

Tesi Doctoral

**EFFECTES DE FÀRMACS INTERCALANTS DEL  
DNA EN L'EXPRESSIÓ GÈNICA A  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Marta Rojas Amadó**





Barcelona, Setembre 2007

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR  
Programa de Doctorat de Biomedicina  
Bienni 2002-2004

**EFFECTES DE FÀRMACS INTERCALANTS DEL DNA EN L'EXPRESSION  
GÈNICA A *Saccharomyces cerevisiae***

Memòria presentada per **Marta Rojas Amadó**  
Per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

**Tesis Doctoral realitzada en el Departament de Biologia  
Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona  
(IBMB-CSIC)**

Directors

**José Portugal Minguela**

**Benjamin Piña Capó**

Tutor

**Rafael Franco Fernández**

## **Resultats**

---

## **Capítol I.**

# **ANÀLISI DE L'ACTIVITAT CITOTÒXICA DELS INTERCALADORS**

## A. ESTUDI DE TOXICITAT DELS INTERCALANTS EN SOQUES DE LLEVAT AMB DIFERENTS DOTACIONS GÈNIQUES

Per estudiar l'efecte dels fàrmacs en la capacitat proliferativa del llevat es van realitzar corbes de creixement incrementant la dosi del fàrmac, amb diferents soques mutants i en dos medis, variant la font de carboni, glucosa i galactosa.

Les soques testades en aquest estudi (Materials i Mètodes) es poden catalogar en dos grups, soques amb la membrana plasmàtica alterada i soques amb defectes en la maquinària de reparació de dany al DNA.

En el primer grup s'estudia el creixement de la soca *Δerg6* i la *ISE2*. La soca amb el gen *ERG6* disrumpit és isogènica amb la soca salvatge BY4741. El gen *ERG6* és el responsable de convertir el zimosterol en fecosterol en la ruta biosintètica de l'ergosterol. La soca *ISE2* (JN362a) l'obtenen el grup del Dr. Wang mitjançant mutagènesi amb EMS (Nitiss and Wang, 1988; Nitiss et al., 1992). És una soca que presenta una mutació dominant no ben definida en el gen putatiu *ISE2*. La mutació en el gen *ISE2* confereix a les cèl·lules la propietat de ser parcialment permeables a la ciclohexamina i a inhibidors de les topoisomereses (Nitiss and Wang, 1988), en canvi, aquesta soca no és gaire sensible a mutàgens com l'etopòsid (Nitiss et al., 1992). La soca parcialment permeable *ISE2Δrad52* (JN394) és isogènica amb la JN362a (Nitiss et al., 1992).

El gen *RAD52* codifica per una proteïna responsable de la recombinació homòloga, un mecanisme del que disposa la cèl·lula per reparar lesions al DNA, concretament trencaments de doble cadena. Les cèl·lules deficientes en aquest mecanisme de reparació, són més sensibles a la radiació, la taxa de mutació augmenta i els nivells de recombinació induïda per l'efecte del psoralè disminueixen (Saffran et al., 2004). Per exemple, la mutació del *RAD52* confereix un fenotip d'hipersensibilitat a l'etopòsid i al mAMSA en la JN394 (Nitiss et al., 1992). Una altra soca utilitzada en l'assaig amb el mecanisme de reparació mutat és la *Δrad52* isogènica amb la BY4741.

El llevat pot aprofitar diferents fonts d'energia i de carboni. La glucosa és el sucre preferit, però també pot créixer en galactosa. Per aprofitar la galactosa el llevat té una maquinària específica, els gens de la família *GAL*.

## A.1 Creixement en glucosa com a font de carboni

### A.1.1 Permeabilitat de les soques

#### Efecte de la permeabilitat de la membrana en la citotoxicitat de la Daunorubicina

En la gràfica A de la Figura R1, es representa la capacitat proliferativa de tres soques en funció de la concentració de Daunorubicina present en el medi, dues de les soques tenen la membrana plasmàtica alterada, JN362a i  $\Delta erg6$ . El creixement de la soca salvatge no mostra cap variació pel rang de concentracions testades, patró similar per a la soca semipermeable JN362a. En canvi, la Daunorubicina sí que afecta al creixement de les  $\Delta erg6$ . La inhibició del creixement pel fàrmac segueix un patró de dosi-resposta a partir de  $3\mu\text{M}$ , i a mesura que la dosis augmenta, el creixement disminueix, fins assolir dosis molt tòxiques al voltant dels  $100\mu\text{M}$  Daunorubicina.

#### Efecte de la permeabilitat de la membrana en la citotoxicitat de la Criptolepina

Tal com es mostra en la gràfica B de la Figura R1, la Criptolepina a elevades concentracions presenta un efecte negatiu en el creixement, tant per a cèl·lules salvatges com per les que tenen la membrana alterada. En presència de la concentració màxima,  $100\mu\text{M}$ , la soca salvatge redueix la taxa proliferativa un 40%. L'efecte citotòxic en la JN362a és més pronunciat a elevades dosis, arribant a una IC90 en presència de  $100\mu\text{M}$ . La Criptolepina afecta al creixement de les cèl·lules  $\Delta erg6$  a concentracions baixes, al voltant d' $1\mu\text{M}$  el creixement ha disminuït un 20%, segueix un comportament dosi-depenent, arribant a una IC20 en presència de  $100\mu\text{M}$  Criptolepina.

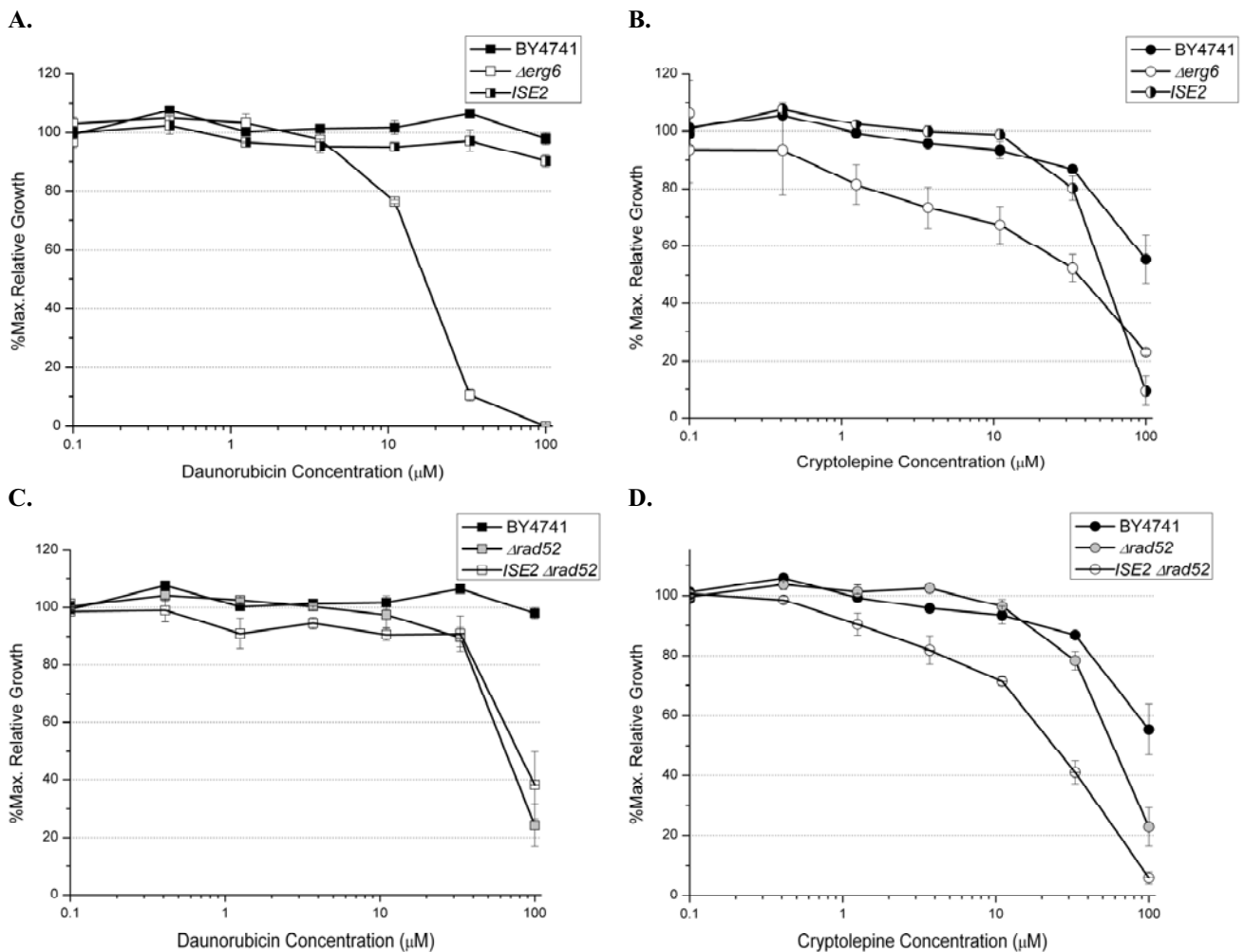
### A.1.2 Mecanisme de reparació del dany al DNA

#### Efecte de la Daunorubicina en el mecanisme de reparació.

La gràfica C de la Figura R1, mostra l'efecte inhibitori del fàrmac depenent del mecanisme de reparació de lesions al DNA. El creixement de les soques mutants pel gen *RAD52* s'afecta a partir del tractament amb  $30\mu\text{M}$  Daunorubicina. La disminució de la proliferació tant per la doble mutant JN394, com per la  $\Delta rad52$  mostra un perfil molt semblant, la taxa inhibitoria augmenta al voltant d'un 70% per a la concentració màxima de fàrmac.

### Efecte de la Criptolepina en el mecanisme de reparació.

La gràfica D de la Figura R1, mostra la relació fenotípica de la Criptolepina amb el mecanisme reparador del dany al DNA. L'efecte citotòxic en les cèl·lules amb la membrana íntegra i  $\Delta rad52$  és evident a partir del tractament amb  $30\mu\text{M}$ , arribant a una IC<sub>20</sub> amb  $100\mu\text{M}$ . L'efecte en la soca JN394 és dosi-depenent, a baixes concentracions s'observa una lleu inhibició del creixement, fins aconseguir un efecte quasi letal, IC<sub>95</sub>, en cèl·lules dobles mutants tractades amb  $100\mu\text{M}$  de Criptolepina.



**Fig. R1. Efecte citotòxic de la Daunorubicina i la Criptolepina en diverses soques;** soques amb alteracions de la membrana plasmàtica, A i B; soques amb la maquinària de reparació alterada, C i D. La taxa de proliferació de les diverses soques és relativa als cultius controls no tractats, que corresponen al 100% del creixement. Es representa el promig de la taxa de creixement de 3 cultius i la desviació estàndard dels triplicats.



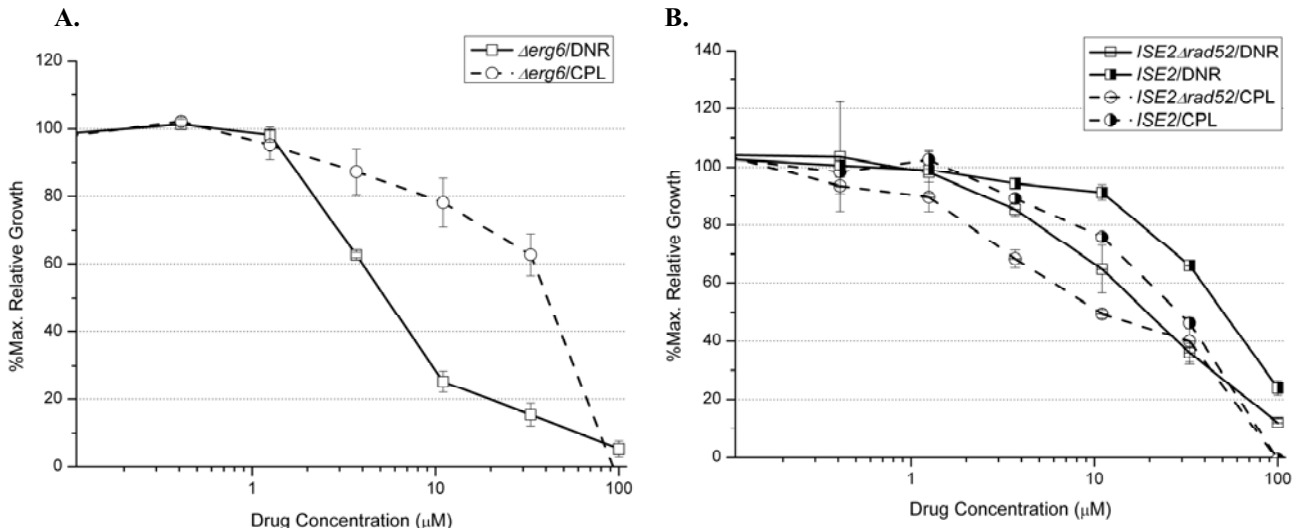
## A.2 Creixement en galactosa com a font de carboni

### A.2.1 Especificitat del fàrmac

La gràfica A de la Figura R2, mostra l'efecte dels intercalants en la velocitat de creixement de cèl·lules mutants pel gen de la biosíntesi de l'ergosterol *ERG6*, en un medi on la font de carboni és la galactosa.

La Daunorubicina té uns efectes en la taxa proliferativa de la soca *Δerg6* típics d'una corba dosi-resposta sigmoïdal. El creixement s'alenteix a dosis baixes, 2μM, i a mida que augmenta la concentració del fàrmac l'efecte inhibitori també, assolint dosis pròximes a la letalitat als 100μM. En canvi, l'efecte de la Criptolepina en les mateixes condicions té un efecte logarítmic. La taxa proliferativa disminueix fins aconseguir la dosis letal als 100μM.

En la gràfica B de la Figura R2, s'observa l'efecte dels intercalants en les diferents soques isogèniques. L'efecte d'ambdós fàrmacs en el creixement és molt similar entre les dues soques isogèniques JN362a i JN394. La taxa proliferativa d'aquestes soques semipermeables, disminueix linealment respecte la concentració. No obstant, la soca doble mutant és més sensible per a qualsevol de les dues molècules. En quant als fàrmacs, la Criptolepina té uns efectes citotòxics lleugerament majors, la presència de 100μM indueix en les dues soques efectes letals. El tractament amb la màxima concentració de Daunorubicina provoca en les cèl·lules una IC20, aproximadament.



**Fig. R2. Efecte citotòxic de la Daunorubicina (DNR) i la Criptolepina (CPL) en diverses soques en medi amb galactosa com a font de carboni. A.** Efecte de la Daunorubicina i la Criptolepina en el creixement de cèl·lules *Δerg6*. **B.** Resposta de les soques isogèniques al tractament amb els fàrmacs. La taxa de proliferació de les diverses soques és relativa als cultius controls no tractats, que corresponen al 100% del creixement. Es representa el promig de la taxa de creixement de 3 cultius i la desviació estàndard dels triplicats.

### A.3 Determinació de la IC50

A partir de les corbes de supervivència es va calcular la concentració que inhibeix el creixement cel·lular un 50% per a cada molècula intercaladora, és a dir la IC50 respecte les mateixes cèl·lules sense tractar (Taula R1).

L'efecte dels intercalants en la soca salvatge no s'ha pogut detectar en aquest rang de concentracions, ja que la IC50 en els dos fàrmacs supera els 100μM. Aquesta soca, en galactosa no es va estudiar degut a l'efecte quasi nul d'aquests fàrmacs. La soca *Δerg6*, isogènica a la salvatge, mostra un comportament molt diferent enfront els fàrmacs intercalants. Estudis previs amb diversos fàrmacs, han detectat per a les cèl·lules *Δerg6* una certa permeabilitat (Emter et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2002). La IC50 per la Daunorubicina s'aconsegueix a 17μM, i per la Criptolepina a 25μM. L'efecte de la Daunorubicina augmenta quan les *Δerg6* creixen en galactosa, la IC50 en aquestes condicions disminueix de l'ordre de 3 vegades, en canvi, per la Criptolepina la IC50 es manté semblant a les cèl·lules crescudes en glucosa. La manca del mecanisme de reparació del dany cel·lular, afecta de manera similar per als dos fàrmacs en glucosa, ja que la IC50 per cadascun d'ells és molt semblant, 81μM per la Daunorubicina i 70μM per la Criptolepina.

El tractament amb Daunorubicina en la soca *ISE2* (JN362a) no és citotòxic (al menys pel rang testat), presenta un perfil de creixement molt similar al de la soca salvatge quan creix en glucosa. La IC50 de la Criptolepina per a la soca *ISE2* està al voltant de 60µM. La concentració d'ambdós fàrmacs necessària per inhibir un 50% el creixement de les cèl·lules *ISE2*, es redueix a la meitat quan creixen amb galactosa. La Daunorubicina inhibeix la taxa de creixement al 50% de la soca *ISE2Δrad52* (JN394) a dosis elevades, 100µM. En glucosa, la concentració IC50 de Criptolepina en la soca doble mutant és 4 vegades menor que per la Daunorubicina. En galactosa, la inhibició de la proliferació en un 50% per a la soca doble mutant tractada amb Daunorubicina es redueix gairebé 5 vegades si es compara amb l'obtinguda en glucosa. L'efecte potencialment additiu de la galactosa i del fàrmac, també s'observa per la Criptolepina, tot i que és més lleuger, ja que la concentració per la IC50 es redueix a la meitat en la *ISE2Δrad52*.

	DNR		CPL	
	IC50 (µM)		IC50 (µM)	
GLUCOSA				
<b>BY4741</b>	<b>btd</b>		<b>&gt;100</b>	
<i>Δerg6</i>	<b>16.83</b>	±3.50	<b>25.03</b>	±4.87
<i>ISE2</i>	<b>&gt;&gt;100</b>		<b>57.65</b>	±12.58
<i>ISE2 Δrad52</i>	<b>98.69</b>	±16.45	<b>20.39</b>	±1.77
<i>Δrad52</i>	<b>80.84</b>	±15.69	<b>67.32</b>	±10.48
GALACTOSA				
<i>Δerg6</i>	<b>6.19</b>	±0.74	<b>29.49</b>	±5.98
<i>ISE2</i>	<b>52.66</b>	±4.69	<b>24.19</b>	±3.27
<i>ISE2 Δrad52</i>	<b>19.33</b>	±2.19	<b>11.30</b>	±1.36

**Taula R1** Valors de les concentracions de Daunorubicina (DNR) i Criptolepina (CPL) que inhibeixen el creixement cel·lular un 50% (IC50). Es va determinar la IC50 per les soques BY4741, *Δerg6*, *ISE2* (JN362a), *ISE2Δrad52* (JN394) i *Δrad52* en ambdós medis usats segons la font de carboni. Els valors es determinaren a partir de les corbes de creixement que es mostren en la Figura R1 i R2. S'indica el valor promig de les tres rèpliques determinat amb la funció *logistic* (Origin), i la desviació estàndard per cada triplicat.

## B. Acumulació intracel·lular de Daunorubicina en diverses soques

Per determinar si les respostes observades estan correlacionades amb la capacitat de les diverses soques de captar els fàrmacs, es va quantificar l'absorció cel·lular de la Daunorubicina en dues concentracions.

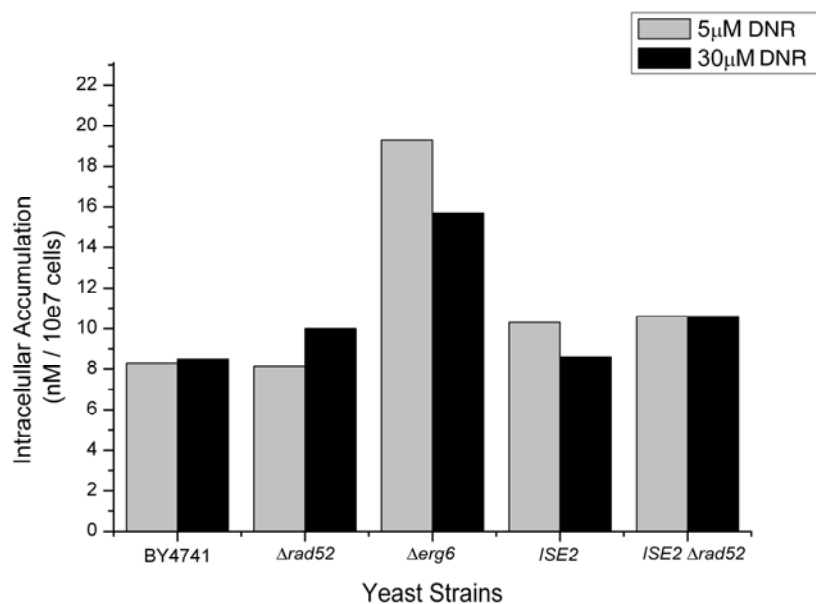
S'aprofità la propietat del cromòfor present en l'estructura de la Daunorubicina, d'emetre fluorescència quan s'excita a una determinada longitud d'ona, i mitjançant un

fluorímetre es va mesurar l'acumulació intracel·lular del fàrmac en el *Saccharomyces cerevisiae*, tant l'acumulat dins la cèl·lula com en les membranes (Materials i Mètodes).

La determinació de l'acumulació es va realitzar sobre lisats cel·lulars obtinguts de cultius tractats amb 5 $\mu$ M o 30 $\mu$ M de Daunorubicina. Es va determinar l'acumulació absoluta de la Daunorubicina per a cada soca mesurada en nM per 10<sup>7</sup> cèl·lules (Fig. R3).

Ambdós tractaments presenten uns valors similars en les soques estudiades, per a la  $\Delta$ erg6 s'indiquen els valors més variables (Fig. R3). En les cèl·lules  $\Delta$ erg6 la detecció disminueix per a la concentració elevada, fet que es podria explicar per l'elevada citotoxicitat que provoca la Daunorubicina en aquestes cèl·lules i per tant l'augment en la quantitat de cèl·lules mortes o lisades, alliberant fàrmac al medi sense estar associat a estructures cel·lulars.

Al comparar el fàrmac incorporat entre soques, ressaltava l'acumulació intracel·lular en la soca mutant pel gen implicat en la biosíntesi de l'ergosterol, gairebé del doble respecte les altres soques, les quals presenten entre elles nivells similars d'acumulació de Daunorubicina (Fig. R3).



**Fig. R3. Acumulació intracel·lular de la Daunorubicina (DNR) en diverses soques de llevat.** A partir de cultius tractats amb 5 $\mu$ M o 30 $\mu$ M de Daunorubicina, es representa la concentració del fàrmac (nM per 10<sup>7</sup> cèl·lules) en l'interior cel·lular per a la soca salvatge (BY4741), la  $\Delta$ rad52, la  $\Delta$ erg6, la ISE2 (JN362a) i de la ISE2 $\Delta$ rad52 (JN394).

