



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
DE IZTACALA

400282  61060

RESPUESTA AL ESTRES TERMICO Y SALINO EN  
MUTANTES DE Saccharomyces cerevisiae QUE CARECEN  
DE UNA O MAS PROTEINAS RIBOSOMALES ACIDAS.

B01192/96  
E<sup>o</sup>. 3

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

IVONNE MARIA OLIVARES CORICHI

DIRECTOR DE TESIS,

DR. SAMUEL ZINKER RUZAL

CENTRO DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN.



MEXICO, 1996



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Quiero dedicar este escrito a siete de los seres  
que más adoro, ya que este logro no es sólo mío.  
El esfuerzo, los desvelos, la alegría y la angustia  
por las que he pasado, las he compartido con ellos.

Gracias a DIOS por todo.

**Gracias a mis padres:**

Lucio Olivares Baez. Gracias por tu confianza, por el grandísimo amor  
que nos tienes a tus hijos, por el gran esfuerzo  
que has hecho por darme todo lo que tengo hoy.

Yolanda Corichi Vázquez: Gracias por preocuparte por mí y por mis  
hermanos, por el cariño infinito que siempre nos  
has demostrado y gracias por confiar en mí.

**Gracias a mis hermanos:**

Claudia. Gracias por tus consejos, tus regaños, tu amistad y por ser  
mi hermana.

César. Te agradezco todo el cariño y apoyo que me has brindado  
en todos los aspectos, siempre con la finalidad de que las  
cosas se me hicieran menos complicadas.

Fabián y Víctor. Gracias a ustedes dos encontré muchas veces un  
motivo para seguir, gracias por sus porras, por sus bromas  
por sus juegos y por su indescriptible cariño.

AL DR. SAMUEL ZINKER RUZAL:  
Le agradezco el apoyo y la paciencia que  
siempre me tuvo.

Hubo mucha gente que me apoyó y me ayudó directa e indirectamente durante todo éste tiempo, no quiero mencionar nombres por que podría omitir a alguien, pero éstas personas saben muy bien quienes son y es a ellas a quienes **debo** el que con sus comentarios positivos siguiera adelante. Además debo agradecer a aquellas personas que trataron de perjudicarme con sus comentarios negativos, ya que éstos en lugar de perjudicarme, me sirvieron para llenarme de orgullo y así demostrarme a mi misma que pude y puedo.

Hay dos personas que además de agradecerles, les quiero decir que no hay palabras para describir el cariño que les tengo, por que al igual que mi familia, también confiaron en mí y siempre estuvieron a mi lado de un modo u otro. Estas dos personas son FRANCISCO CRUZ VAZQUEZ y ALICIA OCHOA SANCHEZ.

## INDICE

	Pag.
RESUMEN .....	i
ABREVIATURAS .....	iii
INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS .....	13
MATERIALES Y METODOS .....	14
I. MATERIAL BIOLÓGICO .....	14
I.1.- Cepas de levadura .....	14
II. MEDIOS DE CULTIVO .....	15
II.1.- Medios de cultivo para levadura .....	15
II.1.1.- Medio YPD .....	15
II.1.2.- Medio SD .....	15
II.1.2.1.- Base Nitrogenada (YNB 10X) .....	16
III. CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LAS LEVADURAS .....	18
IV. PROCEDIMIENTO PARA SOMETER A ESTRES TÉRMICO .....	18
V. PROCEDIMIENTO PARA SOMETER A ESTRES SALINO .....	19
VI. TÉCNICA PARA REALIZAR CURVA DE CRECIMIENTO .....	19
VII. TÉCNICA PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL .....	20
VII.1.- Soluciones .....	20
VII.2.- Método .....	20
VIII. PREPARACION DE LA PROTEÍNA PARA ELECTROFORESIS .....	21
IX. TÉCNICA PARA ELECTROFORESIS (GEL DISCONTINUO DE MAIZEL UNIDIMENSIONAL) .....	21
IX.1.- Soluciones .....	21
IX.2.- Método .....	23
RESULTADOS Y DISCUSION .....	24
Tolerancia al choque térmico .....	24
Tolerancia al estrés salino .....	26
Patrones proteicos .....	29
CONCLUSIONES .....	31
BIBLIOGRAFIA .....	32

**"RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO Y SALINO EN MUTANTES DE  
Saccharomyces cerevisiae QUE CARECEN DE UNA O MÁS  
PROTEÍNAS RIBOSOMALES ÁCIDAS"**

**RESUMEN**

En la subunidad mayor del ribosoma de la levadura Saccharomyces cerevisiae, se detectan cuatro especies protéicas con un marcado carácter ácido, con puntos isoelectrónicos (pI) cercanos a 3.0, las cuales actúan en el proceso de la traducción. Estas cuatro proteínas ácidas se designan como YP1 alfa, YP1 beta, YP2 alfa y YP2 beta. Se han obtenido mutantes de Saccharomyces cerevisiae que carecen de uno o más de los genes que codifican para estas proteínas ribosomales ácidas.

La información que se tiene hasta ahora acerca de la fisiología de estas mutantes es escasa, por lo que en el presente trabajo se las sometió a estrés térmico y salino con la finalidad de diferenciar su fenotipo.

El estrés térmico se dió mediante el cambio brusco de temperatura de 30 °C a 40, 42 y 45 °C, dando como resultado que la cepa que carece de la proteína ribosomal ácida YP1 alfa (D7) tiene un fenotipo de termotolerancia y que la cepa que carece de la proteína ribosomal ácida YP1 beta (D6) tiene un fenotipo de termosensibilidad.

Con respecto al estrés salino, éste se realizó mediante la exposición de las diferentes cepas de levaduras a medio SD suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0.5 M a 1.5 M). De acuerdo con la sobrevivencia celular de cada una de las cepas mutantes con respecto a la cepa parental, la cepa carente de la proteína ribosomal ácida YP2 beta (D5) ó la que carece de YP2 alfa (D4) tienen un fenotipo de halotolerancia y la cepa carente de la proteína YP1 alfa (D7) tiene un fenotipo de halosensibilidad.

La cepa parental W303 (control), D4, D5, D6 y D7 (carentes de la proteína YP2 alfa, YP2 beta, YP1 beta y YP1 alfa respectivamente) se sometieron a estrés térmico mediante un cambio brusco en la temperatura del medio de cultivo de 30 a 45 °C durante 6 min. Posteriormente se sembraron a 30 °C, se extrajo su proteína total y mediante electroforesis

unidimensional se observó que las alteraciones en los patrones protéicos son permanentes para las cepas D4, D5 y D7, pero no para las cepas W303 y D6.

