

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOL·LECULAR

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LAS LEVADURAS A
LAS CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO Y AUSENCIA
DE NITRÓGENO DURANTE LA VINIFICACIÓN.

ELENA JIMÉNEZ MARTÍ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 13 de setembre de 2010 davant un tribunal format per:

- Dra. Concepción Gil García
- Dra. Paula Alepuz Martínez
- Dr. Ramón González García
- Dra. Alexandra Mendes Ferreira
- Dr. Francisco Estruch Ros

Va ser dirigida per:
Dr. Marcel·lí del Olmo Muñoz

©Copyright: Servei de Publicacions
Elena Jiménez Martí

Dipòsit legal: V-3369-2011
I.S.B.N.: 978-84-370-7995-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Arts Gràfiques, 13 baix
46010 València
Spain
Telèfon:(0034)963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis de la respuesta de las levaduras a las
condiciones de estrés osmótico y ausencia de nitrógeno
durante la vinificación.**

Memoria presentada por
Elena Jiménez Martí
para optar al grado de Doctor
por la Universitat de València.

MARCEL·LÍ DEL OLMO MUÑOZ, Doctor en Ciencias Biológicas del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

INFORMA que Elena Jiménez Martí, Licenciada en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título "Análisis de la respuesta de las levaduras a las condiciones de estrés osmótico y por ausencia de nitrógeno durante la vinificación" presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat de València.

Burjassot, Abril de 2010

Dr. Marcel·lí del Olmo Muñoz

“No existen conocimientos más elevados
o más bajos, sino un conocimiento único
que emana de la experimentación”

Leonardo Da Vinci

Índice

Abreviaturas	12
Introducción	16
1. La producción del vino	17
1.1. Las levaduras vínicas	17
1.2. Criterios de selección de las levaduras vínicas	19
1.3. Bioquímica de la fermentación alcohólica	20
1.3.1. Metabolismo de azúcares	20
1.3.2. Metabolismo de nitrógeno	23
1.3.3. Relación entre el metabolismo de las levaduras y las propiedades organolépticas del vino	26
1.4. Etapas durante la producción del vino	28
1.5. Condiciones de estrés asociadas a las diferentes etapas de producción del vino	30
2. Mecanismos de respuesta a estrés en la levadura <i>S. cerevisiae</i>	31
2.1. La respuesta general a estrés y la respuesta particular a diferentes formas de estrés	32
2.2. La respuesta a estrés osmótico	34
2.3. La respuesta a la disponibilidad de nutrientes	42
2.4. La respuesta a estrés durante la fermentación alcohólica	48
3. Manipulaciones genéticas en levaduras vínicas	57
3.1. Características genéticas de las levaduras vínicas	57
3.2. Relevancias de las manipulaciones genéticas en levaduras vínicas	58
3.3. Descripción de manipulaciones genéticas relacionadas con la respuesta a estrés	63
Objetivos	66
Materiales y métodos	69
1. Materiales	70
1.1. Plásmidos	70
1.2. Oligonucleótidos	70
1.3. Micromatrices	77
1.4. Cepas	78
1.4.1. <i>Escherichia coli</i>	78
1.4.2. Levaduras	79
1.4.2.1. Levaduras de laboratorio	79
1.4.2.2. Levaduras vínicas	81

2. Métodos	82
2.1. Medios y condiciones de cultivo	82
2.1.1. Bacterias	82
2.1.2. Levaduras	83
2.1.2.1. Medios generales y condiciones de incubación	83
2.1.2.2. Mostos, condiciones de inoculación e incubación	84
2.1.2.3. Experimentos de sensibilidad a estrés	87
2.2. Manipulación de microorganismos	88
2.2.1. Transformación de <i>E. coli</i>	88
2.2.2. Transformación de levaduras	89
2.2.3. Construcción de cepas	90
2.3. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	93
2.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	93
2.3.2. Aislamiento de DNA genómico de levadura	93
2.3.3. Aislamiento de DNA a partir de geles de agarosa	94
2.3.4. Construcción de plásmidos	94
2.3.5. Aislamiento de RNA	94
2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT)	95
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	95
2.4.2. Transcripción reversa (RT)	96
2.4.3. RT-PCR semicuantitativa	96
2.4.4. RT-PCR en tiempo real	97
2.5. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis	97
2.5.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	98
2.5.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón TAE	98
2.5.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón MOPS	98
2.6. Transferencia de RNA a membranas de nylon	99
2.7. <i>Slot-blot</i> de RNA	100
2.8. Marcaje radiactivo de DNA	100
2.9. Hibridación de ácidos nucleicos y autorradiografía	101
2.10. Hibridación <i>in situ</i> de RNA poliadenilado	102
2.11. Métodos de manipulación y análisis de proteínas	104

2.11.1. Obtención de extractos proteicos	104
2.11.2. Determinación cuantitativa de proteínas	105
2.11.2.1. Método de Bradford	105
2.11.2.2. Método de <i>RD/DC</i> de Bio-Rad	105
2.11.3. Electroforesis en SDS-PAGE e inmunodetección	106
2.11.4. Electroforesis bidimensional analítica en gel de poliacrilamida. Tecnología 2D-DIGE	108
2.11.4.1. Marcaje de proteínas con <i>Cydye DIGE fluor minimal dyes</i>	109
2.11.4.2. Primera y segunda dimensión	109
2.11.5. Electroforesis bidimensional micropreparativa en gel de poliacrilamida (2D-PAGE)	111
2.11.6. Tinción de proteínas	112
2.11.7. Análisis informático de los geles	112
2.11.7.1. Visualización de los geles	112
2.11.7.2. Análisis de imagen	113
2.11.7.3. Análisis multivariante	114
2.11.8. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	115
2.11.8.1. Preparación de la muestra. Desteñido, reducción, alquilación, digestión proteolítica y extracción de péptidos de geles de poliacrilamida	115
2.11.8.2. Identificación mediante espectrometría de masas tipo <i>MALDI-TOF</i> y <i>MALDI- TOF/TOF</i>	116
2.11.9. Análisis de localización de proteínas mediante microscopía de fluorescencia	118
2.12. Determinación de la actividad arginasa	119
2.13. Determinación de metabolitos	120
2.13.1. Azúcares reductores	120
2.13.2. Etanol	121
2.13.3. Nitrógeno asimilable	121
2.13.4. Amonio	122
2.13.5. Glicerol intracelular	122
2.14. Métodos de extracción y análisis de compuestos volátiles	123
2.14.1. Extracción de compuestos volátiles	123

2.14.2. Análisis de compuestos volátiles	124
2.15. Análisis estadístico de los datos	125
2.16 Bases de datos utilizadas	125
Resultados	127
<u>Capítulo 1. Estudio de la respuesta de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente al estrés causado por deficiencias de nitrógeno</u>	129
1. Comportamiento fermentativo de la cepa vínica comercial ICV16 bajo diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno	131
2. Evolución de la actividad arginasa durante la vinificación	136
3. Expresión génica en vinificaciones llevadas a cabo bajo condiciones de limitación y adición de nitrógeno	140
3.1. Genes relacionados con estrés	141
3.2. Genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno	144
3.3. Genes relacionados con el metabolismo glicolítico	146
3.4. Otros genes candidatos a ser marcadores de limitación de nitrógeno en vinificación	147
4. Comparación transcriptómica global del efecto de la adición de diferentes fuentes nitrogenadas	149
4.1. Genes más expresados tras la adición de amonio	150
4.2. Genes más expresados tras la adición de aminoácidos	156
4.3. Validación de los resultados mediante RT-PCR	160
4.4. Regulación transcripcional de los genes inducidos por amonio o por aminoácidos	163
4.5. Importancia de la proteína codificada por el gen <i>YBR147W</i> para el óptimo crecimiento en medio sintético	166
5. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno añadida a vinificaciones limitantes en los niveles de algunos compuestos implicados en propiedades organolépticas	169
6. Discusión	172
<u>Capítulo 2. Estudio de la respuesta de la levadura <i>S. cerevisiae</i> frente al estrés causado por elevadas concentraciones de azúcar</u>	180
1. Descripción general de la respuesta transcriptómica	

global a elevadas concentraciones de glucosa	182
1.1. Genes más expresados en 20% de glucosa	182
1.2. Genes más expresados en 2% de glucosa	184
1.3. Validación de los resultados obtenidos en los análisis de micromatrices	188
1.4. Influencia de la fase de crecimiento de las levaduras en la respuesta al estrés osmótico producido por elevadas concentraciones de azúcar	189
1.5. Influencia de la naturaleza de los azúcares que determinan el estrés osmótico en la respuesta al mismo	192
2. Implicación de las rutas de transducción de señales relacionadas con la respuesta a estrés en condiciones de elevadas concentraciones de glucosa	194
2.1. Estudio del crecimiento de los mutantes en YP20	194
2.2. Análisis de la expresión de los genes <i>GPD1</i> y <i>HSP104</i> en mutantes en rutas de transducción de señales en altas concentración de glucosa	195
2.2.1. Ruta HOG	195
2.2.2. Ruta TOR	197
2.2.3. Ruta PKA	201
2.2.4. Mecanismo FGM	203
2.2.5. Ruta de la quinasa de 3-fosfatidilinositol (PI(3)P)	204
3. Estudio de algunos genes de función desconocida con mayor expresión tras 1 hora en 20% de glucosa que en 2% de glucosa	205
3.1. Validación de los resultados obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real	205
3.2. Importancia de estos genes en el crecimiento en elevadas concentraciones de glucosa	206
3.3. Estudio de <i>YHR087W</i>	209
3.3.1. Estudio de la respuesta del mutante $\Delta yhr087w$ frente a otras condiciones de estrés	210
3.3.2. Expresión de Yhr087wp en presencia de elevadas concentraciones de glucosa	211
3.3.3. Localización de la proteína Yhr087wp en condiciones de estrés osmótico por elevadas concentraciones de glucosa	212

3.3.4. Análisis proteómico comparativo entre <i>Δyhr087w</i> y BY4742 en YP20	213
3.3.5. Estudio de la respuesta transcripcional del mutante <i>Δyhr087w</i> en 20% de glucosa	219
3.3.6. Análisis de la implicación de Yhr087wp en la exportación de mRNAs en <i>S. cerevisiae</i>	221
4. Discusión	222
<u>Capítulo 3. Relevancia de la respuesta al estrés osmótico en la adaptación de las levaduras a las condiciones de vinificación</u>	232
1. Estudio de las diferencias transcripcionales entre una cepa de laboratorio y una cepa vínica adaptada al crecimiento en medios con elevadas concentraciones de glucosa	234
1.1. Genes más expresados en la cepa ICV16 que en la W303 diploide	235
1.2. Genes más expresados en la cepa W303 diploide que en la ICV16	238
1.3. Validación de los resultados obtenidos en los análisis de las micromatrices	240
2. Relevancia de la expresión de los genes implicados en la captación y metabolismo del glicerol en el comportamiento de las cepas de levadura al comienzo de la vinificación	241
3. Relevancia del contenido de glicerol en las levaduras vínicas en la adaptación al crecimiento en el mosto	246
4. ¿Es posible la pre-adaptación de las levaduras vínicas a las condiciones de estrés osmótico presentes al inicio de la vinificación?	248
5. Discusión	251
<u>Capítulo 4. Mejora del comportamiento fermentativo de cepas vínicas en condiciones de vinificación a través de manipulaciones genéticas de los genes de respuesta a estrés <i>HSP26</i> e <i>YHR087W</i></u>	254
1. Selección de cepas, genes y estrategias para los experimentos de manipulación genética	256
2. Construcción de cepas vínicas manipuladas genéticamente	257
3. Efecto de la introducción de <i>HSP26</i> o <i>YHR087W</i> en un plásmido multicopia bajo el control de su propio promotor	261

5. Efecto de la introducción de <i>HSP26</i> o <i>YHR087W</i> en un plásmido centromérico bajo el control de su propio promotor	265
6. Efecto de la sustitución del promotor de los genes <i>HSP26</i> o <i>YHR087W</i> por el del gen <i>SPI1</i> en alguna de sus copias genómicas	267
7. Efecto de la sustitución del promotor del gen <i>YHR087W</i> por el del gen <i>PGK1</i> en alguna de sus copias genómicas	270
8. Discusión	271
Discusión general	277
Conclusiones	286
Bibliografía	290
Anexos	333

Abreviaturas

ACN: acetonitrilo
ADH: alcohol deshidrogenasa
ADP: adenosina difosfato
ATP: adenosina trifosfato
BSA: seroalbúmina bovina
°C: grado centígrado
cAMP: AMP cíclico
cDNA: *complementary DNA* (ADN complementario)
CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CDRE: elemento de respuesta dependiente de calcineurina
CRE: elemento de respuesta a cAMP
Cy2/3/5: *cyanine Dye2/ 3/5* (fluoróforo)
DAP: fosfato de diamonio
DAPI: diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
dCTP: desoxicitosina trifosfato
DiGE: *Difference Gel Electrophoresis*
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNS: ácido dinitro-3,5-salicílico
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
dpm: desintegraciones por minuto
DTE: ditioeritrol
DTT: 1,4-ditiotreitrol
EDTA: ácido etileno diamino tetra-acético
ESR: respuesta a estrés ambiental
FGM: inducido por medio de crecimiento fermentable
FSR: respuesta a estrés fermentativo
GC: gases-masas (instrumento)
GFP: *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)
GDH: glutamato deshidrogenasa
GO: *gene ontology*(ontología génica)

- GRAS:** generalmente reconocido como seguro (organismo)
- HA:** hemaglutinina
- HEPES:** (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HOG:** *high osmolarity glycerol* (alta osmolaridad por glicerol)
- IP:** inmunoprecipitado
- Kb:** kilobase
- KDa:** kilodalton
- LB:** medio *Luria-Bertani*
- LSA:** levadura seca activa
- min:** minutos
- mRNA:** RNA mensajero
- MALDI-TOF:** *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight* (Desabsorción/Ionización por láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo)
- MAPK:** MAP quinasa
- NAD⁺:** dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
- NADH:** dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
- NADP⁺:** fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
- NADPH:** fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
- MOPS:** ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
- NCR:** nitrogen catabolite repression (represión por catabolito de nitrógeno)
- OD₆₀₀:** *optical density* (densidad óptica a 600nm)
- ORF:** *open reading frame* (pauta abierta de lectura)
- PCR:** *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- pb:** par de bases
- PEG:** polietilenglicol
- P_i:** fosfato inorgánico
- PKA:** proteína quinasa A

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
poli(A)⁺: poliadenilado
PP_i: pirofosfato
p/v: peso/volumen
PVP: polivinil pirrolidona
RC/DC: *Reducing agent Compatible* / *Detergent Compatible*
RNA: ácido ribonucleico
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
rRNA: RNA ribosómico
RT: retrotranscripción
SC: *synthetic complete medium* (medio mínimo completo)
SCSIE: *Servei Central de Suport a la Investigació Experimental*
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SGD: *Saccharomyces Genome Database*
STRE: elemento de respuesta a estrés
TAE: tris-acetato sódico EDTA (tampón)
TAG: triacilgliceroles
TBE: tris-borato EDTA (tampón)
TEMED: N, N, N', N', tetrametiletileno-diamino
TFA: ácido trifluoroacético
TOR: **t**arget **o**f rapamicyn (diana de rapamicina)
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
UV: ultravioleta
v/v: volumen/volumen
WB: *Western blot*
WT: *Wild type* (cepa silvestre)
YPD: *yeast extract peptone dextrose medium* (medio rico con extracto de levadura, bactopectona y glucosa)

Introducción

1. La producción del vino.

La producción del vino es un proceso biotecnológico, de gran importancia a nivel industrial en muchas regiones del mundo, en el cual la levadura *Saccharomyces cerevisiae* juega un papel fundamental. Este proceso consta de diferentes etapas siendo la fermentación alcohólica una de las principales. Actualmente, comienza con la producción industrial de las levaduras secas activas a partir de cultivos industriales de las mismas que, posteriormente, son deshidratados. Estas levaduras son inoculadas en los mostos para llevar a cabo la fermentación alcohólica. En la producción de algunos vinos puede tener lugar una segunda fermentación, en este caso maloláctica, conducida por bacterias lácticas. En otros vinos se requieren etapas posteriores de maduración o envejecimiento.

1.1. Las levaduras vínicas

La fermentación es un proceso microbiológico complejo a lo largo del cual los azúcares presentes en el mosto, principalmente glucosa y fructosa, se transforman en etanol, CO₂ y otros subproductos necesarios para la calidad del vino, por la acción conjunta y progresiva tanto de levaduras como de bacterias y hongos filamentosos (Fleet y Heard, 1993). De entre estos organismos los que desarrollan un papel principal son la levaduras: hongos unicelulares que se dividen por gemación y que, de acuerdo con su tipo de desarrollo sexual, pertenecen al grupo de los Ascomicetes. Aunque existen numerosos géneros de levaduras, apenas unos quince están relacionadas con la enología (Ribéreau-Gayon y col., 2000).

De manera tradicional, han sido las levaduras presentes en la superficie de la uva y en las bodegas (especialmente los restos de los tanques de fermentación, también llamados pies de cuba) las utilizadas para llevar a cabo la vinificación. Hay toda una diversidad de levaduras en los cultivos frescos de mostos,

correspondientes principalmente a los géneros *Kloeckera* (*Hanseniaspora*), *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*; ocasionalmente también pueden estar presentes especies de *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycoides*, *Torulaspora*, *Dekkera* y *Schizosaccharomyces* (Fleet, 2008). Ahora bien, esta flora puede verse afectada por diversos factores, como son la temperatura, la pluviosidad, la altitud, el grado de madurez de la cosecha y el uso de fungicidas (Boulton y col., 1996). Por otro lado, la flora que podemos encontrar en las bodegas está formada mayoritariamente por *S. cerevisiae* (Martini y Vaughan-Martini, 1990; Fleet y Heard, 1993; Fleet, 2007) aunque también se han podido aislar especies de los géneros *Kloeckera*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula* y *Picchia*.

Son las especies de los géneros no-*Saccharomyces* (principalmente *Kloeckera*, *Candida*, *Picchia* y *Metschnikowia*) las que inician espontáneamente la fermentación del mosto, pero rápidamente son superadas por el crecimiento de *S. cerevisiae*, que es la especie dominante desde la mitad del proceso hasta el final (Ribéreau-Gayon y col., 2000; Fleet, 2008). Muchos factores como la composición del mosto, los residuos de pesticidas, la adición de sulfito, el contenido de oxígeno disuelto, los factores *killer*, la temperatura y, especialmente, la acumulación de etanol, afectan la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación y la competencia entre cepas y especies (Fleet y Heard, 1993; Bisson, 1999; Yap y col., 2000; Fleet, 2003; Nissen y col., 2003; Pérez-Navado y col., 2006; Zott y col., 2008).

Actualmente, la inoculación en el mosto de levaduras seleccionadas en forma de levadura seca activa (LSA) es la práctica habitual en las bodegas (Bauer y Pretorius, 2000). Gracias a este método se reduce la fase de latencia y se asegura una fermentación rápida y completa, lo que implica una mayor reproducibilidad del producto final año tras año (Fleet y Heard, 1993; Bauer y Pretorius, 2000). Aún así, la cepa inoculada, que en la mayoría de los casos suele imponerse (Delteil y Aziac, 1988), puede hacerlo sólo de manera parcial (Esteve-Zarzoso y col.,

1998). De hecho, durante los primeros días del proceso coexiste con las cepas presentes de forma natural, las cuales pueden aportar propiedades importantes para el vino (Querol y col., 1992b; Schütz y Gafner, 1993). En los últimos años se ha empezado a conducir fermentaciones con una mezcla controlada de diferentes cepas o especies de levaduras, mejorando así la complejidad de características particulares y específicas de los vinos (Fleet, 2008; Ciani y col., 2009).

1.2. Criterios de selección de levaduras vínicas

La práctica de inocular en el mosto cepas de levadura capaces de imponerse sobre la flora presente en la uva y en los tanques de fermentación exige una selección cuidadosa de las mismas. Los criterios para la selección de las cepas vínicas se pueden clasificar en tres categorías.

La primera de ellas tiene que ver con el progreso de la fermentación: las cepas deben conducir fermentaciones vigorosas con cortas fases de latencia, dejar bajas concentraciones de azúcares residuales, llevar a cabo fermentaciones reproducibles, tener baja susceptibilidad a la presión, a las temperaturas no óptimas y a las elevadas concentraciones de etanol (Degréé, 1993), ser tolerantes a las concentraciones de dióxido de azufre añadidas (Pretorius, 2000), no producir excesiva espuma, sedimentar fácilmente y no experimentar ralentizaciones o paradas (Bisson, 1999).

Otra categoría sería la relacionada con la calidad y el carácter del vino; así, es necesario que las levaduras encargadas de la fermentación produzcan glicerol y β -glicosidasa en las cantidades adecuadas para conseguir un buen aroma (Degréé, 1993; Fleet, 2008). También deben presentar determinados niveles de ciertas actividades enzimáticas (Darriet y col., 1988; Dubourdieu y col., 1988) encargadas de la formación del resto de los compuestos que influyen en el aroma del vino de una manera equilibrada, evitando cantidades excesivas de productos no

deseados (como el ácido acético, el acetato de etilo o compuestos con azufre). Finalmente, no han de afectar negativamente al color (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers y Pretorius, 2005).

Por último, dada la producción industrial de estas levaduras vínicas, se hacen necesarias algunas características más relacionadas con la producción comercial de las mismas (Degreé, 1993). Así, para que los costes puedan ser afrontados por las empresas productoras, las levaduras han de poder crecer en cultivos a gran escala y en medios baratos (como las melazas). Además, las levaduras deben tolerar las condiciones de estrés provocadas durante los procesos industriales de desecado, empaquetamiento, almacenamiento, así como en las etapas inmediatamente anteriores a la fermentación, como son la rehidratación y reactivación (Soubeyrand y col., 2005; Fleet, 2008).

De acuerdo con la descripción anterior, uno de los criterios que se deben tener en cuenta para la selección de cepas vínicas es la resistencia a estrés.

1.3. Biquímica de la fermentación alcohólica

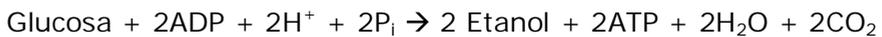
1.3.1. Metabolismo de los azúcares

Las levaduras son capaces de utilizar muy diferentes fuentes de carbono, desde monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa y manosa) o disacáridos (como la maltosa o la sacarosa) e incluso algún trisacárido (rafinosa), hasta aminoácidos; además, también pueden crecer en medios con etanol o glicerol. En condiciones de disponibilidad de azúcares la levadura realiza un metabolismo anaerobio, es decir, la fermentación alcohólica, pero en presencia de fuentes de carbono no fermentables y ausencia de glucosa se pone en marcha el metabolismo aerobio, produciéndose el ciclo de Krebs de forma completa.

Las fuentes de carbono presentes en el mosto son principalmente azúcares. Entre ellos los que se encuentran en una

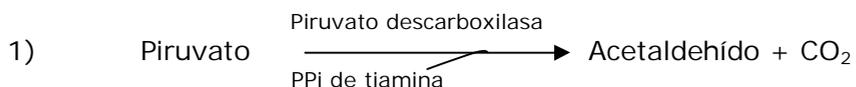
mayor proporción son la glucosa y la fructosa, llegando a concentraciones de entre el 15 y el 25 % (p/v). Estos azúcares son los que permiten a las células obtener la energía necesaria para realizar otros procesos biosintéticos dentro de la célula. El primer paso para utilizar estas fuentes de carbono es su captación desde el medio extracelular a través de proteínas transportadoras codificadas por los genes *HXT* (Lewis y Bisson, 1993; Ko y col., 1993).

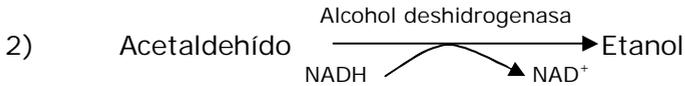
Una vez en el citoplasma la ruta metabólica encargada de la degradación de las hexosas es la glicolisis, descrita en 1940 por Embder-Meyerhof-Parnas, y que tiene lugar en dicho compartimento celular. La reacción neta correspondiente a esta ruta se puede describir de forma la siguiente forma:



La glicolisis consta de diez reacciones y se puede dividir en dos etapas. En la primera de ellas, que incluiría los cinco primeros pasos, los azúcares se activarían mediante fosforilación dependiente de ATP para dar lugar a la fructosa-1,6-bisfosfato, molécula que se escinde en otras dos, cada una de ellas de tres carbonos y con un grupo fosfato (triosas fosfato). En la segunda etapa, las triosas fosfato son oxidadas por el enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que requiere NAD^+ como coenzima, con lo cual éste se reduce a NADH. En las siguientes reacciones se forman dos compuestos: el 1,3-bisfosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato, que son capaces de transferir sus grupos fosfato al ADP para dar lugar a ATP.

En las condiciones anaerobias de la fermentación alcohólica tienen lugar dos reacciones adicionales a partir del producto final de la glicolisis, el piruvato, cuya finalidad es reoxidar el NADH a NAD^+ para asegurar la continuación de la ruta. Son las siguientes:





Además de proporcionar energía, la glicolisis permite generar algunos metabolitos que sirven como punto de partida para la biosíntesis de otras moléculas y compuestos necesarios para el crecimiento de las levaduras. Se describirán a continuación algunos ejemplos. El primero de ellos sería la glucosa-6-fosfato, que puede ser redireccionada hacia la ruta de los fosfatos de pentosa, en la que se forman NADPH (necesario para la síntesis de ácidos grasos) y ribosa-fosfato (requerido para la síntesis de nucleótidos). El piruvato es la base para la síntesis de diferentes moléculas como el oxalacetato, el succinato y algunos ácidos grasos y aminoácidos. Otra molécula que se utiliza para la síntesis de aminoácidos (de serina concretamente) es el fosfoglicerato. Por último, la dihidroxiacetona-fosfato, interviene en la síntesis de glicerol, molécula de suma importancia, no sólo por su papel de osmolito compatible para hacer frente al estrés osmótico al que se enfrentan las levaduras al inicio del proceso de vinificación (Blomberg y Adler, 1992), sino también porque interviene en la biosíntesis de triacilgliceroles (Daum y col., 1998), fundamentales en la calidad del vino. Además, la síntesis de glicerol participa en el control redox, puesto que durante la misma se produce la oxidación de moléculas de NADH (Ansell y col., 1997; Björkquist y col., 1997).

En la Figura I.1 se muestra un esquema-resumen de lo comentado hasta el momento sobre la fermentación alcohólica.

Hay que destacar que durante el metabolismo de los hidratos de carbono por las levaduras también se forman alcoholes superiores que, como posteriormente se comentará, son de gran importancia en el aroma del vino.

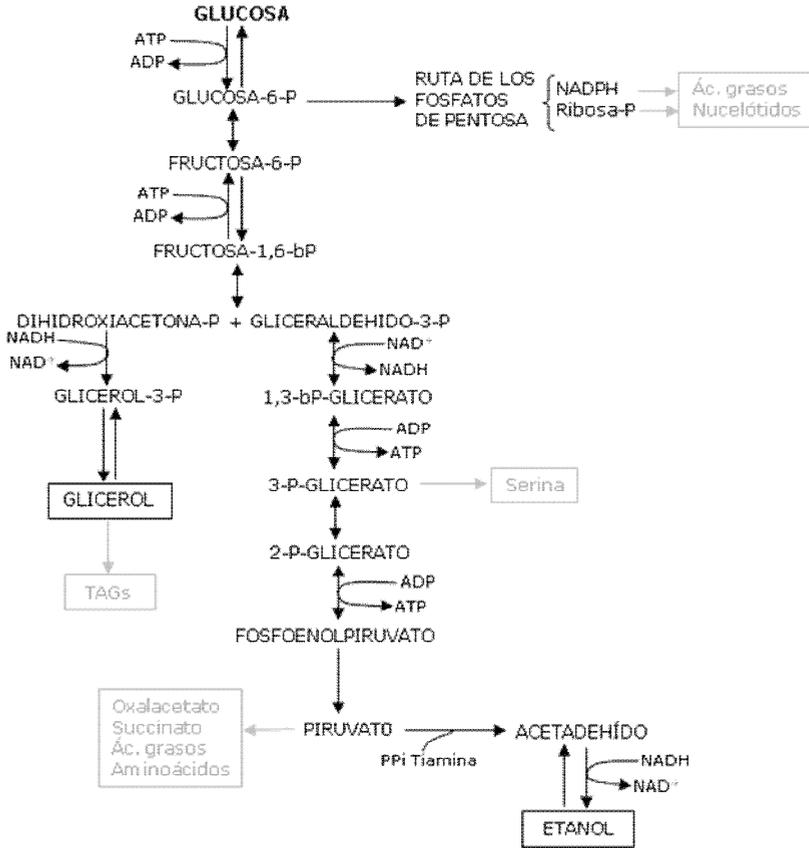


Figura I.1. Esquema de la glicólisis y la fermentación alcohólica llevada a cabo por la levadura *S. cerevisiae*, incluyendo las derivaciones hacia otras rutas de algunos de sus metabolitos.

1.3.2. Metabolismo de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno que pueden ser utilizadas por las levaduras son muchas: aminoácidos, amonio, uracilo, derivados de purina y urea. Existe una relación entre la disponibilidad de las fuentes de nitrógeno y el crecimiento de las levaduras, acortándose los tiempos de generación cuando éstas crecen en presencia de amonio, glutamato, asparagina y glutamina (Cooper, 1982). En el mosto podemos encontrar diferentes fuentes de nitrógeno, siendo los compuestos mayoritarios ciertos aminoácidos, el amonio, los nitratos, las proteínas y polipéptidos,

las aminos biogénicas y las vitaminas (Monteiro y Bisson, 1992; Aerny, 1996; Feuillat y col., 1998).

El primer paso para el metabolismo del nitrógeno es la incorporación del mismo desde el medio extracelular al interior de las células. El transporte de amonio implica las proteínas Mep1p, Mep2p y Mep3p (Marini y col., 1994, 1997), mientras que el de los aminoácidos está mediado por una permeasa general (codificada por el gen *GAP1*) y por un conjunto de permeasas de diferente grado de especificidad para un determinado grupo de ellos (Cooper, 1982; Cartwright y col., 1989; Henschke y Jiranek, 1993; Walker, 1998). No todos los compuestos nitrogenados se consumen al mismo tiempo; su cinética de captación y utilización depende de una serie de factores como son la eficiencia en el transporte, la posibilidad de conversión en amonio o glutamato sin liberar productos tóxicos para la célula y su necesidad en procesos biosintéticos en relación con el requerimiento energético y de cofactores para su utilización (Bisson, 1991). De hecho, durante las primeras 20 horas de vinificación se consume, aproximadamente, la mitad del amonio disponible y los aminoácidos arginina, asparagina, glutamina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina (Jiranek y col., 1995). Durante el crecimiento de las levaduras, las vacuolas sirven como reservorio de nitrógeno, conteniendo más de la mitad de los aminoácidos (Wiemken y Durr, 1974); esta compartimentación sirve como mecanismo de regulación enzimática para su degradación (Sumrada y Cooper, 1978).

En la Figura 1.2 se resume la captación y utilización del nitrógeno por parte de la levadura en situación de disponibilidad de nitrógeno en el medio.

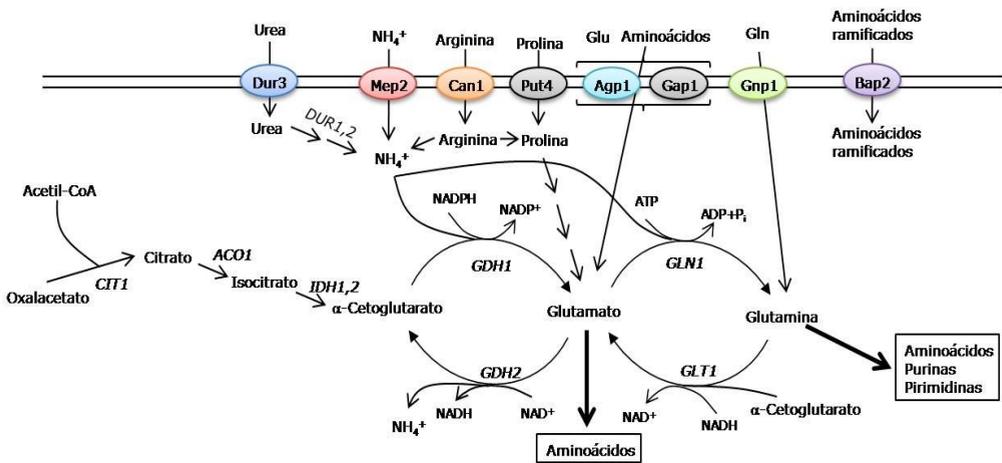


Figura I.2. Captación y utilización de nitrógeno en la levadura *S. cerevisiae*.

Como se puede observar en la Figura I.2, los compuestos centrales del metabolismo nitrogenado son el amonio y el glutamato. El nitrógeno del amonio se utiliza directamente en la biosíntesis de glutamato a través de la actividad del enzima glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺. Las transaminasas se encargan de interconvertir los aminoácidos a través del glutamato como grupo dador/aceptor de grupos amino.

El metabolismo del nitrógeno está regulado finamente mediante el mecanismo de represión por catabolito de nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolic Repression*). De acuerdo con este mecanismo, la expresión de los genes requeridos para la asimilación y degradación de fuentes pobres de nitrógeno está reprimida en presencia de las fuentes ricas. Cuando éstas se agotan, se produce un aumento en la expresión de los genes regulados por este mecanismo (Cooper, 1982; Wiame y col., 1985; Magasanik, 1992; Cooper, 1996). Este aspecto será tratado más ampliamente en el apartado 2.3 de esta introducción.

1.3.3. Relación entre el metabolismo de las levaduras y las propiedades organolépticas del vino

Una de las características más apreciadas de los vinos es su aroma, que viene dado por los compuestos olorosos y volátiles presentes en el mismo. Se pueden distinguir tres tipos de aroma. El primario o varietal es debido a compuestos preexistentes en el mosto (como los terpenos) y viene determinado por la variedad de uva. El secundario depende principalmente del metabolismo de la levadura durante la fermentación alcohólica y, en menor medida, de las transformaciones bacterianas durante la fermentación maloláctica; estos procesos dan lugar a metabolitos secundarios como los alcoholes superiores, los ésteres, los aldehídos o los ácidos grasos (Rapp y Versini, 1991). Por último, el tercer tipo de aroma es el *bouquet*, que es la denominación que recibe el conjunto de aromas que se forman durante el proceso de maduración del vino, cuando los compuestos primarios y secundarios del aroma sufren toda una serie de reacciones químicas para dar lugar a compuestos terciarios como los taninos.

Los principales compuestos que se originan en la fermentación alcohólica y determinan las propiedades organolépticas del producto final son los seis grupos de compuestos que se describen a continuación. Una descripción más exhaustiva de los mismos se puede encontrar en la revisión de Lambrechts y Pretorius (2000). El primero sería el formado por los **ácidos grasos volátiles**, tanto de cadena larga (C16 y C18) como de cadena corta (C8, C10 y C12), en el que también se incluye el ácido acético, cuyos valores están muy controlados y no deben superar 1,0-1,5 g/L (Eglinton y Henschke, 1999). Todos ellos se generan a partir del acetyl-CoA procedente de la descarboxilación oxidativa del piruvato y se sintetizan por la actividad de los enzimas acetyl-CoA carboxilasa y ácido graso sintasa (Ratledge y Evans, 1989; Paltauf y Daum, 1992).

El segundo de los grupos correspondería a los **alcoholes superiores**, que son los que más influyen de forma cuantitativa

en el aroma del mosto, siendo aconsejable un rango de entre 300 y 400 mg/L de los mismos para un efecto óptimo en el vino (Nykänen, 1986). En la levadura existen dos vías para la síntesis de estos compuestos. La primera de ellas es su síntesis *de novo* a partir de los azúcares, siendo intermediarios en este proceso los cetoácidos correspondientes. La segunda vía es la transaminación de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina y treonina) para obtener los correspondientes α -cetoácidos que, en un segundo paso, son reducidos al alcohol correspondiente. Los principales alcoholes superiores formados son: 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, hexanol y 2-feniletanol (Henschke y Jiranek, 1993).

Otro de los grupos que mayoritariamente afectan al aroma del vino y, por tanto, de los más importantes, son los **ésteres**, que derivan fundamentalmente del metabolismo de azúcares. Se pueden clasificar en apolares y polares (Baumes y col., 1986). Entre los apolares se encuentran los ésteres de acetato de los alcoholes superiores (como el acetato de etilo, el acetato de 2-feniletanol o el acetato de isoamilo), generados a partir del alcohol correspondiente y del acetyl-CoA por la acción de las alcohol acetiltransferasas (Peddie, 1990). También pertenecen a este tipo los ésteres etílicos de los ácidos grasos saturados de cadena media (como el hexanoato de etilo), que se obtienen a partir del ácido graso activado (por el coenzima A) gracias a la función de alguna acil-CoA sintetasa (Nordström, 1964,a,b,c). En el grupo de los polares se incluyen ésteres que se producen en mayor cantidad, pero que influyen más en el cuerpo que en el aroma del vino (dietil succinato, 2-etil-hidroxipropionato, dietil malato,...). El principal éster es el acetato de etilo, cuyos niveles no deben superar los 160 mg/L en vinos tintos y los 170 mg/L en blancos (Corison y col., 1979). Los niveles de los ésteres en el producto final no sólo dependen de su síntesis, sino también de su hidrólisis en la fase de maduración (Ramey y Ough, 1980) y de su transporte al medio (Nykänen y col., 1977). También se pueden encontrar ésteres etílicos de aminoácidos, que se forman cuando la concentración de

etanol en el medio es elevada, es decir, durante la segunda mitad de la fermentación (Herraiz y Ough, 1993).

Entre los **aldehídos volátiles de cadena corta** hay que destacar el acetaldehído (límite de 100 mg/L) y el diacetilo (límite entre 1-4 mg/L), siendo ambos el 90% del total de este grupo. Proviene de los cetoácidos generados en la síntesis o degradación de aminoácidos o alcoholes superiores. Otros compuestos importantes para el gusto, color y sabor son los **fenoles volátiles**, vinilfenoles en vinos blancos y etilfenoles en tintos (Chatonnet y col., 1997; Etievant, 1981; Singleton y Essau, 1969). En vinos tintos se obtienen a partir de los ácidos no volátiles *trans*-ferúlico y *trans*-p-cumárico por la acción de las levaduras *Brettanomyces/Dekkera sp* (Chatonnet y col., 1997).

Por último se deben citar los **compuestos azufrados**. El principal es el sulfuro de hidrógeno, cuyos niveles no deben superar los 10-100 µg/L. Este compuesto se forma a partir de los compuestos de azufre presentes en el medio y de los que se originan a partir de los pesticidas (Henschke y Jiranek, 1993; Rauhut, 1993).

Diversos estudios publicados durante los últimos años demuestran que los tipos y niveles de los compuestos organolépticos del vino dependen de diversos factores. Entre ellos se encuentra la disponibilidad y la naturaleza de las fuentes de nitrógeno presentes en el mosto o añadidos posteriormente (Torija y col., 2003; Beltrán y col., 2005; Jiménez-Martí y col., 2007; Carrau y col., 2008; Mendes-Ferreira y col., 2009), así como la cepa de levadura responsable principalmente de conducir la fermentación alcohólica y sus peculiaridades metabólicas (Rapp y Versini, 1991; Henick-Kling y col., 1998; Lambrechts y Pretorius, 2000).

1.4. Etapas durante la producción del vino

Actualmente, de acuerdo con la práctica habitual en las bodegas que se ha comentado anteriormente, la primera etapa en

la producción del vino pasa por conseguir las LSA que serán inoculadas en el mosto. Un paso previo es la selección de la cepa de levadura que se pretende utilizar, siguiendo los criterios descritos en el apartado 1.2 de esta introducción; esta levadura se crece en el medio (generalmente melazas) y en las condiciones óptimas para obtener grandes cantidades de biomasa y seguidamente se somete a un proceso de desecación y deshidratación para su posterior empaquetamiento y almacenaje. Antes de ser inoculadas en el mosto las LSA tienen que ser rehidratadas, generalmente durante unos 30 minutos a 37°C en una disolución de agua con un porcentaje variable de glucosa, entre el 0 y el 5% (p/v) dependiendo del fabricante, tras lo cual se adicionan directamente al tanque de fermentación. En éste se encuentra ya el mosto, al cual en muchos casos se ha añadido sulfito (150 mg/L en tintos y menos de 200 mg/L en blancos) con la finalidad de evitar la oxidación de sus componentes y proteger frente al crecimiento de bacterias.

En el momento en que las levaduras se añaden al tanque comienza la fermentación alcohólica. Tras una período breve de latencia y crecimiento lento, se pasa a la fase tumultuosa, que se extiende aproximadamente durante un tercio del proceso. Más tarde, el crecimiento y consumo de azúcares tiene lugar de manera más lenta. Durante la vinificación los azúcares presentes en el mosto se transforman en etanol y CO₂. Cuando las cantidades de azúcares residuales son inferiores a 2-5 g/L se considera que la fermentación se ha completado (Carrasco y col., 2003; Beltrán y col., 2004; Mendes-Ferreira y col., 2004). Dependiendo del tipo de vino que se quiera conseguir, el producto resultante de la fermentación puede experimentar diferentes tratamientos. Así, en el caso de algunos vinos tintos tiene lugar una segunda fermentación, la maloláctica (Lonvaud-Funel, 1999). Independientemente de que esta tenga lugar o no el vino puede pasar por una etapa de maduración, en barrica o en botella, durante tiempos variables según el tipo de vino que se considere (crianza, reserva o gran reserva). Finalmente, en vinos como el de

Jerez tiene lugar un proceso de envejecimiento biológico; en este caso se adiciona etanol al vino ya elaborado y se introduce en barricas donde levaduras diferentes a las que han intervenido en la fase anterior, las levaduras de flor (Esteve-Zarzoso y col., 2001), crecen formando un velo en la superficie (Martínez y col., 1998).

1.5. Condiciones de estrés asociadas a las diferentes etapas de producción del vino

Se considera situación de estrés cualquier factor ambiental que comprometa o dificulte el crecimiento óptimo de una célula (Hohmann y Mager, 2003). La mayoría de estos factores están relacionados con fluctuaciones en la temperatura o en la osmolaridad, cambios en el pH del entorno, presencia de radiaciones o agentes químicos tóxicos y largos periodos de ayuno de nutrientes.

Durante todas las etapas de producción del vino las levaduras se ven sometidas de forma secuencial o simultánea a una serie amplia de condiciones de estrés, de entre las que cabe destacar: el estrés oxidativo, el osmótico, el causado por el aumento de la concentración de etanol en el medio y el debido a la limitación de nutrientes, a causa de su consumo a medida que avanza la fermentación.

En la fase de producción de LSA, las levaduras se crecen sobre melazas, recurriendo en las últimas etapas del proceso a alimentación progresiva o en "*fed-batch*" con aporte de oxígeno, para asegurar la obtención de grandes cantidades de biomasa; en estas condiciones el metabolismo respiratorio de la levadura está activo y determina un importante estrés oxidativo (Bauer y Pretorius, 2000). La respuesta a este tipo de estrés es fundamental en la capacidad fermentativa de las levaduras (Pérez-Torrado y col., 2009).

El estrés osmótico puede afectar a las levaduras también al principio de esta fase (Bauer y Pretorius, 2000). Las melazas pueden llegar a contener hasta 50% (p/v) de sacarosa y, aunque

se suelen diluir unas 10 veces, las concentraciones resultantes son suficientes para generar la respuesta a este tipo de estrés. Ahora bien, el punto crítico para el estrés osmótico es en el momento de la inoculación de las levaduras en el mosto, ya que entonces se pueden encontrar concentraciones de azúcares de entre el 15 y el 25% (p/v) (Attfield, 1997).

A medida que avanza la fermentación algunos de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras se van consumiendo, generándose un estrés por agotamiento de nutrientes que es de especial importancia en las fases finales del proceso y en el envejecimiento biológico (Bauer y Pretorius, 2000). De manera análoga, a lo largo de la fermentación la concentración de etanol en el medio va aumentando, determinando estrés por etanol (Bauer y Pretorius, 2000), muy destacable también durante los procesos de envejecimiento biológico característicos de los vinos de Jerez. Este compuesto es altamente tóxico para las células, ya que por ejemplo, afecta a la membranas biológicas (Ingram y col., 1984) así como a diversas actividades enzimáticas.

Otras condiciones de estrés pueden afectar a las levaduras a lo largo de las diferentes etapas de producción del vino. Así, durante la fase de producción de levaduras, éstas se enfrentan a los procesos de desecación y deshidratación. Al inicio de la vinificación las condiciones de pH ácido, determinadas concentraciones de sulfito, e incluso bajas temperaturas (utilizadas para potenciar la conservación de aromas primarios, Llauradó y col., 2005) representan también situaciones de estrés. Finalmente, durante el envejecimiento biológico las levaduras también deben enfrentarse a elevadas concentraciones de acetaldehído.

2. Mecanismos de respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En respuesta a situaciones adversas, las células coordinan diversas actividades que implican aspectos relacionados con la detección del estrés, la transducción de señales, el control

transcripcional y post-transcripcional, el direccionamiento de proteínas a orgánulos, la acumulación de agentes protectores y diversas actividades reparadoras (Mager y De Kruijff, 1995). La puesta en marcha de todos estos mecanismos conduce, finalmente, a un conjunto de respuestas adaptativas esenciales para la supervivencia o, al menos, para la adaptación de la célula a las nuevas condiciones.

2.1. La respuesta general a estrés y la respuesta particular a diferentes formas de estrés

En un estudio global llevado a cabo por Gasch y col. (2000), se observó que alrededor de 900 genes de *S. cerevisiae* modificaban sus niveles de expresión ante diferentes situaciones de estrés, y se denominó a este mecanismo de respuesta global "Respuesta general a estrés ambiental" (*ESR*, *Environmental Stress Response*). Unos 600 genes reducían sus niveles de mRNA y la mayoría de ellos están implicados en síntesis de proteínas (Ashburner y col., 2000) y en menor medida en funciones relacionadas con el crecimiento. En cuanto a los genes cuya tasa de transcripción aumentaba, participan en procesos mucho más diversos: metabolismo de carbohidratos o de ácidos grasos, transporte de metabolitos, mantenimiento del potencial redox, detoxificación de especies reactivas de oxígeno, autofagia, plegamiento y degradación de proteínas, modificación de la pared celular, reparación de daños en el DNA, secreción vacuolar y mitocondrial o señalización intracelular (Gasch, 2002; Hohmann y Mager, 2003).

La respuesta de los genes *ESR* suele ser inmediata tras la nueva situación de estrés, aunque es transitoria (Gasch y col., 2000; Causton y col., 2001). Por otro lado, guarda relación con la severidad del choque ambiental, por lo que un estrés de mayor magnitud desencadena una respuesta más fuerte que un cambio sutil en el ambiente (Gasch y col., 2000). Algunos de los genes que forman parte de la respuesta *ESR* presentan una regulación

común por lo que se puede hablar de un mecanismo general de respuesta a estrés con independencia de la condición ambiental cambiante. En estos genes se ha identificado un elemento en la secuencia promotora denominado elemento de respuesta a estrés (*STRE*, *Stress Responsive Element*), cuya secuencia consenso es AGGGG (Kobayashi y McEntee, 1990; Marchler y col., 1993). Este elemento es reconocido por los factores transcripcionales homólogos y parcialmente redundantes Msn2p y Msn4p (Martínez-Pastor y col., 1996; Schmitt y McEntee, 1996), regulados por la ruta de la proteína quinasa A (PKA) (Marchler y col., 1993; Boy-Marcotte y col., 1998; Gerner y col., 1998; Garreau y col., 2000; Garmendia-Torres y col., 2007;) y por la ruta TOR (Helliwell y col., 1998; Beck y Hall, 1999; Estruch, 2000; Santhanam y col., 2004; Rohde y col., 2008). La actividad de estos factores transcripcionales permite una reprogramación de la expresión génica en condiciones de estrés. Es importante destacar que la existencia de este mecanismo general de respuesta a estrés determina en las levaduras el fenómeno conocido como protección cruzada, según el cual células que han sido expuestas a una determinada condición de estrés presentan una mayor resistencia a dosis mayores del mismo o a otro tipo de estrés posterior (Mitchel y Morrison, 1982; Blomberg y col., 1988; Lewis y col., 1995).

La regulación de los genes *ESR* es compleja, ya que, junto con Msn2/4p existe un gran número de factores transcripcionales que están implicados en la misma y, además, los cambios en la abundancia de los transcritos de estos genes pueden estar mediados a nivel del inicio de la transcripción, pero también por la estructura de la cromatina y la estabilidad de los mRNAs (Gasch, 2002; Hohmann y Mager, 2003). En cualquier caso, la regulación de la respuesta a estrés permite especificidad y precisión en la respuesta celular a cada condición adversa, ya que se puede conducir la respuesta inicial global hacia las necesidades exactas que ha creado la nueva situación ambiental (Gasch, 2002; Hohmann y Mager, 2003).

Las levaduras son capaces, además, de responder de manera particular a condiciones de estrés más específicas, como temperaturas supraóptimas, estrés oxidativo, cambios de osmolaridad o limitación de nutrientes. Así, frente a un choque térmico el factor Hsf1p (*Heat shock factor*) induce principalmente la expresión de los genes que codifican diferentes carabinas moleculares (Amorós y Estruch, 2001). Por otro lado, las células hacen frente al estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante la inducción transcripcional (dependiente de los factores Yap1p y Skn7p) de más de 160 genes que codifican proteínas con funciones antioxidantes, enzimas relacionadas con el metabolismo, carabinas moleculares, etc. (Kuge y Jones, 1994; Krems y col., 1996). La respuesta de las levaduras a estrés osmótico y a disponibilidad de nutrientes se considera con mayor detalle en los apartados siguientes, dada su relación con los objetivos de esta Tesis.

2.2. La respuesta a estrés osmótico

La respuesta de las levaduras al estrés causado por el incremento en la osmolaridad del medio se ha caracterizado de manera exhaustiva (revisado en Hohmann y Mager, 2003). Diversos estudios han mostrado que en células sometidas a elevadas concentraciones de sal o sorbitol se producen cambios transcripcionales en un 10% de los genes aproximadamente (Gasch y col., 2000; Posas y col., 2000; Rep y col., 2000; Causton y col., 2001; Yale y Bohnert, 2001; Hirasawa y col., 2006). La ruta que principalmente está relacionada con la respuesta a estrés hiperosmótico es la ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*) (Capaldi y col., 2008), de la que se muestra un esquema en la Figura 1.3. En estas condiciones, las células son capaces de poner en marcha dicha ruta a través de los osmosensores de la membrana plasmática Sln1p y Sho1p-Msb2p, los cuales, debido a su diferente sensibilidad, permiten responder a un amplio rango de cambios osmóticos (Maeda y col., 1995). A través de ambas ramas se llega

a la activación de Pbs2p, que fosforila la quinasa Hog1p en el citosol (Clotet y Posas, 2007). El cambio en el estado de fosforilación de Hog1p conduce a su activación y rápida acumulación nuclear (Ferrigno y col., 1998; Reiser y col., 1999), con el consiguiente aumento en los niveles de mRNA de los genes inducidos por choque hiperosmótico (Rep y col., 1999a,b, 2000), a través de factores transcripcionales como Msn2/4p, Msn1p, Hot1p, Sko1p y Smp1p (revisado en Hohmann y col., 2007) así como a la desarticulación del complejo represor Tup1p-Ssn6p-Sko1p, que se une al elemento de secuencia CRE (*cAMP Response Element*; Proft y Serrano, 1999; Hohmann, 2002). Este efecto sobre el represor permite a Sko1p reclutar los complejos remodeladores de la cromatina SAGA y SWI-SNF para posibilitar así la transcripción de genes de respuesta a estrés.

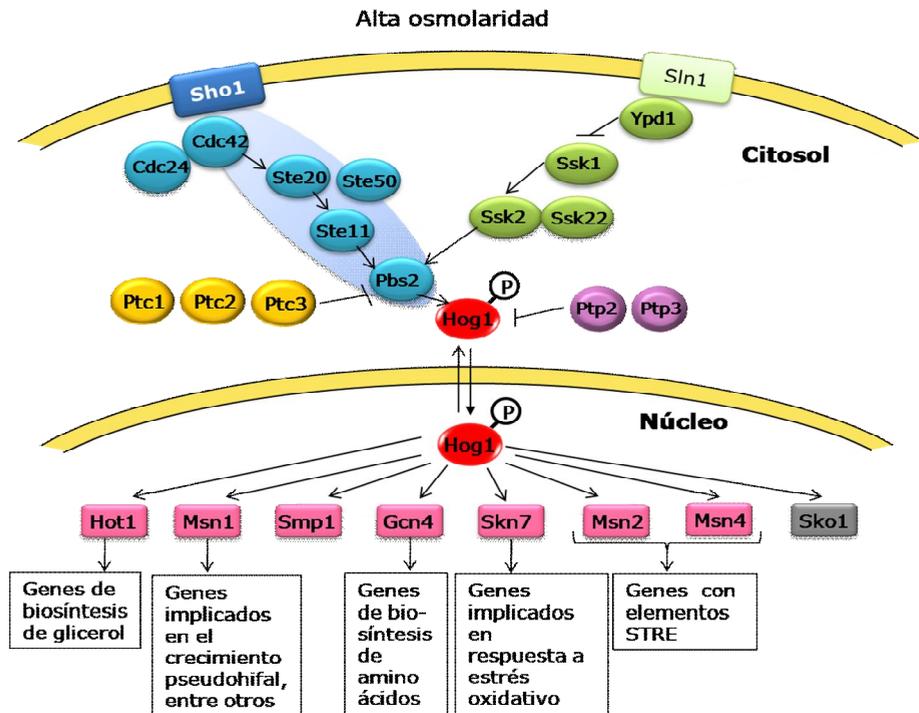


Figura I.3. Esquema de la ruta HOG (adaptado a partir de Gasch, 2002, y Hohmann y Mager, 2003).

La fosforilación de Hog1p se puede detectar cuando a células creciendo en un medio con rafinosa se añade NaCl a una concentración final 110 mM, e incluso cuando dichas células son transferidas a un medio con 2% de glucosa (Tomás-Cobos y col., 2004). Este estudio demuestra además que la fosforilación de Hog1p es mayor al incrementarse la osmolaridad.

Entre los genes que se inducen como respuesta a estrés hiperosmótico es importante destacar *GPD1* (que codifica el enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) y *GPP2* (codificante de glicerol-3-fosfatasa), responsables de la producción de glicerol. La expresión de estos genes está controlada por la ruta HOG a través de los factores transcripcionales Hot1p y Msn1p (Rep y col., 1999a,b). Tras un choque osmótico el aumento en los niveles de mRNAs de *GPD1* y *GPP2* es rápido y transitorio, de unas 50 veces (Larsson y col., 1993; Albertyn y col., 1994; Ansell y col., 1997; Rep y col., 1999b; Eriksson y col., 2000). La máxima expresión de estos genes se encuentra a los 45 minutos, volviendo a valores basales a los 90 minutos. De acuerdo con la función de estos genes, la concentración intracelular de glicerol va aumentando a partir de los 30 minutos del choque osmótico, alcanzando el valor máximo alrededor de los 90 minutos, momento en el que se estabiliza su nivel, unas 3 veces superior al basal (Rep y col., 1999a,b).

El glicerol es un metabolito secundario derivado del metabolismo de la glucosa que se utiliza para diversos procesos. Así, por ejemplo, la producción de glicerol en respuesta a un choque hiperosmótico es fundamental, puesto que es la molécula osmoprotectora (o osmolito compatible) que las levaduras utilizan principalmente para incrementar la osmolaridad en el interior celular (Blomberg y Adler, 1992). También protege frente a un aumento en la temperatura (Siderius y col., 2000) o frente al estrés oxidativo (Påhlmar y col., 2001). En condiciones anaerobias es esencial su producción, ya que sirve para reoxidar el exceso de NADH (Ansell y col., 1997; Björkqvist y col., 1997). Otra vía en la que está implicado el glicerol es en la síntesis de fosfolípidos

(Daum y col., 1998). Este compuesto es, además, fuente de carbono y energía para las células que pueden captarlo del medio.

En *S. cerevisiae* el glicerol se puede sintetizar a partir de la dihidroxiacetona-fosfato mediante dos pasos consecutivos: en el primero se reduce a glicerol-3-fosfato a través de las glicerol-3-fosfato deshidrogenasas (codificadas por los genes *GPD1* y *GPD2*) dependientes de NAD^+ (Larsson y col., 1993; Albertyn y col., 1994; Eriksson y col., 1995; Ansell y col., 1997). En el segundo paso, el glicerol-3-fosfato es desfosforilado por las glicerol-3-fosfato fosfatasas Gpp1p y Gpp2p, también dependientes de NAD^+ (Hirayama y col., 1995; Norbeck y col., 1996; Pählman y col., 2001). Existen también en levadura enzimas que podrían permitir la conversión de glicerol en dihidroxiacetona-fosfato a través de dihidroxiacetona: *GCY1* e *YPR1* codifican unas posibles deshidrogenasas de glicerol y *DAK1* y *DAK2* dos putativas quinasas de dihidroxiacetona (Norbeck y Blomberg, 1997; Blomberg, 2000), cuya expresión se ve incrementada frente a varios tipos de estrés (Norbeck y Blomberg, 1997; Gasch y col., 2000; Causton y col., 2001). Por otro lado, el glicerol puede entrar a la célula mediante tres mecanismos diferentes. El primero es por difusión pasiva, aunque es un proceso lento, que parece estar disminuido cuando las células crecen en un medio de alta osmolaridad (Gancedo y col., 1968; Brown, 1974; Sutherland y col., 1997; Tamás y col., 1999). La segunda vía es la difusión facilitada mediada por el canal Fps1p, que permite tanto la entrada como la salida; este canal se cierra para permitir la acumulación de glicerol durante el choque osmótico, mientras que si se produce una disminución en la osmolaridad externa se abre para permitir su salida (Luyten y col., 1995; Tamás y col., 1999).

El último de los mecanismos es la captación activa, posiblemente de manera simporte con Na^+ o H^+ (Lucas y col., 1990; Van Zyl y col., 1990; Lages y Lucas, 1997), a través de las proteínas Gup1p y Gup2p. El gen *STL1* codifica también un transportador simporte glicerol- H^+ (Ferreira y col., 2005). Una vez en el interior de la célula, la glicerol quinasa Gut1p fosforila el

glicerol (Sprague y Cronan, 1977; Pavlik y col., 1993) para generar glicerol-3-fosfato, que es oxidado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD Gut2p (Sprague y Cronan, 1977; Rønnow y Kielland-Brandt, 1993). La expresión de estos genes no está controlada por estrés osmótico, excepto en el caso de *STL1*, que muestra una inducción fuerte aunque transitoria en estas condiciones (Gasch y col., 2000; Causton y col., 2001; Ferreira y col., 2005). En la Figura I.4 se presenta un esquema del transporte y metabolismo del glicerol.

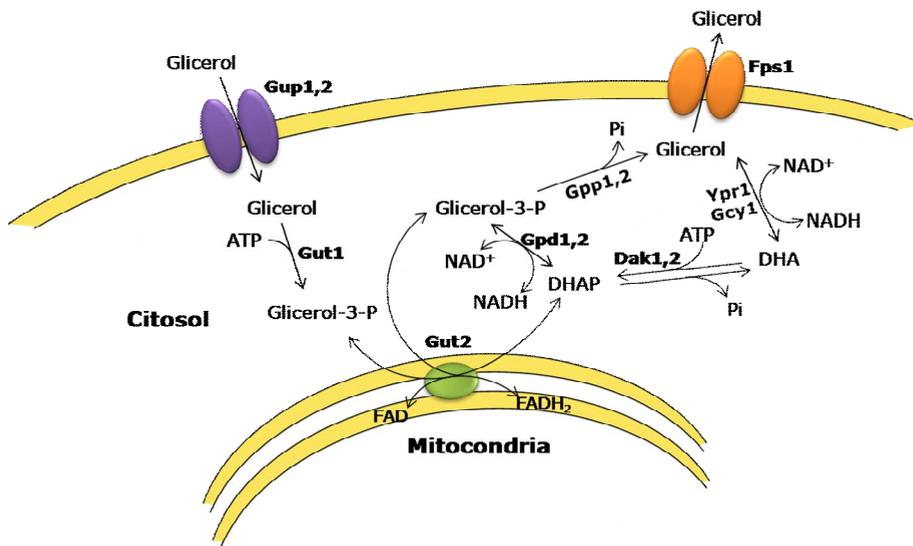


Figura I.4. Metabolismo del glicerol (Adaptado de Hohmann y Mager, 2003).

En la respuesta de las levaduras a estrés osmótico también están implicadas otras rutas. La calcineurina, una fosfatasa Ser/Thr dependiente de calcio/calmodulina es activada por este y otros tipos de estrés (Denis y Cyert, 2002). Esta fosfatasa es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (codificada en *S. cerevisiae* por los genes parcialmente redundantes *CNA1* y *CNA2*) y una pequeña subunidad reguladora (codificada por *CNB1*) (Cyert y col., 1991; Liu y col., 1991; Cyert y Thorner, 1992). La calcineurina acopla señales de Ca^{2+} a repuestas celulares

(Aramburu y col., 2000) a través de la activación por desfosforilación del factor transcripcional Crz1p, que se transloca así al núcleo y activa la transcripción de genes que presentan el elemento de secuencia CDRE (*Calcineurin Dependent Response Element*; Stathopoulos y Cyert, 1997; Cyert, 2003). Entre estos genes se encuentran los codificantes de ATPasas de tipo P implicadas en la homeostasis de iones, como *PMC1*, *PMR1* o *ENA1* (Matheos y col., 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997; Yoshimoto y col., 2002a; Bultynck y col., 2006).

La ruta de la PKC se activa en condiciones de estrés hipoosmótico o de cualquier otra situación que afecte la integridad de la pared celular (Lee y col., 1993; Kamada y col., 1995; Ketela y col., 1999). La señalización en esta ruta se produce a través de Pkc1p, que fosforila Bck1p (MAP-KKK), que a su vez fosforila Mkk1/2p (MAPKK), responsable de la fosforilación de Mpk1p (Posas y col., 1998a). Esta MAPK fosforila los factores transcripcionales Rim1p, Swi4p y Swi6p lo que conduce a la inducción de diversos genes relacionados con la pared celular y su arquitectura. Algunos datos obtenidos en los últimos años sugieren una implicación de la ruta de la PKC en respuesta a estrés hiperosmótico. Así, Nanduri y Tartakoff (2001) han descrito la participación de la actividad quinasa Pkc1p en la relocalización de proteínas después de un choque hiperosmótico, y García-Rodríguez y col. (2005) han mostrado una activación transitoria de esta ruta en respuesta a este tipo de estrés, una vez que la ruta HOG ha detectado el incremento en osmolaridad y puesto en marcha la respuesta celular al mismo.

Finalmente, frente a alta osmolaridad, aunque también en respuesta a otras señales (insulina, factores de crecimiento, etc.) se activa la ruta de la quinasa de fosfatidilinositol-3-fosfato. En *S. cerevisiae*, tras un choque hiperosmótico, Fab1p fosforila el fosfatidilinositol-3-fosfato a fosfatidilinositol-3,5-bifosfato, PI(3,5)P₂ (Yamamoto y col., 1995; Cooke y col., 1998), permitiendo la acumulación de éste (Dove y col., 1997). Los procesos celulares regulados por esta ruta son variados y van

desde la transducción de señales hasta la proliferación celular pasando por el tráfico vesicular o la reorganización del citoesqueleto (revisado en Martin, 1998; Wera y col., 2001).

El estrés osmótico también puede ser provocado por elevadas concentraciones de azúcar. De hecho, al inicio de la fermentación alcohólica durante la producción del vino, como ya se ha comentado anteriormente, este tipo de estrés es muy importante. En este caso, las levaduras se enfrentan a una situación particular puesto que tienen que ser capaces de enfrentarse al estrés osmótico teniendo niveles elevados de glucosa disponible para el crecimiento. La glucosa es la fuente de carbono y energía preferida por *S. cerevisiae*. En diversos microorganismos, la levadura entre ellos, se ha identificado un mecanismo de regulación conocido como represión por catabolito de carbono (Santangelo, 2006; Gancedo, 2008, y referencias incluidas en estos trabajos). De acuerdo con este mecanismo, las células en presencia de glucosa reprimen la transcripción de los genes implicados en el catabolismo de fuentes de carbono menos eficientes. Los genes que sufren esta represión son principalmente aquellos implicados en la respiración celular (ciclo de Krebs y cadena de transporte electrónico), la gluconeogénesis, el ciclo del glioxilato y el transporte y degradación de fuentes de carbono alternativas. En el mecanismo de represión por glucosa (Figura I.5) interviene la quinasa Snf1p (Carlson y col., 1981).

En condiciones de limitación de glucosa esta quinasa inactiva Mig1p, evitando así su interacción con el co-represor Cyc8p-Tup1p. Ante un exceso de glucosa, la quinasa Snf1p está inactiva (McCartney y Schmidt, 2001), Mig1p no está fosforilada y se encuentra en el núcleo, donde ejerce su papel represor (Kaniak y col., 2004; Papamichos-Chronakis y col., 2004).

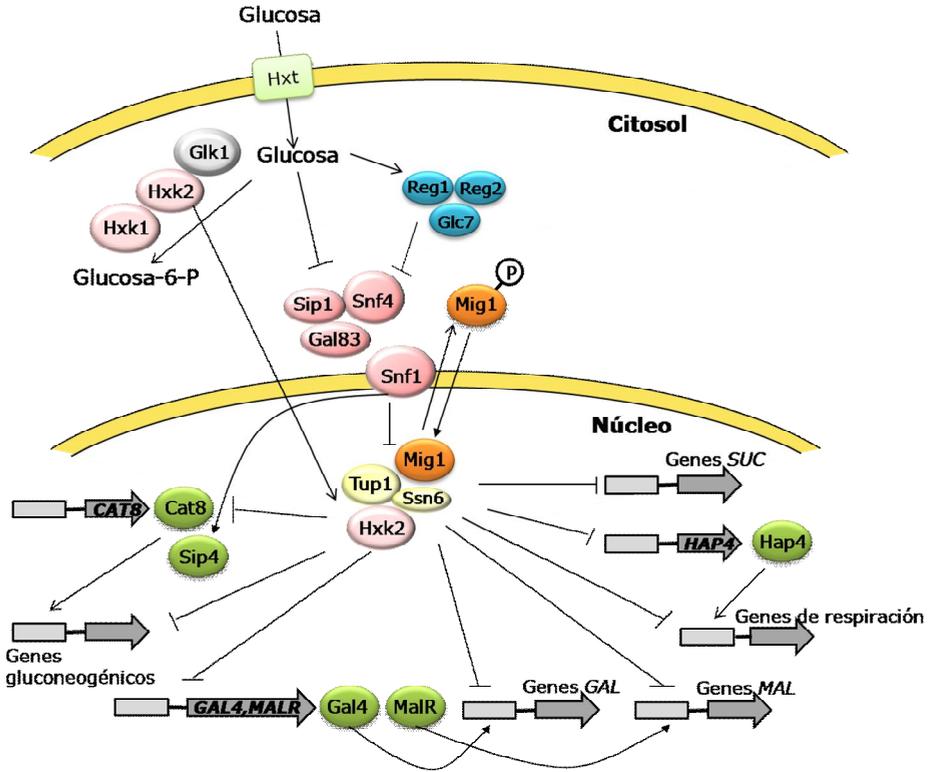


Figura I.5. Mecanismo de represión por catabolito de carbono. Adaptado de Hohmann y Mager, 2003.

Algunos estudios se han centrado en el análisis de la respuesta al estrés osmótico provocado por elevadas concentraciones de glucosa (Kaeberlein y col., 2002; Erasmus y col., 2003). Kaeberlein y col. (2002) realizaron un experimento de micromatrices con la cepa PSY316 creciéndola en un medio con 20% de glucosa y encontraron sobreexpresados en comparación con 2% de glucosa los genes implicados en la biosíntesis de glicerol y trehalosa. Por su parte, Erasmus y col. (2003) compararon la respuesta transcriptómica global de la cepa Vin13 creciendo en 40 o en 22% de glucosa en mosto Riesling. En este estudio observaron que los genes cuya expresión aumentaba en 40% de glucosa con respecto a 22% eran los glicolíticos, los de la ruta de los fosfatos de pentosa y los implicados en la formación de

ácido acético a partir del acetaldehído; por otro lado, los genes con menores niveles de expresión en alta glucosa eran los involucrados en la biosíntesis *de novo* de purinas, pirimidinas, histidina y lisina. Conclusiones similares se obtuvieron en un estudio proteómico llevado a cabo por Pham y Wright (2008) en el que muchas de las proteínas implicadas en la glicolisis y la ruta de los fosfatos de pentosa también se encontraron en mayores niveles en alta glucosa.

Es importante señalar que en la adaptación de *S. cerevisiae* al estrés hiperosmótico también se ha descrito un importante papel de la regulación post-transcripcional, a través del control de la estabilidad de los mRNAs (Greatrix y van Vuuren, 2006; Molin y col., 2009; Romero-Santacreu y col., 2009).

2.3. La respuesta a la disponibilidad de nutrientes

Como se ha comentado anteriormente, una de las condiciones de estrés más relevantes durante la fermentación alcohólica es el ayuno de nutrientes. Es importante, hacer una distinción previa entre limitación y ausencia de nutrientes. A lo largo del crecimiento de un microorganismo en un medio suele disminuir la disponibilidad de alguno de los nutrientes, lo cual conduce a un cambio metabólico que permite la utilización de un nutriente alternativo más pobre. Así, en medios con fuentes de carbono fermentables, como la glucosa, la disminución de las mismas determina una fase de transición entre el metabolismo fermentativo y el respiratorio, denominada cambio diaúxico, que da paso a la fase de crecimiento postdiaúxica, en la que la levadura se adapta a la utilización de acetato, etanol y otros productos de la fermentación como fuente de energía (François y col., 1987; Hohmann y Mager, 2003). Sin embargo, la ausencia de uno o varios nutrientes esenciales determina la entrada en fase estacionaria, lo que desencadena una disminución drástica de la tasa de crecimiento y el aumento de la resistencia a estrés (Herman, 2002). Mientras que en condiciones de laboratorio, la

entrada en fase estacionaria es provocada por la ausencia de glucosa (Werner-Washburne y col., 1996), en el caso de la fermentación vínica puede ocurrir en presencia de grandes cantidades de azúcares por el agotamiento previo de compuestos nitrogenados y la elevada concentración de etanol (Fleet y Heard, 1993).

Para su crecimiento la levadura necesita, por tanto, una serie de nutrientes esenciales, entre los que se encuentran fuentes de carbono y de nitrógeno, cuya utilización está finamente regulada. En el apartado anterior se ha hecho referencia al mecanismo de represión por catabolito de carbono, que permite a las levaduras utilizar fuentes de carbono alternativas a la glucosa cuando ésta empieza a agotarse. En el caso del nitrógeno, *S. cerevisiae* también presenta un mecanismo de represión por catabolito de nitrógeno (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*, Wiame y col., 1985): la presencia de fuentes de nitrógeno preferidas (amonio, glutamina o asparagina) determina una represión de los genes implicados en el transporte y metabolismo de otras más pobres (como la prolina, la alantoína o el γ -aminobutirato) (Cooper, 1982; Magasanik, 1992). En el mecanismo NCR intervienen varios factores transcripcionales que reconocen secuencias tipo GATA: los activadores Gln3p y Gat1p/Nil1p y los represores Dal80p/Uga43p, Deh1p/Gzf3p, Dal81p y Dal82p (revisado en ter Schure y col., 2000). En condiciones de limitación de nitrógeno los reguladores Gln3p y Gat1p se acumulan en el núcleo, donde se unen a los promotores de genes sometidos a represión por NCR, activando así su transcripción. Los grupos de genes que se activan en estas condiciones son los relacionados con el transporte de aminoácidos –ya sea general (*GAP1*) o de sustratos particulares (*PUT4*, *CAN1* o *DAL4*)-, con el catabolismo de la urea (*DUR1,2*), la arginina (*CAR1,2*), la prolina (*PUT1,2*), el γ -aminobutirato (*UGA1,2*), la alantoína (*DAL1,2,3,7*) o la glutamina (*GLN1*, *GDH1/2*), así como algunos que codifican activadores específicos (*PUT3*, *DAL81/82*). Cuando el nitrógeno se encuentra en exceso, la actividad de Gln3p

está reprimida por la glutamina intracelular y la de Gat1p por el glutamato (Stanbrough y col., 1995); además, ambos están excluidos del núcleo por la unión a Ure2p, y Gln3p se encuentra hiperfosforilado (Beck y Hall, 1999). Para la mayoría de los genes regulados por el mecanismo de represión por catabolito de nitrógeno, Dal80p y Gln3p tienen funciones antagónicas. Existe un conjunto de genes en los que ambos factores reconocen la misma secuencia GATA, por lo que compiten por unirse a ella (Coffman y col., 1997; Daugherty y col., 1993). Es importante resaltar que los promotores de *GAT1*, *DAL80* y *DEH1* contienen múltiples secuencias GATA por lo que existe la posibilidad de autoregulación y regulación cruzada (Cunningham y col., 2000).

Existen varias rutas implicadas en la regulación transcripcional en respuesta a nutrientes que controlan los mecanismos de represión por catabolito, la entrada en fase estacionaria y la respuesta a estrés. Una de estas rutas es la de la proteína quinasa A (PKA, revisada en Hohmann y Mager, 2003) (Figura 1.6). Este enzima contiene subunidades catalíticas (Tpk1-3p) y reguladora (Bcy1p, donde se une el cAMP) (Thevelein y col., 2000). En condiciones de disponibilidad de glucosa en el medio, la fosforilación intracelular de la glucosa y la activación del sistema receptor de este azúcar (formado por Grp1p y Gpa2p) incrementan la actividad de la adenilato ciclasa Cyr1p, provocando un incremento transitorio en los niveles de cAMP (Colombo y col., 1998; Kraakman y col., 1999; Rolland y col., 2000; Versele y col., 2001). El cAMP se une a las subunidades reguladoras, haciendo que se disocie el complejo y queden activas las subunidades catalíticas. Las Tpk's inactivan entonces la quinasa Snf1p, mediando así la represión de genes implicados en gluconeogénesis, respiración, utilización de sustratos alternativos, liberación de carbohidratos de reserva, y respuesta a estrés, entre otros (Thevelein y De Winde, 1999; Thevelein y col., 2000). Cuando la glucosa se agota, disminuyen los niveles de cAMP, y las Tpk's se inactivan, con la consiguiente desrepresión de los diferentes tipos de genes citados anteriormente (revisado en

Hohmann y Mager, 2003). Existe una relación de antagonismo entre la ruta de la PKA y la respuesta general a estrés (Smith y col., 1998): la PKA inhibe la actividad de los factores transcripcionales Msn2/4p al impedir su hiperfosforilación y su translocación al núcleo (Görner y col., 1998).

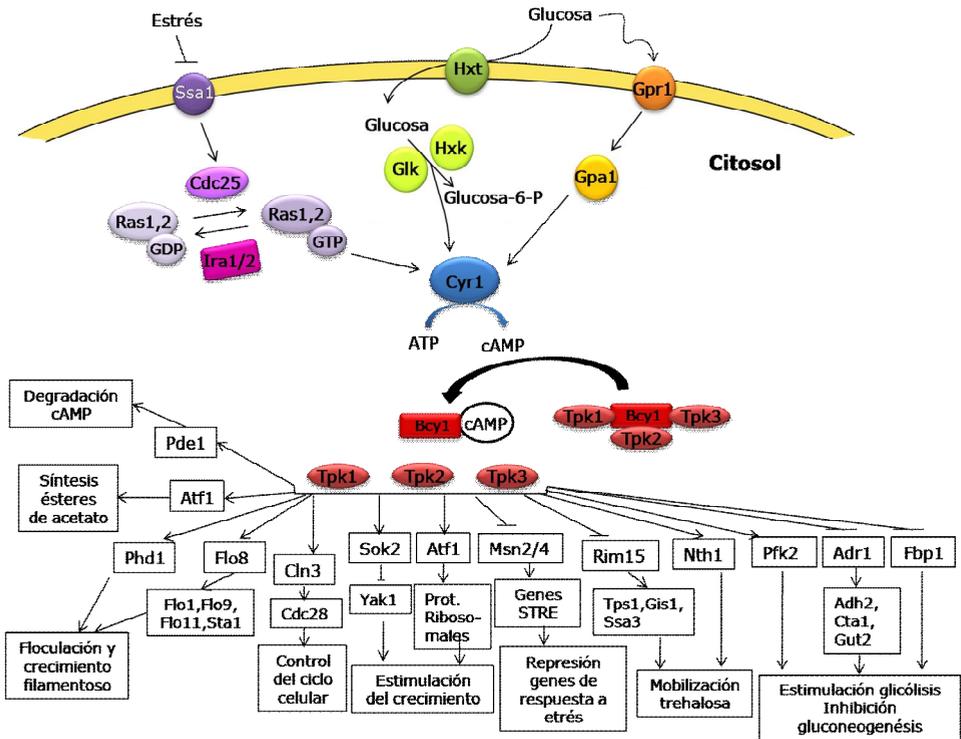


Figura I.6. Esquema de la ruta PKA. Adaptado de Estruch, 2000; Folch-Mallol y col., 2004 y Aguilera y col., 2007.

Otra ruta de transducción relacionada con la respuesta a la disponibilidad de nutrientes que, además, permite interconectar los mecanismos de represión por catabolito de carbono y de nitrógeno (revisado en Hohmann y Mager, 2003), es la ruta TOR (*Target of Rapamycine*), mostrada en la Figura I.7. Esta ruta activa un programa de crecimiento celular en respuesta a nutrientes como carbono y nitrógeno (Barbet y col., 1996; Thomas y Hall, 1997; Noda y Ohsumi, 1998; Beck y Hall, 1999).