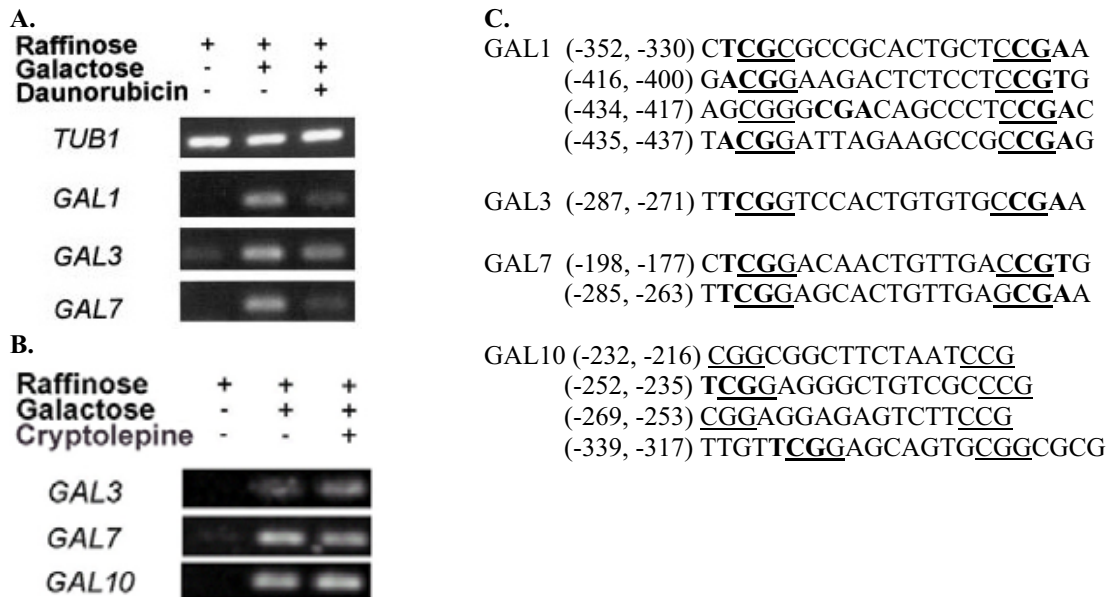
### C. Efecte de la Daunorubicina i la Criptolepina en la regulació dels gens de la família *GAL*

El llevat pot utilitzar altres sucres a part de la glucosa com font de carboni i d'energia, com per exemple la galactosa. En presència de glucosa, els gens del metabolisme de la galactosa estan reprimits per un mecanisme molt eficient (Flick and Johnston, 1992), tan sols en absència de glucosa al medi, la galactosa pot induir la transcripció dels gens *GAL* per part del Gal4p.

En el llevat quan utilitza la galactosa com a font de carboni i d'energia, s'indueixen els gens de la família *GAL* que estan sota la regulació del Gal4p. L'activació transcripcional dels gens *GAL* per la galactosa depèn completament de l'unió del Gal4p als promotors dels gens corresponents (Johnston and Carlson, 1992).

Les cèl·lules *Δerg6* al créixer en galactosa presenten un augment de la sensibilitat al tractament amb Daunorubicina però no en Criptolepina. Una de les consideracions, és l'impediment de l'activació dels gens que estan regulats per Gal4p per part del fàrmac. Els efectes directes de la Daunorubicina i la Criptolepina en la transcripció d'alguns gens *GAL* es mostren en la Figura R4, A i B. A partir d'un únic cultiu de la soca *Δerg6*, es divideix en tres cultius idèntics amb un 2% de rafinosa perquè la proteïna Gal4 sigui activa. En un dels cultius se li afegeix 1% de galactosa, a un altre a més de la galactosa, 2μM de Daunorubicina o Criptolepina i l'altre, resta com a control negatiu. Els nivells transcripcionals de *GAL1*, *GAL3*, *GAL7* o *GAL10* (segons el fàrmac) i, *TUB1* com a referent, es varen quantificar mitjançant la RT-PCR semiquantitativa (Fig. R4, A i B). L'expressió dels quatre gens *GAL* en el medi amb rafinosa és gairebé absent (Fig. R4, A i B, esquerra), a l'afegir galactosa, els nivells d'expressió augmenten bastant (Fig. R4, A i B, central). Aquesta inducció es reprimeix en presència de la Daunorubicina (Fig. R4, A, dreta), sobretot pels gens *GAL1* i *GAL7*, la quantificació del transcrit va desvetllar la disminució de la transcripció respecte el no tractat en un 61% i un 71% respectivament. El gen *GAL3* presentava uns nivells menors de repressió, un 31%. En canvi, en presència de Criptolepina al medi, l'expressió induïda per la galactosa manté els nivells de transcrit pels tres gens de la família *GAL*, *GAL3*, *GAL7* i *GAL10* (Fig. R4, B). El gen *TUB1*, usat com a referència no varia en cap dels tractaments. Les seqüències d'unió al DNA del factor de transcripció Gal4p en els promotors de *GAL1*, *GAL3*, *GAL7* i *GAL10* com els llocs d'unió de la Daunorubicina

en aquestes regions promotores s'indiquen en la Figura R4, C. Les seqüències de reconeixement del DNA del factor de transcripció i del fàrmac es solapen en la majoria dels casos.



**Fig. R4. Efectes de la Daunorubicina en l'expressió dels gens del metabolisme de la galactosa. A i B.** RT-PCR semiquantitativa dels gens *GAL1*, *GAL3*, *GAL7* o *GAL10* i el gen de referència *TUB1*. En la part superior s'indiquen les diverses condicions de creixement; YEP amb 2% rafinosa, 1% galactosa i 3µM Daunorubicina (**A.**) o 2µM Criptolepina (**B.**). **C.** Seqüències dels llocs UASgal en els promotors dels gens *GAL1*, *GAL3*, *GAL7* i *GAL10*. Les seqüències subratllades són els motius que reconeix Gal4p (CGG). Els llocs d'unió al DNA de la Daunorubicina (WCG) estan marcats en negreta.

## **Capítol II.**

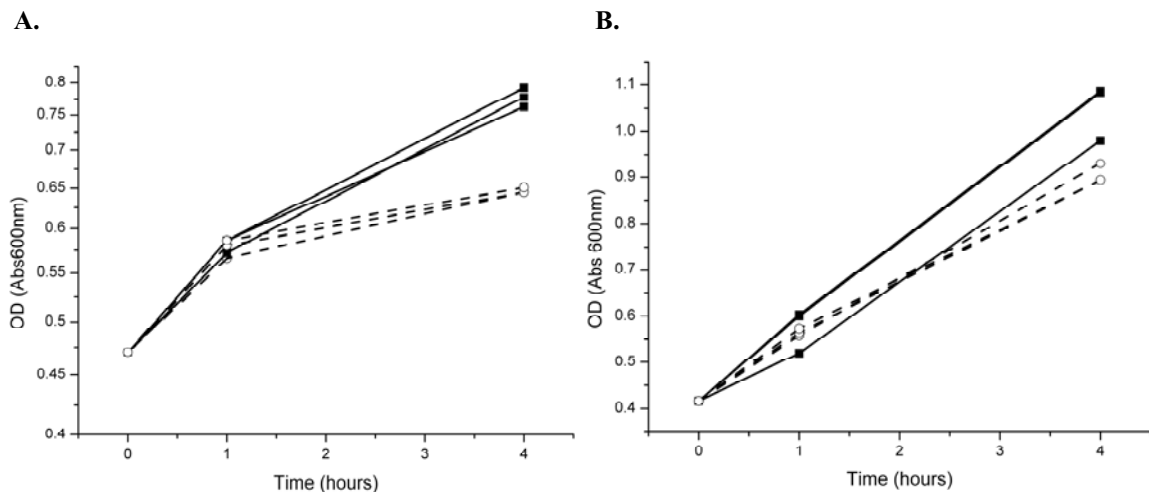
### **ESTUDI DE LA RESPOSTA GLOBAL DEL LLEVAT ALS INTERCALANTS DAUNORUBICINA I CRIPTOLEPINA**

### Primera Part. Estudi de la Resposta Global del Llevat a Tractaments Curts de Daunorubicina i Criptolepina

Les respostes transcripcionals presenten diferències significatives en funció del temps d'exposició a la condició d'estrès (Causton et al., 2001; Gasch et al., 2000). Per estudiar els efectes més primerencs i directes de la Daunorubicina i la Criptolepina en la maquinària transcripcional de les cèl·lules, es va realitzar una anàlisi de la resposta transcripcional del *Saccharomyces cerevisiae* a 1 i 4 hores.

La soca utilitzada en l'estudi va ser la  $\Delta erg6$ , la mutació del gen *ERG6* confereix permeabilitat als fàrmacs, degut a què la membrana plasmàtica està alterada. Les cèl·lules es van tractar durant el temps predeterminat amb la concentració de Criptolepina o Daunorubicina corresponent a la IC40.

L'experiment es va fer a partir de tres cultius independents, derivats d'un mateix cultiu mare en fase exponencial tal com s'explica en Materials i Mètodes. Les cèl·lules es van recollir tan bon punt s'afegí el fàrmac; el temps inicial anomenat temps 0 hores, al cap d'una hora, i al cap de quatre hores, tant pel cultiu tractat com pel no tractat. En la Figura R5, s'observa el creixement dels cultius que posteriorment serviran per l'anàlisi de la resposta transcripcional als fàrmacs.



**Fig. R5. Creixement dels cultius analitzats en l'estudi dels canvis transcripcionals per l'acció de la Daunorubicina (A) i de la Criptolepina (B).** —■— No tractats. -○- Tractats amb 12 μM Daunorubicina o 17 μM Criptolepina.



## A. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE CÈL·LULES TRACTADES AMB DAUNORUBICINA

Els valors de les expressions relatives dels 2692 gens presents en mínim 4 de les 6 rèpliques i en 2 temps (0, 1 i 4h), es van analitzar mitjançant un test d'anàlisi de variància unidireccional, *one-way* ANOVA (amb el valor de p ajustat a 0.001). Un 44% dels gens introduïts en l'anàlisi canvien significativament els nivells transcripcionals, és a dir, 1174 gens presenten canvis en els nivells de mRNA en presència de 12µM de l'antitumoral Daunorubicina. La Taula R2, mostra la quantitat de gens obtinguts per a cada criteri de selecció.

	Criteri	Quantitat de gens
Gens amb dades	4 valors per cada temps	2692
Gens significatius	Test de significança, <i>One way</i> ANOVA, p<0.001	1174
▪ Gens significatius amb expressió diferencial *	<0.5, gens reprimits	61
	>2, gens induïts	28
	>1.7, gens induïts	108
▪ Gens significatius del metabolisme dels carbohidrats*		30

**Taula R2. Quantitat de gens obtinguts en l'experiment de la resposta global a la Daunorubicina.** S'indiquen els diferents criteris i el nombre de gens que els sobrepassen. Els gens significatius marcats amb un asterisc (\*), s'han sotmès a una selecció addicional per eliminar falsos positius, la intensitat de la senyal, al menys per un dels fluorocroms, és major a 700 U.A.

### A.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment dependents de Daunorubicina

La quantificació de la resposta transcripcional del *Saccharomyces cerevisiae* ha servit per realitzar una anàlisi funcional dels gens expressats diferencialment. Els gens inclosos en l'anàlisi són els que han sofert una alteració de l'expressió superior al llindar establert, com s'explica a continuació.

El tractament amb 12µM Daunorubicina indueix l'increment de la transcripció en més de 1.7 vegades de 108 gens, i reprimeix més de la meitat la transcripció de 61 gens. L'agrupació jeràrquica defineix clarament dos grups de gens segons la similitud dels patrons transcripcionals (Fig. R6): gens amb l'expressió augmentada pel fàrmac, i gens amb l'expressió disminuïda. Els nivells transcripcionals canvien a 1 hora i es mantenen els nivells alterats fins les 4 hores de tractament. La resposta entre els dos temps de tractament és de tipus unimodal, tant els gens induïts, com els reprimits presenten un únic comportament. Per a cada conjunt definit en l'agrupació jeràrquica, es va comparar

el número de gens amb canvis d'expressió a 1 i a 4 hores (Fig. R7). El resultat confirmava el perfil detectat visualment en la Figura R6. Al voltant d'un 45% dels gens conserven els canvis en els nivells de trànscrips entre 1 i 4 hores de tractament, tant pels gens activats com pels reprimits (Fig. R7).

Entre els temps testats, la resposta transcripcional sembla independent all temps de tractament, els efectes provocats a una hora són els que es conserven a les 4 hores.

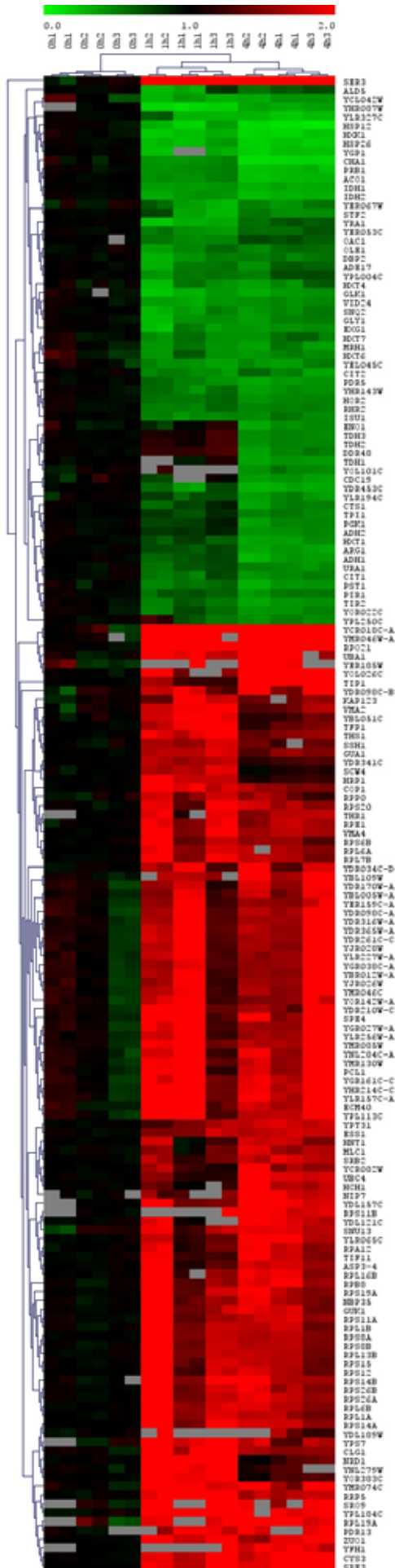


Fig. R6. Agrupació dels valors d'expressió gènica en el llevat després del tractament amb 12µM Daunorubicina. Els 169 gens diferencialment expressats s'agrupen jeràrquicament en funció de la similitud dels patrons d'expressió transcripcionals mitjançant el programa TIGR. Les columnes corresponen a les condicions experimentals, sis columnes per cada temps (0, 1 i 4 hores), cada gen està mínim per duplicat en un mateix microarray. Les files representen els valors de les expressions diferencials de cada gen, corregides per la mitjana del temps 0 del respectiu gen. A la part superior es mostra el rang d'expressió relativa, el verd indica repressió i el vermell activació.

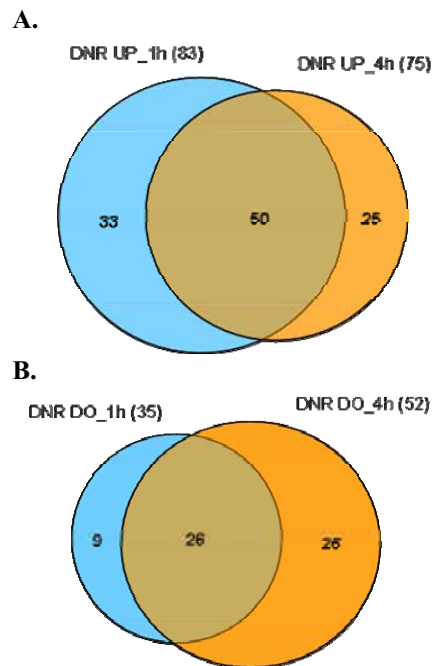


Fig. R7. Classificació dels gens induïts (A.) i reprimits (B.) en presència de 12µM Daunorubicina (DNR) durant 1 o 4 hores. Mitjançant un diagrama de Venn s'indica la quantitat de gens pertanyents a cada grup, entre parèntesis correspon al total de gens amb una expressió diferencial, pels activats (UP) superior a 1.7 i pels reprimits (DO) inferior a 0.5.

La caracterització funcional dels 108 gens amb una activació de l'expressió ha servit per identificar processos potencialment alterats pel fàrmac. Mitjançant el *GO term Finder* de la base de dades del *Saccharomyces Genome Database* o SGD, dirigit a <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>, s'han identificat tres grups de gens definits cadascun en un procés ontològic: la transposició mediada per la unió a l'RNA, la traducció, i l'acoblament de les unitats ribosomals (Taula R3). En la Taula R3, s'observa que els gens identificats en la síntesi ribosomal són un subgrup dels 28 gens relacionats amb la traducció. Al repetir l'anàlisi amb el total de gens sobreexpressats segons la funcionalitat, resulta que el producte de 23 gens són constituents estructurals dels ribosomes amb una probabilitat de 2E-10, els quals la gran majoria dels gens apareixen implicats en la traducció (Taula R3). Un altre grup de gens relacionats funcionalment, són els 28 gens amb productes que s'uneixen a proteïnes (valor de p 1.6E-6), compost majorment d'elements transposables (Taula R3).

GO	Gens activats	Valor p	Gens
<b>Transposició</b>	N=23 21.3%	6.8E-20	YBL005W-A, YBR012W-A, YDR034C-D, YDR098C-A, YDR098C-B, YDR170W-A, YDR210C-C/YDR210W-C, YDR261C-C, YDR316W-A, YDR365W-A, YER159C-A, YGR027W-A, YGR038C-A, YGR161C-C, YHR214C-C, YJR026W, YJR028W, YLR157C-A, YLR227W-A, YLR256W-A, YMR046C, YNL284C-A, YOR142W-A
<b>Traducció</b>	N=28 29.5%	1.4E-4	RPL13B, RPL16B, RPL19A, RPL1A, RPL1B, RPL6A, RPL6B, RPL7B, RPP0, RPS11A, RPS11B, RPS12, RPS14A, RPS14B, RPS15, RPS19A, RPS20, RPS26A, RPS26B, RPS6B, RPS8A, RPS8B, SRO9, SSZ1, THS1, TIF11, YDR341C, ZUO1
<b>Síntesi ribosomal</b>	N=8 14.8%	4.1E-4	NIP7, RPL6A, RPL6B, RPP0, RPS11A, RPS11B, RPS14A, RPS14B
<b>Constituents ribosomals</b>	N=23 20.4%	2.0E-10	RPL13B, RPL16B, RPL19A, RPL1A, RPL1B, RPL6A, RPL6B, RPL7B, RPP0, RPS11A, RPS11B, RPS12, RPS14A, RPS14B, RPS15, RPS19A, RPS20, RPS26A, RPS26B, RPS6B, RPS8A, RPS8B
<b>Unió a proteïnes</b>	N=28 25.9%	1.6E-6	HCH1, KAP123, MLC1, SSZ1, YBL005W-A, YBR012W-A, YDR034C-D, YDR098C-A, YDR098C-B, YDR170W-A, YDR210C-C/YDR210W-C, YDR261C-C, YDR316W-A, YDR365W-A, YER159C-A, YGR027W-A, YGR038C-A, YGR161C-C, YHR214C-C, YJR026W, YJR028W, YLR157C-A, YLR227W-A, YLR256W-A, YMR046C, YNL284C-A, YOR142W-A, ZUO1

**Taula R3. Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa superior a un factor d'1.7, en cèl·lules tractades amb 12µM Daunorubicina.** La primera columna descriu el procés o la funció compartida, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic del total dels 108 gens induïts, juntament amb la quantitat de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats.

La inhibició transcripcional dependent de la Daunorubicina afecta els nivells de mRNA de 61 gens, reduint-los més de la meitat. Al fer una recerca dels processos ontològics descrits pels gens reprimits es determina principalment el metabolisme dels carbohidrats (valor de p 7.9E-11) (Taula R4). Entre els gens implicats en el metabolisme

dels carbohidrats ressalta el subconjunt de gens glicolítics amb una major significança, no obstant, apareixen altres subconjunts de gens implicats en processos metabòlics relacionats (Taula R4). Les funcions ontològiques entre els gens reprimits, se'n descriuen principalment dues, una referent a l'activitat gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa (gens TDH(1-3)) i l'altra, encarregada del transport transmembranal, ja sigui de pentoses o manoses (*HXT1*, *HXT4*, *HXT6*, *HXT7*) (Taula R4).

GO	Gens inhibits	Valor p	Gens
Glicòlisi	N=9 14.8%	4.2E-11	<i>CDC19, ENO1, GLK1, HXK1, PGK1, TDH1, TDH2, TDH3, TPI1</i>
Metabolisme dels Carbohidrats	N=18 29.5%	7.9E-11	<i>ACO1, CDC19, CIT1, CIT2, CTS1, ENO1, EXG1, GLK1, HOR2, HXK1, IDH1, IDH2, PGK1, TDH1, TDH2, TDH3, TPI1, VID24</i>
Metabolisme dels alcohols	N=14 23.0%	1.3E-8	<i>ADH1, ADH2, CDC19, ENO1, GLK1, HOR2, HXK1, PGK1, RHR2, TDH1, TDH2, TDH3, TPI1, VID24</i>
Metabolisme dels àcid carboxílics	N=17 27.9%	1.1E-7	<i>ACO1, ALD5, ARG1, CDC19, CHA1, CIT1, CIT2, ENO1, GLY1, IDH1, IDH2, OLE1, PGK1, TDH1, TDH2, TDH3, VID24</i>
Biosíntesi del Glutamat	N=5 8.2%	1.4E-5	<i>ACO1, CIT1, CIT2, IDH1, IDH2</i>
Gluconeogènesi	N=6 9.8%	2.8E-5	<i>ENO1, PGK1, TDH1, TDH2, TDH3, VID24</i>
Metabolisme del Citrat	N=3 4.9%	7.2E-4	<i>ACO1, CIT1, CIT2</i>
Gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa	N=3 4.9%	7.3E-5	<i>TDH1, TDH2, TDH3</i>
Transportadors transmembranals de pentoses	N=3 4.9%	2.9E-4	<i>HXT1, HXT4, HXT7</i>
Transportadors transmembranals de manoses	N=4 6.6%	7.4E-4	<i>HXT1, HXT4, HXT6, HXT7</i>

**Taula R4. Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa inferior a la meitat al tractar les cèl·lules amb 12µM Daunorubicina.** La primera columna descriu el procés o la funció compartida, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic, del total de 61 gens inhibits més del doble juntament amb la quantitat de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació sigui a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats

## B. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL DE CÈL·LULES TRACTADES AMB CRIPTOLEPINA

Els valors dels 3838 gens presents en mínim 4 de les 6 rèpliques i en 2 temps (0, 1 i 4 hores) es van analitzar mitjançant un test d'anàlisi de variància unidireccional, *one-way* ANOVA. Gairebé un 23% dels gens canvien significativament en condicions d'alta astringència (p menor de 0.001), és a dir, l'expressió diferencial de 887 gens s'altera significativament com a resposta del tractament amb la Criptolepina. A continuació, en la Taula R5, es mostra el número de gens obtinguts per a cada criteri de selecció.