Los patrones protéicos obtenidos al estresar con NaCl 1M a las cepas W303, D4, D5, D6 y D7, muestran que las alteraciones sufridas en la síntesis de proteínas son diferentes para cada una de las cepas, lo cual puede estar relacionado con la diferencia en sobrevivencia celular entre cada una de ellas.

Esto indica que las proteínas ácidas del ribosoma de Saccharomyces cerevisiae además de actuar en el proceso de la traducción, también pueden ser moduladoras de la actividad del ribosoma o de la traducción misma.

## ABREVIATURAS

A	Amstrong.
cm	centímetro.
°C	grados centígrados.
Da	daltones.
D.E.	desviación estándar.
DNA	ácido desoxirribonucleico.
D.O	densidad óptica.
g	gramo.
h	horas.
HSP	proteínas de choque térmico.
kDa	kilodaltones.
L	litro.
log	logaritmo.
M	molaridad.
mg	miligramo.
min	minuto.
ml	mililitro.
mm	milímetro.
mM	milimolar.
mRNA	ácido ribonucleico mensajero.
N	normal.
nm	nanómetro.
pI	punto isoeléctrico.
RNA	ácido ribonucleico.
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal.
rpm	revoluciones por minuto.
S	coeficiente de sedimentación.
seg	segundo.
SD	medio mínimo de composición definida suplementado con aminoácidos y bases nitrogenadas.
SDS	lauril sulfato de sodio.
TEMED	NNNN-tetrametilendiamina.
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia.
ul	microlitro.
V	voltios.
vol	volumen.
YNB	base nitrogenada de levadura.
YPD	medio rico para crecer levaduras.



## INTRODUCCION

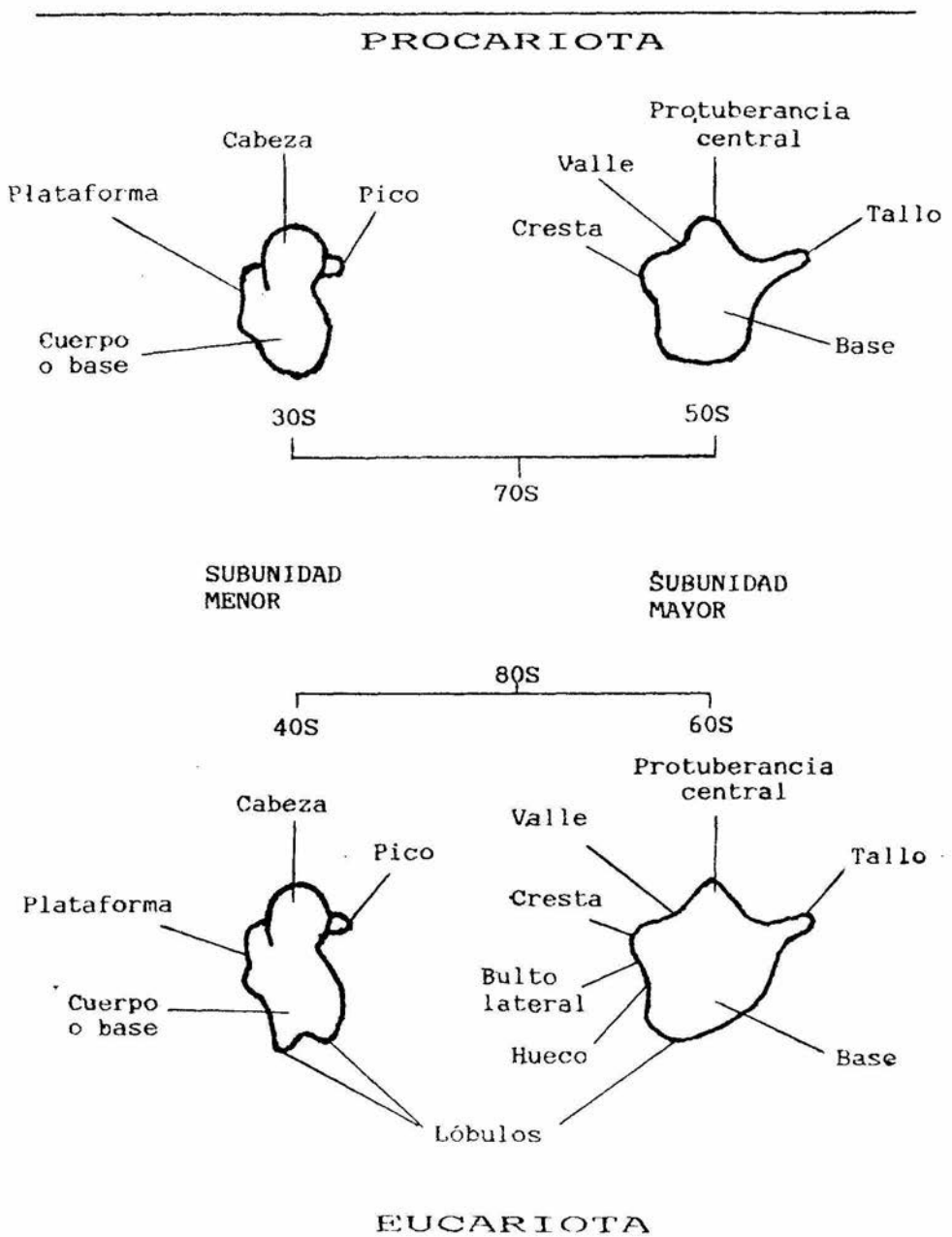
El ribosoma es un organelo presente en todo tipo de células. Es el que cataliza la síntesis de proteínas, en la que intervienen, además, distintos factores protéicos no ribosomales que coadyuvan en la traducción: GTP, RNAs de transferencia (tRNAs) y RNA mensajero (mRNA).

En la naturaleza existen diferentes clases de ribosomas, que se distinguen entre sí por su tamaño y por el número de moléculas de RNA y de proteínas que contienen. Además, todos los ribosomas están formados por dos subunidades ribosomales, una más pequeña que la otra. Cada subunidad se designa por su coeficiente de sedimentación (S) (Figura 1).