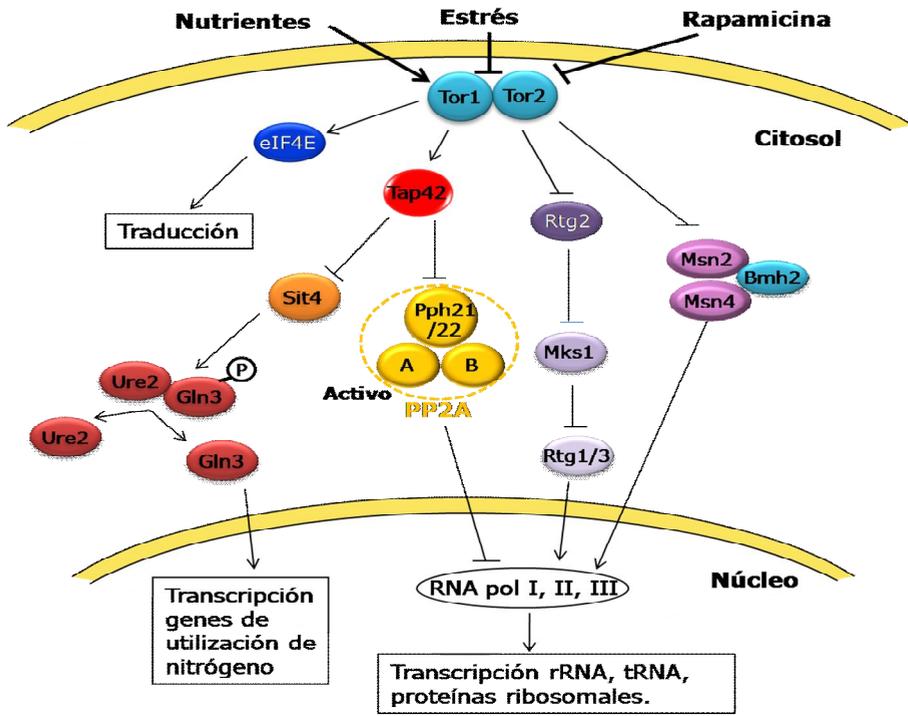


Figura I.7. Esquema de la ruta TOR. Adaptado de Estruch, 2000; Folch-Mallol y col., 2004 y Aguilera y col., 2007.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, las quinasas TOR están codificadas por *TOR1* y *TOR2*, y existen en forma de dos complejos multiproteicos funcionalmente diferentes: TORC1 (responsable de la sensibilidad a rapamicina) y TORC2 (Loewith y col., 2002). La inactivación de TORC1 por rapamicina desencadena la inducción de la transcripción de genes controlados por represión de catabolito de nitrógeno (Beck y Hall, 1999; Cardenas y col., 1999; Hardwick y col., 1999); estos cambios transcripcionales derivan fundamentalmente de la recolocación en el núcleo de los factores transcripcionales Gln3p, Msn2/4p y Rtg1p, controlados por TORC1 (Beck y Hall, 1999; Komeili y col., 2000). Cuando las proteínas TOR están activas la entrada de estos factores al núcleo está restringida por su asociación a las proteínas Ure2p (en el caso

de Gln3p, Beck y Hall, 1999; Bertram y col., 2000; Cardenas y col., 1999; Hardwick y col., 1999), Rtg2p (para Rtg1p y Rtg3p, Komeili y col., 2000) y Bhm1p y Bhm2p (en el caso de Msn2p y Msn4p, Beck y Hall, 1999).

Las principales dianas de TORC1 son los complejos Tap42p-fosfatasa (Di Como y Arndt, 1996; Düvel y col., 2003), localizados fundamentalmente en la membrana plasmática. La rapamicina disrumpe la interacción entre esos complejos y TORC1, lo que conduce a la activación de las fosfatasa asociadas a Tap42p (Yan y col., 2006); también afecta la asociación entre Tap42p y otra fosfatasa, Sit4p, que resulta también activada (Di Como and Arndt, 1996; Rohde y col., 2004).

Durante la fermentación alcohólica se puede dar una situación un tanto paradójica, en la que haya suficiente glucosa (o azúcares) disponible en el medio, pero algunos nutrientes, como el nitrógeno, el fósforo o el azufre se agoten. En estas condiciones la adición de los nutrientes limitantes determina una serie de cambios rápidos en la actividad de enzimas implicados en el metabolismo de la trehalosa y en la glicolisis (François y col., 1991; Crauwels y col., 1997; Moskvina y col., 1998; François y Parrou, 2001), así como la inducción de la transcripción de los genes ribosomales y una disminución de la de los genes controlados por STRE (Griffioen y col., 1994; Neuman-Silberberg y col., 1995; Griffioen y col., 1996; Winderickx y col., 1996; Boy-Marcotte y col., 1998). Estos cambios se engloban en una respuesta que ha sido designada como ruta FGM (*Fermentable Growth Medium-induced*) (Thevelein, 1994; Thevelein y de Winde, 1999; Thevelein y col., 2000). Aunque todos estos efectos parecen dependientes de la ruta de la PKA, no están mediados por un aumento en los niveles de cAMP (Hirimburegama y col., 1992) y ocurren independientemente de la fosforilación de los azúcares (Pernambuco y col., 1996). Se considera que la proteína quinasa Sch9p funcionaría como reguladora de la actividad de la PKA en la respuesta FGM, activando positivamente las tres subunidades catalíticas (Tpk1-3) libres de la misma (Jiang y col., 1998). De

este modo, Sch9p controla de forma independiente de cAMP características fenotípicas afectadas por la PKA (Crauwels y col., 1997; Thevelein and De Winde, 1999; Pascual-Ahuir y Proft, 2007). De hecho el análisis de los genes diana de las rutas cAMP-PKA y FGM revela que Sch9p puede actuar sinérgicamente o de forma opuesta a cAMP-PKA dependiendo de la diana considerada (Roosen y col., 2005).

Es importante resaltar que entre estas tres rutas (PKA, TOR y FGM) existen diversas conexiones. Así, PKA y TOR comparten dianas comunes en el control de la respuesta a estrés, la biogénesis de ribosomas y el metabolismo de los carbohidratos de reserva y Sch9p es sustrato del complejo quinasa TORC1 (Zabrocki y col., 2002). Por otro lado, las tres rutas controlarían la respuesta de las levaduras frente a condiciones de estrés a través de la quinasa Rim15p; así, en condiciones de disponibilidad de nutrientes la ruta PKA y Sch9p inhiben la localización nuclear de Rim15p, mientras que la ruta TOR provoca su localización citoplasmática (Pedruzzi y col., 2003; Roosen y col., 2005). Rim15p activa la transcripción de genes de respuesta a estrés a través de los factores transcripcionales Msn2/4p y Gis1p (Lenssen y col., 2002; Wei y col., 2008).

2.4. La respuesta a estrés durante la fermentación alcohólica

Para que el proceso de producción del vino avance de manera adecuada, es necesario que se den todo un conjunto de respuestas a los diferentes tipos de estrés que puedan ocurrir durante el mismo, descritos en el apartado 1.5.

Los primeros análisis transcriptómicos llevados a cabo con cepas vínicas se centraron en el estudio de un conjunto delimitado de genes durante las diferentes etapas de la producción del vino, fundamentalmente en el proceso de fermentación. Ahora bien, la aplicación de la tecnología de las micromatrices ha permitido enfocar los análisis hacia la comprensión de las bases moleculares de la adaptación de estas levaduras a las diferentes situaciones de

estrés que se dan durante el proceso de producción del vino. En este sentido, el primer estudio global (Rossignol y col., 2003), reveló cambios en la expresión de más de 2000 genes durante la vinificación. Algunos de los estudios de expresión génica con cepas vínicas se han llevado a cabo en mostos naturales, pero en la mayoría de los casos (como en el descrito de Rossignol y col., 2003) se ha recurrido a mostos sintéticos que mimetizan los naturales y permiten controlar la composición química, aumentando así la reproducibilidad de los experimentos. También se han publicado diversos análisis en levaduras vínicas en condiciones de laboratorio, así como en levaduras de laboratorio en situaciones adversas para el crecimiento características de la producción del vino, para entender los mecanismos de respuesta a condiciones particulares de estrés en mayor detalle y de forma aislada, aunque debe tenerse en cuenta que no siempre los datos de expresión génica son coincidentes en condiciones de laboratorio y de vinificación (Puig y Pérez-Ortín, 2000a,b; Carrasco y col., 2003).

Una descripción más detallada puede encontrarse en el Pérez-Ortín y García-Martínez (2005) y en Pérez-Ortín y col. (2009). Un grupo de genes estudiado en condiciones de vinificación ha sido el de los **glicolíticos**. Mediante análisis *Northern* en vinificaciones conducidas por la cepa T73 (Querol y col., 1992a), Puig y Pérez-Ortín (2000a), detectaron que estos genes se expresan a lo largo de todo el proceso pero existen diferencias en los niveles de mRNA tanto entre genes (alcanzando los máximos niveles los *TDH2/3*), como en función de los mostos utilizados, posiblemente debido a variaciones en la composición de los mismos. Estudios globales de expresión génica han mostrado cambios en la expresión de los genes glicolíticos en función del contenido en nitrógeno (Backhus y col., 2001) y en glucosa (Erasmus y col., 2003) de los mostos utilizados.

Otro aspecto muy estudiado mediante análisis de expresión génica ha sido el de la **respuesta a estrés osmótico al inicio de la vinificación**, porque, como ya se ha comentado ampliamente,

esta es una de las condiciones adversas que afecta en mayor grado a las levaduras durante la producción del vino. Pérez-Torrado y col. (2002a) en experimentos de vinificación con la cepa T73 en mostos sintéticos con diferentes concentraciones de azúcares observaron un incremento muy rápido y transitorio en la expresión del gen *GPD1* en medios con 20% de glucosa, mientras que otros genes de respuesta a estrés (*HSP12* y *HSP104*) mostraban durante las primeras horas de vinificación niveles de mRNA inferiores a los encontrados en el inóculo. En un estudio llevado a cabo con varias cepas vínicas comerciales y no comerciales con diferente comportamiento fermentativo sobre la expresión de 19 genes de respuesta a estrés se observó en la mayoría de ellos una disminución en los niveles de mRNA entre 1 y 6 horas tras la inoculación (Zuzuarregui y del Olmo, 2004b). Estos datos sugieren que la respuesta a estrés hiperosmótico al inicio de la vinificación puede presentar peculiaridades con respecto a la respuesta a otros tipos de estrés, probablemente por el efecto de la glucosa y del pH.

La respuesta a este tipo de estrés ha sido objeto también de estudios de expresión génica global, como se ha comentado en el apartado 2.2 de esta introducción. Se trata de los análisis de Kaeberlein y col. (2002), utilizando una cepa de laboratorio y cultivos pre-diluidos con OD_{600} entre 0,5 y 0,8, y de Erasmus y col. (2003) con células rehidratadas de una cepa vínica. En este último estudio se detectó una mayor expresión de diversos genes *HSP* en el medio con la concentración de glucosa más elevada. Estos resultados son diferentes a los obtenidos en los estudios descritos anteriormente sobre expresión de genes particulares de respuesta a estrés, pero es importante señalar que se ha descrito una dependencia de los patrones de expresión génica en función del estado metabólico en el inóculo, de la naturaleza del osmolito responsable del estrés osmótico (Pérez-Torrado y col., 2002a), y de variaciones en el pH (entre 3 y 3,6) y en la temperatura (Zuzuarregui y col., 2005).

Dos estudios recientes se han centrado en la relación entre la respuesta transcripcional y la rehidratación previa a la inoculación en el mosto con elevada concentración de glucosa. En el primero de ellos (Rossignol y col., 2006), en el que la rehidratación se llevó a cabo en medio completo con glucosa, se observó una remodelación transcripcional sustancial: los genes implicados en procesos biosintéticos se encontraban inducidos, mientras que los regulados por represión por glucosa estaban reprimidos. Los genes que participan en la respuesta general a estrés también presentaban una disminución en sus niveles de expresión. En el segundo de los trabajos (Novo y col., 2007), se consideraron diferentes medios de rehidratación con la finalidad de separar los efectos de osmolaridad y de fuente de carbono. Este estudio indicó que la rehidratación de 30 minutos o una hora en agua no introducía ningún cambio relevante en la expresión génica global; en cambio cuando la rehidratación se llevaba a cabo en presencia de fuentes de carbono fermentables se activaba la expresión de genes implicados en la ruta fermentativa, y en la rama no oxidativa de los fosfatos de pentosa así como de otros relacionados con la biogénesis de ribosomas y síntesis de proteínas. Algunos de estos efectos eran similares a los descritos por Erasmus y col. (2003).

Con respecto a la implicación de rutas de transducción de señales en la respuesta a estrés osmótico en condiciones de vinificación, estudios llevados a cabo durante todo el proceso en células inoculadas en mostos sintéticos conteniendo 20% de glucosa, han indicado que la ruta HOG está operativa (Remize y col., 2003).

Otro aspecto muy estudiado de la expresión génica durante la vinificación es la entrada en **fase estacionaria**, que implica grandes cambios tanto a nivel transcriptómico como proteómico. Algunos estudios han permitido identificar genes indicadores de este cambio metabólico en condiciones de vinificación. Así, Riou y col. (1997) llevaron a cabo un análisis *Northern* con la cepa V5 (una cepa vínica no usual) en el que se estudió la expresión de 19

genes -que previamente habían sido caracterizados como propios de fase estacionaria en cepas de laboratorio- en condiciones de crecimiento de laboratorio y en melazas. Los resultados obtenidos fueron similares para algunos de los genes estudiados (*HXK1*, *HXT3*, *THI4*, *UBI4*, *HSP104* y *HSP78*), cuya expresión se incrementaba al entrar en fase estacionaria y que podrían ser utilizados como marcadores de fases tardías de vinificación. En un estudio posterior, el mismo grupo de investigación extendió esta misma metodología a 99 del cromosoma III (Rachidi y col., 2000), detectando dos genes (*PAU3* y *ADH7*) que se expresan específicamente en fase estacionaria en condiciones enológicas. Por otro lado, utilizando la información derivada del estudio transcriptómico global durante el cambio diáuxico en cepas de laboratorio llevado a cabo por DeRisi y col. (1997), Puig y Pérez-Ortín (2000b) identificaron un nuevo gen de función desconocida denominado *SPI1*, expresado activamente durante las fases tardías en condiciones de vinificación. Es interesante resaltar que las peculiaridades en el control transcripcional de este gen han permitido utilizar su promotor para introducir cambios en la expresión de algunos genes con finalidades biotecnológicas (Cardona y col., 2007; Jiménez-Martí y col., 2009). En otro estudio se consideró la respuesta a estrés en seis cepas industriales utilizando *Dot blots* de DNA conteniendo sondas para 19 genes de resistencia a diversas condiciones de estrés que fueron hibridados con muestras de cDNAs obtenidas en diversos puntos a lo largo de la primera mitad de la vinificación. Los resultados indicaron una expresión coordinada en todas las cepas de los genes activados por ausencia de nutrientes *SPI1*, *YGP1*, *CAR1* y *COX6* coincidiendo con la entrada en fase estacionaria (Zuzuarregui y del Olmo, 2004b).

Uno de los factores que aparece muy ligado a la entrada en fase estacionaria durante el proceso de vinificación es la **limitación de nitrógeno**. Cuando se agota el nitrógeno cesa el crecimiento antes de que la fermentación se complete (revisado en Pretorius, 2000), por lo que una estrategia habitual en bodegas es

la adición de fuentes nitrogenadas a los mostos, habitualmente en forma de fosfato de diamonio (DAP). En el trabajo llevado a cabo por Rossignol y col. (2003) se detectó que en la entrada en fase estacionaria un grupo de genes reprimidos por catabolito de nitrógeno veían aumentada su expresión, de acuerdo con la limitación de nutrientes; en un estudio anterior de Backhus y col. (2001), se observó una represión de estos genes debida a las condiciones experimentales de exceso de arginina, pero cuando había limitación de este aminoácido se observaba un aumento del caso de los genes *CAR1*, *CAR2*, *DAL4* y *DAL5*. Este análisis indicó también que en vinificaciones llevadas a cabo en medios con bajas concentraciones de nitrógeno (en forma de arginina concretamente) se observaba una sobreexpresión de algunos genes reprimidos por glucosa, a pesar de las elevadas concentraciones de azúcar disponibles; este resultado ha sido descrito también en otros estudios de expresión génica a lo largo de la vinificación (Zuzuarregui y col., 2006; Mendes-Ferreira y col., 2007).

Diversos estudios transcriptómicos se han centrado en la respuesta de las levaduras a la limitación y adición de nitrógeno. Marks y col. (2003) describieron que 350 genes estaban afectados por la adición de fosfato de diamonio a mosto Riesling en fases tardías de la vinificación, cuando no hay un crecimiento activo de las levaduras: los genes implicados en el transporte de moléculas pequeñas y en la biosíntesis de urea aparecían con menor expresión, mientras que aquéllos relacionados con el metabolismo de aminoácidos y purina, síntesis de proteínas ribosomales y asimilación de azufre se encontraban con niveles de expresión superiores, sugiriendo una activación metabólica asociada a la adición de fuente nitrogenada. Un estudio más exhaustivo fue llevado a cabo por Mendes-Ferreira y col. (2007a,b), que analizaron la respuesta transcriptómica global de *S. cerevisiae* en condiciones de vinificación con diferentes concentraciones de nitrógeno inicial y en varias fases de la vinificación (con situaciones de limitación o agotamiento de nitrógeno y adición de

fosfato de diamonio). Se observó cambios en el 70% aproximadamente del transcriptoma de la levadura, en los que la concentración de nitrógeno tenía un papel decisivo. De acuerdo con los datos obtenidos en dicho estudio, la respuesta inicial a la limitación de nitrógeno vendría definida por una inducción de los genes implicados en el metabolismo respiratorio, seguida de una represión general de los genes asociados al catabolismo; sorprendentemente, se observa un ligero aumento en la expresión de los genes que codifican proteínas ribosomales e implicadas en la biogénesis de ribosomas. Los resultados encontrados permitieron identificar 36 genes altamente expresados en bajas concentraciones de nitrógeno o tras el agotamiento del mismo, que podrían ser útiles para predecir deficiencias de nitrógeno y así diagnosticar retrasos o paradas fermentativas (Mendes-Ferreira y col., 2007b). Este análisis transcriptómico también reveló que la adición de nitrógeno a vinificaciones limitantes, conducía al incremento en la expresión de los genes implicados en glicolisis, metabolismo de la tiamina y rutas energéticas (Mendes-Ferreira y col., 2007a), resultados similares a los que obtuvieron Marks y col. (2003) tras la adición de fosfato de diamonio.

No sólo es relevante la disponibilidad de nitrógeno, sino la naturaleza de las fuentes nitrogenadas disponibles. Según se ha expuesto anteriormente, las fuentes de nitrógeno se han definido como "buenas" o "malas", según permitan una fermentación más o menos rápida, respectivamente. Cada tipo específico de fuente de nitrógeno puede derivar en una respuesta específica (lo que se podría denominar una "firma de transcritos") en una cepa de levadura (Boer y col., 2007).

También se ha realizado estudios transcriptómicos globales en vinificaciones llevadas a cabo a **bajas temperaturas** con la finalidad de mejorar las propiedades organolépticas de los vinos. La expresión génica comparada entre 13°C y 25°C, ha indicado que durante las primeras etapas de la fermentación a 13°C hay una mayor expresión (comparada con la encontrada a 25°C) de los genes implicados en el ciclo celular, el control del crecimiento y el

mantenimiento de las etapas intermedias y finales, así como de los genes mitocondriales encargados de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena corta (Beltrán y col., 2006).

En esta revisión sobre la respuesta a estrés durante la producción del vino no se puede olvidar la condición adversa que representa el **incremento progresivo de la producción de etanol**. Un estudio global en una cepa de laboratorio aplicando un estrés por etanol a tiempos cortos (Alexandre y col., 2001) reveló que la respuesta a la adición de etanol no determina únicamente el incremento en la expresión de genes de respuesta a estrés térmico, sino también de otros muchos, implicados, por ejemplo, en la homeostasis iónica o en la defensa antioxidante. Dado el solapamiento entre diferentes condiciones de estrés durante la vinificación es muy difícil determinar cómo responden las levaduras en particular a esta condición adversa en el contexto de este proceso. Sin embargo, algunos datos obtenidos en condiciones de vinificación o en procesos de elaboración de vinos de Jerez o de sake pueden aportar algunos datos. Así, Backhus y col. (2001) y Rossignol y col. (2003) han observado cambios durante la vinificación en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos, fosfolípidos y ergosterol, que podrían estar asociados al incremento en la producción de etanol. Por otro lado, Hirasawa y col. (2007) han descrito que la adición de triptófano o la sobreexpresión de los genes implicados en la biosíntesis de este aminoácido confieren tolerancia a etanol a levaduras vínicas que intervienen en la elaboración de sake. Finalmente, en levaduras de flor, implicadas en el envejecimiento biológico de los vinos de Jerez y enfrentadas a estrés debido a las altas concentraciones de etanol y acetaldehído, se ha observado un incremento importante en la expresión los genes *HSP12/26/82/104* tras la adición de etanol y/o acetaldehído (Aranda y col., 2002).

Todavía es difícil describir un mecanismo molecular específico a la respuesta a estrés por etanol, puesto que los trabajos realizados difieren mucho en las cepas utilizadas y en las

condiciones experimentales seguidas. Sin embargo, recientemente, Stanley y col. (2009) en un artículo de revisión sobre la respuesta de *S. cerevisiae* a este tipo de estrés han sugerido la importancia del mantenimiento de la producción de energía, con una mayor expresión de los genes implicados en glicolisis y función mitocondrial y una menor expresión de los relacionados con el crecimiento. También han señalado la relevancia de los genes que intervienen en las funciones vacuolares y en la biosíntesis de aminoácidos en la tolerancia a este tipo de estrés.

Es importante señalar que otro estudio de naturaleza global (Marks y col., 2008) ha permitido detectar en condiciones de vinificación una nueva respuesta adaptativa a largo plazo que se ha denominado FSR (*Fermentation Stress Response*). Incluye genes de muy diversas naturaleza, entre los que se encuentran los de respuesta a estrés y numerosos de función desconocida (un 28% de los encontrados). Los autores de este estudio proponen que el etanol podría actuar como una señal que activara una ruta de transducción de señales aún no identificada dando lugar así a la regulación de genes en la FSR.

Por último, también existen algunos datos sobre la expresión génica durante las **fases de propagación de biomasa de levaduras vínicas y deshidratación** para obtener la levadura seca activa, es decir, la etapa que precede la rehidratación e inoculación en el mosto. En simulaciones a escala de laboratorio de estos procesos Pérez-Torrado y col. (2005, 2009) y Garre y col. (2010) han estudiado mediante *Northern blot* y RT-PCR en tiempo real, la expresión de una batería de genes marcadores de distintas condiciones de estrés (*TRX2*, *STI1*, *HSP12*, *GPD1*, *CUP1*, *GLO1*, *CTT1*, *GSH1*, *YGP1*, *GRE2*, *GRX5*, *TSA1* *TRR1*). Estos análisis han permitido identificar la respuesta frente a estrés oxidativo como la más relevante para la eficiencia fermentativa de los inóculos comerciales obtenidos, tanto durante el crecimiento de las levaduras como durante la deshidratación.

En general, los genes de respuesta a estrés se encuentran más expresados en las cepas vínicas, aunque esto depende de la

ruta en la que esté implicado el gen sujeto de estudio. Como se ha descrito en el caso de la limitación de nitrógeno, algunos genes pueden ser buenos indicadores del estado de la fermentación, gracias a los niveles diferenciales que se puede encontrar en las diferentes etapas de la vinificación. Es importante señalar que algunos de los estudios llevados a cabo sobre expresión génica han permitido establecer una cierta correlación entre respuesta a estrés en levaduras vínicas, y capacidad para llevar a cabo las diferentes etapas de producción del vino (Ivorra y col., 1999; Aranda y col., 2002; Zuzuarregui y del Olmo, 2004a,b; Garre y col., 2009; Pérez-Torrado y col., 2009).

3. Manipulaciones genéticas en levaduras vínicas

3.1. *Características genéticas de las levaduras vínicas*

Las cepas vínicas se diferencian de las de laboratorio en varios aspectos. El primero de ellos es el grado de ploidía de ambos tipos de cepas; mientras que las cepas de laboratorio son haploides o diploides y presentan longitudes cromosómicas definidas, la mayoría de las cepas vínicas son diploides, poliploides o aneuploides (Bakalinsky y Snow, 1990; Codón y col., 1998) y presentan un alto grado de polimorfismo en las longitudes cromosomales (Bidenne y col., 1992; Rachidi y col., 1999). La ploidía podría suponer ventajas para adaptarse a entornos cambiantes (como es el de la fermentación alcohólica), ya que puede verse aumentada la dosis de algunos genes importantes en la respuesta a estos entornos (Bakalinsky y Snow, 1990). Sin embargo, estas diferencias condicionan, en parte, las posibilidades de manipulación genética, dado que para conseguir una delección génica es necesario, al menos, eliminar dos copias de un gen.

Por otro lado, las cepas de laboratorio son heterotálicas (ho), de manera que el locus *MAT* es estable y pueden existir en forma haploide con sexo definido a o α hasta que se encuentren con células de tipo sexual distinto, momento en el cual pueden

conjugar y dar cepas diploides (revisado en Sprague, 1983). Las cepas vínicas son homotálicas (HO), es decir, no existen de forma estable en su estado haploide, y tras esporular pueden cambiar de sexo, conjugando con las células de tipo sexual opuesto, dando entonces células diploides homocigóticas para todos los genes excepto para el locus *MAT* (Thornton y Eschenbruch, 1976).

También se debe señalar que las cepas vínicas muestran una elevada tasa de heterocigosis (Barre y col., 1993; Codón y col., 1995). Además, presentan una alta capacidad de reorganización de sus cromosomas durante el crecimiento mitótico mediado por elementos Ty (Longo y Vezinhet, 1993), entrecruzamiento (Aguilera y col., 2000) y conversión génica (Puig y Pérez-Ortín, 2000c), lo que impide el mantenimiento de la uniformidad génica de las levaduras vínicas (Snow, 1983; Pretorius, 2000).

Finalmente, otro aspecto diferencial importante es que mientras que las cepas de laboratorio pueden presentar auxotrofías, las cepas vínicas son protótrofas. Esta característica limita las posibilidades de manipulación de las levaduras vínicas, ya que hay que recurrir a la introducción de una auxotrofia previa a la manipulación de las levaduras vínicas o al uso de genes de resistencia a antibióticos como la cicloheximida (del Pozo y col., 1991) o la geneticina (Hadfield y col., 1990). Ahora bien, estos marcadores de resistencia deben de ser eliminados tras la transformación, ya que es requerimiento indispensable en la obtención de organismos GRAS (*Generally Recognized As Safe*) la ausencia de cualquier DNA exógeno.

3.2. Relevancia de las manipulaciones genéticas en levaduras vínicas

La calidad de la uva es un factor esencial en la obtención de un buen producto final, pero *S. cerevisiae* también influye de un modo muy destacado en las propiedades del mismo. Por este motivo, y a pesar de los problemas de manipulación de las

mismas, se ha propuesto todo un conjunto de posibilidades de mejora de las levaduras vínicas mediante ingeniería genética (Pretorius, 2000; Pretorius y Bauer, 2002). Las estrategias sugeridas, y en algunos casos llevadas a cabo, están dirigidas sobre todo a la reducción de los costes de producción y el empleo de tecnologías responsables con el medio ambiente, así como a la producción de vinos sanos, de alta calidad y con un alto grado de reproducibilidad. Las manipulaciones genéticas llevadas a cabo hasta el momento para la mejora de levaduras vínicas se pueden clasificar de acuerdo con sus objetivos en tres grandes grupos: i) eficiencia fermentativa (con el consiguiente efecto en el proceso industrial), ii) propiedades físico-químicas de los vinos y iii) propiedades saludables, nutricionales y organolépticas del producto final (pensando en este caso en los consumidores). Una revisión amplia de estas modificaciones se puede encontrar en Ramón (2005).

En relación con la **mejora de la capacidad fermentativa**, una de las estrategias diseñadas ha consistido en aumentar la acumulación de los carbohidratos de reserva glucógeno y trehalosa en la levadura seca activa (LSA) (Silljé y col., 1999), bien aumentando los niveles de expresión de los genes implicados en su biosíntesis (*GSY1* y *GSY2*, en el caso del glucógeno (Farkas y col., 1991), y *TPS1* y *TPS2*, en el de la trehalosa (Vuorio y col., 1993)), o bien eliminado los que participan en su movilización (*GPH1*, para el glucógeno (Hwang y col., 1989) y *NTH1* y *ATH1*, para la trehalosa (Nwaka y col., 1995; Nwaka y Holzer, 1998)). Así, la sobreexpresión regulada de *GSY2* ha permitido obtener cepas vínicas con mayor acumulación de glucógeno, viabilidad al final del proceso y capacidad fermentativa (Pérez-Torrado y col., 2002b). Otra estrategia en esta misma dirección ha consistido en sobreexpresar el enzima glicolítico gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, lo cual conduce a un acortamiento en la duración de la fermentación, aunque también introduce cambios en el perfil de volátiles y en el contenido alcohólico del vino (Remize y col., 1999).

Los mostos presentan, generalmente, una proporción equimolar de glucosa y fructosa, acumulándose esta última por el consumo preferente de la glucosa por parte de la levadura. La utilización de la fructosa es crítica para el mantenimiento de una alta tasa de fermentación al final del proceso de vinificación. Por este motivo se han estudiado cepas con capacidad incrementada de utilización de fructosa, y se ha identificado un alelo mutado del gen *HXT3* (codificante de un transportador de hexosas) cuya sobreexpresión permite alterar el patrón de utilización de este azúcar durante la fermentación (Guillaume y col., 2007).

Uno de los determinantes de retrasos y paradas fermentativas es la baja concentración de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables por la levadura. Una estrategia que ha mejorado la fermentación de mostos pobres en nitrógeno fácilmente asimilable, ha sido la interrupción del gen *URE2* (Salmon y Barre, 1998), uno de los implicados en la represión por catabolito de nitrógeno según se ha comentado en el apartado 2.3 de esta introducción.

Por otro lado, se han construido varias levaduras vínicas que contienen copias extra de genes que codifican factores *killer* distintos del que ya contenía la cepa (Lee y Hassan, 1988; Boone y col., 1990; Salek y col., 1990). Esta modificación permite a estas levaduras eliminar otros microorganismos que puedan interferir con el proceso de fermentación.

Otro aspecto clave en el proceso de vinificación es la clarificación y filtración del vino, para lo cual se utilizan enzimas pectinolíticas. Se ha construido una levadura vínica transgénica que contiene el gen *peIA*, codificante de pectato liasa, del hongo filamentoso *Fusarium solana* (González-Candelas y col., 1995); esta cepa secreta la actividad pectinolítica al mosto al mismo tiempo que lo fermenta, evitando así el uso de preparados enzimáticos pectinolíticos añadidos. Otra manipulación relacionada ha sido la mutación del gen *KNR4* (que codifica una proteína reguladora requerida para la correcta señalización a través de la MAPK StI2p), que permite una mayor liberación de manoproteínas

importantes para la clarificación y estabilización de vinos blancos, aunque los resultados dependen de la cepa vínica manipulada y de las condiciones en las que se realiza el experimento (González-Ramos y col., 2008). En este sentido, este mismo grupo de investigación ha introducido mutaciones en otros genes, como *GPI7*, *FSK1* y *GAS1*, en cepas vínicas y en condiciones de laboratorio, observando un aumento de los niveles de manoproteínas y, en algunas de ellas, mayores tasas fermentativas y un mayor grado de clarificación, aunque de nuevo dependiendo de la cepa utilizada (González-Ramos y col., 2009).

En cuanto a estrategias diseñadas para la **mejora de las propiedades físico-químicas de los vinos** se pueden señalar como especialmente relevantes las siguientes: (i) expresión del gen de la bacteria láctica *Lactobacillus casei* que codifica la L(+)-lactato deshidrogenasa, para incrementar la acidez de vinos de zonas con elevadas temperaturas (Dequin y Barre, 1994; Dequin y col., 1999); (ii) introducción en cepas vínicas de levadura de genes heterólogos codificantes de malato permeasas y enzimas maloláticas, con la finalidad de transportar el exceso de málico presente en mostos de regiones frías al interior de las levaduras para su conversión en lactato (Bony y col., 1997; Volscheck y col., 1997a,b); (iii) expresión del gen de *Aspergillus niger* que codifica la glucosa oxidasa, incrementando en la expresión de los genes *GPD1* y *GPD2* o la interrupción del gen *FPS1*, codificante del transportador de glicerol, para disminuir el grado alcohólico del vino (Michnick y col., 1997; Remize y col., 1999; De Barros Lopes y col., 2000; Eglinton y col., 2002; Malherbe y col., 2003).

Son numerosas las estrategias consideradas a lo largo de los últimos años para **mejorar las propiedades nutricionales y organolépticas del vino**. Desde el punto de vista nutricional, se ha descrito una relación entre un consumo moderado de vino y la reducción del riesgo de sufrir enfermedades coronarias, así como un mayor control frente a situaciones de estrés; estas propiedades parecen estar relacionadas con ciertos compuestos fenólicos, entre los que destaca el resveratrol, procedente de la piel de la uva y

con características anticolesterolémicas y antitumorales *in vitro*. La expresión en una levadura vínica de un gen de la levadura *Candida molischiana* que codifica una β -glucosidasa ha permitido obtener productos con mayor contenido en resveratrol (González-Candelas y col., 2000). En los vinos también hay sustancias perjudiciales para la salud de los consumidores, como es el etilcarbamato (que puede resultar carcinogénico), las aminas biogénicas (que pueden ser neurotóxicas) o el sulfito (que puede conducir a alergias); se han desarrollado levaduras, en las cuales se ha reducido significativamente la presencia de estos compuestos en el vino (revisado en Pretorius y Bauer, 2002; Pretorius, 2003).

Por otro lado, se ha prestado una atención muy especial a las propiedades organolépticas del vino (color, densidad, sabor, aroma, etc.) en las manipulaciones genéticas. Aunque como se ha comentado con anterioridad, las características varietales de la uva ejercen una gran influencia sobre estas propiedades, también es importante el metabolismo de la levadura en el conjunto final de las mismas, sobre todo en la generación de compuestos volátiles que determinan el aroma secundario. Por tanto, la manipulación de los genes implicados en la biosíntesis de estos compuestos y en la regulación de estas rutas, son dianas susceptibles para modular su producción (Lambrechts y Pretorius, 2000; Lilly y col., 2000). Ejemplos en este sentido son: la sobreexpresión del gen *ATF1* para incrementar la producción de ésteres volátiles (Lilly, 2000); la manipulación de los genes *BAT*, que codifican transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada (Lilly y col., 2006); la expresión en levaduras de genes de hongos codificantes de enzimas hidrolíticas que contribuyen a la liberación de terpenos a partir de sus precursores glicosidados (Pérez-González y col., 1993; Sánchez-Torres y col., 1996, 1998; Ganga, 1999; Manzanares, 2003); la modificación de la ruta de biosíntesis de isoprenoides con la finalidad de excretar eficientemente linalool (Herrero y col., 2008); la sobreexpresión de los genes implicados en el metabolismo o el transporte de aminoácidos ramificados *LEU4*, *LEU2*, *BAT2* y *BAP2* con el efecto de aumentar los niveles de

alcohol isoamílico (Eden y col., 2001; Kodama y col., 2001; Yoshimoto y col., 2002a), o la sobreexpresión en una cepa vínica comercial del gen *tnaA* de *Escherichia coli* (codificante de una actividad cisteína- β -liasa), que incrementa considerablemente los niveles de tioles volátiles y produce un aroma intenso a fruta de la pasión (Swiegers y col., 2007). Dado que algunos compuestos de azufre pueden influir negativamente en el aroma del vino, también se ha llevado a cabo mutagénesis de genes implicados en su síntesis, como por ejemplo el codificante de la sulfito reductasa Met10p (Cordente y col., 2009).

Uno de los compuestos más importantes en la formación del “cuerpo” del vino es el glicerol, ausente en los mostos. Se ha desarrollado toda una serie de estrategias con la intención de incrementar de manera óptima su concentración, evitando la acumulación colateral de otras sustancias indeseables en el vino (Michnick y col., 1997; Remize y col., 1999; De Barros Lopes y col., 2000; Eglinton y col., 2002). Dada la relación entre el glicerol y la resistencia a estrés consideraremos este aspecto con mayor detenimiento en el apartado siguiente.

3.3. Descripción de manipulaciones genéticas relacionadas con la respuesta a estrés

Debido a la correlación existente entre la respuesta a diversas condiciones de estrés, los niveles de expresión génica y el comportamiento fermentativo de las levaduras vínicas en las diferentes etapas del proceso (Ivorra y col., 1999; Aranda y col., 2002; Zuzuarregui y del Olmo, 2004a,b; Garre y col., 2009; Pérez-Torrado y col., 2009), así como al conocimiento de los mecanismos de respuesta a estrés, muchas de las manipulaciones génicas llevadas a cabo en las levaduras vínicas están relacionadas con los genes implicados en estos mecanismos. Estas estrategias constituyen una metodología adicional a las comentadas en el apartado anterior para la mejora de la eficiencia fermentativa de las levaduras.

Una de las primeras modificaciones que se llevó a cabo en este sentido fue la sobreexpresión del gen *GPD1*, que conducía a una sobreproducción de glicerol e incrementaba la tasa de fermentación en fase estacionaria (Remize y col., 1999). Esta modificación daba lugar también a un incremento indeseado en los niveles de acetato. Posteriormente la sobreexpresión de este gen se llevó a cabo en una cepa vínica comercial que tenía delecionadas las dos copias del gen *ALD6* (que codifica la aldehído deshidrogenasa citosólica dependiente de NADP^+ y activada por Mg^{2+}); en este caso el azúcar se derivaba eficientemente hacia la producción de glicerol, la concentración de acetato se mantenía en valores similares a los de una cepa silvestre, los niveles de etanol eran un 15-20% inferiores, pero la acetoina se acumulaba en niveles considerables debido a una reducción ineficiente a 2,3-butanediol (Cambon y col., 2006). La sobreexpresión en esta cepa del gen *BDH1*, que codifica la 2,3-butanediol deshidrogenasa dependiente de NADH , ha permitido redireccionar alrededor del 85-90% de la acetoina acumulada a 2,3-butanediol, un compuesto con características sensoriales neutras, así como reducir los niveles de diacetilo, un compuesto responsable de propiedades organolépticas indeseables, a la mitad (Ehsani y col., 2009).

Otra diana de manipulación relacionada con la respuesta a estrés ha sido el gen *MSN2*. Para evitar defectos de crecimiento debidos a su sobreexpresión, Cardona y col. (2007) optaron por situarlo bajo el control del promotor del gen *SPI1*. Este gen se induce en fase estacionaria (Puig y Pérez-Ortín, 2000b) y bajo ciertas condiciones de estrés (Gasch y col., 2000) y durante la vinificación sus niveles más elevados de expresión se detectan en las últimas etapas, cuando el crecimiento no es relevante (Puig y Pérez-Ortín, 2000b; Rossignol, 2003). Al cambiar el promotor de *MSN2* en alguna de sus copias genómicas por el de *SPI1* se observó una mejora de la resistencia a diversas condiciones de estrés en la cepa vínica modificada, así como una disminución de la fase de latencia en la vinificación.

En relación con la modulación de la respuesta a estrés no se puede olvidar que desde la mitad del proceso las levaduras vínicas han de enfrentarse a concentraciones elevadas de etanol, con los consiguientes efectos tóxicos en las membranas, tanto por los cambios en su composición en esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga como por la alteración de la actividad ATPasa bombreadora de protones (Leao y van Uden, 1984; Sun y Sun, 1985; Cartwright y col., 1986; Dombeck e Ingram, 1986; Goldstein, 1987; Nabais y col., 1988; Cartwright y col., 1989; Rosa y Sá-Correira, 1991; Kunkee y Bisson, 1993). Por este motivo, se ha planteado el interés de utilizar como dianas en la mejora a la resistencia a etanol genes implicados en el metabolismo de estos tipos de lípidos, así como otros codificantes de la ATPasa de membrana (*PMA1* y *PMA2*) (Pretorius y Bauer, 2002). Se han conseguido cepas capaces de producir más etanol mediante la sobreexpresión de manera simultánea del factor transcripcional general Spt15p y la subunidad Spt3p de los complejos reguladores SAGA, los cuales están implicados en la activación transcripcional de algunos de los genes dependientes de la RNA-polimerasa II; estas cepas, además, presentan una mayor tolerancia a dicho alcohol y a estrés osmótico (Hou y col., 2009).

También se ha modificado en una levadura vínica comercial la expresión del gen *TRX2*, que codifica una tioredoxina citoplasmática, una de las defensas antioxidantes celulares más importantes. Esta cepa modificada presenta niveles menores de daño oxidativo que su cepa parental después de la producción de biomasa seca y, además, muestra una mayor capacidad fermentativa (Pérez-Torrado y col., 2009).

Objetivos

El desarrollo de esta Tesis Doctoral se planteó con la finalidad de entender la respuesta de las levaduras, particularmente las vónicas, a dos condiciones de estrés de interés desde el punto de vista biotecnológico: el estrés osmótico provocado por la elevada concentración de azúcares al inicio de la vinificación y la limitación de nitrógeno a medida que transcurre la misma. De acuerdo con esto se consideraron los siguientes objetivos principales:

1. Análisis de la respuesta de la levadura *S. cerevisiae* al agotamiento de nitrógeno y a la adición de diferentes fuentes nitrogenadas, considerando los efectos sobre el comportamiento fermentativo, la actividad arginasa, la producción de compuestos organolépticos y la expresión génica a nivel específico de ciertos genes y a nivel global.
2. Estudio de la repuesta transcriptómica global de una cepa de laboratorio de la levadura *S. cerevisiae* al estrés hiperosmótico causado por elevadas concentraciones de glucosa. Se pretendía también entender la implicación de las principales rutas de trasducción de señales en respuesta a este tipo particular de estrés así como identificar genes relevantes para la adaptación al mismo.
3. Análisis transcriptómico comparativo entre dos cepas de *S. cerevisiae*: una de laboratorio (W303 diploide) y una vónica (ICV16) en elevadas concentraciones de glucosa, con la finalidad de determinar posibles determinantes moleculares en la adaptación de las levaduras vónicas al crecimiento en dichas condiciones.
4. Estudio comparativo del efecto de la preadaptación de cepas vónicas que presentan problemas al inicio de la vinificación en medios con diferente contenido en glucosa sobre la capacidad fermentativa.

5. Análisis de la relevancia de la sobreexpresión de los genes de respuesta a estrés *HSP26* e *YHR087W* en plásmidos episomales y centroméricos, así como de la sustitución del promotor en al menos una de sus copias genómicas por el de los genes *SPI1* o *PGK1*, para la respuesta a estrés y el comportamiento fermentativo de las cepas vínicas ICV16 e ICV27.

Materiales y métodos

1. MATERIALES

1.1. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla M.1:

Tabla M.1. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pUG6	Plásmido que contiene el gen marcador de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias <i>LoxP</i>	Güldener y col., 1996
YEp351-cre-cyh	Plásmido con marcador <i>CYH^R</i> que contiene el gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor <i>GAL1</i>	Delneri y col., 2000
YEp352	Vector episomal lanzadera con marcador <i>URA3</i> .	Hill y col., 1986
YEp352- <i>HSP26</i>	Plásmido derivado de YEp352 conteniendo el gen <i>HSP26</i> .	A. Zuzuarregui, Tesis Doctoral
YEp352- <i>YHR87W</i>	Plásmido derivado de YEp352 conteniendo el gen <i>YHR087W</i> .	A. Zuzuarregui, Tesis Doctoral
pRS316	Vector centromérico con marcador <i>URA3</i> .	Sikorski y Hieter, 1989
pRS316- <i>HSP26</i>	Plásmido derivado de pRS316 conteniendo el gen <i>HSP26</i> .	Este trabajo
pRS316- <i>YHR087W</i>	Plásmido derivado de pRS316 conteniendo el gen <i>YHR087W</i> .	Este trabajo

1.2. Oligonucleótidos

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se muestra en la Tabla M.2, junto con la finalidad de los mismos.

Tabla M.2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Utilización
25S-D	GGAAGCTCCGTTTCAAAGG	Obtención de sonda de rDNA 25S
25S-R	AGAGCCAATCCTTATCCCG	"
ACT1-1	GGATCTTCTACTACATCAGC	PCR/RT-PCR de <i>ACT1</i>
ACT1-2	CACATACCAGAACC GTTATC	"
ACA1-a	TTTGCTACAAGTCCAGA	Obtención de sonda de <i>ACA1</i>
ACA1-b	CATATAGACTGGAGCTGCGT	"
ADE2-A	GCTGCTCACTTGCCAGGTAT	RT-PCR de <i>ADE2</i>
ADE2-B	ACGGTAGCTACTGGAACACC	"
AGP1-a	GTCTCTATACGAAGTAAAAG	RT-PCR de <i>AGP1</i>
AGP1-b	TGTTGCTTCTACTTCATCCT	"
ALD3-1	CCACTCATCTTAAATCCGCC	RT-PCR de <i>ALD3</i>
ALD3-2	CTTACAAGATACTATGCGGG	"
AQY1-1	TCTTCGAACGATTTCGAAC	RT-PCR de <i>AQY1</i>
AQY1-2	TTAGACTTCAGCCACAGCA	"
ARG1-a	GGGAAAAGTTTGTGGCTT	RT-PCR de <i>ARG1</i>
ARG1-b	CTTCACCTTTGGTTTTTTGG	"
ARG4-a	CGGCACATCAAAAATATGGG	RT-PCR de <i>ARG4</i>
ARG4-b	GGGATTTCAAATTATCC	"
ATP2-a	CTATATACTGCTACATCCCG	RT-PCR de <i>ATP2</i>
ATP2-b	GGCTTCAGCGGCTAACTTTT	"
CDC60-A	GATATCGCGTTTGAACACGAA	RT-PCR de <i>CDC60</i>
CDC60-B	GCATTACACCACTAGCTTCAC	"
CIT1-a	TGTCAGCGATATTATCAACAA	RT-PCR de <i>CIT1</i>
CIT1-b	CGATTTTCTTTACCAACT	"
COX4-a	TGCTTTCCTACTACGTCAATC	RT-PCR de <i>COX4</i>
COX4-b	GGTGGTCATCATTTGGAACA	"
ERG10-1	TATCGACTGCCAGAAC	Obtención de sonda de <i>ERG10</i>
ERG10-2	CATTACAAATGGCGGC	"
ERG10-A	GACCCATCTAAGGTTAATGT	RT-PCR de <i>ERG10</i>
ERG10-B	ATAGCAGTGAACAACCACT	"
FSP1-A	GCTTCCATGGCTTATCAG	RT-PCR de <i>FSP1</i>

Materiales y métodos

FSP1-B	AATGATGATGATGCACCC	RT-PCR de <i>FSP1</i>
GAD1-a	GTTACACAGGCACGGTTCTA	Obtención de sonda de <i>GAD1</i>
GAD1-b	CCTCTATAGTTTCTCGTTG	"
GAP1-a	ACTTCTTCGTACGAGAGG	RT-PCR de <i>GAP1</i>
GAP1-b	CACCAGAAATTCAGATTC	"
GDH1-a	GAGCCAGAATTTCAACAAGC	Obtención de sonda de <i>GDH1</i>
GDH1-b	CACCTTGGTCAAACATAGCA	"
GPD1-1	TTGAATGCTGGTAGAAAG	Obtención de sonda de <i>GPD1</i>
GPD1-2	TGACCGAATCTGATGATC	"
GPD1-1Q	GTTGCTAATCCAGACTTG	RT-PCR de <i>GPD1</i>
GPD1-2Q	AGATAGCTCTGACGTGTG	"
GPD2-A	GCTGGTGTGCAGATCTGAT	RT-PCR de <i>GPD2</i>
GPD2-B	GCGGATTGACCGTTAAGCAA	"
GUP1-A	GGAGAGCTTGGCATAGAA	RT-PCR de <i>GUP1</i>
GUP1-B	TTTAGTTCGATGTCATGCC	"
HSP26-1	GTCATCACTTTTGCCAGACTAC	RT-PCR de <i>HSP26</i>
HSP26-2	ACCTCAATCTTCTGACGTGG	"
HSP26-3	GGCATCAACTTCGTTG	Comprobación de la inserción en el genoma de la sustitución del promotor de <i>HSP26</i> por el de <i>SPI1</i> o <i>PGK1</i>
HSP26-5	CTAAACGGCTCTCTACTA	"
HSP26-a	ATGTTTTCAAGTCTCCGTTTCAATAT TCTGCGCACATCAATCATCGTACG CTGCAGGTCGAC	Obtención del cassette para la sustitución del promotor de <i>HSP26</i> por el de <i>SPI1</i>
HSP26-b	ATGTTGTCAAAGAAATCAAAAAAT GGACTGTAAATGACATGATTAGT AATAGTACTG	"
HSP26-f	ATGTTGTCAAAGAAATCAAAAAAT GGACTGTAAATGACATGGCAGGT CGACTGTTTTA	Obtención del cassette para la sustitución del promotor de <i>HSP26</i> por el de <i>PGK1</i>

HSP26-g	ATGTTTTTCAGTCTCCGTTTCAATAT TCTGCGCACATCAATCACCCTAG TGGATCTGATA	Obtención del cassette para la sustitución del promotor de <i>HSP26</i> por el de <i>PGK1</i>
HSP26-P	TGCACCGTTGAACCTGTA	Amplificación de la región codificante y parte del promotor de <i>HSP26</i>
HSP30-1	GAACGATACGCTATCAAGC	RT-PCR de <i>HSP30</i>
HSP30-2	TAAGCAGTATCTTCGACAGC	"
HSP78-A	GTTGGGTGATGATGGTAAGA	RT-PCR de <i>HSP78</i>
HSP78-B	GCCAATCCTTCGCTTCATCA	"
HSP104-1	GCGGTCTTACCGATACCTGG	RT-PCR y obtención de sonda de <i>HSP104</i>
HSP104-2	GACTGAGCAGGCTCGTCAAGG	"
IPP1-a	CGAATGGTTCAGAATTT	Obtención de sonda de <i>IPP1</i>
IPP1-b	GTCAATTGGAGCATCTG	"
IPP1-F	AAGAACAAGAAGTACGCTTTGG	RT-PCR de <i>IPP1</i>
IPP1-R	TTGGAGCATCTGCCTTTGG	"
IURA3	TACAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCC GCATCTTCTCAAATATAGGCCACT AGTGGATCTG	Interrupción del gen <i>URA3</i> en cepas vínicas
IURA3B	ATGCTTCCCAGCCTGCTTTTCTGT AACGTTCCACCCTCTACATAGGCCA CTAGTGGATCT	"
IURA5	ATGTCGAAAGCTACATATAAGGAA CGTGCTGCTACTCATCCGTACGCT GCAGGTCGAC	"
IURA5B	CTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTAT TTAATATCATGCACGACGTACGCT GCAGGTCGAC	"
K2	CTACCTTTGCCATGTTTCAG	Comprobación de la construcción e integración en el genoma de los cassettes <i>Kan</i> -promotor <i>SPI1</i>
K3	CCTCGACATCATCTGCC	Comprobación de la construcción e integración en el genoma de los cassettes <i>Kan</i> -promotor <i>SPI1</i>
K3inv	GGGCAGATGATGTCGAG	"
MEP2-A	TTTACAGGTACGCCTACAGG	RT-PCR de <i>MEP2</i>

Materiales y métodos

MEP2-B	TGGTCAGTGTTCTTAGTAG	RT-PCR de <i>MEP2</i>
MET3-a	TGCCTGCTCCTCACGGTGG	RT-PCR de <i>MET3</i>
MET3-b	AGTTCTTACCTGGGCCCGC	"
MIS1-a	TATTGAGTAACTCGAGGG	RT-PCR de <i>MIS1</i>
MIS1-b	ATCTGTGGAACCCATCAA	"
MSC1-a	TAATGCGGTTTCCGCAT	RT-PCR de <i>MSC1</i>
MSC1-b	TAGCTCGTCCTTGCTTT	"
MUP1-a	TGTCGGAAGGAAGAACGTTT	RT-PCR de <i>MUP1</i>
MUP1-b	CAGCGATTTTTCTTGTTCACT	"
ODC1-a	TATACCAGTTCACAGCC	RT-PCR de <i>ODC1</i>
ODC1-b	AATCCATGACGTTTCGTG	"
OligodT	TTTTTTTTTTTTTTTT(AGC)AGCT	Obtención de cDNA para RT-PCR cuantitativa
PDA1-A	GCTTCATTCAAACGCCAACCC	RT-PCR de <i>PDA1</i>
PDA1-B	TCCCTAGAGGCAAACCTTG	"
PGK1-1s	GTAGAACCTCGTGAAAC	Secuenciación desde el final del promotor de <i>PGK1</i> en dirección 3' para comprobar la inserción del promotor de <i>PGK1</i> en pUG6
PGK1-2s	GTTTCACGAGGTTCTAC	Secuenciación desde el final del promotor de <i>PGK1</i> en dirección 5' para comprobar la inserción del promotor de <i>PGK1</i> en pUG6
PGK1-1A	CCGCCGGTCGACCCTTAATTTT TTTTAG	Amplificación del promotor de <i>PGK1</i> para su integración en pUG6 con la finalidad de obtener cassettes de sustitución de promotores
PGK1-2A	CCGCCGGTCGACTGTTTTATATTT GTTGTA	Amplificación del promotor de <i>PGK1</i> para su integración en pUG6 con la finalidad de obtener cassettes de sustitución de promotores
PGK1-A	GTATTCCAGCTGGCTGGCAA	RT-PCR de <i>PGK1</i>
PGK1-B	AAACACCTGGTGGACCGTTC	"

PGK1-D	CCAAGGGGGTGGTTTAGT	Comprobación de la sustitución en el genoma del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>PGK1</i>
PGK1-X	CTAAACCACCCCCTTGG	Comprobación de la sustitución del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>PGK1</i>
QCR2-a	GATTGCAATTTGGCCAGG	RT-PCR de <i>QCR2</i>
QCR2-b	CGTCCAAATATGGCAAGTTG	"
RTN2-1	ACGACTACCAATAAGAACGC	RT-PCR de <i>RTN2</i>
RTN2-2	TTTTTGCTTTAGGCCGTG	"
SDH2-a	TTGAGAAGGAAGGCCTTTTG	RT-PCR de <i>SDH2</i>
SDH2-b	GGCAAATGCCAAAGATTTT	"
SEC23-A	GAAAAGCCGGTTACCAAGACG	RT-PCR de <i>SEC23</i>
SEC23-B	GAACCACCGGCTTCAGTATCA	"
SPI1-1	TTGTCTAACGCTAAGCTCCT	Obtención de sonda de <i>SPI1</i>
SPI1-2	AAGCATCATAACTGCACCAG	"
SPI1-b	GCTCTAGACATTATTAGTAA TTAC	Comprobación de la construcción e integración en el genoma del cassette <i>Kan</i> -promotor <i>SPI1</i> Amplificación del promotor de <i>SPI1</i>
SPI1-c	CGGAATTCGTC AATGGAAGTGTAT GGTC	Amplificación del promotor de <i>SPI1</i>
SPI1-d	CTCGAAGTCCCAGATGCCC	Comprobación de la sustitución en el genoma del promotor de <i>HSP26</i> e <i>YHR087W</i> por el de <i>SPI1</i>
STL1-A	TGCTAAAGCATACGAGGATG	RT-PCR de <i>STL1</i>
STL1-B	ATTTTCGTCGTCATAAGAGCC	"
TDH3-1		Obtención de sonda de <i>TDH3</i>
TDH3-2		"
tHSP26-1	TCCCCCGGGACCTACCATAGGA CACAC	Amplificación de <i>HSP26</i> incluyendo promotor y terminador y sitios <i>SmaI/BamHI</i> para clonación
tHSP26-2	CGCGGATCCACCGTTTGATATAC CGAGC	"

Materiales y métodos

tYHR087w-1	TCCCCGGGACGGTGATATAAC AGCGC	Amplificación de <i>YHR087w</i> incluyendo promotor y terminador y sitios <i>SmaI/BamHI</i> para clonación
tYHR087w-2	CGCGGATCCCTCTATCGTCTGTG TTACG	"
URA3A1	GAGTATTGAGAAGGGCAACG	Comprobación de la interrupción del locus <i>URA3</i>
URA3A4	TGCCCTACACGTTGCTATG	"
XYL2-a	TGACTTAACACACAAGAAGC	RT-PCR de <i>XYL2</i>
XYL2-b	GCCCTCAATGATCGTCTTGAT	"
YBR147W-1	ATGAAGCTGATCCCAA	RT-PCR de <i>YBR147W</i>
YBR147W-2	GTATTTTCTCGTATTTAGG	"
YDR222W-1	GGTGGATTTTCAGAACAC	RT-PCR de <i>YDR222W</i>
YDR222W-2	GAAGGTTGACAGTATTG	"
YER064C-a	GGGTCTTGTTTCAGCTTCCAA	RT-PCR de <i>YER064C</i>
YER064C-b	CAATCTGCAACGATATCGCG	"
YGR052W-F	GTTTTGGGAACAGTGGTCTG	RT-PCR de <i>YGR052W</i>
YGR052W-R	TCTTGAATTAGGCAAGGTTTCT	"
YHR033W-3	GGCGAATTGGATATCTCG	RT-PCR de <i>YHR033W</i>
YHR033W-4	CTACGTATTTCACTCACAC	"
YHR087-3	CTGTATTTTCACCCTTG	Comprobación de la sustitución en el genoma del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>SPI1</i> o <i>PGK1</i>
YHR087-5	TGTCTCTCTATTCATG	"
YHR087-a	CAGGAGGAAAAGAAAGCGCAGGT TGAAACTCCGTTTCAGAAGATCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Obtención del cassette para la sustitución del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>SPI1</i>
YHR087-b	GTATTTTCACCCTTGAAAAGTATT TGGTTACAGTAGACATGATTAGTA ATAGTACTG	Obtención del cassette para la sustitución del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>SPI1</i>
YHR087-f	GTATTTTCACCCTTGAAAAGTATT TGGTTACAGTAGACATGGCAGGTC GACTGTTTTA	Amplificación del cassette para la sustitución del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>PGK1</i>
YHR087-g	CAGGAGGAAAAGAAAGCGCAGGT TGAAACTCCGTTTCAGAAGACCACT AGTGGATCTGATA	"

YHR087-P	CTAACTTCGACGCTAGAG	Amplificación de la región codificante y parte del promotor de <i>YHR087W</i>
YHR087-R	GACTAGAGGTGGTAGAGTTTGG	Confirmación de la sustitución del promotor de <i>YHR087W</i> por el de <i>SPI1</i> o <i>PGK1</i>
YHR087-L	CTTCGAAGTTTTCACTCCTCAG	"
YHR087W-1	GGTAAGCTATCTGAAGTTGTC	RT-PCR de <i>YHR087w</i>
YHR087W-2	ACTTCTTCGATCTTCTTG	"
YJL107C-1	GAAACCTCCACATACGTACC	RT- PCR de <i>YJL107C</i>
YJL107C-2	TGTTACAGCTTGGAATCTG	"
YLL055W-a	AGAAATCACGCCTGAACA	RT-PCR de <i>YLL055W</i>
YLL055W-b	GCAACTGATACCAATGTC	"
YLR042C-1	ATTCTACGGTAGTCACCCAG	RT-PCR de <i>YLR042C</i>
YLR042C-2	TGAACCTACACCTCCTGTGC	"
YMR244W-1	TACCTGGAATCGTCATGT	RT-PCR de <i>YMR244W</i>
YMR244W-2	AGAACTGGGTCATGGA	"
YNL193W-1	TCCTCCGATAATGAACTGAG	RT-PCR de <i>YNL193W</i>
YNL193W-2	GTAACCCGCACTGTTTTGATG	"

Los oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR en tiempo real se diseñaron según las recomendaciones dadas por Applied Biosystems (T_m próxima a 60°C, tamaño del amplificado de 50 a 150 pb y situación cercana al extremo 3' del gen).

1.3. Micromatrices

Las matrices fueron elaboradas en el centro *Research Genetics* (Huntsville, AL) a partir de la amplificación mediante oligos específicos de 6281 pautas abiertas de lectura. El marcaje e hibridación de las muestras fueron realizados por el Servicio de Genómica del *Fred Hutchinson Cancer Research Center* (Seattle, EE.UU.) en las condiciones descritas en Fazzio y col. (2001). Se utilizaron muestras de RNA de 3 o más cultivos independientes

para cada condición y se hibridaron los pares Cy3-Cy5 que se indican en cada caso:

Capítulo 1

- Cepa ICV16, condiciones A (amonio) y AA (aminoácidos)
Combinaciones Cy3-Cy5: A1-AA1, AA1-A2 y A1-AA3.

Capítulo 2

- Cepa W303-1a, condiciones YPD e YP20
Combinaciones Cy3-Cy5: YPD.1-YP20.1, YPD.2-YP20.2,
YP20.3-YPD.3 e YPD.4-YP20.4.

- Condición YP20, cepas WT (BY4742) y Δ ($\Delta yhr087w$)
Combinaciones Cy3-Cy5: WT.1- Δ .1, WT.2- Δ .2, WT.3- Δ .3.

Este experimento se llevó a cabo utilizando macromatrices generadas en el servicio de Xips de ADN (SCSIE, Universitat de València) (Alberola y col., 2004).

Capítulo 3

- Condición YP20, cepas ICV16 y W303-diploide
Combinaciones Cy3-Cy5: W303.1-ICV16.1, ICV16.2-
W303.2, W303.3-ICV16.3

1.4. Cepas

1.4.1. *Escherichia coli*

La cepa DH5 α ($F' \phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_K^- m_K^+) phoA supE44 \lambda^- thi-1$) es la que ha sido utilizada para realizar las diferentes transformaciones con los plásmidos indicados en la tabla 1.1.

1.4.2 Levaduras

1.4.2.1. Levaduras de laboratorio

Tabla M.3. Cepas de levaduras de laboratorio utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Procedencia
W303-1a	<i>MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his3-11,15, ura3-1</i>	(Thomas y Rothstein, 1989)
W303-diploide	<i>MATa/MATα, ade2-1/ade2-1, trp1-1/trp1-1, can1-100/can1-100, leu2-3, 112/leu2-3, 112, his3-11,15/his3-11,15, ura3-1/ura3-1</i>	(Thomas y Rothstein, 1989)
KMY52	W303-1A; <i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 sch9Δ::HIS3</i>	Kevin Morano (Trott y col., 2005)
W303-1a Δ msn2 Δ msn4	W303-1a <i>msn2Δ3::HIS3, msn4-1::trp1</i>	F. Estruch (Estruch y Carlson, 1993)
TM141	<i>MATa, ura3, leu2, trp1, his3</i>	F. Posas (Alepez y col., 2003)
TM233	TM141 <i>hog1Δ::TRP1</i>	"
JK9-3d	<i>MATa, leu2-3,112, ura 3-52, rem1, trp1, his3, GAL⁺, HMLα</i>	M. Hall (Helliwell y col., 1998)
MH349-3d	JK9-3d <i>tor1Δ::LEU2-4</i>	"
MCY1389	<i>MATa, ura3-52, leu2::HIS3, SUC2</i>	F. Estruch (Estruch y Carlson, 1993)
BQS110	MCY1389 <i>bcy::LEU2</i>	"
K603	W303-1A; <i>cnb1::LEU2</i>	P. Alepez (Cunningham y Fink, 1994)
DMY14	W303-1A; <i>tcn1::G418</i>	P. Alepez (Matheos y col., 1997)
Y16036	BY4742; <i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 YLR433C (CNA1)::kanMX4</i>	Euroscarf
Y10513	BY4742; <i>MATa his3 leu2 lys2 ura3 YML057W (CNA2)::kanMX4</i>	Euroscarf

Materiales y métodos

SP1	<i>MATa, his3, leu2, ura3, trp1, ade8</i>	J. Thevelein (Mbonyi y col., 1990)
S15-5B	SP1 <i>tpk1::URA3, tpk2^{w1}, tpk3::TRP1</i>	"
RS13-7C-1	SP1 <i>tpk1::URA3, tpk2^{w1}, tpk3::TRP1, bcy::LEU2</i>	"
SH200	<i>MATa, leu2-3, 112, ura3-52, rem1, trp1, his3, GAL+, HMLa, ade2, tor1::HIS3-3, tor2::ADE2-3/ YCplac111::TOR2</i>	M. Hall (Helliwell y col., 1998)
SH221	SH200/ <i>YCplac111::tor2-21^{ts}</i>	"
SH229	SH200/ <i>YCplac111::tor2-29^{ts}</i>	"
BY4741	<i>MATα, his3Δ1, met15Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	"
Δ fab1 (Y17080)	BY4742 <i>fab1::kanMX4</i>	"
FY86	<i>MATα, his3-200, leu2-1, ura3-52</i>	F. Estruch (Roberts y Wiston, 1997)
BQ2070	FY86 con etiqueta HA en Ct de Yhr087wp	Este trabajo
BQ2071	FY86 con etiqueta GFP en Ct de Yhr087wp	Este trabajo
Δ ybr147w	BY4741 <i>ybr147w::kanMX4</i>	Euroscarf
Δ ybr216c	BY4741 <i>ybr216c::kanMX4</i>	"
Δ ydr070c	BY4742 <i>ydr070c::kanMX4</i>	"
Δ ydr222w	BY4742 <i>ydr222w::kanMX4</i>	"
Δ yer064c	BY4742 <i>yer064c::kanMX4</i>	"
Δ ygr052w	BY4742 <i>ygr052w::kanMX4</i>	"
Δ ygr203w	BY4742 <i>ygr203w::kanMX4</i>	"
Δ ygr243w	BY4742 <i>ygr243w::kanMX4</i>	"
Δ ygr272c	BY4742 <i>ygr272c::kanMX4</i>	"
Δ yhr033w	BY4742 <i>yhr033w::kanMX4</i>	"
Δ yhr048w	BY4742 <i>yhr048w::kanMX4</i>	"
Δ yhr087w	BY4742 <i>yhr087w::kanMX4</i>	"
Δ yhr112c	BY4742 <i>yhr112c::kanMX4</i>	"

Δ yr045c	BY4742 ykr045c::kanMX4	"
Δ yjl107c	BY4742 yjl107c::kanMX4	"
Δ yjr096w	BY4741 yjr096w::kanMX4	"
Δ yll055w	BY4741 yll055w::kanMX4	"
Δ ylr042c	BY4742 ylr042c::kanMX4	"
Δ ylr050c	BY4742 ylr050c::kanMX4	"
Δ ylr108c	BY4742 ylr108c::kanMX4	"
Δ ylr152c	BY4741 ylr152c::kanMX4	"
Δ ylr437c	BY4742 ylr437c::kanMX4	"
Δ yml131w	BY4742 yml131w::kanMX4	"
Δ ymr090w	BY4742 ymr090c::kanMX4	"
Δ ymr310c	BY4741 ymr310c::kanMX4	"
Δ ynl134c	BY4742 ynl134c::kanMX4	"
Δ ynl193w	BY4742 ynl193w::kanMX4	"
Δ yor062c	BY4742 yor062c::kanMX4	"

1.4.2.2. Levaduras vínicas

Tabla M.4. Cepas de levaduras vínicas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Procedencia
ICV16	<i>S. cerevisiae</i>	DSM (1)
ICV27	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	Springer Oenologie
Lalvin T73	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	Lallemand Inc. (2) (Querol y col., 1992b)
Uvaferm CEG	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand Inc. (2)
A1 (Francia)	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand Inc. (2)
A2 (España)	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand Inc (2)
BQS2017	ICV16 <i>ura3</i> ⁻	A. Zuzuarregui (Tesis Doctoral)
BQS2018	ICV16/YEp352	"
BQS2019	BQS2018/YEp352-HSP26	"
BQS2020	BQS2018/YEp352-YHR087W	"
BQS2022	BQS2018/pRS316	"
BQS2023	BQS2018/pRS316-HSP26	"
BQS2024	BQS2018/pRS316-YHR087W	"

BQS2036	ICV27 <i>ura</i> ⁻	Este trabajo
BQS2027	BQS2036/YEp352	"
BQS2028	BQS2036/YEp352- <i>HSP26</i>	"
BQS2029	BQS2036/YEp352- <i>YHR087W</i>	"
BQS2037	BQS2036/pRS316	"
BQS2038	BQS2036/pRS316- <i>HSP26</i>	"
BQS2039	BQS2036/pRS316- <i>YHR087W</i>	"
BQS2046	ICV16 p <i>HSP26</i> ::p <i>SPI1</i> (<i>KanMX</i>) (3)	"
BQS2047	ICV27-p <i>HSP26</i> ::p <i>SPI1</i> (<i>KanMx</i>) (3)	"
BQS2044	ICV16-p <i>YHR087W</i> ::p <i>SPI1</i> (<i>KanMX</i>)(3)	"
BQS2045	ICV27-p <i>YHR087W</i> ::p <i>SPI1</i> (<i>KanMX</i>)(3)	"
BQS2066	ICV27-p <i>YHR087W</i> ::p <i>PGK</i> (<i>KanMX</i>) (3)	"

(1) Delft, Netherlands (2) Maisons-Alfort, Francia (3) p indica promotor: al menos una copia del promotor del gen *HSP26* o *YHR087W* ha sido sustituida por el del gen *SPI1* o *PGK1*.

2. MÉTODOS

2.1. Medios y condiciones de cultivo

2.1.1. Bacterias

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LB (extracto de levadura 0,5% (p/v), triptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v)) o LBA (medio LB suplementado con ampicilina 50 µg/mL) a 37°C con agitación (200 rpm). Para los cultivos en placa el medio fue suplementado con agar 2% (p/v).

Tras la transformación de células de *E. coli* por electroporación (apartado 2.2.1), las células se recuperaron en medio SOC (extracto de levadura 0,5% (p/v), triptona 2% (p/v), NaCl 0,05% (p/v), KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa 40 mM, pH 7) y posteriormente se sembraron en placas LBA.

2.1.2. Levaduras

2.1.2.1. Medios generales y condiciones de incubación

Para los cultivos de células de levadura sin auxotrofías se utilizó medio YPD (extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)), con agitación a 200 rpm e incubación a 30°C. Para el crecimiento en soporte sólido se utilizó el mismo medio YPD con agar 2% (p/v) y las placas se incubaron durante 24-72 h a 30°C.

Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos fueron cultivadas en medio selectivo. Se utilizó medio mínimo SD (base nitrogenada para levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico 0,17% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% (p/v), glucosa 2% (p/v)) suplementado con los aminoácidos requeridos en cada caso (uracilo (100mg/L), leucina (100 mg/L), triptófano (20 mg/L), histidina (20 mg/L), adenina (100 mg/L)). En algunos casos se recurrió a medio mínimo selectivo SC (base nitrogenada para levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico 0,17% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% (p/v), mezcla de aminoácidos (*Drop out*) sin el aminoácido marcador de la auxotrofia 0,2% (p/v) y glucosa 2% (p/v)). Para la elaboración de los medios sólidos se agregó agar al 2% (p/v).

La selección de transformantes resistentes a antibiótico se llevó a cabo en medio sólido YPD suplementado con geneticina 100 mg/L o con cicloheximida 1 mg/L. Los transformantes estables fueron discriminados entre los transformantes abortivos formadores de microcolonias mediante resiembra en medio selectivo.

Para la inducción del promotor del gen *GAL1* en las cepas transformadas con el plásmido YEp352-cre-cyh se inocularon las colonias resistentes a geneticina y a cicloheximida en YPD conteniendo ambos antibióticos a 100 y 1 mg/L respectivamente. Se dejaron crecer los cultivos durante 1 día, se lavaron las células 3 veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en medio

YPGal (YP conteniendo galactosa 2% (p/v) en lugar de glucosa). Tras una incubación de 2-4 horas se plaqueó en SD-cicloheximida una dilución adecuada para la obtención de unas 100 colonias por placa. En el caso de la interrupción del gen *URA3*, cuando se eliminó la última copia, las placas fueron de YPD en lugar de SD y también contenían el antibiótico; a los 2-3 días de incubación a 30°C se realizó una réplica de las colonias a placas de YPD-geneticina para comprobar la pérdida del marcador.

Se utilizó también otros tipos de medios, derivados del YPD explicado con anterioridad, en los experimentos en los que se estudiaba el estrés osmótico. Así, en YP20 e YP25, la cantidad de glucosa es 20% (p/v) y 25%(p/v), respectivamente, el medio YPS contiene sorbitol a una concentración 1 M, el YPDNaCl cloruro sódico 0,7 M y, en el caso del YPHS, la fuente carbono está representada por una concentración equimolar de glucosa y fructosa (10% (p/v) de cada azúcar). Para la elaboración de los medios sólidos correspondientes se agregó agar al 2% (p/v).

2.1.2.2. Mostos, condiciones de inoculación e incubación

En este trabajo se ha utilizado mosto sintético de composición químicamente definida, así como algunos mostos naturales.

Con el fin de poder detectar diferencias en los patrones de fermentación en función de la naturaleza y las concentraciones de nitrógeno disponible, se realizaron microvinificaciones en mosto sintético variando la cantidad de nitrógeno inicial y la naturaleza de la fuente de nitrógeno añadida. El mosto utilizado en la vinificación que servía como control (MS300) fue definido por Riou y col. (1997), pero en nuestro laboratorio se han introducido algunas pequeñas modificaciones para acercarnos más a la composición del mosto natural. La principal de estas modificaciones es la utilización como fuente de carbono de una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa a una concentración final del 20% (p/v). Este mosto contiene 300 mg/L de nitrógeno

asimilable por la levadura (*yeast assimilable nitrogen*, YAN) , siendo 120 mg/L en forma de NH_4Cl y 180 mg/L en forma de aminoácidos introducidos a partir de una solución madre que incluye: Tyr 18 mg/L, Trp 179 mg/L, Ile 33 mg/L, Asp 44 mg/L, Glu 120 mg/L, Arg 374 mg/L, Leu 48 mg/L, Thr 76 mg/L, Gly 18 mg/L, Gln 502 mg/L, Ala 145 mg/L, Val 44 mg/L, Met 31 mg/L, Phe 38 mg/L, Ser 78 mg/L, His 32 mg/L, Lys 17 mg/L, Cys 13 mg/L, Pro 619 mg/L. El mosto también contiene otros elementos esenciales para el crecimiento de la levadura como son: vitaminas (mioinositol 20 mg/L, pantotenato de calcio 1,5 mg/L, tiamina 0,25 mg/L, ácido nicotínico 2 mg/L, piridoxina 0,25 mg/L, biotina 0,003 mg/L), ácidos (málico 0,6% (p/v) y cítrico 0,6% (p/v)), sales minerales (KH_2PO_4 750 mg/L, K_2SO_4 500 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 155 mg/L, NaCl 200 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, KI 1 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg/L, H_3BO_3 1 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 1 mg/L) y factores anaerobios (ergosterol 15 mg/L, ácido oleico 5 mg/L, Tween 80 0,5 mL/L). El pH final en condiciones estándar fue 3,2 y se ajustó con NaOH.

Para las vinificaciones con limitación de nitrógeno se utilizó un mosto de composición idéntica, exceptuando la cantidad de nitrógeno atómico asimilable, que en este caso era de 60 mg/L, aunque las proporciones entre amonio y aminoácidos se mantuvieron (24 mg/L en forma de NH_4Cl y 36 mg/L en forma de aminoácidos). Las adiciones que se llevaron a cabo fueron tres, en las que se variaba la fuente de nitrógeno introducida, aunque la cantidad de nitrógeno atómico asimilable era la misma en todos los casos: 240 mg/L. La primera de las adiciones fue en forma de sal de amonio (NH_4Cl), en el segundo en forma de aminoácidos (solución madre) y en el último de los casos se trató de una mezcla manteniendo las proporciones (2:3) de sal de amonio (NH_4Cl) y aminoácidos (solución madre).

Los mostos naturales utilizados en algunos de los experimentos correspondieron a las variedades siguientes:

- Macabeo: 260 g/L de azúcares; 115 mg N/L; procedencia "Bodegas El Rebollar", Requena (Valencia), 2007.

- Bobal: 220 g/L azúcares; >500 mg N/L; procedencia "Bodegas Torre Oria", Requena (Valencia), 2004.

- Sauvignon Blanc: 200 g/L de azúcares; 200 mg N/L; procedencia "Bodegas Torre Oria", Requena (Valencia), 2004.

El mosto Bobal había sido suplementado en bodega con 10 mL de *Sulfoferment* (Laffort) por hectólitro de mosto (equivalente a 6 g/HL de SO₂) y con 1 g de cóctel enzimático *Lallyzyme* (Lallemand Inc.) por 100 Kg de uva. Al mosto Sauvignon se había añadido con 10 g/HL de metabisulfito potásico (KHSO₃, que equivale a 5,3 g/HL de SO₂) y 0,5 g/HL del preparado enzimático *Lafase 60* (Laffort). El mosto Macabeo contenía cantidades similares de sulfitos. En todos los casos fueron parcialmente clarificados por sedimentación en depósitos de 150 HL durante 1-2 días a 10°C, tomándose para los experimentos mosto situado aproximadamente a 1,5-2 m del fondo del depósito donde sedimentan las lías, que fue congelado inmediatamente hasta su utilización. Tras su descongelación y previamente al inóculo de las levaduras se realizó una siembra directa de 10 µL en placas con YPD y no se observó crecimiento de ninguna colonia, motivo por el cual no se estudió la imposición de la cepa inoculada durante la vinificación.

Las microvinificaciones se llevaron a cabo de diversas maneras, según los requerimientos de los experimentos a realizar: tubos eppendorf, cornings de 15, 30 ó 50 mL, o bien matraces, pero en cualquier caso siempre se llenaban hasta $\frac{3}{4}$ partes del volumen total. En todos los casos la temperatura de incubación fue de 22° C. Si bien en la mayoría de los experimentos las vinificaciones se llevaron a cabo sin agitación, en algunos casos se recurrió a agitación suave (120 rpm), de manera que las condiciones de fermentación fueran lo más parecidas posibles a las que se dan en las bodegas.

En algunos experimentos se inoculó levadura seca activa, la cual fue rehidratada e inoculada según las instrucciones del

productor. Así pues, las células se incubaron a una concentración del 10% (p/v) en glucosa 5% (p/v) durante 20 minutos a 37° C. Después de esto se inocularon directamente en el mosto en proporción 1:500. En varios experimentos se utilizaron medios de rehidratación sin glucosa o con concentraciones de este azúcar del 2% y del 10%.

En los casos que se partían de levaduras en cultivo, éstas se tuvieron creciendo durante dos días en medio YPD o medio selectivo, para asegurarnos que estaban en fase estacionaria, y se inocularon directamente en el mosto para obtener una concentración de alrededor de $5 \cdot 10^6$ células/mL.

2.1.2.3. Experimentos de sensibilidad a estrés

Para el estudio de la sensibilidad a los distintos tipos de estrés se siguieron protocolos basados en aquellos utilizados previamente en nuestro laboratorio y en otros (Ivorra y col., 1999; Piper y col., 1994).