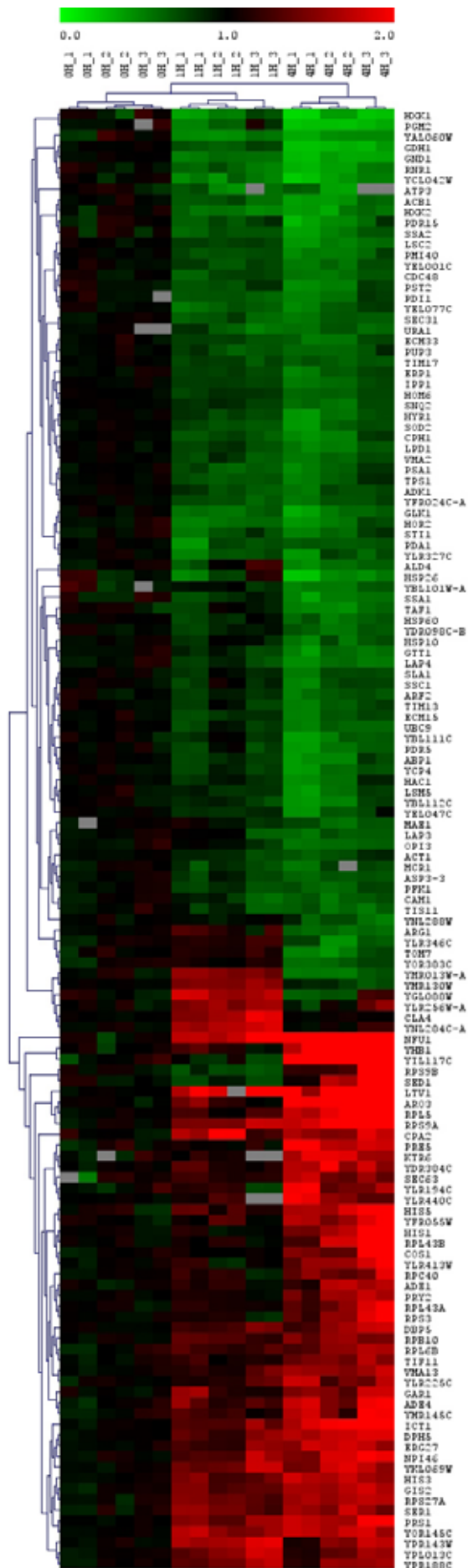
	<b>Criteri</b>	<b>Quantitat de gens</b>
Gens amb dades	4 valors per cada temps	3838
Gens significatius	One way ANOVA, $p < 0.001$	887
Gens significatius amb expressió diferencial	>2, gens induïts	7
	>1.5, gens induïts	56
	<0.5, gens reprimits	15
	<0.66, gens reprimits	80

**Taula R5. Quantitat de gens obtinguts en l'experiment de la resposta global a la Criptolepina.** S'indiquen els diferents criteris i el nombre de gens que els sobrepassen. Els gens significatius amb una expressió diferencial superior al factor indicat, s'han sotmès a una selecció addicional per eliminar falsos positius, la intensitat de la senyal, al menys per un dels fluorocroms, ha de ser major a 700 U.A.

### B.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment dependents de Criptolepina

L'anàlisi dels canvis d'expressió del *Saccharomyces cerevisiae* mitjançant els microarrays proporciona una informació útil per a l'estudi de les categories funcionals més representades en la resposta al tractament amb 17 $\mu$ M Criptolepina.

El tractament amb Criptolepina augmenta per sobre d'una vegada i mitja els nivells de mRNA de 56 gens respecte el no tractat, i els disminueix en 80 gens. Per facilitar la visualització i la interpretació dels patrons d'expressió gènics obtinguts, s'han representat els gens amb canvis significatius (amb una expressió relativa superior a 1.5 pels activats o inferior a 0.66 pels inhibits) segons la semblança dels perfils transcripcionals (Fig. R8). D'aquesta anàlisi s'extreuen 3 grups, els gens reprimits, els induïts i un petit grup d'onze gens, amb un comportament bimodal. Els gens amb un comportament unimodal són els que presenten una expressió diferencial similar en ambdós temps (Fig. R8).



**Fig. R8. Agrupació dels valors d'expressió gènica en el llevat després del tractament amb 17µM Criptolepina.** Els 136 gens diferencialment expressats s'agrupen jeràrquicament en funció de la similitud dels patrons d'expressió transcripcionals, mitjançant el programa TIGR. Les columnes corresponen a les condicions experimentals, sis columnes per cada temps (0, 1 i 4 hores), cada gen està mínim per duplicat en un mateix microarray. Les files representen els valors de les expressions diferencials de cada gen, corregides per la mitjana del temps 0 del respectiu gen. A la part superior es mostra el rang d'expressió relativa, el verd indica repressió i el vermell activació.

La interpretació de la resposta al tractament ve donada per la identificació de les categories funcionals dels gens diferencialment expressats. Mitjançant el *GO term Finder* de la base de dades del *Saccharomyces Genome Database* o SGD, dirigit a <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>, s'han identificat 22 gens sobreexpressats implicats en processos biosintètics (amb un valor p 7.3E-5), entre els quals hi ha 7 gens de la biosíntesi d'aminoàcids (valor p 6.8E-4) (Taula R6).

GO	Gens activats	Valor p	Gens
<b>Procés biosintètic</b>	N=22 51.2%	7.3E-5	ADE1, ADE4, ARO3, CPA2, DBP5, DPH5, ERG27, HIS1, HIS3, HIS5, KTR6, MRPS16, PRS1, RPL43A, RPL43B, RPL5, RPL6B, RPS27A, RPS3, RPS9A, SER1, TIF11
<b>Biosíntesi Histidina</b>	N=4 9.3%	2.9E-4	HIS1, HIS3, HIS5, PRS1
<b>Biosíntesi Aminoàcids</b>	N=7 16.3%	6.8E-4	ARO3, CPA2, HIS1, HIS3, HIS5, PRS1, SER1

**Taula R6. Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa superior a una vegada i mitja (un factor d'1.5), en cèl·lules tractades amb 17µM Criptolepina.** La primera columna descriu el procés compartit, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic del total dels 56 gens induïts, juntament amb el número de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats.

Els gens reprimits per la presència de Criptolepina se'ls ha agrupat segons el terme ontològic associat pel *GO term Finder*. El metabolisme de les manoses amb un valor p 4.3E-7 acull 5 gens, l'altre procés descrit és el metabolisme de l'etanol, el qual inclou a 11 gens reprimits més d'una vegada i mitja. S'ha observat que hi ha una disminució dels nivells de transcrit de 17 gens codificants per oxidoreductases amb un valor p 6.4E-7.

GO	Gens inhibits	Valor p	Gens
Metabolisme de les manoses	N=5 6.2%	4.3E-7	GLK1, HXK1, HXK2, PMI40, PSA1
Metabolisme de l'alcohol	N=11 13.8%	8.0E-4	ALD4, GLK1, GND1, HOR2, HXK1, HXK2, MCR1, PFK1, PGM2, PMI40, PSA1
Activitat oxidoreductasa	N=17 21.2%	6.4E-7	ALD4, BDH1, GDH1, GND1, GTT1, HOM6, HYR1, LPD1, MAE1, MCR1, PDA1, PDII, RNRI, SOD2, URA1, YCP4, YEL047C

**Taula R7. Principals ontologies dels gens amb una repressió relativa a una vegada i mitja (un factor de 0.66), en cèl·lules tractades amb 17µM Criptolepina.** La primera columna descriu el procés compartit, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic, del total dels 80 gens inhibits juntament amb la quantitat de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats.



## C. QUANTIFICACIÓ I VALIDACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR A TEMPS REAL

La tècnica usada en l'estudi de la resposta global del *Saccharomyces cerevisiae* en presència de l'antitumoral Daunorubicina i Criptolepina aporta en relativament poc temps, una gran quantitat de valors d'expressió gènica en les diferents condicions, no obstant, és una informació semiquantitativa que s'ha de validar per una altra tècnica, en aquest cas, es va realitzar mitjançant PCR a temps real.

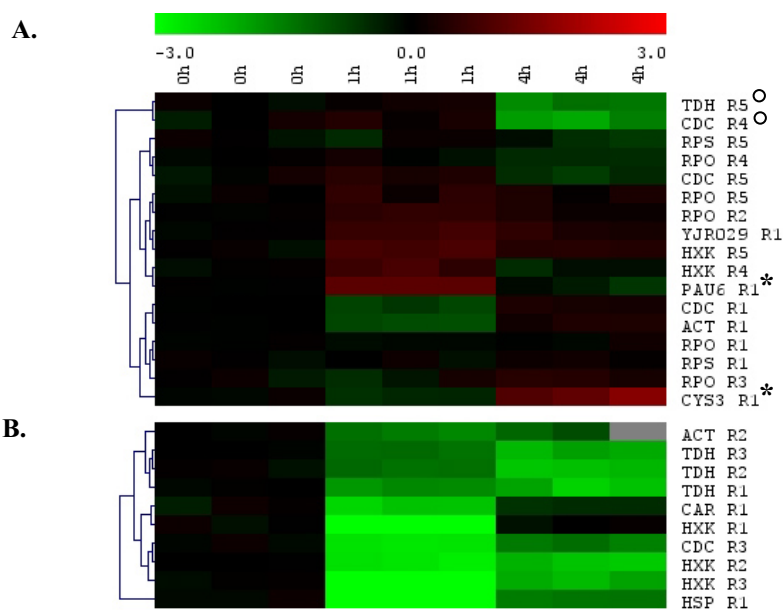
### C.1 Quantificació de la variació de l'expressió gènica deguda al tractament amb Daunorubicina

Es van escollir dos tipus de gens, un grup de gens que serviran principalment per validar els resultats obtinguts en els microarrays, implicats en diversos processos com la xaperona *HSP26*, el *CAR2*, responsable del catabolisme de l'arginina, el gen *CYS3* de transulfuració dels aminoàcids, el retrotransposó YJR029W i el gen subtelomèric *PAU6*, i un segon grup, que a part de contrastar els resultats dels microarrays permetran estudiar en detall el comportament dels gens glicolítics (apartat C). En aquest grup s'analitzà el gen de la gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (TDH(1-3), inclou la part homòloga de les tres isoformes), el *CDC19* codificant per la piruvat quinasa i l'hexoquinasa I (*HXK1*), a més, del gen ribosomal *RPS28A* que codifica per una proteïna de la subunitat petita del ribosoma.

Inicialment es va escollir com a gen de referència, l'actina, usat sovint com a *housekeeping*, però s'apreciaren variacions significatives de l'expressió depenents de la cinètica, així que es va trobar molt més adient usar el gen de la RNA polimerasa II (*RPO21*) d'expressió més constant. Per seleccionar el gen referent es varen analitzar estadísticament les dades obtingudes per *Real Time* d'ambdós gens, amb el programa *Bestkeeper*. Pel gen *RPO21*, s'obtingué una desviació estàndard promig menor de 0.43, envers 0.87 per l'actina. Aquest valor va ser rellevant per escollir l'*RPO21* com al gen amb menys variabilitat i per tant, de referència.

L'expressió dels gens prèviament esmentats es van quantificar en les mostres usades pel marcatge dels microarrays (cultius R1, R2 i R3). L'expressió dels gens glicolítics i del ribosomal es van mesurar també en dos cultius addicionals (R4 i R5). Els valors obtinguts per RTPCR a temps real es van agrupar mitjançant el SOM (*Self*

*Organizing Maps*, TIGR) (Fig. R9). Dels quatre grups obtinguts, els dos més abundants, eren els que es presenten a continuació; el grup de gens representats en la Figura R9, A, i els de la Figura R9, B. El primer grup inclou els gens que pràcticament no varien, només el *PAU6* i el *CYS3* arriben a superar una inducció de l'expressió del doble (marcats amb un asterisc), i els gens *TDH* (1-3) i *CDC19* marcats amb un cercle presenten una repressió de més del doble a 4 hores. La resta de gens no mostren una expressió diferencial provocada ni pel fàrmac, ni per la cinètica. En aquest grup pertanyen els gens *RPS28A*, el *YJR029W* i l'*RPO21*, els quals hi són presents per a totes les cinètiques testades. La Figura R9, B, correspon al grup de gens fortament reprimits al llarg de la cinètica, l'expressió de tots aquests gens disminueix a una hora i es mantenen els nivells de mRNA fins a les quatre hores, exceptuant el *CAR2*. Una altra característica que engloba aquest grup, és la presència dels gens glicolítics mesurats a partir de l'extracció dels cultius R1, R2 i R3, corresponents als usats en els microarrays.

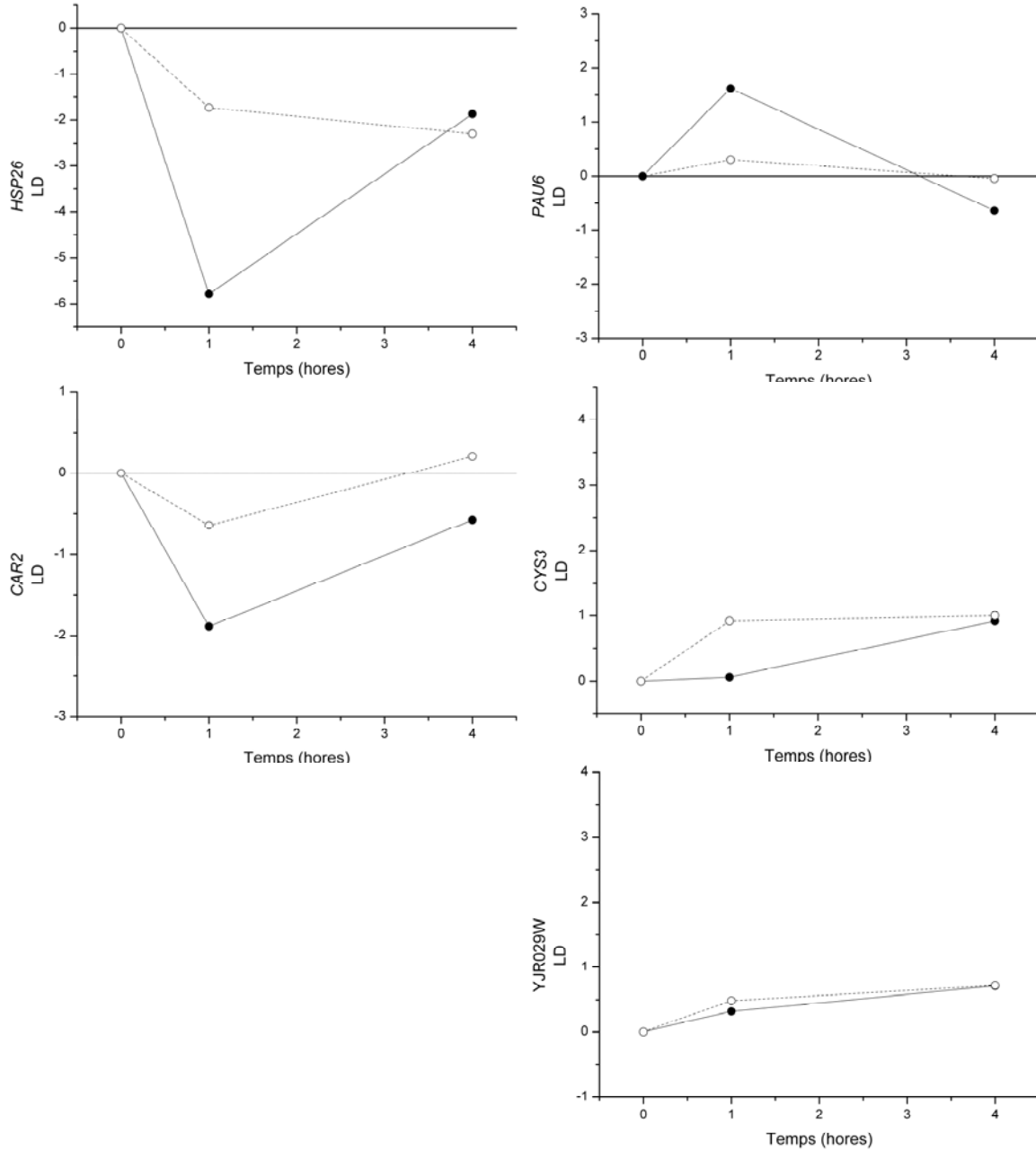


**Fig. R9. Resultats de l'expressió gènica obtinguts per RTPCR quantitativa entre cultius tractats i no tractats amb Daunorubicina. A i B** corresponen a dos patrons diferents definits pel mètode SOM (*Self Organizing Maps*, TIGR). Agrupació dels gens al llarg del temps a partir dels valors promitjats per cada cinètica, respecte el promig del temps inicial, representats com  $\text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ . El rang s'expressa en la part superior.

### C.1.1 Expressió diferencial i validació dels microarrays dels gens involucrats en diferents processos

En la Figura R10, s'observa que l'*HSP26* s'expressa 64 vegades menys amb el tractament d'una hora, a 4 hores, la repressió és superior a 4 vegades. El patró d'expressió detectat per a la xaperona és similar a l'obtingut amb els microarrays.

El gen de la carnitina té un patró similar entre les dues tècniques, l'estudi quantitatiu coincideix amb la repressió de l'expressió de *CAR2* donada per l'antitumoral (Fig. R10).



**Fig. R10. Comparació dels valors obtinguts per PCR a temps real, amb els dels microarrays d'oligonucleòtids** Verificació de la quantitat de mRNA dels gens *PAU6*, *CYS3*, *HSP26*, *YJR029W* i *CAR2* en cèl·lules *Δerg6* tractades durant 0, 1 i 4 h amb 12μM Daunorubicina, respecte no tractades. Els cultius independents monitoritzats per qRT-PCR utilitzats en l'hibridació dels microarrays d'oligonucleòtids s'indiquen com ●—; els valors diferencials obtinguts en els microarrays d'oligonucleòtids es representen com a ○---. La quantitat relativa de transcrit d'un gen és normalitzat respecte el gen de referència *RPO21*, l'expressió relativa provocada pel tractament respecte el temps inicial es representa com LD = Log<sub>2</sub>[Fold Change].

L'increment del doble de la quantitat de missatge del *PAU6*, disminueix a les 4 hores, en aquest cas, tot i que hi ha més variació entre tècniques, el comportament del gen a 4 hores es conserva (Fig. R10).

El *CYS3* augmenta significativament el doble de l'expressió en el darrer temps de tractament, valor d'expressió diferencial similar a l'obtingut amb els microarrays (Fig. R10). L'expressió del retrotransposó *YJR029W* augmenta lleugerament a les 4 hores de tractament, perfil similar a l'obtingut amb els microarrays.

### **C.1.2 Expressió diferencial i validació dels gens glicolítics i del *RPS28A***

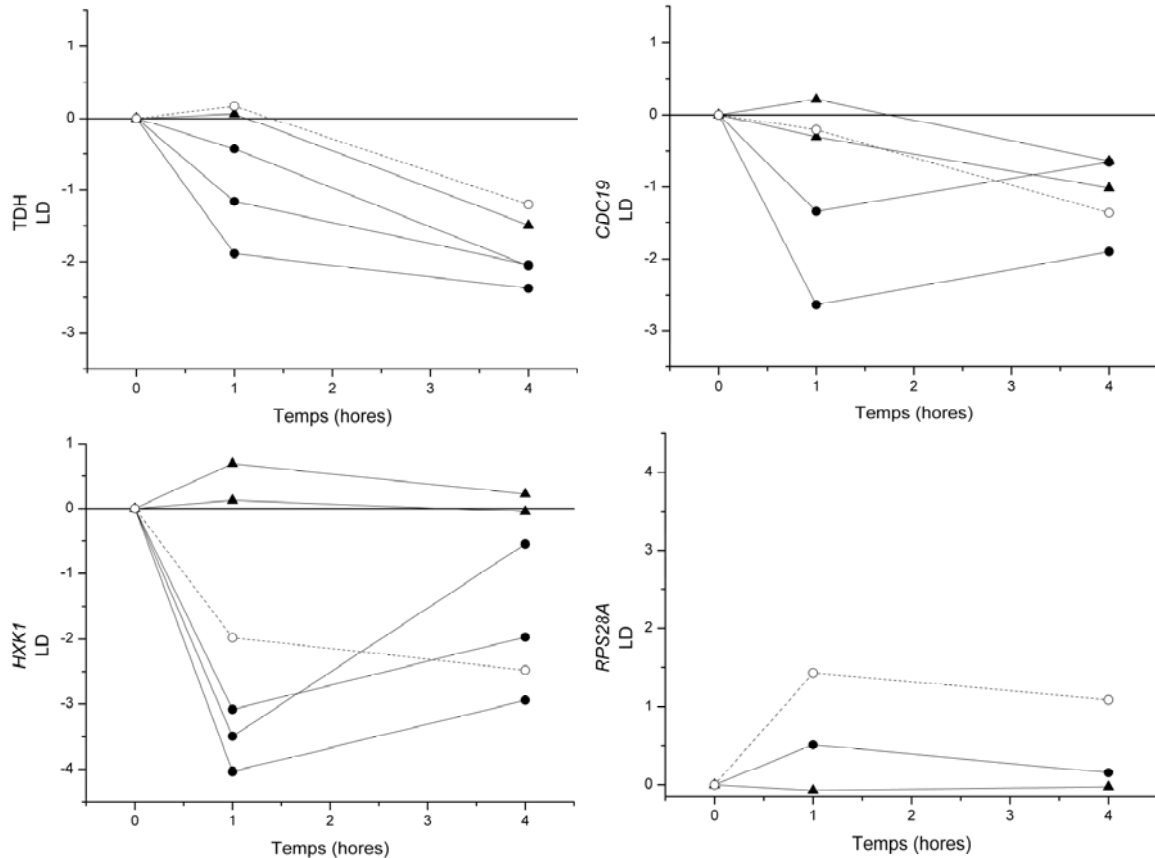
Els gens del metabolisme dels carbohidrats analitzats per PCR a temps real presenten una disminució de la quantitat de transcrit cel·lular, al voltant de la meitat, deguda a la presència de l'antitumoral Daunorubicina. En aquest apartat es mostren els gens que se'ls ha mesurat l'expressió en els dos temps de tractament, tal com s'ha procedir amb la tècnica global.

L'expressió del *TDH(1-3)* en totes les cinètiques testades presenta una repressió a una hora, i assoleix els màxims d'inhibició a 4 hores, tal com indiquen els resultats dels microarrays (Fig. R11).

La piruvat quinasa *CDC19*, té uns patrons més variables entre els diferents cultius, no obstant, conserva la inhibició de l'expressió a 4 hores amb valors molt semblants als obtinguts semiquantitativament (Fig. R11).

El gen de l'hexokinasa I és el gen amb més diferència entre els cultius cel·lulars. El comportament transcripcional conserva dos perfils, un de repressió (entre 8 i 16 vegades) per a les rèpliques utilitzades en l'hibridació dels microarrays i que coincideix amb els resultats d'aquests, i per altra banda, per a les rèpliques R 4 i R5, no s'observa l'efecte del fàrmac és gairebé nul (Fig. R11).

Mitjançant els microarrays s'ha detectat un augment, al voltant del doble, del mRNA del gen ribosomal *RPS28A*, en canvi, les cinètiques analitzades amb la PCR quantitativa indiquen que no hi ha variació (Fig. R11).