En organismos procariotas, por ejemplo en *E. coli*, los ribosomas tienen un diámetro de aproximadamente 18 nm, una masa de 2.8 megadaltones y un coeficiente de sedimentación de 70S. La composición química de este organelo es un 60% de RNA ribosomal (rRNA) y 40% de proteínas. Los componentes de los ribosomas citoplásmicos eucarióticos son más grandes y están en número mayor por célula que en los organismos procariotes; su diámetro es de 20 a 22 nm. El peso molecular de la partícula ribosomal completa, por ejemplo de una levadura, es de 3.6 a 3.9 megadaltones. El coeficiente de sedimentación del ribosoma completo es de 80S a 82S. El 53% del peso total de los ribosomas de la levadura es rRNA, mientras que el 47% restante son proteínas.

Como ya se mencionó, todos los ribosomas están formados por dos subunidades ribosomales que se designan por su coeficiente de sedimentación: 30S y 50S o 40S y 60S para las subunidades pequeña y grande de los ribosomas de los procariotes y de los eucariotes, respectivamente (Figura 1). El rRNA de las subunidades 30S y 40S tiene un coeficiente de sedimentación de 16S y de 18S,

Figura 1



Esquema de las subunidades ribosomales de procariotas y eucariotas, según se aprecian en microscopía electrónica (Oakes y col., 1986).

respectivamente. La subunidad 50S contiene dos especies distintas de rRNA con coeficientes de sedimentación de 23S y 5S; la subunidad 60S contiene tres especies distintas de rRNA con coeficientes de sedimentación de 5S, 23S y 5.8S (Figura 2). Los ribosomas recién aislados de la célula contienen moléculas de mRNA y tRNA que no se consideran como parte de la estructura de la partícula, porque su asociación es transitoria (Vilella, 1988).

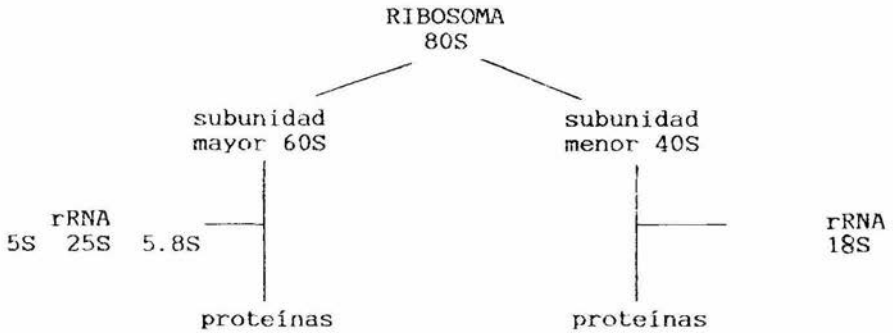
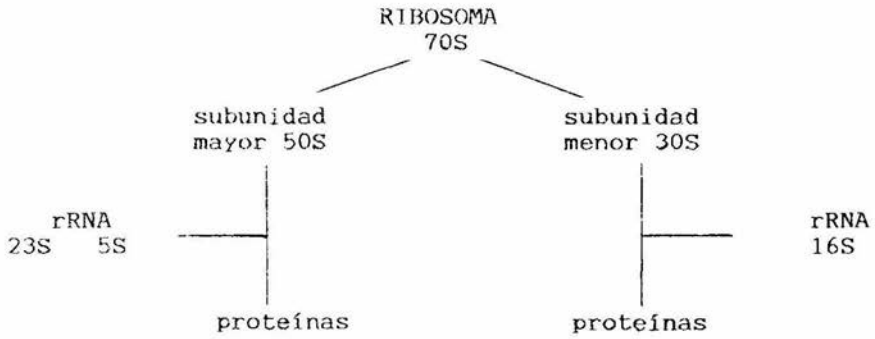
Por estudios filogenéticos se ha llegado a la conclusión de la existencia de una notable conservación en la estructura secundaria del rRNA en eubacterias, arqueobacterias y eucariotas, y en características morfológicas del ribosoma. En la subunidad mayor son rasgos conservados la cresta ("ridge"), la protuberancia central y el tallo ("stalk") (Figura 1) (Payo, 1993).

En el tallo de la subunidad mayor del ribosoma procariótico, eucariótico y arqueobacteriano se detectan especies protéicas con un marcado carácter ácido, con puntos isoeléctricos (pI) de 3.0-4.0. (Payo, 1993; Sanchez-Madrid et al., 1979), generalmente designadas como proteínas "A" (Vilella, 1988). Las proteínas "A" de la subunidad mayor de los ribosomas de diversos orígenes comparten ciertas propiedades fisicoquímicas, las cuales son: bajo peso molecular (11-14 kDa); alto contenido en Alanina (Sanchez-Madrid, 1979) que les dota de una elevada hidrofobicidad, Aspártico y Glutámico (confiriéndoles un pI muy ácido), pocos residuos aromáticos y pocas o ninguna Arginina, Cisteína y Triptofano; alto contenido en alfa-hélice; presentan una región rica en Alanina, Glicina y Prolina, de gran flexibilidad; forman dímeros muy estables en solución; fácilmente extraíbles del ribosoma con soluciones conteniendo alta concentración salina y etanol, permitiendo la reconstitución posterior; son las únicas proteínas presentes en más de una copia por partícula ribosomal (cuando éstas proteínas están presentes en más de una copia en el mismo ribosoma se diferencian sólo por modificaciones químicas simples como la acetilación o la

Figura 2

---

PROCARIOTA



EUCARIOTA

---

Componentes del ribosoma

fosforilación de uno o dos de los polipéptidos (Sanchez-Madrid, 1979)); no interaccionan directamente con el rRNA, sino a través de la proteína L10 y probablemente también L11 (AO y PO en la levadura y mamíferos respectivamente (Mitsui, 1987)); y forman una protuberancia característica en la interacción con factores de elongación y terminación (Payo, 1993).

En E. coli existen dos proteínas "A" (las primeras proteínas ribosomales ácidas que se caracterizaron) denominadas L7 Y L12. Si bien ambas tienen la misma secuencia de aminoácidos, se diferencian en que L7 está acetilada en el extremo amino (Terhorst, et al., 1973)), significando que ambas están codificadas por el mismo gene. Las proteínas L7/L12 están implicadas en la interacción de los factores de iniciación, elongación y terminación con el ribosoma. Estas proteínas juegan un papel muy importante en la hidrólisis del GTP dependiente del factor de elongación EF-G. Los datos disponibles parecen indicar que las proteínas no forman el sitio de unión de los factores sino que alteran la estructura ribosomal de tal forma que las interacciones de los factores de elongación con el ribosoma tienen lugar en las condiciones adecuadas (Vilella, 1988).