Para la mayoría de experimentos se diluyeron cultivos en YPD crecidos durante una noche hasta una absorbancia a 600nm de 0,1 y se dejaron crecer hasta 0,3-0,4 (fase exponencial temprana), momento en el cual se aplicó el estrés correspondiente.

Para el estudio de estrés osmótico se recogieron mediante centrifugación (3000 rpm, 2 minutos) las células contenidas en una alícuota del cultivo en YPD mantenido en fase de crecimiento exponencial y se resuspendieron en el mismo volumen de medio YP20 o YP25. La incubación continuó a 30°C durante 2 h. Para el estudio de estrés por etanol se añadió directamente este compuesto al cultivo de células en crecimiento exponencial hasta una concentración de 10% (v/v) e incubando a 30°C durante 1 h.

La viabilidad de las células tras estos tratamientos se determinó sembrando en placas de YPD, por triplicado. La dilución fue la adecuada de los cultivos, de manera que tras la incubación a 30°C se obtuviesen entre 100 y 300 colonias. Para expresar el resultado como viabilidad relativa se tomó como referencia el

cultivo control mantenido en crecimiento sin estrés durante el mismo período de tiempo en el que los otros cultivos estaban siendo sometidos a condiciones de estrés. Los datos mostrados son el resultado de al menos tres experimentos independientes.

Para el estudio de la sensibilidad a estrés oxidativo se sembraron en placas de YPD, por triplicado, 10^7 células procedentes de cultivos en YPD y se colocó en el centro de la placa un disco de papel de filtro de 5 mm de diámetro y 0,6 mm de grosor impregnado con 10 μ L de H_2O_2 9,79 M. Tras 24-48 horas de incubación a 30°C se formó un césped de células y en el centro de la placa un halo de inhibición del crecimiento cuyo diámetro constituye una medida de la sensibilidad de cada cepa a dicho estrés (Stephen y col., 1995). El experimento se realizó utilizando tanto células en fase de crecimiento exponencial como células en fase de crecimiento estacionaria (cultivos de una noche) cultivadas en YPD. Se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes para cada cepa y condición.

2.2. Manipulación de microorganismos

2.2.1. Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se realizó por electroporación utilizando células electrocompetentes de la cepa DH5 α . Éstas se obtuvieron a partir de un cultivo de 2 L de SOB (bactopeptona 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM) a una OD₆₀₀ de 1,5 aproximadamente. Las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm 10 minutos a 4°C, se resuspendieron en 1L de tampón de lavado (glicerol 10% (v/v) en agua) y se centrifugaron de nuevo con las mismas condiciones. Tras repetir este lavado, el sedimento final se resuspendió en 2 mL del tampón de lavado y se prepararon alícuotas de 50 μ L que se guardaron a -80°C hasta su utilización.

Cada alícuota se transformó con 10-40 ng de plásmido aproximadamente. Para ello se realizó un pulso a 1,8 kV en un

aparato electroporador *E. coli Pulser* (Bio-Rad). Después se recuperaron las células durante una hora en medio SOC y finalmente se plaquearon en medio LBA sólido.

2.2.2. Transformación de levaduras

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* fueron transformadas siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio (Gietz y col., 1995). A partir de cultivos de una noche en YPD las células se diluyeron en este mismo medio de cultivo hasta una absorbancia a 600nm de 0,2-0,3. Después de 2,5-3 generaciones se recogieron 10^8 células por transformación y se lavaron una vez con agua destilada estéril y otra vez con LiAc 0,1 M. Seguidamente se resuspendieron en 50 μ L de LiAc 0,1 M y se incubaron durante 15 minutos a 30°C. Después se añadieron 5 μ L de DNA de esperma de salmón disuelto en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) a una concentración de 2 mg/mL y previamente desnaturalizado y 5-10 μ L conteniendo 100-200 ng (en el caso de plásmidos) o 1-5 μ g (si se trataba de módulos de integración) de DNA transformante. A la mezcla se añadió 300 μ L de una solución de polietilenglicol (peso molecular medio 3350) 50% (p/v): LiAc (1 M): H₂O en proporciones 24:3:1. El tubo conteniendo la muestra se agitó de forma vigorosa, se incubó a 30°C 30 minutos y seguidamente se realizó un choque térmico a 42°C durante 20 minutos.

En el caso de las transformaciones con plásmidos que complementan auxotrofías de la cepa, tras el choque térmico la mezcla de transformación se plaqueó en medio mínimo selectivo. En el caso de las transformaciones en las que la selección se basaba en la resistencia a antibióticos, las células fueron recuperadas en medio YPD líquido durante 2-5 horas en agitación a 30°C antes de realizar la siembra en placas con antibiótico a las concentraciones indicadas en el apartado 2.1.2.1. En algunos casos la recuperación se llevó a cabo en placas de YPD y tras 12-

16 horas de incubación a 30°C se hicieron réplicas en las placas con antibiótico.

2.2.3. Construcción de cepas

Las transformaciones integrativas para la eliminación de secuencias en el genoma se llevaron a cabo siguiendo el sistema descrito por Güldener y col. (1996).

Para la disrupción del gen *URA3* en la cepa ICV27, el DNA transformante se sintetizó mediante una reacción de PCR en la que se utilizó como molde el plásmido pUG6. Este plásmido contiene el gen *Kan^r* de *E. coli*, que confiere resistencia a geneticina, flanqueado por secuencias *loxP*. Los cebadores utilizados inicialmente (IURA3 e IURA5) poseen en la zona 3' una secuencia de 18-20 bases homólogas al plásmido pUG6 y, en la zona 5', secuencias de 38-40 bases homólogas a los extremos de la secuencia que se desea eliminar, en nuestro caso los extremos de la región codificante del gen *URA3*. Después de la transformación (apartado 2.2.2) con el DNA lineal obtenido de esta manera se produce, por recombinación homóloga, la integración en el locus deseado y la sustitución de la secuencia silvestre por la del gen marcador. El siguiente paso fue la transformación de la cepa con el plásmido YEp351-cre-cyh. Éste posee como marcador el gen *CYII^R* de *Candida maltosa*, que confiere resistencia a cicloheximida y, además, la secuencia codificante de la recombinasa Cre del fago P1 bajo el control del promotor del gen *GAL1*. Seguidamente se procedió a la inducción de la expresión de la recombinasa (apartado 2.1.2.1 de esta sección) para eliminar el marcador de resistencia a kanamicina por recombinación de las secuencias *loxP*. Tras sucesivas rondas de integración y eliminación hasta interrumpir todas las copias de *URA3* presentes en el genoma de las cepas se realizó un crecimiento de la cepa *ura⁻ cyh⁺* durante 2 días en medio YPD no selectivo con el fin de conseguir colonias que hubiesen perdido el plásmido YEp351-cre-cyh. Todos estos pasos se pudieron seguir mediante PCR por amplificación a partir de los

oligos URA3A1 y URA3A4. Dado que en cada ronda de interrupción el módulo de integración puede recombinar en un locus ya interrumpido, se tuvo que diseñar otra pareja de oligos (IURA3B e IURA5B) con una secuencia interna respecto a la primera para poder eliminar todas las copias del gen *URA3* presentes en el genoma de esta levadura.

La sustitución del promotor de los genes *HSP26* o *YHR087W* en alguna de sus copias genómicas por el de los genes *SPI1* o *PGK1* se llevó a cabo en las cepas ICV16 e ICV27 de acuerdo con el procedimiento descrito en Cardona y col. (2007) y mostrado en la Figura M1.

En casos de sustitución de promotores por el de *SPI1* (Figura M1 panel A), se amplificó una región de 1100 pb de este gen utilizando los oligonucleótidos SPI1b y SPI1c. El producto de PCR se introdujo en el sitio *EcoRV* del plásmido pUG6, lo cual fue confirmado mediante amplificación con K2 y SPI1b.

Los cassettes de sustitución con regiones flanqueantes homólogas a los promotores de *HSP26* o *YHR087W* se obtuvieron mediante reacciones de PCR con las combinaciones de oligonucleótidos HSP26a/HSP26b o YHR087a/YHR087b. Una vez comprobada la sustitución de promotores en el genoma (véase el Capítulo 4 de este trabajo), se introdujo el plásmido YEp351-cre-cyh para inducir la pérdida del gen *kanMX* según el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2.1.

Para la sustitución del promotor de *YHR087W* por el del *PGK1* (Figura M.1 panel B), se amplificó una región de 788 pb de este gen utilizando los oligonucleótidos PGK1-1A y PGK1-2A y este producto de PCR se introdujo en el sitio *SaI* de pUG6. La construcción del plásmido fue confirmada mediante amplificación con K2 y PGK1X. El cassette de sustitución con regiones flanqueantes homólogas a las del promotor de *YHR087W* se obtuvo mediante amplificación con los oligonucleótidos YHR087f/YHR087g. La comprobación de la sustitución del promotor en el genoma se describe en el Capítulo 4 de este trabajo y las etapas posteriores

hasta conseguir la cepa final se llevaron a cabo según se ha descrito en el párrafo anterior.

Para la construcción de una cepa derivada de la FY86 conteniendo la etiqueta HA en la región C-terminal de Yhr087wp se llevó a cabo una amplificación con los oligonucleótidos YHR087W-F2 e YHR087W-R1 a partir del plásmido pFA6A-3HA-KanMX5 (Longtine y col., 1998) para obtener el cassette de transformación. La comprobación de la modificación en el genoma se llevó a cabo mediante PCR con YHR087W-200 e YHR087W+200.

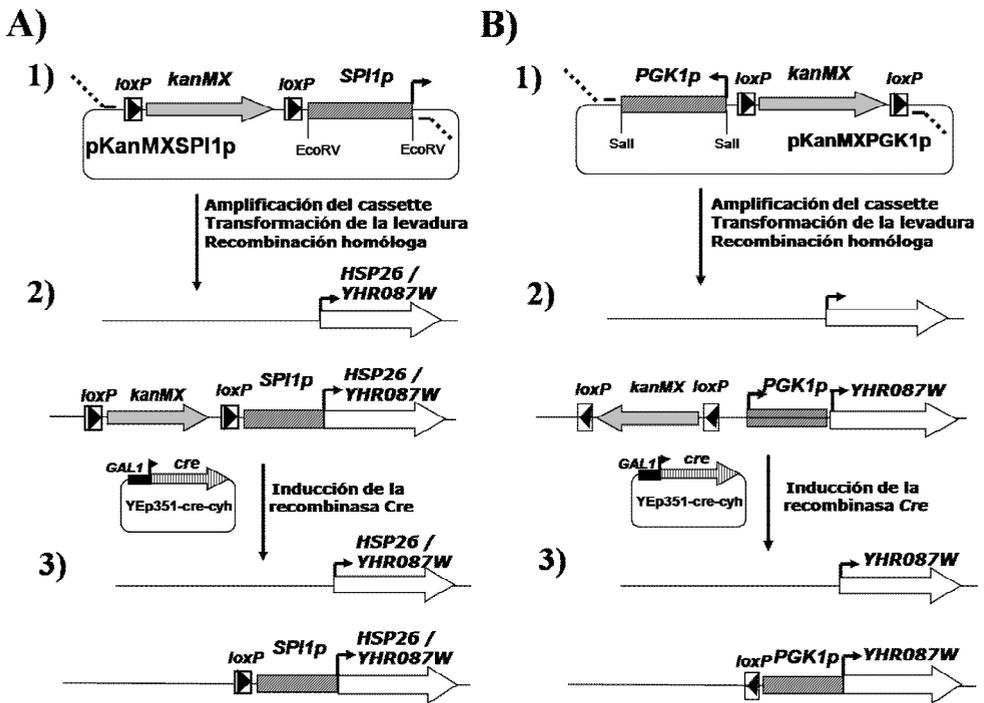


Figura M.1. Esquema de la construcción de las cepas ICV16 (ICV27)-PSPI1-HPS26, -PSPI1-YHR087W (panel A) o ICV16 (ICV27)-PPGK1-YHR087W (panel B). Los detalles están descritos en el texto.

2.3. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos

2.3.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial *Perfectprep Plasmid Mini* (Eppendorf) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención de mayores cantidades de DNA plasmídico se utilizaron los Kits comerciales *Perfectprep Plasmid Midi* o *Perfectprep Plasmid Maxi* (Eppendorf), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.2. Aislamiento de DNA genómico de levadura

Se extrajo DNA genómico de levadura para la obtención de sondas, las cuales se utilizaron en las hibridaciones de RNA, así como para la comprobación de sustituciones de promotores, de introducción de etiquetas HA o de interrupciones génicas.

La extracción se realizó a partir de cultivos de 4 mL en YPD crecidos durante toda la noche, a partir de los cuales se recogieron las células por centrifugación durante 3 minutos a 3000 rpm. Las células se lavaron con 500 μ L de agua estéril y se vuelvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Se aspiró el sobrenadante y sobre las células se añadieron 200 μ L de tapón de rotura (Triton X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM pH 8,0 y EDTA 1mM pH 8,0), 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 y 200 μ L de perlas de vidrio de 425-600 μ m de diámetro. Se agitaron en vórtex durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se añadieron 200 μ L de tampón TE 1X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) y se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima a 4°C. Se recogió el sobrenadante y, tras añadir 2 volúmenes de etanol 96% y agitar en vórtex, se volvió a centrifugar 15 minutos a velocidad máxima a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70% y se centrifugó 5 minutos en las mismas condiciones. Finalmente, se

eliminó el sobrenadante y, cuando el precipitado estuvo seco, se resuspendió en un volumen de entre 50 y 100 μ L de agua estéril. El DNA resuspendido se guardó a -20°C .

2.3.3. Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas o para clonaciones o transformaciones integrativas fueron purificados a partir de geles de agarosa. Para ello se utilizó el kit comercial Gel cleanup (Eppendorf) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.4. Construcción de plásmidos

Para expresar los genes *HSP26* e *YHR087W* bajo el control de su propio promotor se utilizaron el plásmido episomal YEp352 y el centromérico pRS316. Con esta finalidad se amplificaron fragmentos de 2140 pb del gen *HSP26* y 1860 del *YHR087W*, conteniendo el promotor, la región codificante y el terminador de estos genes, a partir de DNA genómico de la cepa W303-1a mediante las combinaciones de oligonucleótidos tHSP26-1/tHSP26-2 o tYHR087-1/tYHR087-2 respectivamente. Estos fragmentos se introdujeron en los sitios *SmaI-BamH1* de los vectores mencionados con anterioridad. Los plásmidos resultantes se denominaron YEp(pRS)*HSP26* o YEp(pRS)*YHR087W*.

2.3.5. Aislamiento de RNA

Para la extracción de RNA total de levadura se siguió el protocolo descrito previamente por Sherman y col. (1994) con algunas modificaciones. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron una vez en agua destilada estéril fría y se congelaron inmediatamente con N_2 líquido. Se guardaron a -80°C hasta la extracción del RNA. Las células se descongelaron entonces en hielo, resuspendiéndolas en 0,5 mL de tampón LETS

(LiCl 0,1M, EDTA 0,01 M, Tris 0,01 M, SDS 0,2% (p/v), pH 7,4), y se añadió 0,5 mL de fenol ajustado a pH 4,3 (Amresco) y 0,5 mL de perlas de vidrio (425-600 micras de diámetro). La rotura de las células se realizó en un *Fast-Prep FP120* (Savant Instruments Inc. Farmingdale, NY) durante dos períodos de 30 segundos (velocidad 5,5). Para separar las fases se centrifugó durante 15 minutos a 12000 rpm, 4° C. Se recogió el sobrenadante y se le añadió un volumen de una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (125:24:1), centrifugando 10 minutos a 10000 rpm. Seguidamente se realizó una nueva extracción con un volumen de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (4:1) en las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente el RNA se precipitó con un volumen de LiCl 5 M y se dejó a -80° C durante un mínimo de 3 horas. Se recogió por centrifugación durante 15 minutos a 12000 rpm, 4° C, y se realizaron dos lavados de 200 µL con EtOH 70% (v/v). El RNA se resuspendió en H₂O milliQ para volver a precipitarlo. Para ello se añadió acetato potásico a una concentración final 0,3 M y dos volúmenes de EtOH 96% (v/v). Se volvió a dejar al menos 30 minutos a -80° C para volver a centrifugar durante 15 minutos a velocidad máxima, 4° C. El precipitado se lavó con EtOH al 70% y finalmente se resuspendió en H₂O milliQ.

La concentración de RNA se valoró midiendo la absorbancia a 260nm en un *Biophotometer* (Eppendorf).

Todo el material utilizado para la obtención de RNA fue autoclavado a 2 atm y 121°C durante 1 h para inactivar las RNasas.

2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT)

2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20-50 µl con 100 ng de DNA molde genómico, 0,5 µM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 3 mM, tampón proporcionado por la

casa comercial y una unidad de DNA polimerasa *Biotaq* (Bioline), aislada de *Thermus aquaticus* YT-1. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95° C, 20-40 ciclos compuestos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos, un tiempo variable (1 minuto por Kb) a 72° C y un último ciclo de 10 minutos a 72° C.

2.4.2. Transcripción reversa (RT)

Se incubaron 5 µg de RNA con 1 unidad de DNasa I (Gibco, Life Technologies) en un volumen de 25 µL a 37°C durante 1 hora. A continuación se agregó 1 µL de oligodT (500 ng/ µL) y 2 µL de una mezcla de dNTPs, a una concentración de 10 mM cada uno, y se incubó la mezcla a 65°C durante 5 minutos, tras lo cual se transfirió el tubo a hielo. Se añadieron entonces 8 µL de tampón 5x para SuperScript III (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 unidad de inhibidor de ribonucleasas *Rnase out* (Invitrogene) y 1 unidad de transcriptasa reversa *SuperScript III* (Invitrogene). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 50°C. Finalmente se inactivó el enzima incubando a 75°C 15 minutos.

2.4.3. RT-PCR semicuantitativa

Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se realizó una dilución 1/20 del cDNA obtenido como se describe en el apartado anterior y se utilizaron 2 µL como molde de la PCR. El volumen de reacción para estos estudios fue de 20 µL y se utilizaron entre 20-25 ciclos de amplificación dependiendo del gen a estudiar. Antes de llevar a cabo las RT-PCR de interés con un determinado cDNA se llevó a cabo una comprobación de la ausencia de DNA genómico en la muestra mediante una RT-PCR con oligos correspondientes al gen *ACT1*, que contiene un intrón. La secuencia de estos oligonucleótidos se indica en la Tabla 1.2. Si la muestra sólo contenía cDNA daba una única banda de 170 pb y si la muestra estaba contaminada con

DNA genómico aparecía una segunda banda de mayor tamaño (420 pb).

2.4.4. RT-PCR en tiempo real

Los experimentos de expresión génica realizados mediante ésta técnica se llevaron a cabo en un aparato *Chromo 4 Real Time PCR detector* (Bio-Rad), utilizando el reactivo *SYBR Green with ROX* (Invitrogene). El fluoróforo *ROX* se utilizó como referencia pasiva de cada una de las muestras. El diseño de oligonucleótidos, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo triplicado de PCR para todas las muestras. El procesamiento de los datos se llevó a cabo de la manera siguiente: se realizó inicialmente una RT-PCR en tiempo real con diferentes diluciones (entre 1/20 y 1/400) de un cDNA genérico para cada par de oligonucleótidos que se iban a utilizar, con la finalidad de calcular la eficiencia de los mismos según se describe en Schmittgen y Livak (2008), utilizando la expresión $E = (10^{-(1/\text{pendiente})})$ (E =eficiencia). Una vez comprobada que la eficiencia estaba dentro del rango 1,8-2,2, se comenzó a trabajar con las muestras. El gen que se utilizó como normalizador fue *ACT1* y se utilizó el método de comparación de Ct para calcular las diferencias de expresión entre los pares de condiciones consideradas (Schmittgen y Livak, 2008). Así, se calculó el $\Delta\Delta\text{CT}$ como:

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{gen diana}} - \text{CT}_{\text{gen referencia}})_{\text{cond. 1}} - (\text{CT}_{\text{gen diana}} - \text{CT}_{\text{gen referencia}})_{\text{cond. 2}}$$

2.5. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis

Las electroforesis de ácidos nucleicos se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos descritos en Sambrook y col. (2001).

2.5.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0,8%-1,8% (p/v)) según los tamaños a separar. Los geles se prepararon en tampón TBE 0,5x (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA (pH 8) 1,25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0,25% (p/v), azul de xilencianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final 1x y la electroforesis se realizó a voltaje constante (6-10 V/cm) durante un tiempo variable en función de la resolución requerida.

Las electroforesis con fines preparativos se realizaron de manera análoga.

2.5.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón TAE

La integridad del RNA obtenido tras las extracciones se comprobó mediante la visualización de 2 µg de RNA total en un gel TAE 1x (Tris 40 mM, EDTA (pH 8,0) 1 mM) con 1% (p/v) de agarosa. Estas electroforesis se llevaron a cabo durante 10-15 minutos a 10 V/cm.

2.5.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa en tampón MOPS

Para realizar una electroforesis de RNA todo el material tiene que estar tratado frente a nucleasas, por lo que se empezó con una limpieza exhaustiva de la cubeta donde se realizó la electroforesis. Se hizo un primer lavado con agua y detergente, a continuación un segundo lavado con etanol al 70% y un tercero con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos. Por último, un lavado con abundante agua milliQ autoclavada para RNA (en las condiciones descritas en el apartado 2.3.5).

La preparación del gel también se hizo con material tratado para RNA. Estos geles contienen agarosa 1,5% (p/v) en MOPS 1x (MOPS 40 mM, NaAc 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0) y formaldehído 8% (v/v). Las muestras también fueron tratadas; para ello se diluyó entre 10-20 µg de RNA en MOPS 1x conteniendo formamida 50% (v/v) y formaldehído 6,5% (v/v) y se incubó durante 5 minutos a 65°C. Después se añadió 4 µL de tampón de carga para RNA (glicerol 50% (v/v), EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,4% (p/v), xilencianol 0,4% (p/v) y 0,01% (v/v) bromuro de etidio).

Antes de realizar la electroforesis se realizó una pre-electroforesis, sin cargar las muestras, durante unos 10 minutos a unos 80-100 V. Finalmente, se aplicaron las muestras y se corrió el gel, al mismo voltaje, hasta que la banda del colorante quedó a 2-3 cm del final.

En algunos casos para la detección del RNA en lugar de añadir el bromuro de etidio a las muestras se preparó una dilución 1:200 (v/v) de la solución madre (10 mg/mL) en agua, en la cual se introdujo el gel y se dejó en agitación durante 10 minutos. Se pasó a otra cubeta que contenía agua milliQ para RNA y se dejó en agitación unas tres horas, para la eliminación del exceso de bromuro de etidio.

2.6. Transferencia de RNA a membranas de nylon

Una vez llevada a cabo una electroforesis de RNA, se hizo la transferencia del mismo a membranas de nylon según se describe en Sambrook y col. (2001).

El tampón empleado para la transferencia fue SSC 6x (NaCl 0,9 mM, citrato sódico 90 mM, pH 7,0) y la membrana fue Hybond-N (Amersham). Tras 12-16 horas de transferencia se hicieron dos lavados con SSC 2x. Finalmente la membrana se secó ligeramente entre papel de filtro y se procedió al entrecruzamiento del RNA con la misma mediante luz UV (0,120 J/minuto) durante un minuto.

2.7. Slot-blot de RNA

Existe una manera alternativa de analizar el RNA que consiste en aplicarlo directamente a una membrana de nylon sin tener que correr previamente un gel MOPS. Esta técnica se basa en la desnaturalización del RNA y la transferencia a la membrana de nylon utilizando un aparato de *slot-blot*, en este caso de Bio-Rad. Esta metodología sólo se ha utilizado en los casos en los que se ha comprobado previamente que la sonda empleada no hibrida con otras secuencias de RNA. Tiene como ventaja frente a un Northern que el volumen que podemos cargar en el pocillo es mucho mayor, además de poder analizar hasta 48 muestras sobre la misma membrana.

Para la preparación de la muestra se diluyeron entre 8-40 μg de RNA en una mezcla de formaldehído 6,5% (v/v), formamida desionizada 50% (p/v) y tampón MOPS 1x (de la misma composición que en el apartado 2.5.3.) con un volumen final no superior a 300 μL . Se incubó la mezcla durante 10-15 minutos a 65° C y se centrifugó unos segundos a velocidad máxima. A continuación se procedió según las indicaciones del sistema de *Slot-blot* de Bio-Rad.

Al acabar el proceso la membrana se trató como en el caso descrito con anterioridad (apartado 2.6).

2.8. Marcaje radiactivo de DNA

Para el marcaje de las sondas de DNA previo a la hibridación de las membranas se utilizó la técnica de cebado aleatorio empleando el sistema *High Prime* (Roche) y utilizando como nucleótido marcado [α -³²P]-dCTP (Amersham). Se utilizó unos 25-50 ng de DNA desnaturalizado (hervido durante 10 minutos), a los que se añadió el *High Prime*, el nucleótido marcado y H₂O destilada hasta el volumen necesario para llevar a cabo la reacción. Ésta se incubó durante 15-20 minutos a 37° C, y

posteriormente se detuvo por adición de EDTA a una concentración final 50 mM.

Para eliminar el exceso de nucleótidos libres se pasó la muestra por columnas MS300 (Amersham) siguiendo las indicaciones descritas por la casa comercial.

2.9. Hibridación de ácidos nucleicos y autorradiografía

Las membranas se pre-incubaron a 42°C durante al menos dos horas en solución de pre-hibridación (SSPE 5x (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,7), Denhardt 5x (BSA 0,1% (p/v), Ficoll 0,1% (p/v), PVP 0,1% (p/v)) y DNA de esperma de arenque desnaturalizado (100 µg/mL)). Esta solución fue sustituida por solución de hibridación (SSPE 5x, Denhardt 1x, formamida desionizada 50% (v/v), sulfato de dextrano 10% (p/v) y DNA de esperma de arenque desnaturalizado (100 µg/mL)) a la que fue añadido el DNA genómico marcado y previamente desnaturalizado a una concentración aproximada de $5 \cdot 10^6$ dpm/mL. La hibridación tuvo lugar a 42° C durante 16-24 horas, tras lo cual se procedió a la eliminación de radiactividad que no hibridó específicamente lavando los filtros una vez durante 10 minutos a 42° C en SSPE 2x y SDS 0,1%, otra en SSPE 1x y SDS 0,1% durante 15 minutos a 65° C y, por último, en muchos casos se llevó a cabo un tercer lavado a la misma temperatura, pero esta vez en SSPE 0,1x y SDS 0,1%. Finalmente los filtros se secaron al aire.

En algunos casos el protocolo de hibridación que se siguió fue diferente. En este segundo método se añadían 10 mL de la solución de pre-hibridación (NaPO_4^{2-} 0,5M (pH 7,2), EDTA 1 mM, SDS 7%(p/v)) durante 1,5 - 2 horas a 65°C y tras la incubación se eliminaba la solución y se añadían 15 mL de la de hibridación, que era la misma que la de pre-hibridación conteniendo el DNA genómico marcado y previamente desnaturalizado a una concentración aproximada de $5 \cdot 10^6$ dpm/mL. Se incubó de 14 a 16 horas a 65°C y se procedió a los lavados del filtro para eliminar la

radiactividad inespecífica que pudiera quedar unida. Para ello se realizaron 2 lavados de 10 minutos a 65°C con una solución que contenía SSC 0,5x y SDS 0,1%. Los filtros se secaron al aire.

Para eliminar la sonda de los filtros, con la finalidad de reutilizarlos, se realizó una incubación de 30 minutos con SDS 0,1% (p/v) hirviendo, proceso que se repitió 2 veces. La eliminación de la sonda se comprobó con un contador Geiger y realizando una exposición de 48 horas.

La cuantificación de la intensidad en cada punto se llevó a cabo con un sistema de autorradiografía *Phosphorimager FLA3000* (Fujifilm). El análisis de la imagen se llevó a cabo con el programa *Image Gauge* (Fujifilm).

2.10. Hibridación *in situ* de RNA poliadenilado

Para la visualización de los mRNA poliadenilados se recurrió a cultivos de 10 mL con una OD₆₀₀ entre 0,2 y 1. Se les añadieron 1,2 mL de formaldehído al 37% (v/v) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras recoger las células por centrifugación a 2500 rpm 3 minutos, se resuspendieron en 5 mL de una disolución formada por formaldehído 4% (v/v) y K₃PO₄ 0,1 M (pH 6,4). Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron las células dos veces con 5-10 mL de K₃PO₄ 0,1M (pH 6,4). Se hizo un lavado adicional con el tampón K₃PO₄ 0,1M, sorbitol 1,2M, se resuspendieron las células en 1 mL de este último tampón y se transfirieron a un tubo eppendorf.

Se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm y se volvió a resuspender en 90 µL de tampón de lavado. Se añadieron 10 µL de solución de Zymoliasa 10T (5 mg de zymoliasa en 1 mL de tampón de lavado), incubando 30 minutos a 30°C con agitación. Tras una centrifugación de 3 minutos a 3000 rpm y un lavado con 100 µL de tampón K₃PO₄ 0,1M, sorbitol 1,2M, el sedimento se resuspendió en 30 µL de este tampón.

Toda la solución se añadió a pocillos recubiertos de poli-L-lisina. Estos pocillos fueron preparados con anterioridad, añadiendo 20 μL de poli-L-lisina 3 mg/mL en cada uno de los pocillos de la placa que se iban a utilizar, dejando 10 minutos a temperatura ambiente y eliminando entonces el exceso con una bomba de vacío. Una vez aplicada la muestra en los pocillos así tratados, se dejó secar durante 20 minutos y las células no adheridas fueron retiradas por aspiración. A partir de este momento las muestras se mantuvieron, para evitar que se secaran, en una cámara húmeda.

Los pocillos se lavaron una vez con 100 μL /pocillo de SSC 2x y las muestras se incubaron en la misma solución durante 10 minutos. Se retiró el SSC 2x, se añadió 25 μL de tampón de pre-hibridación (sulfato de dextrano 10% (p/v), formamida desionizada 50% (v/v), tRNA de *E. coli* 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DNA de salmón 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Denhart 1x, DTT 1mM y RNasin 4 unidades/mL) y se incubó al menos 1 hora a 37°C. Tras aspirar la solución de pre-hibridación, se añadió la de hibridación (solución de pre-hibridación conteniendo oligo-dT marcado con Cy3 a una concentración final de 1 μM) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Los pocillos se lavaron introduciendo la placa dentro de un vaso de precipitados con 100 mL de SSC 2x y se dejaron 5 minutos del mismo modo en SSC 1x. Tras ello se añadió 2 μL de DAPI (2,5 mg/mL en agua) a la solución del vaso y se incubó 5 minutos más. Se realizó una incubación adicional de 5 minutos en SSC 1x dentro del mismo recipiente con agitación y, por último, un lavado con SSC 0,5x de 1 minuto a temperatura ambiente. Se dejó secar la placa, se añadió 3,5 μL /pocillo de *Mowiol**, se colocó un cubre y se dejó al menos 1 hora a temperatura ambiente para que el *Mowiol* solidificara antes de observar la preparación al microscopio de fluorescencia *Axioskop 2* de *Zeiss Inc.* Las fotografías se obtuvieron con una cámara *SPOT* de *Diagnostic Instruments Inc.*

* Preparación del *Mowiol*: 2,4 g de Mowiol (Calbiochem-Merck) y 6,9 g de glicerol apto para microscopia (Merck) se agitaron durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Tras añadir 12 mL de Tris-HCl 0,2M (pH 8,5) se calentó a 50°C 10 minutos. Se centrifugó a 5000 g 15 minutos, se separó en alícuotas de 0,5 mL y se guardó a -20°C. Antes de la utilización se añadió a la alícuota correspondiente 12,5 mg de 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octano (Dabco, Sigma), calentándose a 37°C hasta el momento de su uso).

2.11. Métodos de manipulación y análisis de proteínas

2.11.1. Obtención de extractos proteicos

Las células se recogieron por centrifugación a 2500 rpm durante 3 minutos. Tras un lavado con agua, las células se resuspendieron en 100 µL de agua y se añadió 100 µL de NaOH 0,2M. Se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 1 minuto a 12000 rpm.

Se aspiró el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 50 µL de tampón de carga de proteínas SDS-PAGE 2x (Tris-HCl 250mM pH 6,8, SDS 140 mM, azul de bromofenol 30 mM, glicerol 27 µM) conteniendo DTT 0,1 mM y se incubaron las muestras a 95°C durante 5 minutos. Se centrifugaron de nuevo durante 10 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante, que constituye el extracto proteico, se transfirió a un tubo nuevo.

En el caso de los extractos proteicos utilizados para los experimentos de actividad arginasa el protocolo seguido fue el descrito por Carrasco y col. (2003). Las células recogidas por centrifugación se resuspendieron en 500 µL de Tris-HCl 5mM (pH 7,5), MnCl₂ 1 mM. Para romperlas se añadieron aproximadamente 500 mg de perlas de vidrio y se agitaron en vórtex durante 4 intervalos de 1 minuto cada uno, poniendo las muestras en hielo entre ellos. El lisado se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante se utilizó como extracto crudo de proteínas.

Las muestras que se utilizaron para los geles bidimensionales se extrajeron con un protocolo diferente (Fernández-Arenas y col., 2007). Se resuspendieron las células

recogidas en un volumen de 150 μ L de tampón de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), Tris 10 mM, PMSF 0,5 mM, pH 8,5) y se añadieron 150 μ L perlas de vidrio. Se realizó un pulso de 25 segundos a velocidad 5,5 en *Fast-Prep FP120* (Savant Instruments Inc. Farmingdale, NY) y seguidamente se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante y, tras repetir la centrifugación, se desaló con un Kit comercial *2D Clean-Up kit* (Amersham Biosciences). Finalmente, las muestras se dejaron en un tampón que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v) y Tris 30 mM (pH 8,5) y se guardaron a -80°C antes de ajustarles el pH y cuantificarlas.

2.11.2. Determinación cuantitativa de proteínas

2.11.2.1. Método de Bradford

Para cuantificar las proteínas nos basamos en el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando el reactivo comercializado por Bio-Rad y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. En cada ensayo se realizó una recta patrón con una disolución de seroalbúmina bovina (Boehringer Mannheim) de concentración conocida. Las diluciones utilizadas se encontraban en un rango de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro *Thermo Spectronic Genesys 20*.

2.11.2.2. Método RC/DC de Bio-Rad

La cantidad de proteína de las muestras que iban a ser analizadas por *DIGE*, se determinó utilizando el kit *RC/DC Protein Assay (RC, Reducing agent Compatible/DC, Detergent Compatible)* de Bio-Rad y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó este Kit porque además de ser más rápido (en 15 minutos se consigue el 90% del avance de la reacción), es más sensible y mantiene el color estable durante más tiempo (tras 1 hora sólo se pierde el 5% del color). La recta patrón se realizó con una solución

de BSA de concentración conocida (1,48 mg/mL) y se realizaron diluciones entre 0,05 y 2 $\mu\text{g/mL}$. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro *Thermo Spectronic Genesys 20* de cada una de las muestras.

2.11.3. Electroforesis en SDS-PAGE e inmunodetección

Las muestras proteicas (50 μg aproximadamente) se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los geles separadores se realizaron con una concentración de acrilamida-bisacrilamida entre el 10-12% y de SDS del 0,1%. Las electroforesis se desarrollaron en cubetas Mini Protean II (Bio-Rad) a 15-25 mA/gel.

Acabada la electroforesis se realizó la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (*Trans-Blot*, 1620113, Bio-Rad). La inmunodetección se llevó a cabo mediante el sistema *ECFTM plus Western Blotting detection system* (RPN2132, Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el bloqueo de la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente durante un mínimo de 2 horas y, después de varios lavados, con el secundario durante 1 hora. Las combinaciones de anticuerpos primario y secundario utilizadas se muestran en la Tabla M.5.

Tabla M.5. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo, indicando las diluciones de uso y procedencia.

Ac 1°	Dilución	Procedencia	Ac 2°	Dilución	Procedencia
α -GFP	1:20000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	Roche 11- 814-446- 001	α -mouse	1:25000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	GE Healthcare
α -HA (12CA5)	1:10000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	Roche 11- 583-816- 001	α -mouse	1:15000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	GE Healthcare
α -HA* ¹ (3F10)	1:10000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	Roche 1867-423	α -rat HRPL	1:25000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	GE Healthcare NA935V
α -HA (3F10)	1:10000 en PBS 1x BSA 0,5%(v/v)	Roche 1867-423	Alexa Fluor 546	1:25000 en PBS 1x BSA 0,5% (v/v)	Molecular Probes
Anti- fosfo p38 MAPK	1:1000 en TBS 1x 0,1%(v/v) Tween 20 5%(p/v) BSA	Cell Signalling Technology 9211	α -rabbit	1:10000 en TBS 1x 0,1%(v/v) Tween 20 5%(p/v) Leche en polvo no grasa	GE Healthcare NA934
α - tubulina	1:10000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	Serotec MCA785	α -rat HRPL	1:25000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	GE Healthcare NA935V
Anti- Mex67 α - rabbit * ²	1:10000 en TBS 1x 0,01%(v/v) Tween 20	GE Healthcare NA934			

Tampón TBS (Tris-HCl 20mM (pH 8,0), NaCl 0,5M)

Tampón PBS (NaCl 150mM, Na₂PO₄ 40mM, NaH₂PO₄ 10mM)

*¹ Esta combinación de anticuerpos se utilizó para los experimentos de inmunodetección que se describirán posteriormente

*² En este caso no se requería un anticuerpo secundario adicional

2.11.4. Electroforesis bidimensional analítica en gel de poliacrilamida. Tecnología *2D-DIGE*

En la Figura M.2 se muestra un esquema general de la tecnología *2D-DIGE* seguida en este trabajo.

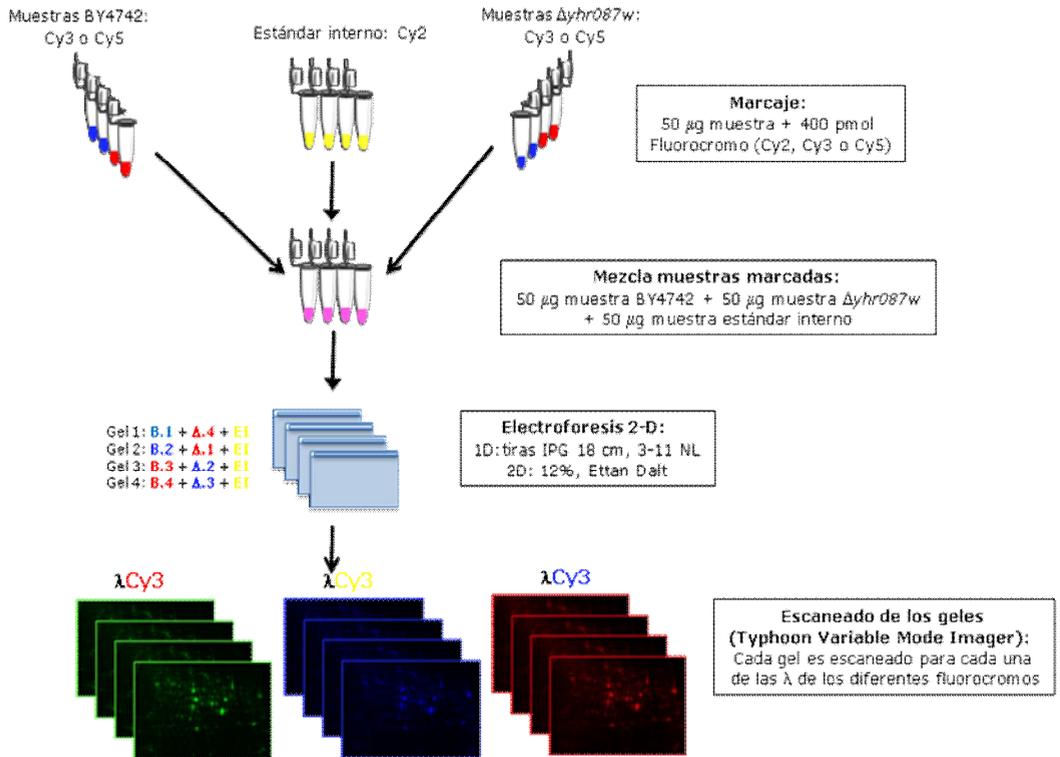


Figura M.2. Analisis de la expresion diferencial mediante *2D-DIGE* (*Two-Dimensional Difference In-Gel Electrophoresis*). Se basa en la visualizacion de dos o mas mezclas complejas de proteinas marcadas con diferentes colorantes fluorescentes en un unico gel 2D. Los colorantes Cy3 y Cy5 son utilizados para marcar la muestra control o tratada, mientras que el colorante Cy2 se emplea para marcar el estandar control. Esta metodologia se usa para el analisis diferencial de proteinas.

2.11.4.1. Marcaje de proteínas con Cydye DIGE fluor minimal dyes

Para la realización del estudio de proteómica cuantitativa se utilizaron 4 replicas biológicas con concentraciones de 5-10 mg/mL, de acuerdo con las recomendaciones para este tipo de estudios (*DeCyder 2D Software User Manual 28-4010-06 AB, GE Healthcare*).

Se mezclaron 50 µg de cada una de las muestras proteicas que se iban a analizar por DIGE con 400 pmol de fluorocromo (Cy3 o Cy5) y se incubaron 30 minutos en hielo y en oscuridad. A continuación se añadió 1 µL de una solución de lisina 10 mM para parar la reacción. Se mezcló y centrifugó brevemente y se dejó 10 minutos en hielo y en oscuridad. Las muestras marcadas se procesaron inmediatamente o se guardaron a -80°C en oscuridad, pudiéndose conservar así durante 3 meses.

Se repitió el mismo procedimiento para marcar 200 µg del estándar interno (mezcla equimolecular de todas las muestras utilizadas en el experimento), pero con el fluorocromo Cy2.

Finalmente, cada muestra marcada con Cy3 se mezcló con otra marcada con Cy5 y con 50 µg del estándar interno marcado con Cy2.

Relación de muestras marcadas y emparejamientos de los geles realizados en el apartado 3.1.2 del capítulo 2:

- Gel 1: BY4742.1 (Cy5) – $\Delta yhr087w.4$ (Cy3)
- Gel 2: BY4742.2 (Cy5) – $\Delta yhr087w.1$ (Cy3)
- Gel 3: BY4742.3 (Cy3) – $\Delta yhr087w.2$ (Cy5)
- Gel 4: BY4742.4 (Cy3) – $\Delta yhr087w.3$ (Cy5)

2.11.4.2. Primera y segunda dimensión

Se añadió a la mezcla un volumen igual de una solución compuesta por urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 2% (p/v), DTE 20 mM, anfolitos (*Pharmalyte pH 3-10, Amersham, Pharmacia Biotech*) 4%

(v/v) y trazas de azul de bromofenol (este será el tampón de muestras 2x) y se dejó en hielo durante al menos 10 minutos.

El isoelectroenfoco fue llevado a cabo en un dispositivo *Ettan IPGphor Isoelectric Focusin System* (Amersham), utilizando un gradiente de pH inmovilizado (Bjellqvist y col., 1993). Los gradientes empleados fueron de pH 3-11 no lineal (*Immobiline DryStrip*, 18 cm; Amersham Pharmacia Biotech, tiras IPG).

La rehidratación de las muestras se realizó de la siguiente manera. Se pipeteó el volumen adecuado de tampón de rehidratación (aproximadamente 450 μ L) que contenía urea 8M, tiourea 2M, CHAPS 2% (p/v), DTE 10 mM, anfólitos (*Pharmalyte pH 3-10*, Amersham, Pharmacia Biotech) 2% (v/v) y trazas de azul de bromofenol, en cada hueco reservorio del dispositivo empleado (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*) y se eliminaron las burbujas. Se colocó la tira IPG y se cubrió con líquido de cobertura *PlusOne™ DryStrip Cover Fluid* para prevenir la evaporación y la cristalización de la urea, y se permitió la rehidratación de dicha tira IPG a temperatura ambiente durante al menos 10 horas. Transcurrido este tiempo, las tiras fueron transferidas al *IPGphor Cup Loading Strip Holder* eliminando el exceso de líquido de cobertura.

Se colocaron almohadillas de electrodo húmedas tanto en el extremo ácido como en el básico de cada tira de gel, se sujetaron los electrodos firmemente a las almohadillas y al pocillo de carga en el extremo ácido o básico de la tira de tal manera que quedara colocado entre los dos electrodos. De esta manera se conseguía que se formara un buen sello con la tira IPG.

Seguidamente, se añadieron al menos 4 mL de líquido de cobertura. Finalmente, se mezclaron las muestras proteicas marcadas (según el apartado 2.11.4.1) y se añadió un volumen igual de tampón de muestra 2x. A través del pocillo se cargaron entre 80 y 120 μ L de muestra proteica.

El isoelectroenfoco se llevó a cabo a 15°C con el siguiente programa: 120 V durante 1 hora, 500 V durante 1 hora, 1000 V en

gradiente durante 1 hora, y 8000 V durante 6,5 horas. Cada gel fue sometido a 50 μ A durante todo el programa.

Tras el isoelectroenfoco se realizó el equilibrado de las tiras con el fin de volver a solubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro; este paso se compone de dos etapas. En la primera de ellas las tiras se incubaron durante 12 minutos en agitación orbital en una solución compuesta por Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTE 0,5% (p/v), para reducir los puentes disulfuro; en la segunda etapa las tiras se trataron con la solución compuesta por Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, urea 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), iodoacetamida 4,5% (p/v) durante 5 minutos en agitación orbital para bloquear y estabilizar los grupos SH.

La segunda dimensión se realizó en geles de poli(acrilamida) al 12%, de 1,5 mm de grosor, sin gel concentrador y utilizando PDA (piperacina di-acrilamida) como agente polimerizante, ya que consigue mejor resolución y menor bloqueo *N*-terminal de las proteínas (Hochstrasser, 1991). Además de añadir el SDS y los catalizadores, las soluciones fueron desaireadas en baño de ultrasonido durante 30 minutos. Los geles fueron preparados dos días antes de su uso para conseguir una polimerización lo más completa posible. La segunda dimensión se llevó a cabo en sistemas verticales de electroforesis (*Ettan-Dalt Six*, Amersham Biosciences) a una potencia constante de 2 W/gel a 15°C durante 30 minutos y de 20 W/gel a 15°C durante 4 horas.

2.11.5. Electroforesis bidimensional preparativa en gel poli(acrilamida) (2D-PAGE)

En esta modalidad de electroforesis, lo único que varía respecto de la analítica es la cantidad de proteína cargada y el programa utilizado en la primera dimensión. En este caso la cantidad de proteína de extractos totales cargada fue 2 veces superior a la analítica, aproximadamente 0,2 mg. Las tiras IPG utilizadas fueron de pH 3-10 no lineal. El isoelectroenfoco se

desarrolló en un dispositivo *IPGphor Isoelectric Focusing System* (Amersham), a una temperatura constante de 15°C y el programa utilizado constaba de seis pasos: el primero rehidratación activa a 30V durante 16 h como mínimo, el segundo aplicación de 500 V durante 1 h, el tercero con 1000 V 1,5 h, el cuarto a 2000 V 1 h, el quinto a 5000 V en gradiente 4 h y el sexto a 8000 V 11 h. La intensidad de corriente para cada tira fue de 200 μ A durante todo el programa. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida) al 12%, de 1,5 mm de grosor y sin gel concentrador (al igual que la analítica).

2.11.6. Tinción de proteínas

Para visualizar las proteínas en los geles se procedió a la tinción con *Comassie coloidal Blue G-250* (Bio-Rad). Tras correr la segunda dimensión y escanear los geles con los diferentes filtros se hizo un lavado de 5 minutos con agua. Después se fijaron con una solución de metanol 50% y ácido fosfórico 2% durante 3 horas. A continuación se hicieron 3 lavados de 10 minutos con agua milliQ y se incubaron 1 hora en un solución que contenía metanol 33% (v/v), sulfato amónico 17% (p/v) y ácido fosfórico 3% (v/v). Finalmente se añadió 5 mL de una disolución de *Comassie Blue G-250* 6,66% (p/v) en metanol y se dejaron los geles incubando alrededor de 18 horas. Para desteñirlos se hicieron varios lavados con agua.

2.11.7. Análisis informático de los geles

2.11.7.1. Visualización de los geles

Una vez terminada la electroforesis bidimensional, los geles de DIGE se visualizaron en un escáner *Typhoon 9400TM* (GE Healthcare) con los filtros CyDye. Para la adquisición de las imágenes donde se ven los distintos fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2 se utilizaron las longitudes de onda de excitación/emisión 532

nm/580 nm, 633 nm/670 nm y 480 nm/520 nm, respectivamente y un tamaño de píxel de 100 μ m. Para recortar las imágenes y seleccionar el área de interés se utilizó el programa ImageQuant TL; posteriormente se guardaron para evaluarlas con el programa *DeCyder*.

Los geles se tiñeron como se ha descrito en el apartado 11.6 para visualizar y recortar las proteínas de interés para su identificación.

2.11.7.2. Análisis de imagen

El programa *DeCyder 2D Software* (versión 6.5, GE Healthcare) nos permite realizar un análisis estadístico de los geles bidimensionales obtenidos mediante el sistema DIGE. Comprende cuatro módulos:

DIA (*Differential In gel Analysis*), donde las manchas proteicas son detectadas y cuantificadas en la serie de imágenes de un mismo gel bidimensional (imagen del estándar interno e imágenes de las muestras experimentales). Como característica del programa se incluye la eliminación del fondo, la normalización “en gel” de las señales correspondientes a la relación Cy3/Cy5 con la señal del estándar interno Cy2 así como la eliminación de cualquier artefacto presente en el gel. Los algoritmos del DIA detectan las manchas proteicas en una imagen acumulada derivada de la unión de las múltiples imágenes de un mismo gel. Este método de co-detección asegura que todas las manchas estén representadas en todas las imágenes.

El módulo DIA expresa los valores de la cuantificación como una relación, indicando los cambios en la abundancia proteica por comparación directa de las manchas correspondientes. Una vez que se ha analizado todo lo anterior en el módulo DIA, los datos de las manchas proteicas pueden ser utilizados en el siguiente módulo (BVA) para los estudios de cuantificación inter-gel.

BVA (*Biological Variation Analysis*), donde se emparejan las múltiples imágenes de los geles bidimensionales para proporcionar datos estadísticos de los diferentes niveles de abundancia proteica entre los grupos considerados. Las imágenes son emparejadas con una única imagen máster (imagen que consideramos como referencia), identificando manchas proteicas comunes entre los geles.

Las condiciones para establecer una proteína como diferencial fueron que estuviera presente como mínimo en 9 de los 12 geles procesados y que tuviera una variación de expresión mínima de 1,3 % de volumen, con una probabilidad del 95%.

Batch Processor. Ejecuta ambos módulos (DIA y BVA), realizando la codetección automática de manchas proteicas y el emparejamiento inter-gel de las múltiples imágenes de los geles.

XML Toolbox. Los datos generados en los diferentes módulos del programa son exportados utilizando un formato de archivo XML común, de tal manera que es muy fácil transferir datos entre los diferentes módulos.

Una vez detectadas las manchas de expresión diferencial, se recortaron del gel teñido con Coomassie y se identificaron por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF como se explica a continuación.

2.11.7.3. Análisis multivariante

Para las muestras analizadas mediante *DIGE*, se llevó a cabo un análisis multivariante utilizando el módulo *EDA*. Se seleccionó como subgrupo para este análisis aquellas proteínas diferenciales con una variación de la abundancia de $\pm 1,3$ ANOVA $p < 0,05$). El análisis de componentes principales (PCA) se realizó utilizando un método no lineal e iterativo de mínimos cuadrados

parciales. Para el análisis jerárquico de grupos (HCA) se utilizó el método de Pearson para el cálculo de las distancias.

2.11.8. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La digestión e identificación de proteínas mediante espectrometría de masas se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense y el Parque Científico de Madrid (Laboratorio perteneciente a ProteoRed)

2.11.8.1. Preparación de la muestra. Desteñido, reducción, alquilación, digestión proteolítica y extracción de péptidos de geles de poliacrilamida

Las manchas proteicas fueron cortadas de los geles bidimensionales manualmente con puntas de pipeta recortadas y transferidas a una placa multipocillo, en cada uno de cuyos pocillos se había añadido un volumen aproximado de 50 μ l de agua MilliQ. Así preparadas, las manchas se conservaron a 4°C hasta su análisis.

Las manchas proteicas del gel fueron desteñidas según el protocolo descrito por Gharahdaghi y col. (1999). Los trozos de gel fueron deshidratados con acetonitrilo al 100% durante 5 minutos y secados al vacío en una centrifuga *Speed-Vac* (Savant) 10-15 minutos. Este tratamiento deshidrata los fragmentos del gel, permitiendo que absorba mejor el siguiente reactivo que vayamos a añadir, de manera que éste alcanzase la totalidad de la mancha proteica, aumentando así la eficacia de las reacciones. A continuación se añadieron 20 μ L de una solución 10 mM de DTT en bicarbonato amónico 25 mM y se incubaron las muestras a 56°C durante 30 minutos con agitación suave. Este tratamiento reduce los grupos disulfuro de las proteínas.

Se lavaron los fragmentos de gel con acetonitrilo (ACN). A continuación, para alquilar los grupos previamente reducidos, se

añadieron 20 μL de iodoacetamida 55 mM (10 mg/mL) en bicarbonato amónico 25 mM durante 15 minutos en oscuridad. Después se realizaron dos lavados con acetonitrilo y posteriormente se incubaron las muestras 5 minutos en bicarbonato amónico 25 mM, se añadió un volumen igual de ACN y se dejó 15 minutos más a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante de los pocillos y se secó en *Speed-Vac* (Savant) durante 25-30 minutos.

La digestión proteolítica se realizó con tripsina (Roche). Se añadió a cada pocillo 10 μL de una solución de tripsina de concentración 12,5 ng/ μL en bicarbonato amónico 25 mM. El volumen de solución de tripsina utilizada permite la rehidratación del fragmento de gel. La incubación se llevó a cabo durante 45 minutos en hielo. Se retiró el sobrenadante, se añadió bicarbonato amónico 25 mM hasta cubrir el gel y se incubó toda la noche a 37°C. Tras la digestión se agitó con vórtex y se dió un pulso de centrifuga para pasar el sobrenadante a una nueva placa.

La extracción de los péptidos se realizó cubriendo el gel con una solución de ACN al 50% (v/v) y TFA (ácido trifluoroacético) al 0,5% (v/v) y sonicando 10 minutos. Tras esta etapa se pasó el sobrenadante a otra placa. Esta operación se repitió tres veces y se juntaron los sobrenadantes de cada extracción. Posteriormente se realizaron otras tres extracciones con ACN de 10 minutos cada una, se juntaron todos los sobrenadantes, secándolos a vacío en la *Speed-Vac* y se resuspendieron en 5 ml de una solución de ACN al 50% (v/v) y TFA al 0,1% (v/v).

2.11.8.2. Identificación mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF y MALDI- TOF/TOF

Las muestras se dispusieron en una placa de acero inoxidable recubierta de teflón (para concentrar la muestra) con 96x2 pocillos mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar se aplicó el sobrenadante de la digestión peptídica (1 μL por pocillo), que tras dejarlo secar forma una película sobre la placa.

Sobre la muestra se añadió la matriz (0,5 μ L por pocillo), compuesta por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) a una concentración de 3 mg/ml en ACN: agua al 50% (v/v) (acidificado con TFA al 0,1% (v/v)). La matriz co-cristaliza con la muestra formando unos cristales pequeños, compactos y redondeados. Las muestras así cargadas se analizaron mediante espectrometría de masas de tipo *MALDI-TOF* (*Matriz-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of Flight*) en un espectrómetro de masas *Voyager STR-MALDI-TOF* (Perseptive Biosystem). La adquisición de los espectros, así como el procesamiento de los mismos, se realizó en modo reflector de forma manual. Mediante un análisis bioinformático, esta huella peptídica se comparó con las huellas peptídicas teóricas de las proteínas existentes en las bases de datos.

En los casos en los que la huella peptídica no conducía a una determinación clara de la proteína, fue necesario recurrir para su identificación al análisis parcial de la secuencia proteica mediante fragmentación de péptidos utilizando un espectrómetro de masas tipo *MALDI-TOF/TOF* (*MALDI-tandem time-of-flight mass spectrometer 4700 Proteomics Analyzer*) (Applied Biosystems, Framingham, MA).

Las identificaciones de las proteínas se llevaron a cabo utilizando varios programas, que son de dominio público y están disponibles en la red (*Protein Prospector 4.0.4* (MS-Fit), *MatrixScience (MASCOT)* y *Prowl* (ProFound) (ver direcciones en el apartado 15)) en una base de datos no redundante que contenía entradas de *SwissProt*, *TrEMBL* y *NCBI nr* así como en *SGD* (dirección en el apartado 15), donde se encuentra anotado el genoma completo de *S. cerevisiae*. Los parámetros utilizados en la búsqueda fueron los siguientes: intervalo de exactitud en la masa (error) de +/- 50/100 ppm, modificaciones tales como cisteínas carbamidometiladas y oxidación de la metionina, como mínimo 4 péptidos coincidentes, permitir un corte parcial, peso molecular restringido (desde 1 hasta 100 kDa), punto isoeléctrico restringido (3-10) y especie no restringida. Para verificar que los resultados

obtenidos en las búsquedas realizadas con las bases de datos anteriores eran concluyentes, se consideraron una serie de parámetros, como son el porcentaje de cobertura de la secuencia teórica de la proteína (mínimo un 20%), el número de péptidos experimentales coincidentes con los teóricos y el grado de confianza/fiabilidad en el resultado (probabilidad de que la identificación de la proteína sea correcta).

2.11.9. Análisis de la localización de proteínas mediante microscopía de fluorescencia

En el caso de proteínas etiquetadas con GFP, la visualización se llevó a cabo directamente en células vivas crecidas en el medio sintético correspondiente. Para la identificación de los núcleos en estas células se llevó a cabo una incubación previa de 15 minutos a 26°C con 1 µL/mL de cultivo de una solución 2 mg/mL en agua del reactivo *Hoetsch* (Invitrogen, Martínez-Poveda y col., 2008).

En el caso de las etiquetas con HA, se procedió a la localización mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando el método descrito por Queralt e Igual (2003) con pequeñas modificaciones. Se recogieron 10⁸ células del cultivo de interés y se fijaron en tampón A (KH₂PO₄ 100 mM pH 6,4, MgCl₂ 0,5 mM) conteniendo formaldehído 3,7% (v/v) durante 2 horas a 30°C o 16 horas a 4°C. A continuación se lavaron con tampón A y con tampón B, de composición idéntica a la del tampón A pero con sorbitol 1,2 M. Para obtener proplastos, las células se incubaron en este mismo tampón pero con β-mercaptoetanol 0,1% (v/v) y 200 µg/mL de *Zimoliasa 20T* (USBiological) durante 20-40 minutos a 37°C con agitación. Tras lavar cuidadosamente los protoplastos en tampón B y resuspenderlos en 200 µL de dicho tampón, se distribuyeron alícuotas de 5-10 µL en pocillos de un porta previamente incubados en 5 µL de poli-L-Lisina 0,1% (p/v). En este porta, tras un lavado de 3 minutos en metanol a -20°C y de 10 segundos en acetona a -20°C, se trataron las muestras de

forma sucesiva, y siempre en una cámara húmeda, con las siguientes soluciones. En primer lugar se incubaron durante 30 minutos a 4°C en solución bloqueante PBS-BSA 0,5% (descrita en el apartado 11.9). Después se añadió 8 μL de una solución de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo primario anti-HA *High Affinity 3F10* (Roche), en la que se mantuvieron las muestras durante 2 horas a 4°C. Tras varios lavados con PBS-BSA se procedió a una incubación de 1 hora a 4°C con una dilución 1:500 del anticuerpo secundario *Alexa Fluor 546 anti-rat IgG* (Molecular Probes). Después de lavar los protoplastos se procedió a la tinción con *DAPI* (Sigma) 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS durante 2 minutos. Finalmente se añadió 1 μL de glicerol 50% (p/v) en cada pocillo y, tras colocar el cubre, se observó el porta en el microscopio de fluorescencia descrito anteriormente.

2.12. Determinación de la actividad arginasa

Para la determinación de actividad arginasa se siguió el protocolo descrito por Carrasco y col. (2003). Se trata de una cinética enzimática en la cual la arginina añadida se convierte en ornitina por la acción de la arginasa y a través de una reacción indirecta de la ornitina con la ninhidrina se obtiene un producto coloreado del que podemos medir la absorbancia. Existe una relación equimolar a partir de la cual, y junto con la ley de Lambert-Beer, se puede calcular los moles de ornitina formados y, por tanto, la actividad arginasa.

Se utilizó alrededor de 25 μg de proteína total (obtenida según se ha descrito en el apartado 2.11.1), siendo el volumen máximo a ensayar de 125 μL . Se realizaron diferentes controles: el blanco de reactivos, un blanco por cada muestra, así como un patrón de ornitina (1 mM).

A cada una de las muestras (125 μL), al blanco de muestras y al tubo correspondiente al patrón de ornitina se añadió como disolución activadora 125 μL de MnCl_2 10 mM. Se incubaron todos los tubos durante 20 minutos a 55°C y después se dejaron enfriar

a temperatura ambiente durante 4 minutos, para posteriormente incubar a 37°C. En este momento se añadió 125 µL del patrón de ornitina al tubo correspondiente y 125 µL del tampón de extracción de las proteínas al blanco de reactivos.

Seguidamente se añadió a cada uno de los tubos 750 µL de tampón carbonato 0.1 M pH 9,5 previamente atemperado a 37°C. También se adicionaron 250 µL de una disolución de arginina 0,1 M (pH 9,5) a todas las muestras, excepto a las correspondientes al blanco de muestra.

Se tomaron alícuotas de 187,7 µL de cada tubo de reacción a 3, 6 y 9 minutos y se añadieron a tubos que ya contenían 562,3 µL de ácido acético glacial, para parar la reacción. De las alícuotas de los controles de muestra se tomaron a punto final, es decir, a los 9 minutos 150 µL, a los que posteriormente se añadió 37,7 µL de la disolución de arginina. Del blanco de reactivos y del patrón de ornitina se tomaron 187,7 µL también a tiempo final.

Finalmente se añadió a todos los tubos 187,7 µL de disolución de ninhidrina (140 mM en una mezcla formada por 60% de ácido acético glacial y 40% de ácido fosfórico), y se incubaron durante 30 minutos a 100°C. Se dejaron enfriar en hielo y se midió la absorbancia a 515nm frente al blanco de reactivos.

Para calcular los moles de ornitina producidos se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{mmoles} = 6,25 \cdot 10^{-5} \frac{(A_{515}(\text{muestra}) - A_{515}(\text{blanco de muestra}))}{(\mu\text{g proteína} \cdot A_{515}(\text{ornitina}))}$$

Por último, se representó los valores de moles de ornitina formados frente al tiempo para obtener así la actividad arginasa.

2.13. Determinación de metabolitos

2.13.1. Azúcares reductores

El método empleado se basa en el ensayo colorimétrico descrito por Robyt y Whelan (1972).

Se realizaron diluciones de las soluciones problema de azúcares en un volumen final de 250 μL y se añadieron 250 μL de reactivo *DNS* (ácido dinitro-3,5-salicílico 1% (p/v), NaOH 1,6% (p/v), tartrato doble sódico-potásico 30% (p/v)). Se prepararon también varios tubos conteniendo concentraciones conocidas de glucosa (entre 0 y 2 g/L) para construir una recta patrón. Todas las muestras se hirvieron durante 5 minutos y, tras enfriarse en hielo, se midió la absorbancia a 540 nm de una dilución 1/6 en agua destilada. La concentración de azúcares reductores se calculó interpolando en la recta patrón de glucosa a partir del valor de absorbancia de cada muestra.

2.13.2. Etanol

La determinación del etanol producido durante la vinificación se llevó a cabo también mediante ensayo colorimétrico según lo descrito por otros autores (Cornell y Veech, 1983). Este método se basa en la cuantificación de la producción de NADH gracias a la reacción de la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH*, Sigma) en presencia de NAD^+ con el etanol que se pretende valorar.

Se añadieron 100 μL de una dilución apropiada de la muestra en agua destilada a 500 μL de un tampón Tris-Glicina de pH 9,7 (Glicina 0,2 M, Tris 0,3 M). Seguidamente se adicionaron 20 μL de una disolución de NAD^+ 50 mM y por último 10 μL de *ADH* 4 mg/mL. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 340 nm lo que supone una medida del NADH producido ($\epsilon^{\text{M}} \text{NADH a } 340 \text{ nm} = 6220$). A partir de la estequiometría de la reacción (en este caso 1:1), se calcula el etanol producido.

2.13.3. Nitrógeno asimilable

Se utilizó el método del formol (Levy, 1933), que es válido para medir nitrógeno amínico y amónico, dado que el grupo amino

y el amonio reaccionan con formaldehído. Como la prolina no posee el grupo amino libre no puede ser valorada por este método y, como no es un compuesto asimilable por la levadura, en condiciones fermentativas, podemos decir que el método nos proporciona la cantidad de nitrógeno asimilable. Para esta determinación se tomaron 10 mL del sobrenadante de muestras de vinificación y se llevaron a pH 8 con NaOH. Seguidamente se añadió 1 mL de formaldehído 35% ajustado también a pH 8,0, se agitó y, tras esperar 5 minutos, se determinó el volumen de NaOH 50 mM que era necesario para recuperar el pH 8,0. Multiplicando los mL de NaOH utilizados en la valoración por 50 (concentración de NaOH utilizada) y dividiendo por el volumen de muestra se obtiene la concentración mM de nitrógeno asimilable de la muestra original.

2.13.4. Amonio

Para la valoración del amonio se utilizó el kit *Boehringer Mannheim Ammonia UV method* (Roche, Ref. 11 112 732 035), basado en la reacción entre el amonio con el 2-oxoglutarato en presencia de glutamato dehidrogenasa (*GIDH*) y NADH.

La cantidad de NADH oxidado presenta una relación 1:1 con la cantidad de amonio consumida. La concentración de NADH se puede determinar por medidas de absorbancia a 340nm. La relación equimolar entre amonio y NADH durante la reacción de la glutamato deshidrogenasa permite determinar así los niveles de amonio.

2.13.5. Glicerol intracelular

La concentración intracelular de glicerol se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Iwaki y col (1999). Las muestras para las medidas de glicerol se obtuvieron al resuspender las células en 500 μ L de agua y 500 μ L de perlas de vidrio y agitar en el vórtex durante 10 minutos a 4°C. Tras

centrifugar a 10400 rpm durante 20 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante, al que se añadió 500 µL de agua, y se separó una alícuota de 100 µL para la valoración de proteínas. El resto de la muestra se hirvió durante 10 minutos y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para recoger a continuación el sobrenadante.

Para la valoración de glicerol se utilizó el kit *Boehringer Mannheim Glycerol UV method* (Roche, Ref. 10 148 270 035), basado en tres reacciones consecutivas que permiten relacionar estequiométricamente la cantidad de glicerol presente en la muestra con la de NADH que es oxidado en la última de las reacciones. La disminución de NADH presente en la solución se determinó mediante la variación de la absorbancia a 340 nm.

2.14. Métodos de extracción y análisis de compuestos volátiles

2.14.1. Extracción de compuestos volátiles

Para el análisis de los compuestos volátiles se realizó una extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico, teniendo en cuenta los protocolos de Llauradó y col. (2005), Beltrán y col., (2005) y Fernández de Simón y col. (2003). Se utilizaron 10,5 mL de muestra a punto final de la vinificación, después de centrifugar 3 minutos a 2500 rpm para eliminar las células de levadura.

A estos 10,5 mL de muestra se le añadió 2,1 g de NaCl, 100 µL de ácido fosfórico (Panreac) al 33% (v/v), 40 µL de 2-heptanona (Sigma-Aldrich) a una concentración de 15 g/L (como patrón interno) y 600 µL de trifluorotricloroetano. Esta disolución se agitó durante 10 minutos en un agitador magnético con una potencia 5-6. Se centrifugó durante 3 minutos a 2800 rpm para separar las fases y se recogió la fase orgánica. Posteriormente se realizaron dos extracciones más, pero sólo se añadió en cada una de ellas 400 µL de disolvente de extracción. Todas las fases orgánicas se juntaron finalmente en el mismo tubo. El proceso se

realizó a 4°C para evitar las posibles pérdidas de los compuestos volátiles a estudiar, ya que estos presentan puntos de ebullición relativamente bajos. Sobre las fases orgánicas recogidas se añadió una bolita de CaCl₂ para absorber las trazas de agua que pudieran quedar.

2.14.2. Análisis de compuestos volátiles

Se seleccionaron varios compuestos determinantes de las propiedades organolépticas del vino para determinar sus niveles en el producto final de algunas vinificaciones: alcohol isoamílico, alcohol isobutílico, 2-feniletilalcohol, acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo y acetato de 2-feniletilo.

Se preparó una disolución patrón que contenía estos compuestos en concentraciones definidas: acetato de etilo 12 g/L, 2-feniletilalcohol 10 g/L, acetato de isoamilo 10 g/L, acetato de 2-feniletilo 10 g/L, acetato de isobutilo 15 g/L, alcohol isobutílico (Panreac) 15 g/L, alcohol isoamílico (Prolabo) 15 g/L y 2-heptanona 15 g/L (como patrón interno) en etanol (Panreac) al 12% (v/v) y se extrajeron del mismo modo que las muestras de la fermentación.

El análisis de los niveles de estos compuestos se llevó a cabo en el *Servei d'Espectrometria de masses*, perteneciente al *Servei Central de Suport a la Investigació* (SCSIE) de la Universitat de València.

Se utilizó un GC analítico Hewlett-Packard 4890A conectado a un integrador Hewlett-Packard 3393A, equipado con un detector de ionización de llama de Agilent. Se inyectó 2 µL de cada una de las muestras en modo "splitless" en una columna FFAP-HP de 30 m x 0.25 mm y un espesor de fases de 0,25 µm (Agilent). El programa de temperatura que se utilizó fue: 10 minutos iniciales a 40°C, una curva de temperatura hasta 240°C con una rampa de 5°C/minuto, manteniendo 10 minutos más la temperatura a 240°C. El gas conductor fue helio a 1 mL/minuto

2.15 Análisis estadístico de los datos

La significatividad estadística de los resultados numéricos se realizó mediante un *test t de student* de una cola con 2 grados de libertad (3 muestras), considerando significativos los datos cuando el resultado era un valor de *p* (*p-value*) menor o igual a 0.05 y el estadístico *t* no superaba los valores límites para considerar el test como correcto. Para dicho análisis se utilizó la función correspondiente en el programa *Excel* (Paquete Microsoft Office). En los estudios sobre la implicación de factores transcripcionales en la regulación de genes diferencialmente expresados (Capítulo 1) la probabilidad que la representación de cada factor ocurriera por casualidad se analizó mediante la distribución hipergeométrica (Cleveland, 1979) del mismo programa.

En algunos experimentos el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando la herramienta *ANOVA* con un nivel de significación de $P \leq 0.05$ con el programa *STATPLUS 2006 PROFESSIONAL 3.7.1*.

2.16. Bases de datos utilizadas

Para los diferentes análisis realizados tanto para los resultados obtenidos de las micromatrices como de los geles bidimensionales se utilizaron diferentes paquetes estadísticos o programas de acceso público. A continuación se detalla un listado de todos ellos.

- GO term finder: <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>
- FuncAssociate: <http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>
- Gene CoDis 2.0: <http://genecodis.dacya.ucm.es/>

- Funcspect: <http://funspec.med.utoronto.ca/>
- Protein Prospector 4.0.4: <http://www.prospector.ucsf.edu>
(MS-Fit)
- MatrixScience: <http://www.matrixscience.com> (MASCOT)
- Prowl: <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>
(ProFound)
- Yeasttract: <http://www.yeasttract.com/>
- *Saccharomyces* genome database (SGD):
<http://www.yeastgenome.org>

Resultados

Capítulo 1

CAPÍTULO 1

Estudio de la respuesta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* frente al estrés causado por deficiencias de nitrógeno

Los mostos naturales contienen fuentes de carbono (mayoritariamente glucosa y fructosa) y también de nitrógeno, azufre y otros elementos químicos esenciales para su crecimiento. El nitrógeno es un nutriente importante que desempeña un papel principal en muchas de las funciones y procesos llevados a cabo por las levaduras. La composición en nitrógeno de los mostos afecta al crecimiento y a la velocidad de fermentación (Bisson, 1991). La cantidad de nitrógeno requerida para una fermentación satisfactoria se estableció en 120-140 mg N/L (Bely y col., 1990), aunque depende tanto de la composición del mosto como de la cepa utilizada en cada caso. Para algunas cepas se ha encontrado valores de 200 (Cantarelli, 1957) o 267 mg N/L (Mendes-Ferreira y col., 2004).

Las deficiencias de nitrógeno pueden conducir a paradas o retrasos fermentativos (Ingledeew y Kunkee, 1985; Bisson, 1999; Mendes-Ferreira y col., 2004), situaciones indeseables que conllevan la obtención de vinos con altos contenidos en azúcares, largos tiempos de vinificación y riesgos de contaminación. La práctica habitual en enología para prevenirlas es la adición de amonio en las primeras etapas del proceso, aunque cantidades excesivas de éste pueden tener consecuencias negativas (Taillandier y col., 2007; Mendes-Ferreira y col., 2009). Estas adiciones permiten reducir el tiempo final de la fermentación, independientemente del momento de la adición, aunque el efecto es más significativo cuando el nitrógeno se añade durante la fase de crecimiento exponencial (Äyräpää, 1968; Beltrán y col., 2005).

El objetivo principal de este capítulo es analizar el efecto de la adición de diferentes fuentes de nitrógeno (amonio, aminoácidos o una mezcla de ambos) en condiciones de deficiencia del mismo

durante la vinificación, para intentar entender los cambios metabólicos que se dan en la adaptación a las nuevas condiciones. Además, se estudia cómo estas adiciones afectan el comportamiento fermentativo, los niveles finales de diversos compuestos volátiles, la actividad arginasa y la expresión génica a nivel global (Jiménez-Martí y col., 2007; Jiménez-Martí y del Olmo, 2008).

Para realizar estos experimentos se utilizó la cepa ICV16 ya que de acuerdo con la información proporcionada por la empresa que la comercializa (Lallemand Inc.) y con experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a) presenta un buen comportamiento fermentativo. Además, conocemos algunos aspectos moleculares de la misma (Zuzuarregui y del Olmo, 2004b; Zuzuarregui y col., 2006). Estos análisis se realizaron con mostos sintéticos que presentan una composición similar a la del mosto natural, en tubos de 50 mL, sin agitación y a 22°C.

1. Comportamiento fermentativo de la cepa vínica comercial ICV16 bajo diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno

Para llevar a cabo estos estudios se seleccionaron dos tipos de mostos sintéticos que difieren en su contenido en nitrógeno asimilable. El mosto MS300 contiene 300 mg de N asimilable/L, con una proporción amonio: aminoácidos de 2:3 y, de acuerdo con los datos que se han expuesto anteriormente, se puede considerar rico en nitrógeno, al superar las cantidades mínimas requeridas por diversas cepas. En el mosto MS60 hay 60 mg de N asimilable/L (en la misma proporción amonio : aminoácidos que en el caso anterior), cantidad que podría resultar insuficiente para conseguir una fermentación completa, de acuerdo con los datos obtenidos previamente para la cepa T73 (Carrasco y col., 2003), la QA23 (Beltrán y col., 2004) y la PYCC4072 (Mendes-Ferreira y col., 2004). Para analizar el comportamiento fermentativo de esta cepa en los dos mostos considerados se midieron diferentes parámetros

Resultados

que nos indican el avance del proceso fermentativo, como son la densidad óptica a 600 nm (OD_{600}), el consumo de glucosa, de nitrógeno total y de amonio, y la producción de etanol.

En la Figura C1.1 se muestran las gráficas correspondientes.

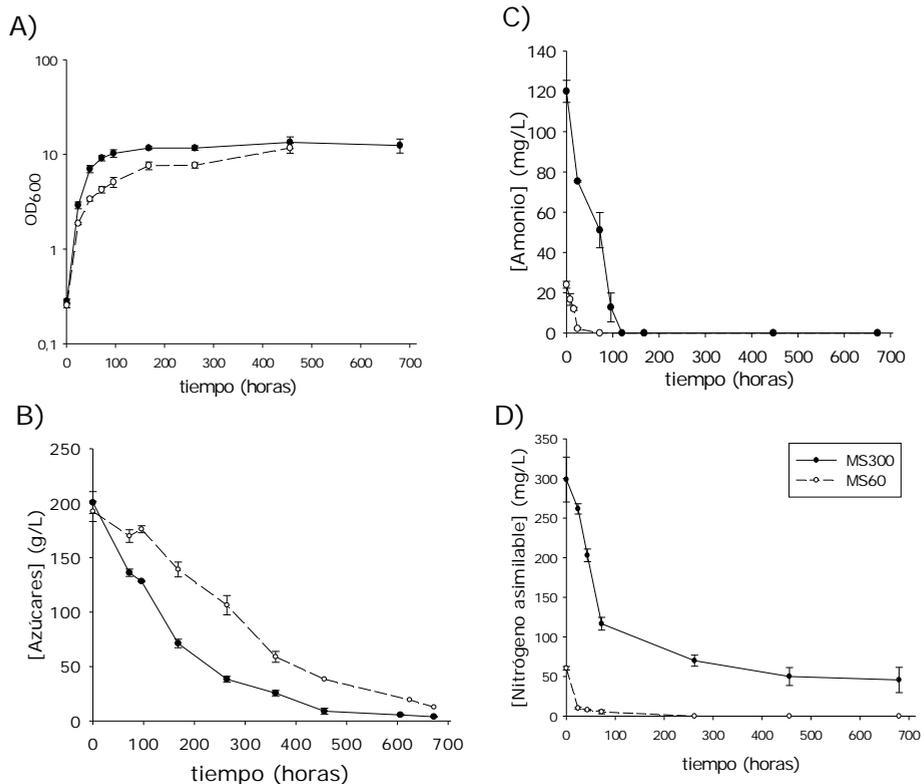


Figura C1.1. OD_{600} (panel A), consumo de azúcares (panel B), de amonio (panel C) y de nitrógeno (panel D) a lo largo de las vinificaciones llevadas a cabo con la cepa ICV16 en mostos sintéticos con la composición y condiciones de crecimiento descritas en Materiales y Métodos. Las vinificaciones se llevaron a cabo por triplicado y se muestra en todos los casos la media y la desviación estándar.

En el panel A se observa el crecimiento de la levadura en los dos mostos. A partir de las 24 horas ya existe un retraso en el crecimiento de la cepa ICV16 en el medio MS60.

