79(5):557-568.
90. Mir SS, Fiedler D, Cashikar AG: Ssd1 is required for thermotolerance and Hsp104-mediated protein disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 2009, 29(1):187-200.
91. Morano KA, Liu PC, Thiele DJ: Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in microbiology* 1998, 1(2):197-203.
92. Boy-Marcotte E, Lagniel G, Perrot M, Bussereau F, Boudsocq A, Jacquet M, Labarre J: The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Molecular microbiology* 1999, 33(2):274-283.
93. Hahn JS, Neef DW, Thiele DJ: A stress regulatory network for coordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Molecular microbiology* 2006, 60(1):240-251.
94. Castells-Roca L, Garcia-Martinez J, Moreno J, Herrero E, Belli G, Perez-Ortin JE: Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *PLoS One* 2011, 6(2):e17272.
95. Hohmann S, Krantz M, Nordlander B: Chapter Two - Yeast Osmoregulation. In: *Methods in enzymology*. Edited by Dieter H, Helmut S, vol. Volume 428: Academic Press; 2007: 29-45.
96. Hohmann S: Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2002, 66(2):300-372.
97. Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H: Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 1996, 86(6):865-875.
98. Folch-Mallol J G-AA, Lledías F, Covarrubias-Robles A.: La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoam Microbiol* 2004, 46:24-46.
99. Singer MA, Lindquist S: Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular cell* 1998, 1(5):639-648.
100. Francois J, Parrou JL: Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 2001, 25(1):125-145.

101. Mager WH, Siderius M: Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS yeast research* 2002, 2(3):251-257.
102. Jamieson DJ: Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 1998, 14(16):1511-1527.
103. Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E: Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et biophysica acta* 2008, 1780(11):1217-1235.
104. Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler J-M, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J: The H₂O₂ Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273(35):22480-22489.
105. Moye-Rowley WS: Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxidants & redox signaling* 2002, 4(1):123-140.
106. Toledano M, Delaunay A, Biteau B, Spector D, Azevedo D: Oxidative stress responses in yeast. In: *Yeast Stress Responses*. Edited by Hohmann S, Mager W, vol. 1: Springer Berlin Heidelberg; 2003: 241-303.
107. Kho CW, Lee PY, Bae KH, Kang S, Cho S, Lee do H, Sun CH, Yi GS, Park BC, Park SG: Gpx3-dependent responses against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of microbiology and biotechnology* 2008, 18(2):270-282.
108. Gulshan K, Rovinsky SA, Coleman ST, Moye-Rowley WS: Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(49):40524-40533.
109. Kuge S, Jones N, Nomoto A: Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *The EMBO journal* 1997, 16(7):1710-1720.
110. Kuge S, Toda T, Iizuka N, Nomoto A: Crm1 (Xpol) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1998, 3(8):521-532.
111. Temple MD, Perrone GG, Dawes IW: Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in cell biology* 2005, 15(6):319-326.
112. Delaunay A, Isnard AD, Toledano MB: H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO journal* 2000, 19(19):5157-5166.
113. He XJ, Fassler JS: Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 2005, 58(5):1454-1467.
114. Garay-Arroyo A, Covarrubias AA, Clark I, Nino I, Gosset G, Martinez A: Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied microbiology and biotechnology* 2004, 63(6):734-741.
115. Teixeira MC, Mira NP, Sa-Correia I: A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current opinion in biotechnology* 2011, 22(2):150-156.
116. Costa V, Reis E, Quintanilha A, Moradasferreira P: Acquisition of Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The Key Role of the

- Mitochondrial Superoxide Dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993, 300(2):608-614.
117. Costa V, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P: Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology (Reading, England)* 1997, 143 (Pt 5):1649-1656.
118. Ogawa Y, Nitta A, Uchiyama H, Imamura T, Shimoi H, Ito K: Tolerance mechanism of the ethanol-tolerant mutant of sake yeast. *Journal of bioscience and bioengineering* 2000, 90(3):313-320.
119. Du X, Takagi H: N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Applied microbiology and biotechnology* 2007, 75(6):1343-1351.
120. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P: Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 2000, 101(3):249-258.
121. Bernales S, McDonald KL, Walter P: Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLoS biology* 2006, 4(12):e423.
122. Nikawa J, Yamashita S: IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 1992, 6(11):1441-1446.
123. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J: A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 1993, 74(4):743-756.
124. Cox JS, Shamu CE, Walter P: Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 1993, 73(6):1197-1206.
125. Hendershot LM: The ER function BiP is a master regulator of ER function. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 2004, 71(5):289-297.
126. Kohno K, Normington K, Sambrook J, Gething MJ, Mori K: The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* 1993, 13(2):877-890.
127. Schuldiner M, Collins SR, Thompson NJ, Denic V, Bhamidipati A, Punna T, Ihmels J, Andrews B, Boone C, Greenblatt JF *et al*: Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 2005, 123(3):507-519.
128. Gardner BM, Walter P: Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* 2011, 333(6051):1891-1894.
129. Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Ito T, Hirata A, Suzuki T, Oikawa D, Takeuchi M, Kohno K: Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1

- involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *The Journal of cell biology* 2007, 179(1):75-86.
130. Cox JS, Chapman RE, Walter P: The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Molecular biology of the cell* 1997, 8(9):1805-1814.
 131. Mori K, Sant A, Kohno K, Normington K, Gething MJ, Sambrook JF: A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *The EMBO journal* 1992, 11(7):2583-2593.
 132. Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H, Yura T: Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 1998, 273(16):9912-9920.
 133. Patil CK, Li H, Walter P: Gcn4p and Novel Upstream Activating Sequences Regulate Targets of the Unfolded Protein Response. *PLoS biology* 2004, 2(8):e246.
 134. Yang R, Wek SA, Wek RC: Glucose Limitation Induces GCN4 Translation by Activation of Gcn2 Protein Kinase. *Molecular and cellular biology* 2000, 20(8):2706-2717.
 135. Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ: Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Molecular and cellular biology* 2001, 21(13):4347-4368.
 136. Leber JH, Bernales S, Walter P: IRE1-independent gain control of the unfolded protein response. *PLoS biology* 2004, 2(8):E235.
 137. Promlek T, Ishiwata-Kimata Y, Shido M, Sakuramoto M, Kohno K, Kimata Y: Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Molecular biology of the cell* 2011, 22(18):3520-3532.
 138. Lajoie P, Moir RD, Willis IM, Snapp EL: Kar2p availability defines distinct forms of endoplasmic reticulum stress in living cells. *Molecular biology of the cell* 2012, 23(5):955-964.
 139. Greenberg ML, Lopes JM: Genetic regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews* 1996, 60(1):1-20.
 140. Carman GM, Han GS: Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of biochemistry* 2011, 80:859-883.
 141. Brickner JH, Walter P: Gene recruitment of the activated INO1 locus to the nuclear membrane. *PLoS biology* 2004, 2(11):e342.
 142. Cox JS, Walter P: A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 1996, 87(3):391-404.

143. Jesch SA, Liu P, Zhao X, Wells MT, Henry SA: Multiple endoplasmic reticulum-to-nucleus signaling pathways coordinate phospholipid metabolism with gene expression by distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 2006, 281(33):24070-24083.
144. Chang HJ, Jones EW, Henry SA: Role of the unfolded protein response pathway in regulation of INO1 and in the sec14 bypass mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2002, 162(1):29-43.
145. Jesch SA, Zhao X, Wells MT, Henry SA: Genome-wide analysis reveals inositol, not choline, as the major effector of Ino2p-Ino4p and unfolded protein response target gene expression in yeast. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(10):9106-9118.
146. Snapp E: Unfolded Protein Responses With or Without Unfolded Proteins? *Cells* 2012, 1(4):926-950.
147. van der Sanden MH, Houweling M, van Golde LM, Vaandrager AB: Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *The Biochemical journal* 2003, 369(Pt 3):643-650.
148. Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B: Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 2001, 498(1):98-103.
149. Du X, Takagi H: N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Applied microbiology and biotechnology* 2007, 75(6):1343-1351.
150. Ma M, Han P, Zhang R, Li H: Ultrastructural changes of *Saccharomyces cerevisiae* in response to ethanol stress. *Canadian journal of microbiology* 2013, 59(9):589-597.
151. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2005, 15(4):316-328.
152. Hu XH, Wang MH, Tan T, Li JR, Yang H, Leach L, Zhang RM, Luo ZW: Genetic Dissection of Ethanol Tolerance in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2007, 175(3):1479-1487.
153. Meaden PG, Arneborg N, Guldfieldt LU, Siegmundfeldt H, Jakobsen M: Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. *Yeast (Chichester, England)* 1999, 15(12):1211-1222.
154. Rosa MF, Sa-Correia I: In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 1991, 57(3):830-835.
155. Rosa MF, Sa-Correia I: Intracellular acidification does not account for inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence of ethanol. *FEMS Microbiol Lett* 1996, 135(2-3):271-274.

156. Leão C, van Uden N: Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering* 1984, 26(4):403-405.
157. Stanley GA, Hobley TJ, Pamment NB: Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnology and bioengineering* 1997, 53(1):71-78.
158. Birch RM, Walker GM: Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 2000, 26(9-10):678-687.
159. Chandler M, Stanley GA, Rogers P, Chambers P: A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol* 2004, 54(4):427-454.
160. Yang KM, Lee NR, Woo JM, Choi W, Zimmermann M, Blank LM, Park JB: Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2012, 12(6):675-684.
161. Landolfo S, Politi H, Angelozzi D, Mannazzu I: ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochimica et biophysica acta* 2008, 1780(6):892-898.
162. Meaden PG, Arneborg N, Guldeldt LU, Siegumfeldt H, Jakobsen M: Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. *Yeast (Chichester, England)* 1999, 15(12):1211-1222.
163. Petrov VV, Okorokov LA: Increase of anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. *Yeast (Chichester, England)* 1990, 6(4):311-318.
164. Mishra P, Prasad R: Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* 1989, 30(3):294-298.
165. Cartwright CP, Veazey FJ, Rose AH: Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of general microbiology* 1987, 133(4):857-865.
166. Piper PW: Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 1993, 11(4):339-355.
167. Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Recnacq M, Boucherie H: Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology (Reading, England)* 1994, 140 (Pt 11):3031-3038.

168. Plesset J, Palm C, McLaughlin CS: Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* 1982, 108(3):1340-1345.
169. Curran BP, Khalawan SA: Alcohols lower the threshold temperature for the maximal activation of a heat shock expression vector in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)* 1994, 140 (Pt 9):2225-2228.
170. Lloyd D, Morrell S, Carlsen HN, Degn H, James PE, Rowlands CC: Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 1993, 9(8):825-833.
171. Jones RP, Greenfield PF: Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast (Chichester, England)* 1987, 3(4):223-232.
172. Ingram LO, Buttke TM: Effects of alcohols on micro-organisms. *Advances in microbial physiology* 1984, 25:253-300.
173. Marza E, Camougrand N, Manon S: Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. *FEBS letters* 2002, 521(1-3):47-52.
174. Salgueiro SP, Sá-Correia I, Novais JM: Ethanol-Induced Leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics and Relationship to Yeast Ethanol Tolerance and Alcohol Fermentation Productivity. *Applied and environmental microbiology* 1988, 54(4):903-909.
175. Swan TM, Watson K: Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian journal of microbiology* 1997, 43(1):70-77.
176. Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C: Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters* 1994, 124(1):17-22.
177. Mannazzu I, Angelozzi D, Belviso S, Budroni M, Farris GA, Goffrini P, Lodi T, Marzona M, Bardi L: Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *International journal of food microbiology* 2008, 121(1):84-91.
178. Chiou JS, Krishna PR, Kamaya H, Ueda I: Alcohols dehydrate lipid membranes: an infrared study on hydrogen bonding. *Biochimica et biophysica acta* 1992, 1110(2):225-233.
179. Kranenburg M, Vlaar M, Smit B: Simulating Induced Interdigitation in Membranes. *Biophysical journal* 2004, 87(3):1596-1605.
180. Vanegas JM, Faller R, Longo ML: Influence of ethanol on lipid/sterol membranes: phase diagram construction from AFM imaging. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2010, 26(13):10415-10418.
181. Lee AG: How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2004, 1666(1-2):62-87.

182. Montecucco C, Smith GA, Dabbeni-sala F, Johannsson A, Galante YM, Bisson R: Bilayer thickness and enzymatic activity in the mitochondrial cytochrome-c oxidase and ATPase complex. *FEBS letters* 1982, 144(1):145-148.
183. Yuan C, O'Connell RJ, Feinberg-Zadek PL, Johnston LJ, Treistman SN: Bilayer Thickness Modulates the Conductance of the BK Channel in Model Membranes. *Biophysical journal* 2004, 86(6):3620-3633.
184. Killian JA: Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1998, 1376(3):401-415.
185. Tierney KJ, Block DE, Longo ML: Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol, and ethanol. *Biophysical journal* 2005, 89(4):2481-2493.
186. Vanegas JM, Contreras MF, Faller R, Longo ML: Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. *Biophysical journal* 2012, 102(3):507-516.
187. Goffeau A, Slayman CW: The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 1981, 639(3-4):197-223.
188. Leao C, Van Uden N: Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1984, 774(1):43-48.
189. Li BZ, Cheng JS, Ding MZ, Yuan YJ: Transcriptome analysis of differential responses of diploid and haploid yeast to ethanol stress. *Journal of biotechnology* 2010, 148(4):194-203.
190. Monteiro GA, Supply P, Goffeau A, Sa-Correia I: The in vivo activation of *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H(+)-ATPase by ethanol depends on the expression of the PMA1 gene, but not of the PMA2 gene. *Yeast (Chichester, England)* 1994, 10(11):1439-1446.
191. Zeng J, Smith KE, Chong PL: Effects of alcohol-induced lipid interdigitation on proton permeability in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biophysical journal* 1993, 65(4):1404-1414.
192. Madeira A, Leitao L, Soveral G, Dias P, Prista C, Moura T, Loureiro-Dias MC: Effect of ethanol on fluxes of water and protons across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2010, 10(3):252-258.
193. Mager WH, Ferreira PM: Stress response of yeast. *Biochemical Journal* 1993, 290(Pt 1):1-13.
194. Beaven MJ, Charpentier C, Rose AH: Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Journal of general microbiology* 1982, 128(7):1447-1455.
195. You KM, Rosenfield C-L, Knipple DC: Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Applied and environmental microbiology* 2003, 69(3):1499-1503.

196. Ghareib M, Youssef KA, Khalil AA: Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiol* 1988, 33(6):447-452.
197. Šajbidor J, Grego J: Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiology Letters* 1992, 93(1):13-16.
198. Andreasen AA, Stier TJ: Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *Journal of cellular physiology* 1954, 43(3):271-281.
199. Andreasen AA, Stier TJ: Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *Journal of cellular physiology* 1953, 41(1):23-36.
200. Thomas DS, Hossack JA, Rose AH: Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology* 1978, 117(3):239-245.
201. Chi Z, Arneborg N: Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied microbiology* 1999, 86(6):1047-1052.
202. Weber FJ, de Bont JAM: Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1996, 1286(3):225-245.
203. Yamada T, Shimoi H, Ito K: High expression of unsaturated fatty acid synthesis gene OLE 1 in sake yeasts. *Journal of bioscience and bioengineering* 2005, 99(5):512-516.
204. Shobayashi M, Ukena E, Fujii T, Iefuji H: Genome-wide expression profile of sake brewing yeast under shaking and static conditions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2007, 71(2):323-335.
205. Ma M, Liu LZ: Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC microbiology* 2010, 10:169.
206. Ingram LO: Ethanol tolerance in bacteria. *Critical reviews in biotechnology* 1990, 9(4):305-319.
207. Kinji U: Occurrence of saturated and mono-unsaturated fatty acids with unusually-long-chains (C20-C30) in *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholophilic bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1974, 348(1):86-93.
208. Hossack JA, Rose AH: Fragility of plasma membranes in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *Journal of bacteriology* 1976, 127(1):67-75.
209. Shobayashi M, Mitsueda S, Ago M, Fujii T, Iwashita K, Iefuji H: Effects of culture conditions on ergosterol biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2005, 69(12):2381-2388.

210. Swan TM, Watson K: Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett* 1998, 169(1):191-197.
211. Dickey AN, Yim WS, Faller R: Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure. *The journal of physical chemistry B* 2009, 113(8):2388-2397.
212. Stanley D, Chambers PJ, Stanley GA, Borneman A, Fraser S: Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 88(1):231-239.
213. Li B-Z, Cheng J-S, Qiao B, Yuan Y-J: Genome-wide transcriptional analysis of *Saccharomyces cerevisiae* during industrial bioethanol fermentation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2010, 37(1):43-55.
214. Alexandre H, Rousseaux I, Charpentier C: Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and applied biochemistry* 1994, 20 (Pt 2):173-183.
215. Tran QH, Nguyen, T. T., Le, V. V. M., and Hoang, K. A.: Effect of Tween 80 and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing. *International Food Research Journal* 2010, 17:309-318.
216. Hu CK, Bai FW, An LJ: Protein amino acid composition of plasma membranes affects membrane fluidity and thereby ethanol tolerance in a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology* 2005, 21(5):809-813.
217. Morita Y, Nakamori S, Takagi H: Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering* 2002, 94(5):390-394.
218. Terao Y, Nakamori S, Takagi H: Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 2003, 69(11):6527-6532.
219. Samuel D, Kumar TK, Ganesh G, Jayaraman G, Yang PW, Chang MM, Trivedi VD, Wang SL, Hwang KC, Chang DK *et al*: Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2000, 9(2):344-352.
220. Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y: Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 2005, 71(12):8656-8662.
221. Kaino T, Takagi H: Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Applied microbiology and biotechnology* 2008, 79(2):273-283.

222. Maggio A, Miyazaki S, Veronese P, Fujita T, Ibeas JI, Damsz B, Narasimhan ML, Hasegawa PM, Joly RJ, Bressan RA: Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2002, 31(6):699-712.
223. Fujita K, Matsuyama A, Kobayashi Y, Iwahashi H: The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS yeast research* 2006, 6(5):744-750.
224. Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S: Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis. *Journal of biotechnology* 2007, 131(1):34-44.
225. Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, Nagahisa K, Hirasawa T, Shimizu H: Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2009, 9(1):32-44.
226. Pham TK, Wright PC: The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation. *Journal of proteome research* 2008, 7(11):4766-4774.
227. Martinez-Munoz GA, Kane P: Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *The Journal of biological chemistry* 2008, 283(29):20309-20319.
228. Forgac M: Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, 8(11):917-929.
229. Inoue T, Wang Y, Jefferies K, Qi J, Hinton A, Forgac M: Structure and regulation of the V-ATPases. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2005, 37(6):393-398.
230. Li SC, Kane PM: The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochimica et biophysica acta* 2009, 1793(4):650-663.
231. Teixeira MC, Raposo LR, Mira NP, Lourenco AB, Sa-Correia I: Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Applied and environmental microbiology* 2009, 75(18):5761-5772.
232. van Voorst F, Houghton-Larsen J, Jonson L, Kielland-Brandt MC, Brandt A: Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast (Chichester, England)* 2006, 23(5):351-359.
233. Teixeira MC, Raposo LR, Palma M, Sa-Correia I: Identification of genes required for maximal tolerance to high-glucose concentrations, as those present in industrial alcoholic fermentation media, through a chemogenomics approach. *Omics : a journal of integrative biology* 2010, 14(2):201-210.
234. Marks VD, Ho Sui SJ, Erasmus D, van der Merwe GK, Brumm J, Wasserman WW, Bryan J, van Vuuren HJ: Dynamics of the yeast

- transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS yeast research* 2008, 8(1):35-52.
235. Rossignol T, Dulau L, Julien A, Blondin B: Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast (Chichester, England)* 2003, 20(16):1369-1385.
236. Stanley D, Fraser S, Stanley GA, Chambers PJ: Retrotransposon expression in ethanol-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 87(4):1447-1454.
237. Ma M, Liu L: Quantitative transcription dynamic analysis reveals candidate genes and key regulators for ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC microbiology* 2010, 10(1):169.
238. Dinh TN, Nagahisa K, Yoshikawa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H: Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess and biosystems engineering* 2009, 32(5):681-688.
239. Izawa S, Ikeda K, Miki T, Wakai Y, Inoue Y: Vacuolar morphology of *Saccharomyces cerevisiae* during the process of wine making and Japanese sake brewing. *Applied microbiology and biotechnology* 2010, 88(1):277-282.
240. Hounsa CG, Brandt EV, Thevelein J, Hohmann S, Prior BA: Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology (Reading, England)* 1998, 144 (Pt 3):671-680.
241. Ribeiro MJ, Leao LS, Morais PB, Rosa CA, Panek AD: Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999, 75(3):245-251.
242. Herdeiro RS, Pereira MD, Panek AD, Eleutherio EC: Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta* 2006, 1760(3):340-346.
243. Mansure JJ, Panek AD, Crowe LM, Crowe JH: Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochimica et biophysica acta* 1994, 1191(2):309-316.
244. Yang J, Bae JY, Lee YM, Kwon H, Moon HY, Kang HA, Yee SB, Kim W, Choi W: Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance. *Biotechnology and bioengineering* 2011, 108(8):1776-1787.
245. Parrou JL, Teste MA, Francois J: Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology (Reading, England)* 1997, 143 (Pt 6):1891-1900.
246. Kim J, Alizadeh P, Harding T, Hefner-Gravink A, Klionsky DJ: Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Applied and environmental microbiology* 1996, 62(5):1563-1569.

247. Soto T, Fernandez J, Vicente-Soler J, Cansado J, Gacto M: Accumulation of trehalose by overexpression of *tps1*, coding for trehalose-6-phosphate synthase, causes increased resistance to multiple stresses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied and environmental microbiology* 1999, 65(5):2020-2024.
248. Pataro C, Guerra JB, Gomes FCO, Neves MJ, Pimentel PF, Rosa CA: Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002, 33:202-208.
249. Gomes FC, Pataro C, Guerra JB, Neves MJ, Correa SR, Moreira ES, Rosa CA: Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Canadian journal of microbiology* 2002, 48(5):399-406.
250. Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA: Trehalose promotes the survival of *Saccharomyces cerevisiae* during lethal ethanol stress, but does not influence growth under sublethal ethanol stress, vol. 9; 2009.
251. Piper PW: The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 134(2-3):121-127.
252. Watson K, Cavicchioli R: Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. *Biotechnology letters* 1983, 5(10):683-688.
253. Fujita K, Matsuyama A, Kobayashi Y, Iwahashi H: Comprehensive gene expression analysis of the response to straight-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* using cDNA microarray. *Journal of applied microbiology* 2004, 97(1):57-67.
254. Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G: The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et biophysica acta* 2000, 1463(2):267-278.
255. Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S: Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO journal* 1992, 11(6):2357-2364.
256. Piper PW, Ortiz-Calderon C, Holyoak C, Coote P, Cole M: Hsp30, the integral plasma membrane heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is a stress-inducible regulator of plasma membrane H(+)-ATPase. *Cell stress & chaperones* 1997, 2(1):12-24.
257. Izawa S, Kita T, Ikeda K, Inoue Y: Heat shock and ethanol stress provoke distinctly different responses in 3'-processing and nuclear export of HSP mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal* 2008, 414(1):111-119.
258. Izawa S: Ethanol stress response in the mRNA flux of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2010, 74(1):7-12.