**Fig. R11. Comparació dels valors obtinguts per PCR a temps real, amb els dels microarrays d'oligonucleòtids.** Verificació de la quantitat de mRNA dels gens del metabolisme dels carbohidrats *CDC19*, *HXK1* i *TDH*, i del component ribosomal *RPS28A* en cèl·lules *Aerg6* tractades durant 0, 1 i 4 h amb 12µM Daunorubicina, respecte no tractades. Els cultius independents monitoritzats per qRT-PCR utilitzats en l'hibridació dels microarrays d'oligonucleòtids (R1, R2 i R3) s'indiquen com —●—; els de les cinètiques addicionals (R4, R5) com a —▲—; els valors diferencials obtinguts en els microarrays d'oligonucleòtids es representen com a ---○---. La quantitat relativa de transcrit d'un gen és normalitzat respecte el gen de referència *RPO21*, l'expressió relativa provocada pel tractament respecte el temps inicial es representa com  $LD = \text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ .

## C.2 Quantificació i validació de l'expressió gènica diferencial deguda al tractament amb Criptolepina

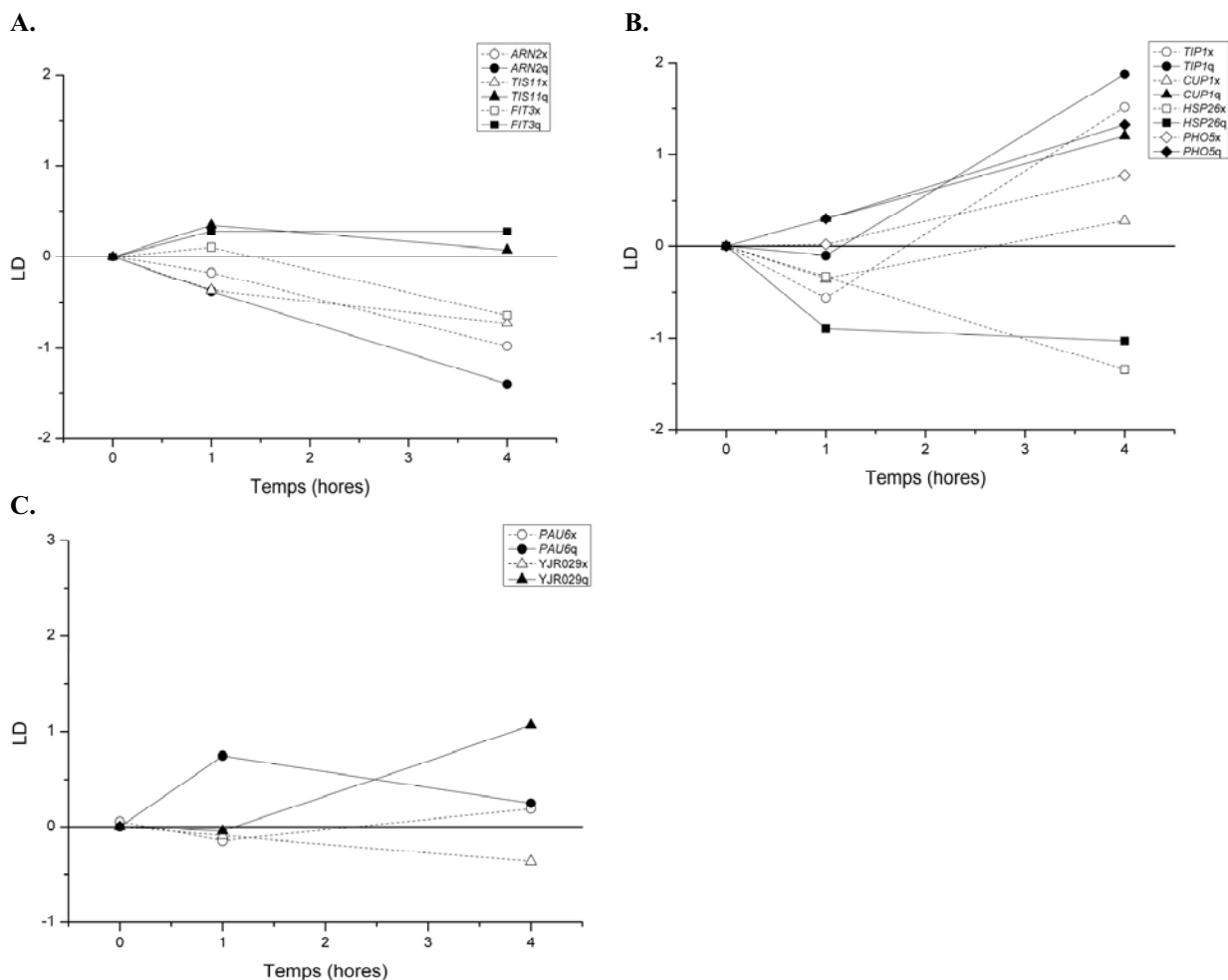
Els microarrays d'oligonucleòtids han mostrat que la Criptolepina induïx una resposta transcripcional en el llevat. Per validar-la, es va mesurar quantitativament l'efecte del fàrmac en els nivells de mRNA dels següents gens, mitjançant PCR a temps real; gens implicats en el metabolisme del ferro, *ARN2*, *TIS11* i *FIT3*, gens relacionats amb la resposta a condicions subòptimes o estressants, *TIP1*, *CUP1-1*, *HSP26* i *PHO5*, el gen subtelomèric *PAU6* i l'element transposable YJR029W (Fig. R12). El gen usats de referència és l'actina *ACT1*.

Els gens del metabolisme del ferro mostren un manteniment dels nivells transcripcionals, excepte pel missatger del *FIT3*, pel qual el fàrmac disminueix

l'expressió més de la meitat. Les dades obtingudes amb la tècnica dels microarrays, indiquen que a 4 hores de tractament disminueixen els nivells d'expressió dels tres gens relacionats amb el ferro (Fig. R12, A).

Els gens implicats en la resposta a estrès *TIP1*, *CUP1-1* i *PHO5* augmenten els nivells de transcrit en presència del fàrmac, resposta obtinguda amb les dues tècniques. La xaperona *HSP26* té un patró diferent a la resta de gens, ja que tant els microarrays com la PCR a temps real indiquen una disminució de l'expressió (Fig. R12, B).

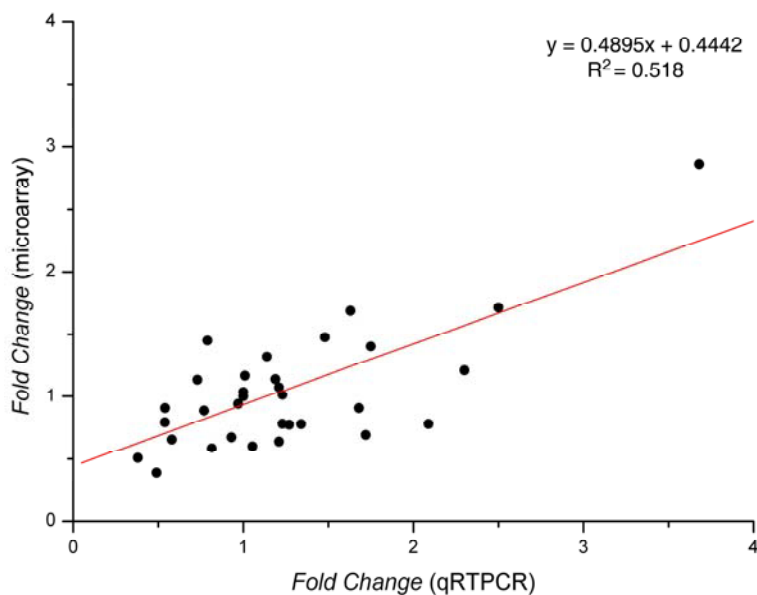
L'expressió del gen subtelomèric *PAU6* varia a una hora de tractament, i a les 4 hores la variació transcripcional és gairebé nul·la. El retrotransposó *YJR029W* presenta uns nivells de transcrit similars a una hora, però a les 4 hores l'expressió augmenta el doble, resultat no apreciable amb els microarrays (Fig. R12, C).



**Fig. R12. Comparació dels valors obtinguts per PCR a temps real, amb els dels microarrays d'oligonucleòtids.** Verificació de la quantitat de mRNA dels gens del metabolisme dels sideròfors *ARN2*, *TIS11* i *FIT3* (A.), gens de resposta a estrès *TIP1*, *CUP1-1*, *HSP26* i *PHO5* (B.), el gen subtelomèric *PAU6* i l'element transposable *YJR029W* (C.) en cèl·lules *Δerg6* tractades durant 0, 1 i 4 h amb 17 μM Criptolepina, respecte no tractades. Monitorització per qRT-PCR amb línees contínues, llegenda amb una q, mitjançant microarrays indicat en línea discontinua, llegenda amb una x. La quantitat relativa de transcrit d'un gen és normalitzat respecte el gen de referència *ACT1*, l'expressió relativa provocada pel tractament respecte el temps inicial es representa com  $LD = \text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ .

A més d'aquests gens d'especial interès en la modulació de la resposta transcripcional del llevat per la Criptolepina, es varen validar els resultats dels microarrays testant altres gens (*ARG1*, *ARG4*, *ADE2*, *CAR2*, *RPS28A*, *RPO21*).

El conjunts de les expressions diferencials obtingudes per qRT-PCR es varen representar envers les obtingudes amb la tècnica semiquantitativa (Fig. R13). El gràfic de la figura R13 indica un grau de correlació de  $R^2$  de 0.51 entre les tècniques emprades.



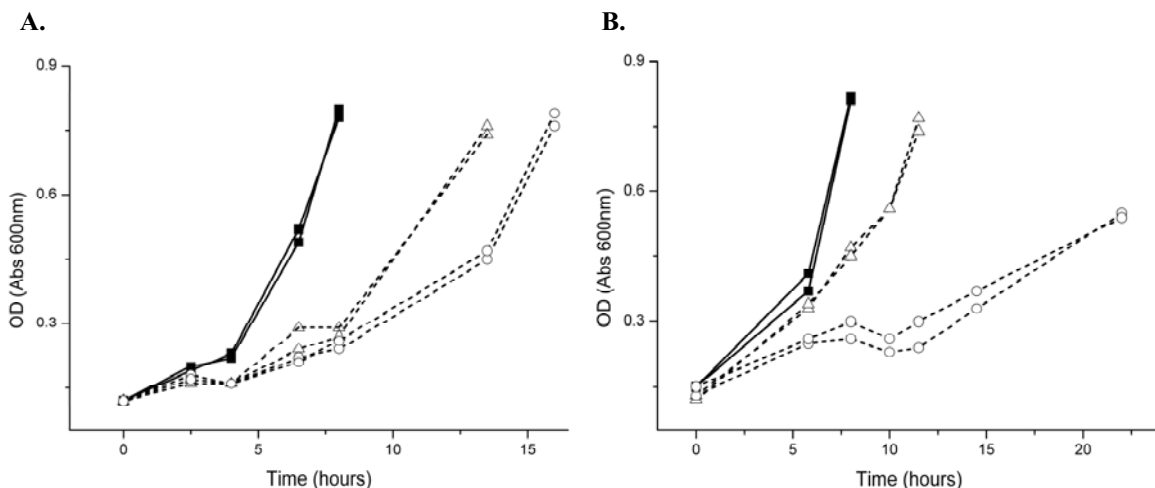
**Fig. R13. Correlació de l'expressió gènica (*Fold Change*) obtinguda per PCR a temps real, respecte els valors dels microarrays d'oligonucleòtids de cèl·lules tractades amb Criptolepina respecte les no tractades.** Valors de l'expressió diferencial de diversos gens (*ARN2*, *TIS11*, *FIT3*, *ARG1*, *ARG4*, *ADE2*, *CAR2*, *RPS28A*, *RPO21*, *TIP1*, *CUP1-1*, *HSP26*, *PHO5*, *PAU6* i *YJR029W*). Mitjanes de les rèpliques dels microarrays respecte mitjanes dels triplicats tècnics pel cultiu R1. Equació de la recta de regressió i coeficient de correlació,  $R^2$ .

### Segona Part. Estudi de la Resposta Global del Llevat a Tractaments Prolongats de Daunorubicina i Criptolepina

La resposta transcripcional del *Saccharomyces cerevisiae* provocada per la presència de fàrmacs, depèn de la variable temps com s'ha vist en l'anàlisi abordat amb els microarrays d'oligonucleòtids. Estudis d'alquilants i fàrmacs immunosupressors com el FK506 o l'antifúngic Griseofulvina (Carroll et al., 2001; Marton et al., 1998; Savoie et al., 2003) han demostrat que l'expressió diferencial és dosi-depenent, a més concentració, més efecte en el transcriptoma del llevat.

Els canvis en l'expressió gènica induïts pels tractaments amb els fàrmacs intercalants, Criptolepina i Daunorubicina en el *Saccharomyces cerevisiae* es van analitzar amb la tècnica dels microarrays de cDNA. La soca permeable als fàrmacs  $\Delta erg6$  es va tractar amb dues concentracions 5  $\mu\text{M}$  i 12  $\mu\text{M}$  (IC10 i IC40) per la Daunorubicina, i 7.5  $\mu\text{M}$  i 17  $\mu\text{M}$  per la Criptolepina (IC30 i IC40). Les concentracions es van determinar segons la dosis emprada en un treball previ (Marin et al., 2002) i dels assaigs clonogènics (apartat I.1).

L'experiment es va fer a partir de dos cultius independents per cada tractament (no tractat, dosis baixa i dosis alta de fàrmac). Els dos cultius provenien d'un mateix cultiu mare en fase exponencial tal com s'explica en Materials i Mètodes. En la Figura R14, s'observa el creixement dels cultius cel·lulars que posteriorment serviran per l'anàlisi de la resposta transcripcional als fàrmacs.



**Fig. R14.** Creixement dels cultius analitzats en l'estudi dels canvis transcripcionals per l'acció de la Daunorubicina (A) i de la Criptolepina (B). —■— No tractats. -△- Tractats amb 5 $\mu\text{M}$  Daunorubicina o 7.5 $\mu\text{M}$  Criptolepina. ••• Tractats amb 12 $\mu\text{M}$  Daunorubicina o 17 $\mu\text{M}$  Criptolepina.



## A. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL EN TRACTAMENTS PROLONGATS DE DAUNORUBICINA

L'estudi de les expressions relatives es va fer a partir dels gens presents mínim en un ~70% de les hibridacions, 3 de les 4 rèpliques per 5µM, i 4 de 6 per 12µM. Es varen realitzar replicats biològics i tècnics, els darrers, corresponen al procés anomenat *dye swap*, que és la repetició de l'hibridació amb les mostres marcades amb el fluorocrom invers (Materials i Mètodes).

S'obtingueren valors per a 1808 gens pel tractament amb 5µM, i 1355 gens amb 12µM Daunorubicina, en total s'obtingueren valors d'expressió relativa per a 1876 ORFs. D'aquest ~30% del genoma, s'escolliren inicialment els que tenien una expressió diferencial igual o superior a 2.8 vegades per a cada tractament (valor d'expressió diferencial equivalent a  $\text{Log}_2 > 1.5$  o  $\text{Log}_2 < -1.5$ ). Es seleccionà un valor de canvi (*threshold*) superior que en els microarrays d'oligonucleòtids, degut a la gran dispersió entre els replicats. En la Taula R8 es mostra la quantitat de gens amb una expressió relativa per sobre de 2.8, gens considerats activats, i inferior a 0.35 corresponent als gens inhibits per a cada condició:

	<i>Fold change</i>	5µM DNR	12µM DNR
gens activats	>2.8	29	48
	>2	98	147
gens reprimits	<0.35	35	71
	<0.5	104	189

**Taula R8. Quantitat de gens activats i reprimits com a resposta al tractament amb 5µM i 12µM de Daunorubicina (DNR).** Es determina el llindar d'activació i de repressió. Representats en  $\text{Log}_2$  de l'expressió diferencial corresponen a valors superiors de 1.5 o 1 pels activats, i inferiors a -1.5 o -1 pels inhibits.

### A.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment dependents de la Daunorubicina

Els efectes de la Daunorubicina es poden classificar funcionalment considerant els gens amb la transcripció alterada pel fàrmac.

La resposta transcripcional del *Saccharomyces cerevisiae* és dependent de la concentració de Daunorubicina, a l'augmentar la dosi de fàrmac, augmenta el número de gens amb un canvi superior al *threshold*, tant els gens sobreexpressats com els reprimits.

Tractaments prolongats amb Daunorubicina augmenten l'expressió de 68 gens en més de 2.8 vegades respecte cèl·lules no tractades (Taula R8). Les cèl·lules tractades amb la concentració més elevada presenten gairebé el doble de gens activats, de 29 gens activats amb 5µM, passen a activar-se'n 48 gens amb 12µM, dels quals 9 gens són comuns en ambdós tractaments. La Daunorubicina reprimeix més de tres vegades a un centenar de gens, dels quals, 7 són comuns en ambdues concentracions. Les cèl·lules gairebé doblen el número de gens reprimits en presència de la dosis alta de Daunorubicina, passa d'inhibir l'expressió de 28 a 64 gens.

L'agrupació en categories funcionals dels gens amb l'expressió alterada pel fàrmac es va realitzar mitjançant el *GO Term Finder* de la base de dades del *Saccharomyces cerevisiae* (SGD).

Aproximadament, un 41% dels gens sobreexpressats no tenen associat un procés biològic. En aquest grup hi pertanyen 10 components d'una família multigènica de seripauperines, formada per 23 membres que es localitzen principalment en les regions subtelomèriques.

L'anàlisi ontològic dels gens transcripcionalment reprimits, defineix un grup de 17 gens relacionat amb el metabolisme dels àcid carboxílics (valor de p 3.5E-4) (Taula R9). Un subconjunt de 13 gens estan implicats en el metabolisme dels aminoàcids amb una significança del mateix ordre (valor de p 5.5E-4) (Taula R9). Del total dels gens reprimits s'identifica l'activitat liasa com a funció biològica sobrerepresentada, amb una probabilitat de 2.6E-4 (Taula R9).

GO	Gens inhibits	Valor p	Gens
Metabolisme dels Àcids carboxílics	N=17 17.2%	3.5E-4	ACN9, ARG1, ARG4, ARO2, BIO2, CYS4, FRS2, HIS4, IFA38, LEU1, LEU9, LYS1, OLE1, SES1, TRP4, TRP5, YHR020W
Metabolisme dels Aminoàcids	N=13 13.1%	5.5E-4	ARG1, ARG4, ARO2, CYS4, FRS2, HIS4, LEU1, LEU9, LYS1, SES1, TRP4, TRP5, YHR020W
Activitat liasa	N=9 9.1%	2.6E-4	ADE13, ADE2, ARG4, ARO2, CYS4, LEU1, MVD1, NTG1, TRP5

**Taula R9. Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa inferior a 0.35 ( $\text{Log}_2 < -1.5$ ) en cèl·lules tractades amb 5 i 12µM Daunorubicina.** La primera columna descriu el procés o la funció compartida, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic del total dels 99 gens inhibits, juntament amb la quantitat de gens (N), la probabilitat (p) de que l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats.

## A.2 Perfils transcripcionals conservats entre tractaments llargs i curts

### A.2.1 Metabolisme dels Aminoàcids

El tractament prolongat amb Daunorubicina influeix principalment en els gens del metabolisme dels aminoàcids. A l'observar el comportament dels 13 gens reprimits en la resposta a curt termini, s'observa que alguns d'aquests gens presenten una disminució dels trànscrips a una hora de tractament (Fig. R15, A), per exemple, els nivells d'expressió de *LEU1* disminueixen gairebé a la meitat ( $\text{Log}_2=-0.9$ ), i els gens de la biosíntesi de l'arginina, *ARG1* i *ARG4*, presenten una expressió diferencial ( $\text{Log}_2$ ) -0.52 i -0.31, respectivament. Transcorregudes 4 hores de tractament, *ARG1* i *ARG4* presenten una davallada de trànscrip significativa superior al doble ( $\text{Log}_2=-1.44$  i  $-1.1$ , respectivament).

### A.2.1 Metabolisme dels Carbohidrats

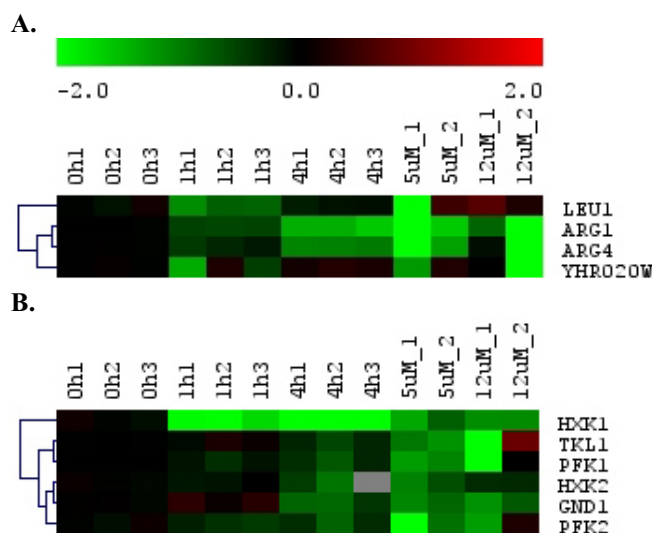
Entre els 273 gens reprimits més del doble (Taula R8), 20 gens són comuns en les dues concentracions. L'anàlisi funcional dels 253 gens indica que un conjunt de 9 gens estan implicats amb el metabolisme de la glucosa, sent aquest, el procés ontològic més representatiu (valor de  $p$   $1.4E-4$ ) (Taula R10). Tanmateix apareixen altres processos relacionats, els quals comparteixen gens amb l'anterior procés i amb una probabilitat similar, aquests són el metabolisme de l'alcohol i el catabolisme dels carbohidrats (Taula R10).

GO	Gens inhibits	Valor p	Gens
Metabolisme de la glucosa	N=9 8.7%	1.4E-4	<i>GND1, HXK1, HXK2, MDH2, PFK1, PFK2, PGM2, TKL1, TYE7</i>
Metabolisme de l'alcohol	N=13 12.5%	2.3E-4	<i>ADH5, ERG11, ERG12, GND1, HXK1, HXK2, MDH2, OSH7, PFK1, PFK2, PGM2, TKL1, TYE7</i>
Catabolisme dels carbohidrats	N=9 8.7%	7.0E-4	<i>GND1, HXK1, HXK2, MSS11, PFK1, PFK2, SUC2, TKL1, TYE7</i>

**Taula R10. Principals ontologies dels gens amb una expressió relativa inferior a 0.5 ( $\text{Log}_2<-1$ ), en cèl·lules tractades amb 5 i  $12\mu\text{M}$  Daunorubicina.** La primera columna descriu el procés compartit, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic del total dels 253 gens inhibits, juntament amb el número de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats.