L7 y L12 forman dímeros en solución y son parte integrante de un complejo pentamérico constituido por dos dímeros de L7/L12 y una molécula de L10. Este complejo se une al rRNA 23S para formar el "stalk" o tallo de la subunidad mayor del ribosoma (Mitsui, 1987)) (Figura 1).

En organismos eucariotes, las proteínas ácidas se encuentran como una familia de polipéptidos fosforilados teniendo propiedades fisicoquímicas similares entre sí, y similares a las de L7/L12 pero diferente composición en los aminoácidos (Remacha, 1990). Las proteínas "A" eucarióticas difieren de las eubacterianas L7/L12 en cuatro aspectos principales: primero, son codificadas por genes independientes (Wool et al., 1991; Remacha, 1990). Segundo, están

fosforiladas en los ribosomas (Naranda y Ballesta, 1991; Sanchez-Madrid et al., 1981; Zinker y Warner, 1976), las cuales después fueron llamadas proteínas "P" (Tsurugi et al., 1978), así como desfosforiladas en una poza citoplasmática (Zinker, 1980; Van Agthoven, 1978). Tercero, hay intercambio entre las proteínas fosforiladas ribosomales y las proteínas no fosforiladas en el citoplasma, dependiente de síntesis de proteínas (Zinker y Warner, 1976; Tsurugi y Ogata, 1985) que probablemente se encuentran bajo control de más de una proteína cinasa (Naranda et al., 1993) y mecanismos de desfosforilación. Y cuarto, sus cantidades ribosomales y citoplásmicas varían de acuerdo al estado metabólico de las células (Saenz-Robles et al., 1990).

En el hígado de la rata se han descrito dos proteínas "P", denominadas P1 y P2. Estas juegan un papel muy importante en la interacción del factor de elongación EF-2 con el ribosoma y en la hidrólisis de GTP acoplada al proceso. Las partículas ribosomales deficientes en P1 y P2 disminuyen su eficiencia en la unión del factor EF-2, su capacidad de hidrólisis del GTP y su eficiencia de síntesis de polifenilalanina, recuperándose esta última en las partículas reconstituidas (Sanchez-Madrid, 1981; Vilella, 1988). Dos proteínas ácidas distintas se han encontrado en los siguientes organismos: en Artemia salina, la eL12 y eL12', en Neurospora crassa la A1 y la A2, la L40 y L41 en células HeLa.

En contraste con todos los organismos eucarióticos anteriormente citados, en Saccharomyces cerevisiae se han identificado cuatro proteínas ácidas (Kruiswijk y Planta, 1975; Juan-Vidales, et al., 1984), que han sido denominadas YP1 alfa, YP1 beta, YP2 alfa y YP2 beta (antes llamadas L47, L44, L44 y L45, respectivamente), de acuerdo con una nomenclatura unificadora basada en la aplicada previamente a las proteínas de mamífero (Wool y col., 1991).

Ya que éstas proteínas ácidas de levadura son el objeto de trabajo en ésta tesis, a continuación las describiré con mayor detalle.

Zinker y Warner en 1976 describieron por primera vez unas proteínas de la subunidad mayor del ribosoma de S. cerevisiae que al ser sometidas a electroforesis bidimensional migraban a una posición mucho más ácida que el resto de las proteínas del ribosoma y que llamaron L44 y L45. Estas proteínas ácidas fueron relacionadas con las L7/L12 de E. coli por tener características muy parecidas, aunque se diferencian en que L44 y L45 se fosforilan "in vivo". También, Zinker y Warner en 1976 observaron que las proteínas ácidas del ribosoma de S. cerevisiae, al menos L44 y L45, son proteínas de recambio con aquellas presentes en el citoplasma porque aparecen en los ribosomas cuando la síntesis de éstos está inhibida. Resultados similares se han descrito para las proteínas ácidas del hígado de la rata (Tsurugi, 1985) y de A. salina (Kalthoff, 1979). El hecho de que las proteínas ácidas se fosforilen "in vivo" y recién extraídas de ribosomas estén mayoritariamente fosforiladas (Juan-Vidales, 1984), unido a datos que indican que las proteínas ácidas ribosomales presentes en el citoplasma celular están desfosforiladas (Zinker, 1980), ha hecho pensar que la fosforilación de éstas proteínas puede tener una significación especial en la funcionalidad de la partícula ribosómica.

En 1980 Zinker sugirió la presencia de un reservorio de las proteínas L44 y L45 en el citoplasma de S. cerevisiae utilizando anticuerpos policlonales específicos para dichas proteínas. Lo mismo se ha descrito para las proteínas homólogas de A. salina (Van Agthoven, 1978) y del hígado de la rata (Tsurugi y Ogata, 1985). Después, en 1981 Juan-Vidales y colaboradores estudiaron las proteínas L44 y L45 observando que ambas eran muy parecidas pero no idénticas, e identificaron una proteína más que poseía características similares a las de L44 y L45. A ésta nueva proteína

se le denominó L44'. En 1987 Mitsui y colaboradores caracterizaron una proteína ribosomal ácida en levadura de 38 kDa que se llamó A0 la cual es equivalente a P0 en mamíferos y a L10 en E.coli.

P0 es el equivalente eucariótico de L10. P0 forma el complejo pentamérico con dímeros de P1/P2, tiene un peso molecular de 34178, un pI de 6.18 y de los 19 aminoácidos en el carboxilo terminal, 9 son ácidos, formando allí la región prominente hidrofílica (Wool, 1991).

A0, proteína de S. cerevisiae equivalente a P0 de mamíferos, tiene reacciones cruzadas con los anticuerpos en contra de YP1 beta/YP2 alfa, como P0 contra los de P1/P2. A0 no se separa del ribosoma al quererla extraer con 0.4M NH4Cl-50% etanol y es menos ácida que YP1 beta/YP2 alfa, en lo que es similar a P0. A0 existe como una forma particularmente fosforilada en ribosomas, como en el caso de P0, además A0 es sintetizada por un mRNA diferente según se determinó en el sistema de traducción libre de células (Mitsui, 1987). Posteriormente, en 1988 Mitsui y Tsurugi determinan las secuencias de nucleótidos y deducen, a partir de ellas, la secuencia de aminoácidos de las proteínas ácidas A0, YP1 beta y YP2 alfa.