El consumo de glucosa se considera un buen indicador del avance del proceso de vinificación. El mismo retraso que se observa en el crecimiento en mosto MS60 se puede detectar en el

consumo de azúcares (panel B), que es más lento y no llega a completarse (la concentración de azúcares residuales es de aproximadamente de 12 g/L a las 670 h).

El etanol es otro metabolito interesante de analizar porque es un indicativo del grado de metabolización de los azúcares presentes en el mosto. En la Tabla C1.1 se presentan las concentraciones finales de etanol en estas vinificaciones. Como es esperable a partir de los datos de consumo de azúcares, la vinificación en MS300 es la que proporciona el producto de mayor graduación.

Tabla C1.1. Concentraciones de etanol en el producto final. Se muestra el valor medio y la desviación estándar de tres muestras independientes.

	MS300	MS60
[Etanol] (g/100mL)	13,10 ± 0,39	11,30 ± 0,11

En el panel C de la Figura C1.1. se observa que el amonio se ha consumido casi por completo a las 24 horas en la vinificación en MS60, mientras que en el caso de la vinificación en MS300 se agota alrededor de las 100-120 horas.

El consumo de nitrógeno asimilable está representado en el panel D. En el caso de MS60 el nitrógeno se agota casi por completo a las 72 horas del momento de la inoculación (en este punto queda alrededor de 5,25 mg/L). En cambio, para la vinificación llevada a cabo con MS300, el nitrógeno no se termina de consumir y al final de la vinificación quedan concentraciones de alrededor de 45 mg/L.

A la vista de estos resultados podemos concluir que el mosto sintético MS60 es un medio limitante para el crecimiento de la levadura ICV16 bajo estas condiciones de fermentación vínica. Nos planteamos a continuación realizar, en vinificaciones llevadas a cabo en este mosto, suplementaciones de 240 mg de N asimilable/L para reestablecer así los valores presentes en la

vinificación que se llevaba a cabo con el mosto sintético MS300. Se consideraron tres adiciones diferentes en función de las fuentes nitrogenadas utilizadas en cada caso. Una de ellas (A) se hizo con NH_4Cl , es decir, introduciendo sólo amonio como fuente de nitrógeno; en la segunda (AA) se añadió una mezcla de todos los aminoácidos (a partir de la misma solución madre utilizada para preparar el mosto sintético) y en la última (AAA) se adicionó una mezcla de ambas fuentes nitrogenadas en la misma proporción en la que se encuentran en el mosto sintético, es decir, 60% de NH_4Cl y 40% de aminoácidos (AAA). El momento que se escogió para hacer las adiciones fue aquél en el que se agotaba el nitrógeno en la fermentación llevada a cabo con MS60, que se estimó en 72 horas, como se ha comentado anteriormente, por cuantificación de las concentraciones de amonio y de nitrógeno total en esta vinificación (Figura C1.1, paneles C y D).

En la Figura C1.2 se muestran los resultados obtenidos tras las diferentes adiciones de nitrógeno a la vinificación limitante.

En el panel A se puede observar que en los diferentes tipos de adiciones se recuperan los valores de densidad óptica alcanzados en el mosto MS300. Además, de acuerdo con los datos de consumo de azúcares (panel B) todas las vinificaciones con adición son capaces de terminar el proceso fermentativo en el mismo tiempo que la vinificación control. El consumo de azúcares es más lento cuando se adiciona solamente amonio, con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) para la mayoría de los tiempos considerados.

En correlación con estos datos, se detectan concentraciones de etanol en el producto final muy similares, aunque algo

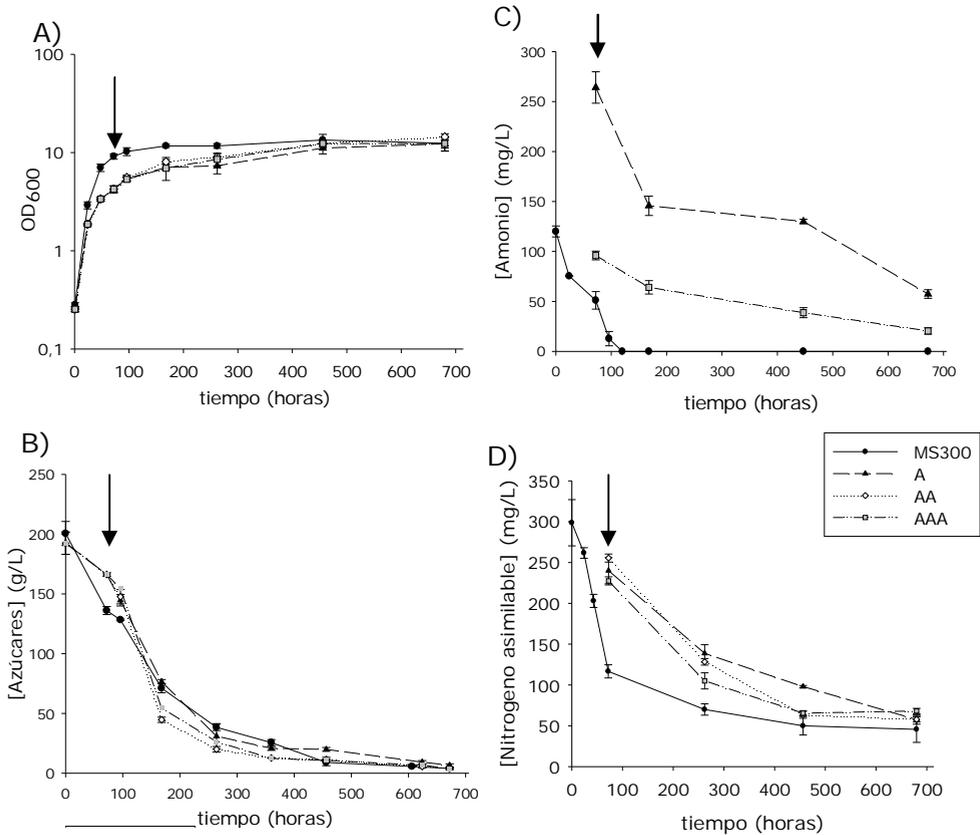


Figura C1.2. OD₆₀₀ (panel A), consumo de azúcares (panel B), de amonio (panel C) y de nitrógeno (panel D) a lo largo de las vinificaciones llevadas a cabo con la cepa ICV16 en mostos sintéticos con la composición y condiciones de crecimiento descritas en Materiales y Métodos. Las flechas indican el momento en que se realizaron las diferentes adiciones. Las vinificaciones se llevaron a cabo por triplicado y se muestra la media y la desviación estándar.

inferiores, a las detectadas en las vinificaciones llevadas a cabo en MS300; estos valores se pueden observar en la Tabla C1.2.

Tabla C1.2. Concentraciones de etanol en el producto final. Se muestra el valor medio y la desviación estándar de tres muestras independientes.

	MS300	A	AA	AAA
[Etanol]	13,10	12,28	12,36	12,62
(g/100mL)	$\pm 0,39$	$\pm 0,08$	$\pm 0,06$	$\pm 0,18$

En el caso de las adiciones en las que se incluye amonio como fuente nitrogenada (A y AAA), éste no termina de consumirse (panel C). Para la vinificación A los niveles de amonio finales están al mismo nivel que los de nitrógeno total asimilable observados en la vinificación control (panel D). En este panel se observa, además, que tras todas las adiciones hay un aumento del consumo de nitrógeno; a pesar de ello, quedan, finalmente, cantidades residuales muy similares a las obtenidas en la vinificación control en MS300.

Todos estos datos permiten concluir la efectividad de las adiciones de nitrógeno en las condiciones llevadas a cabo en este trabajo.

2. Evolución de la actividad arginasa durante la vinificación

El análisis de la actividad arginasa resulta muy útil para la detección de limitaciones de nitrógeno, porque responde a la movilización de la arginina desde la vacuola en estas condiciones (Whitney y Magasanik, 1973; Sumrada y Cooper, 1982). Además, trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio ya indicaban que esta actividad es un marcador de la limitación de nitrógeno durante el proceso de fermentación alcohólica (Carrasco y col., 2003). Analizamos esta actividad enzimática bajo todas las condiciones de crecimiento comentadas en el apartado anterior con la intención de lograr un mejor conocimiento de los mecanismos fisiológicos en la situación de limitación de nitrógeno y en las diferentes adiciones. En la Figura C1.3 se muestran los resultados obtenidos en todos los tipos de vinificaciones realizadas.

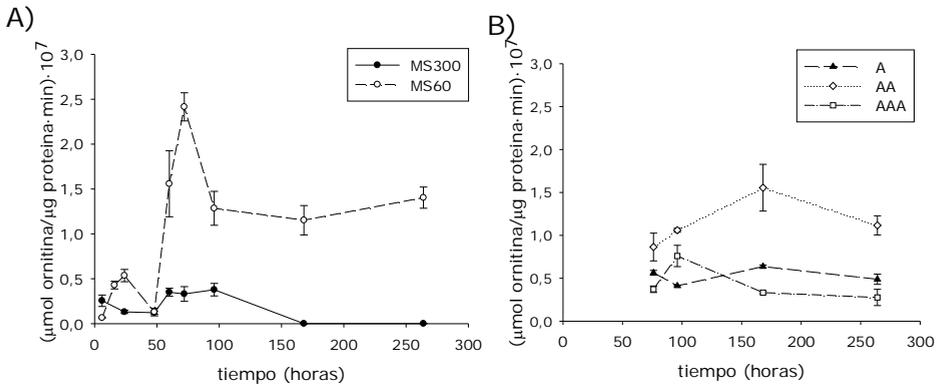


Figura C1.3. Perfil de la actividad arginasa a lo largo de la vinificación. En el panel A se muestra el comportamiento para la vinificación llevada a cabo con MS300 y con MS60, con los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En el panel B se incluyen los datos de esta misma actividad para las tres adiciones realizadas: A (amonio), AA (aminoácidos) y AAA (amonio y aminoácidos). La actividad arginasa se midió como se ha descrito en Materiales y Métodos.

En las vinificaciones realizadas con MS300 se encuentran pocas variaciones en la actividad a lo largo del proceso; sólo es destacable un ligero aumento centrado alrededor de 60-72 horas coincidiendo con el decrecimiento de los niveles de amonio en el medio. Cuando la vinificación es llevada a cabo con MS60 aparecen dos picos de inducción: el primero, minoritario, alrededor de las 24 horas, momento en que se agota el amonio del mosto, y el segundo, que es mucho más destacado y mantenido, alrededor de 72 horas, respondiendo a la completa falta de nitrógeno del medio. Por este motivo, este incremento podría considerarse como un marcador de la limitación de nitrógeno.

Cuando se realizan las adiciones se observa una disminución de esta actividad en todos los casos alrededor de las 76 horas, 4 horas después del momento de la adición; sin embargo, esta disminución es más marcada en el caso de la vinificación en la que se ha añadido amonio (A) o la mezcla de amonio y aminoácidos (AAA), que en la vinificación en la que sólo se ha adicionado aminoácidos (AA). Estos resultados son consistentes con los mecanismos de represión por catabolito de nitrógeno comentados

en la introducción. A lo largo del resto de la vinificación, la actividad arginasa se mantiene relativamente estable en todas las adiciones, como podemos ver en la Figura C1.3 y en otros datos no mostrados, de acuerdo con la disponibilidad de nitrógeno durante todo el proceso (véase la Figura C1.2, panel C y D), al menos en nuestras condiciones experimentales.

Nos planteamos determinar del mismo modo la actividad arginasa en una vinificación llevada a cabo en un mosto natural. Para ello se recurrió a un mosto de denominación Macabeo que contenía 115 mg de N asimilable/L. Estas vinificaciones, a diferencia de las anteriores, se realizaron con agitación suave para conseguir un consumo más rápido del nitrógeno. Se recurrió en este caso a un solo tipo de adición, la de amonio, porque, como hemos observado en la Figura C1.3, es la que determina un cambio más pronunciado en el perfil de la actividad arginasa cuando se compara con las otras adiciones; además, como se ha comentado en la introducción, la práctica habitual en las bodegas para prevenir las limitaciones de nitrógeno es la suplementación con sales de amonio.

Los resultados obtenidos, tanto para algunos de los parámetros de la vinificación como para la actividad arginasa, se muestran en la Figura C1.4.

En el panel A se observa que el consumo de azúcares en la vinificación se completa prácticamente durante las primeras 220 h; el tiempo es menor que en las vinificaciones anteriores por la introducción de agitación. Este dato indica que no existen problemas fermentativos y, por tanto, los niveles de nitrógeno presentes en este mosto no serían limitantes para esta cepa en estas condiciones. En cualquier caso, de acuerdo con los datos mostrados en el panel B, el nitrógeno asimilable se agota alrededor de las 100 h, momento en el cual el valor detectado es de 8,6 mg de N/L. Por este motivo se seleccionó este tiempo para llevar a cabo la adición de amonio. Se observan entonces pequeñas diferencias en el consumo de azúcares en la comparación con la vinificación control (panel A) y que el nitrógeno añadido no es totalmente consumido por la levadura (panel B).

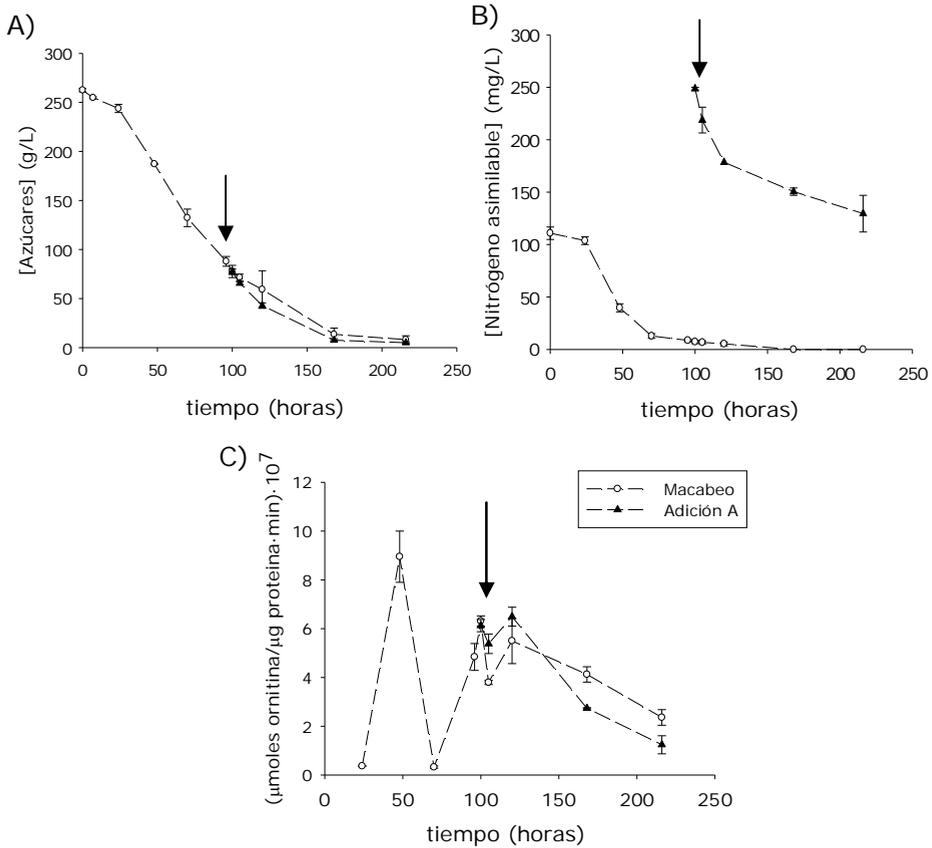


Figura C1.4. Consumo de azúcares (panel A), consumo de nitrógeno (panel B) y perfil de la actividad arginasa (panel C) a lo largo de la vinificación llevada a cabo con mosto Macabeo y para la misma vinificación con adición de amonio a las 100 horas (indicado con una flecha). Se representan los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos independientes. La actividad arginasa se midió como se ha descrito en Materiales y Métodos.

En estas vinificaciones con mosto natural se detectan nuevamente (panel C) los picos de inducción de la actividad arginasa encontrados en la vinificación limitante en mosto sintético, pudiéndose corresponder con el consumo total de amonio (alrededor de las 48 horas) y con el total de nitrógeno asimilable (a las 100 horas), si bien, a diferencia de lo que ocurre en el mosto sintético, el primer pico es más destacado que el segundo. El perfil de la actividad no varía rápidamente tras la adición de amonio; sin embargo, finalmente, los valores de la

misma son menores tras la adición, sugiriendo una respuesta más lenta que la observada en los mostos sintéticos.

3. Expresión génica en vinificaciones llevadas a cabo bajo condiciones de limitación y adición de nitrógeno

En este apartado se estudió la expresión de diversos genes en las condiciones de vinificación consideradas mediante análisis *Northern*. Los oligonucleótidos con que se obtuvieron las sondas para realizar los experimentos se encuentran descritos en la Tabla M.2 del apartado de Materiales y Métodos. Este análisis se planteó para entender la respuesta molecular de las levaduras en diferentes condiciones de disponibilidad de nitrógeno, así como para identificar genes marcadores de limitación del mismo.

Dada la variedad de condiciones adversas que tienen lugar durante el crecimiento de la levadura en la vinificación, algunos de los genes que se eligieron están relacionados con la respuesta a estrés (*SPI1*, *ACA1* y *ERG10*). También se seleccionaron varios genes implicados en el metabolismo del nitrógeno (*GDH1* y *GAD1*). Por último, se consideró la expresión del gen glicolítico *TDH3*, porque se ha observado que los niveles de la proteína codificada por este gen disminuyen, de forma dependiente del factor transcripcional Gcn4p, en respuesta al agotamiento de aminoácidos (Yin y col., 2004).

Todos los datos de las vinificaciones control (MS300) y limitante (MS60) han sido normalizados teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada una de las muestras después de hibridar con una sonda correspondiente a rDNA 25S. En ambos casos se han obtenido valores relativos con respecto a los de la vinificación control a las 24 horas, momento de crecimiento exponencial. En el caso de las adiciones los valores calculados son relativos al obtenido en la limitante a las 72 horas, momento en el que se agota el amonio y tienen lugar las suplementaciones con nitrógeno. Esta forma de mostrar los resultados permite comparar por un lado las diferencias relacionadas con la limitación de

nitrógeno y por otro lado entender el efecto de la adición de las diferentes fuentes nitrogenadas.

3.1. Genes relacionados con estrés

El primer gen relacionado con estrés que se ha considerado es el **ACA1**. Este gen está inducido por limitación de nitrógeno en cepas y condiciones de laboratorio, de acuerdo con el análisis de expresión global llevado a cabo por Gasch y col. (2000). Codifica un activador importante de la utilización de las fuentes de carbono en *S. cerevisiae* (García-Gimeno y Struhl, 2000).

Como se puede observar en la Figura C1.5 (panel A), los niveles de mRNA de este gen son mayores en MS60 que en MS300 prácticamente durante toda la vinificación.

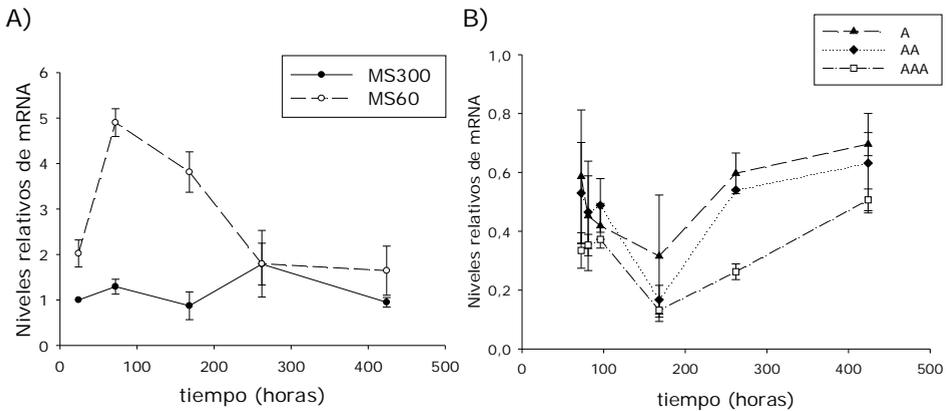


Figura C1.5. Patrón de expresión del gen *ACA1* durante las vinificaciones consideradas en este trabajo. Las gráficas representan los niveles de mRNA cuantificados a partir del análisis *Northern* y normalizados según se describe en el texto. Se analizaron tres cultivos independientes y se muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidos.

Se detecta un marcado incremento en la expresión de *ACA1* en MS60 alrededor de las 72 horas, momento coincidente con el agotamiento de nitrógeno en esta vinificación, seguido de un progresivo decaimiento. Sin embargo, para la vinificación llevada a cabo con MS300, donde el nitrógeno no se consume

completamente, la expresión de este gen muestra menor variabilidad.

En todos los casos las adiciones (panel B) resultan en una reducción de entre 2,5-7 veces (dependiendo del tiempo que consideremos) con respecto a los niveles encontrados a las 72 horas en MS60. A 264 horas se observa un incremento en los niveles de expresión de este gen, siendo estos en todos los casos menores a los encontrados en el medio MS60 en el momento del agotamiento del nitrógeno.

Estos resultados indican que el gen *ACA1* podría considerarse como marcador de limitación de nitrógeno durante la vinificación. En concordancia con estos resultados, se ha descrito que, en experimentos llevados a cabo con la cepa VIN13 en mosto Riesling, la adición de nitrógeno, en forma de fosfato diamónico, cuando ya se ha consumido el 30% de los azúcares y quedan 51 mg/L de nitrógeno también resulta en una represión de la expresión de este gen (Marks y col., 2003).

El gen ***ERG10*** participa en la biosíntesis del ergosterol, proceso dependiente de oxígeno relacionado con el comportamiento fermentativo y la resistencia a etanol (Chi y Arneborg, 1999). Este gen codifica la acetoacetyl-CoA tiasa, involucrada en el primer paso de la biosíntesis del mevalonato, algunos de cuyos derivados están relacionados con el aroma.

La expresión de este gen (Figura C1.6, panel A) decrece durante las primeras horas de fermentación, tanto en la vinificación control como en la limitante y se observa un patrón similar en ambas. Estos resultados son coincidentes con otros anteriores encontrados en nuestro laboratorio (Zuzuarregui y del Olmo, 2006) en medio MS300. Además, la comparación entre estas dos vinificaciones durante la primera etapa de la fermentación muestra datos similares a los descritos por Backhus y col. (2001), en presencia de altas y bajas concentraciones de arginina.

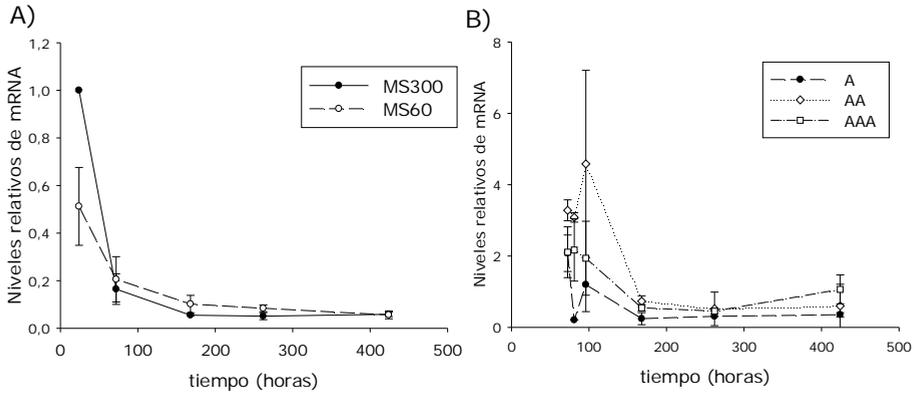


Figura C1.6. Patrón de expresión del gen *ERG10* durante las vinificaciones consideradas en este trabajo. Las gráficas representan los niveles de mRNA cuantificados a partir del análisis *Northern* y normalizados según se describe en el texto. Se analizaron tres cultivos independientes y se muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidos.

Las adiciones de nitrógeno (panel B) conducen a un aumento en los niveles de expresión de este gen, de aproximadamente 2-4 veces, durante las 24 horas posteriores a la adición, especialmente cuando la fuente adicionada son aminoácidos. Estos incrementos vienen seguidos de una disminución hasta valores incluso menores a los encontrados en MS60 a las 72 horas, independientemente de la fuente de nitrógeno adicionada.

El otro gen de respuesta a estrés estudiado (Figura C1.7) fue ***SPI1***, que codifica una importante proteína relacionada en la estructura y biogénesis de la pared celular (Horie e Isono, 2001). Los patrones de expresión encontrados son similares en medio MS300 y MS60, y se observan incrementos en los niveles de expresión que no parecen relacionados con la concentración de nitrógeno, sino con la entrada en fase estacionaria, como se ha descrito anteriormente en experimentos llevados a cabo con esta cepa (Zuzuarregui y del Olmo, 2004b) o en otras (Backhus y col., 2001; Varela y col., 2005).

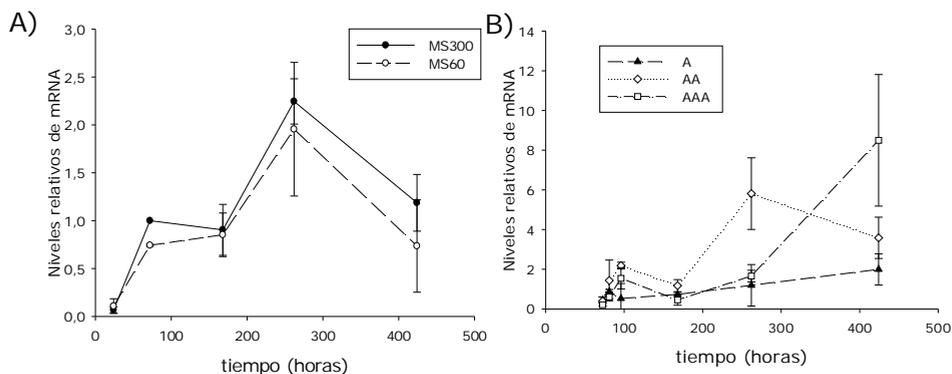


Figura C1.7. Patrón de expresión del gen *SPI1* durante las vinificaciones consideradas en este trabajo. Las gráficas representan los niveles de mRNA cuantificados a partir del análisis *Northern* y normalizados según se describe en el texto. Se analizaron tres cultivos independientes y se muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidos.

3.2. Genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno

En primer lugar se analizó el gen ***GAD1***, codificante del primer enzima que actúa en la ruta de degradación del glutamato, la glutamato descarboxilasa.

Como se observa en la Figura C1.8, la expresión de este gen muestra un pico de inducción en ambas vinificaciones alrededor de 72 horas desde el momento de la inoculación. Parece, por tanto, que el patrón de expresión depende de la fase de crecimiento; sin embargo, las diferencias de niveles entre MS300 y MS60 sugieren una influencia de la disponibilidad de compuestos nitrogenados (probablemente del glutamato y de algunos de sus derivados).

Después de las adiciones se observa una disminución en los niveles de mRNA (de unas 10 veces), seguida de un aumento transitorio. Este patrón recuerda el observado en la vinificación control durante los primeros días. El aumento es menor cuando se añade amonio, lo cual se podría explicar porque este compuesto debe primero incorporarse en forma de glutamato, para que éste posteriormente sea utilizado en procesos biosintéticos. El resultado obtenido para la vinificación control y la represión tras la adición de amonio está de acuerdo con datos descritos previamente en los

análisis globales llevados a cabo por Rossignol y col. (2003) y por Marks y col. (2003), respectivamente.

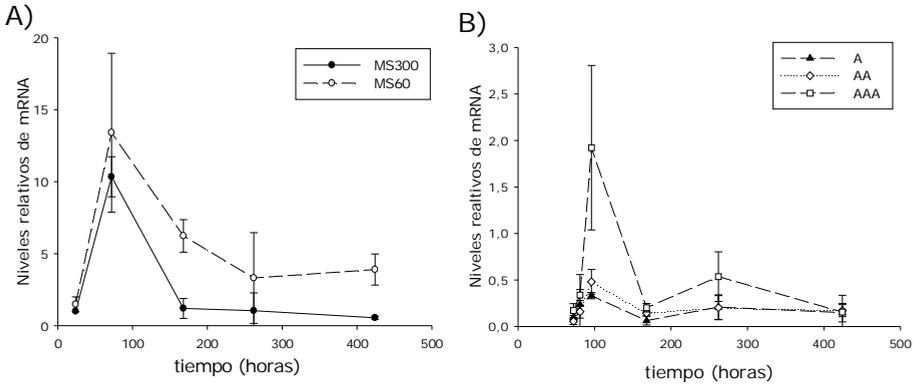


Figura C1.8. Patrón de expresión del gen *GAD1* durante las vinificaciones consideradas en este trabajo. Las gráficas representan los niveles de mRNA cuantificados a partir del análisis *Northern* y normalizados según se describe en el texto. Se analizaron tres cultivos independientes y se muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidos.

Otro gen considerado es el ***GDH1***, que codifica el enzima glutamato deshidrogenasa 1, el primero que actúa en la principal ruta de síntesis del glutamato bajo condiciones de crecimiento en glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente (Avendaño y col., 1997; DeLuna y col., 2001).

La Figura C1.9 muestra que, para cualquier punto de la vinificación, los niveles de expresión de este gen son siempre superiores cuando se lleva a cabo en MS60 que en MS300, pero en ambos hay una disminución después de las primeras horas, como ya se observó en el caso del gen *ERG10*. Estos resultados son consistentes con los descritos para los niveles de Gdh1p por Kolkman y col. (2006) y, parcialmente, también con los datos de Backhus y col. (2001), en los que se observa una disminución de los niveles de expresión de *GDH1* a lo largo de vinificaciones con altas concentraciones de arginina.

Con respecto a las adiciones, sólo la de amonio conduce a un incremento importante, aunque transitorio, en la expresión de este

gen. Este resultado se puede explicar por la participación de la proteína que codifica en la ruta de incorporación del nitrógeno a los aminoácidos.

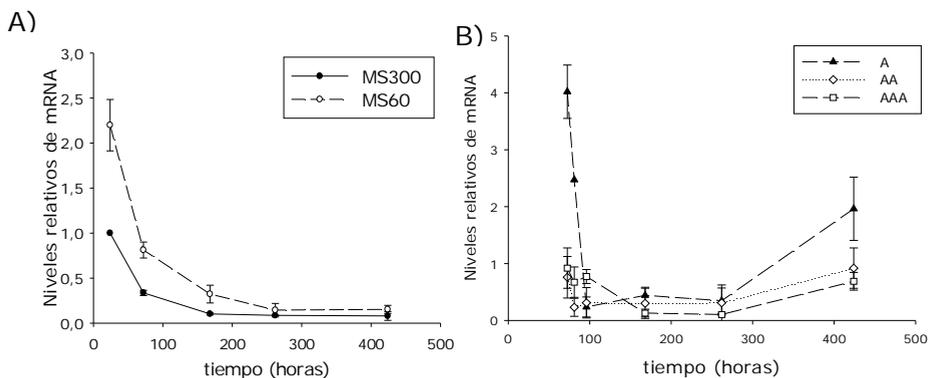


Figura C1.9. Patrón de expresión del gen *GDH1* durante las vinificaciones consideradas en este trabajo. Las gráficas representan los niveles de mRNA cuantificados a partir del análisis *Northern* y normalizados según se describe en el texto. Se analizaron tres cultivos independientes y se muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidos.

3.3. Genes relacionados con el metabolismo glicolítico

En este estudio se ha considerado el gen *TDH3*, que codifica el enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, involucrado en glicolisis y gluconeogénesis. Este gen está reprimido por Gcn4p en respuesta al agotamiento de aminoácidos (Yin y col., 2004).

La Figura C1.10 muestra como los niveles de mRNA decrecen durante la vinificación control; estos datos son consistentes con los encontrados por otros autores (Riou y col., 1997; Puig y Pérez-Ortín, 2000a; Varela y col., 2005), tanto para este gen como para otros que participan en esta misma ruta. La vinificación limitante tiene un patrón similar, pero menos pronunciado.

En las adiciones se detecta un aumento muy pronunciado en la expresión de este gen en el caso de las de aminoácidos y de la mezcla de amonio y aminoácidos, seguido por un importante descenso.

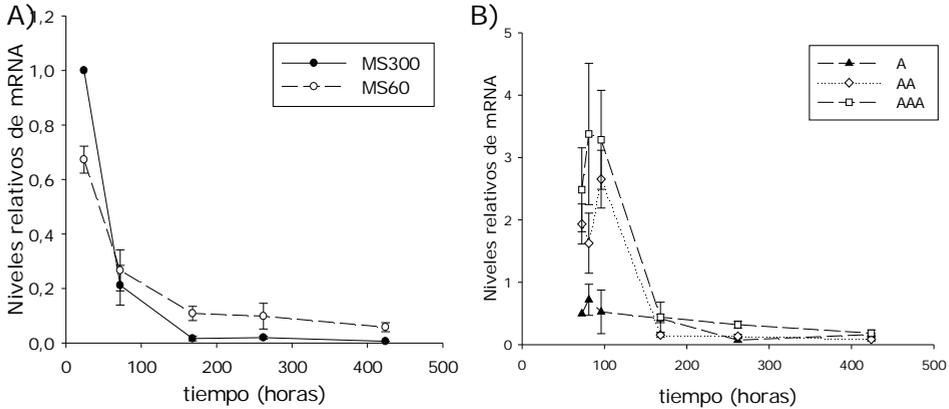


Figura C1.10. Patrón de expresión del gen *TDH3* durante las vinificaciones consideradas en este trabajo. Las gráficas representan los niveles de mRNA cuantificados a partir del análisis *Northern* y normalizados según se describe en el texto. Se analizaron tres cultivos independientes y se muestran el valor medio y la desviación estándar obtenidos.

3.4. Otros genes candidatos a ser marcadores de limitación de nitrógeno en vinificación

Durante el desarrollo de este estudio se estableció una colaboración con los grupos de investigación de la Dra. Mendes-Faia (Universidad Trás-Os-Montes e Alto Douro, Portugal) y el Dr. Pérez-Ortín (Universitat de València), que permitió entender la respuesta global de las células de levadura en condiciones enológicas de limitación y adición de nitrógeno (Mendes-Ferreira y col., 2007a), así como identificar 36 genes (altamente expresados en situaciones de baja concentración o ausencia de nitrógeno) capaces de predecir la limitación de nitrógeno durante la fermentación alcohólica (Mendes-Ferreira y col., 2007b).

Dado que estos estudios se habían llevado a cabo inicialmente en la cepa PYCC4072 en otras condiciones de crecimiento (mostos con glucosa y amonio como únicas fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, y agitación moderada, entre otras) se planteó comprobar si estos genes podían tener una respuesta más general a la limitación de nitrógeno,

independientemente de la cepa utilizada, la composición del medio de crecimiento y las condiciones en las que se realizan los experimentos. Para ello se analizó la expresión de algunos de ellos en las condiciones experimentales seguidas a lo largo de este capítulo para los estudios con mostos sintéticos.

Los genes escogidos *MSC1*, *RTN2*, *ODC1* y *XYL2*. Tanto *RTN2* como *MSC1* forman parte de la respuesta a estrés producido por condiciones ambientales (Gasch y col., 2000). Además, estos dos genes, junto con *ODC1*, están incluidos dentro de las primeras 50 pautas de lectura abiertas inducidas por ayuno de nitrógeno en *S. cerevisiae* (Tai y col., 2005). Se consideró también *XYL2* porque anteriormente había aparecido en otros listados de genes inducidos por deficiencia de nitrógeno (Boer y col., 2003; Tai y col., 2005).

En estos experimentos se utilizó como gen normalizador de muestra *PDA1*, que codifica la subunidad E1 α del complejo piruvato deshidrogenasa y se expresa de forma constitutiva en presencia de distintas fuentes de carbono (Wenzel y col., 1993). La expresión génica se determinó mediante RT-PCR semicuantitativa. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura C1.11 y confirman que los genes seleccionados sirven también como marcadores de limitación de nitrógeno en la cepa vínica ICV16 en las condiciones de crecimiento empleadas en estos análisis. Así, en todos los casos los niveles de mRNAs se incrementan en las muestras de la vinificación limitante correspondientes a 72 y 144 h (FL72 y FL144) y disminuyen tras la adición de amonio (A81).

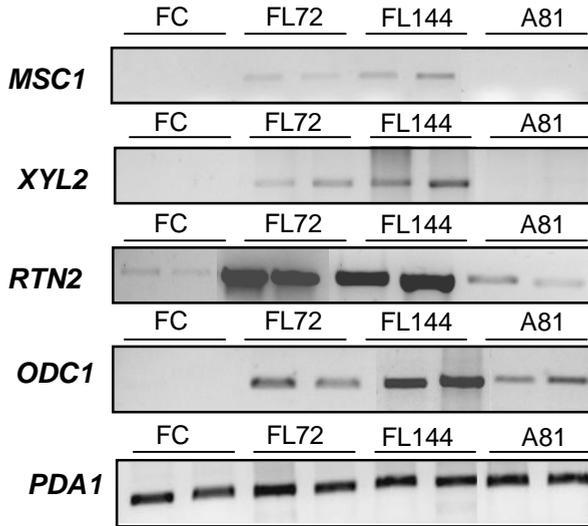


Figura C1.11. Análisis de algunos genes candidatos a ser marcadores de la limitación de nitrógeno de acuerdo con el estudio de Mendes-Ferreira y col., 2007b). Se muestran resultados de RT-PCR semicuantitativa llevada a cabo con duplicados de muestras correspondientes a las vinificaciones cuyos perfiles aparecen en las Figuras C1.1 y C1.2. FC, muestra de la fermentación control (en MS300) a las 24 horas; FL72 y FL144, muestras de la fermentación limitante (en MS60) a las 72 y 144 horas, respectivamente; A81, muestra obtenida 9 horas después de la adición de amonio (A) a la vinificación limitante. Se incluyen como referencia los resultados obtenidos para el gen *PDA1*.

4. Comparación transcriptómica global del efecto de la adición de diferentes fuentes nitrogenadas

Los estudios de expresión génica descritos a lo largo del apartado anterior sugieren diferencias transcripcionales dependientes de la naturaleza de la fuente nitrogenada añadida a la vinificación limitante. Para intentar profundizar en los efectos de las diversas adiciones llevadas a cabo a células creciendo en un medio con deficiencias de nitrógeno se analizó comparativamente la respuesta transcriptómica a nivel global. Para simplificar este estudio nos limitamos a considerar qué ocurre 4 horas después de la adición de amonio o de aminoácidos en vinificaciones donde el nitrógeno se había consumido recientemente. De acuerdo con los datos mostrados en la Figura C1.1 (panel D) estas muestras corresponden a 76 horas desde el momento de la inoculación en MS60.

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente con el paquete informático *ARRAY STAT* para seleccionar solamente aquellos genes que aparecen diferencialmente expresados tras la adición de amonio o de aminoácidos en al menos dos de las tres réplicas realizadas.

Los análisis llevados a cabo revelaron que un total de 729 genes mostraban una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión entre las dos condiciones superior a 2 veces. De todos estos genes, 392 se expresaban más tras la adición de amonio que tras la de aminoácidos, mientras que 337 mostraban el comportamiento contrario.

4.1. Genes más expresados tras la adición de amonio

La utilización de la herramienta *FUNC ASSOCIATE* permite determinar categorías estadísticamente significativas en las cuales se agrupan los genes identificados en este tipo de estudios. Concretamente, cuando se consideran genes más expresados tras la adición de amonio y con valores diferenciales superiores a 2, aparecen las categorías mostradas en la Tabla C1.3.

Tabla C1.3. Agrupación en categorías funcionales de los genes expresados más de 2 veces después de la adición de amonio con respecto a la de aminoácidos

N	X	P	Categoría
73	171	$1,1 \cdot 10^{-28}$	Metabolismo de aminoácidos y derivados
78	194	$1,6 \cdot 10^{-28}$	Metabolismo de compuestos nitrogenados
81	240	$1,4 \cdot 10^{-23}$	Metabolismo de ácidos carboxílicos
24	49	$1,5 \cdot 10^{-11}$	Metabolismo de azufre
14	20	$4,8 \cdot 10^{-10}$	Metabolismo de metionina
11	17	$1,4 \cdot 10^{-7}$	Metabolismo de aminoácidos de la familia del aspartato

Tabla C1.3. Continuación

N	X	P	Categoría
10	15	$3,5 \cdot 10^{-7}$	Metabolismo del glutamato
7	9	$4,8 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de la lisina
9	15	$5,0 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de intermediarios del ciclo de la urea
9	15	$5,0 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de la arginina
37	163	$5,2 \cdot 10^{-6}$	Generación de metabolitos precursores y energía
9	19	$6,2 \cdot 10^{-5}$	Transporte de iones hidrógeno
9	19	$6,2 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de aminoácidos de la familia de la serina
56	319	$8,7 \cdot 10^{-5}$	Respuesta a estímulos

N representa el número de genes de cada categoría que aparecen en nuestro experimento, **X** el número total de genes de dicha categoría y **P** el *p*-valor.

Como se puede observar aparecen como categorías significativas las relacionadas con el metabolismo de los compuestos nitrogenados y, particularmente, con procesos biosintéticos.

Un análisis más detallado de las categorías de genes con mayor expresión tras la adición de amonio lo puede proporcionar la herramienta *GO Term Finder* del SGD (*Saccharomyces Genome Database*). La aplicación de esta aproximación permite agrupar muchos de los genes con niveles de expresión superior a 2 en las categorías que se muestran en la Tabla C1.4.

Tabla C1.4. Distribución en diferentes categorías funcionales según el *GO Term Finder* de los genes más expresados tras la adición de amonio que tras la de aminoácidos, considerando diferencias superiores a 2 entre ambas condiciones.

Categorías funcionales		Genes con mayor expresión tras la adición de amonio	
METABOLISMO DE COMPUESTOS NITROGENADOS	Metabolismo de aminoácidos	Gln	<i>ARG3, ARG1, PUT1, ARG5,6, ARG8, CIT2, IDP1, CPA1, GDH1, CIT1, PUT2, CPA2, ARG4, ECM40, ORT1, GLN1, IDH2, IDH1, GDH3</i>
		Asp	<i>STR3, MET6, LYS20, LYS1, LYS9, LYS12, MET22, MET2, LYS2, LYS21, LYS14</i>
		Ser	<i>MET17, SER33, SER3, HOM6, HOM3, SER1, CYS4, HOM2</i>
		His	<i>HIS4, HIS5, HIS2, HIS7</i>
		Arg	<i>ARG3, ARG1, ARG5,6, ARG8, CPA1, CPA2, ARG4, ECM40, ORT1</i>
		Glu	<i>PUT1, CIT2, IDP1, GDH1, CIT1, PUT2, IDH2, IDH1, GDH3</i>
		Lys	<i>LYS20, LYS1, LYS9, LYS12, LYS2, LYS21, LYS14</i>
		Aromáticos	<i>TRP3, ARO8, ARO3, TRP5, TRP2</i>
		Ramificados	<i>LEU2, ILV5, LEU1, BAT1, LEU4, ILV2</i>
		Pro	<i>PUT1, PUT2, PUT4</i>
		Met	<i>MET3, MET17, MET14, STR3, MET13, MET1, MET6, MET16, MET28, MET2, MET22, MHT1, HOM6, HOM3, SAM2, CYS4, HOM2, SAM1</i>
	Cys		
	Metabolismo de nucleótidos	<i>PYC1, BNA3, GND2, GND1, ZWF1, YEF1, SOL4, TAL1, ATP4, ATP17, POS5, ATP2, STF2, ATP3, ATP1, STF1, HIS7</i>	
METABOLISMO DE COFACTORES	Metabolismo de coenzimas de transferencia de grupo	<i>FOL2, ATP4, ATP17, ATP2, STF2, ATP3, ATP1, STF1, FMS1, ADE3</i>	
	Metabolismo de nicotinamida	<i>PYC1, GND2, GND1, ZWF1, SOL4, TAL1, POS5</i>	
	Metabolismo de vitaminas	<i>ADH5, RIB5, GPD1, YEF1, YAT2, PYC1, SOL4, GND2, GND1, VHR1, TAL1, CAT2, SNO1, SNZ1, ADH2, ZWF1, ALD4, ALD6, POS5</i>	

Tabla C1.4. Continuación

Categorías funcionales		Genes con mayor expresión tras la adición de amonio	
TRANSPORTE	Ácidos orgánicos y aminas	<i>DAL5, GAP1, VBA1, PUT4, OAC1, ORT1, DIC1, DUR3, UGA4, DIP5, MMP1, AVT4, SAM3, TPO1</i>	
	Iónico	<i>MEP2, SUL2, OAC1, PMA1, PMA2, MDM38, ATP4, ATP17, ATP2, STF2, ATP3, ATP1, STF1, SSU1, GIT1</i>	
	Mitocondrial	<i>ORT1, PET9, ODC2</i>	
HOMEOSTASIS	Redox	<i>TRX2, GRX2, PRX1, AHP1</i>	
	Iónica	<i>GGC1, ATM1, MDM38, IZH1, SOD1, ISU2, ISU1, CUP9</i>	
GENERACIÓN DE METABOLITOS PRECURSORES Y ENERGÍA	Respiración celular	<i>CIT1, IDH2, LSC2, COX9, IDH1, PET9, QRC8, COX13, PET10</i>	
	Metabolismo de carbohidratos	Ruta de los fosfato de pentosa	<i>GND2, GND1, ZWF1, SOL4, TAL1</i>
		Reserva de energía	<i>GPH1, TSL1, GDB1, GLC3, PIG2, BMH2, GSY2, NTH1, ATH1, GAC1</i>
		Ciclo del glioxilato	<i>CIT2, IDP1, CIT1, IDH2, LSC2, IDH1</i>
		Regulación del metabolismo	<i>PIG2, UBC8, SNF1, TYE7, VID28</i>
	Metabolismo de esteroides	<i>ALD4, MCR1, ATG26, PDR16, NSG2, ERG25, ADH2, PDC6</i>	
	Met. Vacuolar de proteínas	<i>PRB1(5.9), LAP4(5.1), PEP4(2.7), VPS13(1.9)</i>	
RESPUESTA A ESTÍMULOS	Estrés oxidativo	<i>HSP12, NCE103, GRX4, GND1, ZWF1, TRX2, MCR1, UGA2, GPX1, GRX2, POS5, MCD1, SNO2</i>	
	Iones metálicos	<i>GSH1, CUP1-1, CUP1-2, MET30, IZH1, AHP1</i>	
	Hiperósmosis	<i>HSP12, MET22, GPD1</i>	
	Drogas	<i>LAP3, PDR16, ATR1, YOR1, QDR3, SNO2</i>	
	Calor	<i>HSP12, PIL1, YDC1, GAC1</i>	
	Nivel de nutrientes	<i>PRB1, PEP4, SNF1</i>	
	Desecación	<i>HSP12, STF2</i>	

En el anexo 1, que se puede encontrar en el CD adjunto, aparece un archivo con los datos de expresión relativa amonio/aminoácidos.

A partir de los datos mostrados en la Tabla C1.4 se pueden destacar algunos aspectos interesantes.

La adición de amonio determina un cambio en la expresión de genes implicados en el metabolismo de compuestos nitrogenados (particularmente en su biosíntesis). Así, encontramos más expresados (con respecto a la adición de aminoácidos) 84 de los 250 genes que incluye el GO en la categoría de metabolismo de compuestos nitrogenados, la mayoría de los cuales (74 de 209 en el GO) participa en el metabolismo de aminoácidos y más de la mitad (56 de 106 en el GO) en procesos de biosíntesis. Así, encontramos:

- en el caso de la glutamina 19 genes de biosíntesis (de los 27 de su categoría GO)
- en el del glutámico 9 de 13 (solamente aparecen dos genes relacionados con degradación)
- para la arginina 9 de 10 y ninguno relacionado con degradación
- con respecto a la serina, 7 de biosíntesis (de 12) y 4 de degradación (aunque no el gen *CHA1*, que codifica el primer enzima necesario para la utilización de este aminoácido)
 - en el caso de lisina 7 de 9
 - en el grupo de aminoácidos de azufre 11 de 15, todos los estrictamente necesarios para su proceso de biosíntesis.

También encontramos sobrerrepresentados tras la adición de amonio genes implicados en el metabolismo de cofactores (29 de 167 en la categoría GO), vitaminas (19 de 96) y nucleótidos (23 de 153). Llama la atención especialmente la presencia en la Tabla C1.4 de genes del metabolismo de la nicotinamida (13 de 46), que podrían estar relacionados con la necesidad de este tipo de coenzimas para reacciones de biosíntesis de aminoácidos (la fijación de glutámico, por ejemplo, requiere NADPH).

Es importante señalar, además, la categoría denominada “generación de metabolitos precursores y energía”. Entre los genes de la misma hay algunos relacionados con respiración celular y fosforilación oxidativa. Dentro de esta misma categoría, en cuanto al metabolismo de carbohidratos, aparecen 26 genes de 221 que considera la correspondiente categoría GO, entre los cuales se encuentran algunos relacionados con la ruta oxidativa de los fosfatos de pentosa, con el metabolismo del glucógeno y de la trehalosa, y con el ciclo del ácido cítrico (aunque no el codificante de la succinato deshidrogenasa). Estos datos sugieren un desvío del metabolismo hacia aspectos relacionados con biosíntesis. Debemos tener en cuenta que hay etapas del ciclo del ácido cítrico que funcionan en ausencia de oxígeno y posibilitan la síntesis de precursores para el crecimiento, como ocurre también con la ruta de los fosfatos de pentosa.

Otra categoría que aparece diferencialmente expresada es la relacionada con procesos de transporte, por ejemplo de aminas (12 de 50 genes en la categoría GO) o iones (15 de 110). Como luego veremos esta categoría también aparece sobrerrepresentada con mayor expresión tras la adición de aminoácidos, incluyendo, obviamente, otros genes. La adición de nitrógeno desencadena, independientemente de la naturaleza de la fuente utilizada, una mayor actividad de transporte.

Finalmente, se debe señalar otra categoría interesante, la de respuesta a estímulos (80 genes de 816 en la categoría GO) y, en particular, a estrés oxidativo (21 de 83), en la que aparecen los genes *HSP12*, *GND1* y *TRX2*, entre otros. La mayor expresión de estos genes podría estar conectada con procesos metabólicos de biosíntesis de aminoácidos o de respiración celular.

Además cabe destacar la presencia de numerosos genes de función desconocida con expresión diferencial superior a 2 tras la adición de amonio con respecto a la de aminoácidos. Entre ellos los que muestran los niveles más elevados son: *YLL055W*, *YBR147W*, *YLR152C*, *YHR162W*, *YMR090W*, *YHR112C*, *YML131W*, *YDR070C*, *JRR096W*, *YLL058W*, *YNL115C*, *YNL134C*, *YHR087W*, *YLR149C*,

Resultados

YBL049W, YJL225C, YOR389W, YIL177C, YMR087W, YMR144W, YGR125W, YKR104W, YGL059W e *YBL112C*.

Todos estos datos permiten concluir que el principal efecto diferencial de la adición de amonio frente a la de aminoácidos al nivel transcriptómico está relacionado con un incremento en los procesos de biosíntesis de aminoácidos, así como de todos aquéllos necesarios para que se puedan llevar a cabo. La levadura reorientaría así su metabolismo durante las primeras horas posteriores a la adición hacia estos procesos para posibilitar la recuperación de su crecimiento en el mosto.

4.2. Genes más expresados tras la adición de aminoácidos

El análisis mediante la herramienta *FUNC ASSOCIATE* nos indica en este caso las categorías que se muestran en la Tabla C1.5.

Tabla C1.5. Agrupación en categorías funcionales de los genes expresados más de 2 veces después de la adición de aminoácidos con respecto a la de amonio.

N	X	P	Categoría
50	114	$1,9 \cdot 10^{-23}$	Nucleolo
46	136	$3,3 \cdot 10^{-16}$	Ensamblaje y biogénesis de ribosomas
35	92	$2,6 \cdot 10^{-14}$	Procesamiento de rRNA
35	97	$1,7 \cdot 10^{-13}$	Metabolismo de rRNA
85	471	$7,1 \cdot 10^{-11}$	Orgánulos no asociados a membranas
16	31	$1,6 \cdot 10^{-9}$	Complejo de ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas
49	252	$1,5 \cdot 10^{-7}$	Metabolismo de RNA
15	39	$7,1 \cdot 10^{-7}$	Procesamiento del transcrito primario 35S
7	11	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Biogénesis de subunidades ribosomales
7	12	$2,8 \cdot 10^{-5}$	Modificación de rRNA

N representa el número de genes de cada categoría que aparecen en nuestro experimento, **X** el número total de genes de dicha categoría y **P** el *p*-valor.

De acuerdo con este resultado y con los datos descritos en el apartado 4.1 se puede comprobar cómo la adición de amonio desencadena un incremento en la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, mientras que la adición de éstos determina un incremento en procesos de biosíntesis de proteínas.

Como en el caso anterior se puede hacer un análisis más detallado de las categorías de genes inducidos tras la adición de amonio, mediante la herramienta *GO Term Finder* del *SGD*. La aplicación de esta aproximación permite agrupar los genes con expresión diferencial superior a 2 en las categorías que se muestran en la Tabla C1.6.

Tabla C1.6. Agrupación en categorías funcionales según el *GO Term Finder* de los genes con mayor expresión tras la adición de aminoácidos que tras la de amonio, considerando diferencias superiores a 2 entre ambas condiciones.

Categorías funcionales		Genes con mayor expresión tras de la adición de aminoácidos
ENSAMBLAJE Y BIOGÉNESIS DE RIBOSOMAS	Procesamiento de RNA	<i>SNU13, SIK1, NSR1, HAS1, NOP1, NOP58, NIP7, MIS1, ENP1, CBF5, RRP7, LSM3, DBP3, RPP1, CGR1, SPB1, KRR1 RPS14A, RPL30, GAR1</i>
	Ensamblaje de subunidades ribosomales	<i>NSR1, NOP1, NIP7, RRP7, DBP3, RPS31, RPS14A, MAK16</i>
COMPLEJO RNA-polimerasa	Transcripción a partir de la RNA-polimerasa I	<i>RPA14, RPA12, RPA49, RPA34</i>
	Transcripción a partir de la RNA-polimerasa III	<i>RPC34, NHP6A</i>
	Transcripción a partir de la RNA-polimerasa II	<i>RPA14, RPA12, RPB11, RPA49, RPA34, PTA1</i>

Tabla C1.6. Continuación

Categorías funcionales			Genes con mayor expresión tras de la adición de aminoácidos
METABOLISMO	De proteínas	Inicio de la traducción	<i>MIS1, HYP2, TIF1, FUN12, GCD10, TIF5</i>
		Regulación de la traducción	<i>ZUO1, GNC20, RPS2, TIF5, RPL30</i>
		Plegamiento de proteínas	<i>ZUO1, CNE1, GIM4, EGD1, CCT2, PAC10, CHS7</i>
		Modificación de peptidil-aminoácidos	<i>DPH5, DPH2, NAT2</i>
		Metabolismo de glicoproteínas	<i>DPM1, PMT2, ALG7, PMT4, KTR3</i>
	De nucleobases, nucleósidos y nucleótidos		<i>APT1, URA7, RPE1, DUT1, MIS1, BNA4, IMD2, PRS1, GUA1, IMD3, GUK1, URA6, AAH1, URA3, URA5, RKI1, PRS4, ADE8</i>
	De derivados de aminoácidos		<i>SPE3, PRS1, EPT1, PRS4</i>
	De cofactores		<i>BIO2, RPE1, SPE3, MIS1, COQ1, HEM13, YAH1, BIO4, SDH3, RKI1, GRX5, ERC1</i>
	De lípidos		<i>AUR1, PIS1, LCB1, TSC10, FEN1, SUR4, ACP1, SEC14, SLC1</i>
	TRANSPORTE	De aminoácidos	
De zinc		<i>ZRT2, ZRT1, ZRC1</i>	
De nucleobases		<i>FUR4, DAL4</i>	
Intracelular		Nuclear	<i>KAP123, NPL3, ECM1, NUP1, KAP95</i>
		RE-Golgi	<i>BET5, YIP3, USO1, YIP1, CHS7, SEC23</i>
		De proteínas	<i>KAP123, TOM20, TOM5, TOM40, ECM3, NUP1, MRS5, KAP95</i>

En el anexo 1, que se puede encontrar en el CD adjunto, aparece un archivo con los datos de expresión relativa amonio/aminoácidos.

El estudio de la Tabla C1.6 nos permite destacar algunos aspectos de interés. El resultado más claro es, sin duda, el incremento en la transcripción de algunos genes que están

implicados en procesos de biogénesis de ribosomas (51 de los 392 que incluye esta categoría *GO*), biosíntesis de proteínas y traducción. Este resultado sería indicativo de un direccionamiento metabólico hacia la organización de la maquinaria traduccional. De hecho también se detectan genes de procesamiento de rRNAs (40 de 227), de exportación de ribosomas desde el núcleo y de inicio de la traducción.

En lo que se refiere a genes del metabolismo, encontramos algunas categorías relacionadas con nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, así como lípidos (incluyendo en este caso genes fundamentalmente implicados en la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos). Todo esto se correlacionaría con una capacidad de crecimiento a partir de aminoácidos en presencia de fuentes de carbono adecuadas.

Llama la atención la mayor expresión tras la adición de aminoácidos de los genes que están relacionados con transporte, tanto entre el exterior y el interior de la célula, como el intracelular (nuclear, RE-Golgi...). La subcategoría más representada sería la del transporte de aminoácidos, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta la presencia de éstos en el medio de cultivo. Es interesante resaltar algunos de estos genes: *AGP1* (codifica una permeasa de aminoácidos de baja afinidad y amplio espectro), *GNP1* (permeasa de alta afinidad para glutamina que también transporta leucina, serina, treonina, cisteína, metionina y asparagina), *MUP1* (permeasa de metionina de alta afinidad), *TAT2* (permeasa de triptófano y tirosina, entre otros aminoácidos) y *BAP2/3* (de alta afinidad por leucina, isoleucina y valina). Didion y col. (1996) han descrito que la expresión de *BAP2* se induce en presencia de ciertos aminoácidos en el medio.

También debemos destacar la identificación genes de función desconocida. Los que presentaron valores de expresión diferencial más elevados fueron: *YER064C*, *YCR051W*, *YBR261C*, *YGR272C*, *YMR310C*, *YCR087C-A*, *YGR203W*, *YLR050C*, *TBR187W*, *YOR091W*, *YKR045C*, *YLR437C*, *YOR342C* e *YPL067C*.

4.3. Validación de los resultados mediante RT-PCR

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos, se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa la expresión de algunos de los genes encontrados en los estudios transcriptómicos globales descritos en los apartados 4.1 y 4.2, y pertenecientes a diferentes categorías funcionales. Se incluyeron también algunos otros tiempos de la vinificación para poder obtener información acerca de los cambios transcripcionales que ocurren antes y después de la adición de nitrógeno. Para ello se escogieron las muestras correspondientes a la fase de crecimiento exponencial en la vinificación control (MS300, 24), al momento en el que se agota el amonio (MS60, 72) y tras 4 y 9 horas de la adición de amonio o aminoácidos (A, 76, 81; AA, 76, 81, respectivamente).

Se consideraron para estos análisis los genes con valores de expresión diferencial más elevados 4 horas después de las diferentes adiciones. En el caso de la adición de amonio comparada con la de aminoácidos fueron: *ARG1* (relacionado con el metabolismo de la arginina), *MET3* (metabolismo de la metionina), *MEP2* (permeasa de amonio regulada por NCR), *CIT1* (involucrado en la respiración celular) así como *YLL055W* y *YBR147W* (genes de función desconocida). En el caso de los genes más expresados tras la adición de aminoácidos frente a la de amonio se consideraron: *AGP1* y *MUP1* (relacionados con el transporte de aminoácidos), *MIS1* (inicio de la traducción) e *YER064C* (gen de función desconocida).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura C1. 12 y confirman los resultados obtenidos en las micromatrices: los cambios de expresión y los niveles de los mismos son los esperados.

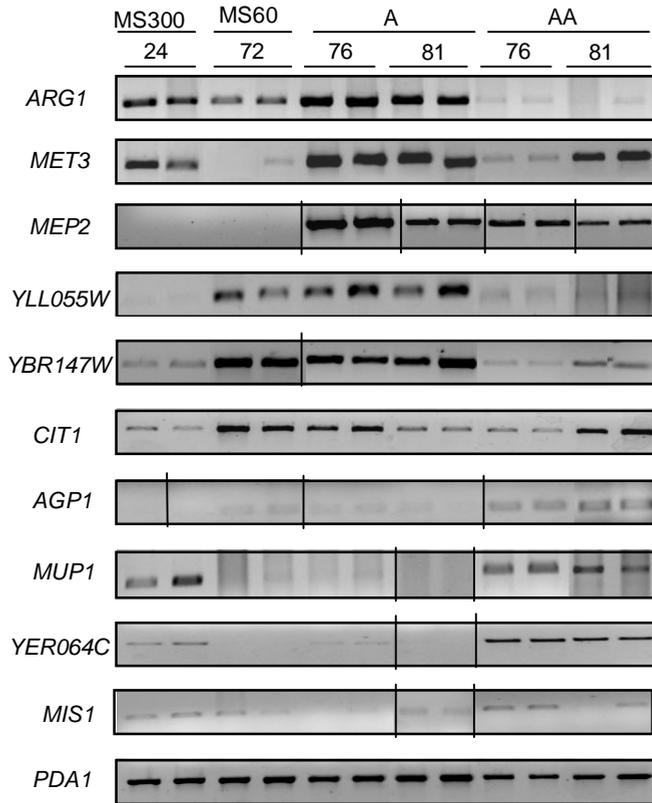


Figura C1.12. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de los genes con mayor expresión tras la adición de amonio (*ARG1*, *MET3*, *MEP2*, *YLL055W*, *YBR147W* y *CIT1*) o la de aminoácidos (*AGP1*, *MUP1*, *YER064C* y *MIS1*). Los oligonucleótidos específicos se describen en la Tabla M. 2. Se utilizaron dos muestras independientes para la validación. Las líneas verticales separan partes de un mismo gel. Se muestran como referencia los resultados obtenidos para el gen *PDA1*.

Si nos centramos en los perfiles de expresión de los genes sobrerrepresentados tras la adición de amonio es posible encontrar algunas peculiaridades interesantes. En el caso de *ARG1* y *MET3* la expresión es menor bajo condiciones de limitación de nitrógeno (MS60 72) que en crecimiento exponencial con disponibilidad del mismo (MS300 24), de acuerdo con resultados descritos anteriormente bajo condiciones de vinificación (Rossignol y col., 2003; Mendes-Ferreira y col., 2007a). Sin embargo, lo contrario ocurre en el caso de *YLL055W*, *YBR147W* y *CIT1*. Teniendo en cuenta la función de *CIT1*, esto podría indicar que los genes que

codifican proteínas relacionadas con respiración y ciclo del ácido cítrico pueden estar parcialmente desreprimidos tanto en condiciones de fase estacionaria como bajo limitación de nitrógeno durante la vinificación, a pesar de la disponibilidad de altas concentraciones de glucosa (Rossignol y col., 2003; Zuzuarregui y col., 2006; Mendes-Ferreira y col., 2007a). En el caso del gen *MEP2*, los niveles de expresión son muy bajos tanto en la vinificación control en crecimiento exponencial como en la limitante en el momento en el que se agota el nitrógeno; este resultado podría explicarse por la implicación de otras permeasas de amonio y por los niveles de nitrógeno presentes.

Cabría destacar que la expresión no varía significativamente entre 4 y 9 horas después de la adición de amonio o de aminoácidos en el caso de *ARG1* o *YLL055W*. Para *MET3* y *YBR147W*, sin embargo, los niveles de mRNA se incrementan a 81 horas en la adición de aminoácidos. Por otro lado, los niveles de *CIT1* descienden tras la adición de amonio pero se incrementan tras la de aminoácidos. Finalmente, en el caso de *MEP2* la expresión se reduce entre 76 y 81 horas tras los dos tipos de adiciones. Todo esto sugiere la existencia de ciertas variaciones en la expresión de los diferentes genes mientras las células se adaptan a los cambios en la disponibilidad de nutrientes.

Con respecto a los genes que tienen mayores niveles de expresión tras la adición de aminoácidos también se pueden observar diferencias en el patrón de expresión. En el caso de *AGP1*, la expresión es indetectable en condiciones de disponibilidad de nitrógeno en fase de crecimiento exponencial, mientras que lo contrario ocurre en el caso de *MUP1* (y también de *YER064C*). Esto puede ser debido a las diferencias en especificidad entre estos transportadores y al consumo progresivo de los diferentes aminoácidos: Agp1p es una permeasa de baja afinidad con un amplio rango de sustratos (entre los que se incluyen la asparagina, la glutamina y otros aminoácidos) y Mup1p es una permeasa de metionina de alta afinidad. En el caso de *MIS1* no hay diferencias significativas entre MS300 24 y MS60 72. El patrón observado para

todos estos genes después de 4 horas de la adición (A 76 y AA 76), tanto de amonio como de aminoácidos, no cambia básicamente en las siguientes horas (A 81 y AA 81).

4.4. Regulación transcripcional de los genes inducidos por amonio o por aminoácidos

La aplicación de la base de datos del *YEASTRACT* a los genes con valores de expresión diferencial superior a 2 permite determinar los factores transcripcionales que regulan la transcripción de estos genes.

Cada uno de los factores Yap1p, Sok2p, Sfp1p, Rpn4p, Met4p, Gcn4p, Ste12p, Msn2p, Pdr1p, Aft1p, Pdr3p, Rap1p, Msn4p, Arr1p y Leu3p controla la transcripción de más del 20% de los genes con mayores niveles tras la adición de amonio frente a la de aminoácidos. Estas proteínas participan en procesos como la respuesta a estímulos (Yap1p, Msn2/4p, Rpn4p, Arr1p, Pdr1p, Pdr3p, Aft1p), el metabolismo del nitrógeno (Met4p, Gcn4p y Leu3p), el crecimiento pseudohifal (Sok2p, Ste12p) o la estructura telomérica y el silenciamiento (Rap1p).

Por otro lado, los factores transcripcionales Sfp1p, Yap1p, Met4p, Ste12p, Rap1p, Msn2p, Pdr3p, Flh1p y Abf1p controlan cada uno de ellos más del 20% de los genes que se expresan más cuando se adiciona aminoácidos que cuando se añade amonio. Entre estos genes hay algunos vinculados a la respuesta a estímulos, metabolismo pseudohifal o estructura telomérica que también han aparecido en el caso anterior (Yap1p, Met4p, Ste12p, Rap1p, Msn2p, Pdr3p), pero se pueden encontrar otros dos no coincidentes: Flf1p (implicado en el procesamiento de rRNA) y Abf1p (silenciamiento génico).

YEASTRACT también permite determinar la proporción de los genes regulados por un determinado factor transcripcional que aparece en nuestras poblaciones de genes con expresión diferencial superior a 2. La Tabla C1.7 muestra los datos obtenidos para algunos factores transcripcionales relevantes en la regulación

Resultados

de la expresión de genes codificantes de proteínas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y proteínas.

Tabla C1.7. Factores transcripcionales (FT) que regulan la transcripción de genes sobrerrepresentados tras la adición de amonio o de aminoácidos y cuyos valores de expresión diferencial son superiores a 2.

FT	Genes regulados	% genes ⁽¹⁾	p-valor	% genes ⁽²⁾	p-valor
Lys14p	Biosíntesis de lisina	60%	$4,39 \cdot 10^{-3}$	0,00%	0,6788
Met28p	Biosíntesis de aminoácidos de azufre	31,40%	$1,93 \cdot 10^{-7}$	7,80%	0,1938
Dal80p	NCR	25,60%	$4,82 \cdot 10^{-8}$	3,80%	0,1629
Met32p	Biosíntesis de metionina	23,70%	$2,52 \cdot 10^{-8}$	6,20%	0,1692
Gcn4p	Biosíntesis de aminoácidos	22,60%	0,00	5,40%	0,0726
Gln3p	NCR	21,50%	$3,63 \cdot 10^{-13}$	9,00%	0,0112
Gzf3p	NCR	20,40%	$2,42 \cdot 10^{-8}$	6,10%	0,1402
Met31p	Biosíntesis de aminoácidos de azufre	17,40%	$8,26 \cdot 10^{-8}$	5,80%	0,1155
Leu3p	Biosíntesis de aminoácidos ramificados y asimilación de amonio	16,40%	$4,92 \cdot 10^{-12}$	5,30%	0,0289
Gat1p	NCR	13,50%	$1,48 \cdot 10^{-5}$	2,00%	0,0681
Cbf1p	Biosíntesis de aminoácidos de azufre	13,00%	$2,51 \cdot 10^{-5}$	6,00%	0,0958
Dal81p	NCR	12,40%	$1,18 \cdot 10^{-7}$	6,00%	0,0333
Met4p	Biosíntesis de aminoácidos de azufre	12,40%	$6,91 \cdot 10^{-14}$	7,40%	0,0095

Tabla C1.7. Continuación.

FT	Genes regulados	% genes ⁽¹⁾	p-valor	% genes ⁽²⁾	p-valor
Dal82p	NCR	7,20%	$9,46 \cdot 10^{-2}$	6,00%	0,1142
Aro80p	Metabolismo de aminoácidos aromáticos	4,10%	$1,96 \cdot 10^{-1}$	7,20%	0,0144
Sfp1p	Biogénesis de ribosomas	1.66%	$1,26 \cdot 10^{-2}$	4,70%	0,0000

(1) Porcentaje de genes regulados que están sobreexpresados tras la adición de amonio en comparación con la de aminoácidos.

(2) Porcentaje de genes regulados que están sobreexpresados tras la adición de aminoácidos en comparación con la de amonio.

Los datos mostrados en la Tabla C1.7 refuerzan las diferencias encontradas en este trabajo en cuanto a la respuesta celular a la adición de amonio o aminoácidos. El porcentaje de genes activados por factores transcripcionales implicados en la biosíntesis de aminoácidos es mayor entre los genes más expresados tras la adición de amonio que tras la de aminoácidos. De hecho, más del 50% de los genes regulados por el factor transcripcional Lys14p y entre el 12 y el 30% de los controlados por Met4/28/31/32p se encuentran en esta condición particular. El número de genes regulados por estos factores es mucho menor entre los genes con mayor expresión al añadir aminoácidos. De forma opuesta, el porcentaje de dianas del factor Sfp1p, implicado en el control de la biogénesis de ribosomas, es mayor en este segundo grupo de genes.

También es interesante destacar que algunos de los factores transcripcionales que aparecen en la Tabla C1.7 presentan diferencias de expresión entre las dos condiciones analizadas. Es el caso de Lys14p, Gcn4p y Dal80p, que presentan mayor expresión tras la adición de amonio que tras la de aminoácidos, como se puede observar en la Tabla C1.4 y en el anexo 1, que se encuentra en el CD adjunto.

Resulta interesante dedicar una atención particular a los genes regulados por NCR. En concordancia con los datos

publicados por Cardenas y col. (1999), Cox y col. (1999), Beltrán y col. (2004) y Godard y col. (2007), la mayoría de ellos muestran una mayor expresión después de la adición de amonio. Los únicos que muestran el comportamiento contrario son: *AGP1*, *CAR1* y *CAR2* (con niveles de expresión diferencial de 26, 24 y 39, respectivamente), así como *DAL4*, *ZRT1* o *MEP3* con diferencias más moderadas (de 2 a 3,6 veces). De acuerdo con sus análisis, Godard y col. (2007) propusieron nuevos genes diana de NCR. En nuestras condiciones experimentales, los genes regulados por NCR descritos en este estudio también se encuentran más expresados tras la adición de amonio que tras la de aminoácidos; sólo *YNL141W* tiene mayores niveles en la situación contraria.

En relación también con la expresión de los genes regulados por NCR, debe resaltarse que, como se muestra en la Tabla C1.7, en el caso de dos activadores transcripcionales que regulan la expresión de estos genes (Gat1p y Gln3p) (Coffman y col., 1997; Svetlov y Cooper, 1997; Scherens y col., 2006), entre el 13 y el 21% de sus dianas aparecen sobrerrepresentadas cuando se adiciona amonio (considerando como en todo este estudio, cambios de expresión superiores a 2). Una situación similar ocurre para los factores transcripcionales que actúan como represores en el mecanismo NCR (Dal80p, Dal81p, Dal82p o Gzf3p, Coffman y col., 1997; Svetlov y Cooper, 1997; Bertram y col., 2000): el porcentaje de dianas reguladas por ellos es de nuevo más alto entre los genes con una mayor expresión tras la adición de amonio que de aminoácidos.

4.5. Importancia de la proteína codificada por el gen YBR147W para el óptimo crecimiento en medio sintético

Para intentar entender el papel de algunas proteínas codificadas por genes de función desconocida diferencialmente expresados en función de la fuente de nitrógeno añadida, se seleccionaron mutantes en algunos de estos genes en las cepas de laboratorio BY4741 o BY4742. Dichos mutantes se crecieron

después de ser sometidos a ayuno de nitrógeno (incubando durante 14-16 horas en medio SD a 30°C con agitación suave) en cuatro fuentes diferentes de nitrógeno: amonio (en forma de cloruro amónico), glutamina, triptófano o una mezcla de amonio y glutamina, con una concentración final en todos los casos de 240 mg N/L. Estos experimentos se llevaron a cabo en medio mínimo sintético ante la incapacidad de las cepas para crecer en mosto sintético. Se utilizaron para este estudio los mutantes de todos aquellos genes que tenían un cambio en el nivel de expresión de al menos tres veces en los experimentos de micromatrices descritos en este capítulo. Estos genes han aparecido citados a lo largo del texto.

Sólo el mutante del gen *YBR147W* presentó defectos en el crecimiento después de las adiciones cuando se compara con la cepa silvestre (Figura C1.13 y otros datos no mostrados). Las diferencias encontradas ocurrían independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada para la suplementación, como se muestra en la Figura C1.13.

Resultados

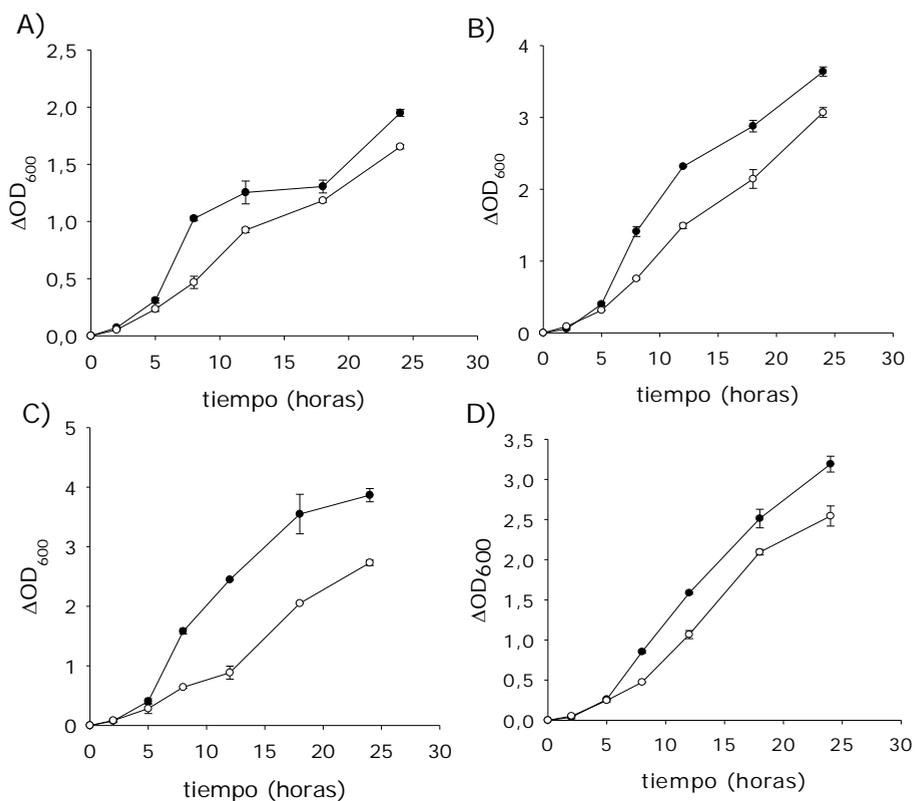


Figura C1.13. Crecimiento del mutante del gen *YBR147W* bajo diversas condiciones de disponibilidad de nitrógeno. Después de crecer las células en medio SD hasta el agotamiento de nitrógeno, se transfirieron a medios con amonio (A), glutamina (B), amonio y glutamina (C) o triptófano (D) como únicas fuentes de nitrógeno, con una concentración final en todos los casos de 240 mg N/L. La figura muestra el incremento de la densidad óptica a 600 nm entre cada tiempo y el momento de la dilución en cada uno de los medios ($OD_{600}=0,1$). Los valores corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Este mutante también presentó defectos similares cuando se inocularon células de cultivos con ayuno de nitrógeno en medio SD conteniendo nitrógeno en concentraciones de 1060 mg N/L en forma de amonio, glutamina y triptófano, así como en medio sintético completo SC (Figura C1.14). Sin embargo, cuando crece en medio YPD, no muestra diferencias con respecto a la cepa silvestre.