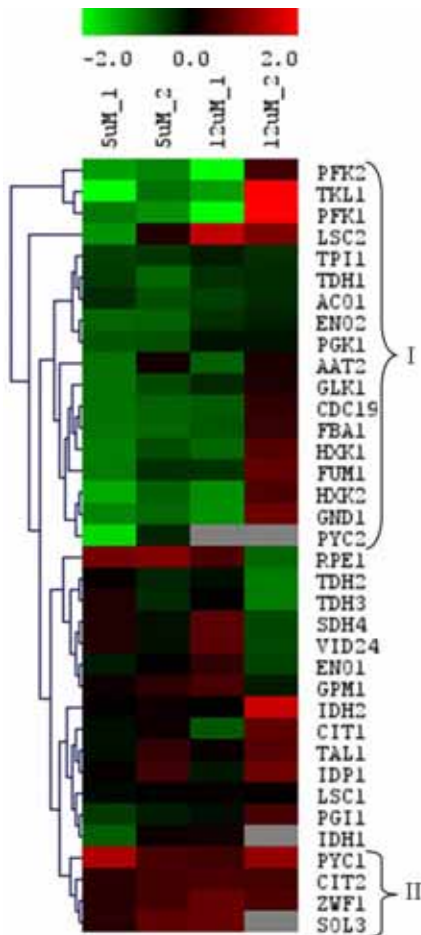
Anàlisis comparatives amb els resultats obtinguts mitjançant els microarrays d'oligonucleòtids, mostren que els perfils transcripcionals dels gens del metabolisme de la glucosa inhibits a tractaments llargs, disminueixen els nivells de mRNA en

tractaments primerencs de Daunorubicina (Fig. R15, B). Amb concordança amb l'anàlisi ontològica obtinguda a partir de les dades dels tractaments a curt termini, s'observa que el metabolisme dels carbohidrats, especialment la glucòlisi, és una de les dianes potencials de la Daunorubicina. Seguidament es mostren els perfils d'expressió dels gens del metabolisme dels carbohidrats en presència de varies hores de tractament i per a cada una de les dosis testades (Fig. R16).



**Fig. R15. Perfils transcripcionals dels gens reprimits a llarg termini en l'experiment de 0, 1 i 4 hores de tractament amb Daunorubicina.** Es representen els promitjos dels gens del metabolisme dels aminoàcids (A.) i del metabolisme de la glucosa (B.), per a cada cultiu tant a 0,1 i 4 hores com per al tractament amb 5µM i 12µM Daunorubicina. A la part superior es mostra el rang d'expressió relativa, el verd indica repressió, el vermell activació.

L'agrupació jeràrquica mostra el comportament diferencial de tres grups de gens; reprimits (grup I), els lleugerament activats (grup II) i un grup amb un perfil no massa ben definit. D'entre els gens reprimits que pertanyen al grup I, un 61% formen part de la glicòlisi amb una probabilitat  $1.5E-22$ . Els 4 gens que formen part del grup II, tenen un perfil lleugerament activat, *PYCI*, *SOL3* i *ZWF1* estan implicats en la regeneració de NADPH (valor de p  $1.6E-6$ ). Els gens *SOL3* i *ZWF1* intervenen en la via oxidativa de les pentoses fosfat ( $1.6E-4$ ). Els processos descrits tant pels gens reprimits com pels activats, corresponen als identificats pels gens amb els mateixos comportaments a tractaments de curt termini de Daunorubicina. Per tant, el resultat d'aquesta anàlisi mostra l'efecte de la Daunorubicina en la regulació transcripcional dels gens del metabolisme dels carbohidrats a curts i llargs tractaments.



**Fig. R16. Agrupació dels valors d'expressió diferencial dels gens implicats en el metabolisme dels carbohidrats, descrits pel GO (SGD), com a resposta a tractaments llargs de Daunorubicina.** Els 36 gens amb valors pertanyents al procés s'han agrupat jeràrquicament mitjançant el TIGR, en funció de la similitud dels patrons transcripcionals. Grup I. reprimits; grup II. lleugerament activats. Les columnes corresponen a les condicions experimentals, tractament amb 5µM i 12µM Daunorubicina per a cada cultiu, i les files els valors d'expressió diferencial per cada gen. A la part superior es mostra el rang d'expressió relativa, el verd indica repressió, el vermell activació.

## B. EXPRESSIÓ DIFERENCIAL EN TRACTAMENTS PROLONGATS DE CRIPTOLEPINA

L'efecte de la Criptolepina en el *Saccharomyces cerevisiae* es va analitzar a nivell transcripcional. Els passos seguits són molt semblants als utilitzats per la Daunorubicina, s'escolliren aquells gens presents mínim, en 3 de les 4 rèpliques. Dues rèpliques són les corresponents als cultius i les altres dues als marcatges o *dye swap* (Materials i Mètodes).

Els gens que complien aquestes condicions van ser 1653 per les cèl·lules tractades amb 7.5µM i 1307 gens per les cèl·lules tractades amb 17µM Criptolepina. En total s'obtingueren valors d'expressió relativa per a 1668 ORFs diferents. D'aquest ~23% del genoma, s'escolliren els que tenien una expressió diferencial igual o superior a 2.8 vegades per a cada tractament (valor d'expressió diferencial equivalent a  $\text{Log}_2 > 1.5$  o  $\text{Log}_2 < -1.5$ ). En la Taula R11 es mostra el número de gens activats, amb una expressió

relativa superior a 2.8 ( $\text{Log}_2 > 1.5$ ), i els inhibits, inferior a 0.35 ( $\text{Log}_2 < -1.5$ ) per a cada condició:

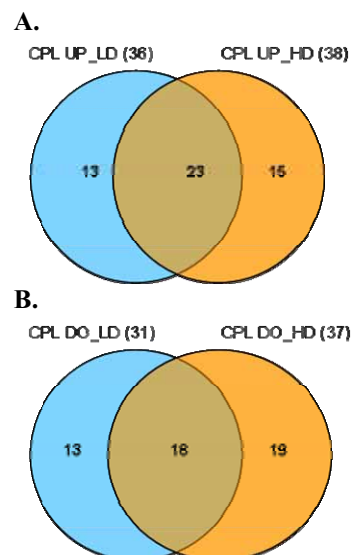
	7.5 $\mu\text{M}$ CPL	17 $\mu\text{M}$ CPL
gens inhibits	31	37
gens activats	36	38

**Taula R11. Quantitat de gens activats i reprimits com a resposta al tractament amb 7.5 $\mu\text{M}$  i 17 $\mu\text{M}$  de Criptolepina (CPL).** Es determina el llindar d'activació i de repressió a partir del  $\text{Log}_2$  de l'expressió diferencial, valor superior a 1.5 pels activats, i inferior a -1.5 pels inhibits.

### B.1 Anàlisi dels gens transcripcionalment dependents de la Criptolepina

L'estudi funcional del transcriptoma del llevat modulats per la presència de Criptolepina durant varies hores, s'ha analitzat funcionalment a partir de les dades proporcionades pels microarrays.

La quantificació de les expressions diferencials de les cèl·lules tractades amb el fàrmac, permet determinar la inducció dels nivells transcripcionals per sobre de 2.8 vegades en 51 gens, 36 induïts amb la dosi baixa (7.5 $\mu\text{M}$ ) i 38 amb l'alta (17 $\mu\text{M}$ ), dels quals, 23 gens, un 45%, són comuns (Fig. R17, A). Amb una expressió diferencial per sota de 0.35 s'observen 50 gens, dels quals, 13 gens estan alterats pel tractament amb la dosi baixa i 19 gens amb l'alta, 18 gens presenten una expressió alterada en ambdues dosis (Fig. R17, B).



**Fig. R17. Classificació dels gens induïts (A) i reprimits (B) pel tractament amb 7.5 $\mu\text{M}$  (LD) o 17 $\mu\text{M}$  (HD) Criptolepina (CPL).** S'indica el número de gens pertanyents a cada grup, entre parèntesi correspon al total de gens amb una expressió diferencial superior a  $\text{Log}_2 > 1.5$  pels activats (UP), o  $\text{Log}_2 < -1.5$  pels reprimits (DO).

La identificació de les ontologies amb més significança entre els gens alterats per la Criptolepina, es va realitzar mitjançant el *GO Term Finder* (SGD). L'activació transcripcional depenent del fàrmac indueix en 15 gens l'augment en un factor de 2.8, els quals estan implicats amb la resposta a condicions estressants (valor de p 2.1E-4) (Taula R12). Els gens descrits en aquesta categoria s'activen tant amb 7.5µM com 17µM Criptolepina, entre els quals hi ha 5 gens codificants per xaperones (*HSP104*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP30*, *SSA4*), proteïnes implicades en la resposta a xoc tèrmic (Taula R12).

GO	Gens activats	Valor p	Gens
Resposta a estrès	N=15 29.4%	2.1E-4	<i>ALD3, GRE3, HOR7, HSP104, HSP12, HSP26, HSP30, PRX1, SOD1, SSA4, STF2, TSL1, YGPI, ZEO1, ZPR1</i>

**Taula R12. Principal ontologia pels gens amb una expressió relativa superior a 2.8 (Log<sub>2</sub>>1.5), en cèl·lules tractades amb 7.5 i 17µM Criptolepina.** La primera columna descriu el procés compartit, la següent columna mostra el percentatge de gens pertanyents al terme ontològic del total dels 51 gens induïts, juntament amb el número de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats en el procés.

La caracterització funcional de la resposta inhibidora provocada per la Criptolepina, agrupa els gens en dues categories depenents del procés descrit pel *GO Term Finder* (Taula R13). El procés amb més gens inhibits i amb major significança és la transposició mediada per la unió al RNA, compost per 10 gens, amb una probabilitat que passi a l'atzar de 1.4E-7 (Taula R13). L'altre grup el formen 4 gens relacionats amb el mecanisme del transport del ferro mitjançant els sideròfors (complexes captadors de ferro extracel·lular) amb un valor de p 9.5E-5 (Taula R13). A més a més, pels gens reprimits es poden definir 3 grups segons la funció biològica que desenvolupen els seus productes: un conjunt de 4 fosfatases àcides (valor de p 8.3E-7); un grup de 15 gens codificants per proteïnes que s'uneixen a l'RNA (3.4E-6), compost majorment per elements transposables; el darrer grup està format per 11 proteïnes amb activitat hidrolasa (1.9E-4), entre els quals hi ha els gens implicats en el metabolisme del fosfat i els gens codificants per transposons (Taula R13).

GO	Gens inhibits	Valor p	Gens
<b>Transposició</b>	N=10 20.4%	1.4E-7	YAR010C, YCL020W, YER160C, YJR026W, YJR027W, YJR028W, YJR029W, YML040W, YML045W, YMR046C
<b>Transport per Sideròfors</b>	N=4 8.2%	6.5E-5	<i>ARN2, FIT2, FIT3, SIT1</i>
<b>Fosfatases àcides</b>	N=4 8.2%	8.3E-7	<i>PHO11, PHO12, PHO3, PHO5</i>
<b>Unió l'RNA</b>	N=15 30.6%	3.4E-6	<i>CBC2, NOP12, RPL24B, SCP160, TIS11, YAR010C, YCL020W, YER160C, YJR026W, YJR027W, YJR028W, YJR029W, YML040W, YML045W, YMR046C</i>
<b>Hidrolases (unions éster)</b>	N=11 22.4%	1.9E-4	<i>DSSI, PHO11, PHO12, PHO3, PHO5, PHO8, YER160C, YJR027W, YJR029W, YML045W, YSR3</i>

**Taula R13. Principals ontologies pels gens amb una expressió relativa inferior a 0.35 ( $\text{Log}_2 < -1.5$ ), en cèl·lules tractades amb 7.5 i 17 $\mu\text{M}$  Criptolepina.** La primera columna descriu el procés compartit, la següent columna mostra la proporció de gens pertanyents al terme ontològic respecte el total dels 50 gens inhibits, juntament amb el número de gens (N), la probabilitat (p) de què l'agrupació passi a l'atzar (la hipòtesi nul·la), i la darrera columna són els gens implicats en cada procés.

## C. QUANTIFICACIÓ I VALIDACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA PER PCR A TEMPS REAL

### C.1 Expressió gènica alterada per la Daunorubicina

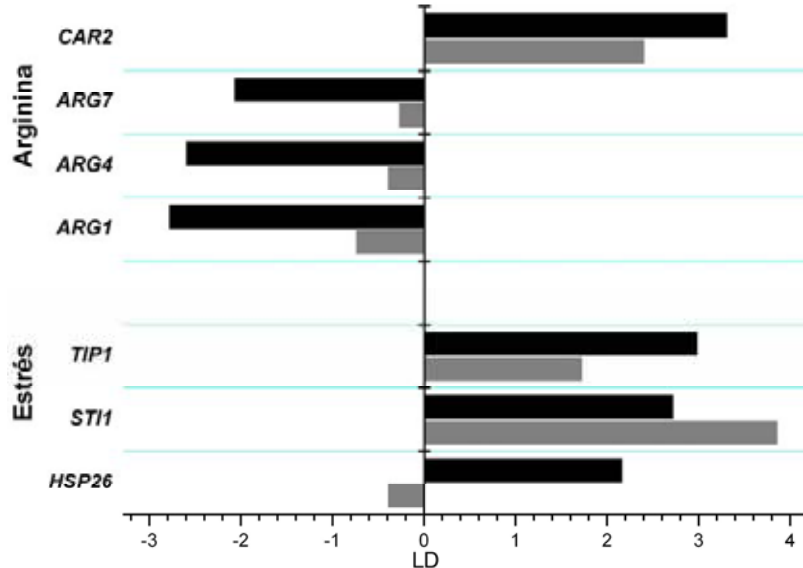
A partir de les anàlisis globals, es va focalitzar l'estudi en l'efecte del fàrmac en el metabolisme dels aminoàcids i en la resposta a estrès. Per determinar els canvis en els nivells d'expressió de cèl·lules tractades amb el fàrmac es va procedir als estudis quantitius mitjançant PCR a temps real.

L'estudi de la resposta transcripcional de indica una desregulació dels gens del metabolisme dels aminoàcids, principalment el subgrup de gens relacionats amb el metabolisme de les arginines (Fig. R18). Els nivells de mRNA dels tres gens de la ruta biosintètica de l'arginina, *ARG1*, *ARG4* i *ARG7* disminueixen en presència de Daunorubicina. La repressió és més elevada a la dosi alta, arribant a disminuir fins a 6 vegades la quantitat de missatger. En contraposició, l'expressió diferencial del *CAR2*, proteïna responsable del catabolisme de l'arginina augmenta depenent de la dosi de fàrmac, s'obté una sobreexpressió entre 6 i 10 vegades respecte el no tractat (Fig. R18).

L'altre conjunt de gens quantificats per qRT-PCR són els que s'indueixen en condicions d'estrès, *HSP26*, *STI1* i *TIP1* (Fig. R18). Tal com s'observa en la Figura R18, *STI1* i *TIP1* augmenten l'expressió en presència del fàrmac en més de 3 vegades



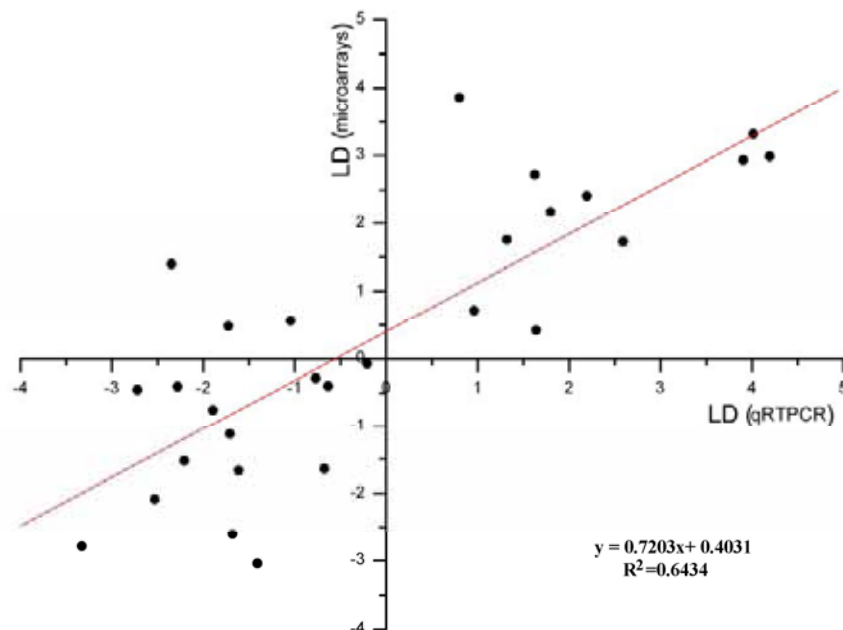
per a qualsevol de les dues dosis. L'expressió de l'*HSP26* no varia amb la dosis baixa, en canvi tractaments prolongats amb 12 $\mu$ M Daunorubicina, els nivells de transcrit incrementen 6 vegades.



**Fig. R18.** Anàlisi diferencial de la transcripció dels gens en cèl·lules tractades amb 5 $\mu$ M o 12  $\mu$ M de Daunorubicina mitjançant PCR a temps Real. A la part més esquerra s'indiquen els principals processos en què estan involucrats els gens testats. L'expressió diferencial es representa com LD =  $\text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ , entre el tractament amb 5 $\mu$ M (barres grises), o amb 12 $\mu$ M Daunorubicina (barres negres) respecte el no tractat. Prèviament les Ct s'han corregit pel gen de referència *ACT1*. Cada experiment ha estat reproduït per triplicat.

### C.1.1 Correlació dels valors dels microarrays i de la PCR a Temps Real

Els valors obtinguts mitjançant la tècnica dels microarrays es va validar amb la tècnica quantitativa qRT-PCR. A més a més dels gens seleccionats en l'anterior apartat, se n'escolliren set més (*LEU9*, *YJR029W*, *SUC2*, *ADH5*, *ADE2*, *ADE13* i *PAU6*). La Figura R19, mostra la correlació dels resultats obtinguts en ambdues tècniques. L'equació de la recta presenta un coeficient de correlació ( $R^2$ ) de 0.64, que confirma les dades obtingudes mitjançant els microarrays de cDNA.



**Fig. R19.** Correlació de l'expressió gènica obtinguda per PCR a Temps Real, respecte els valors dels microarrays de cDNA de cèl·lules tractades amb Daunorubicina. Valors d'expressió diferencial ( $LD = \text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ ) dels següents gens; *ARG1*, *ARG4*, *ARG7*, *CAR2*, *LEU9*, *YJR029W*, *SUC2*, *ADH5*, *ADE2*, *ADE13*, *HSP26*, *TIP1*, *PAU6* i *STI1*. Mitjanes de les rèpliques dels microarrays respecte el promig dels triplicats de la qRT-PCR. Equació de la recta de regressió, s'indica el coeficient de correlació,  $R^2$ .

## C.2 Expressió gènica alterada per la Criptolepina

A partir dels resultats obtinguts amb la tecnologia dels microarrays es van escollir uns quants gens implicats en els processos alterats per la Criptolepina, per tal de determinar quantitativament l'expressió diferencial mitjançant la PCR a temps real (qRT-PCR).

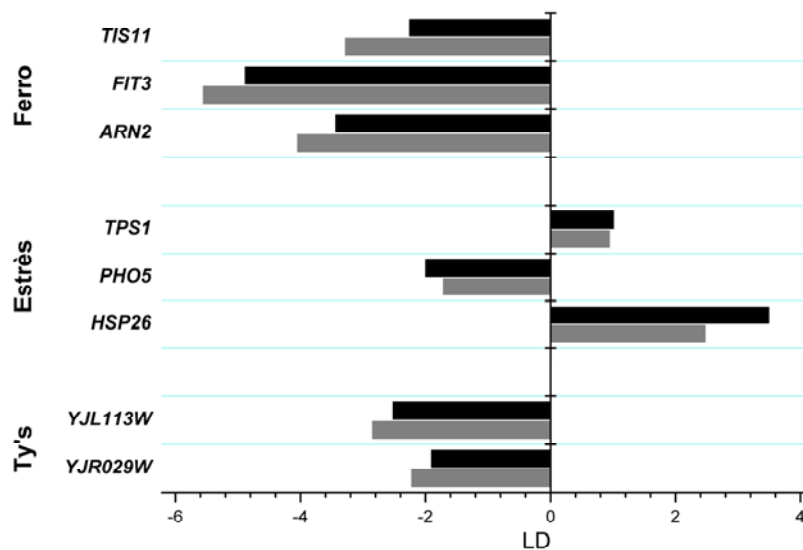
Es va testar un parell de gens codificants per elements transposables, *YJL113W* i *YJR029W*. Els gens seleccionats implicats en la resposta a estrès són, la xaperona *HSP26*, la trehaolsa-6-fosfat sintasa o *TPS1*, i el gen responsable del metabolisme del fosfat *PHO5*. Els gens implicats amb el transport del ferro són, el transportador *ARN2*, la manoproteïna *FIT3*, i el gen implicat en el metabolisme dels sideròfors *TIS11*.

El tractament amb Criptolepina provoca una disminució de la quantitat de transcrits que codifiquen per als dos retrotransposons (Fig. R20). La repressió de l'expressió del *YJR029W* és de 4 vegades, i del *YJL113W* està al voltant 7 vegades.

Tal com es mostra en la gràfica (Fig. R20), els gens de resposta a diferents estressos presenten patrons transcripcionals diferents, ja que cadascú està relacionat de manera diferent en conservar l'estat metabòlic cel·lular. El gen *HSP26* s'activa en presència de Criptolepina entre 5 i 11 vegades més respecte el no tractat, segons la

concentració del fàrmac, 7.5µM i 17µM respectivament. L'expressió del *PHO5* s'inhibeix entre 3 i 4 vegades, i el gen *TPS1* s'indueix el doble en presència de Criptolepina.

Els gens implicats en el metabolisme del ferro presenten una davallada de la transcripció quan les cèl·lules es tracten amb l'intercalador (Fig. R20). La Criptolepina reprimeix gairebé 11 vegades la transcripció de l'*ARN2*. El gen *FIT3* assoleix uns nivells de repressió de 48 i 32 vegades menys en presència del fàrmac. La diferència transcripcional del gen *TIS11* deguda al fàrmac, està al voltant de 10 i 5 vegades menys de mRNA, segons la concentració emprada.

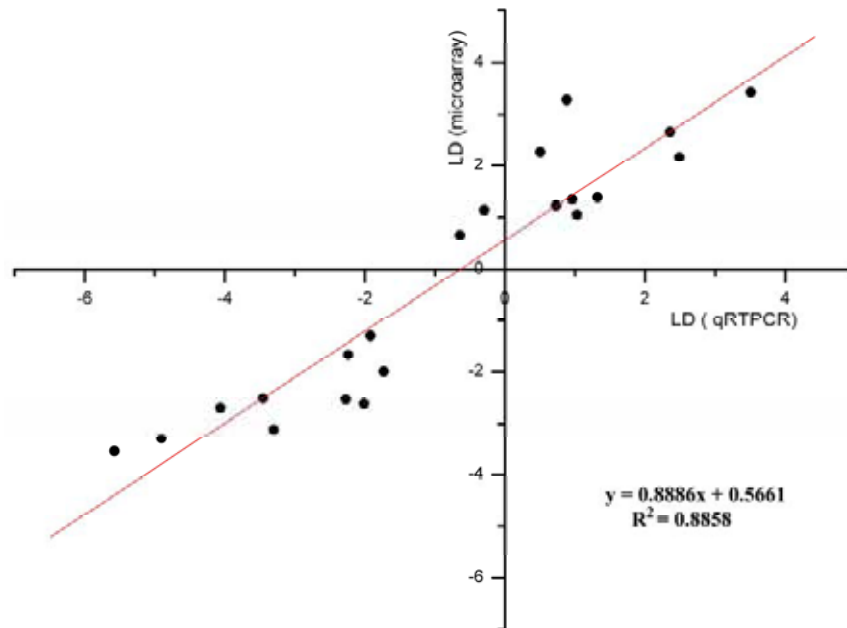


**Fig. R20. Anàlisi diferencial de la transcripció dels gens en cèl·lules tractades amb 7.5µM o 17 µM de Criptolepina mitjançant PCR a temps Real.** A la part més esquerra s'indiquen els principals processos en què estan involucrats els gens testats. L'expressió diferencial es representa com LD =  $\text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ , entre el tractament amb 7.5µM (barres grises), o amb 17µM Criptolepina (barres negres) respecte el no tractat. Prèviament les Ct s'han corregit pel gen de referència *ACT1*. Cada experiment ha estat reproduït per triplicat.