Se ha comprobado, que las proteínas ribosomales ácidas L44', L44 y L45 unicamente son capaces de fijarse "in vitro" a partículas ribosomales cuando están fosforiladas (Saenz-Robles, 1988). Resultados similares han sido descritos para P1 y P2 de hígado de la rata (Laverge, 1987). La fosforilación parece inducir, entre otros aspectos, un cambio conformacional de las proteínas. Este cambio estructural podría facilitar la incorporación de las proteínas al ribosoma y explicaría que en su estado desfosforilado accedan a él con más dificultad. La fosforilación de las proteínas favorecería así la eficacia de las reacciones de elongación acopladas a la hidrólisis del GTP durante la síntesis de proteínas (Saenz-Robles, 1985).

Los datos parecen indicar que las proteínas ácidas L44', L44 y



L45 tienen un papel muy importante en la regulación de la actividad traduccional y además parecen tener un papel modulador en la partícula ribosomal favoreciendo la actividad del ribosoma mediante un mecanismo de fosforilación-desfosforilación íntimamente relacionado con su mayor o menor afinidad por la partícula. Un nivel alto de la capacidad celular de fosforilación favorecería, en las fases metabólicamente más activas de la síntesis de proteínas, la incorporación de un mayor número de partículas ribosomales activas (Vilella, 1988).

Podría pensarse, además, que la fijación de las proteínas ácidas fosforiladas al ribosoma o a la subunidad 60S (Saenz-Robles, 1985; Saenz-Robles, 1988), puede a su vez producir una alteración de la partícula parecida a la inducida en los ribosomas de *E. coli* por las proteínas L7/L12 (Traut, 1983) que aumentaría la eficacia de los mismos durante las reacciones de elongación de la síntesis de proteínas (Vilella, 1988).

A pesar de que las cuatro proteínas ácidas poseen características fisicoquímicas similares, hay datos que las distinguen entre sí. Mediante análisis por ultracentrifugación, se confirmó que L44 y L45 forman dímeros cuando están en solución lo que no parece suceder en el caso de L44' que se comporta como un monómero en estas condiciones (Juan-Vidales, 1984). Posteriormente, se clonaron los genes de las cuatro proteínas ácidas (Remacha, 1990), lo que ha permitido conocer la secuencia primaria de las mismas, confirmando las diferencias y homologías existentes entre los polipéptidos.

Se ha comprobado que, en cuanto a su estructura global, el gen de L44' se diferencia de los genes que codifican a L44 y L45 en que posee un intrón como sucede con la mayor parte de las proteínas del ribosoma (Mager, 1988). Asimismo, el gen de L44' posee (al igual que la mayor parte de los genes que codifican para proteínas ribosomales)

las secuencias conservadas UASrpg en el extremo 5' del DNA (Leer, 1985; Rorenberg, 1986) que actúan como activadores de la transcripción y que normalmente van asociados a la presencia de intrones. Así, existen una serie de resultados genéticos y fisicoquímicos que sugieren que la proteína L44' es una proteína estructural del ribosoma, mientras que L45 y L44, como ya se había mencionado anteriormente, son proteínas intercambiables con aquellas presentes en el citoplasma celular. Además, al parecer, L44' es esencial para la síntesis de proteínas "in vivo" y se necesita una mayor concentración de sal para extraerla del ribosoma, que la requerida para L44, L45 y L47 (Vilella, 1988).

Las secuencias de aminoácidos de las cuatro proteínas presentan diferencias evidentes (Figura 3). La homología observada entre L44 y L45 es del 80% mientras que entre éstas y L44' sólo hay un 63% de similitud (Remacha, 1990). Se puede observar que L44 y L45 poseen una región común muy conservada en el extremo carboxilo (30 aminoácidos) y otra región idéntica en el extremo amino terminal que comprende los diez primeros aminoácidos. Las proteínas L44' y L47 comparten con las otras dos el extremo carboxilo, pero no así el extremo amino, que es totalmente diferente. En cuanto a la composición de aminoácidos se observa que L44' y L47 poseen triptofano, además de que L44' tiene histidina, moléculas que no se hallan presentes en L44 y L45. Las cuatro proteínas poseen un alto contenido en alanina (23-24 residuos) y en aminoácidos ácidos (22 a 24 residuos), lo cual está de acuerdo con sus características fisicoquímicas, (Vilella, 1988).

En A. salina y S. cerevisiae, la extracción de las proteínas ácidas del ribosoma afecta sensiblemente la capacidad de hidrólisis del GTP y la fijación del GDP, dependientes ambas del factor de elongación eEF-2 (Sanchez-Madrid, 1981). En A. salina y S. cerevisiae, por estudios de equilibrio de sedimentación, también se ha descrito la formación de homodímeros en solución (Juan-Vidales, 1984; Tsurugi y Mitsui, 1987). Se ha detectado la formación de

---

**YP1 alfa (L47)**

Met Ser Thr Glu Ser Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Leu Ile Leu Ala Asp Ser Glu Ile Glu Ile Ser Ser  
Glu Lys Leu Leu Thr Leu Thr Asn Ala Ala Asn Val Pro Asp Glu Asn Ile Trp Ala Asp Ile Phe  
Ala Lys Ala Leu Asp Gly Gln Asn Leu Lys Asp Leu Leu Val Asn Phe Ser Ala Gly Ala Ala Ala  
Pro Ala Gly Val Ala Gly Gly Val Ala Gly Gly Glu Ala Gly Glu Ala Glu Ala Glu Lys Glu Glu Glu  
Glu Ala Lys Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp

**YP1 beta (L46 o L44')**

Met Ser Asp Ser Ile Ile Ser Phe Ala Ala Phe Ile Leu Ala Asp Ala Gly Leu Glu Ile Thr Ser Asp  
Asn Leu Leu Thr Ile Thr Lys Ala Ala Gly Ala Asn Val Asp Asn Val Trp Ala Asp Val Try Ala Lys  
AlaLeu Glu Gly Lys Asp Leu Lys Glu Ile Leu Ser Gly Phe His Asn Ala Gly Pro Val Ala Gly Ala  
Gly Ala Ala Ser Gly Ala Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ala Ala Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Ala  
Ala Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp

**YP2 beta (L45)**

Met Lys Try Leu Ala Ala Tyr Leu Leu Leu Val Gln Gly Gly Asn Ala Ala Pro Ser Ala Ala Asp  
Ile Lys Ala Val Val Glu Ser Val Gly Ala Glu Val Asp Glu Ala Arg Ile Asn glu Leu Leu Ser Ser  
Leu Glu Gly Lys Gly Ser Leu Glu Glu Ile Ile Ala Glu Gly Gln Lys Lys Phe Ala Thr Val Pro Thr  
Gly Gly Ala Ser Ser Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Gly Asp Ala Ala Glu Glu Glu  
Lys Glu Glu Glu Ala Lys Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp