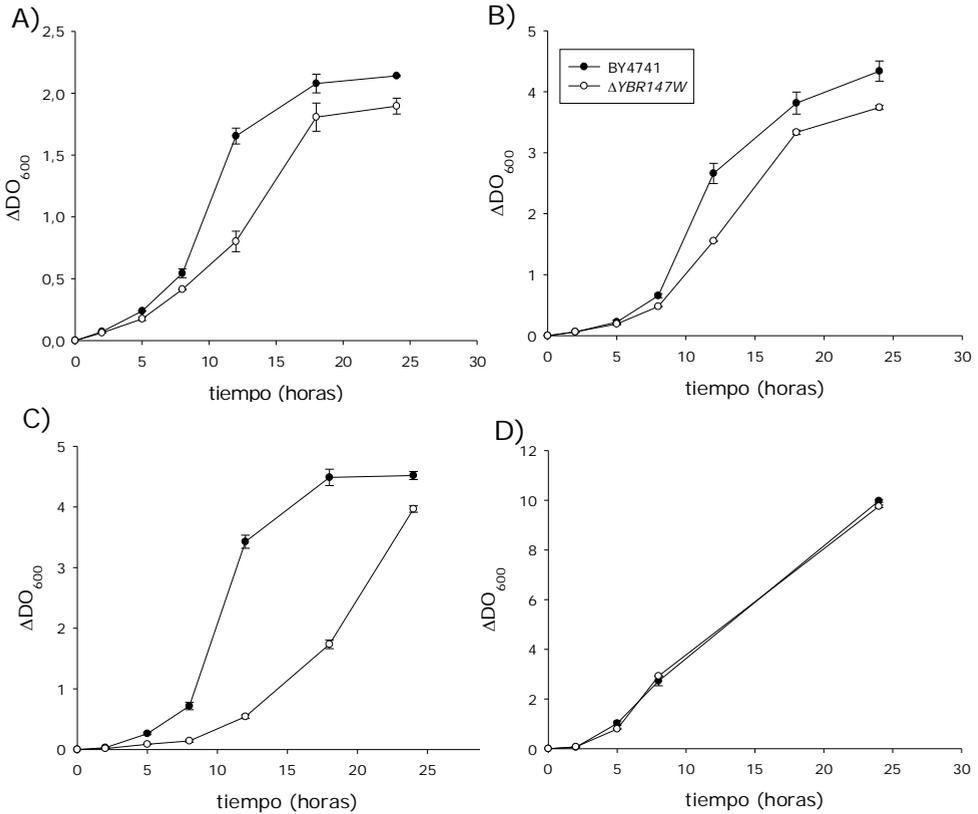


Figura C1.14. Crecimiento del mutante del gen *YBR147W* bajo diversas condiciones de disponibilidad de nitrógeno. Después de crecer las células en medio SD hasta el agotamiento de nitrógeno, las células se transfirieron a medios SD con amonio (1060 mg N/L) como fuente de nitrógeno (A), SD con glutamina (1060 mg N/L) como fuente de nitrógeno (B), SC (C) o YPD (D). La figura muestra el incremento de la densidad óptica a 600 nm entre cada tiempo y el momento de la dilución en cada uno de los medios ($OD_{600}=0,1$). Los valores corresponden a la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

5. Efecto de la naturaleza de la fuente de nitrógeno añadida a vinificaciones limitantes en los niveles de algunos compuestos implicados en propiedades organolépticas

De acuerdo con los experimentos realizados hasta el momento, la naturaleza de la fuente de nitrógeno adicionada no afecta significativamente al comportamiento fermentativo, aunque la adición de las sales de amonio conduce a una ligera disminución en la velocidad de consumo de azúcar (Figura C1.2, panel B).

Dado que las fuentes nitrogenadas contribuyen al aroma del vino, resulta interesante analizar si estas adiciones tienen algún efecto sobre el perfil aromático del producto final.

Para poder responder a esta cuestión se consideraron algunos compuestos volátiles presentes en el vino. Uno de ellos es el acetato de etilo, que constituye cerca del 95% del total de los acetatos presentes en el mismo. El isobutanol, el alcohol isoamílico y el 2-feniletanol también se incluyeron, ya que provienen del metabolismo de carbohidratos y, aunque en menor medida, del de los aminoácidos valina, leucina y fenilalanina, respectivamente (Rapp y Versini, 1991). Finalmente, se analizaron también los ésteres correspondientes a estos alcoholes (acetato de isobutilo, acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletilo).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla C1.8. Se presentan los valores medios (en mg/L) y la desviación estándar de tres muestras obtenidas a partir de tres cultivos independientes. En la presentación de estos resultados se compararán los datos obtenidos entre la vinificación control (MS300) y las adiciones (A, AA y AAA). Se han incluido los datos de MS60, pero no son muy informativos, ya que existe una limitación de nitrógeno desde las 72 horas del comienzo de la vinificación.

Los niveles de alcohol isobutílico son mucho mayores y estadísticamente significativos en todas las adiciones, especialmente en la de aminoácidos y en la de amonio y aminoácidos (alrededor de 4-5 veces superiores, aproximadamente, comparando con MS300). En el caso del alcohol isoamílico, los valores aumentan entre 1,3-1,5 veces después de la adición de amonio y amonio y aminoácidos, y para el caso de la adición de aminoácidos este aumento es de 1,8 veces; estas diferencias presentan una menor significatividad estadística (p -valor entre 0.07 y 0.28, según la comparación). Los niveles del 2-feniletanol se incrementan hasta 3 veces más en el caso de la adición de los aminoácidos, siendo este aumento más moderado

en el caso del amonio (1,4 veces), aunque siempre estadísticamente significativo.

Tabla C1.8. Concentración (en mg/L) de algunos compuestos organolépticos en el producto final, determinados como se describió en el apartado 2.14 de Materiales y Métodos*.

Compuesto	MS300	MS60	A	AA	AAA
Alcohol isobutílico	12 ± 3	84 ± 11	46 ± 6	63 ± 6	64 ± 6
Alcohol isoamílico	285 ± 38	407 ± 103	433 ± 23	520 ± 80	371 ± 24
2-feniletanol	20,7 ± 1,5	39,7 ± 0,2	28,9 ± 1,1	66 ± 6	51 ± 6
Acetato de etilo	74 ± 6	71 ± 10	46 ± 10	39 ± 6	66 ± 5
Acetato de isoamilo	0,033 ± 0,008	0,061 ± 0,003	0,007 ± 0,002	0,012 ± 0,002	0,008 ± 0,002
Acetato de 2-feniletanol	0,046 ± 0,012	0,064 ± 0,006	0,037 ± 0,004	0,088 ± 0,015	0,059 ± 0,009

*De acuerdo con el análisis ANOVA con un $p \leq 0,05$, las diferencias serían significativas en los siguientes casos: MS300/MS60 para el alcohol isobutílico, el 2-feniletanol y el acetato de isoamilo; A/MS300 en el caso de alcohol isobutílico, 2-feniletanol, acetato de etilo y acetato de isoamilo; AA/MS300: alcohol isobutílico, 2-feniletanol, acetato de etilo; AAA/MS300: alcohol isobutílico, 2-feniletanol; A/AA: 2-feniletanol, acetato de isoamilo, acetato de 2-feniletanol; AA/AAA: acetato de etilo; A/AAA: 2-feniletanol, acetato de etilo.

En lo que se refiere a las concentraciones finales de acetato de etilo, se observa una disminución en las adiciones, más pronunciada en el caso de la de aminoácidos. A pesar de los elevados valores encontrados para el alcohol isoamílico, los niveles del acetato correspondiente son comparativamente más bajos que

los encontrados en la bibliografía (Lambrechts y Pretorius, 2000; Beltrán y col., 2005). Las adiciones dan como resultado una disminución en los niveles de este acetato, especialmente en el caso de la de amonio, en el que se encuentran diferencias estadísticamente significativas al comparar con los datos en MS300. Finalmente, los niveles del acetato de 2-feniletilo son mayores (alrededor de 2 veces más), pero sólo en el caso de la adición de aminoácidos. Los valores encontrados en los experimentos de la vinificación control están en la zona más baja, pero dentro del rango de los datos descritos en la bibliografía (0,01-4,5 mg/L, Lambrechts y Pretorius, 2000).

Es interesante mencionar que los resultados encontrados en la adición de amonio muestran la misma tendencia descrita por otros autores (Beltrán y col., 2005), aunque existen diferencias en los niveles de los cambios.

De acuerdo con todos estos datos, las adiciones de nitrógeno aumentan los niveles de todos los alcoholes estudiados y la influencia sobre los niveles de los acetatos depende de la naturaleza de la fuente adicionada y del compuesto considerado.

6. Discusión

En este capítulo se describe la respuesta de las células de la levadura al agotamiento y la adición de nitrógeno durante la vinificación. Se analiza el efecto que tiene la suplementación con diferentes fuentes de nitrógeno (amonio, aminoácidos y una mezcla de amonio y aminoácidos) durante las primeras etapas de la vinificación (inmediatamente después del agotamiento del nitrógeno) sobre el comportamiento fermentativo, la producción de compuestos organolépticos, la actividad arginasa y la respuesta molecular tanto a nivel particular de algunos genes relacionados con estrés o con el metabolismo del nitrógeno, como la respuesta diferencial a nivel global, demostrando que se da una reprogramación del metabolismo celular tras las primeras horas después de las adiciones.

Uno de los resultados más interesantes de este estudio es la identificación de marcadores potenciales de la limitación de nitrógeno. El primero de ellos es la actividad arginasa. Nuestros resultados confirman que esta actividad es muy útil para una detección temprana de la limitación de nitrógeno, no sólo en mostos que contienen amonio como fuente de nitrógeno (Carrasco y col., 2003), sino también en mostos sintéticos con amonio y aminoácidos. Estos resultados no coinciden con los encontrados por Beltrán y col. (2004), que observaron un aumento de la actividad arginasa tanto en la vinificación control como en la limitante, cuando se agotaba el amonio, pero no detectaron ningún otro pico de inducción cuando se consumía todo el nitrógeno asimilable. Las diferencias entre estos trabajos pueden estar relacionadas con las particularidades de crecimiento o con la cepa utilizada. Nuestras vinificaciones requieren mayores tiempos para completarse, y tal vez por esta razón sea más fácil diferenciar los tiempos de agotamiento de amonio y de nitrógeno total. En este sentido la determinación de la actividad arginasa podría ser muy útil en vinificaciones llevadas a cabo a bajas temperaturas, una tendencia que se está dando en la actualidad para mejorar el perfil organoléptico de los vinos. Es importante resaltar que la actividad arginasa también podría ser útil para detectar limitaciones de nitrógeno en mostos naturales.

Otros marcadores que se identifican o confirman a lo largo de este trabajo son genes cuya expresión cambia en función de la disponibilidad de nitrógeno. El primero de ellos es *ACA1*, cuya inducción en condiciones de limitación de nitrógeno ya había sido descrita por Gasch y col. (2000) para cepas y condiciones de laboratorio. De acuerdo con nuestros resultados, la expresión de este gen se correlaciona con la disponibilidad de nitrógeno asimilable: los niveles de mRNA se mantienen constantes, para aumentar cuando el nitrógeno es limitante, pero decrecen rápidamente poco después de la adición. Además de esto, el efecto de la fase estacionaria en la inducción de este gen no es tan determinante como en el caso de otros, como por ejemplo *CAR1*,

HSP26 o *SPI1* (Carrasco y col., 2003; Zuzuarregui y del Olmo, 2004b). Por otro lado se ha confirmado en este trabajo que algunos genes que son marcadores de la limitación de nitrógeno en la cepa PYCC4072 en determinadas condiciones de crecimiento también lo son en la cepa ICV16 en las condiciones utilizadas en este trabajo (Mendes-Ferreira y col., 2007b). Estos resultados abren la oportunidad de aplicar estos marcadores a otras cepas vínicas, mostos o condiciones enológicas más cercanas a las que se dan en el contexto de la bodega.

En los últimos años se han publicado diferentes análisis globales de la expresión génica bajo condiciones de laboratorio o de vinificación con diferentes concentraciones de nitrógeno disponible (Backhus y col., 2001; Marks y col., 2003; Rossignol y col., 2003; Varela y col., 2005; Scheners y col., 2006; Mendes-Ferreira y col., 2007a). Los resultados que hemos encontrado en nuestro estudio sobre expresión génica son consistentes con los descritos en estos trabajos, como hemos comentado en el apartado de resultados. Esta correlación sugiere que los principales cambios detectados en el análisis de los niveles del mRNA responden a la adaptación de las cepas de levadura a las condiciones de vinificación y no a un rasgo particular de la cepa seleccionada en cada estudio. No obstante, las únicas publicaciones hasta la fecha sobre el efecto de las adiciones de nitrógeno en la expresión génica durante la producción del vino se limitan a la adición de arginina (Backhus y col., 2001) o fosfato de diamonio (Marks y col., 2003; Mendes-Ferreira y col., 2007a,b). En el primero de estos trabajos se recurre a una aproximación no convencional para abordar los problemas fermentativos y se detectan efectos particulares en la expresión de algunos genes, por ejemplo en el caso de *CAR1*, que se induce por agotamiento de nitrógeno, pero metaboliza arginina. En el segundo de los estudios citados, la adición de amonio se produce cuando aún queda en el medio 51 mg/L de nitrógeno, por lo que no encontramos realmente una situación de limitación de nitrógeno. En el tercer caso la estrategia es similar a la seguida en este estudio. Los datos

que introducimos en este trabajo dan, por tanto, una visión completa del efecto que tiene la adición de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la expresión de algunos genes implicados en el metabolismo de nitrógeno y la respuesta a estrés. A pesar de las diferentes aproximaciones metodológicas usadas, se han encontrado algunos resultados similares a los descritos en los tres trabajos citados. Además, cabría destacar que aunque las vinificaciones se lleven a cabo con diferentes cepas, el patrón de expresión génica analizado por macromatrices muestra similitudes interesantes después de la adición de amonio en el caso de los genes *ACA1*, *GDH1*, *TDH3* y *SPI1* (Mendes-Ferreira y col., 2007b).

Por otro lado, este trabajo introduce nuevos elementos acerca de los cambios moleculares que tienen lugar durante la vinificación. Algunos genes (especialmente *ERG10* y *GDH1*) presentan una disminución en los niveles de mRNA durante los primeros días de fermentación y los primeros días tras las adiciones de nitrógeno. Estos resultados están de acuerdo con la regulación de la expresión del gen *GDH1* por el sistema HAP, que controla la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos y en la función respiratoria (Forsburg y Guarente, 1989). Además, nuestros datos demuestran que la adición de amonio y aminoácidos introduce diferentes efectos sobre la expresión génica, como se puede observar en el caso de *ERG10*, *GAD1*, *TDH3* (donde los niveles de expresión son menores en el caso de la adición de amonio) y *GDH1* (con un marcado aumento de los niveles de mRNA después de la adición de dicho compuesto). Estos resultados sugieren que, aunque las células son capaces de continuar con la fermentación en cualquiera de los casos, existen cambios metabólicos particulares, dependientes de la fuente de nitrógeno utilizada, durante las primeras horas tras las adiciones. De hecho el análisis transcriptómico global llevado a cabo comparando la adición de amonio con la de aminoácidos nos indica que la primera conduce a una mayor expresión de genes relacionados con biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, mientras que la segunda resulta en una mayor transcripción de

genes que participan en ensamblaje de ribosomas, biosíntesis de proteínas y transporte de aminoácidos.

Los resultados obtenidos mediante los análisis globales también proporcionan nuevos datos sobre la relación entre las diferencias de disponibilidad de amonio y aminoácidos y los mecanismos NCR. En un estudio sobre el efecto del nitrógeno sobre el transcriptoma llevado a cabo por Godard y col. (2007) se añadieron por separado 21 fuentes alternativas de nitrógeno a células creciendo en condiciones de laboratorio. De acuerdo con este trabajo, la glutamina tenía un papel más relevante en los mecanismos NCR. Nuestro estudio aporta algunos datos en la misma dirección; así, diversos genes regulados por NCR aparecen más expresados en los experimentos donde se adiciona amonio que en aquellos en los que se recurre a aminoácidos (entre los que se encuentra la glutamina). Además nuestros datos muestran que algunos de los genes sujetos a regulación por NCR mediante activadores transcripcionales se encuentran entre aquellos más expresados después de la adición de amonio, y la situación es similar para los genes diana de los represores transcripcionales relacionados con los genes NCR. Finalmente, algunos de los factores transcripcionales que actúan como reguladores de la expresión de los genes NCR están más expresados tras la adición de amonio.

Otro resultado interesante del análisis transcriptómico mostrado en este trabajo es la identificación de numerosos genes de función desconocida con diferencias de expresión que dependen de la fuente de nitrógeno adicionada. De todos estos genes, sólo uno de ellos, el gen *YBR147W*, se requiere para el crecimiento óptimo cuando la cantidad de nitrógeno disponible en forma de amonio, aminoácidos concretos o una mezcla de algunos de ellos es de 240 mg/L (o incluso 1060 mg/L). El mutante en este gen crece con normalidad en medio YPD (que contiene bactopectona y extracto de levadura) por lo que podríamos considerar que necesita ciertos requerimientos de compuestos que se encuentran presentes en YPD, sean de nitrógeno o no. A partir de estos datos

es difícil saber en que proceso molecular podría estar involucrado este gen, aunque la localización de la proteína en la mitocondria (Reinders y col., 2006) podría sugerir una relación con las últimas etapas en la obtención de energía a partir de compuestos orgánicos. Se necesitarían experimentos adicionales para poder confirmar esta posibilidad.

Con respecto a la influencia del nitrógeno en las propiedades organolépticas del vino, los datos presentados muestran que las adiciones de nitrógeno (240 mg N/L) llevadas a cabo en etapas tempranas de la vinificación conducen a un aumento en los niveles de los alcoholes superiores considerados en este análisis (con respecto a su incorporación inicial en el mosto). Estos resultados han sido confirmados posteriormente para diversas cepas vínicas (Barbosa y col., 2009) y están de acuerdo con diferentes experimentos (Äyräpää, 1968; Beltrán y col., 2005) que sugieren que tanto las rutas catabólicas como anabólicas relacionadas con la síntesis de alcoholes superiores en levadura pueden disminuir en vinificaciones limitantes tras adiciones de nitrógeno. Además, el incremento en los niveles de estos compuestos, especialmente del 2-feniletanol, es más importante en el caso de la adición de aminoácidos. Este resultado se correlaciona con el incremento en la formación total de los alcoholes superiores correspondientes a la valina, la leucina o isoleucina cuando se adicionan estos aminoácidos (Pierce, 1987) o cuando se incrementan las actividades de las transaminasas de aminoácidos ramificados (Lilly y col., 2006). Se debe mencionar que se realizaron experimentos complementarios con adiciones de aminoácidos ramificados; sin embargo, no se analizó el perfil organoléptico en el producto final porque el nitrógeno se consumía rápidamente y la fermentación no se completaba.

Los datos transcriptómicos globales proporcionan una respuesta para este efecto de la adición de aminoácidos en los niveles de 2-feniletanol a nivel molecular. La producción del 2-feniletanol requiere la descarboxilación del fenolpiruvato a fenilacetaldehído. La expresión del gen *ARO10* (que codifica la

piruvato descarboxilasa más relevante a nivel fisiológico en las cepas silvestres para llevar a cabo esta reacción (Vuralhan y col., 2003)) se incrementa unas 14 veces tras la adición de aminoácidos cuando la comparamos con la de amonio.

La adición de aminoácidos, con respecto a la de amonio, da como resultado una disminución de los niveles de acetato de etilo y un aumento de las concentraciones de acetato de 2-feniletilo. La disminución detectada en el primer caso es coincidente con lo descrito por otros autores (Beltrán y col., 2005).

Según estos resultados, una adición moderada de aminoácidos en fases tempranas de la vinificación puede ser beneficiosa para las propiedades organolépticas del vino; es importante, sin embargo, controlar el aumento de los alcoholes superiores, porque concentraciones que excedan de los 400 mg/L pueden tener un efecto perjudicial en la calidad del vino (Rapp y Versini, 1999). La adición en este punto es mejor que al principio del proceso porque resulta en una disminución en los niveles de acetato de etilo y un aumento de éste no es deseable ya que podría dominar la totalidad del perfil aromático y menguar la complejidad del aroma (Boulton y col., 1996).

Se ha descrito que la naturaleza de la cepa de levadura inoculada en el mosto influye en la formación de alcoholes superiores y ésteres (Fleet y Heard, 1993; Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers y col., 2007). En el caso de la levadura ICV16, de acuerdo con los niveles de alcoholes superiores (especialmente del alcohol isoamílico) encontrados en este trabajo, la concentración de los ésteres correspondientes son menores a lo esperado (no hemos podido cuantificar de una manera precisa los niveles del acetato de isobutilo debido a sus bajas cantidades). Esto se puede explicar si los niveles de los acetatos son más dependientes de los niveles de acetil-CoA que de los de los alcoholes precursores (Beltrán y col., 2005). Existe una explicación alternativa; así, otros autores, consideran que el balance entre las actividades de las alcohol acetiltransferasas y las esterasas determina los niveles de

los acetatos formados por las levaduras vínicas (Fukuda y col., 1998; Lambrechts y Pretorius, 2000; Verstrepen y col., 2003).

De acuerdo con todos nuestros datos, la composición de nitrógeno del mosto puede ser más importante para el perfil aromático del vino de lo que hasta ahora se creía, como han sugerido también otros autores (Hernández-Orte y col., 2002, 2005). También resultados recientes, en donde se ha analizado la producción de compuestos que configuran el aroma del vino en varias cepas vínicas con diferentes disponibilidades de nitrógeno, sugieren que la concentración de las fuentes nitrogenadas podría ser más relevante incluso que la cepa vínica seleccionada en la determinación de los niveles de muchos de dichos compuestos (Mendes-Ferreira y col., 2009). Podría, por tanto, modularse la producción de las moléculas que determinan el aroma del vino seleccionando el nivel y naturaleza del compuesto nitrogenado analizado, así como, la temperatura o la cepa vínica responsable de la vinificación (Molina y col., 2007; Saerens y col., 2008).

Capítulo 2

CAPÍTULO 2

Estudio de la respuesta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* frente al estrés causado por elevadas concentraciones de azúcar

Una de las condiciones que pueden afectar a las células durante su crecimiento es el estrés osmótico. En determinados ambientes (por ejemplo, durante la producción de bebidas alcohólicas) las levaduras tienen que adaptarse a un tipo particular de estrés osmótico, el causado por las altas concentraciones de azúcares presentes en el mosto. Los cambios moleculares y las rutas relacionadas con la respuesta al estrés causado por sal o sorbitol se conocen ampliamente (Gasch y col., 2000; Posas y col., 2000; Rep y col., 2000; Causton y col., 2001; Yale y Bohnert, 2001; Hirasawa y col., 2006), pero la información es menor sobre cómo las células de levadura responden a elevadas concentraciones de azúcares.

En este capítulo se presenta un estudio de la respuesta a esta forma de estrés considerando la cepa de laboratorio W303-1a. Aunque en otros trabajos se ha analizado los cambios que ocurren al nivel transcriptómico cuando se someten células de levadura a este tipo de situaciones (Kaeberlein y col., 2002; Erasmus y col., 2003), en nuestros experimentos intentamos acercarnos más al estado de las levaduras en el momento de la inoculación en el mosto, por lo que se utilizan células afectadas ya por condiciones de estrés. Se debe recordar en este sentido que las levaduras inoculadas en el mosto han sido sometidas a diversas situaciones adversas para su crecimiento, según se ha descrito en la introducción de esta Tesis.

1. Descripción general de la respuesta transcriptómica global a elevadas concentraciones de glucosa

El protocolo de crecimiento que se siguió para intentar entender la respuesta molecular de la levadura frente a elevadas concentraciones de glucosa fue crecer células de la cepa W303-1a en medio YPD durante 14-16 horas y tras este tiempo inocular $5 \cdot 10^6$ células/mL tanto en YPD como en YP20. Las células se recogieron tras una hora en estos medios y se extrajo el RNA como se ha descrito en el apartado 2.3.5 de Materiales y Métodos. La hibridación de las micromatrices se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente con el paquete informático *ARRAY STAT* para seleccionar solamente aquellos genes con diferencias de expresión entre las dos condiciones ensayadas en al menos dos de las cuatro réplicas realizadas.

Los análisis llevados a cabo revelaron que el número de genes que mostraban una expresión diferencial estadísticamente significativa era de 311 si se consideraban variaciones de niveles superiores a 2. De todos estos genes, en el caso de 56 la expresión era mayor en medio YP20 (20% de glucosa) que en medio YPD (2% de glucosa), mientras que 255 mostraban el comportamiento contrario.

1.1. Genes más expresados en 20% de glucosa

Al igual que en el capítulo anterior, utilizamos la herramienta *FUNC ASSOCIATE* para determinar categorías estadísticamente significativas en las cuales se puedan agrupar los genes diferencialmente expresados. Estas categorías se describen en la Tabla C2.1.

Capítulo 2

Tabla C2.1. Agrupación en categorías funcionales mediante *FUNC ASSOCIATE* de los genes expresados más de 2 veces tras 1 hora en 20% de glucosa (YP20) que después del mismo tiempo en 2% de glucosa (YPD).

N	X	P	Categoría
4	15	$7,1 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo del glicerol
4	26	$7,2 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de polioles
14	407	$8,3 \cdot 10^{-6}$	Respuesta a estímulos químicos

N representa el número de genes de cada categoría que aparecen en nuestro experimento, **X** el número total de genes de dicha categoría y **P** el *p*-valor.

La aplicación de la herramienta *GO Term Finder* (Tabla C2.2) a estos genes permitió encontrar también sobrerrepresentadas las categorías de metabolismo de glicerol y respuesta a estímulos químicos.

Tabla C2.2. Distribución en las diferentes categorías funcionales según el *GO Term Finder* de los genes más expresados tras 1 hora en medio YP20 que tras el mismo tiempo en medio YPD, considerando diferencias superiores a 2 entre ambas condiciones.

Categoría	Genes con mayor expresión tras 1 hora en 20% glucosa
METABOLISMO DE CLICEROL	<i>GPD1, DAK1, HOR2, RHR2</i>
RESPUESTA A ESTÍMULOS QUÍMICOS	<i>HSP12, ATR1, YDL023C, PRM1, MIG2, NCA3, SPI1, YPR1, RHR2, AGA1, MSN2, YHK8</i>

En el anexo 2, que se puede encontrar en el CD adjunto, aparece una archivo con los datos de expresión relativa YPD/YP20.

Es interesante destacar que aparecen otros genes con diferencias de expresión elevadas entre las dos condiciones que no están dentro de las categorías señaladas, como por ejemplo, varios transportadores de hexosas (*HXT1* y *HXT5*, con un cambio de expresión de 8,3 y 3,8, respectivamente) y 15 genes de función

Resultados

desconocida (YGR052W, YJL107C, YHR087W, YMR244W, YNL193W, YGR035C, YGR243W, YCLO47C, YHR033W, YDR222W, YLR042C, YML131W, YHR048W, YOR062C e YLR108C).

1.2. Genes más expresados en 2% de glucosa

Cuando se consideran genes más expresados en medio YPD en comparación con YP20 y con valores diferenciales mayores a 2 veces mediante la herramienta *FUNC ASSOCIATE* se encuentran las categorías mostradas en la Tabla C2.3.

Tabla C2.3. Agrupación en categorías funcionales mediante *FUNC ASSOCIATE* de los genes expresados más de 2 veces en YPD en comparación con YP20.

N	X	P	Categoría
42	327	$7,5 \cdot 10^{-12}$	Generación de metabolitos precursores y energía
34	220	$5,3 \cdot 10^{-12}$	Respuesta a estímulos de temperatura
26	128	$3,5 \cdot 10^{-12}$	Biosíntesis de aminoácidos
39	298	$2,6 \cdot 10^{-11}$	Metabolismo de compuestos nitrogenados
18	63	$2,0 \cdot 10^{-11}$	Metabolismo de los aminoácidos de la familia de la glutamina
10	29	$9,2 \cdot 10^{-8}$	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
35	308	$1,4 \cdot 10^{-8}$	Respuesta a estímulos abióticos
5	6	$5,8 \cdot 10^{-7}$	Complejo ATP-sintasa transportador de protones
33	322	$4,5 \cdot 10^{-7}$	Metabolismo de carbohidratos
14	66	$2,3 \cdot 10^{-7}$	Cadena de transporte electrónico
29	252	$2,1 \cdot 10^{-7}$	Oxidación de compuestos orgánicos
7	13	$2,1 \cdot 10^{-7}$	Biosíntesis de glutamato
19	146	$4,9 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo coenzimas
6	12	$2,9 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo del etanol
9	32	$2,9 \cdot 10^{-6}$	Glicolisis
24	204	$1,7 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos
7	16	$1,3 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de la arginina

Capítulo 2

Tabla C2.3. Continuación

N	X	P	Categoría
9	29	$1,2 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo del piruvato
12	74	$3,2 \cdot 10^{-5}$	Respiración aeróbica
11	61	$2,4 \cdot 10^{-5}$	Unión de vitaminas
7	23	$2,2 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de los aminoácidos ramificados

N representa el número de genes de cada categoría que aparecen en nuestro experimento, **X** el número total de genes de dicha categoría y **P** el *p*-valor.

La Tabla C2.4 incluye una descripción más detallada de las categorías funcionales y de los genes con niveles de expresión superiores a 2 en medio YPD frente al medio YP20 proporcionada por la herramienta *GO Term Finder* del SGD.

Tabla C2.4. Distribución en las diferentes categorías funcionales según el *GO Term Finder* de los genes más expresados tras 1 hora en medio YPD que tras el mismo tiempo en medio YP20, considerando diferencias superiores a 2 entre ambas condiciones.

	Categoría	Genes con mayor expresión tras 1 hora en 2% de glucosa
GENERACIÓN DE METABOLITOS PRECURSORES Y ENERGÍA	Fosforilación oxidativa	<i>ATP2, STF1, COX4, COX6, ATP3, COX5A, QCR2, SDH1, ATP1, SDH2, COX8, QCR10, ATP7, INH1, QCR8, ATP14, ATP16, ATP5, NDI1, SDH4, ATP17, QCR6</i>
	Respiración aeróbica	<i>COX4, CIT1, COR1, SDH1, MDH1, SDH2, PET9, QCR10, ACO1, QCR8, POR1, LSC2, COQ5, SDH4, LSC1, IDH2, QCR6</i>
	Otras rutas	<i>YJR120W, PDC1, PDC5, YLR294C, NDE1, ADH5, NTH1</i>

Tabla C2.4. Continuación

Categoria		Genes con mayor expresión en 2% de glucosa		
METABOLISMO	Aminoácidos	Aminoácidos de la familia de la glutamina		<i>CIT1, ARG4, CAR2, GDH1, ARG5,6, PUT1, ACO1, GLT1, CIT2, CPA2, IDH2</i>
		Aminoácidos ramificados		<i>LEU4, LEU2, ILV2, BAT1, LEU1</i>
		Arginina		<i>ARG4, ARG5,6, PUT1</i>
		Otros aminoácidos		<i>HIS1, GDH1, ARO1, MET17, TRP4, ARO4, HIS4, MSF1, ASN1, MET16, GCN4</i>
	Coenzimas	Nucleótidos	<i>Nucleósidos trifosfato de purina</i>	<i>ATP2, STF1, ATP3, ATP1, ATP7, INH1, ATP14, ATP5, ATP16, ATP17</i>
			<i>Nucleósidos trifosfato de pirimidina</i>	<i>PYC2, ZWF1, NDE1, ADH5, PYC1</i>
		Otros coenzimas		<i>CIT1, SDH1, MDH1, SDH2, ACO1, LSC2, COQ5, SDH4, LSC1, IDH2, ECM4</i>
	Fósforo		<i>ATP2, STF1, COX4, COX6, ATP3, COX5A, SDH1, ATP1, SDH2, PHO5, COX8, QCR10, PHO3, ATP7, SLT2, PTP2, INH1, QCR8, PHO81, ATP14, RCK1, ATP16, ATP5, NDI1, CMK2, SDH4, ATP17, PHO11, QCR6</i>	
	Vitaminas hidrosolubles		<i>PYC2, PHO3, SNZ1, YAT2, ZWF1, NDE1, ADH5, RIB5, PYC1, BIO4</i>	
	Ácidos monocarboxílicos, monosacaridos, piruvato y/o etanol		<i>TDH1, PDC5, PYC2, FBP26, PDC1, CDC19, TDH2, CRC1, HXK1, ACO1, ALD4, ACC1, ENO1, CIT2, YAT2, TDH3, ZWF1, ENO2, NDE1, ADH5, PYC1, BIO4</i>	
TRANSPORTE DE IONES		<i>GIT1, ATP2, STF1, ATP3, PMP3, ATP1, PHO84, ATP7, PHO89, INH1, POR1, ATP14, CTR1, ATP16, ATP5, ATP17</i>		
RESPUESTA A ESTÍMULOS QUÍMICOS	Estrés oxidativo		<i>NCE103, ZWF1, ASK10, YCL033C, ACT1</i>	
	Otros estímulos		<i>AGA2, PST1, MFA1, YDL038C, ACO1, AFR1, MET17, SLT2, PTP2, MET16, GCN4, MIG1, YCR102C, RLM1, OYE3, ECM4</i>	

Capítulo 2

En el anexo 2, que se puede encontrar en el CD adjunto, aparece un archivo con los datos de expresión relativa YPD/YP20.

De acuerdo con la información dada en las tablas, muchos de estos genes están relacionados de alguna manera con el metabolismo y la generación de precursores energéticos. De hecho, una conclusión interesante que podemos extraer de este análisis es la detección de niveles inferiores de mRNA en 20% de glucosa en el caso de genes relacionados con respiración, fosforilación oxidativa, síntesis de ATP ligada al transporte electrónico y ciclo de Krebs, lo que sugiere un efecto represor adicional de estas concentraciones de glucosa con respecto a la del 2%, que no había sido descrito en los estudios transcriptómicos de Kaeberlein y col. (2002). Las otras categorías encontradas están relacionadas con el transporte y la respuesta a estímulos. Con respecto a esta última categoría, es importante señalar que en ella se incluirían genes como *HSP104*, *HSP26* y *HSP30* si el valor de expresión diferencial mínimo se hubiera establecido en 1.5 en lugar de en 2; se trata de genes que se inducen en otras condiciones de estrés osmótico (Gasch y col., 2000; Posas y col., 2000; Rep y col., 2000).

Cabe destacar que es difícil distribuir los genes identificados en categorías funcionales separadas por las conexiones entre los procesos en los cuales están involucrados; por esta razón, en algunos casos, se puede encontrar un mismo gen en distintas subcategorías en la Tabla C2.4. El efecto de la concentración de glucosa en la expresión génica en todas las rutas no es el mismo; aunque siempre se indica "metabolismo" para simplificar las tablas, la mayoría de los genes de las categorías de metabolismo de aminoácidos y nucleótidos que aparecen en las mismas están implicados en procesos biosintéticos. Sin embargo en la categoría de metabolismo de carbohidratos, la mayoría son genes relacionados con catabolismo.

1.3. Validación de los resultados obtenidos en los análisis de micromatrices

Para testar los resultados obtenidos se recurrió a RT-PCR semicuantitativa (apartado 2.4.3 de Materiales y Métodos). Con este propósito se seleccionaron genes que pertenecen a las categorías en las cuales los resultados obtenidos en nuestro análisis no son coincidentes con los descritos en otros estudios transcriptómicos de respuesta a estrés osmótico: a) generación de metabolitos precursores y energía y metabolismo de aminoácidos y b) respuesta a estrés. Del primer grupo se consideraron los genes *ARG4*, *ATP2*, *COX4*, *SDH2* y *QCR2*, relacionados con fosforilación oxidativa, ciclo de Krebs o metabolismo de aminoácidos. Para el segundo grupo se escogieron *GPD1*, *HSP104*, *HSP26*, *HSP30* y *AQY1*. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura C2.1.

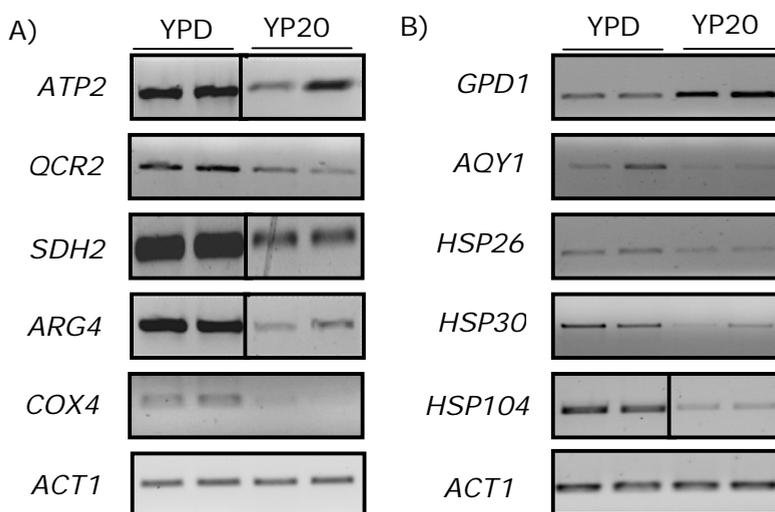


Figura C2.1. Análisis semicuantitativo de la expresión diferencial entre los medios YPD e YP20 de genes encontrados en el estudio de las micromatrices incluidos en las categorías de “Generación de metabolitos precursores y energía” (panel A) y “Respuesta a estrés” (panel B). El experimento se llevó a cabo mediante amplificación de cDNA obtenido 1 hora después de la inoculación de las células (a partir de cultivos en YPD durante 16 horas) en los diferentes medios con los oligonucleótidos específicos para cada gen (descritos en la Tabla M.2). Como referencia se muestran los resultados obtenidos para el gen *ACT1*. Las líneas verticales separan partes del mismo gel.

Capítulo 2

Se observa que todos los genes seleccionados están menos expresados en 20% de glucosa que en 2%, a excepción del gen *GPD1*, en el que se encuentra una mayor expresión en 20% de glucosa. Todos estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los experimentos de micromatrices, y sugieren, por tanto, un mayor efecto represor de 20% de glucosa que de 2% de glucosa. Además, indican que, al menos en la aproximación experimental seguida en este estudio, la expresión de los genes de respuesta a estrés no sigue un patrón similar al encontrado en otras condiciones adversas de crecimiento.

1.4. Influencia de la fase de crecimiento de las levaduras en la respuesta al estrés osmótico producido por elevadas concentraciones de azúcar

Entre los trabajos publicados sobre respuesta transcriptómica global frente a altas concentraciones de glucosa (Kaeberlein y col., 2002; Erasmus y col., 2003), el primero de ellos siguió una aproximación experimental más similar a la utilizada en nuestro laboratorio. En el estudio de estos autores los genes relacionados con el metabolismo del glicerol muestran también niveles de expresión mayores en 20% de glucosa, al igual que varios de los genes de función desconocida detectados en nuestro análisis. Sin embargo, como ya se ha comentado, no aparece sobrerrepresentada la categoría de generación de metabolitos precursores y energía. En la Tabla C2.5 se muestran, como ejemplo, los niveles de expresión de algunos genes analizados en ambos trabajos. En el caso de *COX4* y, particularmente, *ATP2*, se observan diferencias entre los resultados obtenidos.

Tabla C2.5. Niveles diferenciales de expresión entre YPD e YPD de algunos genes en el estudio llevado a cabo por Kaeberlein y col. (2002) y en este trabajo.

Gen	Kaeberlein y col. (2002)	Este trabajo
<i>ATP2</i>	1,36	0,69 ± 0,06
<i>QCR2</i>	0,71	0,68 ± 0,09
<i>SDH2</i>	0,56	0,62 ± 0,02
<i>ARG4</i>	0,39	0,26 ± 0,03
<i>COX4</i>	1,18	0,62 ± 0,11
<i>GPD1</i>	2,07	4,29 ± 0,99
<i>AQY1</i>	1,04	0,79 ± 0,16
<i>HSP26</i>	1,19	0,85 ± 0,14
<i>HSP30</i>	0,74	0,65 ± 0,21
<i>HSP104</i>	0,73	0,56 ± 0,12

En la aproximación experimental seguida por por Kaeberlein y col. (2002), cultivos crecidos durante 16 horas en YPD fueron diluidos en este mismo medio YPD a una OD₆₀₀ de 0,1 y se dejaron crecer hasta una OD₆₀₀ de 0,5; tras ello las células se inocularon tanto en medio YPD como en YP20 y se dejaron crecer durante 1 hora. Para tratar de determinar la influencia del protocolo de crecimiento de las levaduras en los resultados transcriptómicos, se aplicaron estas condiciones experimentales a la cepa W303-1a y se realizó el análisis semicuantitativo de la expresión de los genes que se habían escogido en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura C2.2 y son similares a los descritos en el apartado anterior, es decir, en todos los casos, excepto en el del gen *GPD1*, la expresión de los genes escogidos es menor en levaduras creciendo en medio con elevadas concentraciones de glucosa.

Capítulo 2

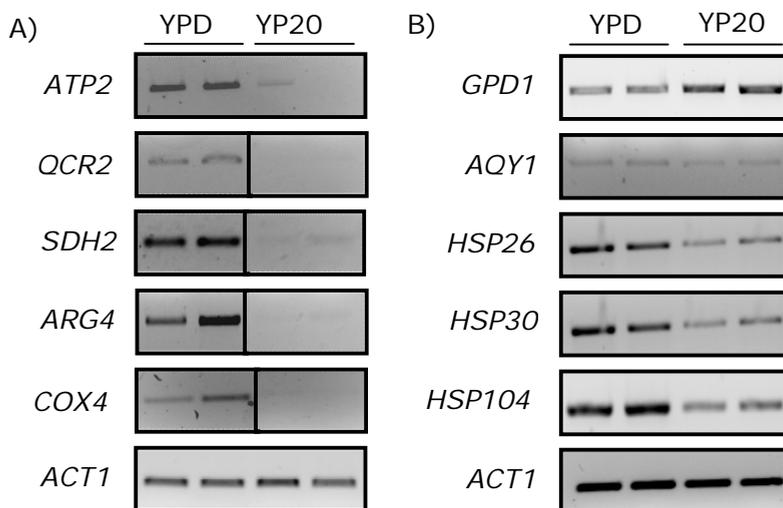


Figura C2.2. Análisis semicuantitativo de la expresión diferencial entre los medios YPD e YP20 de los genes encontrados en el estudio de las micromatrices incluidos en las categorías de “Generación de metabolitos precursores y energía” (panel A) y “Respuesta a estrés” (panel B). El experimento se llevó a cabo mediante amplificación de cDNA obtenido 1 hora después de la inoculación de las células (a partir de cultivos pre-diluidos en YPD durante 4 horas) en los diferentes medios con los oligonucleótidos específicos para cada gen (descritos en la Tabla M.2). Como referencia se muestran los resultados obtenidos en el caso del gen *ACT1*. Las líneas verticales separan partes del mismo gel.

La menor expresión de los genes de respuesta a estrés en alta glucosa podría ser debida al estrés al que ya estaban sometidas las levaduras (en nuestra aproximación experimental inicial) o a no haberse recuperado de dicha situación (en el protocolo de Kaeberlein y col., 2002) antes de la inoculación en 20% de glucosa. Para analizar esta posibilidad se consideró una tercera aproximación experimental, en la cual los cultivos se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial durante unas 16 horas y las células se inocularon en medios frescos, tanto YPD como YP20. De esta manera, las células no pasan por ninguna situación de estrés anterior al causado por las elevadas concentraciones de glucosa. En la Figura C2.3 se muestran los resultados obtenidos en este análisis, que no coinciden con los descritos hasta el momento. En este caso todos los genes ven aumentada su expresión tras 1 hora creciendo en medio YP20 con

respecto a medio YPD. Resulta llamativo que el incremento en la expresión ocurra no sólo en los genes de respuesta a estrés sino también en aquéllos implicados en respiración.

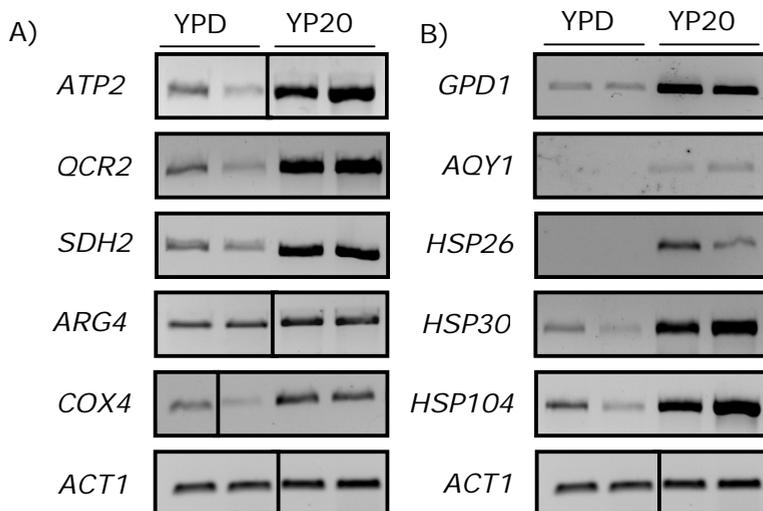


Figura C2.3. Análisis semicuantitativo de la expresión diferencial entre los medios YPD e YP20 de los genes encontrados en el estudio de las micromatrices incluidos en las categorías de “Generación de metabolitos precursores y energía” (panel A) y “Respuesta a estrés” (panel B). El experimento se llevó a cabo mediante amplificación de cDNA obtenido tras 1 hora después de la inoculación de las células (a partir de cultivos en YPD en fase exponencial durante 16 horas) en los diferentes medios con los oligonucleótidos específicos para cada gen (nombrados en la Tabla M.2). Se muestran como referencia los resultados obtenidos para el gen *ACT1*. Las líneas verticales separan partes del mismo gel.

1.5. Influencia de la naturaleza de los azúcares que determinan el estrés osmótico en la respuesta al mismo

Los mostos naturales que se utilizan en la fermentación del vino presentan una composición diferente a la estudiada hasta el momento, alrededor de 10% de glucosa y 10% de fructosa. Por este motivo se incluyó una condición de crecimiento adicional, en la cual las elevadas concentraciones de azúcares son debidas a una mezcla equimolar de glucosa y fructosa con una concentración final de 200 g/L (medio YPHS). Las células fueron crecidas en medio YPD siguiendo las mismas condiciones experimentales seguidas para el experimento de micromatrices (precultivo de 16

Capítulo 2

horas a partir del cual se inocularon en YPHS y en YPD, en donde se incubaron durante 1 hora adicional). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura C2.4.

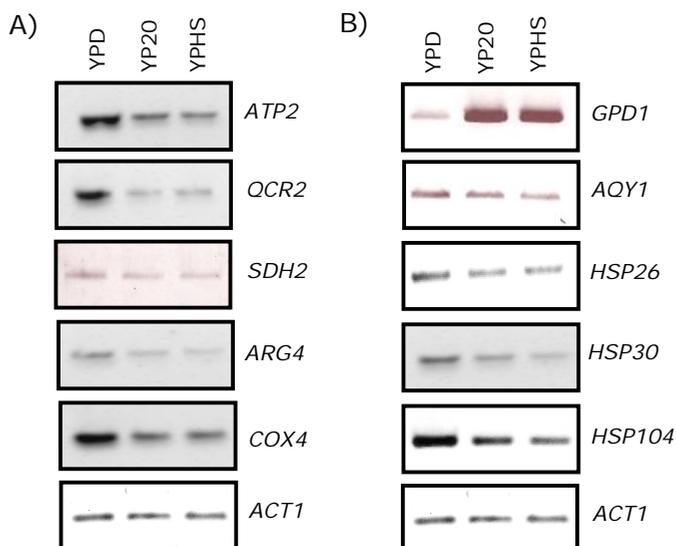


Figura C2.4. Análisis semicuantitativo de la expresión diferencial entre los medios YPD, YP20 e YPHS de los genes encontrados en el estudio de las micromatrices incluidos en las categorías de “Generación de metabolitos precursores y energía” (panel A) y “Respuesta a estrés” (panel B). El experimento se llevó a cabo mediante amplificación de cDNA obtenido 1 hora después de la inoculación de las células (a partir de cultivos en YPD durante 16 horas) en los diferentes medios con los oligonucleótidos específicos para cada gen (nombrados en la Tabla M.2). Se muestran como referencia los resultados obtenidos para el gen *ACT1*.

Los resultados encontrados en YPHS coinciden con los observados anteriormente en medio YP20, por lo que se puede concluir que la naturaleza de la fuente de azúcar que interviene en el estrés osmótico (glucosa o fructosa) no está relacionada con la respuesta a este tipo de estrés y que la mayor represión respecto a 2% de glucosa se consigue tanto con 10% como con 20% de glucosa.

2. Implicación de las rutas de transducción de señales relacionadas con la respuesta a estrés en condiciones de elevadas concentraciones de glucosa

De acuerdo con los datos de las micromatrices, el estrés osmótico que tiene lugar en condiciones de vinificación presenta características particulares cuando se compara con otras condiciones de estrés osmótico. Por esta razón, se considera en este trabajo la implicación de diversas rutas de transducción de señales relacionadas con la respuesta a otras formas de estrés: HOG, TOR, PKA, FGM y fosfatidilinositol. Las cepas que se utilizaron para estos experimentos están incluidas en la Tabla M.3 de Materiales y Métodos. Hay que mencionar que, debido al particular origen de cada uno de los mutantes, se utilizaron también las correspondientes cepas silvestres para poder comparar los resultados.

2.1. Estudio del crecimiento de los mutantes en YP20

En primer lugar, se hicieron diluciones seriadas a partir de cultivos de cada uno de los mutantes en las diferentes rutas de transducción de señales antes mencionadas (así como de sus correspondientes cepas silvestres) y se aplicaron en placas de YP conteniendo 2% de glucosa, sorbitol 1M, 20% de glucosa (la actividad de agua en estas dos últimas condiciones es similar: 0,981 y 0,981; Chen, 1989; Comesaña y col., 2001) y 25% de glucosa. Las placas se incubaron hasta la detección de crecimiento. La Figura C2.5 muestra los resultados obtenidos en las cepas silvestres y mutantes en *HOG1* y *SCH9*. Sólo se observaron defectos de crecimiento en el mutante *hog1Δ*. Para el resto de mutantes se obtuvieron resultados muy similares a los encontrados para la cepa KMY52 (datos no mostrados).

Capítulo 2

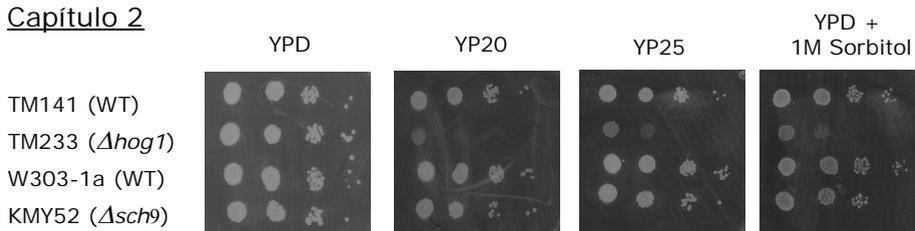


Figura C2.5. Implicación de la ruta HOG en la respuesta a estrés por elevadas concentraciones de glucosa. Diluciones seriadas a partir de cultivos crecidos en YPD durante 16 horas se aplicaron en placas de YPD, YP20, YP25 e YPD conteniendo sorbitol 1M. Las placas se incubaron hasta que el crecimiento fue detectado. La Figura muestra los resultados obtenidos en un experimento representativo. El mutante $\Delta sch9$ y su correspondiente cepa silvestre se incluyeron también como indicativo del comportamiento de los otros mutantes considerados en este análisis.

2.2. Análisis de la expresión de los genes *GPD1* y *HSP104* en condiciones de alta concentración de glucosa en mutantes en rutas de transducción de señales

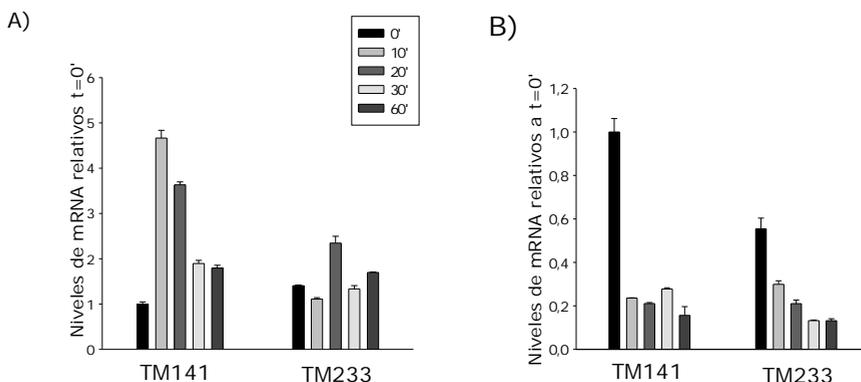
En algunos de los mutantes antes mencionados se analizó la expresión de dos genes cuyos niveles de mRNA se ven afectados en 20% de glucosa, siguiendo siempre las mismas condiciones experimentales en las que se llevaron a cabo las micromatrices. Con este fin, las muestras se obtuvieron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos después de transferir las células a un medio conteniendo 20% de glucosa. Los genes que se eligieron para este análisis fueron *GPD1* (debido a sus elevados niveles de expresión en cualquiera de las condiciones de estrés osmótico descritas) y *HSP104* (para intentar determinar las particularidades de su expresión en condiciones de altas concentraciones de glucosa con nuestro procedimiento experimental).

2.2.1. Ruta HOG

La ruta HOG está principalmente relacionada con la adaptación de las levaduras a situaciones de estrés hiperosmótico (revisado en Hohmann y Mager, 2003). En estas condiciones, la activación por fosforilación de Hog1p (MAPK) (Posas y col., 1998b, Hohmann y Mager, 2003) conduce a un aumento del contenido intracelular de glicerol debido al incremento de la expresión del

gen *GPD1* (Albertyn y col., 1994), y a la inactivación del transportador específico de glicerol Fps1p (Luyten y col., 1995). En la Figura C2.6 se observa la cinética de expresión de los genes estudiados en el mutante de la ruta HOG y en su correspondiente cepa silvestre en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo.

Figura C2.6. Expresión de *GPD1* (A) y *HSP104* (B) en condiciones de estrés por



elevadas concentraciones de glucosa en las cepas TM141 (WT) y TM233 ($\Delta hog1$). Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se inocularon en YP20 a una OD_{600} de 0,3. Las muestras se extrajeron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos para el análisis del RNA con sondas diseñadas para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y Métodos). Los valores han sido normalizados con el gen *ACT1* y referidos a los encontrados a tiempo 0 en la cepa silvestre. Se incluye la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

La expresión del gen *GPD1* en la cepa silvestre (TM141) se incrementa en 20% de glucosa, alcanzando un máximo de casi 5 veces a los 10 minutos. En la cepa mutante (TM233) la inducción es menor (2,5 veces) y más lenta (máximo a los 20 minutos). Esto indica una cierta implicación de esta ruta no sólo en respuesta al estrés osmótico causado por sal o sorbitol (Posas y col., 2000; Rep y col., 2000) sino también frente a elevadas concentraciones de glucosa.

Los cambios transcripcionales detectados en la expresión de *GPD1* en la cepa silvestre deberían estar relacionados con un incremento en la fosforilación de Hog1p, como ocurre en otras condiciones de estrés osmótico, como la provocada por KCl 0,7M

Capítulo 2

(Tomás-Cobos y col., 2004). Como se puede observar en la Figura C2.7, la fosforilación de Hog1p en las cepas silvestres TM141 y W303-1a es similar en medio SC conteniendo una concentración 0,7M de KCl que en SC con 20% de glucosa (SC20), mientras que en el medio SC es prácticamente inapreciable. Como control negativo se utilizó la cepa mutante en *HOG1*.

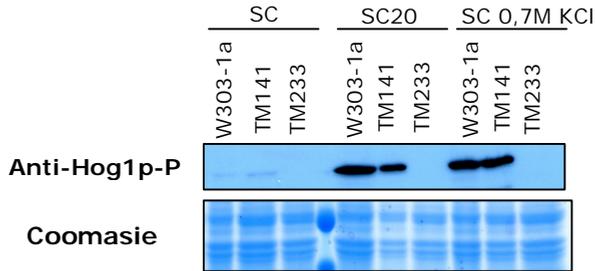


Figura C2.7. Análisis de la fosforilación de Hog1p en condiciones de estrés osmótico. Células creciendo en medio SC conteniendo 2% de rafinosa y 0,05% de glucosa en lugar de 2% de glucosa se transfirieron a medios SC (conteniendo 2% de glucosa), SC20 (conteniendo 20% de glucosa) y SC 0,7M KCl. Tras 10 minutos de incubación las células se recogieron y se prepararon extractos proteicos. Se muestra la detección de la forma fosforilada de Hog1p por inmunodetección usando anticuerpos anti fosfo p-38 MAPK. Como control de carga se incluye el gel de poliacrilamida teñido con Comassie. El experimento se llevó a cabo con las cepas silvestres W303-1a y TM141 y la cepa TM233 (*Δhog1*).

Con respecto a la expresión del gen *HSP104* en las cepas TM141 y TM233 (Figura C2.6), se observa una disminución con el tiempo de incubación en YP20. Los niveles basales en la cepa mutada son prácticamente la mitad de los de la cepa silvestre, pero a los 60 minutos de la inoculación se obtienen finalmente valores de expresión muy similares en ambas cepas.

2.2.2. Ruta TOR

La ruta de señalización TOR (*Target Of Rapamycine*) activa el programa de crecimiento celular en respuesta a nutrientes como el carbono o el nitrógeno (Barbet y col., 1996; Thomas y Hall, 1997; Noda y Ohsumi, 1998; Beck y Hall, 1999). En *S. cerevisiae* las quinasas homólogas Tor1 y Tor2 controlan la síntesis y

Resultados

degradación de proteínas citoplasmáticas a través de la proteína Tap42p, altamente conservada (Di Como y col., 1996; Schmidt y col., 1998; Dennis y col., 1999).

Para entender la implicación de la ruta TOR en la respuesta frente al estrés causado por elevadas concentraciones de glucosa se analizó en primer lugar la expresión de los genes *GPD1* y *HSP104* en cultivos de la cepa de laboratorio W303-1a tratados y no tratados con rapamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura C2.8.

En el caso del gen *GPD1* (panel A), la expresión de este gen se induce en ambas condiciones, alcanzando el máximo a los 30 minutos en ausencia de rapamicina y a los 20 en presencia de la misma. Los valores máximos de inducción de la cepa tratada son aproximadamente la mitad que en la cepa no tratada.

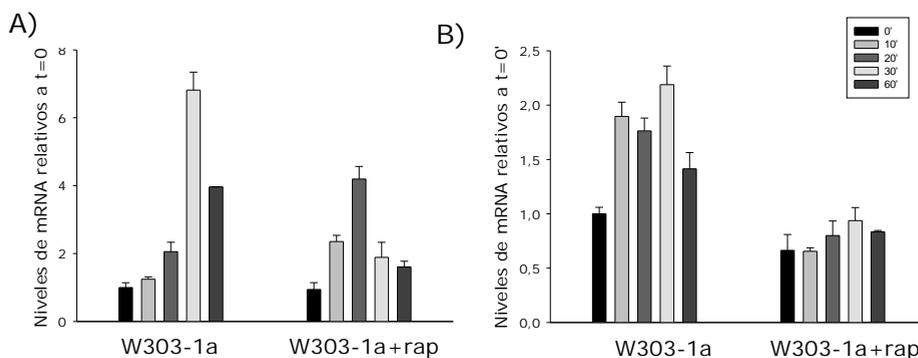


Figura C2.8. Expresión de *GPD1* (A) y *HSP104* (B) en condiciones de estrés por elevadas concentraciones de glucosa en la cepa W303-1a cuando ha sido tratada (W303-1a+rap) y no tratada (W303-1a) con rapamicina durante 2 horas. Células procedentes de cultivos mantenidos en fase exponencial durante 16 horas en YPD se inocularon en YPD o en YPD conteniendo rapamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a una OD_{600} 0,1 y se incubaron durante 2 horas. A continuación se transfirieron a YP20 quedando los cultivos a OD_{600} de 0,3. Las muestras se extrajeron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos para el análisis del RNA con sondas diseñadas para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y Métodos). Los valores han sido normalizados con el gen *ACT1* y se han referido a los encontrados a tiempo 0 en la cepa silvestre. Se incluye la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

En cuanto al gen *HSP104* (panel B), en ausencia de tratamiento con rapamicina, los niveles de expresión alcanzan

Capítulo 2

valores de inducción de aproximadamente 2 veces entre los 10 y los 30 minutos. Como se ha descrito en el apartado 1.5, este aumento es debido al crecimiento exponencial previo a la aplicación del estrés. La cepa tratada con rapamicina, presenta inicialmente niveles ligeramente inferiores que apenas varían durante los diferentes tiempos.

Ambos resultados están de acuerdo con datos obtenidos por Inoki y col. (2005) y Wullschleger y col. (2006), según los cuales cuando la ruta TOR está inactivada por la presencia de rapamicina, se observa una bajada en los niveles de transcripción.

También se estudió la cinética de expresión de los genes escogidos en dos series de cepas relacionadas con la ruta TOR. La primera de ellas incluye el mutante $\Delta tor1$ (MH349-3d) y la cepa silvestre JK9-3d y la segunda dos mutantes diferentes de *TOR2* y su cepa silvestre correspondiente (SH200), mutante en *TOR1*.

Con respecto al gen *GPD1*, en el mutante $\Delta tor1$ (panel A) de detectan niveles de expresión bajos tanto en condiciones basales como de alta glucosa, siendo la máxima inducción encontrada 2,5 veces menor que en la cepa silvestre. Por otro lado, la cepa SH229 muestra un patrón de expresión similar al de la cepa SH200, excepto por presentar su máximo nivel 1 hora después de haber aplicado el estrés. Sin embargo, en la cepa SH221, la inducción de *GPD1* es mucho mayor y más rápida.

En el caso del gen *HSP104* (panel B), los datos obtenidos para las cepas silvestres difieren de los observados en las otras consideradas anteriormente (W303-1a y TM141), puesto que no hay efectos significativos en su expresión en condiciones de estrés por altas concentraciones de glucosa. En la cepa mutante $\Delta tor1$ (MH349-3d), los niveles de mRNA son menores que para la cepa silvestre correspondiente en cualquiera de los puntos considerados y la expresión se incrementa a lo largo del tiempo con una inducción máxima de 1,8 veces. Cuando consideramos los mutantes termosensibles en *TOR2* (cepas SH221 y SH229), la interpretación de los resultados es más complicada, ya que la expresión de este gen se incrementa debido a choque térmico. En

Resultados

el caso de SH229, la expresión de *HSP104* decrece con el tiempo durante los primeros 40 minutos. En SH221 es mayor incluso antes de aplicar el estrés osmótico y permanece sin cambios destacados, de forma similar a lo que le ocurre en la cepa de referencia SH200 utilizada en este experimento.

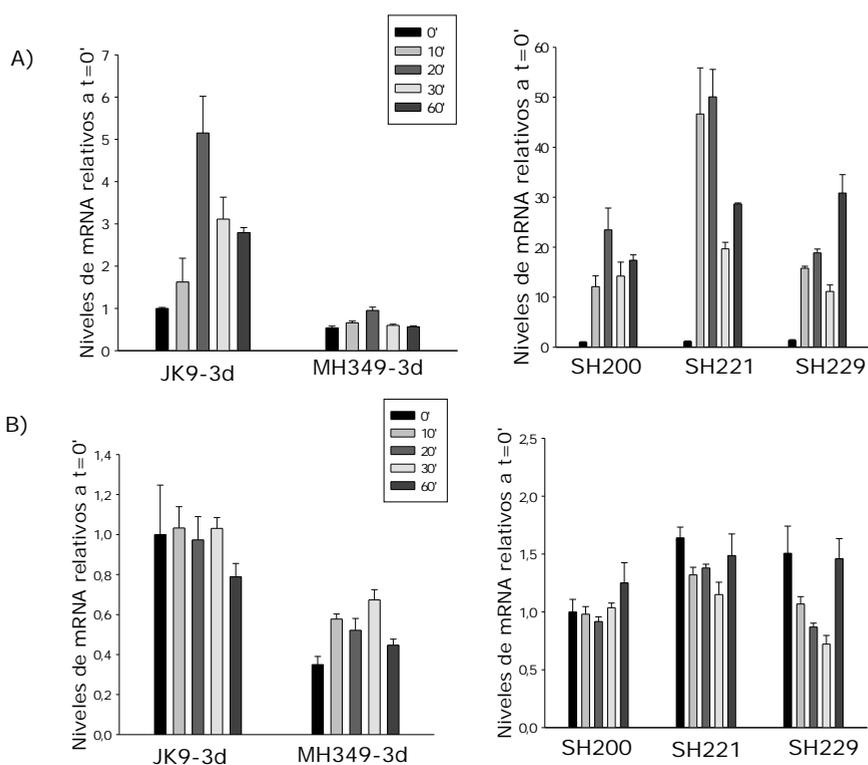


Figura C2.9. Expresión de *GPD1* (A) y *HSP104* (B) en condiciones de estrés por elevadas concentraciones de glucosa en las cepas JK9-3d, MH349-3d, SH200, SH221 y SH229. Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se inocularon en YPD a una OD_{600} de 0,3 y se incubaron durante 1 hora a 37°C. A continuación se transfirieron al medio YP20. Las muestras se extrajeron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos para el análisis del RNA con sondas diseñadas para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y Métodos). Los valores han sido normalizados con el gen *ACT1* y se han referido a los encontrados a tiempo 0 en la cepa silvestre. Se incluye la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

Capítulo 2

Estos resultados indican que la ruta TOR participa en cierta medida en la regulación de la expresión génica en estas condiciones de estrés.

2.2.3. Ruta PKA

Para la levadura *S. cerevisiae* la adición de azúcares fermentables desencadena la activación de la adenilato ciclasa y, con ello, la producción de un pico pronunciado de niveles de cAMP (Mbonyi y col., 1990). El cAMP activa la PKA, uniéndose a sus dos subunidades reguladoras, codificadas por el gen *BCY1*, permitiendo su disociación de las tres subunidades catalíticas, codificadas por los diferentes genes *TPK*, parcialmente redundantes (*TPK1*, *TPK2* y *TPK3*) (Toda y col., 1987a,b). PKA contrarresta la respuesta general a estrés comprometiendo la translocación nuclear de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p (Gorner y col., 1998; Garreau y col., 2000).

Hace algunos años se aislaron diversos mutantes de levadura (*tpk1^{wl}*, *tpk2^{wl}* y *tpk3^{wl}*) que mostraron una actividad reducida de la proteína-quinasa dependiente de cAMP; en estas cepas dos de los genes *TPK* están deletados mientras que el tercero está parcialmente inactivado (Nikawa y col., 1987). Análisis llevados a cabo con estos mutantes han permitido entender las contribuciones de cada uno de los genes *TPK* en procesos diversos (Mbonyi y col., 1990; Roberston y Fink, 1998; Robertson y col., 2000). Así, *TPK3* inhibe el crecimiento pseudohifal, mientras que *TPK1* se requiere para la desrepresión de los genes de biosíntesis de aminoácidos ramificados y tendría un papel secundario en el mantenimiento de los niveles de hierro y en la estabilidad del DNA mitocondrial. *TPK2* es esencial para el crecimiento pseudohifal y regula negativamente genes implicados en la captación de hierro y positivamente genes implicados en la degradación de trehalosa y homeóstasis del agua; parece tener un papel fundamental en el crecimiento respiratorio y el uso de diferentes fuentes de carbono. De acuerdo con estos datos

Resultados

optamos por llevar a cabo nuestros experimentos con la cepa que tiene parcialmente inactivado *TPK2* y deletionados *TPK1* y *TPK3*. La inducción del gen *GPD1* (panel A) en la cepa silvestres SP1 es transitoria, como en las cepas consideradas anteriormente. Cabe destacar, sin embargo, que los valores máximos de expresión son superiores (~200 veces) y se alcanzan más tarde (a los 40 minutos de aplicar la condición de estrés). En los mutantes con actividad de la PKA reducida (cepas S15-5b y RS13-7C-1), la cinética de expresión sigue un patrón similar al encontrado para la cepa silvestre SP1, pero los niveles de inducción son 1,5-1,6 veces mayores.

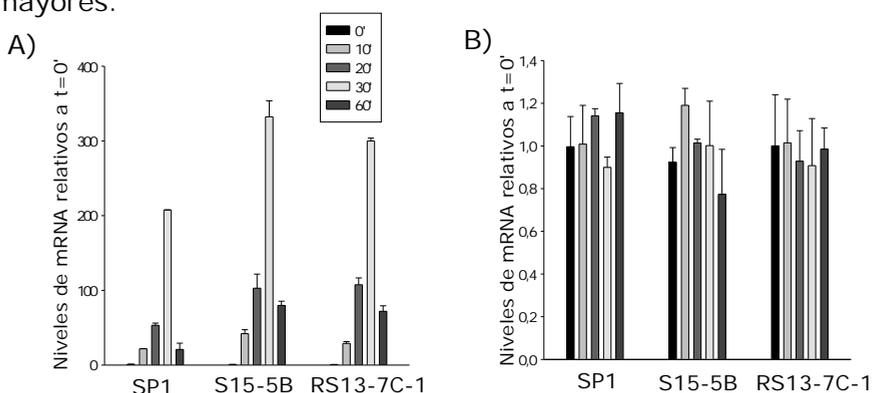


Figura C2.10. Expresión de *GPD1* (A) y *HSP104* (B) en condiciones de estrés por elevadas concentraciones de glucosa en las cepas SP1, S15-5B y RS13-7C-1. Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se inocularon en YP20 a una OD_{600} de 0,3. Las muestras se extrajeron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos para el análisis del RNA con sondas diseñadas para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y Métodos). Los valores han sido normalizados con el gen *ACT1* y se han referido a los encontrados a tiempo 0 en la cepa silvestre. Se incluye la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

En el caso del gen *HSP104* (panel B) los resultados de la cepa silvestre SP1 difieren de los encontrados en las cepas TM141 (Figura C2.6) y JK9-3d (Figura C2.9) ya que no se observan cambios destacados en los niveles de expresión de este gen en las condiciones experimentales testadas. En los mutantes de la PKA considerados tampoco se observa efecto alguno durante la incubación en YP20. Estos resultados podrían sugerir una

Capítulo 2

implicación parcial, dependiente del gen considerado, de la ruta PKA en la respuesta a elevadas concentraciones de glucosa.

2.2.4. Mecanismo FGM

El mecanismo FGM (*Fermentable Growth Medium*) integra la respuesta de las levaduras frente a la disponibilidad de diferentes nutrientes, incluyendo las fuentes de carbono fermentables. Sch9p se ha descrito en el mecanismo FGM como regulador en respuesta a carbono y nitrógeno, que actúa de manera independiente al cAMP, controlando características fenotípicas que están afectadas por PKA, como es la resistencia a estrés (Crauwels y col., 1997; Thevelein y De Winde, 1999). Sch9p parece operar de manera paralela con respecto a las quinasas TOR: podría controlar los cambios transcripcionales de los genes de respuesta a estrés principalmente vía Gis1p y Rim15p, mientras que TOR lo haría vía Mns2/4p y Rim15p (Roosen y col., 2005).

Los perfiles de expresión obtenidos para el mutante $\Delta sch9$ (cepa KMY52) y su cepa control en nuestras condiciones experimentales se muestran en la Figura C2.11.

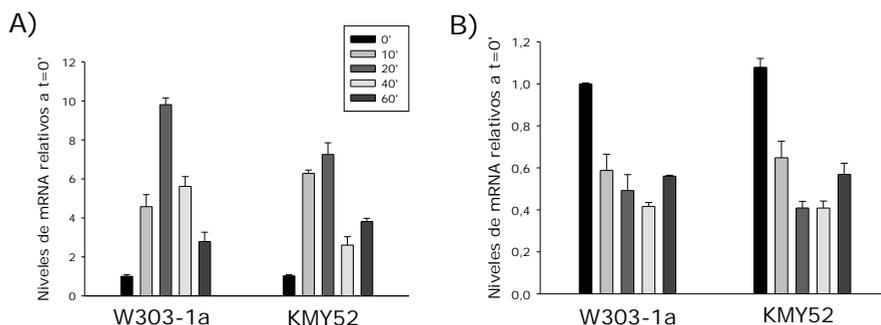


Figura C2.11. Expresión de *GPD1* (A) y *HSP104* (B) en condiciones de estrés por elevadas concentraciones de glucosa en las cepas W303-1a y KMY52. Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se inocularon en YP20 con una OD_{600} de 0,3. Las muestras se extrajeron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos para el análisis del RNA con sondas diseñadas para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y métodos). Los valores han sido normalizados con el gen *ACT1* y se han referido a los encontrados a tiempo 0 en la cepa silvestre. Se incluye la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

Como en los casos anteriores la expresión del gen *GPD1* (panel A) se ve incrementada en la cepa W303-1a transitoriamente, con un máximo de inducción en este caso de 10 veces tras 20 minutos en medio con 20% de glucosa. El mutante manifiesta sólo ciertos efectos en los niveles de expresión que dependen del tiempo que consideremos; así, los niveles de mRNA son inferiores a los que muestra la cepa silvestre excepto tras 10' y 1 hora después de transferirse las células a medio YP20.

En relación al gen *HSP104* (panel B) se observa que tanto W303-1a como KMY52 presentan una cinética de expresión muy similar, con niveles de mRNA que disminuyen a lo largo del tiempo.

2.2.5. Ruta de la quinasa de 3-fosfatidilinositol (PI(3)P)

Los polifosfoinositoides tienen diversos papeles en la señalización celular y en el tráfico de vesículas (De Camilli y col., 1996; Toker y col., 1997). En *S. cerevisiae* la concentración de fosfatidilinositol 3,5- bisfosfato (PI(3,5)P₂) aumenta rápidamente tras la aplicación de un estrés hiperosmótico debido a NaCl 0,9-1,1 M (Dove y col., 1997). Fab1p es una quinasa 5 específica de PI(3)P (Cooke y col., 1998; Gary y col., 1998) implicada, entre otras funciones, en la respuesta a cambios osmóticos en el ambiente, que se acumula en situaciones de estrés hiperosmótico (Bonangelino y col., 2002). En la Figura C2.12 se observan los resultados encontrados para el mutante $\Delta fab1$ (YL17080) y la cepa silvestre correspondiente (BY4742) en nuestras condiciones experimentales.

El patrón de expresión obtenido para el gen *GPD1* en las dos cepas (panel A) es el mismo, aunque los niveles de mRNA son superiores (de 1,5 a 2 veces) en la cepa mutante tras 20 y 40 minutos en medio YP20.

Capítulo 2

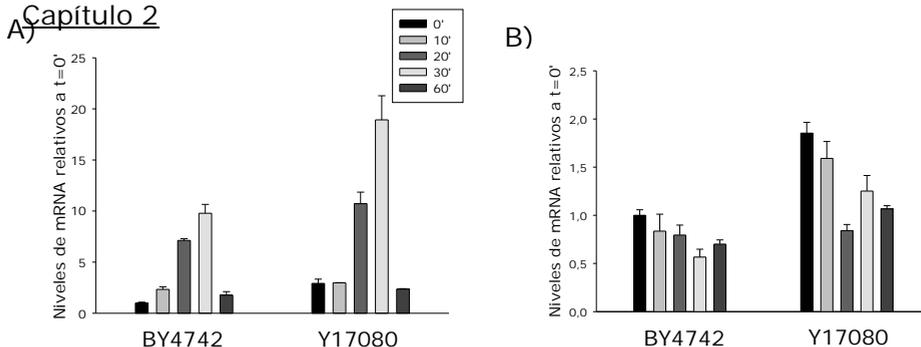


Figura C2.12. Expresión de *GPD1* (A) y *HSP104* (B) en condiciones de estrés por elevadas concentraciones de glucosa en las cepas BY4742 y Y17080. Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se inocularon en YP20 con una OD_{600} de 0,3. Las muestras se extrajeron a 0, 10, 20, 40 y 60 minutos para el análisis del RNA con sondas diseñadas para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y métodos). Los valores han sido normalizados con el gen *ACT1* y se han referido a los encontrados a tiempo 0 en la cepa silvestre. Se incluye la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

Con respecto al gen *HSP104* (panel B), en la cepa silvestre se observa de nuevo una disminución de los niveles de expresión a lo largo del tiempo. En la cepa mutante esto también ocurre, aunque de un modo menos definido; por otro lado, a tiempo 0 los niveles son superiores en 2 veces a los que se detectan en la cepa BY4742.

3. Estudio de algunos genes de función desconocida con mayor expresión tras 1 hora en 20% de glucosa que en 2% de glucosa

3.1. Validación de los datos obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real

Algunos de los genes de función desconocida que muestran una expresión diferencial superior a dos veces en nuestros análisis también se encuentran más expresados en los experimentos llevados a cabo por Kaerberlein y col. (2002). Algunos de ellos (*YGR052W*, *YJL107C*, *YHR087W*, *YNL193W*, *YHR033W*, *YDR222W* e *YLR042C*) fueron seleccionados para validar los resultados de las micromatrices mediante RT-PCR en tiempo real. También se incluyó el gen *YMR244W*, por presentar un valor de expresión diferencial superior a 3 veces en YP20, y no inducirse en presencia

Resultados

de concentraciones elevadas de otros osmolitos (Rep y col., 2000). Los resultados obtenidos (Tabla C2.6) fueron consistentes con los datos encontrados en las micromatrices llevadas a cabo con elevadas concentraciones de glucosa, aunque los valores numéricos no son exactamente coincidentes.

Tabla C2.6. Resultados de RT-PCR en tiempo real de algunos genes de función desconocida más expresados tras 1 hora en 20% de glucosa que en 2% de glucosa.

Gen	Valor RT-PCR en TR	Resultado micromatriz
<i>YGR052W</i>	3,28 ± 0,04	9,49 ± 2,83
<i>YJL107C</i>	2,43 ± 0,17	6,77 ± 0,31
<i>YHR087W</i>	12,66 ± 1,45	4,52 ± 1,75
<i>YMR244W</i>	1,82 ± 0,02	3,99 ± 0,31
<i>YNL193W</i>	2,87 ± 0,38	3,64 ± 0,51
<i>YHR033W</i>	6,16 ± 0,17	2,63 ± 0,16
<i>YDR222W</i>	4,29 ± 0,55	2,44 ± 0,65
<i>YLR042C</i>	7,90 ± 1,88	2,42 ± 0,38

Los experimentos se llevaron a cabo por amplificación de cDNA con los oligonucleótidos específicos para cada gen (nombrados en la Tabla 1.2). Se utilizaron tres muestras independientes y los resultados representan la media y la desviación estándar de estas réplicas. Los resultados se normalizaron con el gen *ACT1*. La tabla muestra las diferencias de expresión entre YP20 e YPD.

3.2. Importancia de estos genes en el crecimiento en elevadas concentraciones de glucosa

Para intentar entender la relevancia de los genes de función desconocida identificados en cuanto al comportamiento de las levaduras en medios con elevadas concentraciones de glucosa, se llevaron a cabo experimentos de crecimiento y viabilidad de cepas mutantes en los genes utilizados para los estudios de RT-PCR a tiempo real, así como en otros citados en el apartado 1.1 (*YGR243W*, *YOR062C* e *YLR108C*), para los que también se habían descrito cambios de expresión en los estudios de Kaeberlein y col. (2002). El comportamiento de estos mutantes se siguió en tres

Capítulo 2

medios con diferentes concentraciones de glucosa: 2, 20 y 25% (Figura C2.13 y datos no mostrados).