259. Henry SA, Kohlwein SD, Carman GM: Metabolism and Regulation of Glycerolipids in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2012, 190(2):317-349.
260. Chi Z, Kohlwein SD, Paltauf F: Role of phosphatidylinositol (PI) in ethanol production and ethanol tolerance by a high ethanol producing yeast. *J Ind Microbiol Biotech* 1999, 22(1):58-63.
261. Mishra P, Kaur S: Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Applied microbiology and biotechnology* 1991, 34(6):697-702.
262. Furukawa K, Kitano H, Mizoguchi H, Hara S: Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. *Journal of bioscience and bioengineering* 2004, 98(2):107-113.
263. Krause EL, Villa-García MJ, Henry SA, Walker LP: Determining the effects of inositol supplementation and the *opi1* mutation on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial biotechnology (New Rochelle, NY)* 2007, 3(3):260-268.
264. You KM, Rosenfield CL, Knipple DC: Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and environmental microbiology* 2003, 69(3):1499-1503.
265. del Castillo Agudo L: Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied microbiology and biotechnology* 1992, 37(5):647-651.
266. Takagi H: Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology* 2008, 81(2):211-223.
267. Lucero P, Penalver E, Moreno E, Lagunas R: Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 2000, 66(10):4456-4461.
268. Teixeira MC, Monteiro P, Jain P, Tenreiro S, Fernandes AR, Mira NP, Alenquer M, Freitas AT, Oliveira AL, Sa-Correia I: The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids research* 2006, 34(Database issue):D446-451.
269. Takemori Y, Sakaguchi A, Matsuda S, Mizukami Y, Sakurai H: Stress-induced transcription of the endoplasmic reticulum oxidoreductin gene *ERO1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular genetics and genomics : MGG* 2006, 275(1):89-96.
270. Watanabe M, Watanabe D, Akao T, Shimoi H: Overexpression of *MSN2* in a sake yeast strain promotes ethanol tolerance and increases ethanol production in sake brewing. *Journal of bioscience and bioengineering* 2009, 107(5):516-518.
271. Wu WS, Li WH: Identifying gene regulatory modules of heat shock response in yeast. *BMC genomics* 2008, 9:439.
272. Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín JE, del Olmo MI, Aranda A: A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *International journal of food microbiology* 2007, 114(1):83-91.

273. Bleoanca I, Silva ARC, Pimentel C, Rodrigues-Pousada C, Menezes RdA: Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *Journal of bioscience and bioengineering* 2013, 116(6):697-705.
274. Yamamoto A, Ueda J, Yamamoto N, Hashikawa N, Sakurai H: Role of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryotic cell* 2007, 6(8):1373-1379.
275. Tamai KT, Liu X, Silar P, Sosinowski T, Thiele DJ: Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Molecular and cellular biology* 1994, 14(12):8155-8165.
276. Hahn JS, Hu Z, Thiele DJ, Iyer VR: Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. *Molecular and cellular biology* 2004, 24(12):5249-5256.
277. Lee S, Carlson T, Christian N, Lea K, Kedzie J, Reilly JP, Bonner JJ: The Yeast Heat Shock Transcription Factor Changes Conformation in Response to Superoxide and Temperature. *Molecular biology of the cell* 2000, 11(5):1753-1764.
278. Takemura R, Inoue Y, Izawa S: Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock. *Journal of cell science* 2004, 117(Pt 18):4189-4197.
279. Betz C, Schlenstedt G, Bailer SM: Asr1p, a novel yeast ring/PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279(27):28174-28181.
280. Izawa S, Ikeda K, Kita T, Inoue Y: Asr1, an alcohol-responsive factor of *Saccharomyces cerevisiae*, is dispensable for alcoholic fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 2006, 72(3):560-565.
281. Daulny A, Geng F, Muratani M, Geisinger JM, Salghetti SE, Tansey WP: Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(50):19649-19654.
282. Auesukaree C, Damnernsawad A, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Boonchird C, Kaneko Y, Harashima S: Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied genetics* 2009, 50(3):301-310.
283. Kumar GR, Goyashiki R, Ramakrishnan V, Karpel JE, Bisson LF: Genes Required for Ethanol Tolerance and Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Enology and Viticulture* 2008, 59(4):401-411.
284. Takahashi T, Shimoi H, Ito K: Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular genetics and genomics : MGG* 2001, 265(6):1112-1119.

285. Walker M, Nguyen T, Liccioli T, Schmid F, Kalatzis N, Sundstrom J, Gardner J, Jiranek V: Genome-wide identification of the Fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics* 2014, 15(1):552.
286. Ramirez-Cordova J, Drnevich J, Madrigal-Pulido JA, Arrizon J, Allen K, Martinez-Velazquez M, Alvarez-Maya I: Transcriptome analysis identifies genes involved in ethanol response of *Saccharomyces cerevisiae* in Agave tequilana juice. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012, 102(2):247-255.
287. Brown NA, de Castro PA, de Castro Pimentel Figueiredo B, Savoldi M, Buckeridge MS, Lopes ML, de Lima Paullilo SC, Borges EP, Amorim HV, Goldman MH *et al*: Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. *FEMS yeast research* 2013, 13(3):277-290.
288. Wu H, Zheng X, Araki Y, Sahara H, Takagi H, Shimoi H: Global gene expression analysis of yeast cells during sake brewing. *Applied and environmental microbiology* 2006, 72(11):7353-7358.
289. Lewis JA, Elkon IM, McGee MA, Higbee AJ, Gasch AP: Exploiting natural variation in *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes for increased ethanol resistance. *Genetics* 2010, 186(4):1197-1205.
290. Swinnen S, Schaerlaekens K, Pais T, Claesen J, Hubmann G, Yang Y, Demeke M, Foulquie-Moreno MR, Goovaerts A, Souvereinys K *et al*: Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome research* 2012, 22(5):975-984.
291. Çakar ZP, Seker UOS, Tamerler C, Sonderegger M, Sauer U: Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2005, 5(6-7):569-578.
292. Jung YJ, Park HD: Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (ATH1) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters* 2005, 27(23-24):1855-1859.
293. Yazawa H, Iwahashi H, Uemura H: Disruption of URA7 and GAL6 improves the ethanol tolerance and fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 2007, 24(7):551-560.
294. Alper H, Moxley J, Nevoigt E, Fink GR, Stephanopoulos G: Engineering Yeast Transcription Machinery for Improved Ethanol Tolerance and Production. *Science* 2006, 314(5805):1565-1568.
295. Baerends RJ, Qiu JL, Rasmussen S, Nielsen HB, Brandt A: Impaired uptake and/or utilization of leucine by *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by the SPT15-300 allele of the TATA-binding protein gene. *Applied and environmental microbiology* 2009, 75(19):6055-6061.
296. Lam FH, Ghaderi A, Fink GR, Stephanopoulos G: Engineering alcohol tolerance in yeast. *Science* 2014, 346(6205):71-75.

297. Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P: Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 1992, 110(1):119-122.
298. Merksamer PI, Trusina A, Papa FR: Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions. *Cell* 2008, 135(5):933-947.
299. Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR: Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast (Chichester, England)* 1998, 14(10):943-951.
300. Gietz RD, Woods RA: Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* 2002, 350:87-96.
301. Robzyk K, Kassir Y: A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic acids research* 1992, 20(14):3790.
302. Sambrook J, Russell D: Transformation of *E. coli* by electroporation. In: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor. Laboratory Press, pp. 1.119–1.122
303. Warringer J, Blomberg A: Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* 2003, 20(1):53-67.
304. Arroyo-Lopez FN, Querol A, Barrio E: Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2009, 36(5):663-669.
305. Lambert RJ, Pearson J: Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of applied microbiology* 2000, 88(5):784-790.
306. Salvado Z, Arroyo-Lopez FN, Guillamon JM, Salazar G, Querol A, Barrio E: Temperature adaptation markedly determines evolution within the genus *Saccharomyces*. *Applied and environmental microbiology* 2011, 77(7):2292-2302.
307. Sharma SC: Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2006, 6(7):1047-1051.
308. Ronn LC, Ralets I, Hartz BP, Bech M, Berezin A, Berezin V, Moller A, Bock E: A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *Journal of neuroscience methods* 2000, 100(1-2):25-32.
309. Sherman F, Fink, G.R. y Hicks, J.B.: *Methods in yeast genetics*: Cold Spring Harbor, NY; 1986.

310. Querol A, Barrio E, Ramón D: A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 1992, 15(3):439-446.
311. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 1979, 7(6):1513-1523.
312. García-Martínez J, Aranda An, Pérez-Ortín JE: Genomic Run-On Evaluates Transcription Rates for All Yeast Genes and Identifies Gene Regulatory Mechanisms. *Molecular cell* 2004, 15(2):303-313.
313. Torres-Quiroz F, García-Marqués S, Coria R, Randez-Gil F, Prieto JA: The Activity of Yeast Hog1 MAPK Is Required during Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Tunicamycin Exposure. *Journal of Biological Chemistry* 2010, 285(26):20088-20096.
314. Causton HC, Quackenbush J, Brazma A: Image processing, normalisation and data transformation. In: *Microarray Gene Expression Data Analysis: a Beginner's Guide*. Malden, MA: Blackwell Publishing; 2003: 51-70.
315. Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T: REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 2011, 6(7):e21800.
316. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL *et al*: The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 2009, 55(4):611-622.
317. van Helden J: Regulatory sequence analysis tools. *Nucleic acids research* 2003, 31(13):3593-3596.
318. Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES: Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 2003, 423(6937):241-254.
319. Arroyo-Lopez FN, Salvado Z, Tronchoni J, Guillamon JM, Barrio E, Querol A: Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast (Chichester, England)* 2010, 27(12):1005-1015.
320. Galdieri L, Mehrotra S, Yu S, Vancura A: Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omics : a journal of integrative biology* 2010, 14(6):629-638.
321. Penacho V, Valero E, Gonzalez R: Transcription profiling of sparkling wine second fermentation. *International journal of food microbiology* 2012, 153(1-2):176-182.
322. Trotter EW, Kao CM, Berenfeld L, Botstein D, Petsko GA, Gray JV: Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277(47):44817-44825.
323. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM: Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online* 2006, 8:175-193.

324. Beckman KB, Lee KY, Golden T, Melov S: Gene expression profiling in mitochondrial disease: assessment of microarray accuracy by high-throughput Q-PCR. *Mitochondrion* 2004, 4(5-6):453-470.
325. Bassani N, Ambrogi F, Biganzoli E: Assessing Agreement between microRNA Microarray Platforms via Linear Measurement Error Models. In: *Computational Intelligence Methods for Bioinformatics and Biostatistics*. Edited by Peterson L, Masulli F, Russo G, vol. 7845: Springer Berlin Heidelberg; 2013: 117-131.
326. Yu H, Lu C, Tan M, Moudgil K: The gene expression profile of preclinical autoimmune arthritis and its modulation by a tolerogenic disease-protective antigenic challenge. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13(5):R143.
327. Volmer R, Ron D: Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. *Current opinion in cell biology* 2015, 33(0):67-73.
328. Ariyama H, Kono N, Matsuda S, Inoue T, Arai H: Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* 2010, 285(29):22027-22035.
329. Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR, Hotamisligil GS: Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 2011, 473(7348):528-531.
330. Miyagawa K, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K, Kimata Y: Ethanol stress impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and activates Ire1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2014, 78(8):1389-1391.
331. Herskovits TT, Gadegbeku B, Jaillet H: On the structural stability and solvent denaturation of proteins. I. Denaturation by the alcohols and glycols. *The Journal of biological chemistry* 1970, 245(10):2588-2598.
332. Nemzer LR, Flanders BN, Schmit JD, Chakrabarti A, Sorensen CM: Ethanol shock and lysozyme aggregation. *Soft Matter* 2013, 9(7):2187-2196.
333. Millar D, Griffiths-Smith K, Algar E, Scopes R: Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. *Biotechnology letters* 1982, 4(9):601-606.
334. Hallsworth JE: Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1998, 85(2):125-137.
335. Mori K, Kawahara T, Yoshida H, Yanagi H, Yura T: Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 1996, 1(9):803-817.
336. Kimata Y, Ishiwata-Kimata Y, Yamada S, Kohno K: Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 2006, 11(1):59-69.

337. Berry DB, Guan Q, Hose J, Haroon S, Gebbia M, Heisler LE, Nislow C, Giaever G, Gasch AP: Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS genetics* 2011, 7(11):e1002353.
338. Francois JM, Formosa C, Schiavone M, Pillet F, Martin-Yken H, Dague E: Use of atomic force microscopy (AFM) to explore cell wall properties and response to stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2013, 59(4):187-196.
339. Walter P, Ron D: The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011, 334(6059):1081-1086.
340. Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, Voss C, Walter P: Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of cell biology* 2009, 187(4):525-536.
341. Schuck S, Gallagher C, Walter P: ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *Journal of cell science* 2014.
342. Prinz WA, Grzyb L, Veenhuis M, Kahana JA, Silver PA, Rapoport TA: Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* 2000, 150(3):461-474.
343. Reggiori F, Klionsky DJ: Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. *Genetics* 2013, 194(2):341-361.
344. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ: Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(40):30299-30304.
345. Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO: Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 2007, 3(3):181-206.
346. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z: Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology* 2011, 12(7):226.
347. Ellgaard L, Helenius A: Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature reviews Molecular cell biology* 2003, 4(3):181-191.
348. Nikawa J, Hosaka K, Yamashita S: Differential regulation of two myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* 1993, 10(5):955-961.
349. Lai K, Bolognese CP, Swift S, McGraw P: Regulation of inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* involves inositol-induced changes in permease stability and endocytic degradation in the vacuole. *The Journal of biological chemistry* 1995, 270(6):2525-2534.
350. Ben-Dov N, Korenstein R: Proton-induced endocytosis is dependent on cell membrane fluidity, lipid-phase order and the membrane resting potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2013, 1828(11):2672-2681.
351. Gurtovenko AA, Anwar J: Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. *The journal of physical chemistry B* 2007, 111(35):10453-10460.

352. Lockshon D, Olsen CP, Brett CL, Chertov A, Merz AJ, Lorenz DA, Van Gilst MR, Kennedy BK: Rho signaling participates in membrane fluidity homeostasis. *PLoS One* 2012, 7(10):e45049.
353. Arora A, Raghuraman H, Chattopadhyay A: Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochemical and biophysical research communications* 2004, 318(4):920-926.
354. Belloch C, Orlic S, Barrio E, Querol A: Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International journal of food microbiology* 2008, 122(1-2):188-195.
355. Querol A, Fernández-Espinar MT, del Olmo MI, amp, x, Barrio E: Adaptive evolution of wine yeast. *International journal of food microbiology* 2003, 86(1-2):3-10.
356. Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, Waterston R, Cohen BA, Johnston M: Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* 2003, 301(5629):71-76.
357. Redón M, Guillamón J, Mas A, Rozès N: Effect of growth temperature on yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature. *Eur Food Res Technol* 2011, 232(3):517-527.
358. Martin CE, Oh C-S, Jiang Y: Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2007, 1771(3):271-285.
359. Vriesekoop F, Barber AR, Pamment NB: Acetaldehyde mediates growth stimulation of ethanol-stressed *Saccharomyces cerevisiae*: evidence of a redox-driven mechanism. *Biotechnology letters* 2007, 29(7):1099-1103.
360. Chen F, Zhou J, Shi Z, Liu L, Du G, Chen J: Effect of acetyl-CoA synthase gene overexpression on physiological function of *Saccharomyces cerevisiae*. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* 2010, 50(9):1172-1179.
361. Miller-Fleming L, Antas P, Pais TF, Smalley JL, Giorgini F, Outeiro TF: Yeast DJ-1 superfamily members are required for diauxic-shift reprogramming and cell survival in stationary phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014, 111(19):7012-7017.
362. Wolak N, Kowalska E, Kozik A, Rapala-Kozik M: Thiamine increases the resistance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative, osmotic and thermal stress, through mechanisms partly independent of thiamine diphosphate-bound enzymes. *FEMS yeast research* 2014, 14(8):1249-1262.
363. Zhao X, Tang J, Wang X, Yang R, Zhang X, Gu Y, Li X, Ma M: YNL134C from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a novel protein with aldehyde reductase activity for detoxification of furfural derived from lignocellulosic biomass. *Yeast (Chichester, England)* 2015, 32(5):409-422.

364. Vriesekoop F, Haass C, Pamment NB: The role of acetaldehyde and glycerol in the adaptation to ethanol stress of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts. *FEMS yeast research* 2009, 9(3):365-371.
365. Trotter EW, Collinson EJ, Dawes IW, Grant CM: Old yellow enzymes protect against acrolein toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 2006, 72(7):4885-4892.
366. Morillon A, Benard L, Springer M, Lesage P: Differential effects of chromatin and Gcn4 on the 50-fold range of expression among individual yeast Ty1 retrotransposons. *Molecular and cellular biology* 2002, 22(7):2078-2088.
367. Eraso P, Gancedo C: Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS letters* 1987, 224(1):187-192.
368. Pandol SJ, Gorelick FS, Gerloff A, Lugea A: Alcohol abuse, endoplasmic reticulum stress and pancreatitis. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 2010, 28(6):776-782.
369. Ji C, Kaplowitz N: Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology* 2003, 124(5):1488-1499.
370. Ogawa N, Mori K: Autoregulation of the HAC1 gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response. *Genes to Cells* 2004, 9(2):95-104.
371. Bicknell AA, Babour A, Federovitch CM, Niwa M: A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. *The Journal of cell biology* 2007, 177(6):1017-1027.
372. Dix TA, Aikens J: Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chemical Research in Toxicology* 1993, 6(1):2-18.
373. Baraibar MA, Ladouce R, Friguet B: Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *Journal of Proteomics* 2013, 92:63-70.
374. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 1991, 11(1):81-128.
375. Mascarenhas C, Edwards-Ingram LC, Zeef L, Shenton D, Ashe MP, Grant CM: Gcn4 is required for the response to peroxide stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 2008, 19(7):2995-3007.
376. Hamasaki M, Noda T, Baba M, Ohsumi Y: Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2005, 6(1):56-65.
377. Pichler H, Gaigg B, Hrstnik C, Achleitner G, Kohlwein SD, Zellnig G, Perktold A, Daum G: A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *European journal of biochemistry / FEBS* 2001, 268(8):2351-2361.

378. Radulovic M, Knittelfelder O, Cristobal-Sarramian A, Kolb D, Wolinski H, Kohlwein S: The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. *Curr Genet* 2013, 59(4):231-242.
379. Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F, Schneider R: Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cell science* 2011, 124(Pt 14):2424-2437.
380. van Zutphen T, Todde V, de Boer R, Kreim M, Hofbauer HF, Wolinski H, Veenhuis M, van der Klei IJ, Kohlwein SD: Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 2014, 25(2):290-301.
381. Orlicky DJ, Roede JR, Bales E, Greenwood C, Greenberg A, Petersen D, McManaman JL: Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplet properties. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2011, 35(6):1020-1033.
382. Wimalarathna R, Tsai CH, Shen CH: Transcriptional control of genes involved in yeast phospholipid biosynthesis. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 2011, 49(2):265-273.
383. Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, Martinou JC: Bax activation and stress-induced apoptosis delayed by the accumulation of cholesterol in mitochondrial membranes. *Cell Death Differ* 2007, 15(3):484-493.
384. Lopez-Malo M, Querol A, Guillamon JM: Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS One* 2013, 8(3):e60135.
385. Abe F, Hiraki T: Mechanistic role of ergosterol in membrane rigidity and cycloheximide resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2009, 1788(3):743-752.
386. Lentz BR, Barenholz Y, Thompson TE: Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 2. Two-component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry* 1976, 15(20):4529-4537.
387. Barrio E, González S, Arias A, Belloch C, Querol A: Molecular Mechanisms Involved in the Adaptive Evolution of Industrial Yeasts. In: *Yeasts in Food and Beverages*. Edited by Querol A, Fleet G: Springer Berlin Heidelberg; 2006: 153-174.

**TABLAS
SUPLEMENTARIAS**

Tabla S1. Tabla comparativa de genes cuya delección genera fenotipo sensible bajo estrés por etanol. Los cuadros marcados en rojo indican que genes son comunes entre los distintos estudios.

ORF	Gen	Kubota <i>et al.</i> 2004	Fujita <i>et al.</i> 2006	Van Voorst <i>et al.</i> 2006	Kumar <i>et al.</i> 2008	Yoshikawa <i>et al.</i> 2008	Auesukaree <i>et al.</i> 2009	Teixeira <i>et al.</i> 2009
YLR027C	AAT2							
YMR072W	ABF2							
YGR037C	ACB1							
YLR144C	ACF2							
YLR304C	ACO1							
YDR448W	ADA2							
YDR176W	ADA3							
YKL206C	ADD66							
YAR015W	ADE1							
YNL220W	ADE12							
YOR128C	ADE2							
YMR300C	ADE4							
YOL086C	ADH1							
YDR226W	ADK1							
YJR105W	ADO1							
YMR064W	AEP1							
YMR282C	AEP2							
YER017C	AFG3							
YGL071W	AFT1							
YBR132C	AGP2							
YHL021C	AIM17							
YBR194W	AIM4							
YMR092C	AIP1							
YDR264C	AKR1							
YMR169C	ALD3							
YPL061W	ALD6							
YNL148C	ALF1							
YPL227C	ALG5							

YOR002W	ALG6							
YOR067C	ALG8							
YEL036C	ANP1							
YKL114C	APN1							
YJL024C	APS3							
YGL105W	ARC1							
YNR035C	ARC35							
YHR013C	ARD1							
YDL192W	ARF1							
YDR173C	ARG82							
YDR127W	ARO1							
YGL148W	ARO2							
YDR035W	ARO3							
YPR060C	ARO7							
YHR129C	ARP1							
YOR141C	ARP8							
YDL100C	ARR4							
YMR116C	ASC1							
YDL088C	ASM4							
YLL042C	ATG10							
YPR049C	ATG11							
YCR068W	ATG15							
YPL100W	ATG21							
YBL099W	ATP1							
YLR393W	ATP10							
YNL315C	ATP11							
YJL180C	ATP12							
YPL271W	ATP15							
YDR377W	ATP17							
YJR121W	ATP2							
YNR020C	ATP23							
YDR298C	ATP5							
YKL016C	ATP7							

YLR114C	<i>AVL9</i>							
YKL146W	<i>AVT3</i>							
YPR122W	<i>AXL1</i>							
YIL124W	<i>AYR1</i>							
YJL095W	<i>BCK1</i>							
YDR375C	<i>BCS1</i>							
YLR399C	<i>BDF1</i>							
YNL039W	<i>BDP1</i>							
YBR200W	<i>BEM1</i>							
YER155C	<i>BEM2</i>							
YPL161C	<i>BEM4</i>							
YOR198C	<i>BFR1</i>							
YCL029C	<i>BIK1</i>							
YER016W	<i>BIM1</i>							
YER177W	<i>BMH1</i>							
YJR025C	<i>BNA1</i>							
YNL271C	<i>BNI1</i>							
YNL233W	<i>BNI4</i>							
YER114C	<i>BOI2</i>							
YNR051C	<i>BRE5</i>							
YPL084W	<i>BRO1</i>							
YGL007W	<i>BRP1</i>							
YGR142W	<i>BTN2</i>							
YPL069C	<i>BTS1</i>							
YGR188C	<i>BUB1</i>							
YEL029C	<i>BUD16</i>							
YJL188C	<i>BUD19</i>							
YER014C-A	<i>BUD25</i>							
YFL023W	<i>BUD27</i>							
YGR262C	<i>BUD32</i>							
YLR319C	<i>BUD6</i>							
YLR226W	<i>BUR2</i>							
YKL005C	<i>BYE1</i>							

YNL278W	CAF120							
YFL028C	CAF16							
YJR122W	CAF17							
YNL288W	CAF40							
YIL034C	CAP2							
YGR036C	CAX4							
YJL209W	CBP1							
YHL038C	CBP2							
YGR174C	CBP4							
YDR197W	CBS2							
YMR038C	CCS1							
YBR131W	CCZ1							
YCR002C	CDC10							
YDR364C	CDC40							
YGL003C	CDH1							
YBR029C	CDS1							
YGL206C	CHC1							
YMR198W	CIK1							
YOR349W	CIN1							
YPL241C	CIN2							
YEL061C	CIN8							
YGL019W	CKB1							
YOR039W	CKB2							
YNL298W	CLA4							
YGR167W	CLC1							
YAL040C	CLN3							
YNL225C	CNM67							
YGL223C	COG1							
YNL051W	COG5							
YBR003W	COQ1							
YOL008W	COQ10							
YNR041C	COQ2							
YDR204W	COQ4							