**YP2 alfa (L44)**

Met Lys Tyr Leu Ala Ala Tyr Leu Leu Leu Asn Ala Ala Gly Asn Thr Pro Asp Ala Thr Lys Ile  
Lys Ala Ile Leu Glu Ser Val Gly Ile Glu Ile Glu Asp Glu Lys Val Ser Ser Val Leu Ser Ala Leu  
Glu Gly Lys Ser Val Asp Glu Leu Ile Thr Glu Gly Asn Glu Lys Leu Ala Ala Val Pro Ala Ala Gly  
Pro Ala Ser Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ser Gly Asp Ala Ala Ala Glu Glu Glu Lys Glu Glu  
Glu Ala Ala Glu Glu Ser Asp Asp Asp Met Gly Phe Gly Leu Phe Asp

---

Figura 3. Secuencia de aminoácidos de las proteínas ácidas L47, L46 (L44'), L45 y L44 de la subunidad mayor del ribosoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Remacha y col. 1988).

heterodimeros entre YP2 beta y YP2 alfa o YP1 beta (Liljas, 1982; Van Agthoven, 1978; Warner, 1982).

En 1990 Remacha y colaboradores obtuvieron mutantes de Saccharomyces cerevisiae carentes de las proteínas ribosomales ácidas YP2 alfa, YP2 beta, YP1 beta y YP1 alfa (denominadas como D4, D5, D6 y D7, respectivamente). Comprobaron que la ausencia de una de las proteínas ácidas en levadura repercute en el tiempo de duplicación celular en medio rico: 145, 110, 95 y 125 minutos en ausencia de YP1 alfa, YP1 beta, YP2 alfa y YP2 beta, respectivamente, frente a 85 minutos en la cepa silvestre, que se ha interpretado como una disminución en la capacidad de síntesis de proteínas.

Posteriormente, Remacha en 1992 construye clonas por disrupción génica, que albergan todas las combinaciones posibles de dos genes inactivados simultáneamente de las proteínas ribosomales ácidas. Al igual que las disrupciones únicas, ninguna de las seis posibles disrupciones fué letal, pero la inactivación simultánea de cualquiera de los genes YP1 alfa y YP1 beta o YP2 alfa y YP2 beta causaron un importante decremento en el crecimiento celular, lo que sugiere nuevamente una alteración en la traducción.

En 1995 Remacha obtuvo cepas con tres y cuatro genes inactivados (triple y cuadruple disrupción) que codifican para las cuatro proteínas ribosomales ácidas YP1 alfa, YP1 beta, YP2 alfa y YP2 beta, concluyendo que la viabilidad de la levadura no depende de las proteínas ácidas; éstas, más bien regulan la actividad de la subunidad 60S, afectando la traducción de ciertos mRNAs.

También en 1995, en el CINVESTAV, en el Departamento de Genética, Ochoa (comunicación personal) describe que las cepas D4 (ausencia de YP2 alfa), D5 (ausencia de YP2 beta), D6 (YP1 beta) y D7 (YP1 alfa) al someterlas en medios ricos suplementados con cicloheximida o con NaF (inhibidores de elongación y de la iniciación

de la traducción respectivamente), la cepa D4 y D7 sobreviven a la cicloheximida y la cepa D7 resiste al NaF. Lo que se interpreta, nuevamente, que éstas proteínas ribosomales ácidas tienen funciones distintas en el proceso de traducción.

Debido a que las proteínas ribosomales ácidas: 1) están fosforiladas en el ribosoma; 2) recambian con sus homologas del citoplasma; 3) este recambio es independiente de la biogénesis del ribosoma; 4) en el proceso de recambio participan protein cinasas específicas y muy probablemente también proteín fosfatasas específicas; y 5) son dispensables para la célula según se concluye de los experimentos de disrupción génica, lo más probable es que éstas proteínas ribosomales ácidas, además de ser estructurales del ribosoma, sean moduladoras o de la actividad de ésta partícula o de la traducción en general. De ser así, se esperaría que en ausencia de alguna de ellas la célula tuviera un comportamiento diferente al enfrentarla a estados de estrés, esto es, cambios repentinos en las condiciones del medio ambiente que pongan en riesgo su sobrevivencia.

Algunas condiciones que inducen a las células a un estado de estrés son: la exposición de las células a metales pesados, a alcoholes, a venenos metabólicos, a infecciones virales, a hipersalinidad y al choque térmico, entre otras. Durante la "emergencia" de sobrevivir, las células producen proteínas de estrés que contrarrestan algún daño. (Welch, 1993).

Con relación al choque térmico (una de las dos condiciones estresantes que se aplicaron en este trabajo), cuando las células o tejidos de una variedad de sistemas, incluyendo células de mamífero (Welch, 1982), células de *Drosophila* (Lindquist, 1981; Lindquist, 1988; Welch, 1993), de *S. cerevisiae* (Lindquist, 1981; Welch, 1993), de plantas (Harrington, 1988), de bacterias (Volker, 1994), son expuestas a elevadas temperaturas, ellas responden con la inducción vigorosa de un pequeño número de proteínas denominadas de choque

térmico (HSP), que pueden conferir, además, una incrementada resistencia a la temperatura, la cual se denomina termotolerancia (McAlister, 1980). La coincidente aparición de las proteínas de choque térmico y la termotolerancia determinan que estas proteínas jueguen un rol protector durante la exposición a altas temperaturas, como un mecanismo de defensa. Las concentraciones de las HSPs disminuyen conforme la temperatura de las células retorna a su estado normal (23°C) (Hall, 1983; Miller, 1979; Mager, 1993; Welch, 1993).

En 1981 Lindquist, reportó investigaciones sobre las respuestas de dos organismos muy diferentes, la mosca de la fruta Drosophila melanogaster y la levadura Saccharomyces cerevisiae. Ambos organismos realizan un muy rápido cambio en la síntesis de proteínas.

En 1980 McAlister, demuestra que en la levadura, el cambio de temperatura induce una respuesta de resistencia, y esto, está relacionado con los niveles de las proteínas de choque térmico, los cuales son transitoriamente inducidos por el mismo cambio de temperatura.