### C.2.1 Correlació de les dades dels microarrays i de la PCR a Temps Real

A partir dels valors de mRNA mesurats mitjançant la tècnica quantitativa (qRT-PCR), es varen correlacionar amb els resultats obtinguts amb la tècnica semiquantitativa (microarrays de cDNA) (Fig. R21).

L'equació de la recta presenta una correlació ( $R^2$ ) igual a 0.88, la qual valida els resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi global del transcriptoma.



**Fig. R21. Correlació de l'expressió gènica obtinguda per PCR a temps real respecte els valors dels microarrays de cDNA de cèl·lules tractades amb Criptolepina.** Valors d'expressió diferencial ( $LD = \text{Log}_2[\text{Fold Change}]$ ) dels següents gens; *HSP26*, *PHO5*, *TPS1*, *ARN2*, *FIT3*, *TIS11*, *YJR029W*, *SUC2*, *QCR8*, *CUP1-1* i *CPR6*. Mitjanes de les rèpliques dels microarrays respecte el promig dels triplicats de la qRT-PCR. L'equació de la recta de regressió s'indica el coeficient de correlació,  $R^2$ .

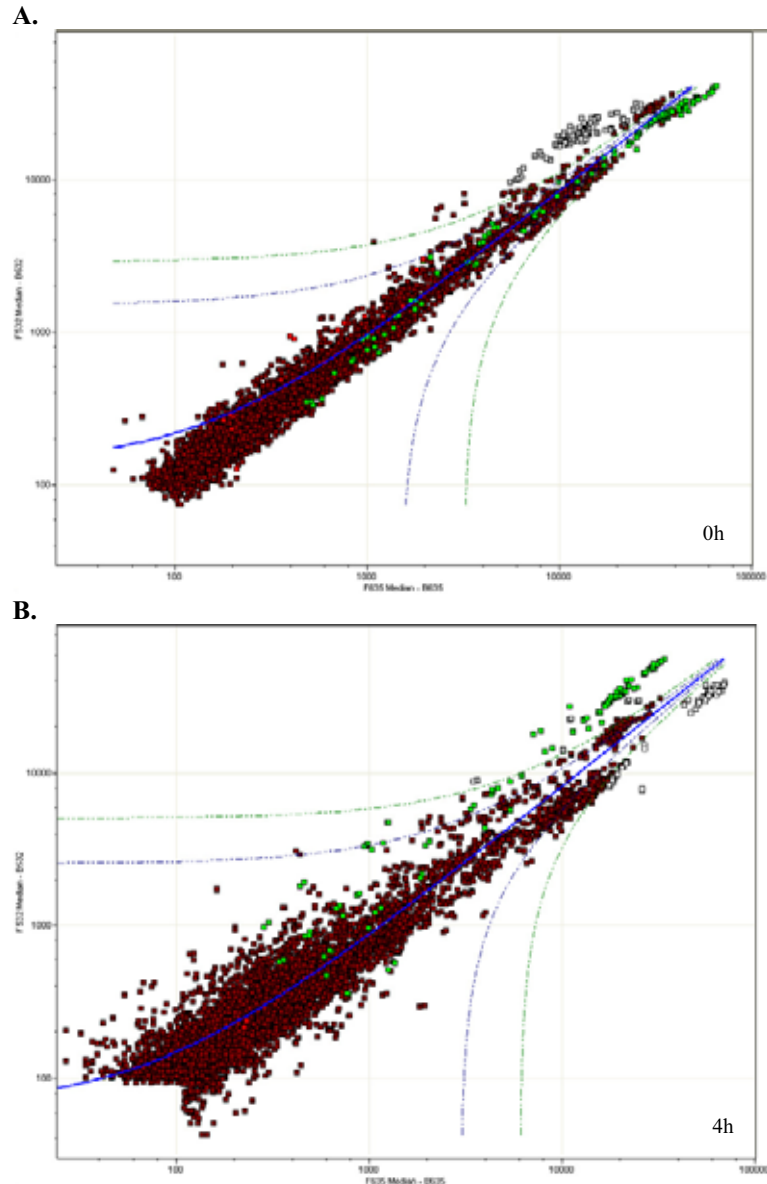
*Tercera Part. Efectes de la Daunorubicina en el llevat*

**A. EFECTES DE LA DAUNORUBICINA EN EL METABOLISME DELS CARBOHIDRATS EN TRACTAMENTS CURTS**

En la primera i segona part d'aquest capítol, s'ha identificat la influència del tractament amb Daunorubicina en els nivells transcripcionals dels gens implicats en el metabolisme dels carbohidrats, especialment, dels gens de la ruta metabòlica de la glicòlisis (tant per a tractaments curts com llargs). Tot i que el patró de repressió es conserva al llarg del temps, s'ha estudiat l'acció del fàrmac en aquesta categoria ontològica a partir de les dades de la resposta transcripcional de cèl·lules tractades a temps curts, ja que el patró de repressió és més pronunciat i afecta a més gens implicats en aquesta via.

**A.1 Desacoblament al llarg de la cinètica dels gens ribosomals i els del metabolisme dels carbohidrats**

El llevat pot usar una varietat de fonts de carboni fermentables i no fermentables, no obstant la glucosa és la preferida. La detecció de glucosa al medi indueix una cascada de senyals intracel·lulars les quals modularan i ajustaran el metabolisme cel·lular i els diferents patrons transcripcionals. La resposta transcripcional induïda per la presència de glucosa, és l'activació de l'expressió dels gens glicolítics i dels gens de les proteïnes ribosomals (Gancedo, 1992). Així doncs, les cèl·lules proliferatives presenten una elevada coordinació entre l'estat nutricional i la biogènesi dels ribosomes (Gasch and Werner-Washburne, 2002; Levy et al., 2007; Warner, 1999; Yin et al., 2003). A més, estudis del transcriptoma del llevat han demostrat que tant els gens codificants per proteïnes ribosomals com els gens implicats en la via de la glicòlisi comprenen les categories de gens més expressats en el llevat (Lopez and Baker, 2000; Velculescu et al., 1997). No obstant, el que s'observa a partir dels estudis globals de cèl·lules tractades amb Daunorubicina, és un desacoblament entre ambdues categories gèniques. El fàrmac indueix una disminució dels nivells de transcrit dels gens del metabolisme dels carbohidrats especialment dels gens glicolítics, en contraposició, amb l'aparent augment dels nivells transcripcionals per als gens codificants per subunitats ribosomals (Fig. R22).



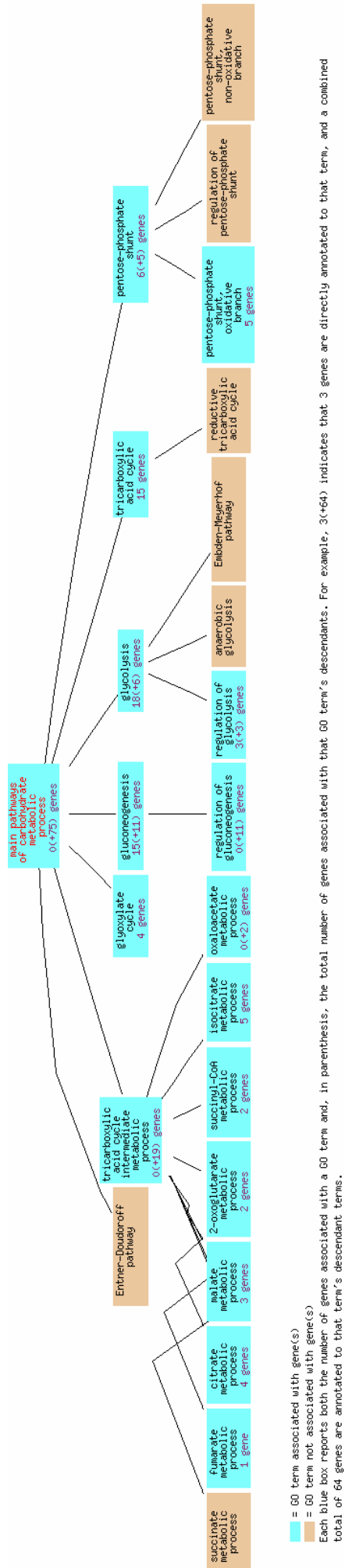
**Fig. R22. Rectes de regressió de la resposta transcripcional al tractament amb Daunorubicina.** Dispersió dels canvis en l'expressió dels gens del tractament respecte al no tractat, determinada a partir dels valors normalitzats (Materials i Mètodes). **A.** Punt inicial de la cinètica (0h), **B.** després de 4 hores de tractament amb  $12\mu\text{M}$  de Daunorubicina. Els punts en verd corresponen als gens descrits en el metabolisme dels carbohidrats, els blancs als gens ribosomals més expressats. L'eix de les x és la intensitat neta pel fluorocrom cy3 (control) i el de les y pel cy5 (tractat). La recta de regressió està indicada en blau, les línies discontinues representen els valors d'una desviació estàndard i dues, en blau i verd respectivament.

Per tal de fer una anàlisi més exhaustiva del comportament dels gens del metabolisme dels carbohidrats, inicialment es varen representar les dades dels microarrays com a valors d'intensitat neta per un fluorocrom respecte l'altre, obtenint de forma gràfica les expressions diferencials per a tots els gens. Un cop feta la recta de regressió d'aquests valors, es visualitza globalment el comportament dels gens inhibits i activats (Fig. R22). Els gens representats en verd, són els gens descrits pel *GO-Term*

(*SGD*) pertanyents a les principals rutes del metabolisme dels carbohidrats (Fig. R23). Aquests gens presenten un patró transcripcional oposat al dels gens ribosomals, representats en blanc a les mateixes gràfiques (Fig. R22). Al temps inicial, els gens del metabolisme dels carbohidrats no presenten canvis en l'expressió diferencial com la majoria dels gens, i estan propers a la recta de regressió. Un cop transcorregudes les 4 hores de tractament amb Daunorubicina, augmenta el nombre de gens amb expressió relativa diferent de 1. Aquest grup de gens s'allunya del conjunt dels gens de proteïnes ribosomals, pels quals el tractament, aparentment, indueix canvis en els nivells d'expressió (els valors són propers a la recta de regressió).

L'expressió diferencial obtinguda pels gens codificants per proteïnes de les subunitats ribosomals (descrits per l'*SGD*) i la dels gens del metabolisme dels carbohidrats es van agrupar jeràrquicament al llarg dels tres temps (Fig. R24). Com a resultat es van obtenir dos grups perfectament diferenciats, el grup I, lleugerament induït al llarg del temps, engloba els components ribosomals i els de la RNA polimerasa, i el grup II, format pels gens del metabolisme dels sucres.

Aquests dos patrons presenten un elevat grau de consistència, ja que l'agrupació jeràrquica segons la similitud dels patrons d'expressió gènica conserva l'ordre cronològic dels experiments, 0, 1 i 4 hores (Fig. R24, part superior). A més, s'observa que tant les rèpliques tècniques com les biològiques s'agrupen juntes (Fig. R24, part superior).



Feb 8, 2007

Fig. R23. Vies principals del metabolisme dels carbohidrats. Estructura d'arbre per les diverses categories ontològiques descrites pel *GO Term Finder, SGD*.



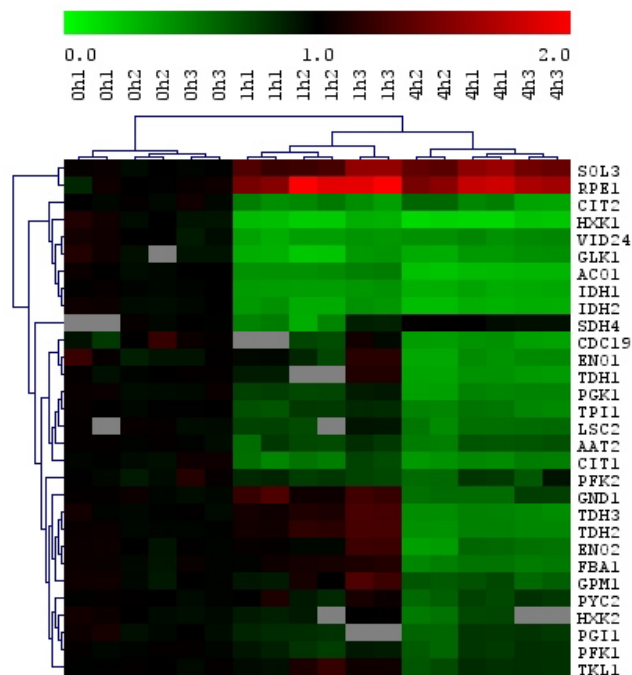


## A.2 Inhibició del metabolisme dels carbohidrats per la Daunorubicina

El tractament a curt termini amb 12 $\mu$ M Daunorubicina inhibeix més de dues vegades els nivells transcripcionals de 18 gens implicats en el metabolisme dels carbohidrats, entre els quals els gens glicolítics es troben en major proporció.

Dels 75 gens descrits en el *GO-Term* (SGD) que participen en les principals rutes del metabolisme dels carbohidrats, 73 estan impresos en els microarrays d'oligonucleòtids. Després d'aplicar els criteris estàndards en aquesta anàlisi, s'obtenen valors d'expressió diferencialment significatius entre els tractaments per a 30 gens (Taula R2).

L'efecte de la Daunorubicina en la resposta transcripcional dels gens del metabolisme dels sucre s'observa en la Figura R25. L'agrupació jeràrquica de la resposta al tractament a curt termini (1 i 4 hores) permet diferenciar dos grups; un grup majoritari de 28 gens, que presenten una disminució de la transcripció deguda al fàrmac, i un grup minoritari de 2 gens, induïts pel tractament (Fig. R25).



**Fig. R25.** Hierarchical clustering de l'expressió diferencial dels gens relacionats en les principals vies del metabolisme dels carbohidrats descrits pel *GO-Term* (SGD), com a resposta al tractament amb Daunorubicina. Part esquerra, agrupació jeràrquica dels gens amb canvis transcripcionals significatius, en la part superior, dendrograma de les condicions i rèpliques, utilitzant el programa TIGR.

El metabolisme dels carbohidrats engloba diferents rutes metabòliques; la glucòlisi, el cicle dels àcids tricarbòxilics o cicle de Krebs, la gluconeogènesi, la via de les pentoses fosfat i el cicle del glioxilat, com a més directes (Fig. R23). Tot i la interrelació entre aquestes rutes cada una té el seu paper cel·lular. Per estudiar l'efecte de la Daunorubicina en les vies energètiques anomenades, es van classificar tots els gens del metabolisme dels carbohidrats amb l'expressió alterada, en funció de la ruta metabòlica a la qual pertanyen (Taula R14).

De les vies prèviament citades, la glucòlisi és la més afectada per la presència de Daunorubicina. L'efecte del fàrmac indueix una repressió dels nivells de transcrit dels gens implicats, i en molts casos, la disminució del mRNA és superior a la meitat (Taula R14, marcats en groc). L'única via amb algun gen activat, és la via de les pentoses fosfat (tanmateix la via oxidativa), aquesta via en el llevat s'indueix en resposta a estressos, principalment per a protegir la cèl·lula enfront el dany oxidatiu (Taula R14) (Minard and McAlister-Henn, 2001).

Glucòlisi	Gluconeogènesis (exclusos gens comuns amb la glucòlisi)	Cicle dels Àcids Tricarboxílics	Via Pentoses Fosfat
CDC19/YAL038W	ACN9/YDR511W	ACO1/YLR304C	PGI1/YBR196C
ENO1/YGR254W	FBP1/YLR377C	CIT1/YNR001C	RKI1/YOR095C
ENO2/YHR174W	MDH2/YOL126C	CIT3/YPR001W	RPE1/YJL121C
FBA1/YKL060C	PCK1/YKR097W	FUM1/YPL262W	TAL1/YLR354C
GLK1/YCL040W	PYC1/YGL062W	IDH1/YNL037C	TKL1/YPR074C
GPM1/YKL152C	PYC2/YBR218C	IDH2/YOR136W	TKL2/YBR117C
HXK1/YFR053C		KGD1/YIL125W	
HXK2/YGL253W		KGD2/YDR148C	Via oxidativa
PFK1/YGR240C		LSC1/YOR142W	Pentoses Fosfat
PFK2/YMR205C		LSC2/YGR244C	GND1/YHR183W
PFK4		MDH1/YKL085W	GND2/YGR256W
PFK5		SDH1/YKL148C	SOL3/YHR163W
PGI1/YBR196C		SDH2/YLL041C	SOL4/YGR248W
PGK1/YCR012W		SDH3/YKL141W	ZWF1/YNL241C
TDH1/YJL052W		SDH4/YDR178W	
TDH2/YJR009C			
TDH3/YGR192C			
TPI1/YDR050C			

Taula R14. Llistat dels gens de les principals vies del metabolisme dels carbohidrats. Els gens en verd, presenten un perfil de repressió transcripcional en la cinètica degut a la Daunorubicina, en vermell, els induïts, en gris els que no presenten canvis d'expressió, i en blanc pels que no s'han obtingut dades. Gens en groc, repressió  $\text{Log}_2 < -1$ , en negre, gens reprimits  $\text{Log}_2 > -1$ . Ambdós grups canvien significativament al llarg del temps (ANOVA). Gens representats en esquemes de les vies metabòliques, Figura R26.

Per clarificar l'efecte inhibitori dels gens relacionats amb el metabolisme dels carbohidrats com a resposta del tractament, s'identificaren els gens responsables en la via de la fermentació de la glucosa i en el cicle de Krebs segons el codi de colors de la Taula R14. Mitjançant l'esquema de la ruta, s'observa clarament que gairebé tots els gens codificants pels enzims responsables de la via glicolítica presenten una reducció dels nivells transcripcionals després de tractar les cèl·lules amb Daunorubicina, tal com

s'havia detectat en les categories ontològiques (Fig. R26). La quantitat de gens implicats directament amb el cicle de Krebs que estiguin reprimits pel fàrmac és menor. Principalment, tots els gens amb l'expressió inhibida codifiquen per enzims implicats en els diversos passos en la conversió de piruvat a oxoglutarat (Fig. R27).

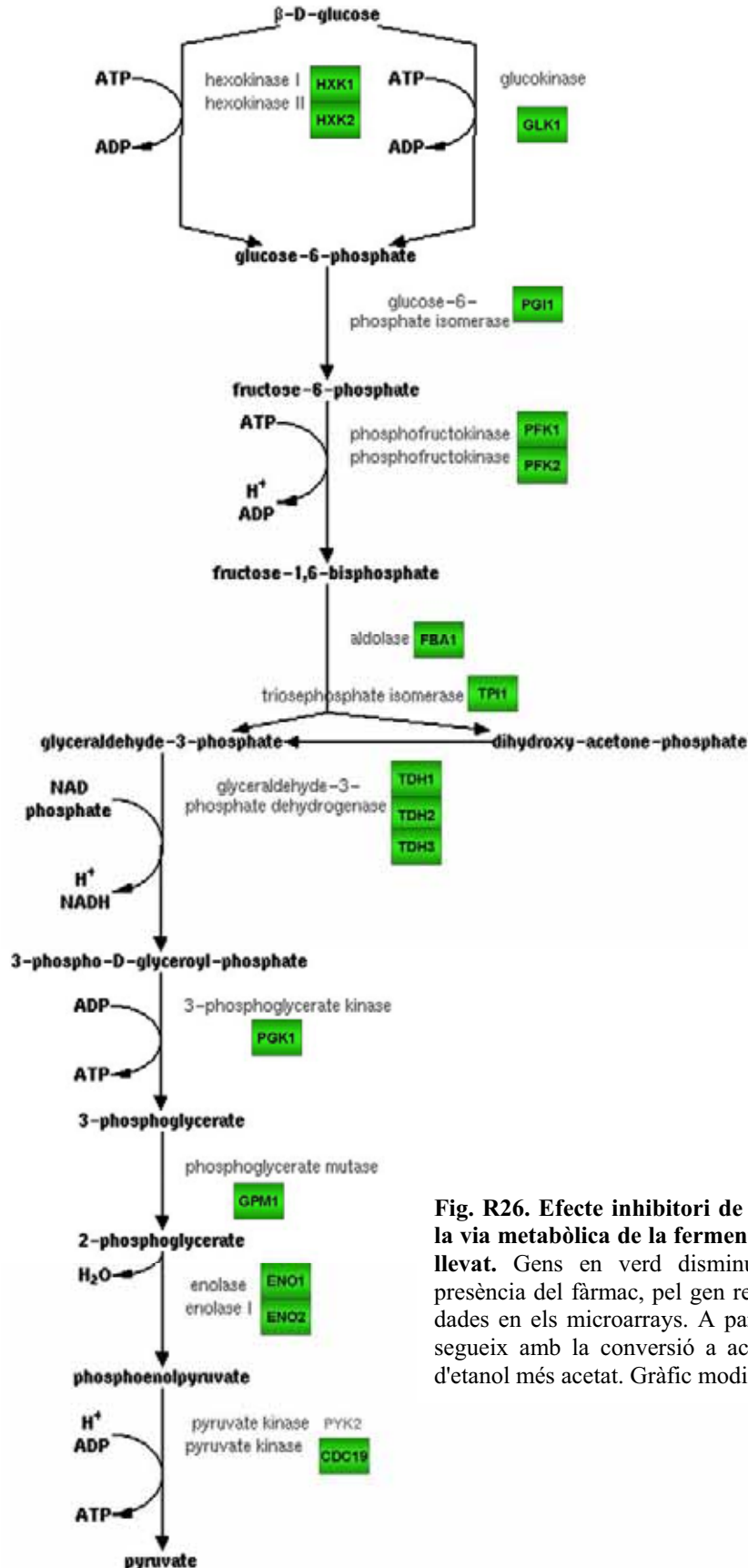


Fig. R26. Efecte inhibitori de la Daunorubicina en la via metabòlica de la fermentació de glucosa en el llevat. Gens en verd disminueixen l'expressió en presència del fàrmac, pel gen restant no s'obtingueren dades en els microarrays. A partir del piruvat la ruta segueix amb la conversió a acetaldehid, i l'obtenció d'etanol més acetat. Gràfic modificat del SGD.