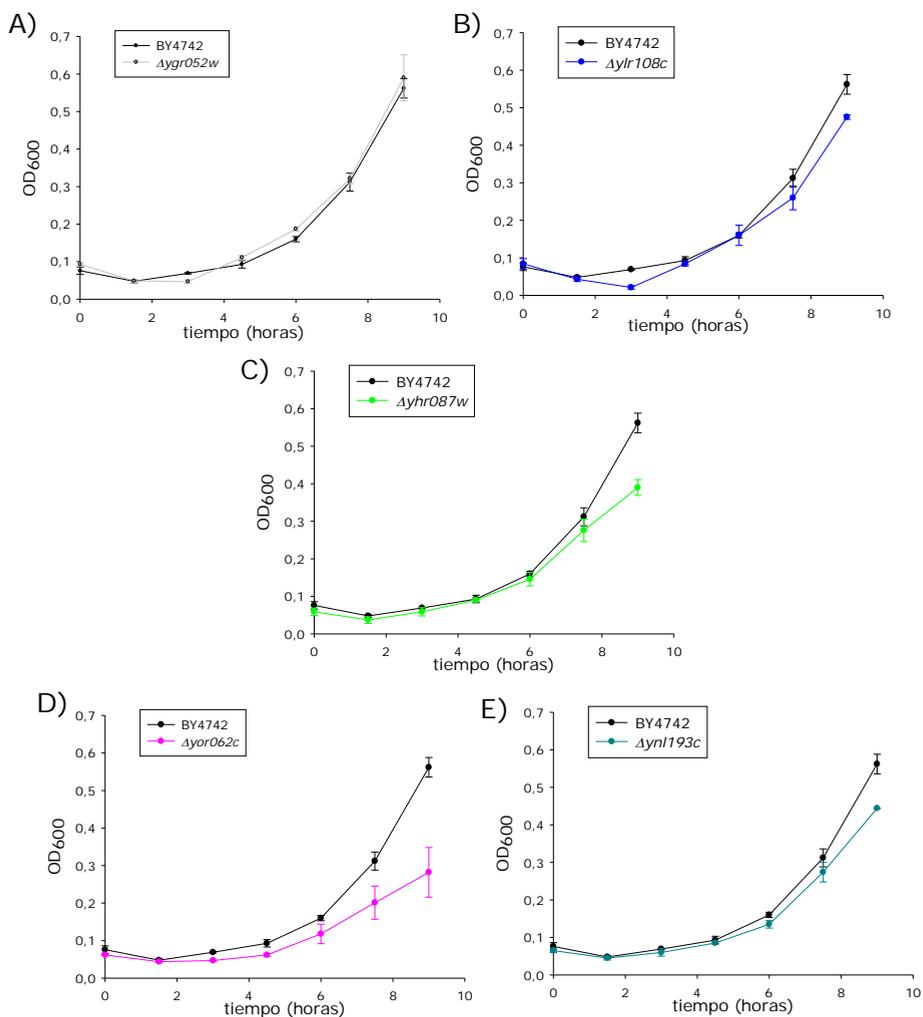


Figura C2.13. Crecimiento a tiempos cortos en medio YP25 de diversos mutantes en genes de función desconocida con elevada expresión en condiciones de estrés osmótico en comparación con la cepa silvestre (BY4742). Mutantes $\Delta ygr052w$ (panel A), $\Delta ylr108c$ (panel B), $\Delta yhr087w$ (panel C), $\Delta yor062c$ (panel D), $\Delta ynl193c$ (panel E). Cultivos de 16 horas en YPD se diluyeron en YP25 a una OD₆₀₀ de 0,1. El crecimiento se siguió por medidas de absorbancia a 600 nm durante las siguientes 9 horas. Los datos muestran la relación entre la OD₆₀₀ en cada uno de los tiempos y la correspondiente al momento de la dilución. Se indican la media y la desviación de tres muestras independientes.

En el caso del mutante $\Delta ygr243w$ se observaron defectos de crecimiento tras 9 horas de incubación en medio YPD (datos no mostrados). Este resultado indica que la función de este gen no está específicamente relacionada con la respuesta a condiciones de estrés. Los mutantes $\Delta ygr052w$, $\Delta yhr087w$, $\Delta ynl193w$, $\Delta yor062c$ y $\Delta ylr108c$ (Figura C2.13 y datos no mostrados) presentaron un cierto retraso en el crecimiento, aunque sólo en concentraciones de 25% de glucosa.

Con respecto a la viabilidad de estos cinco mutantes tras dos horas creciendo en medio con 20% de glucosa, ninguno de ellos presentó valores inferiores a los de la cepa silvestre (datos no mostrados); en condiciones de 25% de glucosa (Tabla C2.7) los mutantes de delección en los genes *YGR052W*, *YNL193W*, *YOR062C* e *YLR108C* presentaron alrededor de la mitad de células viables que la cepa silvestre.

Tabla C2.7. Viabilidad de varias cepas de levadura tras 2 horas en medio YP conteniendo 25% (p/v) de glucosa.

Cepa	Viabilidad relativa (%)
BY4742	41,56 \pm 3,50
$\Delta yhr087w$	45,33 \pm 4,51
$\Delta ynl193c$	19,14 \pm 0,99
$\Delta ygr052w$	17,01 \pm 0,23
$\Delta yor062c$	22,27 \pm 5,14
$\Delta ylr108c$	22,54 \pm 6,33

Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se transfirieron a YP25, quedando a una DO_{600} inicial de 0.3. Las medidas de viabilidad relativa se llevaron a cabo como se describe en el apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos.

Con la intención de recopilar más información sobre estos cinco mutantes que presentaron diferencias en crecimiento y/o en viabilidad en glucosa 25%, se determinó la viabilidad y el consumo de glucosa durante periodos más largos de tiempo en medio YP conteniendo 25% glucosa. $\Delta yhr087w$ fue la única cepa que presentó un menor consumo de glucosa a lo largo de los tiempos

Capítulo 2

seguidos (Figura C2.14 y otros datos no mostrados; la aplicación del test t indicó que las diferencias encontradas entre este mutante y la cepa silvestre fueron estadísticamente significativas para todos los tiempos considerados, excepto para 24 horas). En cuanto a la viabilidad, cuando se compara esta cepa con la silvestre, también se detectan diferencias (que son estadísticamente significativas) desde 48 horas tras la inoculación hasta el último punto considerado. El mutante $\Delta ygr052w$ también presentó una disminución en la viabilidad entre 48 y 72 horas.

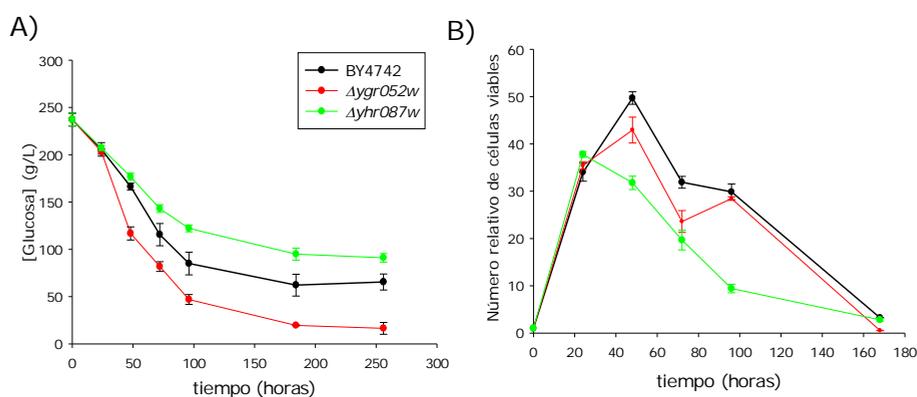


Figura C2.14. Crecimientos a tiempos largos en medio YP25 de la cepa silvestre y de algunos mutantes en genes de función desconocida con elevada expresión en condiciones de estrés osmótico causado por elevadas concentraciones de glucosa. Cultivos de 16 horas en YPD se diluyeron en YP25 a una OD_{600} de 0,3. El crecimiento se siguió por determinación de la glucosa en el medio (panel A) y por el número de células viables (panel B). Los datos en el panel B muestran la relación entre el número de células viables en cada uno de los tiempos y el correspondiente al momento de la dilución. Se indican la media y la desviación de tres muestras independientes.

3.3. Estudio de *YHR087W*

Tras los diferentes análisis realizados, el mutante que presentó un comportamiento más interesante fue el $\Delta yhr087w$, al manifestar defectos en crecimiento y en viabilidad en presencia de elevadas concentraciones de glucosa. Por este motivo nos planteamos un análisis más profundo sobre la función del gen correspondiente.

YHR087W (también llamado *RTC3* por Restriction of Telomer Capping) codifica una proteína de 111 aminoácidos (12 KDa) de función desconocida, que presenta similitudes estructurales con SBDS, proteína humana mutada en el Síndrome de Shwachman-Diamond (Savchenko y col., 2005).

Con respecto a la expresión de este gen, datos derivados del estudio llevado a cabo por Kaerberlein y col. (2002), a los que ya se ha hecho referencia en el apartado anterior, indican una expresión 4 veces superior en glucosa al 20% que en glucosa al 2%. Erasmus y col. (2003) obtuvieron resultados similares cuando compararon los niveles de mRNAs entre 40% y 22%. Pero no es únicamente en alta glucosa cuando se detecta una mayor expresión del gen. Gasch y col. (2000) describieron que *YHR087W* se induce por choque térmico, estrés oxidativo causado por H₂O₂ o diamida, estrés osmótico (sorbitol) y fase estacionaria, mientras que está reprimido en condiciones de estrés hipoosmótico. Por otro lado Causton y col. (2001) detectaron niveles incrementados del mRNA de este gen en condiciones de estrés osmótico provocado por sal o sorbitol, frente a estrés oxidativo y en pHs tanto ácidos como básicos.

3.3.1. Estudio de la respuesta del mutante *Δyhr087w* frente a otras condiciones de estrés

Se comparó la cepa *Δyhr087w* con respecto a la silvestre BY4742 en cuanto a la resistencia a otras dos condiciones de estrés particularmente relevantes en procesos biotecnológicos en los que intervienen las levaduras: oxidativo y por etanol. Para llevar a cabo estos experimentos se siguió el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla C2.8.

Capítulo 2

Tabla C2.8. Resultados obtenidos en experimentos de estrés llevados a cabo con la cepa mutante en el gen *YHR087W* y su correspondiente la cepa silvestre.

Cepa	Oxidativo ⁽¹⁾ (mm)	Etanol 10% (viabilidad relativa (%))
BY4742	36,9 ± 0,6	97,17 ± 3,09
$\Delta yhr087w$	34,8 ± 0,7	75,92 ± 0,96

1 Se indica el diámetro del halo de inhibición producido por el peróxido de hidrógeno.

Se observa que el mutante fue ligeramente más sensible a estrés oxidativo que la cepa silvestre. De igual modo presentó una menor viabilidad cuando se incubó 1h en medio conteniendo etanol al 10%.

3.3.2. Expresión de Yhr087wp en presencia de elevadas concentraciones de glucosa

Se procedió a la comparación de los niveles de proteína Yhr087wp entre el mutante de delección y la cepa silvestre, siguiendo las mismas condiciones experimentales en las que se identificó la sobreexpresión del gen codificante. Para ello se utilizó una cepa de levadura con una versión de la proteína etiquetada con HA en C-terminal (BOS2070). El resultado obtenido se muestra en la Figura C2.15.

Los resultados obtenidos indican niveles elevados de Yhr087wp en el cultivo previo, probablemente debido a las condiciones de fase estacionaria y limitación de nutrientes que, como se ha comentado anteriormente, afectan transcripcionalmente la expresión del gen *YHR087W* (Gasch y col., 2000). Al transferir las células a YPD, los niveles de proteína disminuyen rápidamente, mientras que en YP20 continúan elevados a lo largo de los tiempos considerados en estos experimentos. La detección de α -tubulina con anticuerpos

específicos indica que las diferencias encontradas entre YPD e YP20 no son debidas a variaciones en los niveles de proteína total.

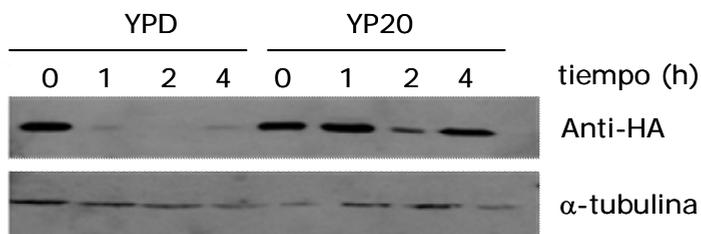


Figura C2.15. Análisis por Western-blot de los niveles de la proteína Yhr087p etiquetada con HA. Tras una incubación de 16 h en YPD, las células se transfirieron a YPD y a YP20 y se recogieron muestras a diferentes tiempos. Se muestra el revelado con anticuerpos anti-HA así como anti- α -tubulina, que se utilizó como control de carga de las muestras.

3.3.3. Localización de la proteína Yhr087wp en condiciones de estrés osmótico por elevadas concentraciones de glucosa

En un estudio global de la localización de proteínas de levadura mediante fusiones con GFP llevado a cabo por Huh y col. (2003) se describió que está proteína se localiza por toda la célula. Con la finalidad de corroborar estos datos y determinar si esta localización podía verse afectada en condiciones de estrés osmótico por alta glucosa, se utilizaron versiones genómicas etiquetadas con GFP o con HA y se procedió según se ha descrito en el apartado 2.11.9 de Materiales y Métodos. Los resultados que se muestran la Figura C2.16 mediante inmunodetección previa fijación de células y tratamiento con anticuerpos anti-HA indican que la proteína se distribuye por toda la célula independientemente de la concentración de glucosa en el medio.

Capítulo 2

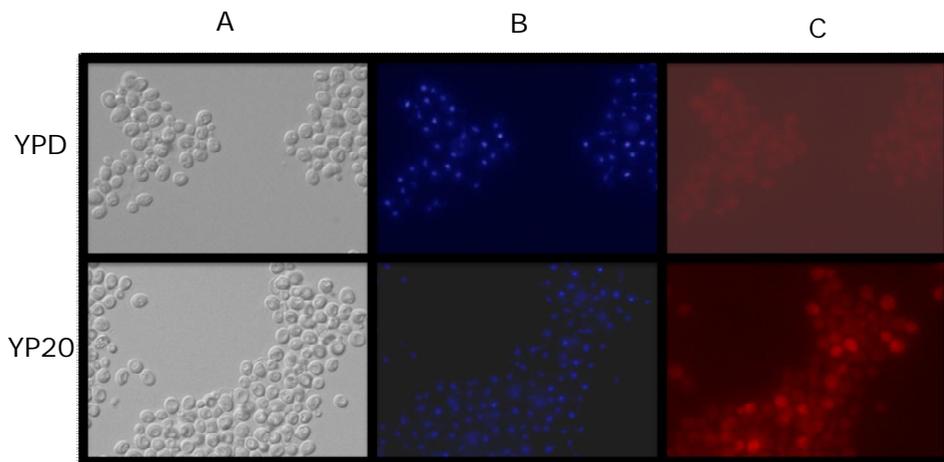


Figura C2. 16. Yhr087wp se distribuye por toda la célula independientemente de la concentración de glucosa. Análisis microscópico de la cepa de levadura que tiene etiquetada la proteína Yhr087wp con HA. Células procedentes de cultivos de 16 h en YPD se transfirieron a YPD o YP20 y se incubaron durante 4 h. Posteriormente se prepararon las muestras para microscopía según se ha descrito en el apartado 2.11.9 de Materiales y métodos. En el panel A podemos ver las células, en el B los núcleos marcados con DAPI y en el C la proteína etiquetada con el filtro correspondiente a Cy3.

3.3.4. Análisis proteómico comparativo entre $\Delta yhr087w$ y BY4742 en YP20

Con la finalidad de obtener más información sobre la función de Yhr087wp se llevó cabo un análisis proteómico mediante la tecnología 2D-DIGE en el servicio de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la supervisión de la Dra. Concha Gil.

La tecnología 2D-DIGE tiene varias ventajas sobre las técnicas 2DE ya existentes: mejora la reproducibilidad reduciendo la variabilidad gel a gel, reduce el número de geles necesarios para analizar la muestra, tiene un amplio rango (lo que permite la detección de proteínas poco abundantes al tiempo que evita la saturación de proteínas muy abundantes) y está diseñada para realizar directamente el análisis por espectrometría de masas. El uso de un estándar interno presente en todas las muestras permite, además, una mejor comparación entre los diferentes

geles (alto nivel de confianza) y un análisis estadístico más exacto entre todos los geles mediante la normalización de muestras individuales comparadas con este estándar interno (Tonge y col., 2001).

A la vista de los resultados obtenidos sobre la expresión de Yhr087wp en alta glucosa (apartado 3.3.2), se consideró que un tiempo adecuado para llevar a cabo el análisis proteómico comparativo era tras 1 hora después de la inoculación en medio YP20 a partir de un cultivo de 16 h en YPD. Además se correspondía con el mismo punto en el que se había realizado el estudio transcriptómico descrito al inicio de este capítulo.

De cada una de las cepas (silvestre y mutante) crecidas en las mismas condiciones utilizadas para los ensayos de micromatrices se obtuvieron 4 muestras de extractos proteicos según se indica en el apartado 2.11.1 de Materiales y Métodos. Para el experimento se realizaron 4 geles bidimensionales aplicando en cada uno de ellos 150 mg de proteína.

Tras la electroforesis bidimensional se procedió a escanear los geles a las longitudes de onda de los tres fluoróforos obteniendo las tres imágenes de cada uno de los geles que se muestran en la Figura C2.17.

Capítulo 2

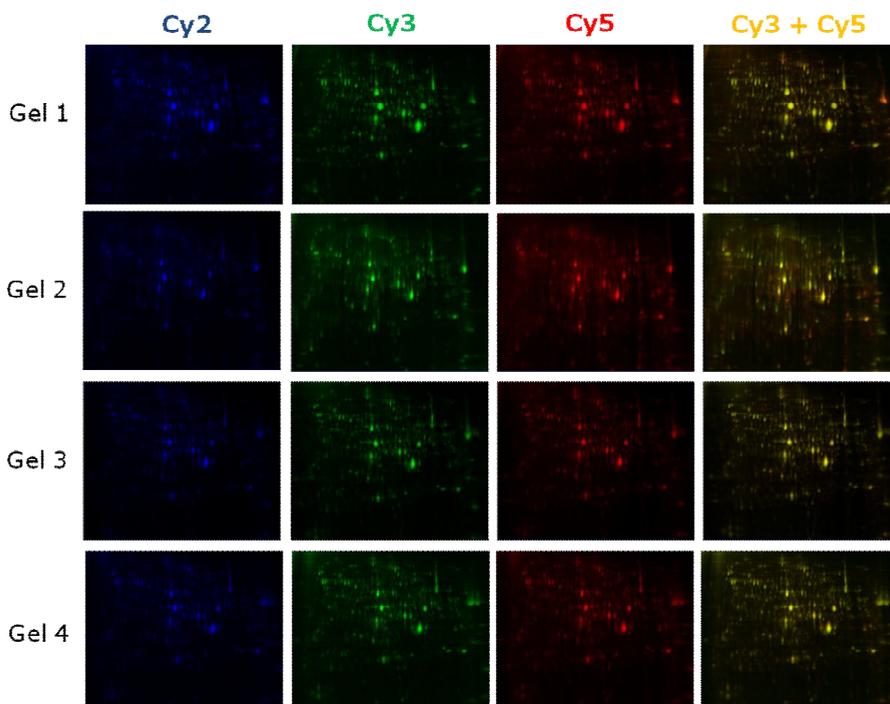


Figura C2.17. Imágenes de los geles bidimensionales llevados a cabo para el análisis proteómico comparativo entre las cepas BY4742 y $\Delta yhr087w$. Cada gel contiene un estándar interno marcado con Cy2 y muestras de ambas cepas, una marcada con Cy3 y la otra con Cy5, como se ha explicado en el apartado 2.11.4.1 de Materiales y Métodos.

Tras el análisis de las imágenes, los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se recortaron las manchas correspondientes a proteínas con expresión diferencial entre las dos cepas consideradas (Figura C2.18) para analizarlas por *MALDI-TOF* o *MALDI-TOF/TOF*. La huella peptídica de cada una de las manchas se comparó con la base de datos de *S. cerevisiae* SGD, utilizando la herramienta de búsqueda *MASCOT*.

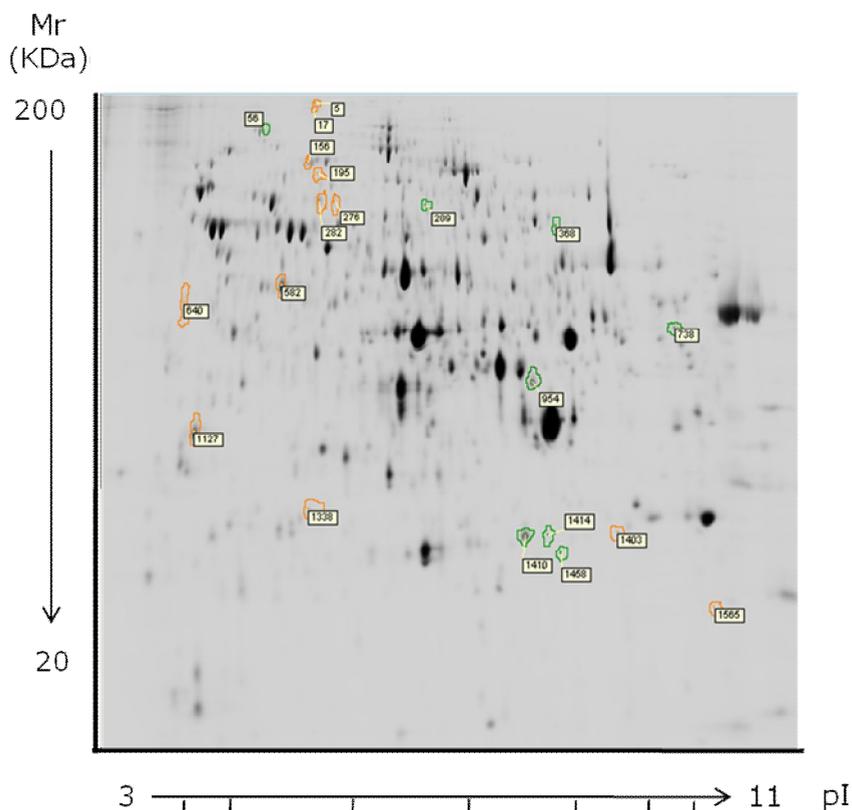


Figura C2.18. Gel DIGE bidimensional teñido con Coomassie. En naranja se señalan las proteínas con una expresión diferencial superior a 1,5 veces y en verde aquellas cuya variación de niveles entre la cepa mutante y la silvestre se sitúa entre 1,3 y 1,5.

Después del análisis de las imágenes se detectaron 20 manchas proteicas con valores de expresión diferencial superiores a 1,3, siendo en 12 de ellas el dato mayor que 1,5. 9 tenían aumentada su expresión en la cepa silvestre en comparación con la cepa mutante y 11 presentaban el comportamiento opuesto.

Se pudo identificar un total de 17 manchas, 11 mediante *MALDI/TOF* y 6 utilizando *MALDI/TOF-TOF*, que corresponden a 16 proteínas diferentes. Los resultados se presentan en la Tabla C2.9.

Tabla C2.9. Listado de proteínas identificadas por espectrometría de masas que varían su expresión entre la cepa silvestre y la mutante tras 1 hora en 20% de glucosa.

Mancha ^a	Apariencia ^b	ORF	Número de acceso	Nombre de la proteína	Ratio promedio ^c	p-valor ^c	PM (KDa)	pI	Score (obtenidos/pasados) ^d	Valor esperado	Número de péptidos coincidentes/ buscados	Cobertura de la proteína (%) ^e
5	6 (12)	<i>YPL231W</i>	P19097	Fas2p	-1,76	0,012	207	5,32	183/51	3,40E-15	37/80	25
17	9 (12)	<i>YPL231W</i>	P19097	Fas2p	-1,53	0,030	207	5,32	96/51	1,60E-06	10/11	6
56	12 (12)	<i>YGR061C</i>	P38972	Ade2p	-1,35	0,015	150	5,15	148/51	1,10E-11	24/65	26
156	9 (12)	<i>YIL026W</i>	P31539	Hsp104p	-1,51	0,011	102	5,31	256/69	1,00E-20	36/67 VIGATTNNEYR (39) ^f EAQVDIEAIKQQAELR(10) ^f IPQQQPAPAEITPSYALGK(23) ^f	42
276	9 (12)	<i>YPL160W</i>	P26637	Cdc60p	3,74	0,028	125	5,61	60/51	0,0063	11/66 LANEKPEDVFER(23) ^f	14
282	12 (12)	<i>YPR181C</i>	P15303	Sec23p	10,51	0,0002	86	5,39	64/51	0,0027	9/65 ADYNKDDPQSFR(23) ^f	14
289	12 (12)	<i>YDR258C</i>	P33416	Hsp78p	-1,38	0,0084	92	8,17	61/51	0,0051	14/65	20
368	12 (12)	<i>YDR101C</i>	Q03862	Arx1p	1,34	0,043	66	6,74	128/51	1,10E-09	17/65	34
582	12 (12)	<i>YGL253W</i>	P04807	Hxk2p	1,84	0,030	54	5,16	381/51	5,40E-35	37/65	74
640	9 (12)	<i>YFL037W</i>	P02557	Tub2p	-1,23	0,035	51	4,64	84/51	2,80E-05	14/65	26
738	12 (12)	<i>YDL066W</i>	P21954	Idp1p	-1,4	0,026	48	8,84	148/31	1,10E-11	19/65	51
954	12 (12)	<i>YJR139C</i>	P31116	Hom6p	1,33	0,035	38,5	6,86	228/51	1,10E-19	21/65	64
1127	12 (12)	<i>YLR340W</i>	P05317	Rpp0p	1,79	0,037	34	4,75	76/51	0,00017	11/65	33
1410	12 (12)	<i>YJR123W</i>	P26783	Rps5p	1,36	0,019	25	8,63	50/51	0,067	7/65	26
1414	9 (12)	<i>YNR017W</i>	P32897	Tim23p	1,46	0,0068	23,4	6,89	197/51	1,30E-16	9/65 LQLNTVLNHITKR(23) ^f GKHDTAGSIGAGALTGALFK(23) ^f	53
1458	12 (12)	<i>YPL078C</i>	P05626	Atp4p	-1,49	0,0073	27,1	9,28	212/51	4,30E-18	11/54 AVLDSWVR(23) ^f YLAPAYKDFADAR(23) ^f	49
1565	9 (12)	<i>YOL086C</i>	P00330	Adh1p	-2,02	0,006	37,3	6,26	314/51	2,70E-28	12/41 EALDFAR(23) ^f SISIVGSYVGNR(23) ^f VLGIDGGEGKEELFR(23) ^f	40

^a Número de mancha proteica en el gel *DIGE* teñido con Coomassie

^b Número de geles de los 12 realizados en los que la proteína aparece diferencialmente expresada

^c Ratio de aumento o disminución de expresión de la proteína (valores positivos indican mayor expresión en la cepa mutante que en la silvestre y valores negativos lo contrario)

^d Puntuación de la proteína en *MASCOT*, obtenida del espectro *MALDI-TOF*. En todos los casos la probabilidad fue <0.05.

^e Número de péptidos buscados/coincidentes.

^f Porcentaje de la secuencia proteica que cubren los péptidos coincidentes

^g Secuencia aminoacídica identificada por MS/MS

Resultados

En la figura C2.19. se pueden observar los perfiles de expresión de algunas de las proteínas con expresión diferencial entre las cepas consideradas.

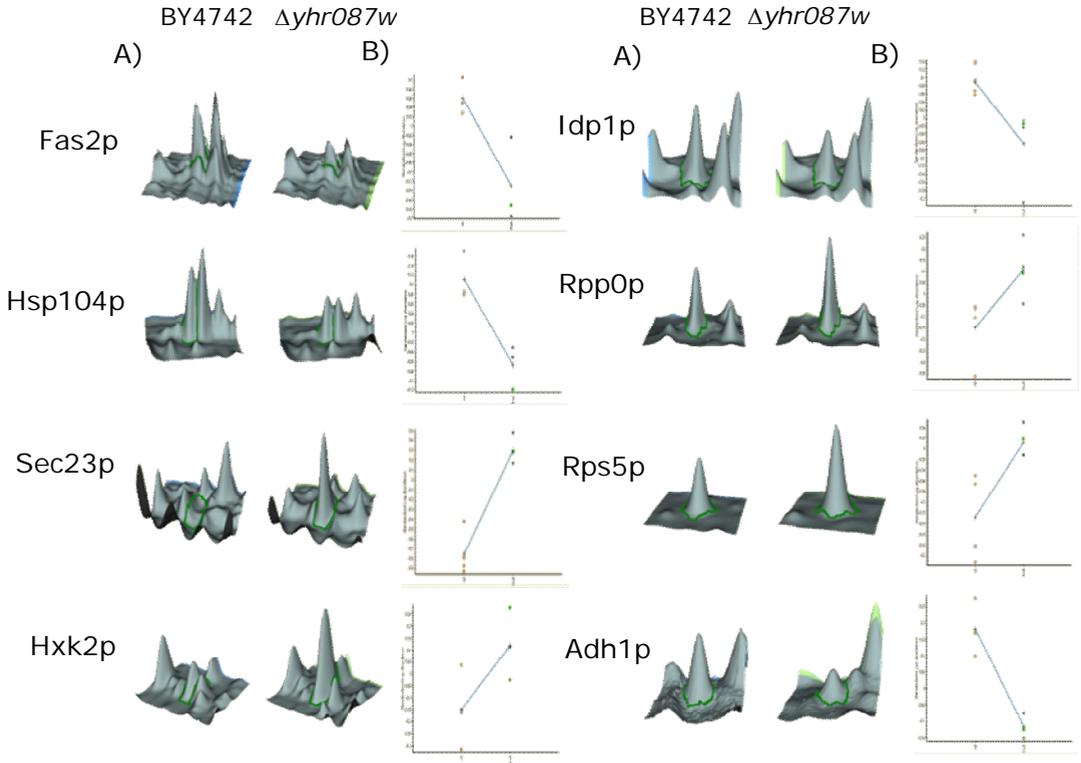


Figura C2.19. Análisis de la expresión diferencial de algunas de las proteínas identificadas. En el panel A se muestra la región del gel bidimensional donde se encuentra la proteína en imagen 3D, y en el panel B la gráfica que representa el comportamiento de la proteína correspondiente en cada uno de los gels empleados para el análisis.

Las proteínas que presentan mayor expresión en el mutante $\Delta yhr087w$ fueron Sec23p (proteína mediadora en el transporte entre RE y Golgi), Cdc60p (aminoacil-tRNA sintetasa de leucina), Hxk2p (hexoquinasa 2), Hom6p (homoserina deshidrogenasa) y las proteínas ribosomales Rpp0p y Rps5p. Por otro lado, las proteínas con niveles menores en el mutante $\Delta yhr087w$ fueron la subunidad α de la ácido graso sintetasa Fas2p, las proteínas de choque térmico Hsp104p y Hsp78p, la β -tubulina (Tub2p), la

alcohol deshidrogenasa Adh1p y las proteínas mitocondriales Atp4p e Idp1p.

La aplicación de la herramienta *GO Term Finder* del SGD a los resultados obtenidos a partir del análisis proteómico permitió detectar 2 categorías sobrerrepresentadas con un p -valor inferior a 0,01: proteínas desplegadas y respuesta celular a calor. Ambas categorías incluyen las proteínas de respuesta a estrés Hsp104p y Hsp78p. De acuerdo con estos resultados los niveles de estas proteínas estarían afectados por la expresión de *YHR087W*, lo cual establece una relación entre la expresión de este gen y la respuesta a estrés.

3.3.5. Estudio de la respuesta transcripcional del mutante $\Delta yhr087w$ en 20% de glucosa

Los datos resultantes del análisis proteómico comparativo entre las cepas BY4742 y $\Delta yhr087w$ plantean la duda de si las diferencias detectadas en los niveles de expresión de las proteínas serían debidas a cambios transcripcionales o no. Para analizar estas posibilidades se recurrió a estudios transcriptómicos globales entre ambas cepas en las mismas condiciones experimentales seguidas para los análisis proteómicos, es decir, ambas cepas se crecieron en medio YPD durante 16 horas y se transfirieron a medio fresco conteniendo 20% glucosa durante 1 hora.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren una mínima relevancia de Yhr087wp en el control transcripcional en *S. cerevisiae*. Sólo un pequeño número de genes ve afectada su expresión en estas condiciones entre la cepa silvestre y la mutante de forma estadísticamente significativa, habiendo 38 genes más expresados en el mutante que en la cepa silvestre y 8 de forma contraria. La aplicación de las herramientas *FUNC ASSOCIATE* o *GO Term Finder* a cada uno de los dos grupos de genes no permite detectar ninguna categoría funcional sobrerrepresentada. En el anexo 3, que se puede encontrar en el CD adjunto, se incluye un

Resultados

archivo con los datos de expresión relativa $\Delta yhr087w$ /BY4742 tras 1 hora en YP20.

En el caso de los genes que codifican las proteínas con expresión diferencial en el estudio proteómico (Tabla C2.11), no existen cambios significativos en sus niveles de mRNA.

Tabla C2.11. Relación entre los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas diferencialmente expresadas en $\Delta yhr087w$ y BY4742. Los datos proceden de experimentos de micromatrices realizadas con ambas cepas en YP20. Se muestran los valores medios y la desviación estándar.

Gen	Media \pm desv. estándar	Gen	Media \pm desv. estándar
<i>FAS2</i>	0,91 \pm 0,15	<i>TUB2</i>	0,91 \pm 0,16
<i>ADE2</i>	0,92 \pm 0,16	<i>IDP1</i>	1,06 \pm 0,16
<i>HSP104</i>	1,11 \pm 0,52	<i>HOM6</i>	1,03 \pm 0,31
<i>CDC60</i>	1,07 \pm 0,32	<i>RPP0</i>	0,79 \pm 0,20
<i>SEC23</i>	1,02 \pm 0,30	<i>RPS5</i>	1,18 \pm 0,28
<i>HSP78</i>	No detectado	<i>TIM23</i>	1,04 \pm 0,19
<i>ARX1</i>	1,13 \pm 0,37	<i>ATP4</i>	1,16 \pm 0,22
<i>HXK2</i>	1,03 \pm 0,05	<i>ADH1</i>	1,14 \pm 0,21

Los niveles de expresión de algunos de estos genes también se analizaron por RT-PCR semicuantitativa para corroborar los datos obtenidos en las micromatrices. Los resultados se presentan en la Figura C2.20.

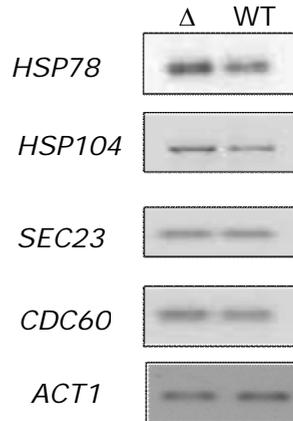


Figura C2. 20. Análisis semi-cuantitativo de la expresión diferencial entre las cepas $\Delta yhr087w$ (Δ) y BY4742 (WT) de algunos de los genes encontrados en el estudio de las micromatrices. El experimento se llevó a cabo mediante amplificación de cDNA obtenido 1 hora después de la inoculación de células de ambas cepas (a partir de cultivos de 16 horas en YPD) en YP20 con los oligonucleótidos específicos para cada gen (escritos en la Tabla M.2). Se muestran como referencia los resultados del gen *ACT1*.

Todo este conjunto de resultados indica que los niveles de mRNA de los genes que codifican las proteínas diferencialmente expresadas entre la cepa silvestre y la mutante tras 1 hora en medio YP20 son prácticamente invariables en esta misma situación, lo que sugiere que el efecto de Yhr087wp sobre la expresión de estas proteínas no ocurre esencialmente a nivel transcriptómico.

3.3.6. Análisis de la implicación de Yhr087wp en la exportación de mRNAs en *S. cerevisiae*

Uno de los procesos posttranscripcionales en la expresión génica es la exportación de mRNAs. Dado que algunos autores han descrito interacciones genéticas de *YHR087W* con *NPL3* o *YRA2* (Savchenko y col., 2005), ambos implicados en este proceso, nos planteamos la posibilidad de una participación de este gen transporte de mRNAs del núcleo al citosol.

Para intentar verificar esta hipótesis determinó si la mutación en *YHR087W* podría provocar un defecto en la exportación de mRNAs. Para ello se analizó la distribución de

mRNAs poliadenilados mediante *FISH*, tanto en el cepa BY7472 como en la $\Delta yhr087w$. Según se observa en la Figura C2.21, la mutación no determina un efecto general en la exportación de mRNAs, ni en 2% ni en 20% de glucosa.

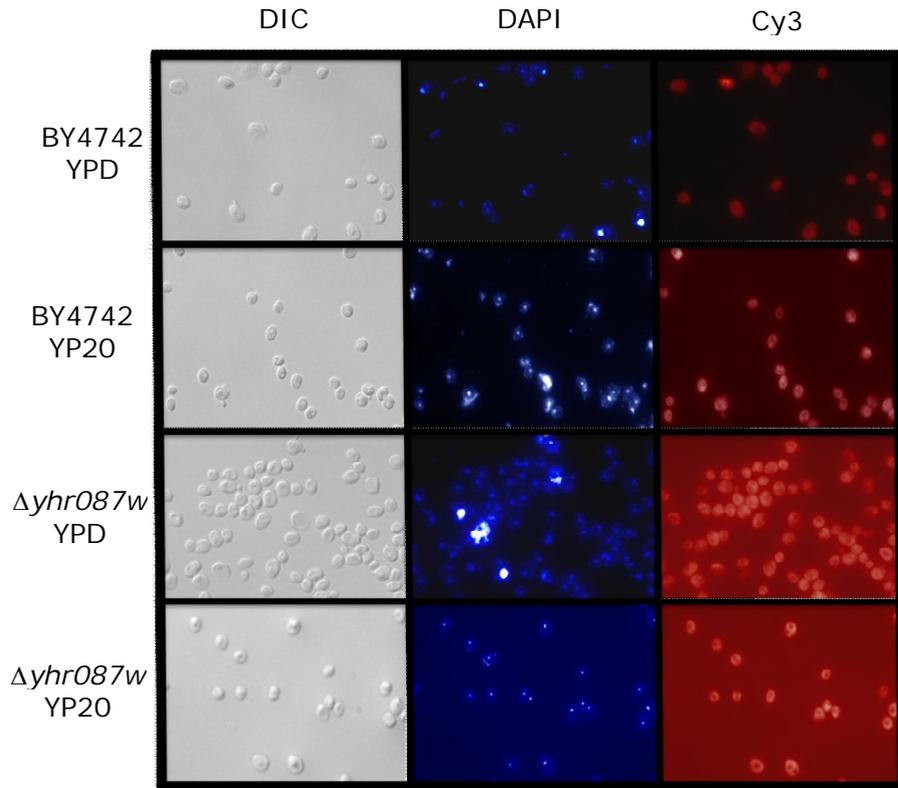


Figura C2.21. El mutante $\Delta yhr087w$ no tiene afectada la localización de RNAs poliadenilados. Células de la cepa silvestre y la mutante tras una hora en medio YPD o YP20 (en donde fueron diluidas a partir de cultivos de 16 h en YPD) fueron fijadas y se llevó a cabo la hibridación *in situ* utilizando una sonda Cy3-oligo(dT). El DNA se visualizó mediante tinción con DAPI.

4. Discusión

En este capítulo, se describen los cambios en el transcriptoma de una cepa silvestre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuando células procedentes de cultivos de 16 horas se transfieren a un medio fresco conteniendo 20% o 2% de glucosa.

Algunos de nuestros resultados se pueden resumir en las figuras C2.22 y C2.23, las cuales muestran, en primer lugar, que los genes implicados en el metabolismo del glicerol están más expresados en 20% de glucosa, como ocurre en otras condiciones de estrés osmótico (Gasch y col., 2000; Posas y col., 2000; Rep y col., 2000; Hirasawa y col., 2006).

Aunque la respuesta transcriptómica de las células de levadura en presencia de sorbitol 1 M o NaCl 0,75 M es muy similar (Hirasawa y col., 2006), cuando se considera el estrés causado por elevadas concentraciones de azúcares se puede encontrar ciertas diferencias. Así, para algunos de los genes con mayor expresión en 20% de glucosa (*RHR2*, *YMR244W*, *YGR035C*, *YCL047C*, *YLR413W*, *YDR222W*, *YHR048W*) no se ha descrito un incremento de niveles de mRNA en condiciones de estrés hiperosmótico causado por concentraciones de sorbitol 1 M (Gasch y col., 2000), mientras que para otros (*YNL193W*, *YHR033W*, *YLR108C*, *YGR243W*) tan sólo se ha detectado un aumento a tiempos cortos en dichas condiciones (Gasch y col., 2000). En el caso de otros genes (*YPL276W*, *YOR062C*, *YNL108C*, *YGL057C*) no hay información disponible acerca de su expresión en estas otras condiciones de estrés. Contrariamente, genes cuyos niveles de mRNA se incrementan por estrés salino o sorbitol 1 M, y que están relacionados con el metabolismo de la glucosa, de la trehalosa o del glucógeno, el metabolismo redox y la respuesta a estrés, como es el caso de *TPS1*, *TPS2*, *TSL1*, *NTH1*, *STL1*, *ALD2*, *ALD6*, *HSP26*, *HSP42* y *HSP104* (Rep y col., 2000; Posas y col., 2000; Hirasawa y col., 2006), no aparecen más expresados en 20% de glucosa en nuestras condiciones experimentales. De hecho, para algunos de ellos, los niveles de mRNA son incluso menores en 20% de glucosa

que en 2%. Experimentos incluidos en este capítulo (Figura C2.4) indican que el efecto es, además, similar cuando las células se inoculan en un medio que contiene 10% glucosa y 10% fructosa en lugar de 20% de glucosa.

Una conclusión particularmente interesante derivada de nuestro análisis es que genes controlados por represión por catabolito de carbono, como muchos pertenecientes a la categoría de "generación de metabolitos precursores y energía", pueden estar más reprimidos en presencia de concentraciones de glucosa superiores al 2%. Esto sugiere que las elevadas concentraciones de azúcar pueden introducir cambios específicos en los perfiles transcripcionales si los comparamos con los causados por otras situaciones de estrés, implicando tal vez mecanismos particulares de regulación. Previamente, se había descrito que la expresión del gen que codifica el represor transcripcional Mig1p es sensible a la concentración de glucosa (Zaragoza y col., 2001) y, de hecho, los datos de las micromatrices realizadas en este trabajo indican un nivel de mRNA dos veces superior en 20% glucosa que en 2%. A pesar de todos estos resultados, sería necesario realizar más análisis para determinar cual sería la concentración de glucosa a la que la represión por catabolito de carbono sería la máxima.

Algunos de los resultados encontrados, como el que se acaba de comentar acerca de la mayor represión ejercida por 20% de glucosa, no se deducen de los experimentos llevados a cabo por Kaeberlein y col. (2002), en los que no aparecen categorías funcionales sobrerrepresentadas al analizar mediante *FUNC ASSOCIATE* o *GO Term Finder* los genes con mayores niveles de expresión en 2% que en 20% de glucosa (datos no mostrados). Es importante señalar, sin embargo, que esta y otras diferencias encontradas entre los dos estudios pueden estar relacionadas con los datos mostrados en las Figuras C2.1 y C2.3, según los cuales el hecho de utilizar células sometidas o no previamente a estrés puede influir en los resultados transcriptómicos. Esta conclusión está de acuerdo con datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio en cepas vnicas (Pérez-Torrado y col., 2002) y podría

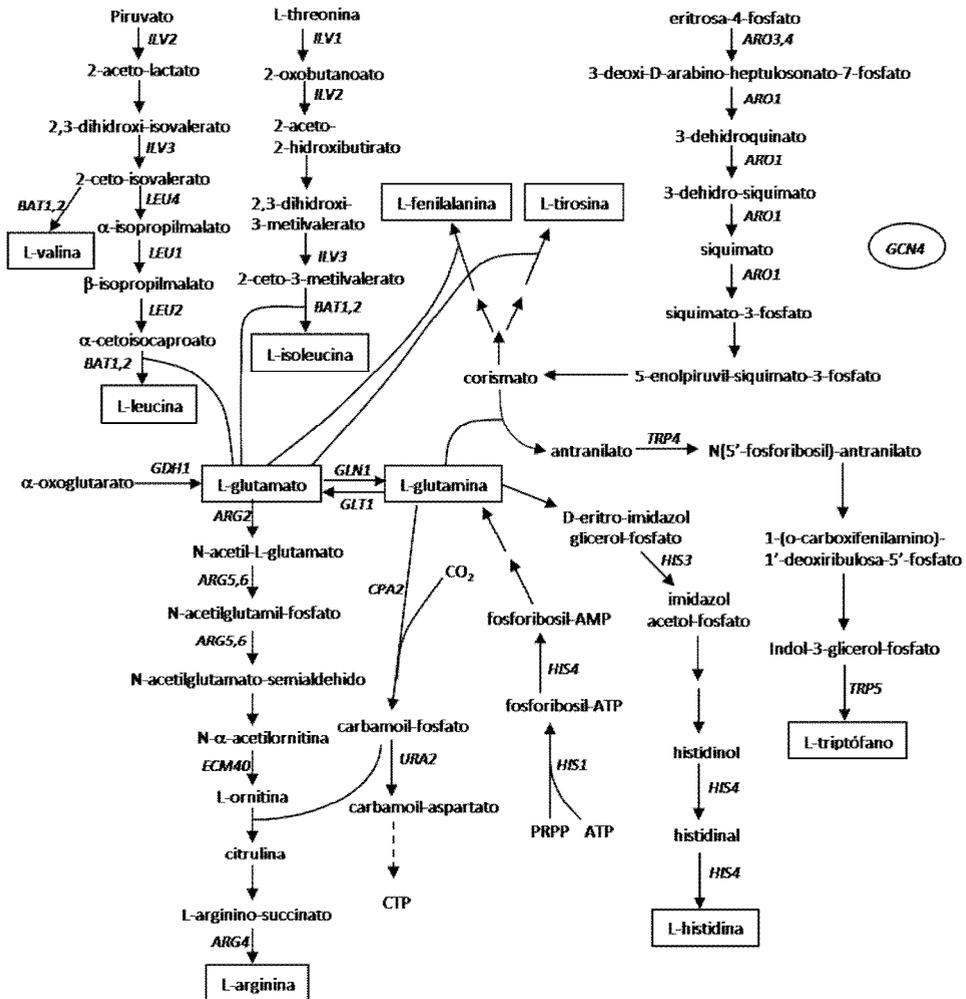


Figura C2. 23. Esquema de rutas metabólicas en las que intervienen genes cuyos niveles de expresión son superiores en 2% que en 20% de glucosa y pertenecen a las categorías de metabolismo de glutamina, aminoácidos ramificados y aromáticos, arginina e histidina. Los genes rodeados por un círculo están implicados en la regulación de la ruta metabólica que aparece más cercana en la Figura.

explicarse teniendo en cuenta el fenómeno ampliamente descrito de la protección cruzada (Hohmann y Mager, 2003 y referencias incluidas), según el cual células de levadura sometidas a estrés (en nuestro protocolo experimental causado por limitación de nutrientes y fase estacionaria), son menos afectadas por nuevas

condiciones de estrés que otras no sometidas previamente a condiciones adversas. Otro factor a considerar en la comparación con los datos de Kaeberlein y col. (2002) es la cepa utilizada; como se puede observar a lo largo de las Figuras C2.6 a C2.11, es posible apreciar variaciones de expresión génica frente a elevadas concentraciones de glucosa dependientes de la cepa silvestre considerada, si bien algunos datos son similares en la cepa W303-1a utilizada en los experimentos de micromatrices y otras, como la TM141 y la BY4742.

En este estudio nos hemos centrado en dos genes cuyos niveles de expresión cambian en función de la concentración de glucosa en el medio para tratar de entender las rutas implicadas en la respuesta al estrés hiperosmótico causado por las altas concentraciones de azúcar. Uno de ellos es *GPD1*, que codifica el enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y, como ya se ha comentado, se induce en cualquier condición de estrés hiperosmótico dada su implicación en la síntesis del glicerol, el osmolito compatible que sintetizan las levaduras en estas condiciones (Blomberg y Adler, 1992). El otro gen es *HSP104*, que codifica una carabina molecular importante en la resistencia a estrés térmico (Sánchez y Lindquist, 1990) cuyos niveles de expresión, como ocurre en el caso de otros genes de respuesta a estrés, son menores en 20% de glucosa que en 2% de glucosa en las condiciones experimentales seguidas en este trabajo (Figura C2.1).

Los datos presentados sobre la expresión de estos genes sugieren la implicación de diversas rutas de regulación transcripcional en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa. La primera es la ruta HOG, que desempeña un papel fundamental en otras condiciones de estrés osmótico (Posas y col., 2000). Esta conclusión está basada tanto en los defectos de crecimiento observados en el mutante en el gen *HOG1* en 20% de glucosa (Figura C2.5), como en la fosforilación de Hog1p (Figura C2. 7) y en los datos de expresión del gen *GPD1* (Figura C2.6). Rep y col. (2000) describieron una relación de 0,14 entre la

expresión del gen *GPD1* en $\Delta hog1$ y en su correspondiente cepa silvestre tras 45 minutos a 0,5 M NaCl; Posas y col. (2000) obtuvieron, en una comparación similar, un resultado de 0,05 tras 10 minutos en 0,4 M NaCl y de 0,14 tras 20 minutos en 0,8 M. En estrés por alta glucosa, las diferencias son menores (0,27). Todos estos resultados confirman los indicios obtenidos previamente por Remize y col. (2003) y Tomás-Cobos y col. (2004) sobre la participación de la ruta HOG en la respuesta a elevadas concentraciones de glucosa. Así, Remize y col. (2003) detectaron defectos de crecimiento en un mutante Δhog en condiciones de fermentación vínica. Tomás-Cobos y col. (2004), por su parte, habían descrito que la adición a cultivos de levadura de concentraciones de glucosa superiores al 2% conducían a mayores niveles de fosforilación de Hog1p. En el caso del gen *HSP104*, el efecto de la ruta HOG en la regulación de su expresión es menos clara, a la vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio.

La ruta PKA también controla la respuesta frente a este tipo de estrés en un cierto rango. En el caso del gen *GPD1*, el efecto podría ser específico de este tipo de estrés osmótico ya que datos previos de Rep y col. (1999a) indican que la expresión de este gen no está afectada en los mutantes de esta ruta. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que en el estudio de estos autores se utilizó un cepa cuyo único alelo silvestre *TPK* era el *TPK3*, y el único papel descrito para éste ha sido el de desarrollo pseudohifal (Robertson y col., 2000). En relación con *HSP104*, no podemos obtener ninguna conclusión a partir de las cepas utilizadas en este trabajo pero Roosen y col. (2005) describieron una represión en la expresión de este gen al añadir cAMP.

La ruta TOR también parece ejercer algún tipo de papel en la regulación de la respuesta a esta forma de estrés de acuerdo con los datos presentados en la Figura C2.9. Además, el tratamiento de las células de la cepa silvestre W303-1a con rapamicina tiene un efecto similar en la expresión de los dos genes considerados que la mutación en *TOR1* presente en la cepa MH349-3d (Figuras C2.8 y C2.9). Düvel y col. (2003) describieron

una reducción de 0,44-0,61 en la expresión de *GPD1* durante las primeras horas tras la adición de rapamicina a células previamente transferidas de 23°C a 37°C, y también en un mutante *tap42ts* (*tap42-109*) a temperatura no permisiva durante una hora. Sin embargo, este es la primera vez que se indica una posible implicación de esta ruta en la regulación de la expresión de este gen en condiciones de estrés osmótico. Alguno de los resultados aquí presentados también sugiere que la ruta TOR regula la expresión de *HSP104*, lo que estaría en concordancia con la reducción de la expresión de este gen después de un tratamiento con rapamicina en células silvestres afectadas por choque térmico (Düvel y col., 2003).

Roosen y col. (2005) propusieron que la quinasa Sch9p actuara de manera sinérgica o antagonista a la ruta PKA en la regulación de algunos genes diana y, recientemente, se ha demostrado que es sustrato de TORC1 (Urban y col., 2007). De acuerdo con nuestros datos (Figura C2.11), esta quinasa no parece desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión de *GPD1* o *HSP104*, al menos en las condiciones testadas.

El choque hiperosmótico incrementa los niveles de fosfatidilinositol-3,5-bifosfato (PI(3,5)P₂) (Dove y col., 1997) a través de la activación de la quinasa Fab1p (Cooke y col., 1998). Sin embargo, los datos de las micromatrices muestran que la expresión del gen que codifica esta quinasa no cambia en el estrés causado por 20% de glucosa, y los niveles de mRNA de *GPD1* y *HSP104* en el mutante $\Delta fab1$ no están afectados significativamente en esta condición adversa (Figura C2.12).

Otro resultado interesante que se deriva del análisis transcritoómico es la identificación de diversos genes de función desconocida que están más expresados en altas concentraciones de glucosa. Para algunos de ellos se han encontrado diferencias en el crecimiento y/o la viabilidad en periodos de tiempos cortos o largos con elevadas concentraciones de glucosa; este es el caso de *YHR087W*, *YGR052W*, *YNL193C*, *YOR062C* e *YLR108C*.

En este trabajo se han obtenido algunos datos sobre procesos biológicos en los que podría estar implicado el gen *YHR087W*. En primer lugar la viabilidad de la cepa de laboratorio mutada en este gen está afectada no sólo en condiciones de estrés por altas concentraciones de azúcar, sino también por etanol y, aunque en menor medida, por estrés oxidativo. En segundo lugar, la comparación proteómica entre la cepa silvestre y la cepa mutante en 20% de glucosa indicó como categoría sobrerrepresentada el “plegamiento de proteínas”. Estos resultados establecen una *YHR087W* y genes de respuesta a estrés como *HSP104*. Así, mientras en diversas condiciones de estrés se detecta la inducción de estos genes (Gasch y col., 2000), los datos proteómicos aquí presentados indican que en el mutante $\Delta yhr087w$ los niveles de Hsp104p están disminuidos. También son destacables las diferencias entre BY4742 y $\Delta yhr087w$ en cuanto a las cantidades de algunas otras proteínas relacionadas, en sentido amplio, con la biosíntesis de proteínas (aminoacil-tRNA sintetasa de leucina, proteínas ribosomales y distribución intracelular de proteínas): Cdc60p, Rpp0p, Rps5p, Sec23p y Tim23p.

De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla C2.11 y la Figura C2.20, el papel de Yhr087wp en el control de los niveles de estas proteínas parece no tener lugar a nivel transcripcional, sino que apuntan hacia una implicación en procesos post-transcripcionales, que podrían abarcar el procesamiento de mRNAs y su exportación y estabilidad, así como la biosíntesis de proteínas considerada en sentido amplio. Ciertamente, se han descrito interacciones físicas o genéticas de *YHR087W* con proteínas que participan en procesamiento y exportación de RNAs y en plegamiento de proteínas, incluyendo Mdm20p/Nat3p, Nsr1p, Npl3p, Lsm12, Yra2p, Air1p, Hsp82p y Hsc82p (Savchenko y col., 2005; McClellan y col., 2007; Wilmes y col., 2008). Diversos estudios presentados en este trabajo parecen indicar que Yhr087wp no intervendría en el proceso de exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma (Figuras C2.21), aunque no se puede descartar un efecto particular sobre el transporte de mRNAs

concretos. Serían necesarios más análisis para alcanzar un mayor conocimiento de la función de *YHR087W*.

Dada la relevancia de este gen en la respuesta a elevadas concentraciones de glucosa, situación a la que deben enfrentarse las levaduras en procesos como la producción del vino, *YHR087W* resulta particularmente interesante por sus posibles aplicaciones biotecnológicas, que se considerarán en el capítulo 4 de este trabajo.

Capítulo 3

CAPITULO 3

Relevancia de la respuesta al estrés osmótico en la adaptación de las levaduras a las condiciones de vinificación.

En la transformación de los azúcares presentes en el mosto de las uvas en etanol están muy implicadas las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* (véase la introducción de este trabajo). Como ya se ha comentado en capítulos anteriores, las células de levadura tienen que superar diferentes tipos de estrés durante la vinificación, siendo particularmente importante el estrés osmótico causado por las elevadas concentraciones de azúcares del mosto en el momento de su inoculación.

En este capítulo se pretende comparar diversas cepas de laboratorio y vínicas para intentar entender posibles causas de su diferente capacidad de crecimiento en el mosto, prestando particular atención a aquéllas que puedan estar relacionadas con la respuesta al estrés osmótico.

Además, también se lleva a cabo un estudio de diferentes medios de rehidratación para tratar de encontrar una correlación entre la concentración de azúcares en los mismos y la capacidad de crecimiento de las levaduras en el mosto tras el momento de la inoculación.

1. Estudio de las diferencias transcripcionales entre una cepa de laboratorio y una cepa vínica adaptada al crecimiento en medios con elevadas concentraciones de glucosa

Con la finalidad de entender en que medida la respuesta al estrés osmótico al que se enfrentan las levaduras vínicas en el comienzo de la vinificación podría ser una cualidad importante en su adaptación a dicho proceso, se llevó a cabo un análisis transcriptómico comparado entre dos cepas de levadura: una vínica (la ICV16) con un buen comportamiento fermentativo (Zuzuarregui y col., 2004a) y otra de laboratorio (la W303 diploide). Ambas cepas se crecieron en medios que presentaban elevadas concentraciones de glucosa.

En primer lugar se llevaron a cabo algunos experimentos preliminares con la finalidad de determinar las diferencias de comportamiento entre ambas cepas en medios con elevadas concentraciones de glucosa. Para ello se inoculó $5 \cdot 10^6$ células/mL en medios YPD e YP20 a partir de cultivos de 16 horas de ambas cepas en YPD. Durante las siguientes horas se determinó la densidad óptica de los cultivos, así como el número de células viables a diferentes tiempos tras la inoculación. Como se puede observar en la Figura C3.1, la cepa ICV16 presenta un mejor crecimiento en medio conteniendo 20% glucosa que la cepa W303 diploide. Por otro lado, se comparó la resistencia de ambas cepas al estrés provocado por elevadas concentraciones de glucosa (apartado 2.1.2.3 de Materiales y Métodos) mediante la determinación del porcentaje del número de células viables en medio con 20% de glucosa frente al encontrado en 2%, transcurrida 1 hora después de la inoculación. Los valores obtenidos fueron $62,4 \pm 4,7$ para la cepa W303 diploide y $89,8 \pm 5,7$ para la ICV16, indicando de nuevo que la cepa vínica es más capaz de enfrentarse a esta condición adversa tan importante en diversos procesos biotecnológicos y que estas dos cepas podían ser adecuadas para los análisis planteados en este capítulo.

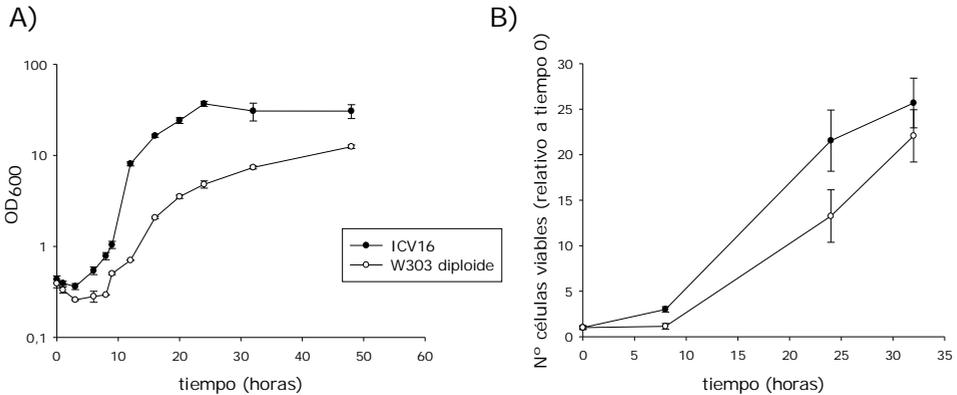


Figura C3.1. Crecimiento de las cepas ICV16 y W303 diploide en medio YPD. Se tomaron medidas de OD₆₀₀ (panel A) a diferentes tiempos. En el panel B se muestra el número de células viables de cada una de las cepas a los tiempos considerados con respecto al valor encontrado en el momento de la inoculación (tiempo 0). En ambos casos se muestra la media y la desviación estándar de tres muestras independientes.

Se procedió al análisis transcriptómico comparado de las dos cepas en las mismas condiciones utilizadas en los experimentos previos utilizando muestras obtenidas 1 hora después de la inoculación en medio YPD. Los datos obtenidos indicaron que 252 genes mostraban valores de expresión superiores a 2 veces en la cepa vónica que en la de laboratorio; el número de genes con diferencias de expresión superiores a 2,5 era de 129 genes y superiores a 3 veces de 79. El comportamiento opuesto se observó en el caso de 265 genes al considerar diferencias de expresión superiores a 2 veces, para 145 genes en el caso de 2,5 veces y para 107 genes si se tenían en cuenta diferencias mayores que 3.

1.1. Genes más expresados en la cepa ICV16 que en la W303 diploide

En la Tabla C3.1. se muestra la agrupación en categorías funcionales según la herramienta *FUNC ASSOCIATE* de los genes que presentaron una expresión superior a 2 veces en la cepa ICV16 que en la cepa W303 diploide.

Resultados

Tabla C3.1. Agrupación en categorías funcionales de los genes expresados más de 2 veces en ICV16 que en W303 diploide tras 1 hora de incubación en YP20.

N	X	P	Categoría
42	294	$9,2 \cdot 10^{-14}$	Metabolismo de ácidos orgánicos
15	37	$2,3 \cdot 10^{-12}$	Metabolismo de esteroides
28	157	$8,2 \cdot 10^{-12}$	Metabolismo de alcoholes
13	31	$4,2 \cdot 10^{-11}$	Metabolismo de nucleobases
33	234	$7,9 \cdot 10^{-11}$	Metabolismo de compuestos nitrogenados
15	53	$8,6 \cdot 10^{-10}$	Biosíntesis de nucleótidos
13	44	$6,7 \cdot 10^{-9}$	Metabolismo de aminoácidos de la familia del aspartato
14	55	$1,5 \cdot 10^{-8}$	Metabolismo de compuestos aromáticos
12	39	$1,5 \cdot 10^{-8}$	Horquilla de replicación
19	103	$1,2 \cdot 10^{-8}$	Replicación del DNA
9	9	$9,8 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de lisina
9	37	$9,0 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo del piruvato
9	31	$1,8 \cdot 10^{-6}$	Metabolismo de aminoácidos de azufre
8	34	$3,7 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de ribonucleótidos
4	6	$3,3 \cdot 10^{-5}$	Respuesta a especies reactivas de oxígeno
16	121	$1,7 \cdot 10^{-5}$	Biosíntesis de lípidos
7	22	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Glicolisis
7	22	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Met. de aminoácidos de la familia de la serina
7	22	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de metionina
8	29	$1,0 \cdot 10^{-5}$	Elongación del DNA

N representa el número de genes de cada categoría que aparecen en nuestro experimento, **X** el número total de genes de dicha categoría y **P** el *p*-valor.

En la Tabla C3.2 se muestra el análisis con la herramienta *GO Term Finder* de este mismo grupo de genes.

Tabla C3.2. Distribución en las diferentes categorías funcionales según el *GO Term Finder* de los genes más expresados en la cepa ICV16 que en la W303 diploide tras 1 hora en medio YP20, considerando diferencias superiores a 2.

Categoría		Genes expresados más de 2 veces en ICV16 en comparación con W303 diploide	
METABOLISMO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (ORGÁNICOS)	Metabolismo del piruvato (Glicolisis)	<i>CDC19, PGK1, TDH3, TDH1, TDH2, MAE1, FBA1, GPM1, PDC1</i>	
	Metabolismo de compuestos nitrogenados	Aspártico (biosíntesis)	<i>CHA1, LYS20, LYS4, SAM2, MET6, STR3, LYS12, LYS1, MET3, SAM1, MET17, MET2, LYS9</i>
		Aminoácidos de azufre (biosíntesis)	<i>CYS3, SAM2, MET6, STR3, MET3, MHT1, SAM1, MET17, MET2</i>
		Lisina (biosíntesis)	<i>LYS20, LYS4, LYS12, LYS1, LYS9</i>
		Serina (biosíntesis)	<i>CYS3, GCV3, CHA1, GCV1, MET17, MET2, SER1</i>
		Otros compuestos nitrogenados (biosíntesis)	<i>HIS3, TRP1, CAR2, GLN1, ACO1, PRS3, HIS4, MAE1, HST4, GLN4, KRS1, IDH2, PRS1</i>
METABOLISMO DE NUCLEOBASES, NUCLEÓSIDOS Y NUCLEÓTIDOS	Metabolismo de ribonucleótidos (<i>purina</i>) (biosíntesis)	<i><u>ADE1, URA7, ADE8, ADE5, ADE7, STF2, ADE6, PRS3, URA8, PRS1, ADE13, APT1, ADE17, GUA1, ADE4, ADE2</u></i>	
	Metabolismo de otras nucleobases, nucleósidos y nucleótidos	<i>MTD1, GPD2, ADH1, HPT1, ADH2, SER1, ADH4, URA6, PRS3, ADH5, RAD27</i>	
FERMENTACIÓN		<i>ADH1, PDC1, ADH2, RHR2, ADH4, ADH5</i>	
BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS	Metabolismo biosintético de esterol(ergosterol)	<i>ERG4, ERG25, ERG1, ERG7, ERG3, ERG6, HMG1, ERG5, CYB5, MVD1, ERG10, IDI1</i>	
REPLICACIÓN DE DNA DEPENDIENTE DE DNA	Elongación	<i>MCM2, POL12, POL30, MCM7, DPB3, MCM3, PRI2, RAD27, POL1</i>	
	Iniciación	<i>MCM2, POL12, MCM7, MCM3, PRI2, CDC45, MCM5, POL1</i>	

Resultados

En el anexo 4, que se puede encontrar en el CD adjunto, aparece un archivo con los datos de expresión relativa ICV16/W303 diploide.

Los resultados obtenidos mediante las dos herramientas utilizadas indican como categorías sobrerrepresentadas aquellas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos (mayoritariamente biosíntesis), glicolisis, metabolismo de los alcoholes (en particular ergosterol) y replicación del DNA.

1.2. Genes más expresados en la cepa W303 diploide que en la ICV16

Por otro lado, las categorías en las que se agrupan los genes que están más expresados en la cepa W303 diploide según la herramienta *FUNC ASSOCIATE* son las que se muestran en la Tabla C3.3.

Tabla C3.3. Agrupación en categorías funcionales de los genes expresados más de 2 veces en W303 diploide que en ICV16 tras 1 hora en YP20.

N	X	P	Categoría
23	108	$3,6 \cdot 10^{-11}$	Transposición de DNA
24	188	$5,4 \cdot 10^{-7}$	Recombinación de DNA
9	31	$2,5 \cdot 10^{-6}$	Catabolismo de aminas
9	31	$2,5 \cdot 10^{-6}$	Catabolismo de compuestos nitrogenados
5	9	$1,2 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de asparagina
4	5	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Respuesta celular a ayuno por nitrógeno
5	10	$2,3 \cdot 10^{-5}$	Catabolismo de aminoácidos de la familia del aspartato
9	42	$3,8 \cdot 10^{-5}$	Catabolismo de aminoácidos de la familia de la glutamina
3	3	$6,7 \cdot 10^{-5}$	Transporte de Na ⁺
4	7	$8,6 \cdot 10^{-5}$	Metabolismo de la vitamina B ₆

N representa el número de genes de cada categoría que aparecen en nuestro experimento, **X** el número total de genes de dicha categoría y **P** el *p*-valor.

Si se utiliza la herramienta GO Term Finder, se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla C3.4.

En este caso las categorías que están sobrerrepresentadas son las relacionadas con la recombinación y transposición del DNA, metabolismo de la asparagina y respuesta celular a la limitación de nitrógeno.

En el anexo 4, que se puede encontrar en el CD adjunto, aparece un archivo con los datos de expresión relativa ICV16/W303 diploide.

De todos los resultados obtenidos el que parece más interesante es la mayor expresión de los genes glicolíticos, fermentativos y biosintéticos en la cepa ICV16, lo que podría indicarnos el porqué de su mayor capacidad de crecimiento en medios con 20% de glucosa.

Tabla C3.4. Distribución en las diferentes categorías funcionales según el *GO Term Finder* de los genes más expresados en la cepa W303 diploide que en la ICV16 tras 1 hora en medio YP20, considerando diferencias superiores a 2.

Categoría		Genes expresados más de 2 veces en la cepa W303 diploide comparada con la ICV16
TRANSPOSICIÓN		<i>YBR012W-B, YML040W, YJR026W, YBR012W-A, YJR028W, YMR051C, YAR010C, YLR035C-A, YML045W, YER160C, YMR050C, YHR214C-B, YBL005W-A, YMR046C, YMR045C, YBL005W-B, YJR029W, YFL002W-A, YIL082W-A, YJL113W, YCLO20W, YJL114W</i>
CATABOLISMO DE COMPUESTOS NITROGENADOS (AMINAS)	Aminoácidos de la familia del aspartato	<i>AAT1, ASP3-1, ASP3-2, ASP3-3, ASP3-4</i>
	Otras aminas	<i>BAT1, ALD3, ALD2, PUT4</i>

1.3. Validación de los resultados obtenidos en los análisis de las micromatrices

Los resultados obtenidos en las micromatrices se verificaron mediante RT-PCR semicuantitativa, utilizando las mismas muestras empleadas en las micromatrices y los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla M.2, correspondientes a algunos de los genes que presentaban una expresión diferencial entre las cepas en presencia de 20% glucosa. Este análisis también se llevó a cabo con muestras de ambas cepas obtenidas durante crecimiento exponencial en YPD, para determinar si las diferencias en los niveles de expresión estaban relacionadas con la respuesta a estrés osmótico o con peculiaridades de las cepas. Los genes seleccionados con este propósito fueron *ADE2*, *PGK1*, *GPD2* y *ERG10* (entre los que presentaban niveles superiores en la cepa ICV16) y *STL1* y *ALD3* (en el caso de aquéllos más expresados en W303 diploide). En la Figura C3.2 se muestran los resultados de este experimento, que, como se puede observar, verifican en todos los casos la información obtenida en las micromatrices.

La comparación entre los resultados obtenidos en YPD e YP20 indica que, aunque las diferencias encontradas en el análisis transcriptómico pueden ser en algunos casos dependientes de cepa, en la mayoría de los genes analizados, como es el caso de *ALD3*, *GPD2*, *PGK1*, *ERG10* y *STL1*, están relacionadas con la respuesta a elevadas concentraciones de glucosa, pues no se detectan variaciones cuando las cepas se crecen en medio YPD.

La obtención en las micromatrices de diferencias entre las dos cepas en el caso del gen *ADE2*, observadas en los experimentos de RT-PCR semicuantitativa también en YPD, constituye una verificación adicional de los experimentos llevados a cabo, ya que la cepa W303 diploide contiene una mutación en el gen *ADE2* (*ade2-1*).

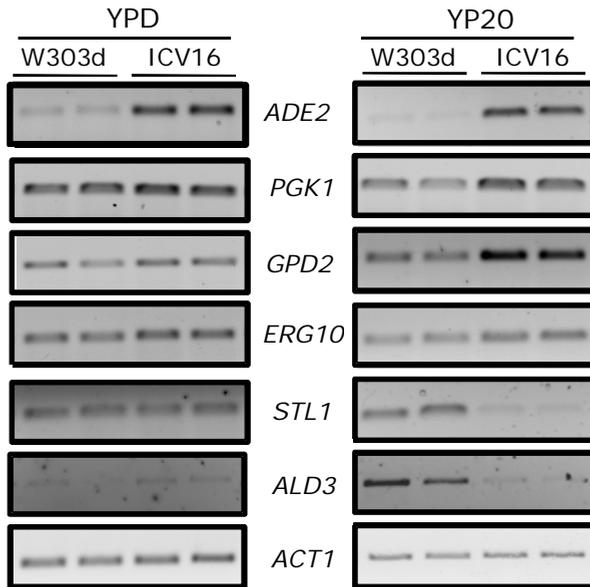


Figura C3.2. Análisis de la expresión diferencial en YPD e YP20 mediante PCR semicuantitativa de algunos de los genes encontrados en el análisis de las micromatrices que presentan mayor expresión diferencial entre las cepas ICV16 y W303 diploide en 20% de glucosa. El experimento se llevó a cabo amplificando cDNA obtenido 1 hora después de la inoculación de las células (a partir de cultivos en YPD durante 16 horas) en estos medios con los oligonucleótidos específicos para cada gen que se describen en la Tabla M.2. Se utilizaron dos muestras independientes para la validación. Como referencia se muestran los resultados del gen *ACT1*.

2. Relevancia de la expresión de los genes implicados en la captación y metabolismo del glicerol en el comportamiento de las cepas de levadura al comienzo de la vinificación

Los genes relacionados con la captación y el metabolismo del glicerol presentan un cambio de expresión variable en los estudios de micromatrices descritos anteriormente. Aunque el gen *GPD1* (inducido en condiciones de estrés osmótico (Albertyn y col., 1994; Nevoigt y Stahl, 1996)) mostró niveles de expresión similares en ambas cepas ($1,15 \pm 0,15$), en el caso del *GPD2* (que codifica también una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) los niveles de mRNA son superiores en ICV16 ($5,55 \pm 0,39$). Lo contrario ocurre para el gen *STL1*, inducido por estrés osmótico (Ferreira y col., 2005), que codifica una proteína simporte glicerol-protón

($0,19 \pm 0,01$ sería el valor de la relación entre los niveles en ICV16 con respecto a W303 diploide para este gen). El gen *GUP1*, también implicado en la captación de glicerol (Holst y col., 2000) está más expresado en la cepa W303 diploide ($0,54 \pm 0,07$). Finalmente, para *FPS1*, que codifica un canal de la membrana plasmática implicado en la entrada y salida del glicerol (Luyte y col., 1995), la expresión es similar en ambas cepas ($1,26 \pm 0,05$).

Para determinar si los niveles de mRNAs de todos estos genes puede desempeñar un papel en la adaptación de las levaduras al crecimiento en medios con elevadas concentraciones de azúcar, se llevaron a cabo análisis de expresión de los mismos tanto en la cepa ICV16 como en otras cepas vínicas de la levadura *S. cerevisiae*. Concretamente, el estudio se amplió a las cepas vínicas comerciales Lalvin T73, Uvaferm CEG, A1 (Francia) y A2 (España). La empresa que comercializa estas levaduras (Lallemand) nos había informado previamente que si bien las cepas A1 y A2 presentan un alto interés enológico por sus propiedades organolépticas, muestran problemas al inicio de la vinificación (Dr. Antonio Palacios, comunicación personal). En primer lugar se hizo un estudio del comportamiento de todas estas cepas en medio YP20 tras inocular $5 \cdot 10^6$ células/mL procedentes, como en casos anteriores, de cultivos de 16 horas en medio YPD. El crecimiento durante las siguientes horas se siguió por determinación de células viables. Los resultados se presentan en la Figura C3.3.

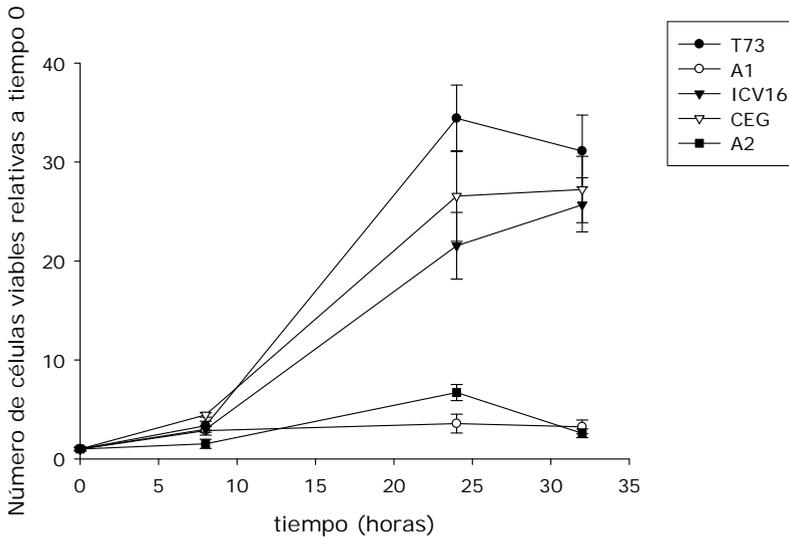


Figura C3.3. Crecimiento en YP20 de varias cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Se inocularon en medio YP20 $5 \cdot 10^5$ células/mL a partir de cultivos de 16 horas en YPD. El número de células viables se determinó mediante recuento en placas donde se habían sembrado diluciones apropiadas de los cultivos preparadas a diferentes tiempos tras la inoculación. Los valores que se muestran son relativos al número de células viables a tiempo 0. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

De acuerdo con estos resultados es posible diferenciar entre cepas vínicas sin problemas de viabilidad en condiciones de crecimiento en medios conteniendo altas cantidades de azúcar (Grupo I: ICV16, T73 y CEG) y cepas con números bajos de células viables (Grupo II: A1 y A2).

Una vez definido el comportamiento de las diferentes cepas vínicas se procedió en todas ellas al análisis de los niveles de mRNA de los genes implicados en la captación y en el metabolismo del glicerol que se han mencionado al inicio de este apartado. La Figura C3.4 muestra los resultados de los experimentos llevados a cabo utilizando las mismas condiciones de crecimiento descritas a lo largo de este capítulo. En ella se indican los datos de expresión obtenidos para cada uno de estos genes en cada cepa con respecto a los encontrados en la cepa ICV16, considerada en este estudio

como cepa de referencia. En el caso del gen *GPD1* los valores se determinaron mediante análisis *Northern*, mientras que en el resto de los genes se recurrió a RT-PCR en tiempo real debido a sus menores niveles de expresión

En el caso del gen *GPD1*, se observan niveles de mRNA muy diferentes entre las cepas, siendo de 4,5 a 7,8 veces menores en las dos con mayores defectos en viabilidad en 20% glucosa (A1 y A2) que en la ICV16.

Con respecto a *GPD2*, el resultado es similar. Se detecta variabilidad entre cepas y, además, las dos con problemas de crecimiento en 20% de glucosa (A1 y A2) muestran valores inferiores al resto de las cepas (con un cambio de aproximadamente 2 veces, cuando se comparan los datos con los de la cepa ICV16).

A diferencia de los resultados encontrados en los casos anteriores, el gen *GUP1* presenta una expresión mayor en estas dos cepas que en las restantes, con diferencias de 2,4 a 5,9 veces respecto a ICV16.

En el caso de *STL1* se detectan niveles muy superiores en la cepa T73, pero no es posible encontrar una correlación entre la expresión génica y el comportamiento durante las primeras horas en YP20. La misma conclusión se puede obtener analizando los datos de *FSP1*, en donde las diferencias de expresión encontradas entre cepas oscilan entre 0,63 y 1,8.