YML110C	COQ5							
YPL172C	COX10							
YPL132W	COX11							
YLR038C	COX12							
YML129C	COX14							
YJL003W	COX16							
YGR062C	COX18							
YLL018C-A	COX19							
YHR116W	COX23							
YHR051W	COX6							
YDL067C	COX9							
YKL179C	COY1							
YML078W	CPR3							
YNR010W	CSE2							
YBR036C	CSG2							
YNL232W	CSL4							
YIL036W	CST6							
YMR078C	CTF18							
YPR135W	CTF4							
YHR191C	CTF8							
YPL181W	CTI6							
YJL006C	CTK2							
YML112W	CTK3							
YBR291C	CTP1							
YPR124W	CTR1							
YOL145C	CTR9							
YGR088W	CTT1							
YEL027W	CUP5							
YNL245C	CWC25							
YCL007C	CWH36							
YAL039C	CYC3							
YBR112C	CYC8							
YKL087C	CYT2							

YJR152W	DAL5	■						
YGR092W	DBF2				■	■		
YPR111W	DBF20					■		
YKR024C	DBP7	■						■
YNL335W	DDI3					■		
YKL054C	DEF1							■
YAL013W	DEP1	■					■	
YDL160C	DHH1		■					■
YHR011W	DIA4	■				■		
YKR035W-A	DID2					■		
YKL002W	DID4	■				■		■
YDR069C	DOA4	■	■				■	■
YGL240W	DOC1	■			■			■
YNL001W	DOM34					■	■	
YDR121W	DPB4					■		
YAL026C	DRS2	■					■	
YDR182W	DSC1				■			
YGL043W	DST1	■				■		
YPR023C	EAF3					■		
YNL136W	EAF7					■		
YKL204W	EAP1				■			
YBR078W	ECM33					■		
YKL048C	ELM1		■					
YGR200C	ELP2	■	■					
YPL101W	ELP4				■			
YMR312W	ELP6		■					
YDR512C	EMI1	■						
YNL084C	END3	■						■
YMR202W	ERG2	■				■		■
YNL280C	ERG24							■
YER044C	ERG28	■	■				■	
YLR056W	ERG3					■		
YMR015C	ERG5				■	■		

YML008C	<i>ERG6</i>							
YGL054C	<i>ERV14</i>							
YGR284C	<i>ERV29</i>							
YLR233C	<i>EST1</i>							
YBR026C	<i>ETR1</i>							
YDR261C	<i>EXG2</i>							
YFR019W	<i>FAB1</i>							
YCR034W	<i>FEN1</i>							
YCR028C	<i>FEN2</i>							
YBR101C	<i>FES1</i>							
YPR104C	<i>FHL1</i>							
YIL098C	<i>FMC1</i>							
YDR070C	<i>FMP16</i>							
YLR077W	<i>FMP25</i>							
YIL157C	<i>FMP35</i>							
YDR493W	<i>FMP36</i>							
YMR157C	<i>FMP39</i>							
YLR201C	<i>FMP53</i>							
YLL043W	<i>FPS1</i>							
YLR060W	<i>FRS1</i>							
YER145C	<i>FTR1</i>							
YAL022C	<i>FUN26</i>							
YBR021W	<i>FUR4</i>							
YNL133C	<i>FYV6</i>							
YBR179C	<i>FZO1</i>							
YDR283C	<i>GCN2</i>							
YKR026C	<i>GCN3</i>							
YEL009C	<i>GCN4</i>							
YGR252W	<i>GCN5</i>							
YPL075W	<i>GCR1</i>							
YNL199C	<i>GCR2</i>							
YDL226C	<i>GCS1</i>							
YAL044C	<i>GCV3</i>							

YEL042W	GDA1							
YOR375C	GDH1							
YHR100C	GEP4							
YCL036W	GFD2							
YDL198C	GGC1							
YMR135C	GID8							
YNL153C	GIM3							
YEL003W	GIM4							
YML094W	GIM5							
YDR096W	GIS1							
YMR311C	GLC8							
YER122C	GLO3							
YEL046C	GLY1							
YJL184W	GON7							
YPR160W	GPH1							
YJR090C	GRR1							
YPL059W	GRX5							
YDR108W	GSG1							
YJL101C	GSH1							
YML121W	GTR1							
YLR289W	GUF1							
YOR070C	GYP1							
YFL031W	HAC1							
YGL237C	HAP2							
YKL109W	HAP4							
YOR358W	HAP5							
YKR084C	HBS1							
YLR192C	HCR1							
YNL021W	HDA1							
YDR295C	HDA2							
YDR458C	HEH2							
YDL013W	HEX3							
YDR317W	HIM1							

YOL095C	<i>HMI1</i>							
YJR075W	<i>HOC1</i>							
YDR138W	<i>HPR1</i>							
YOL123W	<i>HRP1</i>							
YMR186W	<i>HSC82</i>							
YFL014W	<i>HSP12</i>							
YBR072W	<i>HSP26</i>							
YCR021C	<i>HSP30</i>							
YOL012C	<i>HTA3</i>							
YHR067W	<i>HTD2</i>							
YCR020W-B	<i>HTL1</i>							
YGL168W	<i>HUR1</i>							
YPL117C	<i>IDI1</i>							
YDL066W	<i>IDP1</i>							
YOL023W	<i>IFM1</i>							
YLR384C	<i>IKI3</i>							
YCR046C	<i>IMG1</i>							
YCR071C	<i>IMG2</i>							
YMR150C	<i>IMP1</i>							
YMR035W	<i>IMP2</i>							
YOL081W	<i>IRA2</i>							
YLR021W	<i>IRC25</i>							
YDR332W	<i>IRC3</i>							
YIL026C	<i>IRR1</i>							
YLL027W	<i>ISA1</i>							
YPR067W	<i>ISA2</i>							
YOR155C	<i>ISN1</i>							
YDL115C	<i>IWR1</i>							
YPL125W	<i>KAP120</i>							
YER110C	<i>KAP123</i>							
YPR141C	<i>KAR3</i>							
YDR017C	<i>KCS1</i>							
YNL238W	<i>KEX2</i>							

YIL125W	<i>KGD1</i>							
YDR148C	<i>KGD2</i>							
YPL155C	<i>KIP2</i>							
YGR166W	<i>KRE11</i>							
YDR532C	<i>KRE28</i>							
YPR159W	<i>KRE6</i>							
YKL110C	<i>KT112</i>							
YLR260W	<i>LCB5</i>							
YOR322C	<i>LDB19</i>							
YBL006C	<i>LDB7</i>							
YOR123C	<i>LEO1</i>							
YKL073W	<i>LHS1</i>							
YLR239C	<i>LIP2</i>							
YOR196C	<i>LIP5</i>							
YKL183W	<i>LOT5</i>							
YJL124C	<i>LSM1</i>							
YNL147W	<i>LSM7</i>							
YNL006W	<i>LST8</i>							
YKL143W	<i>LTV1</i>							
YMR021C	<i>MAC1</i>							
YDR005C	<i>MAF1</i>							
YCR019W	<i>MAK32</i>							
YOR298C-A	<i>MBF1</i>							
YDL056W	<i>MBP1</i>							
YOR306C	<i>MCH5</i>							
YNL307C	<i>MCK1</i>							
YFL016C	<i>MDJ1</i>							
YAL010C	<i>MDM10</i>							
YOL009C	<i>MDM12</i>							
YLR368W	<i>MDM30</i>							
YGL219C	<i>MDM34</i>							
YGL020C	<i>MDM39</i>							
YGL197W	<i>MDS3</i>							

YOL111C	<i>MDY2</i>							
YLR288C	<i>MEC3</i>							
YDL005C	<i>MED2</i>							
YBR193C	<i>MED8</i>							
YLR069C	<i>MEF1</i>							
YJL102W	<i>MEF2</i>							
YKR007W	<i>MEH1</i>							
YLR303W	<i>MET17</i>							
YIL128W	<i>MET18</i>							
YDR219C	<i>MFB1</i>							
YML062C	<i>MFT1</i>							
YOR211C	<i>MGM1</i>							
YDR296W	<i>MHR1</i>							
YLR332W	<i>MID2</i>							
YGL035C	<i>MIG1</i>							
YOR330C	<i>MIP1</i>							
YNL076W	<i>MKS1</i>							
YLL006W	<i>MMM1</i>							
YOR350C	<i>MNE1</i>							
YER001W	<i>MNN1</i>							
YDR245W	<i>MNN10</i>							
YJR074W	<i>MOG1</i>							
YGL124C	<i>MON1</i>							
YNL297C	<i>MON2</i>							
YER068W	<i>MOT2</i>							
YKL059C	<i>MPE1</i>							
YGL143C	<i>MRF1</i>							
YGL136C	<i>MRM2</i>							
YDR347W	<i>MRP1</i>							
YPR166C	<i>MRP2</i>							
YBL090W	<i>MRP21</i>							
YKL167C	<i>MRP49</i>							
YKR006C	<i>MRPL13</i>							

YKR085C	MRPL20							
YNL177C	MRPL22							
YGR076C	MRPL25							
YBR282W	MRPL27							
YCR003W	MRPL32							
YMR286W	MRPL33							
YBR268W	MRPL37							
YKL170W	MRPL38							
YLR439W	MRPL4							
YPL173W	MRPL40							
YJL096W	MRPL49							
YHR147C	MRPL6							
YDR237W	MRPL7							
YPL013C	MRPS16							
YMR188C	MRPS17							
YDR337W	MRPS28							
YBR251W	MRPS5							
YMR158W	MRPS8							
YPL104W	MSD1							
YOL033W	MSE1							
YHR120W	MSH1							
YNL073W	MSK1							
YGR171C	MSM1							
YHR091C	MSR1							
YDR194C	MSS116							
YPR134W	MSS18							
YDL107W	MSS2							
YLR203C	MSS51							
YMR287C	MSU1							
YMR228W	MTF1							
YDL044C	MTF2							
YMR097C	MTG1							
YGR206W	MVB12							

YMR004W	<i>MVP1</i>							
YHR086W	<i>NAM8</i>							
YDL040C	<i>NAT1</i>							
YGR147C	<i>NAT2</i>							
YPR131C	<i>NAT3</i>							
YDR162C	<i>NBP2</i>							
YBL024W	<i>NCL1</i>							
YHR004C	<i>NEM1</i>							
YLR138W	<i>NHA1</i>							
YPL174C	<i>NIP100</i>							
YPR072W	<i>NOT5</i>							
YDR432W	<i>NPL3</i>							
YMR091C	<i>NPL6</i>							
YDL167C	<i>NRP1</i>							
YGR159C	<i>NSR1</i>							
YJL208C	<i>NUC1</i>							
YKL068W	<i>NUP100</i>							
YKL057C	<i>NUP120</i>							
YKR082W	<i>NUP133</i>							
YBL079W	<i>NUP170</i>							
YDR192C	<i>NUP42</i>							
YDL116W	<i>NUP84</i>							
YKL055C	<i>OAR1</i>							
YNL056W	<i>OCA2</i>							
YHL029C	<i>OCA5</i>							
YDR067C	<i>OCA6</i>							
YGL038C	<i>OCH1</i>							
YKL134C	<i>OCT1</i>							
YJR073C	<i>OPI3</i>							
YDL096C	<i>OPI6</i>							
YKR035C	<i>OPI8</i>							
YLR338W	<i>OPI9</i>							
YJL212C	<i>OPT1</i>							

YPR194C	OPT2	■						■
YGR078C	PAC10	■	■			■	■	
YDR488C	PAC11					■		
YER007W	PAC2				■			
YBR279W	PAF1		■					
YCR077C	PAT1		■	■				
YOR360C	PDE2					■		
YBR035C	PDX3				■			■
YOR036W	PEP12							■
YLR148W	PEP3	■			■		■	■
YMR231W	PEP5				■		■	■
YDR079W	PET100					■		
YMR257C	PET111					■		
YBL080C	PET112							■
YER058W	PET117					■		
YOR158W	PET123				■			
YNR045W	PET494					■		
YKL197C	PEX1					■		■
YDR265W	PEX10					■		■
YMR026C	PEX12					■		■
YGL153W	PEX14					■		■
YOL044W	PEX15					■		
YNL214W	PEX17					■		
YDL065C	PEX19					■		■
YJL210W	PEX2							■
YAL055W	PEX22					■		■
YDR329C	PEX3							■
YGR133W	PEX4					■		■
YDR244W	PEX5							■
YGR077C	PEX8					■		■
YJL179W	PF1	■	■			■		
YMR205C	PF2				■		■	
YIL107C	PF26							■

YPR191W	QCR2							
YFR033C	QCR6							
YDR529C	QCR7							
YGR183C	QCR9							
YLR204W	QRI5							
YOR368W	RAD17							
YCR066W	RAD18							
YKL113C	RAD27							
YGL058W	RAD6							
YDL090C	RAM1							
YNL098C	RAS2							
YJR033C	RAV1							
YDR202C	RAV2							
YCR036W	RBK1							
YOR265W	RBL2							
YJL204C	RCY1							
YDR195W	REF2							
YDR028C	REG1							
YOR127W	RGA1							
YER067W	RGI1							
YKR055W	RHO4							
YIL053W	RHR2							
YBL033C	RIB1							
YOL143C	RIB4							
YLR039C	RIC1							
YOR275C	RIM20							
YMR063W	RIM9							
YEL024W	RIP1							
YNL139C	RLR1							
YDL001W	RMD1							
YDR255C	RMD5							
YER083C	RMD7							
YFR048W	RMD8							

YEL050C	RML2	■						
YER070W	RNR1				■			
YJL026W	RNR2							■
YGR180C	RNR4	■			■			■
YLR371W	ROM2			■				
YBL093C	ROX3	■			■			
YJR063W	RPA12	■					■	
YNL248C	RPA49				■			
YJL140W	RPB4	■					■	■
YGL070C	RPB9	■	■		■			■
YGR085C	RPL11B					■		
YMR142C	RPL13B	■	■					■
YNL069C	RPL16B				■			
YBL027W	RPL19B					■		
YGL135W	RPL1B				■			■
YOR312C	RPL20B					■		
YER117W	RPL23B				■			
YIL052C	RPL34B					■		
YDL191W	RPL35A					■		
YJL189W	RPL39	■						
YGL076C	RPL7A	■						
YDL020C	RPN4	■						
YFL036W	RPO41	■						
YDL081C	RPP1A	■						
YMR230W	RPS10B	■						
YMR143W	RPS16A	■						
YML063W	RPS1B	■						
YGR027C	RPS25A					■		
YER131W	RPS26B					■	■	
YJR145C	RPS4A					■		
YPL090C	RPS6A		■					
YBL072C	RPS8A					■		
YIL153W	RRD1							■

YHR038W	<i>RRF1</i>							
YBL025W	<i>RRN10</i>							
YHR065C	<i>RRP3</i>							
YPL193W	<i>RSA1</i>							
YGR056W	<i>RSC1</i>							
YLR357W	<i>RSC2</i>							
YER050C	<i>RSM18</i>							
YNR037C	<i>RSM19</i>							
YKL155C	<i>RSM22</i>							
YGL129C	<i>RSM23</i>							
YDR175C	<i>RSM24</i>							
YGR215W	<i>RSM27</i>							
YHR087W	<i>RTC3</i>							
YGL244W	<i>RTF1</i>							
YOL067C	<i>RTG1</i>							
YGL252C	<i>RTG2</i>							
YBL103C	<i>RTG3</i>							
YOR014W	<i>RTS1</i>							
YOR216C	<i>RUD3</i>							
YCR009C	<i>RVS161</i>							
YBR095C	<i>RXT2</i>							
YKL212W	<i>SAC1</i>							
YDR129C	<i>SAC6</i>							
YMR060C	<i>SAM37</i>							
YKR028W	<i>SAP190</i>							
YAL027W	<i>SAW1</i>							
YBR037C	<i>SCO1</i>							
YJL080C	<i>SCP160</i>							
YIL076W	<i>SEC28</i>							
YBR171W	<i>SEC66</i>							
YCR067C	<i>SED4</i>							
YHR207C	<i>SET5</i>							
YPL165C	<i>SET6</i>							

YBR231C	SWC5							
YJL187C	SWE1							
YDR126W	SWF1							
YJL176C	SWI3							
YER111C	SWI4							
YLR182W	SWI6							
YDR260C	SWM1							
YNL081C	SWS2							
YPL129W	TAF14							
YBR044C	TCM62							
YPL180W	TCO89							
YIL039W	TED1							
YDR079C-A	TFB5							
YBR123C	TFC1							
YHR167W	THP2							
YGR181W	TIM13							
YPR074C	TKL1							
YPR133W-A	TOM5							
YNL070W	TOM7							
YNL121C	TOM70							
YAL016W	TPD3							
YJL164C	TPK1							
YNL079C	TPM1							
YBR126C	TPS1							
YDR074W	TPS2							
YOL115W	TRF4							
YML014W	TRM9							
YDR007W	TRP1							
YER090W	TRP2							
YKL211C	TRP3							
YDR354W	TRP4							
YGL026C	TRP5							
YOR115C	TRS33							

YLR435W	TSR2							
YOR187W	TUF1							
YCR084C	TUP1							
YBR166C	TYR1							
YML013W	UBX2							
YDL091C	UBX3							
YDR470C	UGO1							
YDR207C	UME6							
YBR173C	UMP1							
YPL230W	USV1							
YLR386W	VAC14							
YEL013W	VAC8							
YOR106W	VAM3							
YGL212W	VAM7							
YDR359C	VID21							
YIL017C	VID28							
YGL227W	VID30							
YDL185W	VMA1							
YHR039C-A	VMA10							
YPL234C	VMA11							
YKL119C	VMA12							
YPR036W	VMA13							
YHR026W	VMA16							
YBR127C	VMA2							
YGR105W	VMA21							
YHR060W	VMA22							
YOR332W	VMA4							
YKL080W	VMA5							
YLR447C	VMA6							
YGR020C	VMA7							
YEL051W	VMA8							
YCL005W-A	VMA9							
YOR270C	VPH1							

YBR097W	VPS15							
YPL045W	VPS16							
YMR077C	VPS20							
YKL041W	VPS24							
YJR102C	VPS25							
YNR006W	VPS27							
YPL065W	VPS28							
YHR012W	VPS29							
YPL120W	VPS30							
YLR396C	VPS33							
YLR240W	VPS34							
YJL154C	VPS35							
YLR417W	VPS36							
YLR360W	VPS38							
YDL077C	VPS39							
YPR173C	VPS4							
YDR080W	VPS41							
YGL095C	VPS45							
YOR069W	VPS5							
YDR484W	VPS52							
YDR027C	VPS54							
YDR486C	VPS60							
YLR261C	VPS63							
YOL129W	VPS68							
YML041C	VPS71							
YDR485C	VPS72							
YDR372C	VPS74							
YML097C	VPS9							
YLR337C	VRP1							
YOR043W	WHI2							
YNL197C	WHI3							
YOL105C	WSC3							
YLR070C	XYL2							

YNL107W	YAF9							
YAL037W	YAL037W							
YAL049C	YAL049C							
YHL009C	YAP3							
YBL053W	YBL053W							
YBL062W	YBL062W							
YBL083C	YBL083C							
YBL094C	YBL094C							
YBR292C	YBR292C							
YCR025C	YCR025C							
YCR045C	YCR045C							
YCR049C	YCR049C							
YCR050C	YCR050C							
YCR061W	YCR061W							
YCR087C-A	YCR087C-A							
YCR087W	YCR087W							
YNL064C	YDJ1							
YDL012C	YDL012C							
YDL068W	YDL068W							
YDL099W	YDL099W							
YDL114W	YDL114W							
YDL118W	YDL118W							
YDL129W	YDL129W							
YDR008C	YDR008C							
YDR010C	YDR010C							
YDR049W	YDR049W							
YDR065W	YDR065W							
YDR114C	YDR114C							
YDR115W	YDR115W							
YDR149C	YDR149C							
YDR157W	YDR157W							
YDR230W	YDR230W							
YDR274C	YDR274C							

YDR433W	YDR433W							
YDR491C	YDR491C							
YEL044W	YEL044W							
YEL045C	YEL045C							
YEL059W	YEL059W							
YER038W-A	YER038W-A							
YER077C	YER077C							
YER087W	YER087W							
YER137C	YER137C							
YFR011C	YFR011C							
YFR017C	YFR017C							
YGL024W	YGL024W							
YGL042C	YGL042C							
YGL117W	YGL117W							
YGL152C	YGL152C							
YGL165C	YGL165C							
YGL218W	YGL218W							
YGL220W	YGL220W							
YGL235W	YGL235w							
YGL242C	YGL242C							
YGR064W	YGR064W							
YGR102C	YGR102C							
YGR150C	YGR150C							
YGR160W	YGR160W							
YGR196C	YGR196C							
YGR218W	YGR218W							
YHR029C	YHI9							
YHR009C	YHR009C							
YCR059C	YIH1							
YIL029C	YIL029C							
YIL090W	YIL090W							
YMR151W	YIM2							
YJL046W	YJL046W							

YJL075C	YJL075C							
YJL131C	YJL131C							
YJL175W	YJL175W							
YJL211C	YJL211C							
YJR011C	YJR011C							
YJR018W	YJR018W							
YJR120W	YJR120W							
YLR200W	YKE2							
YKL037W	YKL037W							
YKL053W	YKL053W							
YKL118W	YKL118W							
YKL169C	YKL169C							
YLL007C	YLL007C							
YLR065C	YLR065C							
YLR091W	YLR091W							
YLR125W	YLR125W							
YLR194C	YLR194C							
YLR202C	YLR202C							
YLR294C	YLR294C							
YLR315W	YLR315W							
YLR322W	YLR322W							
YLR331C	YLR331C							
YLR358C	YLR358C							
YLR414C	YLR414C							
YLR426W	YLR426W							
YPR024W	YME1							
YML010W-A	YML010W-A							
YML013C-A	YML013C-A							
YML087C	YML087C							
YML094C-A	YML094C-A							
YML095C-A	YML095C-A							
YML108W	YML108W							
YMR003W	YMR003W							

YMR075C-A	YMR075C-A							
YMR098C	YMR098C							
YMR144W	YMR144W							
YMR166C	YMR166C							
YMR245W	YMR245W							
YMR293C	YMR293C							
YMR326C	YMR326C							
YER005W	YND1							
YNL045W	YNL045W							
YNL080C	YNL080C							
YNL119W	YNL119W							
YNL120C	YNL120C							
YNL140C	YNL140C							
YNL171C	YNL171C							
YNL187W	YNL187W							
YNL235C	YNL235C							
YNR004W	YNR004W							
YNR005C	YNR005C							
YNR025C	YNR025C							
YNR036C	YNR036C							
YOL083W	YOL083W							
YOR258W	YOR258W							
YOR305W	YOR305W							
YOR318C	YOR318C							
YOR331C	YOR331C							
YKL126W	YPK1							
YPL062W	YPL062W							
YPL077C	YPL077C							
YPL114W	YPL114W							
YPL144W	YPL144W							
YPL150W	YPL150W							
YPL260W	YPL260W							
YPR099C	YPR099C							

YPR116W	YPR116W							
YPR123C	YPR123C							
YPR157W	YPR157W							
YLR262C	YPT6							
YML001W	YPT7							
YMR089C	YTA12							
YGR270W	YTA7							
YGR285C	ZUO1							

Tabla S2. Función celular de aquellos genes más representados en los trabajos de genómica funcional llevados a cabo por: Kubota et al. (2004), Fujita et al. (2006), Van vorst et al. (2006), Yoshikawa et al. (2008), Auesukaree et al. (2009) y Teixeira et al. (2009).