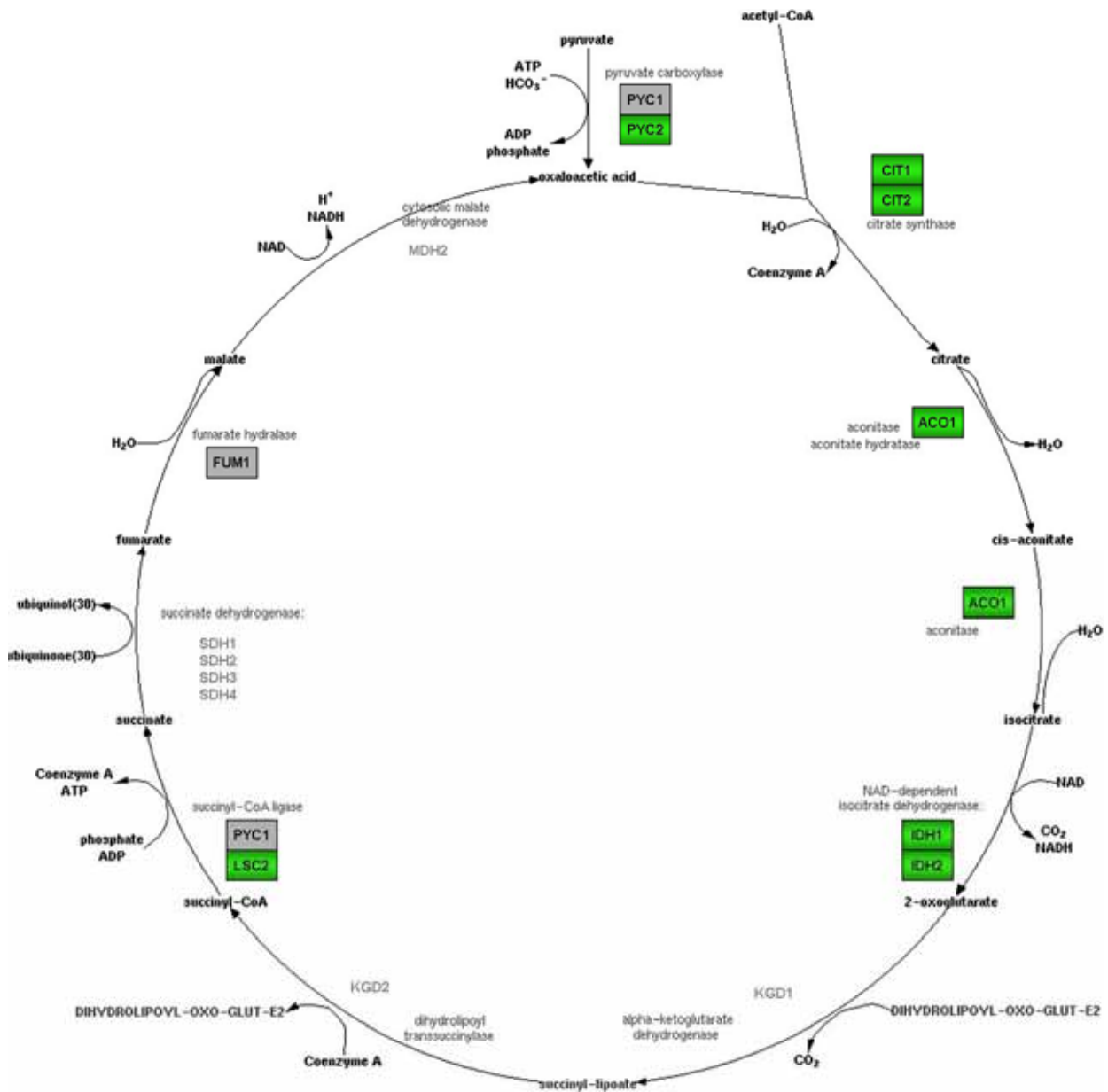


Fig. R27. Efecte de la Daunorubicina en el Ciclo de Krebs. Gens en verd disminueixen l'expressió en presència del fàrmac. Requadre en gris, correspon als gens sense canvis en l'expressió, els gens restants no s'obtingueren valors en els microarrays. Gràfic modificat del SGD.

### A.3 Reguló dels gens glicolítics

*Saccharomyces cerevisiae* té dos factors de transcripció implicats en el mecanisme específic de la regulació transcripcional dels gens glicolítics, el GCR1 (Clifton et al., 1978) i el GCR2 (Uemura and Fraenkel, 1990). El Gcr1p s'ha vist que té un paper en la regulació dels gens de proteïnes ribosomals, però encara no està ben definit (Santangelo and Tornow, 1990; Zhao et al., 2006). No obstant, el que és clar, és

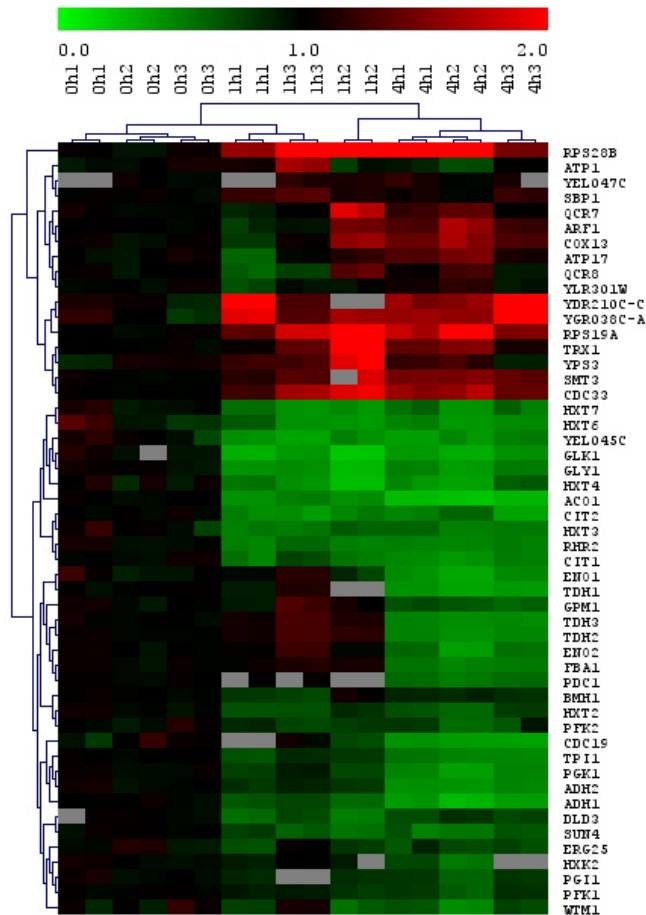
el paper coactivador del Gcr2p juntament amb el Gcr1p damunt els gens glicolítics. Hi han evidències que Gcr1p i Gcr2p interaccionen físicament (Deminoff and Santangelo, 2001; Uemura and Jigami, 1992).

El conjunt de gens regulats per cada factor de transcripció són prou similars (Uemura and Fraenkel, 1990), no obstant, estudis recents de les xarxes reguladores del transcriptoma del llevat (Harbison et al., 2004; Lee et al., 2002), com estudis globals amb mutants per ambdós factors (Sasaki and Uemura, 2005), han descrits gens per a cada proteïna reguladora. En presència de Daunorubicina, al voltant d'un 32% dels gens inhibits més del doble, estan sota el control de Gcr1p o Gcr2p (capítol III).

Donat que el 14.4% del total dels gens regulats per Gcr2p (descrits en la literatura) disminueixen els nivells de mRNA en presència del fàrmac (capítol III) i que, gairebé un 15% dels gens activats per sobre d'1.7 vegades (la majoria ribosomals) estan modulats per Gcr1p (capítol III), es va identificar el Gcr2p, o al menys el complex coactivador format per Gcr1p-Gcr2p com a diana potencial de la Daunorubicina.

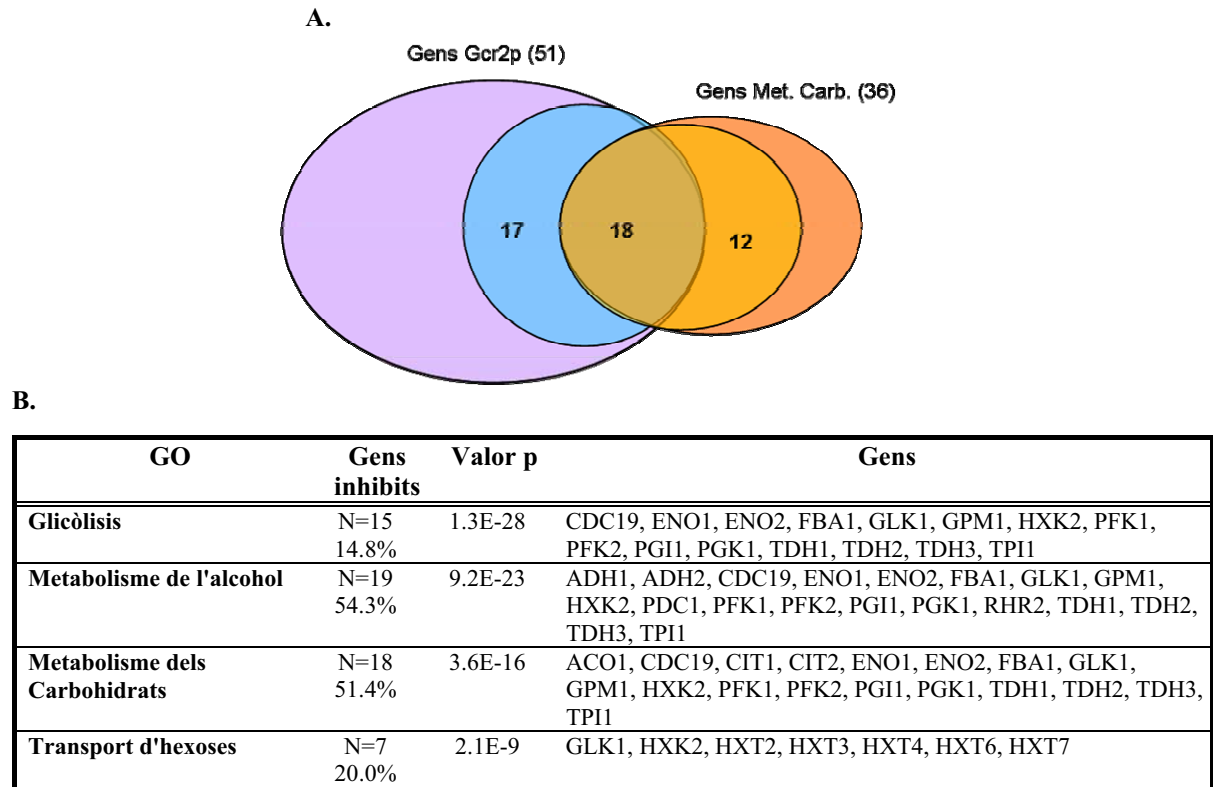
Es va profunditzar en la possible alteració de la regulació per part del Gcr2p i dels 132 gens dependents del seu control descrits en la bibliografia. D'aquests gens, una trentena estan directament relacionats amb el metabolisme dels carbohidrats, un subconjunt format per 17 gens són glicolítics, amb una probabilitat de  $1E-22$ . A part d'aquests gens, també en regula d'implicats en altres processos, com la fosforilació oxidativa, el metabolisme del piruvat, el transport d'electrons i de glucosa, amb una probabilitat inferior a  $8E-5$ .

S'identificà el comportament transcripcional en presència del fàrmac dels 132 gens regulats per Gcr2p, i s'obtingueren dades d'expressió diferencial per a 51 gens (Fig. R28). L'anàlisi de la similitud dels patrons gènics diferencia dos perfils, el més representat i que engloba els gens reprimits, i un minoritari de gens sobreexpressats (Fig. R28). D'aquests 51 gens Gcr2p-dependents, la Daunorubicina altera significativament l'expressió de 35 gens, dels quals 31 gens es reprimeixen entre els quals un 60% presenten nivells de trànscrits inferiors a la meitat, i 4 gens s'indueixen (YGR038v-a, *RPS19A*, *SMT3* i *CDC33*).



**Fig. R28. Hierarchical Clustering** de tots els gens regulats per Gcr2p que presenten una expressió diferencial al tractament amb Daunorubicina. Gràfic resultant de l'agrupació jeràrquica dels 51 gens, dels quals s'han obtingut dades en els microarrays, i les condicions, mitjançant el TIGR.

Dels 35 gens regulats pel factor de transcripció Gcr2p amb canvis transcripcionals inhibitoris, 18 gens estan implicats en el metabolisme dels carbohidrats (Fig. R29), dels quals, 15 gens estan implicats directament amb la glucòlisi (amb un valor p  $1.3E-28$ , *GO Term Finder*, SGD) (Fig. R29, B). Entre els 17 gens regulats per Gcr2p exclosos de l'anterior ontologia (Fig. R29), hi ha 5 transportadors de glucosa (*HXT2*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT6* i *HXT7*) amb un valor p  $2E-7$ , i 4 gens implicats en la fermentació (*ADH1*, *ADH2*, *PDC1*, *RHR2*) amb un valor p  $8E-6$ .



**Fig. R29. Classificació dels gens regulats per Gcr2p i/o implicats en el metabolisme dels carbohidrats amb valors d'expressió diferencial en l'anàlisi global al tractament amb 12 $\mu$ M Daunorubicina. A.** En el diagrama de Venn es representen el total de gens regulats per Gcr2p, els gens implicats en el procés del metabolisme dels sucres (descrits per *GO-Term Finder*, SGD), i els gens amb diferències transcripcionals com a subconjunts. **B.** Processos més destacats pels gens Gcr2p-dependents.

#### A.4 Quantificació de l'expressió diferencial de gens glicolítics

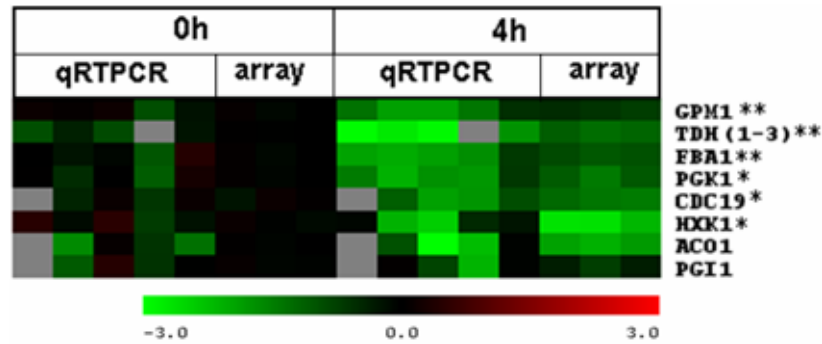
Els valors obtinguts amb els microarrays d'oligonucleòtids van ser validats quantitativament, mitjançant PCR a temps real ( Fig. R30, A).

La Figura R30, B, recull els valors d'expressió dels promitjos de les rèpliques biològiques, per a tots els gens codificants d'enzims implicats en la ruta glicolítica, analitzats per PCR a temps real. Juntament s'indica el valor de la significança del tractament a 4 hores, descrit amb el test estadístic T-Student amb un 95% de confiança.

Els gens amb un valor menor a 1E-2 canvien significativament degut al tractament durant 4 hores amb 12 $\mu$ M Daunorubicina. La disminució significativa de l'expressió que indueix el fàrmac és superior al doble en tots els gens (*FBA1*, *GPM1*, *PGK1* i *TDH(1-3)*), excepte *HXK1*, amb un valor molt pròxim ( $\text{Log}_2=-0.84$ ).



A.



B.

Gen	Descripció	qRT-PCR		Microarray oligonucleòtids	
		Fold Change (Log <sub>2</sub> )	T-Student (valor p)	Fold Change (Log <sub>2</sub> )	T-Student (valor p)
GPM1	Fosfoglicerat mutasa	-1.27	<1E-3	-0.61	<1E-3
TDH (1-3)	Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa	-1.69	<1E-3	-1.19	<1E-3
FBA1	Fructosa-1,6-bisfosfat aldolasa	-1.46	<1E-3	-0.95	<1E-3
PGK1	3-fosfoglicerat quinasa	-1.28	0.010	-1.17	<1E-3
CDC19	Piruvat quinasa	-1.23	0.007	-1.36	<1E-3
HXK1	Hexoquinasa I	-0.84	0.016	-2.47	<1E-3
ACO1	Aconitasa	-0.78	0.515	-1.93	<1E-3
PGI1	Fosfoglucoisomerasa	-0.42	0.613	-0.46	<1E-3
RPS28A	Proteïna ribosomal de la subunitat petita	0.03	0.238	1.09	<1E-3

**Figura R30. Efecte de la Daunorubicina en els nivells transcripcionals dels gens glicolítics i l'*RPS28A*.** A. Visualització dels valors d'expressió diferencial induïts pel tractament a 0 i 4 hores. Resultats de les PCR a temps real (qRT-PCR), i dels microarrays d'oligonucleòtids. Els asteriscs (\*) mostren el grau de significació (\*\* <1E-3; \* <1E-2). La part inferior mostra el rang dels valors, verd per repressió, vermell per activació. B. Canvis d'expressió entre 0 i 4 hores depenents del tractament amb 12µM Daunorubicina (promitjos de tots els replicats en Log<sub>2</sub>) obtinguts per qRT-PCR i pels microarrays d'oligonucleòtids. Valor de significança mesurat amb una T-Student de mostres independents, interval de confiança del 95% (programa utilitzat el SPSS v.10). Gen de referència *RPO21*.

## B. EFECTE DE LA DAUNORUBICINA EN LA REGULACIÓ MEDIADA PER Gcn4p

### B.1 Anàlisi fenotípic de l'acció de la Daunorubicina en el metabolisme dels aminoàcids

Els microarrays de cDNA han permès detectar la repressió del metabolisme dels aminoàcids com a resposta del tractament amb Daunorubicina. Entre els gens reprimits implicats en el metabolisme dels aminoàcids s'observa un petit grup específic del metabolisme de l'arginina. Mitjançant un assaig fenotípic es va relacionar l'efecte d'inhibició detectat a nivell transcripcional amb una possible inhibició d'un dels factors de transcripció que regula la biosíntesi d'aminoàcids.

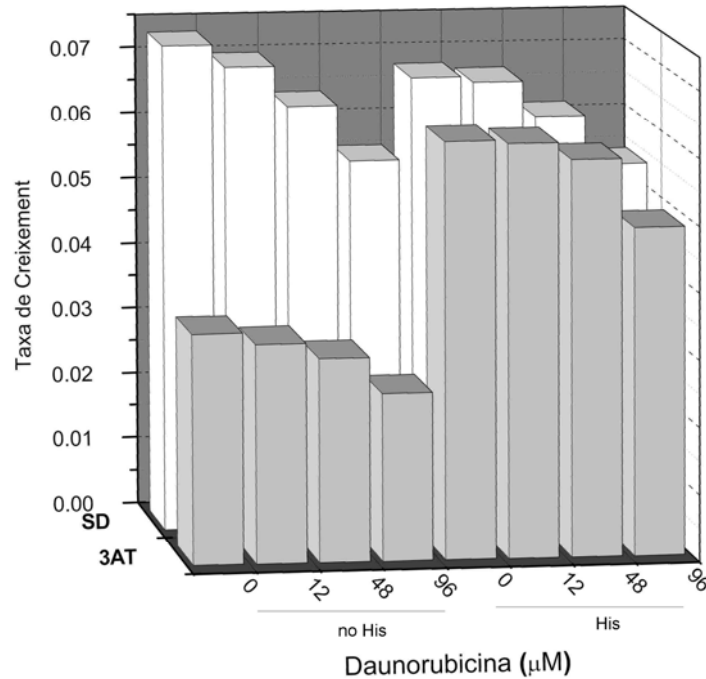
La disponibilitat dels aminoàcids està regulada per xarxes a nivell global. Una d'aquestes xarxes és el control de la regulació dels aminoàcids governada per Gcn4p (Hinnebusch, 2005). Gairebé tots els gens relacionats amb la biosíntesi dels aminoàcids tenen en les regions promotores la seqüència d'unió per a Gcn4p (UAS<sub>GCN4</sub>), l'expressió d'aquests gens depèn de la unió del factor de transcripció Gcn4p a la regió promotora (Natarajan et al., 2001).

En el llevat, la síntesis d'arginina és una via metabòlica important, en la qual hi formen part 12 gens; 10 implicats en la biosíntesi d'arginina i 2 en el procés catabòlic. Es coneixen 3 gens, codificants per a tres proteïnes reguladores. Tan l'anabolisme, com el catabolisme de l'arginina estan subjectes a un control específic de la resposta de la disponibilitat d'arginina en el medi, i a una regulació més global, la qual integra el metabolisme de l'arginina en la resposta cel·lular en funció de la disponibilitat d'aminoàcids (anabolisme) i de la font de nitrogen (catabolisme). El responsable del control global és el factor de transcripció n4p, sobretot els gens biosintètics tenen en el promotor, com a mínim una seqüència diana per Gcn4p.

En condicions del laboratori, la resposta general de control és molt difícil d'induir, gairebé impossible tot i que les cèl·lules creixin en medi mínim (Hinnebusch and Barbour, 1992). Degut als elevats nivells d'expressió basal dels gens implicats en la biosíntesi d'aminoàcids, per induir una situació de carència d'aminoàcids en el llevat es cultiven les cèl·lules en presència d'anàlegs d'aminoàcids, tal com el 3-aminotriazol (3-AT). El 3-AT és un anàleg de l'histidina, competeix amb l'enzim imidazol gliceraldehidfosfat deshidratasa, enzim de la biosíntesi de l'histidina. En presència de l'anàleg al medi, al no haver-hi histidina disponible, s'activa la resposta general de control dels aminoàcids. En condicions de falta d'aminoàcids provocat pel 3-AT, es detecta durant les primeres 4 hores un increment en els nivells del mRNA del *GCN4*, acompanyat seguidament d'un augment de la proteïna (Albrecht et al., 1998).

Les cèl·lules *Δerg6* transformades amb el plasmidi centromèric pRS413 (His<sup>3+</sup>) es tractaren amb diferents concentracions de Daunorubicina al mateix temps que se'ls induïa un augment en la transcripció i els nivells proteics del *GCN4*, mitjançant un dèficit de l'aminoàcid histidina provocat per la presència en el medi de cultiu de 40mM de 3-AT (Fig. R31). La taxa de creixement de les cèl·lules tractades amb el fàrmac disminueix de la mateixa manera en totes les quatre condicions, és a dir, les cèl·lules amb el Gcn4p constitutiu i les tractades amb l'anàleg presenten el mateix perfil negatiu de la proliferació a mida que la dosi de Daunorubicina augmenta, la presència de 3-AT

en el medi també disminueix el creixement. La Daunorubicina no interfereix amb el factor de transcripció responsable de la biosíntesi dels aminoàcids, ja que les cèl·lules crescudes en presència de 40mM 3-AT recuperen el creixement i presenten la mateixa taxa de proliferació que les no tractades amb el fàrmac, quan el medi és suplementat amb l'histidina.



**Fig. R31. Efecte de la Daunorubicina en la taxa de proliferació en un fons Gcn4p activat.** Les cèl·lules  $\Delta erg6$  transformades amb el pRS413 han crescut en 40mM de 3-Aminotriazol, en presència o absència de 0.3mM d'Histidina. Es representen les mitjanes de les taxes proliferatives de tres cultius. La taxa de proliferació és la pendent del canvi de la densitat cel·lular al llarg del temps durant la fase exponencial.