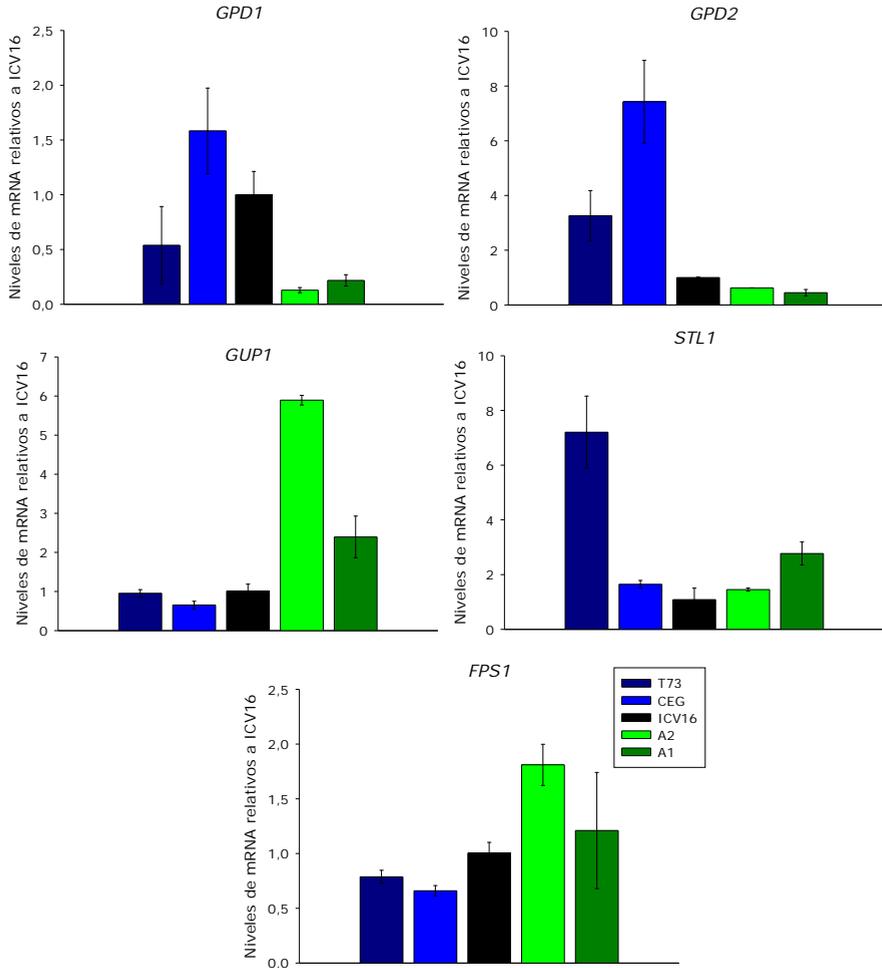


Figura C3.4. Expresión de *GPD1*, *GPD2*, *GUP1*, *STL1* y *FPS1* en YP conteniendo 20% glucosa en varias cepas vínicas. Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD se inocularon en YP20 a una OD_{600} de 0,3. Las muestras se tomaron tras 1 hora de incubación para el análisis de RNA con sondas u oligonucleótidos diseñados para la detección específica de estos genes (Tabla M.2 de Materiales y Métodos). La expresión de *GPD1* fue determinada mediante análisis “Northern” y la de los otros genes por RT-PCR en tiempo real. Los datos se normalizaron con respecto a los obtenidos para el gen *ACT1* y fueron referidos a los de la cepa de referencia ICV16. Se presenta la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

De acuerdo con estos resultados, la expresión de varios de los genes considerados es particularmente diferente entre las cepas A1 y A2 y el resto de levaduras vínicas consideradas, lo que sugiere que la expresión de estos genes podría tener relevancia en

la adaptación a las elevadas concentraciones de glucosa en tiempos cortos tras la inoculación. De acuerdo con la diferentes funciones de los genes analizados, los niveles más bajos encontrados en el caso de los genes *GPD* y los superiores en el caso de *GUP1* podrían indicar una menor capacidad de estas dos cepas para producir glicerol, así como mayores posibilidades de captarlo del medio (en el caso que estuviera presente en el mismo).

3. Relevancia del contenido intracelular de glicerol en las levaduras vínicas en la adaptación al crecimiento en el mosto

Los datos obtenidos en el apartado anterior sugieren que podrían existir variaciones en los niveles de glicerol entre las diferentes cepas consideradas. Para analizar esta posibilidad se determinó el contenido intracelular de glicerol 60 minutos después de haber transferido las células al medio YP20. Se eligió este tiempo por estar próximo al requerido por las células de levadura para conseguir el máximo nivel de este osmolito en otras condiciones de estrés osmótico (Hohmann y Mager, 2003). Como control se determinó también el contenido de glicerol en condiciones de crecimiento exponencial en medio YPD. Los resultados se muestran en la Tabla C3.5.

En todas las cepas consideradas la concentración intracelular de glicerol se sitúa entre $0,9-2,5 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{mol glicerol}/\mu\text{g}$ proteína en condiciones de crecimiento exponencial. Tras 60 minutos en un medio con elevadas concentraciones de glucosa el valor llegó a superar los $3 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol glicerol}/\mu\text{g}$ proteína, excepto en el caso de las cepas A1 y, sobre todo, A2. La aplicación de la herramienta ANOVA con $P \leq 0.05$ indicó que las diferencias entre la cepa A2 con respecto a la ICV16 eran estadísticamente significativas.

Tabla C3.5. Contenido intracelular de glicerol (μmol glicerol/ μg proteína total) en las cepas vínicas seleccionadas.

Cepa	20% Glucosa 60 min	2% glucosa exponencial
ICV16	$3,04 \cdot 10^{-3} \pm 4,63 \cdot 10^{-6}$	$1,34 \cdot 10^{-4} \pm 1,73 \cdot 10^{-5}$
T73	$3,15 \cdot 10^{-3} \pm 8,90 \cdot 10^{-5}$	$1,10 \cdot 10^{-4} \pm 2,79 \cdot 10^{-5}$
CEG	$3,59 \cdot 10^{-3} \pm 5,64 \cdot 10^{-5}$	$9,18 \cdot 10^{-5} \pm 1,67 \cdot 10^{-5}$
A1	$2,65 \cdot 10^{-3} \pm 1,71 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{-4} \pm 6,52 \cdot 10^{-5}$
A2	$2,37 \cdot 10^{-3} \pm 1,95 \cdot 10^{-5}$	$1,29 \cdot 10^{-4} \pm 1,79 \cdot 10^{-5}$

Las variaciones en los niveles de glicerol intracelular encontradas entre las cepas A2 e ICV16 podrían ser debidas a diferencias cinéticas en cuanto a la producción de este osmolito por lo que se procedió a llevar a cabo un estudio de la evolución de dichos niveles durante las primeras 4 horas tras la inoculación de las células de levadura en YP20. Los resultados de este experimento, mostrados en la Figura C3.5, indican que en ambas levaduras los niveles máximos de glicerol intracelular se alcanzaron antes de 1 hora tras la inoculación, siendo 1,3 veces mayores en la cepa ICV16. Sorprendentemente, a pesar del mantenimiento de las condiciones de estrés osmótico, con el transcurso del tiempo se observa una disminución de estos niveles, siendo más rápida en el caso de la cepa ICV16, aunque los valores encontrados para ambas cepas a las 4 horas son similares.

De acuerdo con estos resultados, los genes implicados en la producción y en la captación y liberación del glicerol de la célula podrían estar implicados en la adaptación de las cepas de levadura al 20% de glucosa a través del control de los niveles de glicerol, al menos a tiempos muy cortos, aunque es muy probable que otros mecanismos también estén involucrados.

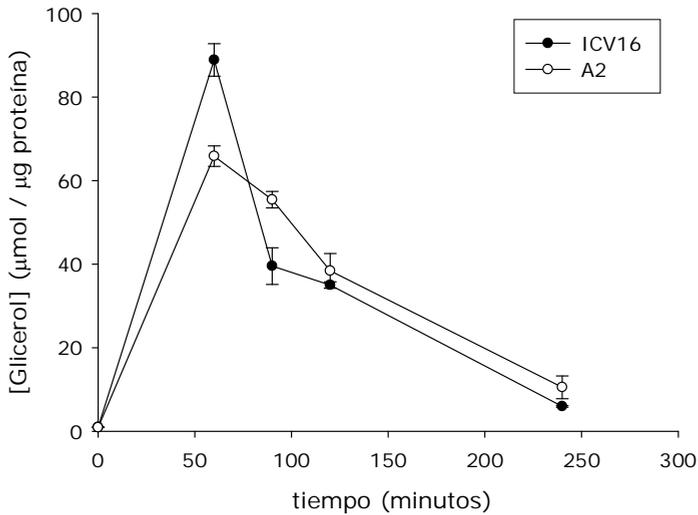


Figura C3.5. Perfil de la evolución de la concentración intracelular de glicerol en las cepas ICV16 y A2. Células procedentes de cultivos de 16 horas en YPD de estas cepas se inocularon en YP20 a una OD_{600} de 0,3. Las muestras se tomaron tras 0, 1, 1,5, 2 y 4 horas de incubación. Los extractos y la cuantificación de glicerol se realizaron como se explica en el apartado 2.13.5 de Materiales y Métodos. Se muestran los valores normalizados frente a tiempo cero de la cepa ICV16. Los datos corresponden a la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4. ¿Es posible la preadaptación de las levaduras vínicas a las condiciones de estrés osmótico presentes al inicio de la vinificación?

Estudios llevados a cabo con diversas cepas vínicas de levadura han demostrado que su pre-adaptación a condiciones particulares de estrés que tienen lugar durante la vinificación puede ayudar a la mejora de sus capacidades fermentativas. Esta estrategia se utilizó, por ejemplo, en la adaptación a las vinificaciones a bajas temperaturas (Llauradó y col., 2005). En el caso de la respuesta al estrés osmótico al que se enfrentan las levaduras al inicio de la vinificación, Novo y col. (2007) realizaron un estudio considerando el efecto de la pre-incubación de la levadura seca activa en medios como agua, 200 g de sorbitol/L, 100 g de glucosa/L + 100 g de fructosa/L y mosto sintético; sus resultados indicaron que la viabilidad celular no variaba

significativamente entre estos tratamientos, pero la vitalidad, estimada a partir de medidas de producción de CO₂, era mayor cuando las células se incubaban en mosto sintético.

Dado que nuestro estudio se centra en la influencia sobre las levaduras de las elevadas concentraciones de glucosa, se utilizó una aproximación para la rehidratación de las levaduras previa a su inoculación en el medio YP20 basada en la utilización de medios con diferentes concentraciones de glucosa (0, 2%, 5% y 10%). En todos los casos, y siguiendo las instrucciones de varias de las empresas comercializadoras, la levadura seca activa fue incubada en estos medios de rehidratación durante 20 minutos a 37°C. A continuación se realizó una dilución 1:500 en medio YP20, se incubaron las células en agitación suave a 22°C y se fueron tomando medidas de producción de CO₂ cada 30 minutos durante las siguientes 5 horas, usando un *Chittick*. En estos experimentos se consideraron las dos cepas comerciales de levadura que presentaban problemas de crecimiento al inicio de la vinificación (A1 y A2). La Figura C3.6 muestra la evolución de la vitalidad de las dos cepas en estas condiciones experimentales.

Los resultados descritos en la Figura C3.6 indican que la capacidad fermentativa muestra diferencias dependiendo de la cepa y de la condición de rehidratación. En el caso de la A2, los mayores valores se encuentran en medios conteniendo 5% y 2% de glucosa, siendo las diferencias estadísticamente significativas entre 5% de glucosa y agua en el intervalo de 30 a 150 minutos tras la inoculación, y únicamente en el punto de 30 minutos para glucosa 2% en comparación con agua. En lo que respecta a A1, la mayor capacidad fermentativa se obtuvo cuando las células fueron rehidratadas en 2% de glucosa y la menor en 10%; las diferencias encontradas en este caso fueron estadísticamente significativas durante la mayoría de los puntos considerados en el caso de glucosa 2% (con respecto a agua), desde 90 a 150 minutos al considerar glucosa 5% y en alguno de los puntos para glucosa 10%.

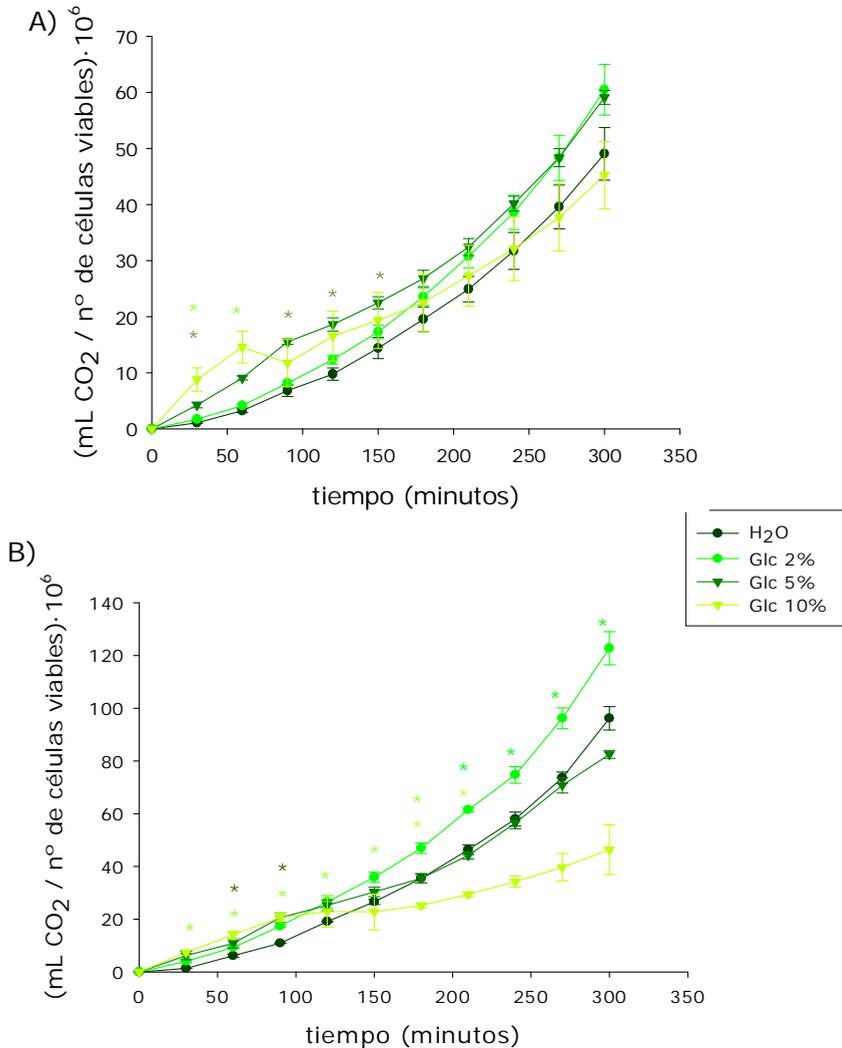


Figura C3.6. Determinación de la vitalidad de las cepas de levadura A2 (panel A) y A1 (panel B). Tras rehidratar la levadura seca activa durante 20 minutos a 37°C en medios conteniendo diferentes concentraciones de glucosa (0, 2%, 5% y 10%), las células se inocularon en medio YP20 a una concentración de 10⁶ células/mL. Los valores que se presentan corresponden a los mL de CO₂ producidos en los tiempos considerados y representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos han sido normalizados con respecto al número de células viables de cada una de las cepas en el momento de la inoculación. Los asteriscos indican los casos en los que las diferencias entre los valores obtenidos en una determinada condición y la de rehidratación en agua son estadísticamente significativas (considerando un valor $p < 0,05$).

5. Discusión

En este capítulo se ha llevado a cabo un análisis comparativo en el que se ha incluido una cepa de laboratorio diploide y varias cepas vínicas (algunas de las cuales presentan problemas de crecimiento al inicio de la vinificación) con el propósito de determinar características que puedan ser relevantes en la adaptación de las levaduras vínicas al crecimiento en el mosto, un medio con elevadas concentraciones de glucosa.

Las levaduras vínicas han sido seleccionadas con fines biotecnológicos, particularmente para la producción de vino, de acuerdo con una serie de características que han sido revisadas en la introducción de esta Tesis. Una de ellas es la capacidad de conducir una fermentación vigorosa con una fase de latencia corta (Degree, 1993; Schuller y col., 2005). Debido a las elevadas concentraciones de azúcares presentes en el mosto (alrededor de 200 g/L de una mezcla equimolar de glucosa y fructosa), las células de levadura se ven afectadas en el momento de la inoculación en dicho medio por este tipo de estrés osmótico (Attfield, 1997) y la capacidad de las levaduras para detectar y responder a esta condición adversa puede ser relevante para el comportamiento durante la fermentación, principalmente en las primeras horas. Nuestros datos indican que la cepa vínica ICV16, que es utilizada en nuestro laboratorio como una buena cepa fermentativa (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a,b), muestra una mayor viabilidad en medios con elevadas concentraciones de glucosa que la cepa de laboratorio W303 diploide. Los mayores niveles de expresión de los genes implicados en glicolisis, fermentación y procesos biosintéticos (incluyendo replicación de DNA) en la cepa vínica en el estudio transcriptómico global en 20% de glucosa que se presenta en este trabajo pueden explicar el mejor comportamiento fermentativo que presenta la cepa ICV16 en medios con elevadas concentraciones de azúcar.

Con la finalidad de descubrir otras claves que pudieran explicar cuáles pueden ser las razones de la adaptación de las

levaduras vínicas al estrés osmótico inicial de la vinificación, se introdujo en este estudio diversas cepas vínicas, algunas de ellas (A1 y A2) con problemas de crecimiento al comienzo del proceso (Antonio Palacios, comunicación personal). Tanto la cepa A1 como la A2 muestran un menor incremento en el número de células viables durante las primeras horas de incubación en medios con elevadas concentraciones de azúcar en comparación con las otras cepas vínicas comerciales consideradas (Figura C3.3), lo que podría explicar los problemas fermentativos detectados. Desde el punto de vista de la expresión génica, ambas cepas presentan menores niveles de mRNA en elevadas concentraciones de glucosa de los genes *GPD1* y *GPD2*, que codifican los enzimas con actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ necesarios para la producción de glicerol. Si bien las proteínas codificadas por estos dos genes homólogos desempeñan funciones diferentes en la adaptación al estrés osmótico y en la regulación redox (Ansell y col., 1997), dado que el glicerol es el osmolito compatible que las células de levadura utilizan para contrarrestar el estrés osmótico (Blomberg y Adler, 1992) estos resultados podrían explicar la menor viabilidad de estas cepas en altas concentraciones de azúcares. De hecho nuestros datos muestran la presencia de menores niveles de glicerol en la cepa A1 y, sobre todo en la A2, en las condiciones estudiadas (comparados con los de las otras cepas). No se puede descartar que otros factores puedan influir en los problemas de crecimiento de estas cepas al inicio de la vinificación.

En este trabajo también se ha estudiado la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en el transporte del glicerol, pero sólo *GUP1* presenta una tendencia diferente en las cepas A1 y A2 con respecto a las otras cepas seleccionadas para este estudio; teniendo en cuenta la posible implicación de la proteína codificada por este gen en la captación de glicerol (Holst y col., 2000), este dato podría indicar una mejor capacidad de estas dos cepas para el transporte de glicerol desde el medio extracelular al interior de la célula. El significado de los resultados

encontrados para éste y otros genes es difícil de explicar porque la expresión del gen *STL1* está reprimida por glucosa (Ferreira y Lucas, 1997; Lages y Lucas, 1997), *Fps1p* es inactiva en condiciones de estrés osmótico (Luyten y col., 1995) y *GUP1* y su homólogo *GUP2* están reprimidos por glucosa a nivel transcripcional durante el crecimiento fermentativo (Pavlik y col., 1993; Rønnow y Kielland-Brandt, 1993).

Los resultados encontrados en este capítulo sugieren una aproximación experimental para resolver los problemas de crecimiento inicial de las cepas A1 y A2 en medios con elevadas concentraciones de glucosa. Se trata de pre-adaptar estas cepas durante la etapa de rehidratación de la levadura seca activa en medios con concentraciones de glucosa intermedias, siguiendo una estrategia similar a la que se utilizó con éxito para la pre-adaptación de las levaduras a vinificaciones llevadas a cabo a bajas temperaturas (Llauradó y col., 2005). Nuestros resultados indican que es posible mejorar la vitalidad, y con ello la capacidad fermentativa, de estas dos cepas siguiendo esta aproximación, encontrando los mejores resultados para la rehidratación con 2% de glucosa en el caso de A2 y con 5% en el de A1. El mejor medio para la pre-adaptación puede ser diferente dependiendo de la cepa considerada. De hecho, Novo y col. (2007) describen mejoras en la vitalidad en 10% de glucosa y 10% de fructosa en comparación con la condición control (agua) para otra cepa bien adaptada al proceso de vinificación, la QA23. De acuerdo con esto, la pre-adaptación en el medio de rehidratación podría ser útil en la mejora de la capacidad fermentativa de las cepas de levadura con problemas en el comienzo de la producción del vino, pero la composición precisa en azúcares de este medio y su efecto deberían ser evaluados para cada uno de los casos.

Capítulo 4

CAPÍTULO 4

Mejora del comportamiento fermentativo de cepas vínicas en condiciones de vinificación a través de manipulaciones de los genes de respuesta a estrés *HSP26* e *YHR087W*

Como se ha comentado ampliamente en esta Tesis, las células de levadura se ven afectadas por toda una serie de condiciones de estrés, incluyendo estrés osmótico, limitación de nutrientes como el nitrógeno o producción de etanol (Attfield, 1997; Bauer y Petrorius, 2000), que comprometen su capacidad para llevar a cabo con éxito el proceso de producción del vino.

En los últimos años se han obtenido importantes conocimientos sobre los mecanismos implicados en la respuesta a estrés tanto en cepas de laboratorio como en cepas vínicas. La denominada respuesta a estrés ambiental (*ESR*, Gasch y col., 2000) implica el incremento de la expresión de aproximadamente 900 genes en diversas condiciones adversas para el crecimiento de las levaduras. Más recientemente, Marks y col. (2008) han caracterizado la respuesta a estrés fermentativo (*FSR*), definida por un grupo de 223 genes altamente inducidos en varios puntos de la fermentación vínica.

Según se ha descrito en la introducción general de este trabajo, el conocimiento de estos mecanismos de respuesta a estrés en las levaduras ha permitido diversas manipulaciones genéticas que han mejorado sus propiedades fermentativas (Remize y col., 1999; Pérez-Torrado y col., 2002b; Rossignol y col., 2003; Cambon y col., 2006; Cardona y col., 2007).

En este capítulo se describen diferentes estrategias para la manipulación de dos genes implicados en la respuesta a estrés (*HSP26* e *YHR087W*) a los que se ha hecho referencia en capítulos anteriores.

1. Selección de las cepas, genes y estrategias para los experimentos de manipulación genética

La selección de las cepas utilizadas en este capítulo se hizo en base a los conocimientos previos que teníamos en nuestro laboratorio. ICV16 e ICV27 presentan diferencias en el comportamiento fermentativo y en la expresión génica. La cepa ICV16 ha sido ampliamente utilizada a lo largo de este trabajo por su buen comportamiento fermentativo. Estudios comparativos entre ambas cepas permitieron demostrar que ICV16 es capaz de completar vinificaciones, mientras que ICV27 deja ciertos niveles de azúcares residuales (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a). Por otro lado, análisis transcriptómicos indicaron que la cepa ICV27 presenta menor expresión de algunos de los genes de respuesta a estrés, incluyendo *HSP26*, y datos proteómicos revelaron niveles menores de la proteína codificada por este gen en esta cepa (Zuzuarregui y del Olmo, 2004b; Zuzuarregui y col., 2006). Tanto la cepa ICV16 *ura3⁻* como la cepa ICV27 *ura3⁻* fueron construidas anteriormente en nuestro laboratorio por la Dr. Zuzuarregui (Tesis doctoral) siguiendo el procedimiento seguido por Güldener y col. (1996), lo que posibilita su transformación con plásmidos multicopia y centroméricos. De hecho en dicho trabajo se llevaron a cabo algunos experimentos preliminares en este sentido.

Los genes a manipular se han seleccionado por su relación con la respuesta a estrés. *HSP26* es uno de los genes que forman parte de la *FSR*. Codifica una proteína citoplasmática que participa en la respuesta a diversas formas de estrés (incluyendo choque térmico y estrés por etanol) y en el plegamiento de proteínas (Morimoto y col., 1994). En cuanto a *YHR087W*, los resultados descritos en el Capítulo 2 de este trabajo y en otros estudios (Erasmus y col., 2003; Kaeberlein y col., 2002; Gasch y col., 2000; Savchenko y col., 2005) demuestran que se induce en condiciones de estrés osmótico (incluyendo el causado por elevadas concentraciones de glucosa), así como por otras situaciones adversas para el crecimiento de las levaduras, y que

podría estar implicado en el control post-transcripcional de la expresión génica.

Las manipulaciones genéticas utilizadas en este trabajo incluyen la expresión de estos genes en plásmidos multicopia y centroméricos, así como la sustitución del promotor de al menos una de sus copias genómicas por el de los genes *SPI1* o *PGK1*. El gen *SPI1* codifica una proteína importante en la estructura y biogénesis de la pared celular (Keptein y col., 1999; Horie e Isono, 2001) y se induce en diversas condiciones de estrés (Gasch y col., 2000; Cardona y col., 2009). Los máximos niveles de expresión de este gen en condiciones de vinificación se han encontrado en fases tardías (Puig y Pérez-Ortín, 2000b), por lo que ha sido utilizado previamente en manipulaciones genéticas de utilidad biotecnológica (Cardona y col., 2007). De hecho los resultados descritos en el último de estos trabajos demuestran que el uso de este promotor permite la expresión regulada por estrés de los genes que tenga bajo su control. Por otro lado el gen *PGK1* codifica el enzima glicolítico fosfoglicerato quinasa, cuyos niveles de expresión más altos se alcanzan en la fase de crecimiento exponencial para disminuir posteriormente de forma gradual durante la fase estacionaria (Puig y Pérez-Ortín, 2000a), en correlación con los cambios en la tasa de fermentación.

2. Construcción de cepas vínicas manipuladas genéticamente

Todas las cepas obtenidas se describen en la Tabla M.4 (apartado de Materiales y Métodos) y derivan de las ICV16 e ICV27 o de sus correspondientes *ura3⁻*.

En las cepas *ura3⁻*, los genes *HSP26* e *YHR087W* se expresaron bajo el control de su propio promotor tanto en un plásmido multicopia (YEp352) como en uno centromérico (pRS316). La construcción de estos plásmidos (Yep352-*HSP26/YHR087W* y pRS316-*HSP26/YHR087W*) se ha descrito en el apartado 2.3.4 de Materiales y Métodos.

También se procedió en las cepas ICV16 e ICV27 a la sustitución del promotor de ambos genes en al menos una de sus copias genómicas por el del gen *SPI1* o por el del *PGK1*, de acuerdo con el procedimiento utilizado por Cardona y col. (2007), que se describió en la sección de Materiales y Métodos (apartado 2.2.3). Las cepas resultantes se denominaron ICV16(ICV27)-**PSPI1-HSP26/YHR087W** o ICV16(ICV27)-**PPGK1-HSP26/YHR087W**.

Las modificaciones en el genoma fueron comprobadas mediante PCR. En el caso de la sustitución de los promotores de *HSP26* e *YHR087W* por el de *SPI1* se utilizaron para ello los oligonucleótidos SPI1d e YHR087R/HSP26B (según el gen modificado), así como las combinaciones HSP26-5/HSP26-3 o YHR087-5/YHR087-3. La Figura C4.1 muestra un ejemplo de estas comprobaciones. En el panel A puede observarse como en las cepas con el promotor del gen *YHR087W* sustituido por el del gen *SPI1* en la amplificación llevada a cabo con los oligonucleótidos YHR087W-5 e YHR087W-3 se aprecia una banda de 630 pb correspondiente a la(s) copia(s) genómica(s) no modificada(s) y otra de 2500 pb aproximadamente que resulta del cambio de promotor, conteniendo aún el cassette de resistencia a kanamicina. Los paneles B y C muestran en las cepas en el estado final de manipulación (cuando se ha eliminado el gen *kanMX*) los resultados de la amplificación con los oligonucleótidos citados anteriormente o con la combinación HSP26-5 y HSP26-3 (dependiendo del gen modificado); en el caso de la sustitución del promotor de *HSP26* se detecta una banda de 960 pb correspondiente al gen no modificado y una de 1300 pb debida a la introducción de la fusión *PSPI1-HSP26*. En las cepas en las que se ha sustituido el promotor de *YHR087W* por el de *SPI1* los tamaños de las bandas correspondientes son de 630 y 1400 pb respectivamente. En el caso de la sustitución del promotor de *YHR087W* por el de *PGK1*, los resultados de algunos de los experimentos de comprobación se muestran en el panel D de la Figura C4.1. También en este caso se emplearon diferentes

combinaciones de oligonucleótidos (PGK1-D e YHR087-R así como YHR087W-5 e YHR087W-3). En la Figura puede observarse cómo la utilización de la primera pareja da lugar a una banda de 470 pb que no aparece en las cepas de partida.

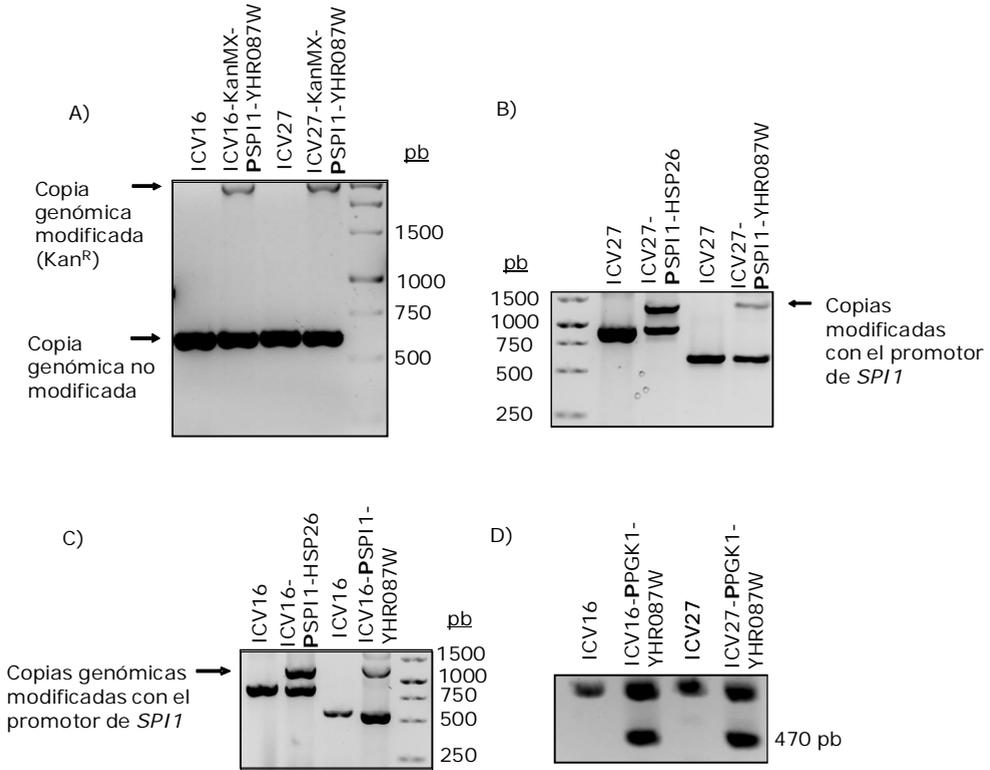


Figura C4.1. Seguimiento por PCR de la construcción de las cepas ICV16(ICV27)-**PSPI1(PPGK1)-HSP26/YHR087W**. A) Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos YHR087W-5/YHR087W-3 de DNA genómico de las cepas ICV16 e ICV27 con y sin introducción del cassette de sustitución del promotor de *YHR087W* por el de *SPI1*. B,C) Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos HSP26-5/HSP26-3 o YHR087W-5/YHR087W-3 de DNA genómico de las cepas ICV16 e ICV27 y de sus correspondientes modificadas por sustitución de promotores de *HSP26* o *YHR087W* por el del gen *SPI1*, tras la eliminación del gen de resistencia a kanamicina. D) Resultado de la amplificación con los oligonucleótidos PGK1-D e YHR087R de DNA genómico de las cepas ICV16 o ICV27 y de las correspondientes modificadas por sustitución del promotor de *YHR087W* por el de *PGK1* en al menos una copia genómica.

Resultados

El proceso completo de manipulación (que implica las etapas de inserción de los cassettes conteniendo el gen *kanMX*, transformación con el plásmido Yep351-cre-cyh, pérdida del gen *kanMX* y eliminación del plásmido de la recombinasa Cre) fue seguido por crecimiento en placas con los antibióticos adecuados, como se muestra en la Figura C4.2 para el caso de la sustitución del promotor del gen *HSP26* por el del *SPI1* en la cepa ICV16.

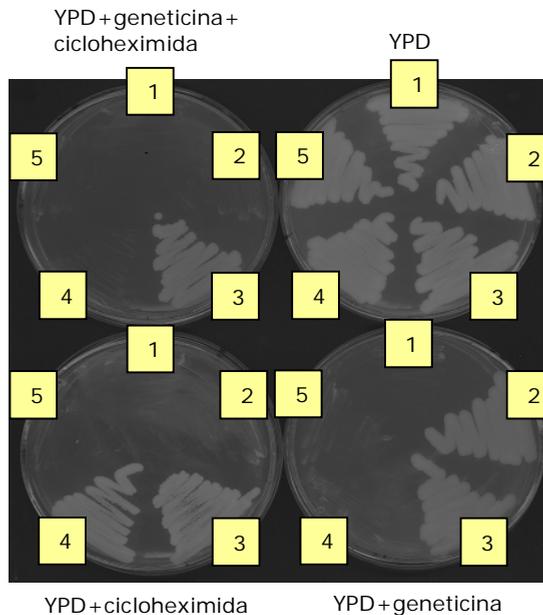


Figura C4.2. Observación mediante crecimiento en medio selectivo con antibióticos de los pasos seguidos durante la construcción de la cepa ICV16-*PSPI1-HSP26*. Los números corresponden a las siguientes cepas: 1) Cepa silvestre ICV16, 2) ICV16 con el cassette *PSPI1-HSP26* que contiene el gen de resistencia a kanamicina integrado en el genoma. 3) Cepa 2 transformada con el plásmido que contiene el gen de la recombinasa Cre y confiere resistencia a cicloheximida. 4) Cepa ICV16/*PSPI1-HSP26* que ha perdido ya la resistencia a kanamicina pero aún contiene el plásmido cre-cyh. 5) Cepa modificada final ICV16/*PSPI1-HSP26* sin el plásmido de la recombinasa.

3. Efecto de la introducción de *HSP26* o *YHR087W* en un plásmido multicopia bajo el control de su propio promotor

Una vez construidas las cepas el primer paso fue determinar que efecto tenía esta manipulación en los niveles de mRNA de estos genes en determinadas condiciones de estrés. Para ello se crecieron en medio YPD durante 16 horas y a continuación se diluyeron en medio fresco a una OD₆₀₀ de 0,1 y se dejaron crecer hasta una OD₆₀₀ de 0,5-0,6, tras lo cual se incubaron en el mismo medio conteniendo 10% (v/v) de etanol o 25% (p/v) de glucosa durante 2 horas. A continuación se aisló el RNA y se analizó mediante *Northern* en el caso de *HSP26*; debido a los bajos niveles de expresión del gen *YHR087W* la detección y cuantificación de este gen se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real. En la Figura C4.3. se presentan los resultados obtenidos de este análisis.

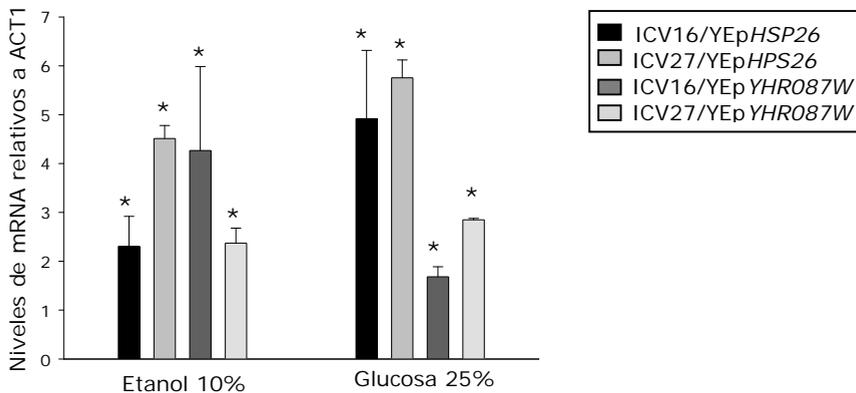


Figura C4.3. Niveles de expresión de los genes *HSP26* e *YHR087W* en las cepas ICV16 e ICV27 transformadas con los plásmidos YEp352-*HSP26*/*YHR087W* tras dos horas de incubación en medio YP conteniendo 10% de etanol o 25% de glucosa. Los datos fueron normalizados con los del gen *ACT1* y los valores son relativos a los encontrados en las cepas originales conteniendo el vector YEp352. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.* indica que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0,05$.

En todos los casos las modificaciones resultaron en una mayor expresión de estos genes. En experimentos llevados a cabo en 25% de glucosa se encontró en ambas cepas una importante

Resultados

sobreexpresión del gen *HSP26* (5-6 veces). En el caso del estrés por etanol, se detectó un cambio de 4-5 veces con respecto a las cepas conteniendo el vector vacío en el caso de *HSP26* en la cepa ICV27 y de *YHR087W* en la ICV16.

Considerando la implicación de estos genes en la respuesta a estrés, se determinó la viabilidad de estas cepas en las condiciones usadas en el análisis del mRNA. Los datos se muestran en la Figura C4.4.

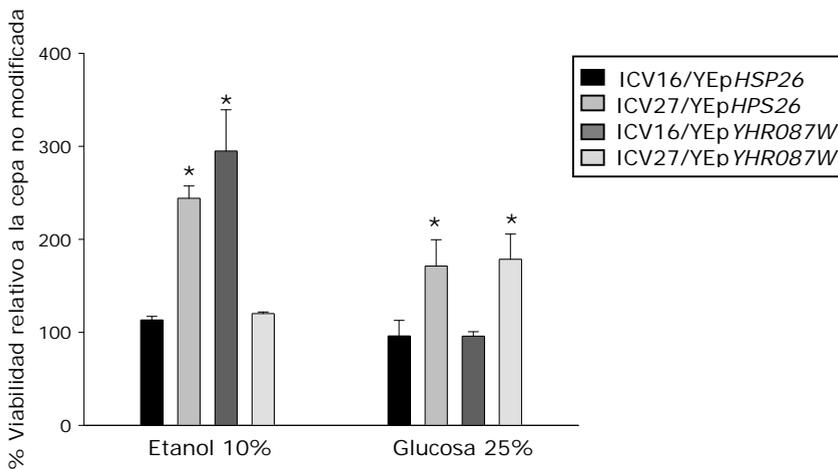


Figura C4.4. Resistencia a etanol y a elevadas concentraciones de glucosa en las cepas ICV16 e ICV27 transformadas con los plásmidos YE_p352-*HSP26*/*YHR087W* tras dos horas de incubación en medio YP conteniendo 10% de etanol o 25% de glucosa. Los datos se relativizaron con respecto a los encontrados en las cepas originales conteniendo el vector YE_p352 en las mismas condiciones consideradas. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0,05$.

Los resultados indican que en la cepa ICV16 la sobreexpresión del gen *YHR087W* mejora la resistencia a etanol, mientras que la de *HSP26* no afecta la viabilidad. En el caso de ICV27 la viabilidad es mayor con las dos modificaciones realizadas y en las dos condiciones testadas, aunque en menor medida y sin significación estadística cuando células sobreexpresando *YHR087W* se someten a estrés por etanol. Todos estos datos demuestran que estas manipulaciones mejoran la resistencia a estrés, principalmente en ICV27, la cepa que muestra deficiencias en el

proceso de vinificación y menor resistencia a ciertas condiciones de estrés (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a).

Para determinar si las manipulaciones genéticas testadas podían proporcionar ventajas en el comportamiento de estas cepas en condiciones similares a las que tienen lugar durante la fermentación vínica, se llevaron a cabo experimentos de microvinificación utilizando inicialmente un mosto *Macabeo*. Como el crecimiento se realizó sin utilizar condiciones selectivas para el mantenimiento de los plásmidos, se determinó en primer lugar la pérdida de los mismos. Los resultados obtenidos a los 27 días del comienzo de la vinificación se muestran en la Tabla C4.1, e indica que la cepa ICV27 no es capaz de mantener suficientemente el plásmido, ni siquiera el vector.

Tabla C4.1. Pérdida de plásmidos durante vinificaciones llevadas a cabo en mosto Macabeo con cepas ICV16 e ICV27 conteniendo los plásmidos derivados de YEp352 para la sobreexpresión de los genes *HSP26* e *YHR087W* bajo el control de su propio promotor. Se muestra el valor medio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Cepa	Porcentaje de pérdida de plásmido
ICV16/Yep352	24,4 ± 3,7
ICV16/YEpHSP26	23,7 ± 6,6
ICV16/YEpYHR087W	22,7 ± 3,0
ICV27/Yep352	67,1 ± 9,8
ICV27/YEpHSP26	77,2 ± 12,0
ICV27/YEpYHR087W	83,8 ± 12,0

De acuerdo con estos resultados, sólo se procedió a completar el estudio fermentativo con la cepa ICV16 y sus derivadas. Las vinificaciones se llevaron a cabo en dos mostos diferentes (*Macabeo* y *Sauvignon blanc*) a 22°C y con diferentes concentraciones de azúcares (en algunos experimentos los mostos

Resultados

fueron suplementados con 50 mg/L de glucosa). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura C4.5.

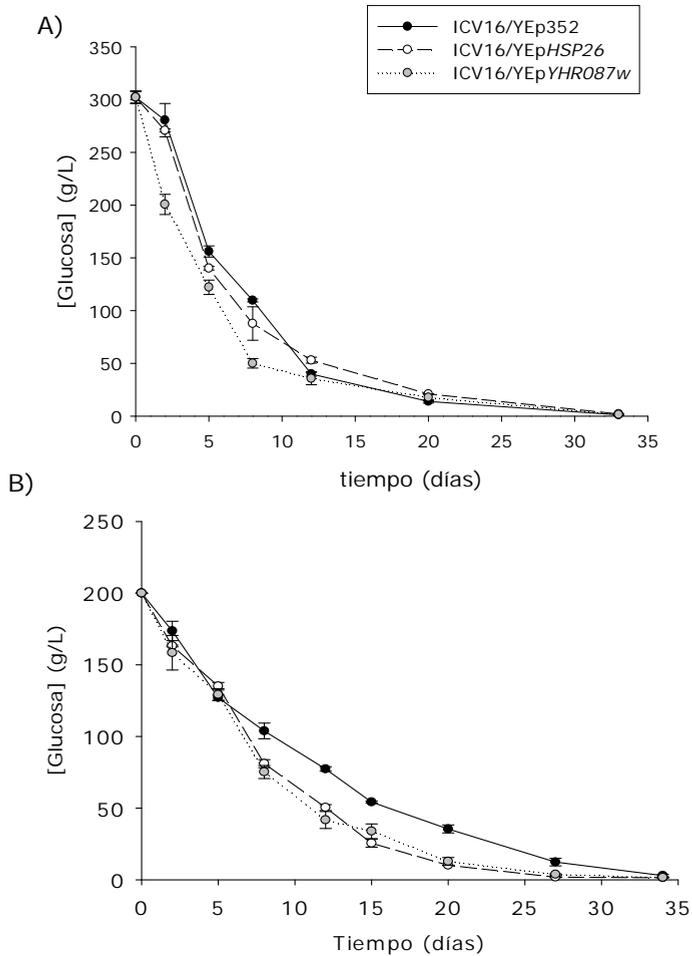


Figura C4.5. Consumo de glucosa en experimentos de vinificación con las cepas derivadas de la ICV16 que contienen el vector YEp352 o los plámidos para la sobreexpresión de los genes *HSP26* e *YHR087W*. Panel A: micro-vinificación llevada a cabo a 22°C en mosto *Sauvignon blanc* suplementado con 50 g/L de glucosa. Panel B: experimento realizado con mosto *Macabeo* a 22°C. Se muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indican que el consumo de glucosa en las vinificaciones llevadas a cabo a 22°C con mosto *Sauvignon blanc* suplementado con glucosa hasta 300 g/L fue mayor durante

la primera parte del proceso en la cepa con sobreexpresión del gen *YHR087W* (panel A). Las diferencias observadas con respecto a la cepa conteniendo el vector vacío son estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) a los tiempos de 2, 5 y 8 días. Por otro lado, en fermentaciones llevadas a cabo en mosto Macabeo a 22°C sin adición de azúcar, las dos cepas modificadas mostraron una reducción del tiempo requerido para completar la vinificación (panel B), siendo las diferencias con la cepa de referencia estadísticamente significativas entre los 8 y 27 días.

4. Efecto de la introducción de los genes *HSP26* o *YHR087W* en un plásmido centromérico bajo el control de su propio promotor

Dada la pérdida del plásmido multicopia en la cepa ICV27 y con la intención de mejorar la estabilidad de las modificaciones genéticas en esta cepa, se introdujeron los genes *HSP26* e *YHR087W* en el plásmido centromérico pRS316, que también contiene el marcador *URA3*. El análisis *Northern* y la RT-PCR cuantitativa a partir de mRNAs obtenidos tras someter las cepas modificadas a 2 h de estrés provocado por 10% de etanol o 25% de glucosa revelaron cambios menores a los observados en las cepas con plásmidos episomales; a pesar de esto, la resistencia de las dos cepas al estrés osmótico causado por 25% de glucosa se vió incrementada (Figura C4.6).

Se llevaron a cabo experimentos de microvinificación para determinar si la mejora en la resistencia a estrés encontrada en estas cepas podría resultar en una ventaja en el comportamiento fermentativo. En las condiciones de vinificación utilizadas la pérdida plasmídica en este caso no fue mayor al 25%, lo que indica que este plásmido se mantiene mejor en esta cepa en condiciones no selectivas que el multicopia.

Resultados

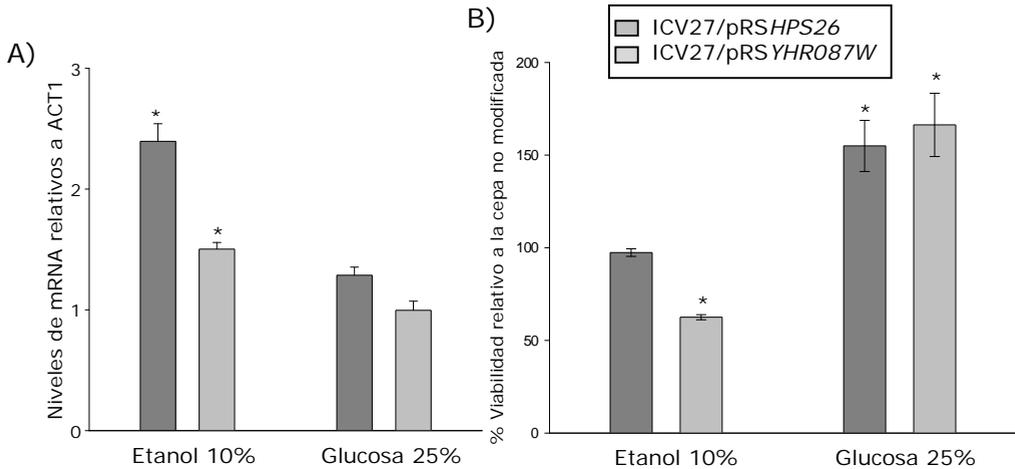


Figura C4.6. Efecto de la transformación de la cepa ICV27 con los plásmidos pRS316-*HSP26/YHR087W* la expresión génica y la viabilidad tras dos horas de incubación en medio YP conteniendo 10% de etanol o 25% de glucosa. Panel A: Niveles de expresión de los genes *HSP26* e *YHR087W* normalizados con respecto a los del gen *ACT1*. Panel B: porcentaje de células viables de estas cepas relativos a los encontrados en la cepa que contenía el plásmido pRS316 en las mismas condiciones. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0,05$.

El comportamiento fermentativo se analizó en mosto *Macabeo* y en las mismas condiciones que en el caso de la cepa ICV16 con los plásmidos episomales. El resultado de estos experimentos se muestra en la Figura C4.7. De acuerdo con los datos del panel A, la sobreexpresión del gen *YHR087W* mediante el plásmido centromérico permite que la cepa modificada pueda completar el proceso de vinificación a 22°C y sin glucosa añadida a los 37 días. Las otras dos cepas no son capaces de agotar completamente la glucosa en dicho tiempo dejando aproximadamente 20 g/L de azúcar residual. En el caso de la adición de azúcar (panel B) también se detecta en la cepa que sobreexpresa *YHR087W* un aumento en la velocidad de consumo de azúcares, sobre todo en este caso en la segunda mitad de la vinificación. Ninguna de las cepas analizadas fue, sin embargo, capaz de finalizar el proceso a los 37 días.

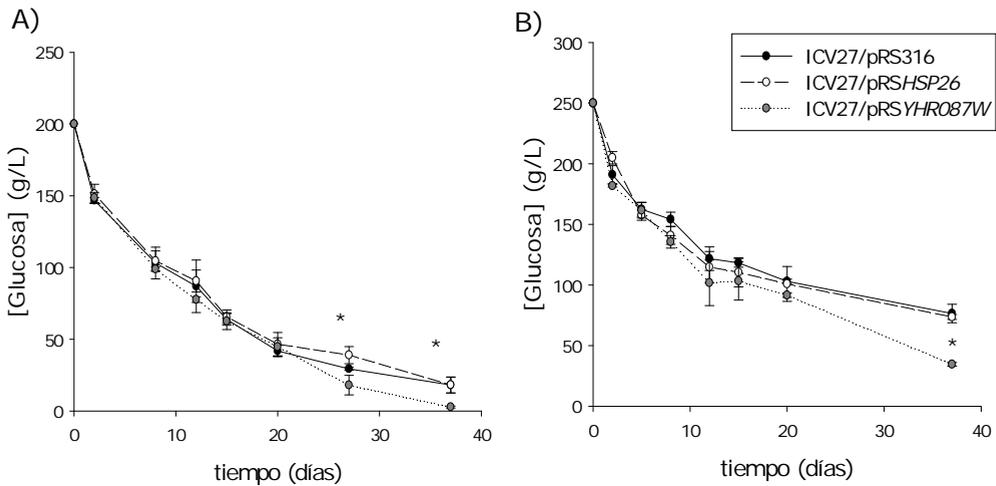


Figura C4.7. Consumo de glucosa en experimentos de vinificación llevados a cabo con las cepas derivadas de ICV27 que contienen el vector pRS316 o los plásmidos pRS316-*HSP26*/*YHR087W*. En el panel A se muestran los datos en microvinificaciones llevadas a cabo a 22°C en mosto *Macabeo*. En el panel B aparecen los resultados de experimentos realizados a la misma temperatura y en el mismo mosto *Macabeo* pero suplementado con 50 g/L de glucosa a 22°C. Se muestra la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

5. Efecto de la sustitución del promotor de los genes *HSP26* o *YHR087W* por el del gen *SPI1* en alguna de sus copias genómicas

Otra de las estrategias seguidas para modificar la expresión de los genes *HSP26* e *YHR087W* consistió en la sustitución del promotor de cada uno de estos genes en alguna de sus copias genómicas por el del gen *SPI1* que, como ya hemos comentado, codifica una proteína de pared celular de función desconocida y presenta niveles elevados de expresión en fases avanzadas de la vinificación. En las Figuras C4.8 y C4.9 se muestran los resultados obtenidos sobre expresión génica y viabilidad en las cepas modificadas mediante esta estrategia bajo las condiciones de estrés que se vienen considerando a lo largo de este capítulo.

Resultados

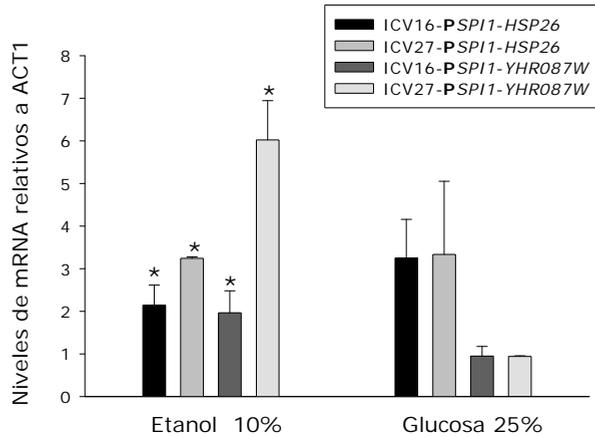


Figura C4.8. Efecto en las cepas ICV16 e ICV27 de la sustitución del promotor de los genes *HSP26* o *YHR087W* en alguna de sus copias genómicas por el de *SP11* sobre la expresión génica tras dos horas de incubación en medio conteniendo 10% de etanol o 25% de glucosa. Se muestran los niveles de expresión de los genes *HSP26* e *YHR087W* normalizados con respecto a los resultados del gen *ACT1*. Se indica la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0,05$.

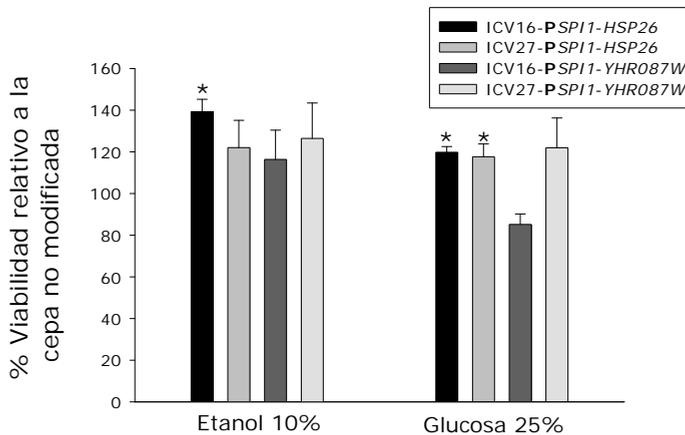


Figura C4.8. Efecto en las cepas ICV16 e ICV27 de la sustitución del promotor de los genes *HSP26* o *YHR087W* en alguna de sus copias genómicas por el de *SP11* sobre la viabilidad tras dos horas de incubación en medio conteniendo 10% de etanol o 25% de glucosa. Se muestran los porcentajes de células viables de estas cepas relativos a los encontrados en las originales sin modificar. Se indica la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0,05$.

Como se observa en ambas figuras la manipulación del gen *HSP26* determinó un incremento de su expresión en las dos cepas en aproximadamente 2 a 3 veces en condiciones de estrés por etanol y osmótico (Figura C4.8). Este efecto resultó en un incremento moderado (alrededor de 120%) en la viabilidad (Figura C4.9). En el caso del gen *YHR087W* esta estrategia de manipulación sólo tuvo efectos positivos en la expresión del gen en estrés por etanol (especialmente en la cepa ICV27), conduciendo a una ligera mejora en la viabilidad en estas condiciones.

Con respecto al comportamiento fermentativo (Figura C4.10), la sustitución en la cepa ICV16 del promotor de *YHR087W* en alguna de sus copias genómicas por el de *SPI1* condujo a un mayor consumo de glucosa durante los 8 primeros días en vinificaciones llevadas a cabo con mosto *Macabeo* a 22°C. Para la cepa ICV27 no se produjo mejora con ninguna de las modificaciones realizadas (datos no mostrados).

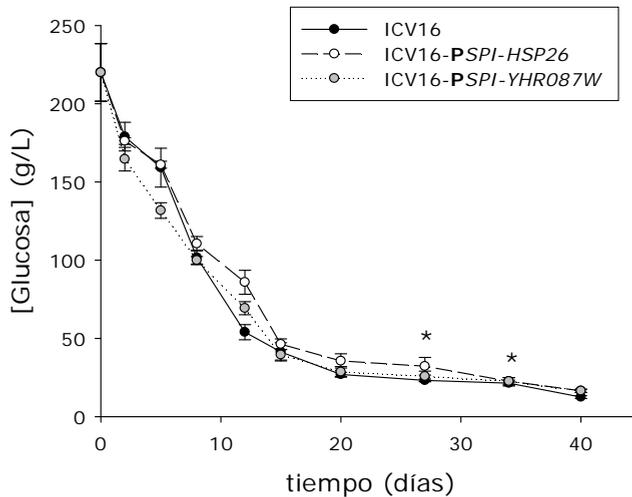


Figura C4.10. Consumo de glucosa en experimentos de vinificación llevados a cabo en mosto *Macabeo* a 22°C con una cepa derivada de la ICV16 en la que se ha sustituido el promotor de los genes *HSP26* e *YHR087W* en alguna de sus copias genómicas por el del gen *SPI1* así como con la cepa de referencia. Se muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes.

6. Efecto de la sustitución del promotor del gen *YHR087W* por el del *PGK1* en alguna de sus copias genómicas

Dado que el promotor del gen de *PGK1* ha sido usado por diversos autores para la sobreexpresión génica en levaduras (véase Cheng y col., 2006) y que los experimentos descritos en los apartados anteriores han indicado que la manipulación de *HSP26* y, especialmente, de *YHR087W* permite mejorar el comportamiento fermentativo, se procedió a la sustitución del promotor de alguna de las copias genómicas del gen *YHR087W* por el del gen *PGK1*. En las condiciones de estrés analizadas (Figura C4.11) la expresión de este gen se incrementó de 10 a 40 veces en el caso de la cepa ICV16 y de 3 a 7 en la ICV27. También se observó un aumento en la resistencia a estrés por etanol en ambas cepas (particularmente en la ICV16) con esta manipulación.

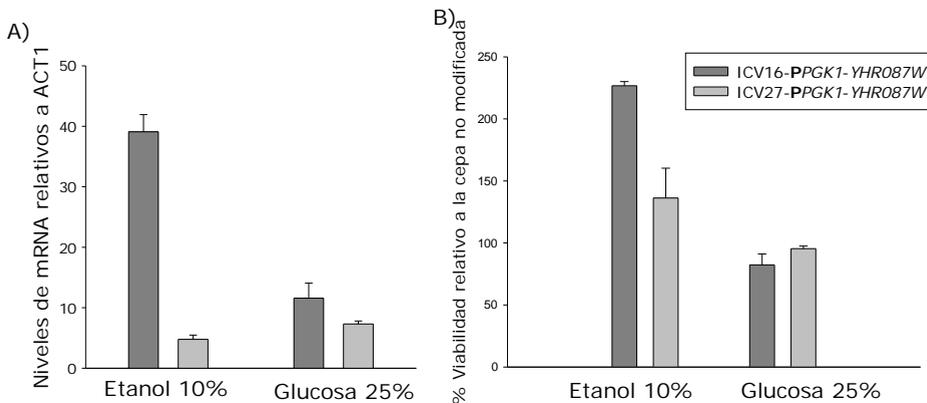


Figura C4.11. Efecto en las cepas ICV16 e ICV27 de la sustitución del promotor del gen *YHR087W* en alguna de sus copias genómicas por el del *PGK1* sobre la expresión génica y la viabilidad tras dos horas de incubación en medio conteniendo 10% de etanol o 25% de glucosa. Se muestran los niveles de expresión de los genes *HSP26* e *YHR087W* normalizados con respecto a los resultados del gen *ACT1* (panel A) y el porcentaje células viables de estas cepas relativos a los encontrados en las cepas originales sin modificar (panel B). Se indica la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. * indica que las diferencias son estadísticamente significativas con un valor $p \leq 0,05$.

A pesar del incremento en los niveles de expresión en ambas cepas, no hubo ninguna mejora en el comportamiento en condiciones de vinificación de estas cepas (datos no mostrados).

7. Discusión

A lo largo de todas las etapas de la producción del vino, desde el crecimiento en melazas para obtener la biomasa hasta el final de la fermentación alcohólica o el envejecimiento biológico, las células están secuencialmente afectadas por diferentes situaciones de estrés, como el estrés osmótico, el estrés oxidativo, pHs ácidos, el agotamiento de nutrientes o el estrés por etanol. Varios trabajos publicados en los últimos años indican que las células responden a estas condiciones adversas a través de cambios en la expresión de diversos genes durante todo el proceso (Rossignol y col., 2003; Mendes-Ferreira y col., 2007a; Marks y col., 2008). Además, ciertas correlaciones observadas entre la respuesta a estrés, la expresión génica y el comportamiento fermentativo sugieren que la viabilidad de las levaduras frente a situaciones adversas para su crecimiento constituye un criterio útil para la selección de cepas vínicas (Zuzuarregui y del Olmo 2004a,b; Zuzuarregui y col., 2006).

A partir de todas estas evidencias, durante los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo al desarrollo de algunas estrategias de manipulación genética en levaduras vínicas para mejorar la resistencia a las condiciones adversas que tienen lugar durante la producción del vino. Estas estrategias han permitido incrementar la tasa de fermentación en fase estacionaria (Remize y col., 1999) o durante los primeros días de la vinificación (Cardona y col., 2007), o mejorar la viabilidad en condiciones de privación de glucosa (Pérez-Torrado y col., 2002).

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han indicado que la expresión del factor de transcripción Msn2p, implicado en la respuesta a estrés, puede ser modulada para permitir una mejora tanto de la resistencia a condiciones adversas para el crecimiento como del comportamiento fermentativo (Cardona y col., 2007). De acuerdo con estos resultados, en este trabajo se procedió a considerar los efectos de otras manipulaciones genéticas relacionadas con la respuesta a estrés

que tuvieran un impacto mínimo en el transcriptoma global de la levadura. Con este fin, se seleccionaron dos genes particulares (*HSP26* e *YHR087W*) y se combinaron diferentes estrategias: sobreexpresión en plásmidos episomales o centroméricos bajo el control de sus propios promotores y sustitución del promotor de estos genes en alguna de sus copias genómicas por el de genes como *SPI1* o *PGK1*. Estas modificaciones se llevaron a cabo en dos cepas vínicas (ICV16 e ICV27) que presentaban diferencias en su comportamiento fermentativo, siendo la segunda una fermentadora "lenta" (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a). Esta cepa (ICV27) fue más difícil de manipular genéticamente y no pudimos mantener en sus células de forma estable plásmidos episomales (ni siquiera el vector) en ausencia de sistemas de selección (como es el caso del crecimiento en mostos), probablemente por alguna una razón genética que desconocemos. Sin embargo, sí fue posible introducir y mantener estables plásmidos centroméricos o modificaciones dirigidas al genoma.

Los resultados obtenidos indican que las manipulaciones realizadas, en general, resultan en un incremento de la expresión de los genes considerados, aunque estos incrementos también se pudieron observar en condiciones de crecimiento control, es decir, fase exponencial de crecimiento, especialmente cuando se utilizaron los plásmidos episomales (datos no mostrados). Además, las cepas modificadas en algunos casos fueron capaces de resistir mejor las condiciones adversas relevantes para la producción del vino consideradas en este trabajo: estrés osmótico causado por elevadas concentraciones de azúcar y estrés por etanol. Finalmente, algunas de estas cepas han mostrado mejoras en su comportamiento fermentativo, aunque los resultados dependen de la clase de mosto utilizado en los experimentos, la temperatura y la concentración de azúcares inicial. A lo largo de este capítulo se han presentado algunos casos en los que fue posible encontrar diferencias en la evolución del consumo de azúcares durante las vinificaciones desarrolladas, pero en otros casos no mostrados no

se pudo detectar ningún efecto de la manipulación, por ejemplo, cuando las vinificaciones se llevaron a cabo a 16°C o a 30°C.

Probablemente los resultados más interesantes se obtuvieron con la expresión del gen *YHR087W* bajo el control de su propio promotor en un plásmido episomal en la cepa ICV16, en un plásmido centromérico en la cepa ICV27 (que resulta en una reducción del tiempo del proceso de fermentación) y cuando el promotor se cambia por el de *SPI1* en la cepa ICV16 en al menos una de sus copias genómicas. Se debe mencionar que la mejora en el comportamiento fermentativo no fue sólo observada en estas dos cepas. En vinificaciones llevadas a cabo en paralelo con otra cepa vínica comercial, la T73 (Querol y col., 1992) a 22°C con mosto *Sauvignon blanc* suplementado con 50 g/L de glucosa, la sobreexpresión del gen *YHR087W* en un plásmido multicopia también mejoraba el consumo de glucosa durante la primera mitad de la vinificación (datos no mostrados). Todos estos resultados apuntan hacia un papel importante del gen *YHR087W* en la vinificación; además, como ya comentamos en el capítulo 2, este gen está inducido en elevadas concentraciones de glucosa (Kaeberlein y col., 2002; Erasmus y col., 2003 y nuestros propios resultados), en otras condiciones de estrés (Gasch y col., 2000) y una cepa mutante en este gen presenta defectos en el crecimiento en medio YP conteniendo 25% de glucosa (apartado 3.2, capítulo 2). Todo este conjunto de resultados señala este gen como muy interesante desde el punto de vista biotecnológico, aunque todavía desconocemos la función concreta que desempeña en las células de levadura.

Según datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Zuzuarregui y col., 2004b, 2006), la expresión del gen *HSP26* y los niveles de la proteína que codifica son menores en la cepa ICV27 que en la ICV16; lamentablemente, ninguna de las estrategias seguidas en este estudio para aumentar la expresión de este gen ha permitido mejorar la capacidad fermentativa de esta cepa. Esto sugiere que otras razones deben marcar las

diferencias entre las cepas ICV16 e ICV27 en condiciones de vinificación.

Estos resultados demuestran que la regulación de los genes de respuesta a estrés en una cepa vínica pueden influir en su comportamiento fermentativo, aunque es difícil predecir el efecto concreto de cada una de las manipulaciones, por lo que cada caso particular debería ser analizado. El hecho de que en algunos casos (por ejemplo cuando *YHR087W* se expresa bajo el control de su propio promotor en un plásmido centromérico) la manipulación no resulte en un incremento significativo en los niveles de mRNA en determinadas condiciones de estrés pero sí en una mejora de la resistencia a estrés y del comportamiento fermentativo, puede explicarse por la cinética de la inducción transcripcional del gen. De hecho, la expresión de *YHR087W* en condiciones de estrés térmico o estrés osmótico es muy rápida y los niveles de mRNA se reducen aproximadamente en 2-6 veces entre 30 minutos y 2 horas tras la aplicación del estrés (Gasch y col., 2000; Kaeberlein y col., 2002), siendo este el tiempo considerado en nuestros experimentos. La mejora observada en el contexto de la fermentación alcohólica en este caso puede explicarse por el gran abanico de condiciones de estrés que se dan durante el proceso de forma simultánea o progresiva.

Otra situación interesante destacar en este sentido es que la sustitución del promotor del gen *YHR087W* por el del *SPI1* en una de sus copias genómicas no conduce a un incremento en los niveles de mRNA de este gen en condiciones de elevadas concentraciones de glucosa en ninguna de las cepas, lo que sugiere una pérdida de la regulación de la expresión normal del gen. En otros casos, como en el de la sobreexpresión de *HSP26* en un plásmido episomal en la cepa ICV16 o en un plásmido centromérico en la ICV27, se observa un incremento en los niveles de mRNA que no se refleja en una mejora de la viabilidad en las mismas condiciones de estrés; este resultado sugiere que la manipulación de un gen concreto puede no ser suficiente para conseguir un efecto positivo en este sentido. Por otro lado, cuando

consideramos el promotor *PGK1*, la expresión de *YHR087W* sí se ve incrementada, pero no se consigue una mejora de la capacidad fermentativa, probablemente por la falta de un control temporal exacto de la expresión durante la vinificación. Por este motivo, la sustitución del promotor de un gen de interés por uno como el *PGK1* (fuerte pero con una expresión baja en etapas avanzadas de la vinificación) no sería apropiado para regular los niveles de mRNA de genes de estrés con el propósito de mejorar la vinificación.

Los resultados de este capítulo, por tanto, permiten presentar varias cepas manipuladas que podrían servir para obtener en un futuro cepas derivadas *GRAS* (genéticamente modificadas pero seguras), lo cual sería interesante para su uso biotecnológico, siempre que los cambios introducidos no determinaran ningún efecto en las propiedades organolépticas del producto final.

Discusión general

A lo largo de este trabajo hemos tratado de aportar nuevos datos sobre la respuesta de la levadura *S. cerevisiae* a varios de los tipos de estrés con los que se encuentra durante el proceso de fermentación alcohólica. Concretamente, se ha considerado el estrés osmótico debido a las elevadas concentraciones de azúcares en el mosto al inicio del proceso y la limitación de nitrógeno durante la segunda mitad de la vinificación.

Para poder llevar a cabo todos estos experimentos hemos recurrido tanto a cepas de laboratorio (de genética bien conocida pero difícilmente utilizables en bodega) como a cepas vnicas comerciales (las responsables en definitiva de llevar a cabo el proceso industrial). Entre las cepas de laboratorio se debe destacar la W303 y entre las vnicas la ICV27 y, sobre todo, la ICV16, una cepa con un buen comportamiento fermentativo que viene siendo caracterizada y utilizada en nuestro laboratorio durante los últimos años (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a,b; Zuzuarregui y del Olmo, 2006). Desde el punto de vista metodológico, a lo largo de todo el trabajo se ha utilizado ampliamente aproximaciones transcriptómicas globales, puesto que proporcionan una serie de datos iniciales sobre diferencias de expresión génica entre cepas o condiciones que ayudan a entender las respuestas moleculares y dirigen los estudios hacia genes de interés. Estas aproximaciones vienen siendo muy utilizadas durante los últimos años en el campo de la vinificación y de las levaduras vnicas y han proporcionado conocimientos interesantes sobre los cambios moleculares que tienen lugar durante este proceso. Se pueden destacar en este sentido los estudios llevados a cabo por Rossignol y col. (2003), que podría considerarse el pionero, Zuzuarregui y del Olmo (2006), Rossignol y col. (2006), Beltrán y col. (2006) o Mendes-Ferreira y col. (2007). Junto con este tipo de estudios también se ha recurrido a análisis particulares de expresión génica utilizando determinados mutantes así como a un análisis proteómico global.

Uno de los aspectos considerados en esta Tesis ha sido el de la respuesta de las levaduras a la disponibilidad de nitrógeno en el mosto. Las paradas fermentativas durante el proceso de

fermentación alcohólica se deben principalmente al agotamiento de nitrógeno en el medio, lo que conlleva que el proceso no pueda terminar en el tiempo adecuado (con el consiguiente aumento de costes debido al mayor tiempo de utilización de las cubas de fermentación) y que pueda producirse contaminación de los mostos (lo que ocasiona pérdidas de los mismos y del producto final). Para evitar estas situaciones, una práctica habitual es la adición de nitrógeno a los mostos, siendo el momento más idóneo la fase exponencial de crecimiento (Beltrán y col., 2005). En nuestro trabajo se muestra que el efecto de la adición en el comportamiento fermentativo es relativamente independiente de la naturaleza de la fuente nitrogenada añadida (amonio, aminoácidos o una mezcla de ambos), si bien la suplementación con aminoácidos en fases tempranas podría ser beneficiosa desde el punto de vista de las propiedades organolépticas del vino por resultar en una disminución de los niveles de acetato de etilo. De acuerdo con estos datos y otros descritos de forma previa o simultánea a este trabajo (Hernández-Orte y col., 2002; Beltrán y col., 2005; Molina y col., 2007; Saerens y col., 2008; Mendes-Ferreira y col., 2009), la naturaleza de las fuentes nitrogenadas presentes en el mosto puede ser determinante en el perfil aromático del vino, junto con la temperatura y la cepa vínica responsable de conducir el proceso.

La naturaleza de las fuentes nitrogenadas añadidas en fermentaciones limitantes en nitrógeno también introduce cambios en los patrones de expresión génica, que son consistentes (en los casos en los que pueden establecerse comparaciones) con los descritos por otros autores (Backhus y col., 2001; Marks y col., 2003; Rossignol y col., 2003; Varela y col., 2005; Scheners y col., 2006; Mendes-Ferreira y col., 2007a), por lo que los principales cambios relacionados con la adaptación de la levadura en condiciones de vinificación frente a la limitación y adición de nitrógeno son independientes de la cepa o las condiciones experimentales. Además, nuestros estudios transcriptómicos globales permiten describir la existencia de una reprogramación

diferente de la célula en función de la naturaleza de la fuente nitrogenada añadida: mientras que tras la adición de amonio se activan en mayor grado los procesos relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, tras la de aminoácidos se ven más inducidos los implicados en la biosíntesis de proteínas, el ensamblaje de ribosomas y el transporte de aminoácidos.

Una de las conclusiones más interesantes de este estudio es la identificación de posibles marcadores de deficiencias de nitrógeno en condiciones de vinificación. En primer lugar cabe proponer la actividad arginasa, que con anterioridad ya había sido considerada en nuestro laboratorio (Carrasco y col., 2003), si bien, de acuerdo con los resultados obtenidos por Beltrán y col. (2004) su utilidad puede depender de las condiciones concretas de vinificación. En segundo lugar, existen varios genes que se derivan de este trabajo y cuyo nivel de expresión podría servir como indicador de limitación o ausencia de nitrógeno, puesto que sus perfiles de expresión muestran un incremento cuando se agota el nitrógeno y una disminución tras la adición de fuentes nitrogenadas. Un gen interesante en este sentido es el *ACA1*, cuya inducción ya había sido observada por Gasch y col. (2000) en condiciones de laboratorio de limitación de nitrógeno, y que no presenta cambios importantes de expresión por entrada en fase estacionaria, a diferencia de lo que ocurre en el caso de genes como *CAR1*, *HSP26* o *SPI1* (Zuzuarregui y del Olmo, 2004b y este trabajo). En colaboración con los grupos de la Dra. Mendes-Faia y el Dr. Pérez-Ortín se ha podido confirmar, además, un amplio grupo de genes marcadores de la disponibilidad de nitrógeno a lo largo de la vinificación (Mendes-Ferreira y col., 2007b), entre los que se encuentran *MSC1*, *XYL2*, *RTN2* y *ODC1*.

Los Capítulos 2 y 3 de esta Tesis se han centrado en la respuesta de las levaduras al estrés osmótico causado por concentraciones elevadas de glucosa. A pesar de los numerosos estudios transcriptómicos globales llevados a cabo sobre la respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae* (Gasch y col., 2000; Posas y col., 2000; Rep y col., 2000; Causton y col., 2001; Yale y

Bohnert, 2001; Hirasawa y col., 2006), considerando incluso el causado por elevadas concentraciones de glucosa (Kaeberlein y col., 2002; Erasmus y col., 2003), la metodología seguida en nuestro trabajo con la cepa de laboratorio W303-1a permite aportar nuevos datos de relevancia. En primer lugar, no sólo ante el estrés osmótico causado por sorbitol o sal (Gasch y col., 2000; Posas y col., 2000; Rep y col., 2000; Hirasawa y col., 2006), sino también en condiciones de elevada concentración de azúcares, los genes implicados en el metabolismo del glicerol incrementan su expresión, de acuerdo con los datos previos de Kaeberlein y col. (2002). Por otro lado, confirmando observaciones anteriores de nuestro laboratorio (Pérez-Torrado y col., 2002a), el estado de las células en el momento de la transferencia al medio con estrés osmótico (es decir, si se encuentran en cultivos en fase estacionaria o exponencial) puede influir en los patrones de expresión génica, particularmente en el caso de genes como los de respuesta a estrés y los implicados en la respiración celular; tal vez, al menos en el caso de los genes de respuesta a estrés, el fenómeno de la protección cruzada comentado en la introducción de esta Tesis y revisado en detalle por Hohmann y Mager (2003) pueda explicar este resultado. Además, se puede observar, al menos en determinadas condiciones experimentales, que las elevadas concentraciones de glucosa pueden desencadenar una mayor represión por catabolito que 2% de glucosa, aspecto que no había sido descrito en los estudios de Kaeberlein y col. (2002). Es complejo determinar que mecanismos pueden estar implicados en este hecho pero resultados similares se obtienen en 10% de glucosa (junto con 10% de fructosa) que en 20% de glucosa, el gen *MIG1* presenta una expresión superior en elevadas concentraciones de glucosa y rutas como PKA y TOR tienen un cierto efecto en la regulación de la expresión de genes como *GPD1* y, aunque en menor medida, también de *HSP104* en nuestras condiciones experimentales. Otro dato novedoso demostrado en este estudio es la implicación de la ruta HOG en la respuesta al estrés provocado por elevadas concentraciones de glucosa; si bien

existían indicios de actividad de la ruta HOG en condiciones de vinificación (Remize y col., 2003) y de un grado de fosforilación de la quinasa Hog1p dependiente de la concentración de glucosa (Tomás-Cobos y col., 2004), nuestros resultados aportan varias evidencias concluyentes acerca de esta ruta en condiciones de 20% de glucosa: i) mutantes en *HOG1* presentan defectos de crecimiento en elevadas concentraciones de glucosa similares a los observados en sorbitol 1 M, ii) la expresión del gen *GPD1* aparece disminuida en dichos mutantes, si bien en menor grado que en el caso del estrés salino (Rep y col., 2000; Posas y col., 2000), iii) la fosforilación de Hog1p es muy superior pocos minutos después de la inoculación en 20% de glucosa que en 2% de glucosa, de acuerdo con lo descrito en otras condiciones de estrés osmótico (Ferrigno y col., 1998; Reiser y col., 1999; Clotet y Posas, 2007).

Una comprensión completa de la respuesta al estrés causado por elevadas concentraciones de glucosa no es posible si no se contempla de forma comparativa la respuesta de una cepa de laboratorio, con problemas de crecimiento y viabilidad en medios conteniendo 20-25% de glucosa, y de una cepa vínica adaptada a la utilización de los azúcares del mosto. En este sentido el estudio transcriptómico global comparado entre la cepa W303 diploide y la vínica comercial ICV16 (Capítulo 3) indica que esta última presenta una mayor expresión de genes implicados en glicolisis y en procesos fermentativos y biosintéticos, por lo que podríamos correlacionar la expresión de este tipo de genes con una mayor facilidad para crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcares. Además también se han observado diferencias en los niveles de mRNA de algunos genes relacionados con el metabolismo y el transporte del glicerol.