GEN	FUNCIÓN CELULAR
<i>ARD1</i>	Modificación N-terminal de proteínas
<i>ATP15</i>	Subunidad del complejo ATP sintasa
<i>BEM2</i>	Organización del citoesqueleto y morfogénesis celular
<i>BRO1</i>	Regulación de la desubiquitinación en la ruta de cuerpos multivesiculares
<i>BUB1</i>	Control del ciclo celular en la anafase
<i>BUD27</i>	Iniciación de la traducción
<i>CUP5</i>	Subunidad de la V-ATPasa
<i>CWH36</i>	Subunidad de la V-ATPasa
<i>DOA4</i>	Reciclaje de ubiquitina de proteínas de membrana ubiquitinadas
<i>GCN5</i>	Coactivador en la regulación transcripcional
<i>GIM4</i>	Biogénesis de microtúbulos
<i>GIM5</i>	Biogénesis de microtúbulos
<i>PAC10</i>	Ensamblaje del complejo tubulina
<i>PEP3</i>	Biogénesis vacuolar
<i>RAD27</i>	Replicación del DNA
<i>RPB9</i>	Subunidad de la RNA polimerasa II
<i>SEC66</i>	Señalización postraducciona de proteínas a membrana
<i>SIT4</i>	Organización del citoesqueleto de actina
<i>SLG1</i>	Organización del citoesqueleto de actina
<i>SMI1</i>	Biogénesis de la pared celular
<i>SNF7</i>	Clasificación de proteínas transmembrana en la ruta de los cuerpos multivesiculares
<i>SNF8</i>	Direccionamiento de proteínas a la vacuola
<i>SOD2</i>	Protección celular frente especies reactivas de oxígeno
<i>SRB2</i>	Mantenimiento de telómeros
<i>SSD1</i>	Organización de la pared celular
<i>STP22</i>	Catabolismo de proteínas dependientes de ubiquitina por la ruta de los cuerpos multivesiculares
<i>THP2</i>	Exportación de mRNA del núcleo y mantenimiento de telómeros.
<i>TOM5</i>	Complejo translocasa de la membrana mitocondrial externa
<i>TPD3</i>	Regulación de la traducción

<i>TPS1</i>	Síntesis de trehalosa
<i>TRS33</i>	Transporte mediado por vesícula desde retículo endoplasmático a Golgi
<i>UME6</i>	Regulación transcripcional de genes del catabolismo de la arginina, función peroxisomal y reparación de DNA.
<i>VMA21</i>	Ensamblaje de la V-ATPasa
<i>VMA22</i>	Ensamblaje de la V-ATPasa
<i>VMA6</i>	Subunidad de la V-ATPasa
<i>VMA8</i>	Ensamblaje de la V-ATPasa
<i>VPS20</i>	Catabolismo de proteínas dependientes de ubiquitina por la ruta de los cuerpos multivesiculares
<i>VPS34</i>	Segregación vacuolar, endocitosis, formación de cuerpos multivesiculares.
<i>VPS36</i>	Catabolismo de proteínas dependientes de ubiquitina por la ruta de los cuerpos multivesiculares
<i>VPS4</i>	Catabolismo de proteínas dependientes de ubiquitina por la ruta de los cuerpos multivesiculares
<i>YKL037W</i>	Función desconocida

Tabla S3. Tabla comparativa de genes sobreexpresados bajo estrés por etanol a lo largo de distintos trabajos de transcriptómica. Los cuadros marcados en rojo indican que genes son comunes entre los distintos estudios.

ORF	Gen	Alexandre <i>et al.</i> (2001)	Chandler <i>et al.</i> (2004)	Fujita <i>et al.</i> (2004)	Li <i>et al.</i> (2010)	Stanley <i>et al.</i> (2010)
YDL243C	<i>AAD4</i>					
YFL056C	<i>AAD6</i>					
YNL141W	<i>AAH1</i>					
YLR027C	<i>AAT2</i>					
YJR108W	<i>ABM1</i>					
YDR511W	<i>ACN9</i>					
YLR304C	<i>ACO1</i>					
YKL192C	<i>ACP1</i>					
YOL086C	<i>ADH1</i>					
YMR303C	<i>ADH2</i>					
YGL256W	<i>ADH4</i>					
YBR145W	<i>ADH5</i>					
YDR216W	<i>ADR1</i>					
YCL025C	<i>AGP1</i>					
YDR214W	<i>AHA1</i>					
YLR109W	<i>AHP1</i>					
YHL021C	<i>AIM17</i>					
YJL122W	<i>ALB1</i>					
YMR170C	<i>ALD2</i>					
YMR169C	<i>ALD3</i>					
YOR374W	<i>ALD4</i>					
YLR089C	<i>ALT1</i>					
YGL156W	<i>AMS1</i>					
YDL008W	<i>APC11</i>					
YNL077W	<i>APJ1</i>					
YDL137W	<i>ARF2</i>					
YOR094W	<i>ARF3</i>					
YOL058W	<i>ARG1</i>					

YJL071W	ARG2					
YJL088W	ARG3					
YHR018C	ARG4					
YER069W	ARG5,6					
YOL140W	ARG8					
YDR173C	ARG82					
YGL148W	ARO2					
YDR035W	ARO3					
YBR249C	ARO4					
YDR101C	ARX1					
YJL115W	ASF1					
YKL185W	ASH1					
YDR184C	ATC1					
YLL042C	ATG10					
YBL078C	ATG8					
YLR393W	ATP10					
YDR377W	ATP17					
YML081C-A	ATP18					
YML116W	ATR1					
YNL259C	ATX1					
YHR208W	BAT1					
YHR040W	BCD1					
YDR361C	BCP1					
YDR299W	BFR2					
YGR282C	BGL2					
YPL217C	BMS1					
YJR025C	BNA1					
YLR231C	BNA5					
YFR047C	BNA6					
YNL166C	BNI5					
YOL077C	BRX1					
YGR142W	BTN2					
YLR074C	BUD20					

YOR078W	BUD21					
YMR014W	BUD22					
YFL023W	BUD27					
YCR063W	BUD31					
YGR041W	BUD9					
YKL005C	BYE1					
YML042W	CAT2					
YDR270W	CCC2					
YAL038W	CDC19					
YGL116W	CDC20					
YFR036W	CDC26					
YDR054C	CDC34					
YJL005W	CDC35					
YGL029W	CGR1					
YCL064C	CHA1					
YER026C	CHO1					
YGR157W	CHO2					
YHR142W	CHS7					
YHR052W	CIC1					
YOR349W	CIN1					
YOR028C	CIN5					
YGR207C	CIR1					
YNR001C	CIT1					
YCR005C	CIT2					
YPR001W	CIT3					
YBR135W	CKS1					
YGR108W	CLB1					
YPR120C	CLB5					
YGR109C	CLB6					
YMR199W	CLN1					
YPL256C	CLN2					
YAL040C	CLN3					
YLR433C	CNA1					

YBR155W	<i>CNS1</i>					
YLL050C	<i>COF1</i>					
YML110C	<i>COQ5</i>					
YGR255C	<i>COQ6</i>					
YNL336W	<i>COS1</i>					
YJR161C	<i>COS5</i>					
YGR295C	<i>COS6</i>					
YDL248W	<i>COS7</i>					
YHL048W	<i>COS8</i>					
YKL219W	<i>COS9</i>					
YOR316C	<i>COT1</i>					
YGL191W	<i>COX13</i>					
YER141W	<i>COX15</i>					
YLL009C	<i>COX17</i>					
YLL018C-A	<i>COX19</i>					
YIL111W	<i>COX5B</i>					
YOR303W	<i>CPA1</i>					
YJR109C	<i>CPA2</i>					
YDR155C	<i>CPH1</i>					
YLR216C	<i>CPR6</i>					
YJL172W	<i>CPS1</i>					
YOR100C	<i>CRC1</i>					
YOL007C	<i>CSI2</i>					
YPL181W	<i>CTI6</i>					
YHR175W	<i>CTR2</i>					
YGR088W	<i>CTT1</i>					
YHR053C	<i>CUP1-1</i>					
YHR055C	<i>CUP1-2</i>					
YEL027W	<i>CUP5</i>					
YNL286W	<i>CUS2</i>					
YLR323C	<i>CWC24</i>					
YNL245C	<i>CWC25</i>					
YKL096W	<i>CWP1</i>					

YAL039C	CYC3					
YEL039C	CYC7					
YML070W	DAK1					
YKR034W	DAL80					
YML113W	DAT1					
YDL031W	DBP10					
YNL112W	DBP2					
YGL078C	DBP3					
YKR024C	DBP7					
YHR169W	DBP8					
YLR276C	DBP9					
YOL149W	DCP1					
YLR270W	DCS1					
YOR173W	DCS2					
YOL052C-A	DDR2					
YMR173W	DDR48					
YOR204W	DED1					
YFL001W	DEG1					
YBR201W	DER1					
YKL078W	DHR2					
YDL024C	DIA3					
YHR011W	DIA4					
YKL002W	DID4					
YPL266W	DIM1					
YLR129W	DIP2					
YPL265W	DIP5					
YEL071W	DLD3					
YHR043C	DOG2					
YDR121W	DPB4					
YIL103W	DPH1					
YLL008W	DRS1					
YNL191W	DUG3					
YBR208C	DUR1,2					

YML080W	<i>DUS1</i>					
YLR401C	<i>DUS3</i>					
YLR405W	<i>DUS4</i>					
YLR284C	<i>ECI1</i>					
YGR146C	<i>ECL1</i>					
YAL059W	<i>ECM1</i>					
YMR128W	<i>ECM16</i>					
YBR176W	<i>ECM31</i>					
YKR076W	<i>ECM4</i>					
YGR271C-A	<i>EFG1</i>					
YPL086C	<i>ELP3</i>					
YDR516C	<i>EMI2</i>					
YOL071W	<i>EMI5</i>					
YGR254W	<i>ENO1</i>					
YHR174W	<i>ENO2</i>					
YBR247C	<i>ENP1</i>					
YGR145W	<i>ENP2</i>					
YMR049C	<i>ERB1</i>					
YLR246W	<i>ERF2</i>					
YML130C	<i>ERO1</i>					
YDR365C	<i>ESF1</i>					
YNR054C	<i>ESF2</i>					
YBL019W	<i>ETH1</i>					
YDR518W	<i>EUG1</i>					
YDR261C	<i>EXG2</i>					
YOR317W	<i>FAA1</i>					
YIL009W	<i>FAA3</i>					
YIL019W	<i>FAF1</i>					
YDR021W	<i>FAL1</i>					
YKL060C	<i>FBA1</i>					
YLR051C	<i>FCF2</i>					
YER060W	<i>FCY21</i>					
YMR058W	<i>FET3</i>					

YPR104C	<i>FHL1</i>					
YOR382W	<i>FIT2</i>					
YDR519W	<i>FKB2</i>					
YHR211W	<i>FLO5</i>					
YJL161W	<i>FMP33</i>					
YGR052W	<i>FMP48</i>					
YMR020W	<i>FMS1</i>					
YNL256W	<i>FOL1</i>					
YLR449W	<i>FPR4</i>					
YLL043W	<i>FPS1</i>					
YEL047C	<i>FRD1</i>					
YOR381W	<i>FRE3</i>					
YHR049W	<i>FSH1</i>					
YPL262W	<i>FUM1</i>					
YAL019W	<i>FUN30</i>					
YHR128W	<i>FUR1</i>					
YHR059W	<i>FYV4</i>					
YLR068W	<i>FYV7</i>					
YOR178C	<i>GAC1</i>					
YMR250W	<i>GAD1</i>					
YDR009W	<i>GAL3</i>					
YML051W	<i>GAL80</i>					
YLR343W	<i>GAS2</i>					
YJL125C	<i>GCD14</i>					
YDR019C	<i>GCV1</i>					
YMR189W	<i>GCV2</i>					
YAL044C	<i>GCV3</i>					
YOR120W	<i>GCY1</i>					
YPR184W	<i>GDB1</i>					
YDL215C	<i>GDH2</i>					
YCL036W	<i>GFD2</i>					
YDR309C	<i>GIC2</i>					
YEL003W	<i>GIM4</i>					

YER054C	<i>GIP2</i>					
YDR152W	<i>GIR2</i>					
YCR098C	<i>GIT1</i>					
YEL011W	<i>GLC3</i>					
YKR058W	<i>GLG1</i>					
YCL040W	<i>GLK1</i>					
YOR040W	<i>GLO4</i>					
YOR040W	<i>GLO4</i>					
YDL022W	<i>GPD1</i>					
YGL121C	<i>GPG1</i>					
YPR160W	<i>GPH1</i>					
YDL021W	<i>GPM2</i>					
YKR067W	<i>GPT2</i>					
YKL026C	<i>GPX1</i>					
YOL151W	<i>GRE2</i>					
YHR104W	<i>GRE3</i>					
YCL035C	<i>GRX1</i>					
YDR098C	<i>GRX3</i>					
YER174C	<i>GRX4</i>					
YGR032W	<i>GSC2</i>					
YOR185C	<i>GSP2</i>					
YFR015C	<i>GSY1</i>					
YLR258W	<i>GSY2</i>					
YML121W	<i>GTR1</i>					
YIR038C	<i>GTT1</i>					
YLL060C	<i>GTT2</i>					
YPL189W	<i>GUP2</i>					
YIL155C	<i>GUT2</i>					
YGR021W	<i>HAH1</i>					
YMR290C	<i>HAS1</i>					
YCL026C-B	<i>HBN1</i>					
YJL033W	<i>HCA4</i>					
YNL281W	<i>HCH1</i>					

YGR187C	HGH1					
YNL031C	HHT2					
YER057C	HIG1					
YCL030C	HIS4					
YIL116W	HIS5					
YBR248C	HIS7					
YJR055W	HIT1					
YOR032C	HMS1					
YBR034C	HMT1					
YLR205C	HMX1					
YDR158W	HOM2					
YER052C	HOM3					
YER062C	HOR2					
YMR251W-A	HOR7					
YPR193C	HPA2					
YLR097C	HRT3					
YMR186W	HSC82					
YKL101W	HSL1					
YOR020C	HSP10					
YLL026W	HSP104					
YFL014W	HSP12					
YJL159W	HSP150					
YBR072W	HSP26					
YCR021C	HSP30					
YDR533C	HSP31					
YDR171W	HSP42					
YLR259C	HSP60					
YDR258C	HSP78					
YPL240C	HSP82					
YHR067W	HTD2					
YCR020W-B	HTL1					
YFR053C	HXK1					
YDR343C	HXT6					

YDR342C	<i>HXT7</i>					
YIR037W	<i>HYR1</i>					
YMR195W	<i>ICY1</i>					
YNL037C	<i>IDH1</i>					
YOR136W	<i>IDH2</i>					
YDL066W	<i>IDP1</i>					
YLR052W	<i>IES3</i>					
YOR189W	<i>IES4</i>					
YMR108W	<i>ILV2</i>					
YCL009C	<i>ILV6</i>					
YOL157C	<i>IMA2</i>					
YML056C	<i>IMD4</i>					
YHR148W	<i>IMP3</i>					
YNL075W	<i>IMP4</i>					
YHR046C	<i>INM1</i>					
YJL153C	<i>INO1</i>					
YDR123C	<i>INO2</i>					
YOL108C	<i>INO4</i>					
YHR085W	<i>IPI1</i>					
YNL182C	<i>IPI3</i>					
YER048W-A	<i>ISD11</i>					
YMR081C	<i>ISF1</i>					
YPL135W	<i>ISU1</i>					
YGL018C	<i>JAC1</i>					
YJR119C	<i>JHD2</i>					
YPR169W	<i>JIP5</i>					
YJL162C	<i>JJJ2</i>					
YJR097W	<i>JJJ3</i>					
YMR294W	<i>JNM1</i>					
YJL034W	<i>KAR2</i>					
YPR141C	<i>KAR3</i>					
YPL263C	<i>KEL3</i>					
YDR148C	<i>KGD2</i>					

YJL094C	<i>KHA1</i>					
YDL049C	<i>KNH1</i>					
YNL132W	<i>KRE33</i>					
YNL308C	<i>KRI1</i>					
YCL059C	<i>KRR1</i>					
YBL071W-A	<i>KTI11</i>					
YKR061W	<i>KTR2</i>					
YNL029C	<i>KTR5</i>					
YKL103C	<i>LAP4</i>					
YER127W	<i>LCP5</i>					
YCL018W	<i>LEU2</i>					
YNL104C	<i>LEU4</i>					
YDL051W	<i>LHP1</i>					
YKL073W	<i>LHS1</i>					
YJR070C	<i>LIA1</i>					
YHR156C	<i>LIN1</i>					
YFR001W	<i>LOC1</i>					
YFL018C	<i>LPD1</i>					
YHR081W	<i>LRP1</i>					
YOR142W	<i>LSC1</i>					
YGR244C	<i>LSC2</i>					
YGL099W	<i>LSG1</i>					
YNL006W	<i>LST8</i>					
YKL143W	<i>LTV1</i>					
YIR034C	<i>LYS1</i>					
YBR115C	<i>LYS2</i>					
YDL182W	<i>LYS20</i>					
YDL131W	<i>LYS21</i>					
YGL154C	<i>LYS5</i>					
YER142C	<i>MAG1</i>					
YKL021C	<i>MAK11</i>					
YAL025C	<i>MAK16</i>					
YDR060W	<i>MAK21</i>					

YBR142W	<i>MAK5</i>					
YLR244C	<i>MAP1</i>					
YCR039C	<i>MATALPHA2</i>					
YDL003W	<i>MCD1</i>					
YOL119C	<i>MCH4</i>					
YKL150W	<i>MCR1</i>					
YFL016C	<i>MDJ1</i>					
YAL010C	<i>MDM10</i>					
YLR106C	<i>MDN1</i>					
YDL005C	<i>MED2</i>					
YHR058C	<i>MED6</i>					
YLR069C	<i>MEF1</i>					
YNL142W	<i>MEP2</i>					
YFR030W	<i>MET10</i>					
YGL125W	<i>MET13</i>					
YPR167C	<i>MET16</i>					
YLR303W	<i>MET17</i>					
YJR010W	<i>MET3</i>					
YER091C	<i>MET6</i>					
YGR249W	<i>MGA1</i>					
YLL062C	<i>MHT1</i>					
YKL195W	<i>MIA40</i>					
YER028C	<i>MIG3</i>					
YEL019C	<i>MMS21</i>					
YOR350C	<i>MNE1</i>					
YJR074W	<i>MOG1</i>					
YBL049W	<i>MOH1</i>					
YJL066C	<i>MPM1</i>					
YJR002W	<i>MPP10</i>					
YPR112C	<i>MRD1</i>					
YDL045W-A	<i>MRP10</i>					
YGR084C	<i>MRP13</i>					
YHL004W	<i>MRP4</i>					

YLR312W-A	<i>MRPL15</i>					
YNL252C	<i>MRPL17</i>					
YMR193W	<i>MRPL24</i>					
YMR286W	<i>MRPL33</i>					
YJL096W	<i>MRPL49</i>					
YPR100W	<i>MRPL51</i>					
YHR147C	<i>MRPL6</i>					
YDR237W	<i>MRPL7</i>					
YPL013C	<i>MRPS16</i>					
YHR005C-A	<i>MRS11</i>					
YKL009W	<i>MRT4</i>					
YOR066W	<i>MSA1</i>					
YKR077W	<i>MSA2</i>					
YBR195C	<i>MSI1</i>					
YIR009W	<i>MSL1</i>					
YGR028W	<i>MSP1</i>					
YKL098W	<i>MTC2</i>					
YJL050W	<i>MTR4</i>					
YIR019C	<i>MUC1</i>					
YAL029C	<i>MYO4</i>					
YNL124W	<i>NAF1</i>					
YPL126W	<i>NAN1</i>					
YMR069W	<i>NAT4</i>					
YJL116C	<i>NCA3</i>					
YJL205C	<i>NCE101</i>					
YNL036W	<i>NCE103</i>					
YLR254C	<i>NDL1</i>					
YML118W	<i>NGL3</i>					
YDL208W	<i>NHP2</i>					
YBR089C-A	<i>NHP6B</i>					
YPL211W	<i>NIP7</i>					
YHR170W	<i>NMD3</i>					

YOR056C	<i>NOB1</i>					
YOR206W	<i>NOC2</i>					
YLR002C	<i>NOC3</i>					
YPR144C	<i>NOC4</i>					
YPL093W	<i>NOG1</i>					
YNR053C	<i>NOG2</i>					
YOL041C	<i>NOP12</i>					
YNL175C	<i>NOP13</i>					
YDL148C	<i>NOP14</i>					
YNL110C	<i>NOP15</i>					
YER002W	<i>NOP16</i>					
YNL061W	<i>NOP2</i>					
YPL043W	<i>NOP4</i>					
YPL146C	<i>NOP53</i>					
YDL213C	<i>NOP6</i>					
YGR103W	<i>NOP7</i>					
YOL144W	<i>NOP8</i>					
YJL010C	<i>NOP9</i>					
YJR072C	<i>NPA3</i>					
YDR043C	<i>NRG1</i>					
YBR066C	<i>NRG2</i>					
YGL111W	<i>NSA1</i>					
YER126C	<i>NSA2</i>					
YGR159C	<i>NSR1</i>					
YML059C	<i>NTE1</i>					
YDR001C	<i>NTH1</i>					
YKR022C	<i>NTR2</i>					
YJL208C	<i>NUC1</i>					
YER006W	<i>NUG1</i>					
YLR093C	<i>NYV1</i>					
YPL052W	<i>OAZ1</i>					
YGL038C	<i>OCH1</i>					
YIL136W	<i>OM45</i>					

YDR316W	<i>OMS1</i>					
YHL020C	<i>OPI1</i>					
YJR073C	<i>OPI3</i>					
YLR054C	<i>OSW2</i>					
YHR179W	<i>OYE2</i>					
YPL171C	<i>OYE3</i>					
YMR174C	<i>PAI3</i>					
YKR065C	<i>PAM17</i>					
YJL223C	<i>PAU1</i>					
YHL046C	<i>PAU13</i>					
YCR104W	<i>PAU3</i>					
YLR461W	<i>PAU4</i>					
YFL020C	<i>PAU5</i>					
YNR076W	<i>PAU6</i>					
YNL015W	<i>PBI2</i>					
YLR151C	<i>PCD1</i>					
YIL071C	<i>PC18</i>					
YKR097W	<i>PCK1</i>					
YNL289W	<i>PCL1</i>					
YDL127W	<i>PCL2</i>					
YHR071W	<i>PCL5</i>					
YDL179W	<i>PCL9</i>					
YGR202C	<i>PCT1</i>					
YLR134W	<i>PDC5</i>					
YPR002W	<i>PDH1</i>					
YCL043C	<i>PDI1</i>					
YGR193C	<i>PDX1</i>					
YER149C	<i>PEA2</i>					
YPL154C	<i>PEP4</i>					
YER153C	<i>PET122</i>					
YGR222W	<i>PET54</i>					
YDL065C	<i>PEX19</i>					
YGR133W	<i>PEX4</i>					

YIL107C	<i>PFK26</i>					
YOR122C	<i>PFY1</i>					
YCR012W	<i>PGK1</i>					
YCR012W	<i>PGK1</i>					
YMR105C	<i>PGM2</i>					
YKL043W	<i>PHD1</i>					
YER037W	<i>PHM8</i>					
YGR233C	<i>PHO81</i>					
YML123C	<i>PHO84</i>					
YER053C	<i>PIC2</i>					
YLR273C	<i>PIG1</i>					
YKL163W	<i>PIR3</i>					
YGL059W	<i>PKP2</i>					
YOL011W	<i>PLB3</i>					
YCR024C-A	<i>PMP1</i>					
YGL037C	<i>PNC1</i>					
YOR145C	<i>PNO1</i>					
YIL122W	<i>POG1</i>					
YCR014C	<i>POL4</i>					
YNL282W	<i>POP3</i>					
YBR257W	<i>POP4</i>					
YNL055C	<i>POR1</i>					
YGL205W	<i>POX1</i>					
YHR075C	<i>PPE1</i>					
YGR123C	<i>PPT1</i>					
YEL060C	<i>PRB1</i>					
YMR297W	<i>PRC1</i>					
YOR362C	<i>PRE10</i>					
YPL192C	<i>PRM3</i>					
YPL156C	<i>PRM4</i>					
YMR268C	<i>PRP24</i>					
YGL120C	<i>PRP43</i>					
YBL064C	<i>PRX1</i>					