### **Capítol III.**

## **MECANISMES D'ACCIÓ DE LA DAUNORUBICINA I LA CRIPTOLEPINA**

## A. INTERPRETACIÓ DE LA RESPOSTA TRANSCRIPCIONAL MITJANÇANT ELS FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ

La xarxa d'interaccions entre proteïnes reguladores i gens, descriu la major part de la regulació de l'expressió gènica cel·lular del llevat. Els programes transcripcionals, tant els intrínsecs com el cicle cel·lular, com els induïts pels canvis externs, depenen del reconeixement de seqüències específiques promotores per part de proteïnes reguladores i de complexes formats pels factors de transcripció (Garvie and Wolberger, 2001; Lee and Young, 2000). Amb l'objectiu de determinar els factors de transcripció que regulen la resposta del transcriptoma del llevat al tractament amb Daunorubicina o Criptolepina, es va emprar el programa YEASTRACT (<http://www.yeasttract.com>; Teixeira, 2006 #226}, el qual avarca un banc de dades de més de 12000 associacions reguladores entre factors de transcripció i gens diana. Aquesta informació biològica està basada en evidències experimentals publicades, i no en seqüències d'unió teòriques en la regió promotora dels gens diana. A partir d'aquesta eina computacional, s'identificaren els diferents mecanismes d'acció afectats per cada fàrmac mitjançant l'agrupació dels factors de transcripció més enriquits entre els gens alterats. I en darrera instància elucidar els mecanismes d'acció dels fàrmacs.

Les freqüències d'aparició dels factors de transcripció entre els gens expressats diferencialment (tant pels activats com pels reprimits per a cada fàrmac) es van avaluar si eren representatives o no, és a dir, donat un grup concret de gens regulats per un mateix factor de transcripció es va avaluar si l'agrupació tenia la mateixa probabilitat que un esdeveniment aleatori o no, per tant, si la probabilitat obtinguda era major que l'esperada per atzar. El mètode escollit per resoldre les freqüències va ser mitjançant una distribució hipergeomètrica, tanmateix la utilitzada pel programa *GO-TermFinder* (SGD) (Boyle et al., 2004).

### A.1 Mecanismes d'acció de la Daunorubicina

A partir de l'agrupació dels gens transcripcionalment dependents de la Daunorubicina en funció del reguló al qual pertanyen (YEASTRACT), per tal d'identificar els regulons més enriquits es varen obtenir les següents taules (Taula R15, A i B);

A. Tractament 1-4h	Gens dependents de DNR		Total genoma (7200gens)	Distribució Hipergeomètrica		Correcció Bonferroni	
	Inhibits (61)	Activats (108)		Inhibits	Activats	Inhibits	Activats
<b>FT (170)</b>			<b>Gens regulats</b>				
<b>Abf1p</b>		14	495		8.8E-3		
<b>Fhl1p</b>		21	250		7.0E-11		1.2E-8
<b>Gcn4p</b>	20		478	7.9E-10		1.3E-7	
<b>Gcr1p</b>	20	17	235	1.5E-15	5.0E-8	2.6E-13	8.5E-6
<b>Gcr2p</b>	19		132	4.0E-19		6.8E-17	
<b>Ino4p</b>	17		603	5.0E-6		8.5E-4	
<b>Msn2p</b>	25		510	7.3E-14		1.2E-11	
<b>Msn4p</b>	23		447	3.7E-13		6.3E-11	
<b>Pdr1p</b>	21		293	8.1E-15		1.4E-12	
<b>Rn4p</b>	19	29	813	1.8E-5	3.7E-6	3.0E-3	6.2E-4
<b>Sok2p</b>	32	11	735	1.1E-16		1.9E-14	
<b>Yap1p</b>	24		678	2.8E-10		4.7E-8	
<b>Yox1p</b>		12	462		2.3E-2		

B. Tractament 10-15h	Gens dependents de DNR		Total genoma (7200gens)	Distribució Hipergeomètrica		Correcció Bonferroni	
	Inhibits (99)	Activats (68)		Inhibits (valor p)	Activats (valor p)	Inhibits (valor p)	Activats (valor p)
<b>FT (170)</b>			<b>Gens regulats</b>				
<b>Arr1p</b>	19		733	2.7E-3			
<b>Ecm22p</b>		14	269		1.3E-7		2.2E-5
<b>Gcn4p</b>	23		478	6.3E-8		1.1E-5	
<b>Hms1p</b>		15	170		3.0E-11		5.0E-9
<b>Rox1p</b>		14	345		2.5E-6		4.2E-4
<b>Rpn4p</b>	24		813	1.3E-4		2.1E-2	
<b>Sok2p</b>	21	18	735	5.2E-4	7.8E-5		1.3E-2
<b>Swi4p</b>		13	527		7.9E-4		
<b>Upc2p</b>		20	208		1.5E-15		2.5E-13
<b>Yox1p</b>		13	462		2.4E-4		4.0E-2

**Taula R15. Dades utilitzades en el identificar els factors de transcripció més enriquits entre els gens modulats per la Daunorubicina segons el tractament (A i B).** Primera columna correspon als Factors de transcripció identificats en les anàlisis anteriors mitjançant el YEASTRACT, del total de 170 factors possibles. Els valors associats a les dues columnes següents representen la quantitat de gens inhibits i activats per la Daunorubicina (DNR), entre parèntesis s'indica el total de gens alterats. La tercera columna indica la quantitat de gens documentats regulats per cada Factor de transcripció (FT). Es considera que el genoma està compost per 7200 gens. Les darreres columnes mostren el valor p obtingut d'aplicar una distribució hipergeomètrica i la correcció de Bonferroni.

Un resum de les dades anteriors es representa en la Taula R16, en la qual s'indiquen les probabilitats de què els gens alterats pel fàrmac pertanyin per atzar al reguló associat. Els regulons presents en els diversos temps de tractaments, essencialment s'observen per als gens reprimits. Un altre punt a destacar entre els gens transcripcionalment reprimits pel fàrmac, és l'aparició de freqüències molt representatives per als factors de transcripció. Aquests factors de transcripció s'agrupen en dos conjunts segon la funcionalitat: els relacionats amb el metabolisme, tals com Gcr1p, Gcr2p i Gcn4p, al cicle cel·lular com el Sok2p, i els reguladors de la resposta a condicions d'estrès, entre els quals s'indiquen Msn2p, Msn4p, Yap1p i Pdr1p.

Els gens inhibits per la presència del fàrmac durant 1-4 hores, sota el control transcripcional de Gcr1p, Gcr2p, Gcn4p i Sok2p, són gens implicats en dos processos: el metabolisme dels carbohidrats, principalment la glicòlisi, i el metabolisme dels aminoàcids (Taula R17). Per tant, la Daunorubicina està afectant específica o inespecíficament la regulació de l'expressió d'aquestes dues categories, consistent amb la funció propòsit.

FT		Reprimits (valor p)		Activats (valor p)	
		curt	llarg	curt	llarg
<b>Metabolisme</b>					
Gcr1p	Glicòlisi	2.6E-13*		8.5E-6	
Gcr2p	Glicòlisi	6.8E-17*			
Gcn4p	Aminoàcids	1.3E-7*	1.1E-5		
<b>Cicle cel·lular</b>					
Sok2p	Creixement filamentós	1.9E-14*			1.3E-2
Hms1p	Creixement filamentós				5.0E-9
Yox1p	Cicle cel·lular				4.0E-2
Rpn4p	Proteosoma	3.0E-3	2.1E-2	6.2E-4	
Fhl1p	Procés rRNA			1.2E-8	
<b>Estrès</b>					
Msn2p	Estrès general	1.2E-11*			
Msn4p	Estrès general	6.3E-11*			
Yap1p	Estrès oxidatiu, metalls, fàrmacs	4.7E-8*			
Pdr1p	Múltiple resistència a fàrmacs	1.4E-12*			
Rox1p	Hipòxia				4.2E-4
<b>Membrana</b>					
Upc2p	Biosíntesi esterols				2.5E-13
Ino4p	Biosíntesi fosfolípids	8.5E-4			

**Taula. R16. Factors de transcripció majoritaris que regulen els gens alterats per la Daunorubicina a curt termini (1 i 4 hores) o a llarg termini (10-15 hores).** S'indica el procés per a cada factor de transcripció (FT), el comportament dels gens, reprimits o activats pel fàrmac, i el valor de p, obtingut mitjançant el test hipergeomètric amb la correcció de Bonferroni (Excel). L'asterisc (\*) mostra alguns dels factors més enriquits.

GO	Gens inhibits	Valor p	Gens
<b>Metabolisme àcid carboxílic</b>	N=26 31.3%	1.1E-13	<i>ACN9, ACO1, ALD5, ARG1, ARG4, ARO2, BIO2, CDC19, CHA1, CIT1, CIT2, ENO1, GLY1, HIS4, IDH1, IDH2, LEU1, LYS1, OLE1, PGK1, SES1, TDH1, TDH2, TDH3, TRP5, VID24</i>
<b>Glicòlisi</b>	N=10 12.0%	1.6E-11	<i>CDC19, ENO1, GLK1, HXK1, PGK1, TDH1, TDH2, TDH3, TPI1, TYE7</i>
<b>Biosíntesi aminoàcids</b>	N=13 15.7%	6.1E-8	<i>ACO1, ARG1, ARG4, ARO2, CIT1, CIT2, GLY1, HIS4, IDH1, IDH2, LEU1, LYS1, TRP5</i>

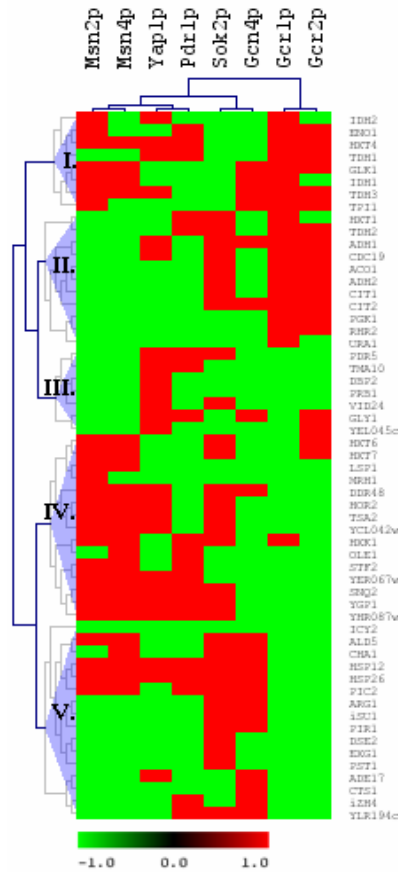
**Taula R17. Agrupació del gens inhibits per la Daunorubicina i regulats per Sok2p, Gcn4p, Gcr1p o Gcr2p, segons el procés.** Principals categories ontologies descrites per *GO-Term Finder* (SGD). S'indica el procés, el número de gens i la proporció respecte el total de gens inclosos, la probabilitat que sigui a l'atzar, i els gens.

Per tal de determinar una correlació entre els factors de transcripció més enriquits en la resposta inhibitoria a al fàrmac, es varen agrupar jeràrquicament tant els factors de transcripció sobrerrepresentats com els gens reprimits que regulen, segons la similitud del patró de regulació que presenten (Fig. R32, A). El dendrograma de la part superior de la Fig. R32, A, agrupa les proteïnes reguladores i indica la formació de dos grups: un grup compost per les proteïnes implicades en la resposta a condicions estressants juntament amb Sok2p i Gcn4p, i un segon grup amb les proteïnes reguladores de la glicòlisi.

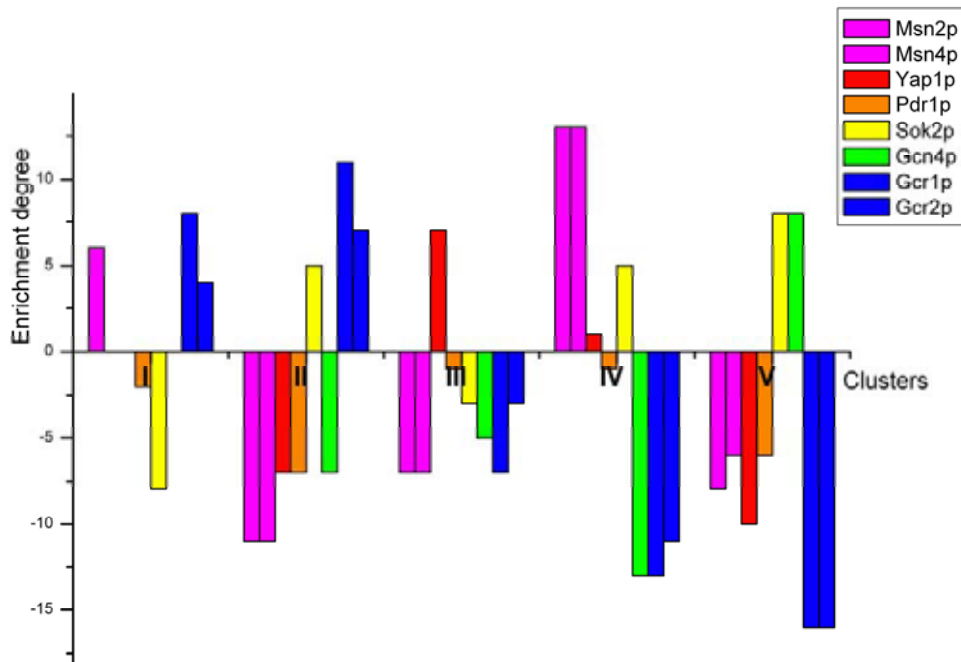
Per a cada un dels cinc conjunts de gens definits segons la similitud del patró regulador, s'observa que cada grup presenta un grau d'enriquiment i una distribució diferent dels factors de transcripció (Fig. R32, B). Els grups I i el II estan regulats majorment per Gcr1p i Gcr2p, els grups III i IV tenen enriquits les proteïnes reguladores de la resposta a estrès, i els gens del grup V tenen afavorits Sok2p i Gcn4p. La repressió dels gens que formen el grup V, indicaria que l'alteració de l'expressió dels gens del metabolisme dels aminoàcids podria provindre d'un efecte cel·lular indirecte regulat per Sok2p, a més del regulat per Gcn4p.



A.



B.



**Fig. R32. Factors de transcripció enriquits entre els gens reprimits per la Daunorubicina. A.** Agrupació jeràrquica dels gens (lateral) i dels factors de transcripció (superior) mitjançant el TIGR. El gen sota el control d'un factor de transcripció s'indica en vermell, si no pertany al reguló en verd. Grups de gens segons la similitud del patró definits pel programa indicats en lletres romanescs. **B.** Representació de la presència dels factors de transcripció per a cada grup de gens.

## A.2 Mecanismes d'acció de la Criptolepina

La identificació dels regulons apareguts entre els gens amb una expressió diferencial induïda per la Criptolepina (Taula R18, A i B), i amb una freqüència no estocàstica s'han abordat seguint els mateixos passos que per la Daunorubicina.

A. Tractament 1-4h	Gens dependents de CPL		Total genoma (7200gens)	Distribució Hipergeomètrica		Correcció Bonferroni	
	Inhibits (80)	Activats (56)		Gens regulats	Inhibits	Activats	Inhibits
<b>FT (170)</b>							
<b>Arr1p</b>		13	733		2.3E-3		
<b>Gcn4p</b>		16	478		3.3E-7		5.5E-5
<b>Hap4p</b>	15		349	4.2E-6		7.2E-4	
<b>Hsf1p</b>	17		532	4.2E-5		7.1E-3	
<b>Ifh1p</b>		8	196		1.0E-4		1.8E-2
<b>Ino4p</b>	14	9	603	3.8E-3	2.5E-2		
<b>Mbp1p</b>	16		443	1.7E-5		2.9E-3	
<b>Msn2p</b>	24		510	4.8E-10		8.2E-8	
<b>Msn4p</b>	23		447	2.1E-10		3.6E-8	
<b>Phd1p</b>	14		450	2.7E-4		4.6E-2	
<b>Rap1p</b>		10	715		2.7E-2		
<b>Rpn4p</b>		14	813		2.0E-3		
<b>Sfp1p</b>		15	509		3.9E-6		6.7E-4
<b>Sok2p</b>	23	14	735	2.0E-6	8.1E-4	3.5E-4	
<b>Ste12p</b>		9	463		6.1E-3		
<b>Swi4p</b>	16		527	1.3E-4		2.2E-2	
<b>Yap1p</b>	27	9	678	1.2E-9	4.2E-2	2.0E-7	

B. Tractament 15-20h	Gens dependents de CPL		Total genoma (7200gens)	Distribució Hipergeomètrica		Correcció Bonferroni	
	Inhibits (50)	Activats (51)		Gens regulats	Inhibits (valor p)	Activats (valor p)	Inhibits (valor p)
<b>Abf1p</b>		16	495		1.3E-7		2.1E-5
<b>Adr1p</b>		17	259		7.7E-13		1.3E-10
<b>Hsf1p</b>		29	532		2.4E-20		4.0E-18
<b>Mig1p</b>		18	160		9.5E-18		1.6E-15
<b>Msn2p</b>		30	510		3.8E-22		6.5E-20
<b>Msn4p</b>		31	447		3.3E-25		5.6E-23
<b>Pdr1p</b>		21	293		1.1E-16		1.9E-14
<b>Pho4p</b>	10		203	8.8E-7		1.5E-4	
<b>Sok2p</b>		24	735		1.6E-11		2.7E-9
<b>Swi4p</b>		17	527		4.7E-8		8.0E-6
<b>Yap1p</b>	11	26	678	4.0E-3	3.1E-14		5.2E-12

**Taula R18. Dades utilitzades en el identificar els factors de transcripció més enriquits entre els gens modulats per la Criptolepina segons el tractament (A i B).** Primera columna correspon als Factors de transcripció identificats en les anàlisis anteriors mitjançant el YEASTRACT, del total de 170 factors possibles. Els valors associats a les dues columnes següents representen la quantitat de gens inhibits i activats per la Criptolepina (CPL), entre parèntesis s'indica el total de gens alterats. La tercera columna indica la quantitat de gens documentats regulats per cada Factor de transcripció (FT). Es considera que el genoma està compost per 7200 gens. Les darreres columnes mostren el valor p obtingut d'aplicar una distribució hipergeomètrica i la correcció de Bonferroni.

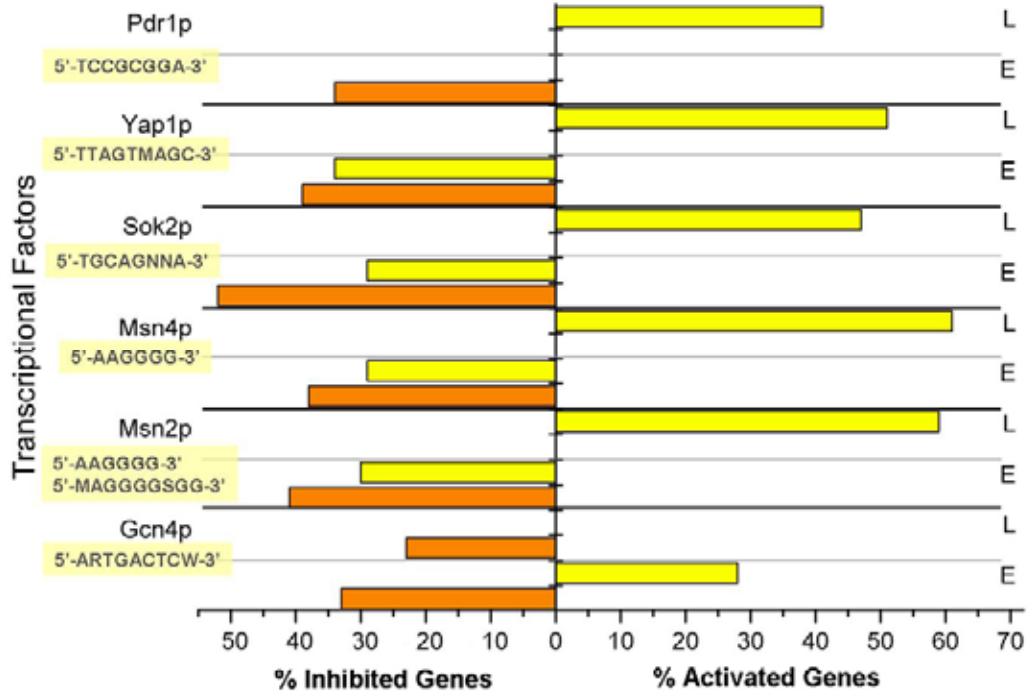
La Taula R19, mostra que els factors reguladors de la resposta a estressos fisicoquímics són els més representatius en cèl·lules tractades amb Criptolepina. Els gens que modulen aquests factors es sobreexpressen en tractaments llargs de Criptolepina, així doncs, la principal resposta que indueix el fàrmac en el transcriptoma del llevat és la inducció d'una resposta a condicions d'estrès, a diferència del tractament amb Daunorubicina.

FT		Reprimits (valor p)		Activats (valor p)	
		curt	llarg	curt	llarg
<b>Estrès</b>					
<b>Yap1p</b>	Estrès oxidatiu, metalls, fàrmacs		2.0E-7		5.2E-12
<b>Msn2p</b>	Estrès general		8.2E-8		6.5E-20
<b>Msn4p</b>	Estrès general		3.6E-8		5.6E-23
<b>Pdr1p</b>	Múltiple resistència a fàrmacs				1.9E-14
<b>Hsf1p</b>	Xoc tèrmic		7.1E-3		4.0E-18
<b>Mig1p</b>	Nivells de nutrients				1.6E-15
<b>Adr1p</b>	Nivells de nutrients				1.3E-10
<b>Pho4p</b>	Nivells de fosfats		1.5E-4		
<b>Cicle cel·lular</b>					
<b>Abf1p</b>	Reparació, replicació, silenciament				2.1E-5
<b>Mbp1p</b>	Progressió G1/S		2.9E-3		
<b>Swi4p</b>	Progressió G1/S		2.2E-2		8.0E-6
<b>Phd1p</b>	Creixement pseudohifal		4.6E-2		
<b>Sok2p</b>	Creixement pseudohifal		3.5E-4		2.7E-9
<b>Sfp1p</b>	Mida cel·lular				6.7E-4
<b>Ifh1p</b>	Procés rRNA, telòmer				1.8E-2
<b>Metabolisme</b>					
<b>Gcn4p</b>	Aminoàcids				5.5E-5
<b>Hap4p</b>	Respiració		7.2E-4		

**Taula R19. Factors de transcripció majoritaris que regulen els gens alterats per la Criptolepina a curt termini (1 i 4 hores) o a llarg termini (15-20 hores).** S'indica el procés per a cada factor de transcripció (FT), el comportament dels gens, reprimits o activats pel fàrmac, i el valor de p, obtingut mitjançant el test hipergeomètric amb la correcció de Bonferroni (Excel).

### A.3 Factors de transcripció presents en les dues respostes transcripcionals

La resposta transcripcional en el llevat és específica per a cada fàrmac. La Daunorubicina i la Criptolepina desencadenen en les cèl·lules respostes diferents, ja que els mecanismes d'acció enriquits són específics per a cada fàrmac. No obstant, en s'han identificat alguns factors de transcripció comuns. En la Fig. R33 es mostren els factors de transcripció que apareixen implicats en les dues respostes. En termes generals, s'observa el comportament diferent dels gens regulats per cadascun d'ells segons el fàrmac. Tan sols coincideixen els gens reprimits regulats per Yap1p, Sok2p, Msn2p i Msn4p en tractaments a curt termini.



**Fig. R33. Factors de transcripció comuns entre els gens alterats per la Daunorubicina (taronja) i la Criptolepina (groc).** Es representa la proporció de gens inhibits o activats sota el control d'un mateix factor de transcripció, respecte el total de gens diferencialment expressats. En la part esquerra s'indica el factor de transcripció i la seqüència consens d'unió al promotor. En la dreta el temps de tractament, curt o E (1-4 hores), o prolongat o L (10-20 hores).