Muchos de los genes que codifican para las proteínas de estrés son marcadamente similares en todos los organismos. Se ha reportado que los genes para proteínas de choque térmico (hsp) de la familia hsp70, son los más altamente conservados; tienen más de un 50% de similitud en bacterias, levaduras y Drosophila (Welch, 1993). Las proteínas hsp son inducidas también por otros tipos de estrés, como el salino (Lindquist, 1988) en bacterias, levaduras y Drosophila. Todos los organismos examinados (bacterias, hígado de la rata, levadura y Drosophila) producen proteínas codificadas por los genes de las familias de hsp70 y hsp90 en respuesta a elevadas temperaturas (Lindquist, 1988).

El estrés salino, es la segunda condición estresante que se estudió en el presente trabajo.

En plantas superiores y bacterias se ha descrito que los mecanismos básicos para que estos organismos sean tolerantes a sal son: 1) la síntesis de osmolitos (prolina, betaína y polioles); 2) El sistema de transporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en las membranas vacuolares y plasmáticas y 3) la actividad celular sensitiva a la pérdida de turgencia, deshidratación o altas concentraciones intracelulares de Na<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> (Weretilnyk y Hanson, 1990; Serrano y Gaxiola, 1994).

Estudios realizados con el organismo procariota E. coli sugieren que la síntesis de solutos orgánicos puede ser un paso crucial para la tolerancia a sal. El primer gen de E. coli descrito como un gen que provee al organismo de halotolerancia (proB-74) determina la sobreacumulación de prolina (Csonka, 1981).

En organismos eucariotas (S. cerevisiae) sin embargo, la homeostasis del potasio parece ser la respuesta más crítica para el estrés salino. A comparación de E. coli en S. cerevisiae la toxicidad del cloro no es significativa (Serrano y Gaxiola, 1994)

Gaxiola, en 1992, aisló el gen HAL1 que se sobreexpresa mejorando el crecimiento de la levadura Saccharomyces cerevisiae bajo estrés salino (altas concentraciones de NaCl). Cuando las células de la levadura sobreexpresan el gen HAL1, la toxicidad del sodio parece ser contrarrestada por una incrementada acumulación de potasio. La disrupción de este gen decrementó la tolerancia a sal, por lo tanto HAL1 es determinante para la halotolerancia. Este gen codifica para una proteína de 32kDa, localizada en el citoplasma de la levadura.

El NaCl afecta muchos parámetros del crecimiento de las levaduras: la tasa de crecimiento, la producción de biomasa y la composición celular, además de que incrementa el consumo de glucosa, también incrementa la producción de glicerol. La tolerancia de varias especies de levadura al NaCl varía grandemente. Los factores más importantes parecen ser la presencia de un mecanismo de

osmorregulación y la habilidad de algunas enzimas para funcionar en presencia de concentraciones altas de NaCl (Watson, 1970).

La exposición de células de levadura (Saccharomyces) a altas concentraciones de NaCl provoca deshidratación, el colapso de gradientes iónicos sobre la membrana plasmática y decremента la viabilidad de la célula.

La respuesta de las células vivas a altas osmolaridades externas es designada como respuesta a osmoestrés. Tanto las reacciones osmorregulatorias y el estrés general involucrados en esto, son procesos pobremente entendidos. Parte de la respuesta apunta al incremento del potencial osmótico interno, por ejemplo, la producción de osmolitos como el glicerol y la expulsión de solutos tóxicos. Se sintetizan proteínas de choque térmico y trehalosa, probablemente para proteger a los componentes celulares y para facilitar la reparación y la recuperación celulares (Mager y Moradas, 1993).

#### OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fué diferenciar el fenotipo de las cepas con disrupciones simples (YP1 alfa::LEU2, YP1 beta::TRP1, YP2 alfa::URA3, y YP2 beta::HIS3), sometidas a dos condiciones que alteran la síntesis de proteínas: una es el estrés térmico y la otra el estrés salino.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Conocer si existe relación entre la carencia de una o más proteínas ribosomales ácidas y la tolerancia al estrés térmico en mutantes de Saccharomyces cerevisiae.

2.- Conocer si existe relación entre la carencia de una o más proteínas ribosomales ácidas y la tolerancia al estrés salino en mutantes de Saccharomyces cerevisiae.



## MATERIALES Y METODOS

### I. MATERIAL BIOLÓGICO.

#### I.1.- Cepas de levadura

Se trabajó, como cepa parental, la W303-1B de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Presenta tipo de apareamiento alfa, es grande, haploide. MAT-alfa con los marcadores nutricionales: *ade2*, *can1*, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*.

Se trabajaron también las cepas con disrupciones simples, dobles y triples en los genes que codifican para las proteínas ribosomales ácidas de *S. cerevisiae*.

#### SIMPLES

D4: MAT a; *trp1*, *his3*, *leu2*, *ura3*, *can1*.  
D5: MAT a; *ura3*, *leu2*, *trp1*, *ade2*, *can1*.  
D6: MAT a; *ura3*, *leu2*, *his3*, *ade2*, *can1*.  
D7: MAT a; *ura3*, *trp1*, *his3*, *ade2*, *can1*.

#### DOBLES

D45: MAT a; *trp1*, *leu2*.  
D46: MAT a; *his3*, *leu2*, *ade2*.  
D47: MAT a; *trp1*, *his3*.  
D56: MAT a; *ura3*, *leu2*, *ade2*, *can1*.  
D57: MAT a; *ura3*, *trp1*, *ade2*, *can1*.  
D67: MAT a; *ura3*, *his3*, *ade2*, *can1*.

#### TRIPLES

D456: MAT a; *leu2*.

D457: MAT a; trp1, ade2.

D467: MAT a; his3.

D567: MAT a; ade2, ura3.

Y la cepa FRD

FRD: MAT a, haploide. grande, gall, adel, ade2, ural, his7, lis2, tirl). Es una mutante de Saccharomyces cerevisiae, hiperresistente a concentraciones de NaCl de hasta 2M, de caracter halofílico (Gaxiola, 1987).

## II. MEDIOS DE CULTIVO

### II.1.- Medios de cultivo para levadura

#### II.1.1.- Medio YPD (Medio rico)

Medio YPD Y=Levadura P=Peptona D=Dextrosa

Extracto de levadura (1%) ..... 10 g.  
Peptona (2%) ..... 20 g.  
Glucosa (2%) ..... 20 g.  
Agua bidestilada ..... 1000 ml.

Medio YPD/agar (medio rico-sólido para crecer colonias aisladas)

Agregar agar (2%) ... 20 g para 1000 ml  
de medio.