YBL064C	<i>PRX1</i>					
YJL079C	<i>PRY1</i>					
YKR013W	<i>PRY2</i>					
YOL054W	<i>PSH1</i>					
YDR055W	<i>PST1</i>					
YKR093W	<i>PTR2</i>					
YDR496C	<i>PUF6</i>					
YGL063W	<i>PUS2</i>					
YLR165C	<i>PUS5</i>					
YLR142W	<i>PUT1</i>					
YLR196W	<i>PWP1</i>					
YCR057C	<i>PWP2</i>					
YGR280C	<i>PXR1</i>					
YGL062W	<i>PYC1</i>					
YBR218C	<i>PYC2</i>					
YOR347C	<i>PYK2</i>					
YHR001W-A	<i>QCR10</i>					
YJL166W	<i>QCR8</i>					
YOR368W	<i>RAD17</i>					
YDR030C	<i>RAD28</i>					
YGL163C	<i>RAD54</i>					
YJR052W	<i>RAD7</i>					
YJR033C	<i>RAV1</i>					
YDR527W	<i>RBA50</i>					
YAL036C	<i>RBG1</i>					
YOL010W	<i>RCL1</i>					
YBR005W	<i>RCR1</i>					
YHR157W	<i>REC104</i>					
YJL217W	<i>REE1</i>					
YDR028C	<i>REG1</i>					
YBR050C	<i>REG2</i>					
YBR267W	<i>REI1</i>					
YLR107W	<i>REX3</i>					

YOL080C	<i>REX4</i>					
YNL290W	<i>RFC3</i>					
YER067W	<i>RGI1</i>					
YMR182C	<i>RGM1</i>					
YNL180C	<i>RHO5</i>					
YDR487C	<i>RIB3</i>					
YBR256C	<i>RIB5</i>					
YFL033C	<i>RIM15</i>					
YOR119C	<i>RIO1</i>					
YHR197W	<i>RIX1</i>					
YLL034C	<i>RIX7</i>					
YOR095C	<i>RK11</i>					
YPL089C	<i>RLM1</i>					
YLR009W	<i>RLP24</i>					
YNL002C	<i>RLP7</i>					
YGR044C	<i>RME1</i>					
YPL024W	<i>RM11</i>					
YLR145W	<i>RMP1</i>					
YDR465C	<i>RMT2</i>					
YMR239C	<i>RNT1</i>					
YFR022W	<i>ROG3</i>					
YGL171W	<i>ROK1</i>					
YJR063W	<i>RPA12</i>					
YPR010C	<i>RPA135</i>					
YOR341W	<i>RPA190</i>					
YJL148W	<i>RPA34</i>					
YOR340C	<i>RPA43</i>					
YNL248C	<i>RPA49</i>					
YBR154C	<i>RPB5</i>					
YDR045C	<i>RPC11</i>					
YNL113W	<i>RPC19</i>					
YNL151C	<i>RPC31</i>					
YHR088W	<i>RPF1</i>					

YKR081C	<i>RPF2</i>					
YIL119C	<i>RPI1</i>					
YNL067W	<i>RPL9B</i>					
YDL020C	<i>RPN4</i>					
YHR062C	<i>RPP1</i>					
YMR131C	<i>RRB1</i>					
YML043C	<i>RRN11</i>					
YKL125W	<i>RRN3</i>					
YJL025W	<i>RRN7</i>					
YDR087C	<i>RRP1</i>					
YPL012W	<i>RRP12</i>					
YKL082C	<i>RRP14</i>					
YPR143W	<i>RRP15</i>					
YDR412W	<i>RRP17</i>					
YHR069C	<i>RRP4</i>					
YGR095C	<i>RRP46</i>					
YMR229C	<i>RRP5</i>					
YDR083W	<i>RRP8</i>					
YPR137W	<i>RRP9</i>					
YOR294W	<i>RRS1</i>					
YPL193W	<i>RSA1</i>					
YLR221C	<i>RSA3</i>					
YCR072C	<i>RSA4</i>					
YOR049C	<i>RSB1</i>					
YMR030W	<i>RSF1</i>					
YKL155C	<i>RSM22</i>					
YJR101W	<i>RSM26</i>					
YGR215W	<i>RSM27</i>					
YBR147W	<i>RTC2</i>					
YHR087W	<i>RTC3</i>					
YGR161C	<i>RTS3</i>					
YJL098W	<i>SAP185</i>					
YDL153C	<i>SAS10</i>					

YCR008W	SAT4					
YGR263C	SAY1					
YGL011C	SCL1					
YGR245C	SDA1					
YLL041C	SDH2					
YDR178W	SDH4					
YKL193C	SDS22					
YGL056C	SDS23					
YBR214W	SDS24					
YDR077W	SED1					
YDR363W-A	SEM1					
YER081W	SER3					
YLR336C	SGD1					
YIR001C	SGN1					
YOR007C	SGT2					
YER096W	SHC1					
YOR137C	SIA1					
YBR103W	SIF2					
YLR197W	SIK1					
YOL031C	SIL1					
YMR175W	SIP18					
YDL042C	SIR2					
YHR149C	SKG6					
YGR195W	SKI6					
YOR195W	SLK19					
YOR154W	SLP1					
YDR088C	SLU7					
YGR081C	SLX9					
YML066C	SMA2					
YGR229C	SMI1					
YNR015W	SMM1					
YBR172C	SMY2					
YDR525W-A	SNA2					

YOR290C	<i>SNF2</i>					
YMR095C	<i>SNO1</i>					
YMR322C	<i>SNO4</i>					
YDL098C	<i>SNU23</i>					
YMR096W	<i>SNZ1</i>					
YJR104C	<i>SOD1</i>					
YHR008C	<i>SOD2</i>					
YLL011W	<i>SOF1</i>					
YMR016C	<i>SOK2</i>					
YGR248W	<i>SOL4</i>					
YEL059C-A	<i>SOM1</i>					
YCL054W	<i>SPB1</i>					
YEL031W	<i>SPF1</i>					
YER150W	<i>SPI1</i>					
YHR152W	<i>SPO12</i>					
YDR523C	<i>SPS1</i>					
YHR139C	<i>SPS100</i>					
YOR313C	<i>SPS4</i>					
YCR018C	<i>SRD1</i>					
YOR247W	<i>SRL1</i>					
YCL037C	<i>SRO9</i>					
YKL218C	<i>SRY1</i>					
YAL005C	<i>SSA1</i>					
YLL024C	<i>SSA2</i>					
YBL075C	<i>SSA3</i>					
YER103W	<i>SSA4</i>					
YPL106C	<i>SSE1</i>					
YBR169C	<i>SSE2</i>					
YHR066W	<i>SSF1</i>					
YHR184W	<i>SSP1</i>					
YPL092W	<i>SSU1</i>					
YMR053C	<i>STB2</i>					
YDL130W-	<i>STF1</i>					

A						
YGR008C	<i>STF2</i>					
YDL048C	<i>STP4</i>					
YJR130C	<i>STR2</i>					
YGL184C	<i>STR3</i>					
YGL169W	<i>SUA5</i>					
YPR151C	<i>SUE1</i>					
YBR294W	<i>SUL1</i>					
YGL162W	<i>SUT1</i>					
YPL163C	<i>SVS1</i>					
YGR129W	<i>SYF2</i>					
YJL035C	<i>TAD2</i>					
YBR069C	<i>TAT1</i>					
YPR140W	<i>TAZ1</i>					
YBR044C	<i>TCM62</i>					
YJL052W	<i>TDH1</i>					
YJR009C	<i>TDH2</i>					
YGR192C	<i>TDH3</i>					
YLR010C	<i>TEN1</i>					
YBR123C	<i>TFC1</i>					
YGR005C	<i>TFG2</i>					
YPL234C	<i>TFP3</i>					
YLR178C	<i>TFS1</i>					
YDR058C	<i>TGL2</i>					
YPL157W	<i>TGS1</i>					
YNL332W	<i>THI12</i>					
YLR237W	<i>THI7</i>					
YHR167W	<i>THP2</i>					
YBR067C	<i>TIP1</i>					
YPR040W	<i>TIP41</i>					
YLR136C	<i>TIS11</i>					
YOR252W	<i>TMA16</i>					
YMR269W	<i>TMA23</i>					

YOR091W	TMA46					
YMR203W	TOM40					
YNL070W	TOM7					
YBR162C	TOS1					
YLR183C	TOS4					
YDR050C	TPI1					
YNL079C	TPM1					
YLL028W	TPO1					
YBR126C	TPS1					
YDR074W	TPS2					
YJL129C	TRK1					
YDR120C	TRM1					
YOL124C	TRM11					
YNR046W	TRM112					
YKR056W	TRM2					
YBR061C	TRM7					
YDL201W	TRM8					
YDR165W	TRM82					
YDR007W	TRP1					
YER090W	TRP2					
YKL211C	TRP3					
YDR354W	TRP4					
YGL026C	TRP5					
YGR209C	TRX2					
YCR083W	TRX3					
YML028W	TSA1					
YML100W	TSL1					
YDL060W	TSR1					
YLR435W	TSR2					
YDR513W	TTR1					
YOR344C	TYE7					
YBR166C	TYR1					
YBR082C	UBC4					

YDR059C	<i>UBC5</i>					
YEL012W	<i>UBC8</i>					
YLL039C	<i>UBI4</i>					
YDL122W	<i>UBP1</i>					
YNL186W	<i>UBP10</i>					
YPL072W	<i>UBP16</i>					
YER151C	<i>UBP3</i>					
YJL048C	<i>UBX6</i>					
YGR048W	<i>UFD1</i>					
YGR019W	<i>UGA1</i>					
YKL035W	<i>UGP1</i>					
YGR072W	<i>UPF3</i>					
YMR271C	<i>URA10</i>					
YBL039C	<i>URA7</i>					
YJR103W	<i>URA8</i>					
YKL014C	<i>URB1</i>					
YDR400W	<i>URH1</i>					
YNR012W	<i>URK1</i>					
YKR042W	<i>UTH1</i>					
YJL109C	<i>UTP10</i>					
YKL099C	<i>UTP11</i>					
YLR222C	<i>UTP13</i>					
YML093W	<i>UTP14</i>					
YMR093W	<i>UTP15</i>					
YJL069C	<i>UTP18</i>					
YBL004W	<i>UTP20</i>					
YLR409C	<i>UTP21</i>					
YOR004W	<i>UTP23</i>					
YKR060W	<i>UTP30</i>					
YDR324C	<i>UTP4</i>					
YDR398W	<i>UTP5</i>					
YDR449C	<i>UTP6</i>					
YER082C	<i>UTP7</i>					

YGR128C	<i>UTP8</i>					
YHR196W	<i>UTP9</i>					
YGR065C	<i>VHT1</i>					
YPR139C	<i>VPS66</i>					
YPL019C	<i>VTC3</i>					
YOR359W	<i>VTS1</i>					
YHR134W	<i>WSS1</i>					
YJR067C	<i>YAE1</i>					
YNL107W	<i>YAF9</i>					
YAL065C	<i>YAL065C</i>					
YAR010C	<i>YAR010C</i>					
YPL239W	<i>YAR1</i>					
YER024W	<i>YAT2</i>					
YBL005W-B	<i>YBL005W-B</i>					
YBL028C	<i>YBL028C</i>					
YBL039W-A	<i>YBL039W-A</i>					
YBL054W	<i>YBL054W</i>					
YBL055C	<i>YBL055C</i>					
YBL071C-B	<i>YBL071C-B</i>					
YBL101W-A	<i>YBL101W-A</i>					
YBL101W-B	<i>YBL101W-B</i>					
YBR085C-A	<i>YBR085C-A</i>					
YBR139W	<i>YBR139W</i>					
YBR141C	<i>YBR141C</i>					
YBR200W-A	<i>YBR200W-A</i>					
YBR230W-A	<i>YBR230W-A</i>					
YBR271W	<i>YBR271W</i>					
YBR284W	<i>YBR284W</i>					
YBR287W	<i>YBR287W</i>					
YCL012C	<i>YCL012C</i>					
YCL021W-A	<i>YCL021W-A</i>					

YCL042W	YCL042W					
YCL049C	YCL049C					
YCR013C	YCR013C					
YCR016W	YCR016W					
YCR087C-A	YCR087C-A					
YDL023C	YDL023C					
YDL038C	YDL038C					
YDL063C	YDL063C					
YDL124W	YDL124W					
YDR031W	YDR031W					
YDR034W-B	YDR034W-B					
YDR042C	YDR042C					
YDR133C	YDR133C					
YDR154C	YDR154C					
YDR161W	YDR161W					
YDR170W-A	YDR170W-A					
YDR185C	YDR185C					
YDR210W-D	YDR210W-D					
YDR222W	YDR222W					
YDR261W-B	YDR261W-B					
YDR340W	YDR340W					
YDR357C	YDR357C					
YDR379C-A	YDR379C-A					
YDR514C	YDR514C					
YDR540C	YDR540C					
YEL073C	YEL073C					
YER137C	YER137C					
YER188W	YER188W					
YMR040W	YET2					
YFL066C	YFL066C					
YFR026C	YFR026C					
YGL117W	YGL117W					

YNL160W	YGP1					
YGR042W	YGR042W					
YGR066C	YGR066C					
YGR068C	YGR068C					
YGR079W	YGR079W					
YGR102C	YGR102C					
YGR109W-B	YGR109W-B					
YGR110W	YGR110W					
YGR117C	YGR117C					
YGR127W	YGR127W					
YGR146C	YGR146C					
YGR149W	YGR149W					
YGR150C	YGR150C					
YGR161W-B	YGR161W-B					
YGR169C-A	YGR169C-A					
YGR243W	YGR243W					
YGR272C	YGR272C					
YGR283C	YGR283C					
YHL026C	YHL026C					
YDR451C	YHP1					
YHR112C	YHR112C					
YHR127W	YHR127W					
YHR140W	YHR140W					
YIL014C-A	YIL014C-A					
YIL064W	YIL064W					
YIL082W-A	YIL082W-A					
YIL091C	YIL091C					
YIL096C	YIL096C					
YIL127C	YIL127C					
YIL161W	YIL161W					
YJL016W	YJL016W					
YJL047C-A	YJL047C-A					

YJL131C	YJL131C					
YJL133C-A	YJL133C-A					
YJL147C	YJL147C					
YJR008W	YJR008W					
YJR056C	YJR056C					
YJR061W	YJR061W					
YJR080C	YJR080C					
YJR096W	YJR096W					
YJR115W	YJR115W					
YKL095W	YJU2					
YLR200W	YKE2					
YKL027W	YKL027W					
YKL063C	YKL063C					
YKR045C	YKR045C					
YKR075C	YKR075C					
YHL014C	YLF2					
YLR057W	YLR057W					
YLR063W	YLR063W					
YLR073C	YLR073C					
YLR243W	YLR243W					
YLR287C	YLR287C					
YLR326W	YLR326W					
YLR348C	YLR348C					
YLR363W-A	YLR363W-A					
YLR414C	YLR414C					
YML007C-A	YML007C-A					
YML108W	YML108W					
YML131W	YML131W					
YMR090W	YMR090W					
YMR147W	YMR147W					
YMR185W	YMR185W					
YMR196W	YMR196W					
YMR244W	YMR244W					

YMR310C	YMR310C					
YNL024C	YNL024C					
YNL050C	YNL050C					
YNL162W-A	YNL162W-A					
YNL211C	YNL211C					
YNL217W	YNL217W					
YNL254C	YNL254C					
YNR014W	YNR014W					
YNR018W	YNR018W					
YNR034W-A	YNR034W-A					
YOL047C	YOL047C					
YOL083W	YOL083W					
YOL131W	YOL131W					
YOL159C-A	YOL159C-A					
YOR006C	YOR006C					
YOR060C	YOR060C					
YOR062C	YOR062C					
YOR152C	YOR152C					
YOR186W	YOR186W					
YOR205C	YOR205C					
YOR238W	YOR238W					
YOR287C	YOR287C					
YOR289W	YOR289W					
YOR302W	YOR302W					
YOR305W	YOR305W					
YOR338W	YOR338W					
YOR342C	YOR342C					
YOR385W	YOR385W					
YOR389W	YOR389W					
YML027W	YOX1					
YPL014W	YPL014W					
YPL068C	YPL068C					

YPL222W	YPL222W					
YPL245W	YPL245W					
YPL277C	YPL277C					
YPL278C	YPL278C					
YPR117W	YPR117W					
YPR127W	YPR127W					
YPR158W	YPR158W					
YPR174C	YPR174C					
YLR121C	YPS3					
YNL093W	YPT53					
YBR054W	YRO2					
YBR162W-A	YSY6					
YOR272W	YTM1					
YGR211W	ZPR1					

Tabla S4. Función celular de aquellos genes más comunmente sobreexpresados en levadura en los trabajos de Alexandre et al. (2001), Chandler et al. (2004), Fujita et al. (2004), Marks et al. (2008) y Stanley et al. (2010).

GEN	FUNCIÓN CELULAR
<i>ARG4</i>	Biosíntesis de arginina
<i>CIT2</i>	Síntesis de citrato
<i>CTT1</i>	Protección frente daño oxidativo
<i>DAK1</i>	Detoxificación de la dihidroxiacetona (DHA)
<i>DDR2</i>	Respuesta a varios estreses
<i>DLD3</i>	D-Lactato deshidrogenasa
<i>ERO1</i>	Mantenimiento del equilibrio redox y plegamiento oxidativo de proteínas en el retículo endoplasmático
<i>GLK1</i>	Glucólisis
<i>GPM2</i>	Función desconocida
<i>GRE3</i>	Respuesta a estrés oxidativo, osmótico, iónico y calor
<i>GRX1</i>	Respuesta a estrés oxidativo
<i>GSP2</i>	Organización nuclear
<i>GSY2</i>	Biosíntesis de glucógeno
<i>HOR7</i>	Organización de la membrana plasmática
<i>HSP104</i>	Respuesta a estrés por calor y etanol.
<i>HSP12</i>	Respuesta a estrés osmótico, calor y oxidativo. Organización de la membrana plasmática
<i>HSP26</i>	Respuesta a calor, plegamiento de proteínas
<i>HSP30</i>	Regulador negativo de la H ⁺ -ATPasa
<i>HSP31</i>	Respuesta a estrés oxidativo y a niveles de nutrientes
<i>HSP78</i>	Estabilización y plegamiento de proteínas
<i>HSP82</i>	Respuesta a estrés osmótico, plegamiento de proteínas
<i>HXK1</i>	Glucólisis
<i>OPI3</i>	Biosíntesis de fosfatidilcolina
<i>PBI2</i>	Regulación de la proteólisis, fusión vacuolar
<i>PGM2</i>	Síntesis de glucano, trehalosa, glucógeno y homeostasis del calcio.
<i>PIC2</i>	Transporte mitocondrial de cobre y fosfato
<i>PYC1</i>	Gluconeogénesis
<i>SNZ1</i>	Biosíntesis de tiamina

<i>SPI1</i>	Respuesta a pH ácido
<i>SSA4</i>	Plegamiento de proteínas. Respuesta a calor
<i>TDH1</i>	Glucólisis y gluconeogénesis
<i>UBI4</i>	Ubiquitinación de proteínas
<i>YGP1</i>	Ensamblaje de la pared celular

Tabla S5. Niveles de expresión para aquellos genes sobreexpresados (rojo) y reprimidos (verde) en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 tras una hora de estrés en presencia de un 10% (v/v) de etanol en el medio. Los genes cuya expresión no varía significativamente en presencia de etanol se presentan en amarillo. (CECT) CECT 10094, (Temo) Temohaya-26. La descripción del proceso biológico proviene de la base de datos SGD (www.yeastgenome.org).

Gen	CECT	Temo	Proceso Biológico
<i>THI13</i>	4,50	0,90	Thiamine biosynthesis
<i>THI12</i>	4,30	0,55	Thiamine biosynthesis
<i>CTR2</i>	3,69	1,08	Copper ion import; intracellular copper ion transport
<i>SRN2</i>	3,64	2,59	Protein-vacuolar targeting; protein-membrane targeting
<i>CYB2</i>	3,62	2,46	Lactate metabolic process
<i>NCA3</i>	3,60	1,49	Mitochondrion organization and biogenesis
<i>PIC2</i>	3,60	2,02	Cellular copper ion homeostasis
<i>AIM17</i>	3,58	2,27	Mitochondrion organization
<i>HSP32</i>	3,54	2,83	Cellular response to nutrient levels
<i>NCE103</i>	3,54	2,06	Cellular response to oxidative stress
<i>SPR28</i>	3,53	2,43	Cell wall organization and biogenesis; cellular morphogenesis
<i>YCL042W</i>	3,46	2,42	Unknown
<i>GRE3</i>	3,44	2,27	Response to stress; arabinose metabolism; D-xylose metabolism
<i>YHR033W</i>	3,36	2,28	Unknown
<i>YDL124W</i>	3,33	2,63	Cellular response to oxidative stress
<i>PUT1</i>	3,32	2,85	Proline catabolism; glutamate biosynthesis
<i>MPD1</i>	3,31	0,35	Protein folding
<i>PUT4</i>	3,30	1,30	Neutral amino acid transport
<i>RGI1</i>	3,22	0,37	Energy reserve metabolic process
<i>HSP104</i>	3,18	2,45	Response to stress; protein folding; trehalose metabolism
<i>YNL195C</i>	3,15	2,70	Unknown
<i>AIM46</i>	3,11	1,36	Unknown
<i>OLE1</i>	3,11	1,15	Fatty acid desaturation; mitochondrion inheritance
<i>PIN3</i>	3,10	1,42	Actin cytoskeleton organization and biogenesis
<i>ZWF1</i>	3,14	2,96	Pentose-phosphate shunt; response to hydrogen peroxide
<i>THI11</i>	3,08	0,01	Thiamine biosynthesis
<i>ECM4</i>	2,95	5,72	Glutathione metabolic process
<i>ALD3</i>	2,18	5,39	Polyamine catabolism
<i>SPG4</i>	1,88	5,04	Unknown