Otra de las informaciones obtenidas en nuestros estudios de respuesta a estrés por elevadas concentraciones de glucosa está relacionada con la detección de algunos genes de función desconocida que presentan mayores niveles de expresión en medios con 20% de glucosa que con 2%. En cinco de ellos (*YHR087W*, *YGR052W*, *YNL093C*, *YOR062C* e *YLR108C*) sus

mutantes de delección muestran defectos de crecimiento y/o viabilidad con respecto a la cepa silvestre en medios con elevadas concentraciones de glucosa. De estos genes, destaca *YHR087W* que, de acuerdo con nuestros datos, también parece influir de la resistencia de las levaduras a otros tipos de estrés (etanol y oxidativo) y cuyos niveles de expresión se incrementan en respuesta a numerosas condiciones adversas para el crecimiento (Gasch y col., 2000). La comparación proteómica entre la cepa mutante en este gen y la cepa silvestre en condiciones de estrés producido por 20% de glucosa muestra como única categoría sobrerrepresentada la de plegamiento de proteínas, en la que se incluyen algunas con niveles de expresión diferencial constatados en nuestro estudio, como Hsp104p y Hsp78p. El hecho de no detectar cambios en los niveles de mRNAs de los genes que codifican estas proteínas entre la cepa mutante y la silvestre hacen pensar en un papel de Yhr087wp en procesos post-transcripcionales, como exportación o procesamiento o estabilidad tanto de mRNAs como de proteínas. En este trabajo nos hemos centrado en la posibilidad de una función de este gen en exportación de mRNAs, puesto que datos obtenidos por otros autores (Savchenko y col., 2005) habían indicado interacciones entre Yhr087wp y proteínas implicadas en este proceso, como Yra2p y Npl3p. De acuerdo con los resultados obtenidos, parece ser que esta proteína no participa en este proceso de forma general, aunque no se puede descartar la posibilidad de su intervención en el transporte de un grupo concreto de mensajeros, como los de las proteínas de choque térmico. Serían necesarios más análisis para poder determinar la función de este gen.

Los resultados obtenidos sobre la respuesta a estrés osmótico abren la posibilidad de diversas aplicaciones biotecnológicas. Una de las que se han explorado en esta Tesis ha sido la de manipular genéticamente el gen *YHR087W* (así como también el *HSP26*) en dos cepas vínicas comerciales, la ICV16 (que como hemos comentado presenta un buen comportamiento fermentativo) y la ICV27 (con defectos en la vinificación,

Zuzuarregui y del Olmo, 2004). Estrategias similares con otros genes han permitido mejorar el comportamiento fermentativo en fase estacionaria (Remize y col., 1999) o durante los primeros días de vinificación (Cardona y col., 2007) o mejorar la viabilidad en situaciones de deficiencia de glucosa (Pérez-Torrado y col., 2002). La elección del gen *HSP26* tiene su fundamento en la relación de este gen con la respuesta a estrés (Amorós y Estruch, 2001). En el caso de *YHR087W*, a todas las razones expuestas anteriormente y relacionadas con su vinculación con la respuesta al estrés causado por concentraciones elevadas de glucosa, como las presentes en el mosto, cabe añadir una más: en estudios previos de nuestro laboratorio (Aurora Zuzuarregui, Tesis Doctoral) se había observado una mayor expresión de este gen a tiempos cortos de vinificación en cepas con buen comportamiento fermentativo que en cepas que presentan problemas de enlentecimientos o paradas.

Para la manipulación de la expresión de estos genes en las cepas seleccionadas se intentó su introducción en plásmidos episomales y centroméricos bajo el control de su propio promotor, así como el cambio de su promotor en al menos una de sus copias genómicas por el de los genes *SPI1* y *PGK1*. Estos genes muestran diferencias en sus patrones de expresión durante la vinificación encontrándose los máximos niveles de expresión del primero en fases tardías y del segundo durante el crecimiento exponencial (Puig y Pérez-Ortín, 2000a,b). Los resultados obtenidos indican que en algunos casos, sobre todo cuando se sobreexpresa el gen *YHR087W* en un plásmido episomal en la cepa ICV16, en uno centromérico en la ICV27 o se sustituye el promotor de alguna de sus copias genómicas por el de *SPI1* en la cepa ICV16, es posible mejorar el comportamiento fermentativo. Además, los datos obtenidos a lo largo de todos estos experimentos indican la importancia de seleccionar para cada gen el tipo de manipulación más adecuado, evitando siempre la utilización de promotores fuertes, lo que puede ser útil para el planteamiento de futuras manipulaciones de otros genes.

Otra aplicación biotecnológica de nuestros estudios sobre respuesta a estrés osmótico ha sido la de poder establecer correlaciones entre el metabolismo y transporte del glicerol y el comportamiento de las cepas vínicas al inicio de la vinificación. Se seleccionaron 5 cepas vínicas comerciales, dos de las cuales (A1 y A2), presentan un menor número de células viables durante las primeras horas de la vinificación, así como una menor expresión de los genes *GPD1* y *GPD2*, que codifican enzimas necesarios para la producción de glicerol, compuesto que la levadura utiliza como osmoprotector (Blomberg y Alder, 1992). En el caso de la cepa A2 (y, en menor grado, de la A1), además, se ha encontrado menores niveles de glicerol intracelular, lo que indicaría que presenta problemas para responder al estrés osmótico. Por otro lado, la capacidad fermentativa de ambas cepas mejora si antes de su inoculación se lleva a cabo una pre-adaptación en medios con bajas concentraciones de glucosa (2-5% dependiendo de la cepa). Estos resultados y los obtenidos previamente en la cepa vínica QA23 (Novo y col., 2007) sugieren que la estrategia de preadaptación, utilizada con éxito para vinificaciones a bajas temperaturas (Llauradó y col., 2005) puede ser muy útil para mejorar problemas fermentativos en cepas vínicas, aunque debe analizarse cual es la mejor condición para cada una.

Todos los estudios llevados a cabo a lo largo de este trabajo permiten por tanto alcanzar una mayor información sobre los mecanismos moleculares que permiten a la levadura *S. cerevisiae* responder a estrés por limitación de nitrógeno y por elevadas concentraciones de glucosa. Además, algunos de los resultados abren posibilidades de mejora en el comportamiento fermentativo de cepas vínicas, tanto a través de la construcción de cepas *GRAS* manipuladas genéticamente, como de la selección de cepas con niveles adecuados de determinados marcadores o de modificaciones en las estrategias de rehidratación de la levadura seca activa.

Conclusiones

A partir de los resultados presentados y discutidos en este trabajo podemos sacar las siguientes conclusiones finales:

1. La limitación de nitrógeno durante la vinificación puede ser detectada mediante la utilización de algunos marcadores moleculares, como la actividad arginasa y los niveles de expresión de varios genes, entre los que se encuentra *ACA1*.

2. La adición de fuentes nitrogenadas a vinificaciones limitantes por su bajo contenido en nitrógeno permite completar el proceso fermentativo de forma similar a la observada en una vinificación control, independientemente de si la suplementación se ha llevado a cabo con amonio, aminoácidos o ambos tipos de fuentes nitrogenadas. La naturaleza de éstas sí influye, sin embargo, en el perfil organoléptico del producto final.

3. La naturaleza de la fuente nitrogenada añadida a vinificaciones limitantes determina una reprogramación celular diferente en las horas posteriores: la adición de amonio conduce a un mayor incremento en la expresión de genes implicados en biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, mientras que la de aminoácidos determina una mayor inducción de genes relacionados con ensamblaje de ribosomas, biosíntesis de proteínas y transporte de aminoácidos.

4. Los estudios transcriptómicos globales llevados a cabo en la cepa W303-1a en medios con diferente contenido en glucosa muestran una mayor expresión de los genes implicados en el metabolismo del glicerol en 20% de glucosa que en 2%, así como una mayor represión por catabolito de carbono en 20% de glucosa que en 2% y una menor expresión en 20% de algunos genes de respuesta a estrés inducidos bajo otras condiciones de estrés osmótico. Estos efectos pueden estar influidos por la fase del cultivo de procedencia de las células inoculadas.

5. La ruta HOG está implicada en la respuesta a estrés por elevadas concentraciones de glucosa. También existe una cierta participación de las rutas PKA y TOR.

6. Estudios transcriptómicos globales comparativos entre la cepa vínica ICV16 y la cepa de laboratorio W303 diploide sugieren que la mayor viabilidad de la primera de ellas en medios con elevada concentración de glucosa podría estar relacionada con una mayor expresión de los genes implicados en glicolisis, fermentación y procesos biosintéticos.

7. Algunas cepas vínicas que presentan problemas para iniciar su crecimiento en el mosto muestran, en medios con 20% de glucosa, menor expresión de los genes *GPD1* y *GPD2* (responsables de la biosíntesis de glicerol, el osmolito compatible que utilizan las levaduras), así como niveles más bajos de glicerol intracelular.

8. La vitalidad (y, por tanto, la capacidad fermentativa) de estas cepas con problemas al inicio de la vinificación se puede mejorar con la introducción de determinadas concentraciones de glucosa en el medio de rehidratación de la levadura seca activa (2% en el caso de la cepa A2 y 5% en el de la A1).

9. El gen *YHR087W* presenta niveles de expresión superiores en 20% de glucosa que en 2% de glucosa. El mutante de delección de este gen muestra defectos de viabilidad y consumo de glucosa en medios conteniendo 25% de glucosa. Estudios proteómicos comparativos entre dicho mutante y la cepa parental muestran cambios en los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a la categoría de plegamiento de proteínas; estos cambios deben ser el resultado de mecanismos post-transcripcionales, ya que no se detectan en los correspondientes mRNAs.

10. Las manipulaciones llevadas a cabo con los genes *HSP26* e *YHR087W* resultan, en general, en un aumento de los niveles de expresión de los genes estudiados, y en algunos casos en una mayor resistencia a diferentes condiciones de estrés. Algunas de estas modificaciones, particularmente las que implican *YHR087W*, también mejoran el comportamiento fermentativo, lo

que confirma la relevancia de este gen en la respuesta al estrés osmótico causado por elevadas concentraciones de glucosa.

Bibliografía

- Aerny, J.** (1996) "Composés azotés des moûts et des vins". *Revue Suisse de Vitic. Arboric. Hortic.* **28**:161-165.
- Aguilera A, Chavez S, Malagon F.** (2000) "Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence". *Yeast* **16**:731-754.
- Aguilera J, Randez-Gil F, Prieto JA.** (2007) "Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms". *FEMS Microbiol. Rev.* **31**(3):327-341.
- Alberola TM, García-Martínez J, Antúnez O, Viladevall L, Barceló A, Ariño J, Pérez-Ortín JE.** (2004) "A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses". *Int. Microbiol.* **7**(3):199-206.
- Albertyn J, Hohmann S, Thevelein JM, Prior BA.** (1994) "GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway". *Mol. Cell Biol.* **14**:4135-4144.
- Alepuz PM, de Nadal E, Zapater M, Ammerer G, Posas F.** (2003) "Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II". *EMBO J.* **22**: 2433-42.
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B.** (2001) "Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEBS Lett.* **498**:98-103.
- Amorós M, Estruch F.** (2001) "Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner". *Mol. Microbiol.* **39**:1523-1532.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adler L.** (1997) "The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation". *EMBO J.* **16**(9):2179-2187.
- Aramburu J, Rao A, Klee CB.** (2000) "Calcineurin: from structure to function". *Curr. Top Cell Regul.* **36**:237-295.
- Aranda A, Querol A, del Olmo M.** (2002) "Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of *HSP* genes in

- yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines". *Arch. Microbiol.* **177**: 302-312.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G.** (2000) "Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium". *Nat. Genet.* **25**(1):25-29.
- Attfield PV.** (1997) "Stress tolerance. The key to effective strains of industrial baker's yeast". *Nature Biotech.* **15**, 1351-1357.
- Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L, González A.** (1997) "GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **179**: 5594-5597.
- Äyrapää T.** (1968) "Formation of higher alcohols by various yeasts". *J. Inst. Brew.* **74**:169-179.
- Backhus LE, DeRisi J, Brown PO, Bisson LF.** (2001) "Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions". *FEMS Yeast Res.* **1413**: 1-15.
- Bakalinsky AT, Snow R.** (1990) "The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **6**(5):367-382.
- Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN.** (1996) "TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast". *Mol. Biol. Cell* **7**: 25-42.
- Barbosa C, Falco V, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A.** (2009) "Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains". *J Biosci. Bioeng.***108**(2):99-104.
- Barre P, Vézinhét F, Dequin S, Blondin B.** (1993) "Genetic improvement of wine yeast", p. 421-447. In: G. H. Fleet (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Reading

- Bauer FF, Pretorius IS.** (2000) "Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review". *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**:27-51.
- Baumes R, Cordonnier R, Nitz S, Drawert F.** (1986) "Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars". *J. Sci. Food Agric.* **37**:927-943.
- Beck T, Hall MN.** (1999) "The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors". *Nature* **402**:689-692.
- Beltrán G, Esteve-Zarzoso B, Rozès N, Mas A, Guillamón JM.** (2005) "Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption". *J. Agric. Food Chem.* **53**:996-1002.
- Beltrán G, Novo M, Leberre V, Sokol S, Labourdette D, Guillamón JM, Mas A, François J, Rozès N.** (2006) "Integration of transcriptomic and metabolic analysis for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations". *FEMS Yeast Res.* **6**(8):1167-1183.
- Beltrán G, Novo M, Rozès N, Mas A, Guillamón JM.** (2004) "Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations". *FEMS Yeast Res.* **4**:625-632.
- Bely M, Sablayrolles JM, Barre P.** (1990) "Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance". *Am. J. Enol. Vitic.* **41**:319-324.
- Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF, Zheng S.** (2000) "Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p and phosphatases". *J. Biol. Chem.* **275**:35727-35733.
- Bidenne C, Biondin B, Dequin S, Vezinhet F.** (1992) "Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*". *Curr. Genet.* **22**(1):1-7.
- Bisson LF, Coons DM, Krueckeberg AL, Lewis DA.** (1993) "Yeast sugar transporters". *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**(4):259-308.
- Bisson LF.** (1991) "Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes". In: *Ranz J.M. (ed), Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine.* American Society of Enology and

Viticulture. Davis, CA.

- Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sanchez JC, Hochstrasser D.** (1993) "A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale". *Electrophoresis* **14**(12):1357-1365.
- Björkqvist S, Ansell R, Adler L, Lidén G.** (1997) "Physiological response to anaerobicity of glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(1):128-132.
- Bland JM, Altman DG.** (1995) "Multiple significance tests: the Bonferroni method". *BMJ.* **310**:170.
- Blomberg A, Adler L.** (1992) "Physiology of osmotolerance in fungi". *Adv. Microbiol. Physiol.* **33**:145-212.
- Blomberg A, Larsson C, Gustafsson L.** (1988) "Microcalorimetric monitoring of growth of *Saccharomyces cerevisiae*: osmotolerance in relation to physiological state". *J. Bacteriol.* **170**(10):4562-4568.
- Blomberg A.** (2000) "Metabolic surprises in *Saccharomyces* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model". *FEMS Microbiol. Lett.* **182**:1-8.
- Boer VM, de Winde JH, Pronk JT, Piper MDW.** (2003) "The genomic-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulphur". *J. Biol. Chem.* **278**:3265-3274.
- Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, Arifin Y, Walsh MC, Piper MD, de Winde JH, Pronk JT, Daran JM.** (2007) "Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures". *FEMS Yeast Res.* **7**(4):604-620.
- Bonangelino CJ, Nau JJ, Duex JE, Brinkman M, Wurmser AE, Gary JD, Emr SD, Weisman LS.** (2002) "Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p". *J. Cell Biol.* **156**(6):1015-1028.
- Bony M, Bidart F, Camarasa C, Ansanay, V, Dulau L, Barre P, Dequin S.** (1997) "Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation". *FEBS Lett.* **410**:452-456.
- Boone C, Sdicu AM, Wagner J, Degré R, Sánchez C, Bussey H.** (1990) "Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome

- of marked wine yeasts and its effects on vinification". *Am. J. Enol. Vitic.* **41**:37-42
- Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkee RE.** (1996) "Yeast and Biochemistry of ethanol fermentation. Principles and practices of winemaking". *The Chapman & Hall Enology Library, Chapman & Hall, New York, USA.* 123-126.
- Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M.** (1998) "Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **180**(5):1044-1052.
- Bradford MM.** (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem.* **72**:248-254.
- Brown AD.** (1974) "Microbial water relations: features of the intracellular composition of sugar-tolerant yeasts". *J. Bacteriol* **118**:769-777.
- Bultynck G, Heath VL, Majeed AP, Galan JM, Haguenaer-Tsapis R, Cyert MS.** (2006) "Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease". *Mol. Cell Biol.* **26**(12):4729-4745.
- Cambon B, Monteil V, Remize F, Camarasa C, and Dequin S.** (2006) "Effects of *GPD1* overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking *ALD6* genes". *Appl. Env. Microbiol.* **72**: 4688-4694.
- Cantarelli C.** (1957) "On the activation of alcoholic fermentation in winemaking". *Am. J. Enol. Vitic.* **8**:113-120, 167-175.
- Capaldi AP, Kaplan T, Liu Y, Habib N, Regev A, Friedman N, O'Shea EK.** (2008) "Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1". *Nat. Genet.* **40**:1300-1306.
- Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como J, and Heitman J.** (1999) "The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients". *Genes Dev.* **13**:3271-3279.
- Cardona F, Aranda A, del Olmo M.** (2009) "Ubiquitin ligase Rsp5p is involved in the gene expression changes during nutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **26**(1):1-15.

- Cardona F, Carrasco P, Pérez-Ortín JE, del Olmo M, and Aranda A.** (2007) "A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts". *Int. J. Food Microbiol.* **114**:83-91.
- Carlson M, Osmond BC, and Botstein D.** (1981) "Mutants of yeast defective in sucrose utilization". *Genetics* **98**:25-40.
- Carrasco P, Pérez-Ortín JE, del Olmo M.** (2003) "Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentations". *Syst. Appl. Microbiol.* **26**:471-479.
- Carrau FM, Medina K, Farina L, Bodio E, Henschke PA, Dellacassa E.** (2008) "Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains". *FEMS Yeast Res.* **8**(7):1196-1207.
- Cartwright CP, Juroszek JR, Beavan MJ, Ruby FMS, DeMorias SMF, Rose AH.** (1986) "Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Gen. Microbiol.* **132**:369-377.
- Cartwright CP, Rose AH, Calderbank J, and Keenan HJ.** (1989) "Solute transport in the yeast". *Metabolism and Physiology of Yeast* Vol. 3. AH Rose and JS Harrison ed. Academic Press Limited. London.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, and Young RA.** (2001) "Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes". *Mol. Biol. Cell* **12**:323-337.
- Chatonnet P, Viala C, Dubourdieu D.** (1997) "Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols". *Am. J. Enol. Viticult.* **48**:443-448.
- Chen CS.** (1989). "Water-activity – Concentration models for solutions of sugars, salts and acids". *J. Food Sci.* **54**:1318-1321.
- Cheng J, Wan DF, Gu JR, Gong Y, Yang SL, Hao DC, and Yang L.** (2006) "Establishment of a yeast system that stably expresses human cytochrome P450 reductase: application for the study of drug metabolism of cytochrome P450s in vitro". *Protein Expr. Purif.* **47**:467-476.
- Chi Z, Arneborg N.** (1999) "Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants and ethanol

- tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Appl. Microbiol.* **86**:1429-1440.
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P.** (2009) "Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking". *FEMS Yeast Res.* **10**(2):123-133.
- Cleveland WS.** (1979) "Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots". *J. Am. Stat. Assoc.* **74**:829-836.
- Clotet J, Posas F.** (2007) "Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast". *Methods Enzymol.* **428**:63-76.
- Codón AC, Benítez T, Korhola M.** (1998) "Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**(2):154-163.
- Codon AC, Gasent-Ramirez JM, Benitez T.** (1995) "Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts". *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:630-638.
- Coffman JA, Rai R, Loprete DM, Cunningham T, Svetlov V, Cooper TG.** (1997) "Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **179**:3416-3429.
- Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde JH, Gorwa MF, Colavizza D, Thevelein JM.** (1998) "Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *EMBO J.* **17**(12):3326-3341.
- Comesaña JF, Correa A, Sereno AM.** (2001) "Water activity in sorbitol or xylitol + water and sorbitol or xylitol sodium chloride + water systems at 20°C and 35°C". *J. Chem. Eng. Data* **46**:716-719.
- Cooke FT, Dove SK, McEwen RK, Painter G, Holmes AB, Hall MN, Michell RH, Parker PJ.** (1998) "The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*". *Curr. Biol.* **8**:1219-1222.

- Cooper TG.** (1982) "Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*", pp. 39-99. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Metabolism and Gene Expression (J. N. Strathern, E. W. Jones, J. B. Broach, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Cooper TG.** (1996) "Allantoin degradative system-an integrated transcriptional response to multiple signals". *Mycota III*:139-169.
- Cordente AG, Heinrich A, Pretorius IS, Swiegers JH.** (2009) "Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production". *FEMS Yeast Res.* **9**(3):446-459.
- Corison CA, Ough CS, Berg HW, Nelson KE.** (1979) "Must acetic acid and ethyl acetate as mold rot indicators in grapes". *Am. J. Enol. Viticult.* **30**:130-134.
- Cornell NW, Veech RL.** (1983) "Enzymatic measurement of ethanol or NAD in acid extracts of biological samples". *Anal. Biochem.* **132**:418-423.
- Cox KH, Pinchak AB, Cooper TG.** (1999) "Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization". *Yeast* **15**:703-713.
- Crauwels M, Donaton MC, Pernambuco MB, Winderickx J, de Winde JH, Thevelein JM.** (1997) "The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium induced (FGM) pathway". *Microbiology* **143**:2627-2637.
- Cunningham KW, Fink GR.** (1994) "Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases". *J. Cell Biol.* **124**:351-363.
- Cunningham TS, Rai R, Cooper TG.** (2000) "The level of *DAL80* expression down-regulates GATA factor-mediated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **182**(23):6584-6591.
- Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D, Thorner J.** (1991) "Yeast has homologs (*CNA1* and *CNA2* gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7376-7380.

- Cyert MS, Thorner J.** (1992) Regulatory subunit (*CNB1* gene product) of yeast Ca^{2+} -calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase is required for adaptation to pheromone". *Mol. Cell Biol.* **12**:3460-3469.
- Darriet P, Boldron JN, Dubourdieu D.** (1988) "L'hydrolyse des hétérosides terpéniques du Muscat à petits grains par les enzymes périplasmiques de *Saccharomyces cerevisiae*". *Connaiss. Vigne Vin.* **22**:189-195.
- Daugherty JR, Rai R, el Berry HM, Cooper TG.** (1993) "Regulatory circuit for responses on nitrogen catabolic gene expression to the *GLN3* and *DAL80* proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **175**(1):64-73.
- Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R.** (1998) "Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **14**:1471-1510.
- De Barros Lopes M, Rehman AU, Gockowiak H, Heinrich AJ, Langridge P, Henschke PA.** (2000) "Fermentation properties of a wine yeast overexpressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*GPD2*)". *Aust. J. Grape Wine Res.* **6**:208-215.
- De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P.** (1996) "Phosphoinositides as regulators in membrane traffic". *Science* **271**(5255):1533-1539.
- Degré R.** (1993) "Selection and commercial cultivation of wine yeasts and bacteria". In: Fleet GH (ed) *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, pp 421-447
- Del Pozo L, Abarca D, Claros MG, Jiménez A.** (1991) "Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker". *Curr. Genet.* **19**(5):353-358.
- Delneri D, Tomlin GC, Wixon JL, Hutter A, Sefton M, Louis EJ, Oliver SG.** (2000) "Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system". *Gene* **252**(1-2):127-135.
- Delteil D, Aizac T.** (1988) "Comparaison de différences techniques de levurage par suivi de l'implantation d'une souche de levure oenologique marquée ". *Connaiss. Vigne Vin.* **21**:267-278.
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L, González A.** (2001) "NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*."

- Purification, kinetic properties and physiological roles". *J. Biol. Chem.* **47**:43775-43783.
- Denis V, Cyert MS.** (2002) "Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue". *J. Cell Biol.* **156**:29-34.
- Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G.** (1999) "Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation". *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**(1):49-54
- Dequin S, Baptista, E, Barre P.** (1999) "Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains genetically engineered to produce lactic acid". *Am. J. Enol. Vitic.* **50**:45-50.
- Dequin S, Barre P.** (1994) "Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH". *Biotechnology* **12**:173-177.
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO.** (1997) "Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale". *Science* **278**:680-686.
- Di Como CJ, Arndt KT.** (1996) "Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases". *Genes Dev.* **10**:1904-1916.
- Didion T, Grauslund M, Kielland-Brandt MC, Andersen HA.** (1996) "Amino acids induce expression of BAP2, a branched-chain amino acid permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Bacteriol.* **178**(7):2025-2029.
- Dombeck KM, Ingram LO.** (1986) "Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:975-981.
- Døskeland SO, Maronde E, Gjertsen BT.** (1993) "The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase-functionally different or redundant?". *Biochim. Biophys. Acta* **1178**(3):249-258.
- Dove SK, Cooke FT, Douglas MR, Sayers LG, Parker PJ, Michell RH.** (1997) "Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis". *Nature* **390**:187-192.
- Dubourdieu D, Darriet O, Ollivier JN, Ribereau-Gayon P.** (1988) "Role de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans l'hydrolyse

- enzymatique des hétérosides terpéniques du jus de raisin". 489-493. Comptes Rendus Academie des Sciences. Paris T. 306. Série III.
- Düvel K, Santhanam A, Garrett S, Schneper L, Broach JR.** (2003) "Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast". *Mol. Cell* **11**:1467-1478.
- Eden A, Van Nederveelde L, Drukker M, Benvenisty N, Debourg A.** (2001) "Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**(3):296-300.
- Eglinton JM, Heinrich AJ, Pollnitz AP, Langridge P, Henschke PA, de Barros Lopes M.** (2002) "Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene". *Yeast* **19**:295-301.
- Eglinton JM, Henschke PA.** (1999) "The occurrence of volatile acidity in Australian wines". *Australian Grapegrower and Winemaker*, 7-12.
- Ehsani M, Fernández MR, Biosca JA, Julien A, Dequin S.** (2009) "Engineering of 2,3- butanediol dehydrogenase to reduce acetoin formation by glicerol-overproducing, low-alcohol *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Environ. Microbiol.* **75**(10):3196-3205.
- Erasmus DJ, van der Merwe GK, van Vuuren HJJ.** (2003) "Genome-wide analyses, metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress". *FEMS Yeast Res.* **3**:375-399.
- Eriksson P, André L, Ansell R, Blomberg A, Adler L.** (1995) "Cloning and characterization of *GPD2*, a second gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in *Saccharomyces cerevisiae*, and its comparison with *GPD1*". *Mol. Microbiol.* **17**(1):95-107.
- Eriksson P, Alipour H, Adler L, Blomberg A.** (2000) "Rap1p-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae GPD1* promoter are involved in its response to NaCl". *J. Biol. Chem.* **275**(38): 29368-29376.
- Esteve-Zarzoso B, Manzanares P, Ramón D, Querol A.** (1998) "The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking" *Int. Microbiol.* **1**(2):143-148.
- Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán MJ, García-Maiquez E, Uruburu F, Querol A.** (2001) "Yeast population dynamics during the fermentation

- and biological aging of sherry wines". *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(5):2056-2061.
- Estruch F, Carlson M.** (1993) "Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a *SNF1* protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol.* **13**:3872-3881.
- Estruch F.** (2000) "Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast". *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:469-486.
- Etievant PX.** (1981) "Volatile phenol determination in wine". *J. Agric. Food Chem.* **29**:65-67.
- Farkas I, Hardy TA, Goebel MG, Roach PJ.** (1991) "Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled". *J. Biol. Chem.* **266**:15602-7.
- Fazio TG, Kooperberg C, Goldmark JP, Neal C, Basom R, Delrow J, Tsukiyama T.** (2001) "Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression". *Mol. Cell. Biol.* **21**:6450-6460.
- Fernández de Simón B, Cadahía E, Galocha J.** (2003) "Volatile compounds in a spanish red wine aged in barrels made of spanish, french and american oak". *Word. J. Agric. Food Chem.* **51**:7671-7678.
- Fernández-Arenas E, Cabezón V, Bermejo C, Arroyo J, Nombela C, Díez-Orejas R, Gil C.** (2007) "Integrated proteomics and genomics strategies bring new insight into *Candida albicans* response upon macrophage interaction". *Mol. Cell Proteomics* **6**(3):460-78
- Ferreira C, Lucas C.** (1997) "Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene STL1 is overcome by high temperature". *FEBS Lett.* **581**(9):1923-1927.
- Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt MC, Lucas C, Brandt A.** (2005) "A member of the sugar transportes family, Stl1p, is the glycerol-H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Biol. Cell* **16**:2068-2076
- Ferrigno P, Posas F, Koepf D, Saito H, Silver PA.** (1998) "Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs *NMD5* and *XPO1*". *EMBO J.* **17**:5606-5614.

- Feuillat M, Charpentier C, Maujean A.** (1998) "Les composés azotés". Chapter 3. In *Enologie. Fondement scientifiques et technologiques*. Lavoisier (Technique & Documentation). Paris.
- Fleet GH, Heard GM.** (1993) "Yeasts-Growth during fermentation" p.27-57. In: Fleet G.H. (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Fleet GH.** (2003) "Yeast interactions and wine flavor". *Int. J. Food Microbiol.* **86**(1-2):11-22.
- Fleet GH.** (2007) "Yeasts in food and beverages: impact on product quality and safety". *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**:170-175.
- Fleet GH.** (2008) "Wine yeasts for the future". *FEMS Yeast Res.* **8**:979-995.
- Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias Robles AA.** (2004) "The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisia*". *Rev. Latinoam. Microbiol.* **46**(1-2):24-46.
- Forsburg SL, Guarente L.** (1989) "Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**:153-180.
- François J, Eraso P, Gancedo C.** (1987) "Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose". *Eur. J. Biochem.* **164**(2):369-373.
- François J, Neves MJ, Hers HG.** (1991) "The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase". *Yeast* **7**(6):575-587.
- François J, Parrou JL.** (2001) "Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:125-145.
- Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokawa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y, Kimura A.** (1998) "Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**:4076-4078.

- Gancedo C, Gancedo JM, Sols A.** (1968) "Glycerol metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production". *Eur. J. Biochem.* **5**:165-172.
- Gancedo JM.** (2008) "The early steps of glucose signalling in yeast". *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:673-704.
- Ganga MA, Piñaga F, Vallés S, Ramón D, Querol A.** (1999) "Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans xlnA* gene". *Int. J. Food Microbiol.* **47**:171-178.
- García-Gimeno MA, and Struhl K.** (2000) "Aca1 and Aca2, ATF/CREB activators in *Saccharomyces cerevisiae*, are important for carbon source utilization but not the response to stress". *Mol. Cell Biol.* **20**:4340-4349.
- García-Rodríguez LJ, Valle R, Durán A, Roncero C.** (2005) "Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast". *FEBS Lett.* **579**(27):6186-6190.
- Garmendia-Torres C, Goldbeter A, Jacquet M.** (2007) "Nucleocytoplasmic oscillations of the yeast transcription factor Msn2: evidence for periodic PKA activation" *Curr. Biol.* **17**(12):1044-1049.
- Garre E, Raginel F, Palacios A, Julien A, Matallana E.** (2010) "Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts". *Int. J. Food Microbiol.* **136**(3):295-303.
- Garre E, Pérez-Torrado R, Gimeno-Alcañiz JV, Matallana E.** (2009) "Acid trehalase is involved in intracellular trehalose mobilizations during postdiauxic growth and severe saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Yeast Res.* **9**(1):52-62.
- Garreau H, Hasan RN, Renault G, Estruch F, Boy-Marcotte E, Jacquet M.** (2000) "Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*" *Microbiology* **146**:2113-2120.
- Gary JD, Wurmser AE, Bonangelino CJ, Weisman LS, Emr SD.** (1998) "Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis". *J. Cell Biol.* **143**(1):65-79.

- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO.** (2000) "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes". *Mol. Biol. Cell* **11**:4241-4257.
- Gasch AP.** (2002) "Yeast genomic expression studies using DNA microarrays". *Methods Enzymol.* **350**:393-414.
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM.** (1999) "Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity". *Electrophoresis.* **20**(3):601-605.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA.** (1995) "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure". *Yeast.* **11**:355-360.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J, André B.** (2007) "Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **27**(8):3065-3086.
- Goldstein D.** (1987) "Ethanol-induced adaptation in biological membranes". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **492**:103-111.
- González-Candelas L, Cortell A, Ramón D.** (1995) "Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a fungal pectate lyase gene". *FEMS Microbiol. Lett.* **126**:263-270.
- González-Candelas L, Gil JV, Lamuela-Raventós R, Ramon D.** (2000) "The use of transgenic yeast expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine". *Int. J. Food Microbiol.* **59**:179-183.
- González-Ramos D, Cebollero E, González R.** (2008) "A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze". *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(17):5533-5540.
- González-Ramos D, Quirós M, González R.** (2009) "Three different targets for the genetic modification of wine yeast strains resulting in improved effectiveness of bentonite fining". *J. Agric. Food Chem.* **57**(18):8373-8378.

- Gorner W, Durchslang E, Martínez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C.** (1998) "Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity". *Genes Dev.* **12**:586-597.
- Greatrix BW, van Vuuren HJJ.** (2006) "Expression of the *HXT13*, *HXT15* and *HXT17* genes in *Saccharomyces cerevisiae* and stabilization of the *HXT1* gene transcript by sugar-induced osmotic stress". *Curr. Genet.* **49**:205-217.
- Griffioen G, Laan RJ, Mager Wh, Planta RJ.** (1996) "Ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae* shows a biphasic response to nutritional changes". *Microbiology* **142**(8):2279-2287.
- Griffioen G, Mager WH, Planta RJ.** (1994) "Nutritional upshift response of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*" *FEMS Microbiol. Lett.* **123**(1-2):137-144.
- Guillaume C, Delobel P, Sablayrolles JM, Blondin B.** (2007) "Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated *HXT3* allele enhances fructose fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(8):2432-2439.
- Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH.** (1996) "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast". *Nucleic Acids Res.* **24**:2519-2524.
- Hadfield C, Jordan BE, Mount RC, Pretorius GH, Burak E.** (1990) "G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *Curr. Genet.* **18**(4):303-313.
- Hardwick JS, Kuruvilla FG, Tong JK, Shamji AF, Schreiber SL.** (1999) "Rapamycin modulates transcription defines the subset of nutrient-sensitive signalling pathways directly controlled by Tor proteins". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(26):14866-14870.
- Helliwell SB, Howald I, Barbet N, Hall MN.** (1998) "*TOR2* is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **269**:8792-8796.
- Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P, Monk P.** (1998) "Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine". *J. Appl. Microbiol.* **84**:865-876.

- Henschke PA, Jiranek V.** (1993) «Yeast. Metabolism of nitrogen compounds». In Wine. Microbiology and Biotechnology. Chapter 4. G.H. Fleet ed. Harwood Academic Publishers. Chur.
- Herman PK.** (2002) "Stationary phase in yeast". *Curr. Opin. Microbiol.* **5**(6) :602-607-
- Hernández-Orte P, Cacho JF, Ferreira V.** (2002) "Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition". Experiments with model solutions and chemometric study". *J. Agric. Food Chem.* **50**:2891-2899.
- Hernández-Orte P, Ibarz MJ, Cacho J, Ferreira V.** (2005) "Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine". *Food Chem.* **89**:163-174.
- Herraiz T, Ough CS.** (1993) "Formation of ethyl esters of amino acids by yeasts during the alcoholic fermentation of grape juice". *Am. J. Enol. Viticult.* **44**:41-48.
- Herrero O, Ramón D, Orejas M.** (2008) "Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine". *Metab. Eng.* **10**(2):78-86.
- Hill JE, Myers AM, Koerner TJ, Tzagoloff A.** (1986) "Yeast/E. Coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites". *Yeast* **2**(3):163-7
- Hirasawa T, Ashitani K, Yoshikawa K, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S.** (2006) "Comparison of the transcriptional responses to osmotic stress induced by NaCl and sorbitol additions in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray". *J. Biosci. Bioeng.* **102**:568-571.
- Hirasawa T, Yoshikawa K, Nakakura Y, Nagahisa K, Furusawa C, Katakura Y, Shimizu H, Shioya S.** (2007) "Identification of target genes conferring ethanol stress tolerance to *Saccharomyces cerevisiae* based on DNA microarray data analysis". *J. Biotechnol.* **131**(1):34-44.
- Hirayama T, Maeda T, Saito H, Shinozaki K.** (1995) "Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **249**:127-138.
- Hirimburegama K, Dumez P, Keleman J, Oris E, Vergauwen R, Mergelsberg H, Thevelein JM.** (1992) "Nutrient-induced activation of

- trehalase in nutrient-starved cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: cAMP is not involved as second messenger". *J. Gen Microbiol.* **138**(10):2035-2043.
- Hochstrasser M.** (1991) "Function of intracellular protein degradation in yeast". *Genet. Eng.* **13**:307-329.
- Hohmann S, Krantz M, Nordlander B.** (2007) "Yeast osmoregulation". *Methods Enzymol.* **428**:29-45.
- Hohmann S, Mager WH.** (2003) "Yeast stress responses". Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Hohmann S.** (2002) "Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeasts". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(2):300-372.
- Holst B, Lunde C, Lages F, Oliveira R, Lucas C, Kielland-Brandt MC.** (2000) "*GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* **37**:08-124.
- Horie T, Isono K.** (2001) "Cooperative functions of the mannoprotein-encoding genes in the biogenesis and maintenance of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **18**:1493-503.
- Hou L, Cao X, Wang C, Lu M.** (2009) "Effect of overexpression of transcription factors on the fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains". *Lett. Appl. Microbiol.* (en prensa).
- Huh W-K, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK.** (2003) "Global analysis of protein localization in budding yeast". *Nature* **425**(6959):686-691.
- Hwang PK, Tugendreich S, Fletterick RJ.** (1989) "Molecular analysis of *GPH1*, the gene encoding glycogen phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biol.* **9**:1659-1666.
- Ingledeu WM, Kunkee RE.** (1985) "Factors influencing sluggish fermentations of grape juice". *Am. J. Enol. Vitic.* **36**:65-76.
- Ingram LO, Buttke TM.** (1984) "Effects of alcohols on microorganisms". *Adv. Microb. Physiol.* **25**: 253-300.
- Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL.** (2005) "Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**(1):79-100.

- Ivorra C, Pérez-Ortín JE, del Olmo M.** (1999) "An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study". *Biotechnol. Bioeng.* **64**(6):698-708.
- Iwaki T, Tamai Y, Watanabe Y.** (1999) "Two putative MAP kinase genes, *ZrHOG1* and *ZrHOG2*, cloned from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* are functionally homologous to the *Saccharomyces cerevisiae HOG1* gene". *Microbiology* **145**:241-248.
- Jiang Y, Davis C, Broach JR.** (1998) "Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway". *EMBO J.* **17**:6942-6951.
- Jiménez-Martí E, Aranda A, Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, del Olmo M.** (2007) "The nature of the nitrogen source added to nitrogen depleted vinifications conducted by a *Saccharomyces cerevisiae* strain in synthetic must affects gene expression and the levels of several volatile compounds". *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**(1):61-75.
- Jiménez-Martí E, del Olmo, M.** (2008) "Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation". *FEMS Yeast Res.* **8**:245-256.
- Jiménez-Martí E, Zuzuarregui A, Ridaura I, Lozano N, del Olmo M.** (2009) "Genetic manipulation of *HSP26* and *YHR087W* stress genes may improve fermentative behaviour in wine yeasts under vinification conditions". *Int. J. Food Microbiol.* **130**:122-130.
- Jiranek V, Langridge P, Henschke PA.** (1995) "Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium". *Am. J. Enol. Vitic.* **46**:75-83.
- Kaeberlein M, Andalis AA, Fink, GR, Guarente L.** (2002) "High osmolarity extends life span in *Saccharomyces cerevisiae* by a mechanism related to calorie restriction". *Mol. Cell. Biol.* **22**:8056-8066.
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE.** (1995) "The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response". *Genes Dev.* **9**:1559-1571.

- Kaniak A, Xue Z, Macool D, Kim JH, Johnston M.** (2004) "Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eukaryotic Cell* **3**:221-231.
- Keptein JC, Van Den Ende H, Klis FM.** (1999) "The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall". *Biochim. Biophys. Acta* **1426**:373-383.
- Ketela T, Green R, Bussey H.** (1999) "*Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway". *J. Bacteriol.* **181**:3330-3340.
- Ko CH, Liang H, Gaber RF.** (1993) "Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biol.* **13**(1):638-648.
- Kobayashi N, McEntee K.** (1990) "Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6550-6554.
- Kodama Y, Omura F, Ashikari T.** (2001) "Isolation and characterization of a gene specific to lager brewing yeast that encodes a branched-chain amino acid permease". *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(8):3455-3462.
- Kolkman A, Daran-Lapujade P, Fullaondo A, Olsthoorn MM, Pronk JT, Slijper M, Heck AJ.** (2006) "Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations". *Mol. Syst. Biol.* **2**:2006-2026.
- Komeili A, Wedaman KP, O'Shea EK, Powers T.** (2000) "Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signalling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors". *J. Cell Biol.* **151**(4):863-878.
- Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Teunissen AW, Donaton MC, Van Dijk p, Winderickx J, de Winde JH, Thevelein JM.** (1999) "A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose". *Mol. Microbiol.* **32**(5):1002-1012.
- Krems B, Charizanis C, Entian KD.** (1996) "The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance". *Curr. Genet.* **29**(4):327-334.

- Kuge S, Jones N.** (1994) "YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides" *EMBO J.* **13**(3):655-664.
- Kunkee RE, Bisson LF.** (1993) "Wine-making yeasts". p.69-127. In: Rose, A. H., Harrison, J. S. (eds). *The Yeasts* 2nd Ed Vol. 5. Academic Press, London.
- Lages F, Lucas C.** (1997) "Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*". *Biochem. Biophys. Acta* **1322**:8-18.
- Lambrechts M, Pretorius IS.** (2000) "Yeast and its importance to wine aroma". *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**:97-129.
- Larsson K, Ansell R, Eriksson P, Adler L.** (1993) "A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*" *Mol. Microbiol.* **10**(5):1101-1111.
- Leao C, van Uden N.** (1984) "Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*". *Biochim. Biophys. Acta* **774**:43-48.
- Lee FJ, Hassan HM.** (1988) "Stability and expression of a plasmid-containing killer toxin cDNA in batch and chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnol. Bioeng.* **31**(8):783-789.
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE.** (1993) "A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signaling by protein kinase C". *Mol. Cell Biol.* **13**:3067-3075.
- Lenssen E, Oberholzer U, Labarre J, De Virgilio C, Collart MA.** (2002) "*Saccharomyces cerevisiae* Ccr4-not complex contributes to the control of Msn2p-dependent transcription by the Ras/cAMP pathway". *Mol. Microbiol.* **43**(4):1023-1037.
- Levy M.** (1933) "Equilibria in the formol tritration". *J. Biol. Chem.* **99**:767-779.
- Lewis DA, Bisson LF.** (1993) "The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters". *Mol. Cell Biol.* **11**(7):3804-3813.

- Lewis JG, Learmonth RP, Watson K.** (1995) "Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology* 141:687-694.
- Lilly M, Bauer FF, Styger G, Lambrechts MG, Pretorius IS.** (2006) "The effect of increased branch-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour properties of wine and distillates". *FEMS Yeast Res.* **6**:726-743.
- Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS.** (2000) "Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavour profiles of wine and distillates". *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:744-753.
- Liu Y, Ishii S, Tokai M, Tsutsumi H, Ohki O, Akada R, Tanaka K, Tsuchiya E, Fukui S, Miyakawa T.** (1991) "The *Saccharomyces cerevisiae* genes (*CMP1* and *CMP2*) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B". *Mol. Gen. Genetics* **150**:1443-1457.
- Llauradó JM, Rozés N, Constantí M, Mas A.** (2005) "Study of *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking after preadaptation at low temperatures". *J. Agric. Food Chem.* **53**:1003-1011.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN.** (2002) "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control". *Mol. Cell* **10**(3):457-468.
- Longo E, Vezinhet F.** (1993) "Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:322-326.
- Longtine MS, McKenzie III A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR.** (1998) "Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **14**:953-961.
- Lonvaud-Funel A.** (1999) "Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine". *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**(1-4):317-331.
- Lucas C, da Costa M, van Uden N.** (1990) "Osmoregulatory active sodium-glycerol cotransport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*". *Yeast* **6**:187-191.

- Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, Hohmann S.** (1995) "Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress". *EMBO J.* **14**:1360-1371.
- Maeda T, Takekawa M, Saito H.** (1995) "Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor" *Science* **269**(5223):554-558.
- Magasanik B.** (1992) "Regulation of nitrogen utilization". In: Jones E.W., Pringle, J.R., and Broach, J.R. (ed.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Volume II: gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Mager WH, De Kruijff AJ.** (1995) "Stress-induced transcriptional activation". *Microbiol. Rev.* **59**(3):506-531.
- Malherbe DF, du Toit M, Cordero RR, van Rensburg, P, Pretorius IS.** (2003) "Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**:502-511
- Manzanares P, Orejas M, Gil JV, de Graaf L, Visser J, Ramón D.** (2003) "Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* gene, encoding an α -L-rhamnosidase of enological interest". *Appl. Env. Microbiol.* **69**:502-511.
- Marchler G, Schüller C, Adam G, Ruis H.** (1993) "A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions". *EMBO J.* **12**(5):1997-2003.
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, Andre B.** (1997) "A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biol.* **17**:4282-4293.
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, Andre B.** (1994) "Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*". *EMBO J.* **13**:3456-3463.
- Marks VD, Ho Sui SJ, Erasmus D, van der Merwe GK, Brumm J, Wasserman WW, Bryan J, van Vuuren, HJ.** (2008) "Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response." *FEMS Yeast Res.* **8**:35-52.

- Marks VD, van der Merwe GK, van Vuuren HJJ.** (2003) "Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate". *FEMS Yeast Res.* **3**:269-287.
- Martin TF.** (1998) "Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking". *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**:231-264.
- Martínez P, Valcárcel MJ, Pérez L, Benítez T.** (1998) "Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds". *Am. J. Enol. Vitic.* **49**: 240-250.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schuller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F.** (1996) "The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE)". *EMBO J.* **15**:2227-2235.
- Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MA.** (2008) "The anti-angiogenic 8-epipuupehedione behaves as a potential anti-leukaemic compound against HL-60 cells". *J. Cell Mol. Med.* **12**(2):701-706.
- Martini A, Vaughan-Martini A.** (1990) "Grape must fermentation: past and present". 105-123. En Spencer, J. F. T., Spencer, D. M. (ed.) *Yeast technology*. Springer-Verlag. Berlín.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW.** (1997) "Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genes Dev.* **11**:3445-3458.
- Mbonyi K, van Aelst L, Argüelles JC, Jans AWH, Thevelein JM.** (1990) "Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase". *Mol. Cell Biol.* **10**:4518-4523.
- McCartney RR, Schmidt MC.** (2001) "Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit". *J. Biol. Chem.* **276**:36460-36466.

- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J.** (2007) "Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches". *Cell* **131**(1):121-135.
- Mendes-Ferreira A, Mendes-Faia A, Leao C.** (2004) "Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry". *J. Appl. Microbiol.* **97**:540-545.
- Mendes-Ferreira A, del Olmo M, García-Martínez J, Jiménez-Martí E, Mendes-Faia A, Pérez-Ortín JE, Leão C.** (2007a) "Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to different nitrogen concentrations during alcoholic fermentation". *Appl. Env. Microbiol.* **73**(9):3049-3060.
- Mendes-Ferreira A, del Olmo M, García-Martínez J, Jiménez-Martí E, Leão C, Mendes-Faia A, Pérez-Ortín JE.** (2007b) "*Saccharomyces cerevisiae* signature genes for predicting nitrogen deficiency during alcoholic fermentation". *Appl. Env. Microbiol.* **73**(16):5363-5369.
- Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Inês A, Mendes-Faia A.** (2009) "The timing of diammonium phosphate supplementation of wine must affects subsequent HS release during fermentation". *J. Appl. Microbiol.* **108**(2):540-549.
- Michnick S, Roustan JL, Remize F, Barre P, Dequin S.** (1997) "Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase". *Yeast* **13**:783-793.
- Mitchel RE, Morrison DP.** (1982) "Heat-shock induction of ionizing radiation resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, and correlation with stationary growth phase" *Radiat. Res.* **90**(2):284-291.
- Molin C, Jauhiainen A, Warringer J, Nerman O, Sunnerhagen P.** (2009) "mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress". *RNA* **15**:600-614.
- Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS, Agosin E.** (2007) "Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-

- derived volatile aroma compounds". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**(3):675-687.
- Monteiro F, Bisson LF.** (1992) "Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation". *Am. J. Enol. Vitic.* **43**:1-10.
- Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C.** (1994) "The biology of heat shock proteins and molecular chaperones". Cold Spring Harbor, New York.
- Moskvina E, Schüller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H.** (1998) "A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements". *Yeast* **14**(11):1041-1050.
- Nabais RC, Sá-Correia I, Viegas CA, Novais JM.** (1988) "Influence of calcium ion on ethanol fermentation by yeasts". *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2439-2446.
- Nanduri J, Tartakoff AM.** (2001) "Perturbation of the nucleus: a novel Hog1p-independent, Pkc1p-dependent consequence of hypertonic shock in yeast". *Mol. Cell Biol.* **12**(6):1835-1841.
- Neuman-Silberberg FS, Bhattacharya S, Broach JR.** (1995) "Nutrient availability and the Ras/cyclic AMP pathway both induce expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae* but by different mechanisms". *Mol. Cell Biol.* **15**(6):3187-3196.
- Nevoigt E, Stahl U.** (1996) "Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD⁺] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **12**(13):1331-1337.
- Nikawa J, Cameron S, Toda T, Ferguson KM, Wigler M.** (1987) "Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genes Dev.* **1**(9):931-937.
- Nissen P, Nielsen D, Arneborg N.** (2003) "Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by cell-cell contact-mediated mechanism". *Yeast* **20**(4): 331-341.
- Noda T, Ohsumi Y.** (1998) "Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast". *J. Biol. Chem.* **273**(7):3963-3966.

- Norbeck J, Blomberg A.** (1997) "Metabolic and regulatory changes associated with growth in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway". *J. Biol. Chem.* **272**:5544-5554.
- Norbeck J, Pählman AK, Akhtar N, Blomberg A, Adler L.** (1996) "Purification and characterization of two isoenzymes of DL-Glycerol-3-Phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway". *J. Biol. Chem.* **271**:13875-13881.
- Nordström K.** (1964a) "Formation of esters from acids by brewer's yeast. II. Formation from lower fatty acids". *J. Inst. Brew.* **70**:42-55.
- Nordström K.** (1964b) "Formation of esters from acids by brewer's yeast. IV. Effect of higher fatty acids and toxicity of lower fatty acids". *J. Inst. Brew.* **70**:233-242.
- Nordström K.** (1964c) "Formation of esters from alcohols by brewer's yeast". *J. Inst. Brew.* **70**:328-336.
- Novo M, Beltrán G, Rozés N, Guillamón JM, Sokol S, Leberre V, François J, Mas A.** (2007) "Early transcriptional response of wine yeast after rehydration: osmotic shock and metabolic activation". *FEMS Yeast Res.* **7**:304-316
- Nwaka S, Holzer H.** (1998) "Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**:197-237.
- Nwaka S, Mechler B, Destreulle M, Holzer H.** (1995) "Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEBS Lett.* **360**:286-290.
- Nykänen L, Nykänen I, Soumalainen H.** (1977) "Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium". *J. Inst. Brew.* **83**:32-34.
- Nykänen L.** (1986) "Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages". *Am. J. Enol. Viticult.* **37**:84-96.
- Pählman AK, Granath K, Ansell R, Hohmann S, Adler L.** (2001) "The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for

- glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress". *J. Biol. Chem.* **276**:3555-3563.
- Paltauf F, Daum G.** (1992) "Phospholipid transfer proteins from yeast". *Methods Enzymol.* **209**:514-522.
- Papamichos-Chronakis M, Gligoris T, Tzamarias D.** (2004) "The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor". *EMBO Rep.* **5**:368-372.
- Pascual-Ahuir A, Proft M.** (2007) "The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes". *EMBO J.* **26**:3098-3108.
- Pavlik P, Simon M, Schuster T, Ruis H.** (1993) "The glycerol kinase (*GUT1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization". *Curr. Genet.* **24**:21-25.
- Peddie HAB.** (1990) "Ester formation in brewery fermentations". *J. Inst. Brew.* **96**:327-331.
- Pedruzzi I, Dubouloz F, Cameroni E, Wanke V, Roosen J, Winderickx J, de Virgilio C.** (2003) "TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry to G0". *Mol. Cell* **12**(6):1607-1613.
- Pérez-González JA, González R, Querol A, Sendra J, Raom D.** (1993) "Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a b-(1,4)-endoglucanase activity and its use in microvinification processes". *Appl. Env. Microbiol.* **59**:2801-2806.
- Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T, Girio F.** (2006) "Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*". *Int. J. Food Microbiol.* **108**(3):336-345.
- Pérez-Ortín JE, García-Martínez J.** (2005) "Genómica y proteómica de levaduras vínicas". En: Carrascosa AV, Muñoz R, González R. Microbiología del vino. AMV ediciones. Madrid.
- Pérez-Ortín JE, del Olmo M, García-Martínez J.** (2009) "DNA arrays". En: König H, Uden G, Fröhlich J. Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. Springer-Verlag ed. Berlin, Heidelberg.

- Pérez-Torrado R, Bruno-Bárcena JM, Matallana E.** (2005) "Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making". *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11):6831-6837.
- Pérez-Torrado R, Carrasco P, Aranda A, Gimeno-Alcañiz J, Pérez-Ortín JE, Matallana E, del Olmo M.** (2002a) "Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes". *System Appl. Microbiol.* **25**:153-161.
- Pérez-Torrado R, Gimeno-Alcañiz JV, Matallana, E.** (2002b) "Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display an enhanced viability under glucose deprivation conditions". *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3339-3344.
- Pérez-Torrado R, Gómez-Pastor R, Larsson C, Matallana E.** (2009) "Fermentative capacity of dry active yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**:951-960.
- Pernambuco MB, Winderickx J, Crauwels M, Griffioen G, Mager WH, Thevelein JM.** (1996) "Glucose-triggered signalling in *Saccharomyces cerevisiae*: different requirements for sugar phosphorylation between cells grown on glucose and those grown on non-fermentable carbon sources". *Microbiology* **42**:1775-1782.
- Pham TK, Wright PC.** (2008) "The proteomic response of *Saccharomyces cerevisiae* in very high glucose conditions with amino acid supplementation". *J. Proteome Res.* **7**:4766-4774.
- Pierce JS.** (1987) "Horace Brown Memorial lecture: the role of nitrogen in brewing". *J. Inst. Brew.* **93**:378-381.
- Piper PW, Talreja K, Panaretou B, Moradas-Ferreira P, Byrne K, Praekelt UM, Meacock P, Reznacq M, Boucherie H.** (1994) "Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold". *Microbiology* **140**:3031-3038.
- Posas F, Chambers JR, Heyman JA, Hoeffler JP, de Nadal E, Ariño J.** (2000) "The transcriptional response of yeast to saline stress". *J. Biol. Chem.* **275**:17249-17255.

- Posas F, Takekawa M, Saito H.** (1998a) "Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast". *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:175-182.
- Posas F, Witten EA, Saito H.** (1998b) "Requirement of STE50 for osmotic stress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high osmolarity glycerol response pathway". *Mol. Cell Biol.* **18**:5788-5796.
- Pretorius IS, Bauer FF.** (2002) "Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains". *Trends Biotechnol.* **20**(10):426-432.
- Pretorius IS.** (2000) "Tailoring wine yeasts for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking". *Yeast* **16**:675-729.
- Pretorius IS.** (2003) "The genetic analysis and tailoring of wine yeasts". p. 99-142. In: J. H. de Winde (ed), *Functional genetics of industrial yeasts*. Springer.
- Proft M, Serrano R.** (1999) "Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation" *Mol. Cell Biol.* **19**(1):537-546.
- Puig S, Pérez-Ortín JE.** (2000a) "Expression levels and patterns of glycolytic genes during wine fermentation". *Syst. Appl. Microbiol.* **23**:300-303.
- Puig S, Pérez-Ortín JE.** (2000b) "Stress response and expression patterns in wine fermentation of yeast genes induced at the diauxic shift". *Yeast* **16**(2):139-148.
- Puig S, Querol A, Barrio E, Pérez-Ortín JE.** (2000c) "Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(5):2057-2061.
- Queralt E, Igual JC.** (2003) "Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling". *Mol. Cell Biol.* **23**(9):3126-40.
- Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D.** (1992a) "Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines, selection and DNA patterns". *J. Food Sci.* **57**:183-185.

- Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramón D.** (1992b) "Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains". *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2948-2953.
- Rachidi N, Barre P, Blondin B.** (1999) "Multiple Ty-mediated chromosomal translocation lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen Genet.* **261**(4-5):841-850.
- Rachidi N, Martínez MJ, Barre P, Blondin B.** (2000) "*Saccharomyces cerevisiae* PAU genes are induced by anaerobiosis". *Curr. Genet.* **37**(1):1-11.
- Ramey DD, Ough CS.** (1980) "Volatile ester hydrolysis on formation during storage of model solutions and wines". *J. Agric. Food Chem.* **28**:928-934.
- Ramón D.** (2005) "Mejora de levaduras vínicas mediante técnicas de ingeniería genética". En: Carrascosa AV, Muñoz R, González R. Microbiología del vino. AMV ediciones. Madrid.
- Rapp A, Versini G.** (1991) "Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines". In: Ranz J.M. (ed), Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, American Society of Enology and Viticulture. Davis, CA.
- Ratledge C, Evans CT.** (1989) "Lipids and their metabolism". pp. 367-455. En Rose, A. H., Harrison, J. S. (ed.), The yeasts, vol III. Academic Press Limited, London.
- Rauhut D, Kürbel H.** (1996) "Identification of wine aroma defects caused by sulfur-containing metabolites of yeast". pp. 515-519. En Lonvaud-Funel, A. (coordinador), Enologie 95, 5e Symposium International d'Oenologie. Bordeaux-Lac.
- Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A.** (2006) "Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics". *J. Proteome Res.* **5**:1543-1554.
- Reiser V, Ruis H, and Ammerer G.** (1999) "Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Biol. Cell* **10**:1147-1161.

- Remize F, Cambon B, Barnavon L, Dequin S.** (2003) "Glycerol formation during wine fermentation is mainly linked to Gpd1p and is only partially controlled by the HOG pathway". *Yeast* **20**:1243-1253.
- Remize F, Roustan JL, Sablayrolles JM, Barre P, Dequin S.** (1999) "Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase". *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:143-149.
- Rep M, Albertyn J, Thevelein J, Prior BA, Hohmann S.** (1999a) "Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiology* **145**:715-727.
- Rep M, Krantz M, Thevelein J, Hohmann S.** (2000) "The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes". *J. Biol. Chem.* **275**:8290-8300.
- Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G, Ruis H.** (1999b) "Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p". *Mol. Cell Biol.* **19**:5474-5485.
- Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A.** (2000) "Handbook of enology". Vol 1. The Microbiology of wine and vinifications. Wiley & Sons. England.
- Riou C, Nicaud JM, Barre P, Gaillardin C.** (1997) "Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation". *Yeast* **13**:903-915.
- Roberts SM, Winston F.** (1997) "Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes" *Genetics* **147**(2):451-465.
- Robertson LS, Causton HC, Young RA, Fink GR.** (2000) "The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5984-5988.

- Robertson LS, Fink GR.** (1998) "The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(23):13783-13787.
- Robyt JF, Whelan WJ.** (1972) "Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper". *Anal. Biochem.* **45**:510-516.
- Rohde JR, Bastidas R, Puria R, Cardenas ME.** (2008) "Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*" *Curr. Opin. Microbiol.* **11**(2):153-160.
- Rohde JR, Campbell S, Zurita-Martinez SA, Cutler NS, Ashe M, Cardenas ME.** (2004) "TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors" *Mol. Cell Biol.* **24**(19):8332-8341.
- Rolland F, de Winde JH, Lemaire K, Boles E, Thevelein JM, Winderickx J.** (2000) "Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process". *Mol. Microbiol.* **38**(2):348-358.
- Romero-Santacreu L, Moreno J, Pérez-Ortín JE, Alepuz P.** (2009) "Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *RNA* **15**:1110-20.
- Rønnow B, Kielland-Brandt MC.** (1993) "*GUT2*, a gene encoding mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast* **9**:1121-1130.
- Roosen J, Engelen K, Marchal K, Mathys J, Griffioen G, Cameroni E, Thevelein JM, De Virgilio C, De Moor B, Winderickx J.** (2005) "PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability". *Mol. Microbiol.* **55**:862-880.
- Rosa MF, Sá-Correia I.** (1991) "In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:830-835.
- Rossignol T, Dulau L, Julien A, Blondin B.** (2003) "Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation". *Yeast* **20**:1369-1385.

- Rossignol T, Postaire O, Storai J, Blondin B.** (2006) "Analysis of the genomic response of a wine yeast to rehydration and inoculation". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**:699-712.
- Saerens SMG, Delvaux F, Verstrepen KJ, Van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR.** (2008) "Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(2):454-461.
- Salek A, Schnettler R, Zimmermann U.** (1990) "Transmission of killer activity into laboratory and industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* by electroinjection". *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:67-72.
- Salmon JM, Barre P.** (1998) "Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain". *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3831-3837.
- Sambrook J, Russell DW, Sambrook J.** (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". *Cold Spring Harbor.*
- Sánchez Y, Lindquist SL.** (1990) "HSP104 required for induced thermotolerance". *Science* **248**(4959):1112-1115.
- Sánchez-Torres P, González-Candelas L, Ramón D.** (1996) "Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* *abfB* gene". *FEMS Microbiol. Lett.* **145**:189-194.
- Sánchez-Torres P, González-Candelas L, Ramón D.** (1998) "Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin-b-glucosidase in a wine yeast strain". *J. Agric. Food Chem.* **46**:354-360.
- Santangelo GM.** (2006) "Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:253-282.
- Santhanam A, Hartley A, Düvel K, Broach JR, Garrett S.** (2004) "PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p" *Eukaryot. Cell* **3**(5):1261-1271.
- Savchenko A, Krogan N, Cort JR, Evdokimova E, Lew JM, Yee AA, Sánchez-Pulido L, Andrade MA, Bochkarev A, Watson JD, Kennedy MA, Greenblatt J, Hughes T, Arrowsmith CH, Rommens JM, and Edwards AM.** (2005) "The Shwachman-Bodian-Diamond

- syndrome protein family is involved in RNA metabolism". *J. Biol. Chem.* **19**:19213-19220.
- Schehl B, Müller C, Senn T, and Heinisch JJ.** (2004) "A laboratory strain suitable for spirit production". *Yeast* **21**:1375-1389.
- Scherens B, Feller A, Vierendeels F, Messenguy F, Dubois E.** (2006) "Identification of direct and indirect targets of the Gln3 and Gat1 activators by transcriptional profiling in response to nitrogen availability in the short and long term". *FEMS Yeast Res.* **6**(5):777-791.
- Schmidt A, Beck T, Koller A, Kunz J, Hall MN.** (1998) "The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates *NPR1* and inhibits turnover of the tryptophan permease". *EMBO J.* **17**(23):6924-6931.
- Schmitt AP, McEntee K.** (1996) "Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(12):5777-5782.
- Schmittgen T, Livak KJ.** (2008) "Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method". *Nature protocols* **3**:1101-1108.
- Schuller D, Casal M.** (2005) "The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:292-304.
- Schütz M, Gafner J.** (1993) "Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations". *J. Appl. Bacteriol.* **75**:551-558.
- Sherman F, Fink GR, Hicks J.** (1994) "Techniques and Protocols: Yeast RNA Isolation". In: *Methods in Yeast Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Siderius M, Van Wuytswinkel O, Reijenga KA, Kelders M, Mager WH.** (2000) "The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature". *Mol. Microbiol.* **36**:1381-1390.
- Sikorski RS, Hieter P.** (1989) "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics* **122**(1):19-27.
- Silljé HH, Paalman JW, ter Schure EG, Olsthoom SQ, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT.** (1999) "Function of trehalosa and glycogen

- in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **181**(2):396-400.
- Singleton VL, Esau P.** (1969) "Phenolic substances in grapes and wine and their significance". *Adv. Food Res.* **1**:1-282.
- Smith A, Ward MP, Garrett S.** (1998) "Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation". *EMBO J.* **17**(13):3556-3564.
- Snow, R.** (1983) "Genetic improvement of wine yeast", p. 439-459. In: J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, and A. R. W. Smith (eds.), *Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects.* Springer-Verlag, New York.
- Soubeyrand V, Luparia V, Williams p, Doco T, Vernhet A, Ortiz-Julien A, Salmon JM.** (2005) "Formation of micelle containing solubilised sterols during rehydration of active dry yeasts improves their fermenting capacity". *J. Agric. Food Chem.* **53**(20):8025-8032.
- Sprague GF, Cronan JE.** (1977) "Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism". *J. Bacteriol.* **129**:1335-1342.
- Sprague GF, Blair LC, Thorner J.** (1983) "Cell interactions and regulation of cell type in the *Saccharomyces cerevisiae*". *Annu. Rev. Microbiol.* **37**:623-660.
- Stanbrough M, Rowen DW, Magasanik B.** (1995) "Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen-regulated genes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9450-9454.
- Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, Stanley GA.** (2009) "Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**:139-149.
- Stathopoulos AM, Cyert MS.** (1997) "Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast". *Gene Dev.* **11**:3432-3444.
- Stephen DW, Rivers SL, Jamieson DJ.** (1995) "The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* **16**:415-423.

- Sumrada R, Cooper TG.** (1978) "Control of vacuole permeability and protein degradation by the cell cycle arrest signal in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **136**:234-246.
- Sumrada R, Cooper TG.** (1982) "Isolation of the *CAR1* gene from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of its expression". *Mol. Cell Biol.* **2**(12):1514-1523.
- Sun GY, Sun AY.** (1985) "Ethanol and membrane lipids". *Alcohol Clin. Exp. Res.* **9**:164-180.
- Sutherland FCW, Lages F, Lucas C, Luyten K, Albertyn J, Hohmann S, Prior BA, Kilian SG.** (1997) "Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **179**:7790-7795.
- Svetlov V, Cooper TG.** (1997) "The minimal transactivation region of *Saccharomyces cerevisiae* Gln3p is localized to 13 amino acids". *J. Bacteriol.* **179**:7644-7652.
- Swiegers JH, Capone DL, Pardon KH, Elsey GM, Sefton MA, Francis IL, Pretorius IS.** (2007) "Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma". *Yeast* **24**(7):561-574.
- Swiegers JH, Pretorius IS.** (2005) "Yeast modulation of wine flavour". *Adv. Appl. Microbiol.* **57**:131-175.
- Tai SL, Boer VM, Daran-Lapujade P, Walsh MC, De Winde JH, Daran JM, Pronk JT.** (2005) "Two dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures. Combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **280**:437-447.
- Taillandier P, Ramon Portugal F, Fuster A, Strehaiano P.** (2007) "Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content". *Food Microbiol.* **24**(1):95-100.
- Tamás MJ, Luyten K, Sutherland FCW, Hernández A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior BA, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, Hohmann S.** (1999) "Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation". *Mol. Microbiol.* **31**:1087-1104.

- ter Schure EG, van Riel NA, Verrips CT.** (2000) "The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Microbiol. Rev.* **24**(1):67-83.
- Thevelein JM, Cauwenberg L, Colombo S, De Winde JH, Donation M, Dumortier F, Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Nauwelaers D, Rolland F, Teunissen A, Van Dijck P, Versele M, Wera S, Winderickx J.** (2000) "Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance and growth in yeast". *Enzyme Microb. Tech.* **26**:819-825.
- Thevelein JM, de Winde JH.** (1999) "Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* **32**:1002-1012.
- Thevelein JM.** (1994) "Signal transduction in yeast". *Yeast* **10**(13):1753-1790.
- Thomas BJ, Rothstein R.** (1989) "Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA". *Cell* **56**:619-630.
- Thomas G, Hall MN.** (1997) "TOR signalling and control of cell growth". *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**(6):782-787.
- Thornton RJ, Eschenbruch R.** (1976) "Homothallism in wine yeast". *Antonie Van Leeuwenhoek* **42**(4):503-509.
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, Wigler M.** (1987b) "Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biol.* **7**(4):1371-1377.
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M.** (1987a) "Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase". *Cell* **50**(2):277-287.
- Toker A, Cantley LC.** (1997) "Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase". *Nature* **387**(6634):673-676.
- Tomás-Cobos L, Casadomés L, Mas G, Sanz P, Posas F.** (2004) "Expression of the *HXT1* low affinity glucose transporter requires the coordinated activities of the HOG and glucose signalling pathways". *J. Biol. Chem.* **279**:22010-22019.

- Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J, Pognan F, Hawkins E, Currie I, Davison M.** (2001) "Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology". *Proteomics* **1**(3):377-396.
- Torija MJ, Beltrán G, Novo M, Poblet M, Rozès N, Mas A, Guillamón JM.** (2003) "Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity". *J. Agric. Food Chem.* **51**(4):916-922.
- Trott A, Shaner L, Morano KA.** (2005) "The molecular chaperone Sse1 and the growth control protein kinase Sch9 collaborate to regulate protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics* **170**:1009-1021.
- Urban J, Soulard A, Huber A, Lippman S, Mukhopadhyay D, Deloche O, Wanke V, Anrather D, Ammerer G, Riezman H, Broach JR, de Virgilio C, Hall MN, Loewith R.** (2007) "Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell* **26**:663-674.
- Van Zyl PJ, Kilian SG, Prior BA.** (1990) "The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:231-235.
- Varela C, Cárdenas J, Melo F, Agosin E.** (2005) "Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions". *Yeast* **22**:369-383.
- Versele M, Lemaire K, Thevelein JM.** (2001) "Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems". *EMBO Rep.* **2**(7):574-579.
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour JP, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, Delvaux FR.** (2003) "Flavor-active esters: adding fruitiness to beer". *J. Biosci. Bioeng.* **96**:110-118.
- Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, Bauer F, Lonvaud A, Denayrolles M, Subden RE, van Vuuren HJJ.** (1997a) "Malolactic fermentation in grape musts by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*". *Am. J. Enol. Vitic.* **48**:193-197.
- Volschenk H, Viljoen M, Grobler J, Petzold B, Bauer F, Subden RE, Young RA, Lonvaud A, Denayrolles M, van Vuuren HJJ.** (1997b) "Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*". *Nature Biotechnol.* **15**:253-257

- Vuorio OE, Kalkkinen N, Londesborough J.** (1993) "Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalosa synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Eur. J. Biochem.* **16**(3):849-861.
- Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, Piper MDW, Pronk JT.** (2003) "Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Env. Microbio.l* **69**: 4534-4541.
- Walker GM.** (1998) "Yeast metabolism". In yeast. Physiology and biotechnology. Chapter 5. John Wiley & Sons Ltd.
- Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD.** (2008) "Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factor downstream of Ras/PKA, Tor and Sch9". *PLoS Genet.* **4**(1):e13
- Wenzel TJ, Luttk MA, van den Berg JA, de Steensma HY.** (1993) "Regulation of the *PDA1* gene encoding the E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*". *Eur. J. Biochem.* **218**:405-411.
- Wera S, Bergsma JC, Thevelein JM.** (2001) "Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling". *FEMS Yeast Res.* **1**(1):9-13.
- Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM.** (1996) "Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* **19**(6):1159-1166.
- Whitney PA, Magasanik B.** (1973) "The induction of arginase in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **248**:6197-6202.
- Wiame JM, Grenson M, Arst HNJR.** (1985) "Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi". *Adv. Microb. Physiol.* **26**:1-88.
- Wiemken A, Durr M.** (1974) "Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*". *Arch. Microbiol.* **101**:45-57.
- Wilmes GM, Bergkessel M, Bandyopadhyay S, Shales M, Braberg H, Cagney G, Collins SR, Whitworth GB, Kress TL, Weissman JS, Ideker T, Guthrie C, Krogan NJ.** (2008) "A genetic interaction map

- of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing". *Mol. Cell* **32**(5):735-746.
- Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Va Dijck P, Thevelein JM.** (1996) "Regulation of genes encoding subunits of the trehalosa synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control?". *Mol. Gen Genet.* **252**(4):470-482.
- Wullschleger S, Loewith R, Oppliger W, Hall MN.** (2005) "Molecular organization of target of rapamycin complex 2". *J. Biol. Chem.* **280**(35):30697-30704.
- Yale J, Bohnert HJ.** (2001) "Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity". *J Biol. Chem.* **276**:15996-166007.
- Yamamoto A, DeWald DB, Boronenkov IV, Anderson RA, Emr SD, Koshland D.** (1995) "Novel PI(4)P 5-kinase homologue, Fab1p, essential for normal acule function and morphology in yeast". *Mol. Biol. Cell* **5**:525-539.
- Yan G, Shen X, Jiang Y.** (2006) "Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1". *EMBO J.* **25**(15):3546-3555.
- Yap NA, de Barros Lopes M, Langridge P, Henschke PA.** (2000) "The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous species of grape must: potential application in wine fermentation". *J. Appl. Microbiol.* **89**(3):381-389.
- Yin Z, Stead D, Selway L, Walker J, Riba-García I, McInerney T, Gaskell S, Oliver SG, Cash P, Brown AJP.** (2004) "Proteomic response to amino acid starvation in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*". *Proteomics* **4**:2425-2436.
- Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS.** (2002a) "Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **277**(34):31079-31088.
- Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sone H.** (2002b) "Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**(4-5):501-508.

- Zabrocki P, Van Hoof C, Goris J, Thevelein JM, Winderickx J, Wera S.** (2002) "Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signaling in yeast". *Mol. Microbiol.* **43**(4): 835-842.
- Zaragoza O, Vincent O, Gancedo JM.** (2001) "Regulatory elements in the *FBP1* promoter respond differently to glucose-dependent signals in *Saccharomyces cerevisiae*". *Biochem J.* **359**:193-201.
- Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I.** (2008) "Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking". *Int. J. Food Microbiol.* **125**(2):197-203.
- Zuzuarregui A, and del Olmo M.** (2004a) "Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection". *Antonie van Leeuwenhoek* **85**:271-280.
- Zuzuarregui A, and del Olmo M.** (2004b) "Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behaviour". *FEMS Yeast Res.* **4**:699-710.
- Zuzuarregui A, Carrasco P, Palacios A, Julien A, del Olmo M.** (2005) "Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strain at the beginning of vinification". *J. Appl. Microbiol.* **98**(2):299-307.
- Zuzuarregui A, Monteoliva L, Gil C, and del Olmo M.** (2006) "Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation". *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:836-847.

Anexos

Anexo 1

Valores de expresión de amonio/aminoácidos del experimento de micromatrices llevado a cabo en el Capítulo 1 (apartado 4).

Anexo 2

Valores de expresión de la cepa W303 YPD/YP20 del experimento de micromatrices llevado a cabo en el Capítulo 2 (apartado 1).

Anexo 3

Valores de expresión de las cepas $\Delta yhr087w$ /BY4742 del experimento de micromatrices llevado a cabo en el Capítulo 2 (apartado 3.3.5).

Anexo 4

Valores de expresión de las cepas ICV16/W303 diploide del experimento de micromatrices llevado a cabo en el Capítulo 3 (apartados 1.1 y 1.2).

Todos se permiten en el trabajo de la tesis un apartado en el que ser subjetivo y escribir las cosas como las sientes y no como resultan de un experimento, tener la capacidad de agradecer a las personas que tanto dentro como fuera del ámbito del laboratorio te han ayudado y apoyado durante los años de realización de la misma. Y como a todos, se hace muy complicado por quién empezar, aunque el orden de nombrarlos no implica el grado de importancia, porque si fuera así todos tendrían que estar en el primer puesto.

En primer lugar, darle las gracias a Marce, porque sin la oportunidad que me brindó hace ya seis años, nada de esto hubiera sido posible. Gràcies Marce: m'has guiat de la millor manera possible i m'has ensenyat tot el que sé. De tú no només he après a treballar sino també a fer bé les coses, a intentar donar sempre un poc més d'un mateix, que sempre es pot.

A las persona que están y que han pasado por el departamento. A los profesores, técnicos y secretarias que siempre han estado dispuestos a echarnos una mano, darnos una explicación o lo que hiciera falta en el momento que lo hemos necesitado.

Dar también las gracias a las personas que me han dado la oportunidad de trabajar con ellas. A la Dra. Concha Gil y su laboratorio, en especial a las chicas del servicio de proteómica, por acogerme dos mesecitos en su laboratorio como una más. A la Dra. Claire Moore y su grupo de trabajo, por mostrarme toda su experiencia y ponerla a mi disposición, y permitirme trabajar en un mundo tan diferente al que conocía. Y a la Dra. Paqui Rández, el Dr. José Anotnio Prieto y la gente del IATA por ayudarme en los últimos experimentos.

Agradecer a Lau y a Lore el buen año que pase viviendo con ellas. De ellas aprendí que la convivencia puede ser una experiencia maravillosa. Y tampoco olvidar a los compis de la carrera *et al.*: Hilària, Minerva, Emilio, Salva, Francesc, David y Teresa. Por los buenos comienzos y todo lo que ha venido después.

Y a es@s compañer@s de lab (las que siempre han estado, las que empiezan y las que ya se han ido): gracias. Madre mía, sin ell@s nada hubiera sido lo mismo. Gracias a "les xiquetes": Lore, Inma y María, por todos nuestros momentos, los buenos, los malos y los del medio, porque todos han valido la pena a vuestro lado. A las nuevas adquisiciones: Natalia, Manolo, Raquel y Mercé, que ya se han convertido en imprescindibles. No quiero olvidarme de otros: Jordi, María Oliver, la Zalve, Pepo y Laura, que siempre ayudan a que los buenos momentos sean mejores con su compañía.

A mis amigos: Ana, Raúl, Lore, José Luis, Irene, Charo, Noe, Jorge, Edu y Pepe; intentando siempre animar en los bajones y alegrándose por las cosas conseguidas.

Por supuesto, gracias a mi familia. Han sido siempre un punto de apoyo para contarles todo lo que me ocurría y siempre han sabido darme la visión de las cosas desde otra perspectiva. Papis, gràcies per tot, no cal que diga res més, ya sabeis que lo sois todo para mí. A Cari, por las conversaciones de viernes tarde en tu casa. I a vosaltres germanets (el 3+2) també: sempre intentant entendre el que faig. I permetiu-me que li done les gràcies en especial a Clara per l'esforç que ha fet amb la portada.

Y, por último, aunque no por eso menos, gracias a Pedro. En estos últimos años has sido mi punto de apoyo, mi compañero y confidente; el nene que más me ha soportado y con el que tanto estoy aprendiendo. Has permitido que el camino fuera mucho más fácil y bonito, simplemente porque has estado siempre a mi lado.

P.S.: Este trabajo ha sido financiado con la ayuda del proyecto AGL-2005-00508 y la beca pre-doctoral BES-2006-12898.