<i>SIP18</i>	1,73	4,91	Cellular response to water deprivation
<i>YNR073C</i>	2,62	4,73	Unknown
<i>SPS100</i>	2,94	4,71	Spore wall assembly
<i>RTN2</i>	2,11	4,47	Endoplasmic reticulum tubular network maintenance
<i>YHR138C</i>	2,92	4,40	Vacuole fusion, non-autophagic
<i>HBT1</i>	1,24	3,86	Cellular morphogenesis during conjugation with cellular fusion
<i>GRE1</i>	1,52	3,82	Unknown
<i>DSF1</i>	1,94	3,76	Unknown
<i>FMP16</i>	2,08	3,75	Unknown
<i>RTC3</i>	2,47	3,64	RNA metabolic process
<i>NQM1</i>	2,58	3,63	Unknown
<i>GCY1</i>	1,67	3,54	Cellular response to oxidative stress; D-xylose metabolism
<i>DDR2</i>	2,80	3,51	Cellular response to heat, hydrogen peroxide and starvation
<i>YGR066C</i>	1,80	3,51	Unknown
<i>SFA1</i>	1,85	3,50	Formaldehyde assimilation
<i>YRO2</i>	0,06	3,42	Unknown
<i>UIP4</i>	1,86	3,36	Unknown
<i>RCK1</i>	1,68	3,34	Regulation of meiosis; protein phosphorylation
<i>PIR3</i>	1,65	3,30	Cell wall organization and biogenesis
<i>CAK1</i>	1,40	3,29	Protein phosphorylation; cell cycle; meiosis
<i>SGA1</i>	2,29	3,26	Glycogen catabolic process
<i>BDH2</i>	2,23	3,24	Unknown
<i>TKL2</i>	1,02	3,16	Pentose-phosphate shunt
<i>GUT2</i>	2,60	3,12	Glycerol metabolic process; NADH oxidation
<i>OM45</i>	2,57	3,10	Unknown
<i>PEP4</i>	2,38	3,03	Autophagy; cellular response to starvation
<i>SSE2</i>	1,98	3,03	Protein folding
<i>STR3</i>	1,90	2,98	Methionine biosynthesis process
<i>HSP26</i>	5,42	4,40	Response to heat; protein folding
<i>HSP12</i>	4,10	6,40	Response to heat, oxidative and osmotic stress
<i>ACS1</i>	5,21	5,67	Acetate fermentation; acetyl-coa biosynthesis
<i>HSP31</i>	3,38	4,76	Cellular response to nutrient levels and oxidative stress
<i>MSC1</i>	3,42	4,52	Meiotic recombination
<i>YMR090W</i>	3,48	4,43	Unknown
<i>TFS1</i>	3,77	4,30	Regulation of proteolysis; regulation of Ras protein signal
<i>YML131W</i>	3,30	4,29	Unknown
<i>SPI1</i>	3,91	4,06	Response to acidic pH
<i>HSP33</i>	4,41	4,05	Cellular response to nutrient levels
<i>SNO4</i>	3,68	3,94	Cellular response to nutrient levels
<i>MRP8</i>	3,26	3,84	Unknown
<i>GPM2</i>	3,89	3,78	Unknown
<i>CYR1</i>	3,22	3,55	Regulation of cell cycle; RAS protein signal transduction

<i>DCS2</i>	3,48	3,49	Deadenylation-dependent decapping of nuclear-transcribed mRNA
<i>SOL4</i>	3,36	3,30	Pentose-phosphate shunt, oxidative branch
<i>YNL134C</i>	3,82	3,30	Response to furfural
<i>HSP42</i>	4,24	3,23	Cytoskeleton organization and biogenesis
<i>OPI3</i>	3,68	3,22	Phosphatidylcholine biosynthetic process
<i>UGA1</i>	3,42	3,06	Gamma-aminobutyric acid catabolic process
<i>RPS17B</i>	-3,54	-2,91	Protein biosynthesis
<i>GUA1</i>	-3,48	-2,96	GMP biosynthetic process
<i>RPL23B</i>	-3,29	-3,07	Protein biosynthesis
<i>RPS18B</i>	-3,24	-2,72	Protein biosynthesis
<i>RPS13</i>	-3,12	-2,57	Protein biosynthesis
<i>URA7</i>	-2,98	-2,62	Phospholipid biosynthesis; pyrimidine base biosynthesis
<i>RPS18A</i>	-2,95	-3,00	Protein biosynthesis
<i>RPL19B</i>	-2,87	-2,69	Protein biosynthesis
<i>RPL27A</i>	-2,81	-2,36	Protein biosynthesis
<i>RPS7B</i>	-2,75	-2,79	Protein biosynthesis
<i>PMA1</i>	-2,73	-1,82	Regulation of pH; proton transport
<i>YNL226W</i>	-2,73	-2,96	Unknown
<i>YML108W</i>	-2,73	-3,10	Unknown
<i>YHR214W-A</i>	-2,70	-1,20	Unknown
<i>YOR309C</i>	-2,68	-2,39	Unknown
<i>RPS26B</i>	-2,66	-3,02	Protein biosynthesis
<i>DIA2</i>	-2,65	-3,09	Protein ubiquitination
<i>EGD1</i>	-2,59	-2,34	Nascent polypeptide association
<i>RPS11B</i>	-2,58	-2,90	Protein biosynthesis
<i>RPL30</i>	-2,58	-2,52	Protein biosynthesis
<i>NSR1</i>	-2,57	-2,08	rRNA processing
<i>FAR10</i>	-2,53	-2,82	Cell cycle arrest in response to pheromone
<i>RPP1A</i>	-2,49	-2,92	Translational elongation; protein biosynthesis
<i>RPL34B</i>	-2,48	-2,14	Protein biosynthesis
<i>PRP38</i>	-2,45	-2,75	Nuclear mRNA splicing, via spliceosome
<i>IMD4</i>	-2,44	-2,68	Unknown
<i>LIA1</i>	-2,42	-2,20	Microtubule cytoskeleton organization
<i>RPS21A</i>	-2,42	-0,77	Protein biosynthesis
<i>CDC33</i>	-2,39	-2,30	Translational initiation; regulation of cell cycle
<i>ESC1</i>	-2,38	-2,34	Chromatin silencing at telomere
<i>AST2</i>	-2,37	-3,02	Protein targeting to membrane
<i>MRT4</i>	-2,35	-1,73	Ribosomal large subunit biogenesis; rRNA processing
<i>RPL34A</i>	-2,34	-2,33	Protein biosynthesis
<i>IMD1</i>	-2,34	-1,53	Unknown
<i>NHP2</i>	-2,34	-1,97	35S primary transcript processing; rRNA modification
<i>NDE1</i>	-2,33	-2,15	Glycolytic fermentation to etanol; NADH oxidation

<i>RPS28B</i>	-2,33	-2,54	Protein biosynthesis
<i>RPS24A</i>	-2,33	-2,26	Protein biosynthesis
<i>HSL1</i>	-2,32	-2,49	Regulation of cell cycle; protein phosphorylation
<i>URA1</i>	-2,31	-2,04	"de novo" pyrimidine nucleobase biosynthetic process
<i>YHR214W</i>	-1,46	-4,24	Unknown
<i>RPL9B</i>	-2,00	-4,12	Protein biosynthesis
<i>YAR066W</i>	-0,96	-4,11	Unknown
<i>RPS4B</i>	-2,27	-3,88	Protein biosynthesis
<i>SSB2</i>	-2,04	-3,84	Protein biosynthesis
<i>RPL4A</i>	-2,18	-3,58	Protein biosynthesis
<i>SUL2</i>	-1,62	-3,56	Sulfate transport
<i>GUP1</i>	-2,01	-3,39	Glycerol transport; glycerol catabolism
<i>YDL177C</i>	-2,08	-3,29	Unknown
<i>YLR046C</i>	-1,05	-3,29	Unknown
<i>VRG4</i>	-0,80	-3,28	GDP-mannose transport
<i>RPS22B</i>	-1,98	-3,27	Protein biosynthesis
<i>HNM1</i>	-1,72	-3,25	Choline transport
<i>YLR198C</i>	-1,32	-3,23	Unknown
<i>YIL169C</i>	-0,39	-3,19	Unknown
<i>RPL13A</i>	-2,29	-3,14	Protein biosynthesis
<i>RPS7A</i>	-4,52	-4,35	Protein biosynthesis
<i>RPL24A</i>	-4,30	-3,91	Protein biosynthesis
<i>RPS20</i>	-4,10	-4,75	Protein biosynthesis
<i>RPS12</i>	-4,05	-4,74	Protein biosynthesis
<i>RPS22A</i>	-3,90	-4,41	Protein biosynthesis
<i>RPS8B</i>	-3,72	-3,87	Protein biosynthesis
<i>RPL20A</i>	-3,72	-3,98	Protein biosynthesis
<i>RPP2B</i>	-3,57	-4,03	Protein biosynthesis; positive regulation of protein kinase activity
<i>INO80</i>	-3,54	-3,87	Transcription from RNA polymerase II promoter
<i>YGL102C</i>	-3,53	-3,92	Unknown
<i>RPS16A</i>	-3,50	-3,97	Protein biosynthesis
<i>RPS4A</i>	-3,46	-4,26	Protein biosynthesis; processing of 20S pre-rRNA
<i>RPS0A</i>	-3,40	-3,73	Protein biosynthesis
<i>RPS6B</i>	-3,31	-3,46	Protein biosynthesis
<i>RPL12A</i>	-3,25	-3,91	Protein biosynthesis
<i>RPL28</i>	-3,22	-3,15	Protein biosynthesis
<i>RPL18B</i>	-3,11	-3,80	Protein biosynthesis
<i>RPS25B</i>	-3,11	-3,82	Protein biosynthesis
<i>STM1</i>	-3,05	-3,13	Anti-apoptosis; telomere maintenance
<i>RPS0B</i>	-3,05	-4,00	Protein biosynthesis
<i>RPL17B</i>	-3,04	-3,61	Protein biosynthesis
<i>RPS6A</i>	-3,02	-3,28	Protein biosynthesis
<i>BUD28</i>	-2,98	-3,71	Cellular bud site selection

<i>OPI11</i>	-2,96	-3,23	Unknown
<i>RPS26A</i>	-2,95	-3,89	Protein biosynthesis
<i>RPS23B</i>	-2,95	-3,17	Protein biosynthesis
<i>RPL31A</i>	-2,94	-3,28	Protein biosynthesis
<i>RPS23A</i>	-2,90	-3,34	Protein biosynthesis
<i>RPS29A</i>	-2,83	-3,28	Protein biosynthesis
<i>RPL14B</i>	-2,83	-3,14	Protein biosynthesis
<i>TMA19</i>	-2,83	-3,41	Cytoplasmic translation
<i>RPS11A</i>	-2,83	-3,38	Protein biosynthesis
<i>RPL13B</i>	-2,81	-3,40	Protein biosynthesis
<i>RPL16A</i>	-2,81	-3,29	Protein biosynthesis
<i>RPS16B</i>	-2,79	-3,28	Protein biosynthesis
<i>RPS28A</i>	-2,78	-3,29	Protein biosynthesis
<i>RPL2B</i>	-2,76	-3,63	Protein biosynthesis
<i>RPL16B</i>	-2,65	-3,18	Protein biosynthesis
<i>EFT1</i>	-2,64	-4,36	Translational elongation
<i>RPL14A</i>	-2,64	-3,11	Protein biosynthesis
<i>SUR4</i>	-2,58	-3,44	Fatty acid biosynthesis
<i>RPL23A</i>	-2,54	-3,44	Protein biosynthesis
<i>BUD19</i>	-2,52	-3,89	Cellular bud site selection
<i>RPL7A</i>	-2,31	-3,55	Protein biosynthesis
<i>APT1</i>	-2,31	-3,22	AMP biosynthesis

Tabla S6. Niveles de expresión para aquellos genes sobreexpresados (rojo) y reprimidos (verde) en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26 en fase diaúxica durante el crecimiento en presencia de un 10% (v/v) de etanol en el medio. Los genes cuya expresión no varía significativamente en presencia de etanol se presentan en amarillo. (CECT) CECT 10094, (Temo) Temohaya-26. La descripción del proceso biológico proviene de la base de datos SGD (www.yeastgenome.org).

Gen	CECT	Temo	Proceso Biológico
<i>HSP82</i>	2,83	1,62	Protein folding; response to osmotic stress
<i>YCR016W</i>	1,01	-1,11	Unknown
<i>RPL26B</i>	2,73	0,07	Protein biosynthesis
<i>RPN5</i>	2,60	1,15	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>YMR051C</i>	2,43	0,21	Ty element transposition
<i>YBL005W-A</i>	2,36	0,03	Ty element transposition
<i>LHS1</i>	1,15	-0,32	Response to unfolded protein; protein transport
<i>YNL143C</i>	2,33	0,54	Unknown
<i>HAL1</i>	2,32	0,54	Salinity response
<i>SAT4</i>	2,32	0,82	Cation homeostasis; G1/S transition of mitotic cell cycle
<i>DRE2</i>	2,31	1,38	Iron-sulfur cluster assembly
<i>YDR366C</i>	2,29	0,50	Unknown
<i>YJR028W</i>	2,29	-0,11	Ty element transposition
<i>YBL036C</i>	2,26	1,08	Amino acid metabolism
<i>ATP4</i>	2,26	1,05	ATP synthesis coupled proton transport
<i>NSI1</i>	2,07	-1,00	Chromatin silencing at rDNA
<i>ERG20</i>	2,06	0,45	Ergosterol biosynthesis
<i>ERO1</i>	2,06	0,44	Protein folding; protein thiol-disulfide exchange
<i>QCR6</i>	2,00	0,39	Mitochondrial electron transport
<i>CYT1</i>	1,99	0,52	Mitochondrial electron transport; oxidative phosphorylation
<i>ADE4</i>	1,98	0,37	"de novo" IMP biosynthetic process
<i>CIT1</i>	1,92	0,90	Tricarboxylic acid cycle
<i>YPL225W</i>	1,91	0,28	Unknown
<i>YKR023W</i>	1,90	-0,30	Unknown
<i>MRH1</i>	1,89	0,69	Unknown
<i>YJR026W</i>	1,87	0,16	Ty element transposition
<i>YAR009C</i>	1,87	-0,26	Ty element transposition
<i>SFA1</i>	1,85	0,92	Formaldehyde assimilation
<i>JIP5</i>	1,85	0,45	Ribosomal large subunit biogenesis
<i>YMR090W</i>	1,84	1,48	Unknown
<i>SSS1</i>	1,84	0,29	Cotranslational membrane targeting

<i>YML045W</i>	1,82	-0,15	Ty element transposition
<i>NPT1</i>	1,80	0,64	Chromatin silencing at telomere
<i>RPN8</i>	1,80	-0,07	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>TOM20</i>	1,79	0,00	Protein import into mitochondrial matrix
<i>RLP24</i>	1,78	0,51	Ribosomal large subunit biogenesis
<i>UBC1</i>	1,77	0,29	Protein monoubiquitination; protein polyubiquitination
<i>YDJ1</i>	1,76	1,24	Protein-mitochondrial targeting
<i>SPT15</i>	1,75	0,18	Transposon integration
<i>YDR210W</i>	1,75	1,03	Unknown
<i>OLA1</i>	1,75	1,37	Unknown
<i>PHB2</i>	1,74	0,06	Proteolysis and peptidolysis; replicative cell aging
<i>PAA1</i>	1,73	0,18	Chromatin organization
<i>SBA1</i>	1,72	0,80	Protein folding; regulation of telomerase activity
<i>BUD19</i>	1,71	1,41	Cellular bud site selection
<i>CLN1</i>	1,71	0,59	Regulation of CDK activity
<i>ERP2</i>	1,71	-0,23	ER to Golgi transport
<i>ATP3</i>	1,70	0,05	ATP synthesis coupled proton transport
<i>HSP31</i>	1,69	0,26	Cellular response to oxidative stress and nutrient levels
<i>YBL101W-A</i>	1,69	0,33	Ty element transposition
<i>YRO2</i>	1,69	1,21	Unknown
<i>HAP4</i>	1,68	1,69	Regulation of carbohydrate metabolism
<i>YML040W</i>	1,68	-0,06	Ty element transposition
<i>RVS161</i>	1,68	-0,64	Response to starvation, osmotic stress
<i>SER3</i>	1,66	0,01	Serine family amino acid biosynthesis
<i>PUF3</i>	1,65	1,27	Mitochondrion organization; aerobic respiration
<i>YIL060W</i>	1,65	-0,37	Unknown
<i>VMA10</i>	1,65	0,40	Vacuolar acidification; glycogen metabolism
<i>SCM4</i>	1,65	0,44	Cell cycle
<i>RPT4</i>	1,64	0,23	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>RHO1</i>	1,63	0,98	Actin cytoskeleton organization
<i>YLR297W</i>	1,63	-0,13	Unknown
<i>ARF1</i>	1,63	-0,09	Intra-Golgi transport; ER to Golgi transport
<i>DOS2</i>	1,62	-0,84	Unknown
<i>COX6</i>	1,61	0,40	Aerobic respiration
<i>TAE2</i>	1,61	-0,15	Cytoplasmic translation
<i>FAR10</i>	1,60	0,20	Cell cycle arrest in response to pheromone
<i>RPN12</i>	1,60	0,51	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>AAD15</i>	1,58	0,35	Aldehyde metabolism
<i>SUI1</i>	1,58	0,83	Translational initiation
<i>YET1</i>	1,57	0,34	Unknown
<i>CYB5</i>	1,57	1,23	Sterol biosynthesis
<i>PRE1</i>	1,57	0,39	Response to stress
<i>YML131W</i>	1,56	1,69	Unknown

<i>LCB2</i>	1,56	-0,37	Spingolipid biosynthesis
<i>SOF1</i>	1,56	0,14	35S primary transcript processing; rRNA modification
<i>TPO2</i>	1,55	1,02	Polyamine transport
<i>YMR046C</i>	1,53	-0,29	Ty element transposition
<i>HCR1</i>	1,53	1,18	Protein biosynthesis; processing of 20S pre-rRNA
<i>TIF11</i>	1,52	0,30	Translational initiation
<i>SAS3</i>	1,51	0,06	Chromatin modification; chromatin silencing at telomere
<i>PRE7</i>	1,51	-0,04	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>SCL1</i>	1,48	1,38	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>SUA7</i>	1,48	0,02	Transcription initiation from Pol II promoter
<i>NOP15</i>	1,47	-0,39	Ribosomal large subunit biogenesis
<i>CUP1-1</i>	1,47	0,34	Response to copper ion
<i>AHP1</i>	1,47	1,56	Regulation of cell redox homeostasis; response to metal ion
<i>NSG2</i>	1,46	1,05	Sterol biosynthetic process
<i>QCR7</i>	1,46	0,71	Mitochondrial electron transport
<i>KNS1</i>	1,45	0,44	Protein amino acid phosphorylation
<i>CDC34</i>	1,45	-0,19	Protein autoubiquitination
<i>ARI1</i>	1,44	0,38	Unknown
<i>ARF2</i>	1,44	0,97	Intra-Golgi transport; ER to Golgi transport
<i>YPR148C</i>	1,42	-0,43	Unknown
<i>PET123</i>	1,41	0,34	Protein biosynthesis
<i>VMA8</i>	1,41	-0,20	Vacuolar acidification
<i>HLJ1</i>	1,40	-0,31	ATPase activator activity
<i>MRPL24</i>	1,40	1,11	Protein biosynthesis
<i>PRE6</i>	1,39	0,02	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>BSC1</i>	1,39	1,71	Unknown
<i>RPC82</i>	1,39	0,58	Transcription from Pol III promoter
<i>GCV1</i>	1,38	0,39	Glycine metabolism; one-carbon compound metabolism
<i>BUG1</i>	1,38	-0,07	ER to Golgi vesicle-mediated transport
<i>SUB2</i>	1,37	0,24	mRNA export from nucleus
<i>YAR010C</i>	1,37	-0,24	Ty element transposition
<i>PCL5</i>	1,36	0,70	Cell cycle
<i>PRE4</i>	1,36	1,26	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>RIP1</i>	1,36	1,47	Mitochondrial electron transport
<i>BFR1</i>	1,35	-0,23	mRNA metabolic process
<i>RPT5</i>	1,35	1,10	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>HST1</i>	1,34	0,08	Transcriptional gene silencing
<i>RDI1</i>	1,34	0,39	Small GTPase mediated signal transduction
<i>COX5A</i>	1,33	1,27	Aerobic respiration
<i>RIB5</i>	1,33	0,41	Vitamin B2 biosynthesis
<i>MRT4</i>	1,33	-0,11	Ribosomal large subunit biogenesis; rRNA processing
<i>ATP20</i>	1,31	0,59	ATP synthesis coupled proton transport
<i>VPS4</i>	1,31	0,67	Late endosome to vacuole transport; protein-Golgi retention

<i>CHO2</i>	1,31	0,09	Phosphatidylcholine biosynthesis
<i>GTF1</i>	1,31	0,92	Glutaminyl-tRNAGln biosynthesis via transamidation
<i>ERG5</i>	1,31	0,83	Ergosterol biosynthesis
<i>AHA1</i>	1,31	1,26	Response to stress; protein folding
<i>RAS2</i>	1,30	0,62	Activation of adenylate cyclase activity
<i>YCL020W</i>	1,30	0,82	Ty element transposition
<i>CIR1</i>	1,29	-0,38	Unknown
<i>FAT1</i>	1,29	-0,70	Very-long-chain fatty acid metabolism; lipid transport
<i>ARG1</i>	1,29	-0,39	Arginine biosynthesis
<i>DBP5</i>	1,29	0,56	mRNA-nucleus export
<i>YPR158W</i>	1,28	-1,06	Unknown; Ty element transposition
<i>RTG2</i>	1,27	0,10	Intracellular signaling cascade
<i>YBR012W-A</i>	1,27	-0,23	Ty element transposition
<i>DST1</i>	1,26	0,24	Meiotic recombination; RNA elongation from Pol II promoter
<i>ROX1</i>	1,25	0,64	Negative regulation of transcription from Pol II promoter
<i>CAR2</i>	1,25	1,40	Arginine catabolism
<i>PUP2</i>	1,24	-0,58	Response to stress; ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>ATP7</i>	1,24	1,07	ATP synthesis coupled proton transport
<i>ATP1</i>	1,24	-1,01	ATP synthesis coupled proton transport
<i>HHF1</i>	1,24	0,35	Chromatin assembly/disassembly
<i>GET3</i>	1,23	0,78	Response to heat; response to metal ion
<i>GCD6</i>	1,23	0,12	Translational initiation
<i>MAP2</i>	1,23	0,45	Proteolysis and peptidolysis
<i>OYE3</i>	1,19	0,23	Apoptotic process
<i>CYS4</i>	1,14	1,51	Cysteine biosynthesis
<i>FCF2</i>	1,13	1,62	Unknown
<i>EFB1</i>	1,10	1,14	Translational elongation
<i>SUI3</i>	1,08	1,39	Translational initiation
<i>PFK27</i>	1,06	1,50	Regulation of glycolysis
<i>RPS10A</i>	1,04	1,12	Protein biosynthesis
<i>MRPL16</i>	1,03	1,51	Protein biosynthesis
<i>HSP104</i>	1,01	-0,39	Response to stress; protein folding
<i>MCR1</i>	1,00	0,08	Response to oxidative stress; ergosterol biosynthesis
<i>YBR053C</i>	1,00	0,31	Unknown
<i>MRPL20</i>	0,98	1,43	Mitochondrial genome maintenance; protein biosynthesis
<i>YOR052C</i>	0,96	1,71	Unknown
<i>RRS1</i>	0,95	1,05	Ribosome biogenesis; rna processing
<i>SSE2</i>	0,95	0,18	Protein folding
<i>RPS18B</i>	0,93	1,05	Protein biosynthesis
<i>MIC17</i>	0,91	1,38	Aerobic respiration
<i>ISU1</i>	0,76	1,94	Iron-sulfur cluster assembly; iron ion homeostasis
<i>URA5</i>	0,75	1,99	Pyrimidine base biosynthesis
<i>PNO1</i>	0,61	2,35	Protein complex assembly; rRNA processing

<i>CTR3</i>	0,51	2,14	Copper ion import
<i>RPS1B</i>	0,47	2,00	Protein biosynthesis
<i>SNU13</i>	0,44	2,43	Nuclear mRNA splicing, via spliceosome
<i>YER036C</i>	0,38	2,02	Unknown
<i>FUI1</i>	0,37	2,31	Uridine transport
<i>YKL071W</i>	0,35	2,06	Unknown
<i>TMA46</i>	0,34	1,93	Cytoplasmic translation
<i>YKR075C</i>	0,23	2,71	Unknown
<i>RCK1</i>	0,20	3,31	Regulation of meiosis; protein amino acid phosphorylation
<i>UBX6</i>	0,06	1,96	Sporulation resulting in formation of a cellular spore
<i>FMP48</i>	0,04	1,89	Protein phosphorylation
<i>FCY2</i>	-0,06	1,93	Cytosine transport; purine transport
<i>SHM2</i>	-0,16	2,24	One-carbon compound metabolism
<i>SAM1</i>	-0,17	2,12	Methionine metabolism
<i>ILV5</i>	-0,19	1,94	Branched chain family amino acid biosynthesis
<i>RPL12A</i>	-0,34	2,20	Protein biosynthesis
<i>HSP12</i>	-0,41	2,69	Response to oxidative stress; hyperosmotic response
<i>IZH3</i>	-0,43	1,96	Cellular zinc ion homeostasis
<i>GUA1</i>	-0,46	2,11	GMP metabolism
<i>MET31</i>	-0,56	1,89	Regulation of transcription; sulfur amino acid metabolism
<i>NSR1</i>	-0,57	3,12	Ribosomal small subunit assembly and maintenance
<i>ADH6</i>	-0,69	3,22	Alcohol metabolism; aldehyde metabolism
<i>DIT1</i>	-0,70	3,18	Spore wall assembly (sensu Saccharomyces)
<i>IMD4</i>	-1,01	1,89	Unknown
<i>YNR014W</i>	-1,57	2,22	Unknown
<i>HSC82</i>	3,15	2,50	Protein folding; response to stress
<i>PIC2</i>	2,62	1,98	Transmembrane transport
<i>YGP1</i>	1,89	3,20	Response to nutrients; response to stress
<i>NCA3</i>	1,86	3,64	Mitochondrion organization and biogenesis
<i>YHB1</i>	1,72	3,06	Response to stress
<i>HPT1</i>	1,63	2,00	Purine nucleotide biosynthesis
<i>SGT2</i>	1,62	1,98	Posttranslational protein targeting to membrane
<i>MSN4</i>	1,39	2,50	Response to stress
<i>NDE1</i>	1,32	2,08	Ethanol fermentation; NADH oxidation
<i>CPA1</i>	1,30	2,11	Arginine biosynthesis
<i>CYC1</i>	1,29	3,07	Electron transport
<i>TRR1</i>	1,28	1,93	Regulation of cell redox homeostasis
<i>YOR338W</i>	1,24	2,32	Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>BAP2</i>	1,20	2,22	Amino acid transport
<i>RPL24A</i>	1,06	2,06	Protein biosynthesis
<i>ECM4</i>	0,99	2,62	Cell wall organization and biogenesis
<i>TAT1</i>	0,98	2,12	Amino acid transport

<i>MRP13</i>	0,97	2,11	Protein biosynthesis
<i>MUP1</i>	0,92	1,96	Sulfur amino acid transport
<i>ADH4</i>	-4,99	-0,35	Fermentation
<i>BOP3</i>	-4,18	-1,87	Cellular response to methylmercury
<i>SHE4</i>	-3,96	-2,11	Actin cytoskeleton organization and biogenesis
<i>ERR3</i>	-3,42	-1,90	Unknown
<i>IKI3</i>	-3,41	-1,77	Regulation of transcription from Pol II promoter
<i>NUD1</i>	-3,29	-0,20	Microtubule nucleation
<i>PSO2</i>	-3,26	-2,21	DNA repair; double-strand break repair
<i>NRP1</i>	-3,18	-1,41	Unknown
<i>FUN34</i>	-3,15	-0,55	Nitrogen utilization; transport
<i>YKL171W</i>	-3,08	-0,56	Proteolysis and peptidolysis
<i>BDH2</i>	-3,06	-1,69	Unknown
<i>YPR123C</i>	-3,01	-1,05	Unknown
<i>MET8</i>	-3,01	-1,61	Sulfate assimilation; siroheme biosynthesis
<i>YAT1</i>	-2,98	-1,78	Alcohol metabolism; carnitine metabolism
<i>ARP1</i>	-2,98	-1,24	Mitotic anaphase B
<i>YML003W</i>	-2,96	-0,03	Unknown
<i>HIR2</i>	-2,94	-1,04	Regulation of transcription from Pol II promoter
<i>YOL098C</i>	-2,90	-1,03	Unknown
<i>VHS1</i>	-2,90	0,42	Protein amino acid phosphorylation
<i>PUF4</i>	-2,88	-2,24	Loss of chromatin silencing during replicative cell aging
<i>VIP1</i>	-2,88	-1,45	Actin cytoskeleton organization and biogenesis
<i>CAM1</i>	-2,87	-1,18	Regulation of translational elongation
<i>SWC1</i>	-2,86	-2,08	Endoplasmic reticulum organization
<i>BAT2</i>	-2,85	0,66	Amino acid catabolism
<i>GCD2</i>	-2,83	-1,12	Translational initiation
<i>PUS7</i>	-2,82	-2,07	Pseudouridine synthesis; snrna modification
<i>SIN4</i>	-2,82	0,63	Transcription from Pol II promoter
<i>IMD2</i>	-2,80	0,78	GTP biosynthesis
<i>ERR2</i>	-2,78	-1,71	Unknown
<i>YMR262W</i>	-2,77	-1,99	Unknown
<i>YPR027C</i>	-2,77	-0,44	Unknown
<i>RRT12</i>	-2,76	-2,16	Ascospore wall assembly
<i>BIO2</i>	-2,76	-0,53	Biotin biosynthesis
<i>SFG1</i>	-2,76	-1,77	Mitotic cell cycle
<i>MDS3</i>	-2,75	-1,42	Sporulation
<i>YCR006C</i>	-2,74	-2,20	Unknown
<i>YCR041W</i>	-2,71	-2,00	Unknown
<i>KAR1</i>	-2,71	-0,45	Spindle pole body duplication (sensu Saccharomyces)
<i>AHT1</i>	-2,70	-1,50	Unknown
<i>MAK31</i>	-2,69	-1,55	N-terminal protein amino acid acetylation
<i>DPM1</i>	-2,69	-1,40	GPI anchor biosynthesis; O-linked glycosylation; N-linked

			glycosylation
<i>SKI2</i>	-2,69	-1,57	Regulation of translation; mRNA catabolism
<i>YBL044W</i>	-2,68	1,03	Unknown
<i>ATF1</i>	-2,68	-2,06	Fermentation; fatty acid metabolism
<i>GPX2</i>	-2,68	-1,48	Response to oxidative stress
<i>NAM2</i>	-2,68	-1,14	Group I intron splicing; leucyl-trna aminoacylation
<i>YCL042W</i>	-2,67	-2,00	Unknown
<i>LEU2</i>	-2,67	-0,38	Leucine biosynthesis
<i>RHC18</i>	-2,67	-2,06	Cell proliferation; DNA repair
<i>ISW2</i>	-2,64	-1,20	Chromatin remodeling
<i>RPL4A</i>	-2,64	-0,63	Protein biosynthesis
<i>ILV6</i>	-2,63	-0,87	Branched chain family amino acid biosynthesis
<i>TUS1</i>	-2,62	-1,87	Cell wall organization and biogenesis; signal transduction
<i>SSD1</i>	-2,61	-0,66	Cell wall organization and biogenesis
<i>KRE22</i>	-2,61	-0,89	Unknown
<i>OPT2</i>	-2,60	-1,79	Oligopeptide transport
<i>IMD3</i>	-2,60	0,90	GTP biosynthesis
<i>YPR078C</i>	-2,60	-2,19	Meiosis; DNA metabolism
<i>TYR1</i>	-2,59	-2,24	Tyrosine metabolism
<i>GRH1</i>	-2,59	-1,11	Mitotic spindle checkpoint
<i>YDR444W</i>	-2,58	-2,07	Unknown
<i>TPO5</i>	-2,57	-1,42	Polyamine transport
<i>IOC4</i>	-2,57	-1,32	Chromatin remodeling
<i>TPA1</i>	-2,57	-1,35	Translational termination
<i>BMS1</i>	-2,56	-1,14	Ribosome assembly; rna processing
<i>YKL222C</i>	-2,56	-1,28	Unknown
<i>EFT1</i>	-2,54	-0,70	Translational elongation
<i>MEH1</i>	-2,54	-0,85	Microautophagy
<i>ANT1</i>	-2,53	-0,39	Peroxisome organization and biogenesis; fatty acid beta-oxidation
<i>ILV3</i>	-2,53	-0,56	Branched chain family amino acid biosynthesis
<i>LST4</i>	-2,52	-1,24	Protein transport
<i>SIN3</i>	-2,52	-0,74	Chromatin silencing at ribosomal DNA
<i>TRP5</i>	-2,51	-0,76	Tryptophan biosynthesis
<i>KGD2</i>	-2,50	-0,87	2-oxoglutarate metabolism; tricarboxylic acid cycle
<i>YKL107W</i>	-2,50	-0,87	Unknown
<i>UTP13</i>	-2,50	-2,26	Processing of 20S pre-rna
<i>RMR1</i>	-2,49	-1,60	Meiotic gene conversion
<i>MEP2</i>	-2,49	-1,88	Ammonium transport; pseudohyphal growth
<i>FEN2</i>	-2,49	-1,16	Pantothenate transport
<i>YPK3</i>	-2,48	-1,61	Unknown
<i>KEL1</i>	-2,47	-1,09	Regulation of cell shape; cytogamy; plasma membrane fusion
<i>IMD1</i>	-2,47	1,27	Unknown

<i>TES1</i>	-2,46	-1,32	Fatty acid oxidation
<i>STE3</i>	-2,45	-1,18	Signal transduction during conjugation with cellular fusion
<i>BAT1</i>	-2,45	-0,67	Branched chain family amino acid biosynthesis; amino acid catabolism
<i>PFK1</i>	-2,45	-0,68	Glycolysis
<i>RRP43</i>	-2,44	-1,67	mRNA catabolism; 35S primary transcript processing
<i>SGS1</i>	-2,44	-0,15	Mitotic chromosome segregation
<i>ZAP1</i>	-2,44	-1,32	Zinc ion homeostasis; regulation of transcription from Pol II promoter
<i>TNA1</i>	-2,43	-0,51	Nicotinamide mononucleotide transport
<i>VPS61</i>	-2,43	-1,42	Protein targeting to vacuole
<i>YLR416C</i>	-2,42	-1,81	Unknown
<i>KIN82</i>	-2,42	-1,14	Protein amino acid phosphorylation; response to pheromone
<i>YNL058C</i>	-2,42	-0,83	Unknown
<i>YCR025C</i>	-2,41	-1,04	Unknown
<i>ECM25</i>	-2,41	-0,81	Cell wall organization and biogenesis
<i>PRR2</i>	-2,41	-1,01	MAPKKK cascade
<i>RTP1</i>	-2,39	-1,03	RNA polymerase II complex localization to nucleus
<i>PKP1</i>	-2,38	-0,78	Protein phosphorylation
<i>YGR259C</i>	-2,37	-0,85	Unknown
<i>SNQ2</i>	-2,37	-1,37	Response to singlet oxygen; response to drug
<i>YLR041W</i>	-2,37	-0,56	Unknown
<i>HDA1</i>	-2,35	-1,12	Loss of chromatin silencing during replicative cell aging
<i>TOF1</i>	-2,35	-1,90	DNA topological change
<i>FRE7</i>	-2,35	-0,75	Iron ion transport
<i>FRE1</i>	-2,34	-1,78	Copper ion import; iron ion transport
<i>IRR1</i>	-2,33	-1,61	Cytogamy; mitotic sister chromatid cohesion
<i>THR1</i>	-2,32	-0,60	Homoserine, isoleucine, methionine and threonine metabolism
<i>CCW12</i>	-2,32	-1,09	Cell wall organization ;conjugation with cellular fusion
<i>YJL206C</i>	-2,32	-1,44	Unknown
<i>CYR1</i>	-2,30	-1,14	Regulation of cell cycle; RAS protein signal transduction
<i>CRR1</i>	-2,30	-1,56	Ascospore wall assembly
<i>GON1</i>	-2,29	-1,80	Vesicle-mediated transport
<i>FMP10</i>	-2,28	-1,36	Unknown
<i>THI21</i>	-2,28	-1,35	Thiamin biosynthesis
<i>YDR102C</i>	-2,28	-1,81	Unknown
<i>DUR1,2</i>	-2,27	-0,88	Urea metabolism; allantoin catabolism
<i>YSH1</i>	-2,27	-1,95	mRNA polyadenylation; mRNA cleavage
<i>YDL211C</i>	-2,25	-1,25	Unknown
<i>OAF1</i>	-2,24	-2,19	Positive regulation of transcription; fatty acid metabolism
<i>YAR030C</i>	-2,24	-2,12	Unknown
<i>YBL009W</i>	-2,23	-1,93	Meiosis
<i>APT1</i>	-2,21	0,57	AMP biosynthesis
<i>SHH4</i>	-2,18	-2,26	Mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone

<i>FMP12</i>	-2,17	-0,47	Unknown
<i>DNF3</i>	-2,13	-0,41	Intracellular protein transport
<i>SNO4</i>	-2,13	0,88	Pyridoxine metabolism
<i>POL2</i>	-2,12	-1,37	DNA repair synthesis
<i>YLL053C</i>	-2,10	-1,83	Unknown
<i>ELA1</i>	-2,09	-1,87	RNA elongation from Pol II promoter
<i>GTT1</i>	-2,08	-0,60	Glutathione metabolism
<i>SRB2</i>	-2,06	-1,77	Transcription from Pol II promoter
<i>RDS1</i>	-2,06	-1,64	Response to xenobiotic stimulus
<i>SUL2</i>	-2,05	-0,45	Sulfate transport
<i>POL4</i>	-2,04	-1,47	Base-excision repair, gap-filling; double-strand break repair
<i>BDH1</i>	-2,04	-2,25	Butanediol fermentation
<i>HSP30</i>	-2,03	-2,08	Response to stress; protein folding
<i>UTP22</i>	-2,03	-0,24	Processing of 20S pre-rRNA
<i>HBT1</i>	-2,02	0,48	Cellular morphogenesis during conjugation with cellular fusion
<i>FRE3</i>	-2,01	-2,27	Iron ion homeostasis; iron-siderochrome transport
<i>TFS1</i>	-2,01	-1,85	Regulation of proteolysis and peptidolysis
<i>PRP21</i>	-1,99	-1,87	Nuclear mRNA splicing, via spliceosome
<i>ZUO1</i>	-1,99	-0,54	Protein folding
<i>YJR020W</i>	-1,99	-1,84	Unknown
<i>KRE34</i>	-1,97	-1,94	Unknown
<i>SEN34</i>	-1,76	-3,50	tRNA splicing
<i>FRT2</i>	-1,33	-3,41	Response to salt and alkaline stress
<i>SOR2</i>	-1,87	-3,13	Hexose metabolism
<i>YKL162C</i>	-1,56	-3,10	Unknown
<i>SIR4</i>	-1,80	-3,01	Loss of chromatin silencing during replicative cell aging
<i>GAA1</i>	-1,11	-2,79	Attachment of GPI anchor to protein
<i>GDH3</i>	-1,04	-2,73	Glutamate biosynthesis
<i>GDH1</i>	-0,97	-2,70	Glutamate biosynthesis
<i>GIP1</i>	-0,65	-2,70	Spore wall assembly
<i>TIR3</i>	-1,03	-2,66	Unknown
<i>YBR063C</i>	0,29	-2,57	Unknown
<i>AAD16</i>	-0,25	-2,53	Aldehyde metabolism
<i>PMT6</i>	-1,74	-2,43	O-linked glycosylation
<i>YDR278C</i>	-1,92	-2,32	Unknown
<i>YSP2</i>	-1,73	-2,32	Apoptotic process
<i>PHO3</i>	-5,10	-5,51	Thiamin transport
<i>YHR214W-A</i>	-4,56	-3,38	Unknown
<i>WTM1</i>	-3,79	-2,49	Regulation of meiosis
<i>YHR214W</i>	-3,72	-4,76	Unknown
<i>HEM13</i>	-3,35	-3,71	Heme biosynthesis
<i>ELO1</i>	-3,21	-2,87	Fatty acid elongation, unsaturated fatty acid
<i>YBR141C</i>	-3,15	-2,93	Unknown

<i>YAR066W</i>	-3,15	-4,49	Unknown
<i>YIL169C</i>	-3,13	-4,05	Unknown
<i>YRF1-2</i>	-2,98	-2,73	Telomerase-independent telomere maintenance
<i>GAP1</i>	-2,93	-3,88	Amino acid transport
<i>IRA1</i>	-2,90	-2,69	RAS protein signal transduction; sporulation
<i>MRS5</i>	-2,73	-3,37	Mitochondrial inner membrane protein import G2/M transition of mitotic cell cycle; G1/S transition of mitotic cell cycle
<i>CLB4</i>	-2,50	-2,74	
<i>YOL155C</i>	-2,40	-3,61	Cell wall organization and biogenesis
<i>PBY1</i>	-2,35	-2,44	Unknown
<i>RXT2</i>	-2,34	-2,91	Invasive growth; conjugation with cellular fusion
<i>MRD1</i>	-2,21	-2,34	35S primary transcript processing
<i>YCR007C</i>	-2,16	-2,78	Unknown
<i>TIR2</i>	-2,15	-2,99	Cellular response to freezing
<i>PHO11</i>	-2,10	-2,42	Phosphate-containing compound metabolic process
<i>YGR290W</i>	-1,95	-3,12	Unknown

Tabla S7. Genes sobreexpresados en *S. cerevisiae* CECT 10094 y Temohaya-26 tras una hora de estrés por etanol. Las regiones promotoras se analizaron utilizando la herramienta web RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools). Se muestra el número de lugares de unión para los factores de transcripción relacionados con varios estreses, como Msn2/4p para estrés general, Hac1p para proteínas desplegadas, Hsf1p para estrés por calor y Yap1p para estrés oxidativo. El número de elementos STRE en sus regiones promotoras, implicados en la respuesta general a estrés en levadura también fue analizado. Aquellos genes cuya sobreexpresión no se ha detectado previamente en estudios previos frente a estrés por etanol aparecen en negrita.

Gen	Función	Secuencias STRE	Sitios de union para				Ref
			Msn2/4p	Yap1	Hsf1p	Hac1p	
CECT 10094							
<i>PIN3</i>	Organización del citoesqueleto de actina	1	1	0	0	1	
<i>NCA3</i>	Síntesis de ATP	0	0	0	0	0	
<i>SPR28</i>	Organización y biogénesis de la pared celular	0	0	0	2	0	
<i>YDL124W</i>		2	2	1	2	1	1
<i>GRE3</i>	Respuesta celular a estrés oxidativo	1	1	1	0	1	1,2,3,6
<i>NCE103</i>		1	1	1	2	0	6
<i>RG11</i>	Proceso metabólico de reserva de energía	4	4	0	2	3	2,8
<i>HSP104</i>	Proteínas de choque térmico	3	3	1	8	0	1,2,3,4
<i>HSP32</i>		4	4	0	6	0	4
<i>CTR2</i>	Transporte intracelular de cobre	1	1	0	2	0	1

TABLA S7**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

CYB2	Utilización de lactato	1	1	0	0	0	
PIC2	Transporte de fosfato	1	1	0	2	0	1,2,3,6,8
PUT4	Transporte de prolina	3	3	1	2	0	
PUT1	Utilización de prolina	0	0	0	0	1	4
MPD1	Plegamiento de proteínas	0	0	0	0	0	
SRN2	Marcaje de proteínas a vacuola	0	0	0	0	0	
THI12		2	2	1	2	0	6
THI11	Síntesis de tiamina	0	0	0	2	1	
THI13		0	0	0	2	1	
YHR033W		1	1	0	0	0	
FMP12		3	3	0	0	1	2,8
YCL042W	Desconocido	0	0	0	0	0	2,6
FMP34		1	1	1	0	1	
YNL195C		0	0	4	0	1	
OLE1	Síntesis de ácidos grasos monoinsaturados	0	0	0	0	1	9
ZWF1	Desviación de las pentosas fosfato	2	2	1	0	0	4

AMBAS CEPAS

ACS1	Biosíntesis de Acetil-CoA	3	3	0	0	0	
DCS2	Metabolismo de oligonucleótidos m7G	2	2	2	0	0	6

TABLA S7**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

<i>GPM2</i>	Glicolisis	1	1	1	4	0	2,3,4
<i>HSP42</i>		3	3	0	8	0	1,2,4,8
<i>HSP12</i>		7	7	0	0	4	1,2,3,4,5,6
<i>HSP26</i>	Proteínas de choque térmico	4	4	0	2	0	1,2,3,4,6,10
<i>HSP31</i>		1	1	3	4	0	2,4,6,8
<i>HSP33</i>		4	4	0	4	0	
<i>MSC1</i>	Recombinación meiótica	2	2	0	0	0	
<i>UGA1</i>	Utilización de nitrógeno	0	0	3	0	0	2
<i>SOL4</i>	Desviación de las pentosas fosfato	1	1	0	0	0	4,6,8
<i>OPI3</i>	Biosíntesis de fosfatidilcolina	1	1	0	2	0	2,6,7
<i>CYR1</i>	Transducción de la señal de la proteína Ras	1	1	1	0	1	6
<i>TFS1</i>	Regulación de la transducción de la señal de la proteína Ras	2	2	0	0	0	6
<i>SPI1</i>	Respuesta a bajo pH	3	3	0	2	1	2,6,8
<i>MRP8</i>		1	1	1	0	0	
<i>SNO4</i>		4	4	0	6	0	
<i>YMR090W</i>	Desconocido	1	1	1	0	1	6
<i>YML131W</i>		1	1	1	2	0	6
<i>YNL134C</i>		2	2	2	0	0	2,6

Temohaya-26

TABLA S7**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

CAK1	Ciclo celular	1	1	0	0	0	
ECM4	Organización y biogénesis de la pared celular	2	2	3	2	0	
PIR3		1	1	0	0	0	3,6
HBT1	Morfogénesis celular	2	2	0	0	0	
GCY1	Respuesta a estrés oxidativo	1	1	0	2	1	4
SFA1	Metabolismo del formaldehído	1	1	0	2	1	4
GUT2	Metabolismo del glicerol	1	1	0	2	0	6
STR3	Biosíntesis de metionina	1	1	0	0	1	3
TKL2	Ciclo de las pentosas fosfato	2	2	2	1	2	
SSE2	Plegamiento de proteínas	1	1	1	2	0	2,3
RCK1	Regulación de la meiosis	2	2	2	4	1	
SIP18	Respuesta a estrés osmótico	3	3	0	2	0	6
DDR2	Respuesta a estrés	4	4	0	2	0	2,3,6
ALD3		2	2	2	0	0	8
GRE1		0	0	0	0	0	
RTC3	Proceso metabólico del RNA	2	2	1	0	0	6,8
SGA1	Esporulación	5	5	0	0	1	
SPS100		3	3	2	2	0	6
FMP16	Desconocido	1	1	1	0	0	8
OM45		3	3	1	4	3	2,8
RTN2		1	1	1	2	0	8

TABLA S7**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

SPG4		1	1	1	2	0	
UIP4		3	3	0	0	0	
BDH2		2	2	0	4	0	
DSF1		1	1	0	2	0	
NQM1		3	3	0	0	0	4
YGR066C		1	1	0	0	0	
YNR073C		0	0	0	0	0	
YRO2		1	1	2	0	0	2,3,6
PEP4	Catabolismo vacuolar de proteínas	1	1	0	0	0	6
YHR138C	Fusión de vacuolas	1	1	0	0	0	

- 1 Alexandre *et al.* 2001
- 2 Fujita *et al.* 2004
- 3 Chandler *et al.* 2004
- 4 Stanley *et al.* 2010
- 5 Ma and Liu 2010
- 6 Yang, J. 2011
- 7 Teixeira *et al.* 2009
- 8 Ogawa *et al.* 2000
- 9 Shobayashi M *et al.* 2007
- 10 Marks, VD *et al.* 2008

Tabla S8. Enriquecimiento de categorías funcionales de genes reprimidos tras una hora de estrés por etanol en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26. Las categorías GO se analizaron utilizando la herramienta web GO-TermFinder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>), empleándose una corrección por Bonferroni y un p-valor de 0,05. Los términos redundantes se eliminaron utilizando el servidor web REViGO (<http://revigo.irb.hr/>).

Proceso Biológico	P-valor	Genes reprimidos	Genes que componen la GO
Cepa CECT 10094			
Traducción citoplasmática	6,16e-61	51	171
Procesos metabólicos	1,05e-05	75	4399
Procesos celulares	0,033	76	5180
Biogénesis de la subunidad menor ribosomal	8,81e-16	21	137
Transporte de RNA	3,69e-09	8	18
Procesos biosintéticos	1,35e-16	68	2362
Procesos metabólicos primarios	1,19e-08	74	3835
Procesos metabólicos de macromoléculas	1,13e-07	66	3183
Procesos metabólicos celulares	1,24e-07	74	3983
Procesos metabólicos de sustancias orgánicas	1,88e-07	74	4010
Procesos metabólicos del RNA	2,67e-10	24	348
Procesos biosintéticos de ribonucleósidos	0,0255	3	5
Expresión génica	1,09e-16	61	1829
Procesos biosintéticos celulares	1,80e-16	67	2292
Proceso metabólico de proteínas	3,18e-16	60	1797
Exportación nuclear	0.0376	8	126
Proceso metabólico de macromoléculas	1,56e-08	66	3065
Cepa Temohaya-26			
Traducción citoplasmática			
Transporte de RNA	0,0041	4	18
Procesos biosintéticos	2,32e-13	54	2332
Procesos metabólicos de macromoléculas	2,47e-05	51	3183
	353		
Procesos metabólicos primarios	0,0007	54	3835
Procesos metabólicos celulares	0,0031	54	3983

Procesos metabólicos de sustancias orgánicas	0,0040	54	4010
Proceso metabólico de proteínas	3,70e-15	50	1797
Expresión génica	8,20e-15	50	1829
Regulación de la elongación traduccional	0,0022	5	32
Procesos biosintéticos de macromoléculas	4,54e-16	51	1802

Tabla S9. Genes sobreexpresados en *S. cerevisiae* CECT 10094 y Temohaya-26 en fase diaúxica en presencia de etanol. Las regiones promotoras se analizaron utilizando la herramienta web RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools). Se muestra el número de lugares de unión para los factores de transcripción relacionados con varios estreses, como Msn2/4p para estrés general, Hac1p para proteínas desplegadas, Hsf1p para estrés por calor y Yap1p para estrés oxidativo. El número de elementos STRE en sus regiones promotoras, implicados en la respuesta general a estrés en levadura también fue analizado. Aquellos genes cuya sobreexpresión no se ha detectado previamente en estudios previos frente a estrés por etanol aparecen en negrita.

Gen	Función	Secuencias	Lugares de unión para				Referencia
		STRE	Msn2/4p	Yap1	Hsf1p	Hac1p	
CECT 10094							
<i>HLJ1</i>	Catabolismo de proteínas asociado al RE	0	0	0	5	2	
<i>FCF2</i>	Procesamiento del 35S rRNA	1	1	0	0	0	
<i>RDI1</i>	Organización del citoesqueleto de actina	0	0	0	0	0	
<i>RHO1</i>		1	1	1	0	2	
<i>RIP1</i>	Respiración aeróbica	0	0	0	0	0	
<i>MIC17</i>		0	0	0	0	1	
<i>AAD15</i>	Metabolismo del aldehído	0	0	3	0	0	
<i>OYE3</i>	Apoptosis	0	0	3	0	0	1
<i>CAR2</i>	Catabolismo de la arginina	1	1	0	0	0	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

<i>ARG1</i>	Síntesis de arginina	0	0	3	0	1	3
<i>ATP1</i>		1	1	0	0	0	
<i>ATP3</i>		0	0	1	2	1	
<i>ATP4</i>	Síntesis de ATP	0	0	0	2	0	
<i>ATP7</i>		0	0	3	0	0	
<i>ATP20</i>		0	0	1	0	0	
<i>CLN1</i>		1	1	0	0	3	
<i>FAR10</i>	Ciclo celular	1	1	1	4	1	
<i>PCL5</i>		1	1	3	2	0	2,6
<i>SCM4</i>		0	0	1	2	0	
<i>HHF1</i>	Estructura de la cromatina	1	1	0	0	0	
<i>PAA1</i>		0	0	1	0	0	
<i>CYS4</i>	Biosíntesis de cisteína	1	1	2	0	0	
<i>RVS161</i>	Citoesqueleto	1	1	0	0	1	
<i>ARF1</i>		0	0	2	2	0	
<i>ARF2</i>	Transporte del RE a Golgi	1	1	2	0	0	6
<i>BUG1</i>		0	0	0	0	1	
<i>ERP2</i>		0	0	1	2	1	
<i>ERG20</i>	Biosíntesis de ergosterol	1	1	0	0	0	
<i>ERG5</i>		1	1	2	0	0	
<i>SFA1</i>	A asimilación de formaldehído	1	1	0	2	1	4

TABLA S9
TABLAS SUPLEMENTARIAS

GTF1	Biosíntesis de Glutaminil-tRNAGln	0	0	0	0	1	
GCV1	Catabolismo de la glicina	0	0	0	0	1	3
HSP104		3	3	1	4	0	1,2,3,4
HSP31	Proteína de choque térmico	1	1	2	4	0	2,4,6,8
HSP82		2	2	0	4	0	1,3,4,6
RTG2	Transducción de la señal intracelular	0	0	2	0	0	
DRE2	Ensamblaje del cluster hierro-azufre	0	0	5	4	0	
FAT1	Transporte de ácidos grasos de cadena larga	0	0	0	0	0	
TOM20	Marcaje de proteína mitocondrial	0	0	0	0	0	
YDJ1		1	1	0	3	1	
QCR7	Transporte mitocondrial de electrones	0	0	1	2	0	
PUF3	Organización de la mitocondria	0	0	0	4	0	
DBP5	Exportación de mRNA	0	0	1	0	0	
SUB2		0	0	1	2	0	
BFR1	Metabolismo del mRNA	1	1	0	0	0	
NPT1	Biosíntesis de NAD	0	0	1	0	0	
ROX1	Represión de la expresión de genes de hipoxia	2	2	1	4	0	
COX5A		0	0	0	0	0	
COX6	Fosforilación oxidativa	0	0	0	0	0	
CYT1		1	1	0	0	0	
QCR6		1	1	0	0	1	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

ARI1	Actividad oxidoreductasa	2	2	0	2	2	
CHO2	Biosíntesis de fosfatidilcolina	1	1	1	3	0	6
KNS1	Fosforilación de proteínas	2	2	1	2	2	
CDC34		0	0	5	0	1	6
PRE1		0	0	0	2	0	
PRE4		1	1	0	0	1	
PRE6		0	0	0	2	0	
PRE7		1	1	0	0	0	
PUP2		0	0	1	6	0	
RPN12		0	0	0	0	2	
RPN5		1	1	0	0	0	
RPN8	Degradación de proteínas	0	0	2	0	0	
RPT4		1	1	0	0	0	
RPT5		0	0	0	2	0	
SCL1		0	0	0	0	0	6
UBC1		1	1	0	0	0	
ERO1		0	0	2	1	0	1,6
LHS1	Plegamiento de proteínas	0	0	0	0	1	1
SBA1		1	1	1	4	0	
SSE2		1	1	1	2	0	2,3
PHB2		1	1	1	0	0	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

EFB1		2	2	6	0	0	
GCD6		0	0	0	2	0	
HCR1		0	0	0	2	1	
MRPL16		0	0	0	0	1	
MRPL20		0	0	0	0	0	
MRPL24		0	0	2	2	0	
PET123	Síntesis de proteínas	0	0	1	2	0	
RLP24		0	0	0	0	0	
RPL26B		0	0	1	2	0	
RPS10A		2	2	0	0	1	
RPS18B		1	1	1	4	0	
SUI1		0	0	1	0	2	
SUI3		0	0	1	4	1	
TIF11		0	0	1	0	0	
MAP2	Proteólisis y peptidólisis	0	0	0	0	0	
ADE4	Biosíntesis de purinas	0	0	0	0	0	
RAS2	Ruta RAS	0	0	0	0	0	
AHP1	Homeostasis REDOX	3	3	2	2	0	1,6
PFK27	Regulación de la glicólisis	0	0	0	0	1	
CUP1-1	Eliminación de radicales superóxido	0	0	0	2	2	6
MCR1	Respuesta a estrés oxidativo; síntesis de ergosterol	2	2	0	0	1	1,2

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

<i>AHA1</i>	Respuesta a estrés; plegamiento de proteínas	0	0	0	6	0	6
<i>GET3</i>	Transporte mediado por vesicular; Golgi a RE	0	0	0	0	1	
<i>RIB5</i>	Biosíntesis de riboflavina	0	0	2	0	0	6
<i>JIP5</i>		0	0	0	0	1	
<i>MRT4</i>	Síntesis de ribosomas	1	1	0	2	0	
<i>NOP15</i>		0	0	0	0	0	
<i>RRS1</i>		0	0	2	0	0	
<i>SOF1</i>	Procesado de rRNA	0	0	0	0	0	
<i>HAL1</i>		1	1	1	2	2	
<i>SAT4</i>	Tolerancia a sal	0	0	1	0	1	
<i>SSS1</i>	Secreción	0	0	0	0	0	
<i>SER3</i>	Síntesis de aminoácidos de la familia serina	1	1	5	4	2	3
<i>HST1</i>	Silenciamiento	0	0	0	0	0	
<i>SAS3</i>		0	0	0	2	0	
<i>LCB2</i>	Biosíntesis de esfingolípidos	0	0	0	2	0	
<i>CYB5</i>	Biosíntesis de esterol	0	0	1	2	1	
<i>NSG2</i>		1	1	1	0	1	
<i>CIT1</i>	Ciclo CAT	3	3	2	2	0	1,3
<i>DST1</i>		0	0	1	2	0	
<i>HAP4</i>	Transcripción	0	0	0	0	1	
<i>RPC82</i>		0	0	0	1	0	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

SPT15		1	1	1	0	0
SUA7		0	0	0	0	1
TAE2	Traducción	0	0	0	2	0
TPO2	Transporte	0	0	0	2	1
YAR009C		0	0	1	0	0
YAR010C		0	0	0	2	0
YBL005W-A		0	0	1	0	1
YBL101W-A		0	0	0	0	1
YBR012W-A		0	0	1	0	0
YCL020W	Transposición de elementos Ty	0	0	0	2	0
YJR026W		0	0	0	0	0
YJR028W		0	0	0	0	0
YML040W		1	1	1	0	1
YML045W		0	0	0	0	0
YMR046C		0	0	1	0	1
YMR051C		2	2	0	0	0
BSC1		2	2	1	2	0
BUD19		0	0	1	2	1
DOS2	Desconocido	0	0	0	0	0
MRH1		0	0	0	2	0
YBL036C		0	0	1	0	1

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

YBR025C		0	0	0	5	1	
YBR053C		1	1	3	0	0	
NSI1		0	0	0	0	1	
YDR210W		0	0	0	2	0	
YDR366C		0	0	0	0	0	
YCR016W		0	0	0	0	0	
YKR023W		0	0	0	0	0	
YET1		2	2	1	0	0	
YGR207C		0	0	0	2	0	6
YIL060W		1	1	0	0	0	
YLR297W		0	0	2	2	0	6
YML131W		1	1	1	2	0	6
YMR090W		1	1	1	0	1	6
YOR052C		1	1	0	0	1	6
YPL225W		1	1	0	0	0	
YPR148C		0	0	0	5	0	
YPR158W		0	0	3	4	0	
OLA1		0	0	0	5	1	
YNL143C	Resistencia al furfural	0	0	1	0	1	
YRO2	Tolerancia a ácido acético	1	1	2	0	0	2,3,6
VMA10	Acidificación vacuolar	0	0	0	0	1	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

<i>VMA8</i>		0	0	1	0	0	7
<i>VPS4</i>	Marcaje de proteínas vacuolares	0	0	0	0	1	
AMBAS CEPAS							
<i>BAP2</i>	Transporte de aminoácidos	0	0	1	0	1	
<i>TAT1</i>		0	0	0	0	0	
<i>CPA1</i>	Biosíntesis de arginina	0	0	0	0	0	3
<i>NCA3</i>	Síntesis de ATP	0	0	0	0	0	
<i>YGP1</i>	Biogénesis y organización de la pared celular	1	1	1	2	0	1,2,6
<i>ECM4</i>		2	2	3	2	0	
<i>NDE1</i>	Fermentación de etanol; oxidación del NADH	1	1	0	0	0	
<i>CYC1</i>	Transporte de electrones mitocondrial	0	0	0	0	0	
<i>RPL24A</i>	Síntesis de proteínas	0	0	1	0	1	
<i>MRP13</i>		0	0	1	0	0	
<i>HPT1</i>	Biosíntesis de purinas	1	1	0	3	1	
<i>TRR1</i>	Homeostasis REDOX	0	0	2	0	1	
<i>SGT2</i>	Respuesta a calor	0	0	2	5	0	6
<i>HSC82</i>		0	0	0	5	0	3
<i>YHB1</i>	Respuesta a estrés	0	0	2	0	2	3
<i>MSN4</i>		0	0	0	2	4	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

MUP1	Transporte de aminoácidos azufrados	1	1	2	0	1	
PIC2	Transporte transmembrana	1	1	0	2	0	1,2,3,6,8
YOR338W	Desconocido	0	0	1	2	0	
Temohaya-26							
ADH6	Proceso metabólico del alcohol	0	0	1	0	0	
CTR3	Importe de cobre	0	0	0	0	0	
GUA1	Biosíntesis de GMP	1	1	0	0	1	
IMD4		0	0	1	0	0	
HSP12	Proteína de choque térmico	7	7	0	0	4	1,2,3,4,5,6,8
ISU1	Homeostasis del hierro	1	1	2	0	0	6
ILV5	Biosíntesis de valina e isoleucina	1	1	2	0	3	
SAM1	Metabolismo de la metionina	0	0	2	0	0	
SNU13	Splicing de mRNA	1	1	0	0	1	
SHM2	Proceso metabólico de un carbono	0	0	0	0	0	
FMP48	Fosforilación de proteínas	2	2	1	2	0	
RPS1B	Síntesis proteica	0	0	2	2	2	
RPL12A		0	0	0	2	4	
FCY2	Transporte de purinas	0	0	1	0	0	
URA5	Biosíntesis de pirimidina	0	0	1	0	0	

TABLA S9**TABLAS SUPLEMENTARIAS**

RCK1	Regulación de la meiosis	2	2	2	4	1
ARB1	Biogénesis de ribosomas	3	3	1	2	0
PNO1	Procesado de RNA	0	0	1	0	0
NSR1		0	0	0	0	0
UBX6	Esporulación	2	2	0	0	1
DIT1		4	4	3	2	0
MET31	Metabolismo de aminoácidos azufrados	0	0	0	0	0
YKL071W	Desconocido	0	0	6	0	0
TMA46		0	0	2	2	1
YKR075C		2	2	2	0	1
YNR014W		4	4	2	4	1
FUI1		Transporte de uridina	1	1	0	0
IZH3	Homeostasis del zinc	0	0	0	0	1

1 Alexandre *et al.* 2001

2 Fujita *et al.* 2004

3 Chandler *et al.* 2004

4 Stanley *et al.* 2010

5 Ma and Liu 2010

6 Yang, J. 2011

7 Teixeira *et al.* 2009

- 8 Ogawa *et al.* 2000
- 9 Shobayashi M *et al.* 2007
- 10 Marks, VD *et al.* 2008

Tabla S10. Enriquecimiento de categorías funcionales de genes reprimidos en fase diaúxica en presencia de etanol en las cepas CECT 10094 y Temohaya-26. Las categorías GO se analizaron utilizando la herramienta web GO-TermFinder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>), empleándose una corrección por Bonferroni y un p-valor de 0,05. Los términos redundantes se eliminaron utilizando el servidor web REViGO (<http://revigo.irb.hr/>).

Proceso Biológico	p-valor	Genes reprimidos	Genes que componen la GO
Cepa CECT 10094			
Biosíntesis de valina	0,0247	4	6
Procesos de óxido-reducción	0,0294	34	437
Cepa Temohaya-26			
Ciclo de asimilación del amonio	0,0207	2	3

Tabla S11. Equivalencias entre letras y su aminoácido correspondiente.

Aminoácido	Abreviatura	Símbolo	Propiedad
Histidina	His	H	Básico
Arginina	Arg	R	Básico
Lisina	Lys	K	Básico
Isoleucina	Ile	I	Apolar (hidrofóbico)
Fenilalanina	Phe	F	Apolar (hidrofóbico)
Leucina	Leu	L	Apolar (hidrofóbico)
Triptófano	Trp	W	Apolar (hidrofóbico)
Alanina	Ala	A	Apolar (hidrofóbico)
Metionina	Met	M	Apolar (hidrofóbico)
Prolina	Pro	P	Apolar (hidrofóbico)
Valina	Val	V	Apolar (hidrofóbico)
Asparagina	Asn	N	Polar (sin carga)
Cisteína	Cys	C	Polar (sin carga)
Glicina	Gly	G	Polar (sin carga)
Serina	Ser	S	Polar (sin carga)
Glutamina	Gln	Q	Polar (sin carga)
Tirosina	Tyr	Y	Polar (sin carga)
Treonina	Thr	T	Polar (sin carga)
Asparagina	Asp	D	Ácido
Ácido Glutámico	Glu	E	Ácido

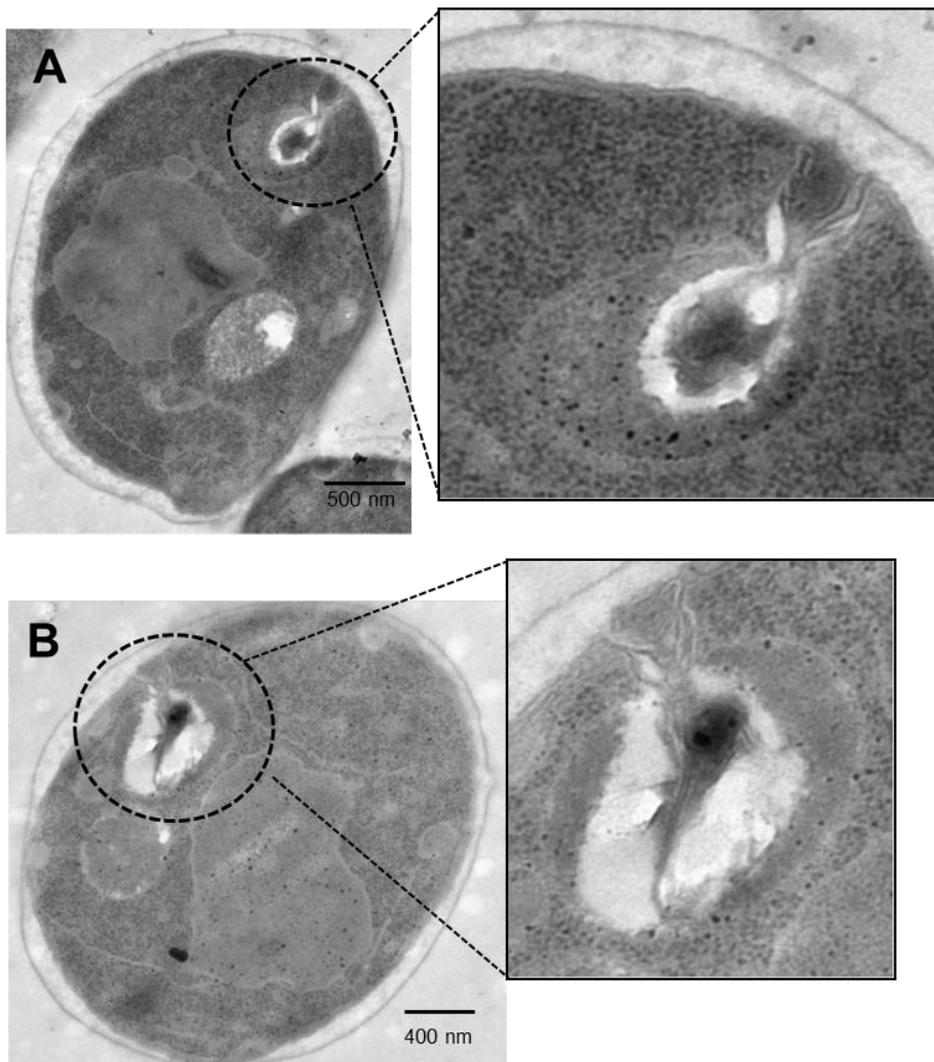


Figura S1. El estrés en RE induce la autofagia del RE. (A-B) Micrografías electrónicas de la cepa BY4741 tras 6 horas de estrés por DTT (1mM). Nótese la inmersión del RE por la membrana vacuolar y la invaginación de la misma durante el proceso.

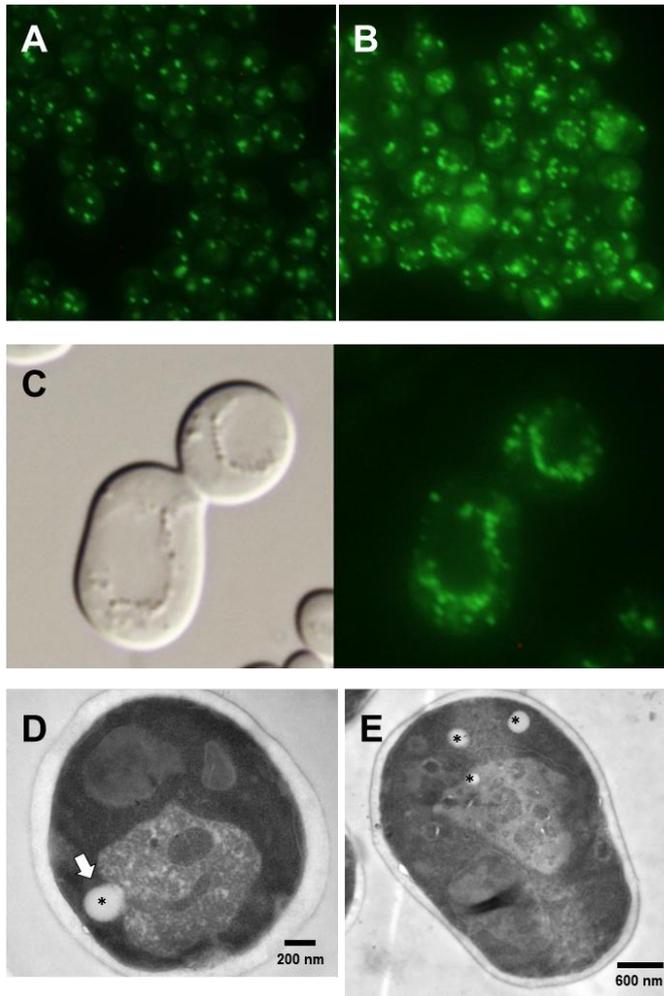


Figura S2. Aumento en la cantidad de gotas lipídicas (LD) en *Saccharomyces cerevisiae* tras estrés por etanol. La observación de los LD mediante microscopía de fluorescencia se llevó a cabo mediante tinción in vivo con rojo Nilo en la cepa BY4741 en ausencia (A) y presencia de un 8% de etanol tras tres horas de crecimiento (B). Detalle de los LD de una célula tras estrés por etanol (C), nótese los LD alrededor de la vacuola, llegando algunos de ellos a penetrar dentro. Microfotografías tomadas por TEM de la entrada de un LD en la vacuola a través de la invaginación de la membrana vacuolar (D) y libres en el citoplasma, tras estrés por etanol (E). Los LD aparecen marcados con un asterisco.