#### II.1.2. Medio SD (medio mínimo de composición definida suplementado con aminoácidos y bases nitrogenadas)

Medio SD

YNA (10%) ..... 100 ml.

Glucosa (50%) .....	20 ml.
Adenina .....	0.04 mg.
Uracilo .....	0.04 mg.
Histidina .....	0.04 mg.
Lisina .....	0.04 mg.
Tirosina .....	0.04 mg.
Leucina .....	0.04 mg.
Triptofano .....	0.04 mg.
Agua bidestilada .....	1000 ml.

Medio SD/agar (medio mínimo sólido para crecer colonias  
aisladas)

Agregar agar (2 ) ... 20 g para 1000 ml de  
medio.

Todos estos medios de cultivo se esterilizaron a 120°C y 20  
libras de presión durante 15 min.

#### II.1.2.1.- Base nitrogenada de levadura (YNB 10X)

Se disolvió 50 g de sulfato de amonio en 500 ml de agua  
bidestilada. Se agregó 40 ml de la mezcla de vitaminas (250X).  
Después se agregaron 1 ml de cada una de las sales traza (100X). Se  
añadieron 200 ml de la mezcla de sales (50X), esto, se aforó a 1000  
ml con agua bidestilada y se mezcló bien. Posteriormente se  
esterilizó por filtración. Se usaron 100 ml de la solución para cada  
1000 ml de medio de cultivo.

\* Vitaminas (250X)

Biotina .....	200 ug.
Pantotenato de Calcio .....	40 ug.
Acido folico .....	200 ug.

Inositol .....	200 ug.
Niacina .....	40 mg.
PABA (Acido p-aminobenzóico)...	20 mg.
Piridoxina hidrocloreto .....	40 mg.
Ribóflavina .....	20 mg.
Tiamina hidrocloreto .....	40 mg.

Se disolvieron en 400 ml de agua bidestilada y se guardó en fracciones de 40 ml a -20°C.

\* Elementos traza (1000X)

Acido bórico .....	50 mg.
Sulfato de Cobre .....	4 mg.
Ioduro de Potasio .....	10 mg.
Cloruro férrico .....	20 mg.
Sulfato de Manganeso .....	40 mg.
Molibdato de Sodio .....	20 mg.
Sulfato de Zinc .....	40 mg.

Cada uno se disolvió en 10 ml de agua bidestilada y se guardó a temperatura ambiente en frascos color ambar.

\* Sales (50X)

Fosfato de potasio monobásico ...	50 g.
Sulfato de magnesio .....	25 g.
Cloruro de sodio .....	5 g.
Cloruro de calcio .....	5 g.
Agua bidestilada .....	1000 ml.

El Cloruro de calcio se disolvió en 100 ml. Por separado se disolvieron en 300 ml todas las demás sales, posteriormente se juntaron éstas dos aforando a 1000 ml. Se guardó en frascos de vidrio a 4°C.

### III. CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA LAS LEVADURAS

Cada una de las cepas fué crecida en el medio adecuado (medio YPD y SD para estrés térmico y salino, respectivamente) a 30°C, manteniéndolas en agitación constante rotatoria hasta obtener una densidad poblacional de 0.4 a 0.6 D.O. a 660 nm (fase media logarítmica).

### IV. PROCEDIMIENTO PARA SOMETER A ESTRES TERMICO

Se prepararon cajas con medio YPD/agar, cada una con 20 ml aproximadamente y se sometieron a una temperatura de 37°C durante 24 hrs para prueba de esterilidad.

Se preparó también medio de cultivo líquido YPD, en el cual se sembró la cepa W303 (o cualquiera de las disrupciones) y fué sometido a las condiciones de crecimiento ya especificadas. Ya que la densidad poblacional llegó a la fase media log 0.4 a 0.6 D.O.) se procedió a hacer diluciones de 1-1000, 1-10 000 y 1-100 000 v:v. Todo se realizó en medio estéril. Hechas las diluciones se sembraron 100 ul en las cajas con YPD/agar, por espatulación y se incubó a 30°C durante tres días, contando después las colonias formadas. Este procedimiento se tomó como control.

Para el choque térmico, se procedió del mismo modo hasta llegar a una densidad poblacional de 0.4 a 0.6 D.O. A este cultivo se le agregó un volumen igual de medio YPD a 91°C, lográndose una mezcla a la temperatura de 45°C, lo cual inmediatamente se puso a baño María a 45°C durante 3, 6 y 9 min. A cada tiempo se tomó una muestra para realizar con ellas las diluciones (1-1000, 1-10 000 y 1-100 000 v:v). Después se sembró, espatuló, incubó y se contaron las colonias como anteriormente se describió. Todo lo anterior se realizó por duplicado. Además se dio choque térmico a 40 y 42°C, pero solo a las cepas W303 y a las cuatro con disrupciones simples.

## V. PROCEDIMIENTO PARA SOMETER A ESTRES SALINO

Se prepararon cajas con medio SD/agar, otras adicionándoles NaCl a 0.25M, 0.5M, 0.75M, 1.0M, 1.25M o 1.5M, (cada caja con 20 ml aproximadamente; y se sometieron a prueba de esterilidad (a 37°C durante 24 hrs). Para realizar la siembra de las cepas W303, FRD y las disrupciones simples, dobles y triples (todas en una misma caja), se prepararon previamente "Stocks" de cada una de las cepas, donde su densidad óptica fué de 2.0 a 2.1. A partir de esto, por medio de goteo de 10 ul, se procedió a sembrar todas las cepas en cada una de las cajas que contenían las diferentes concentraciones de NaCl. Se incubaron a 30°C durante tres días y se observó su crecimiento. Todo lo anterior se realizó por duplicado.

## VI. TECNICA PARA REALIZAR CURVAS DE CRECIMIENTO

Se siguieron las cinéticas de crecimiento de las cepas de W303 y FRD (controles) y las cepas con disrupciones simples, por lo menos durante 24 h continuas, crecidas en medio SD suplementado con diferentes concentraciones de NaCl (0.25 M a 1.5 M).

En matraces de 150 ml de capacidad se prepararon en cada uno 50 ml de medio SD (mínimo) y se inocularon con la cepas anteriormente mencionadas. Inmediatamente a la inoculación del medio se tomaron muestras de 1 ml que fueron leídas a 660 nm, teniendo como blanco medio SD sin inocular y las lecturas resultantes se consideraron como el inicio de la cinética. Una vez tomada la muestra, los matraces se mantuvieron en agitación rotatoria a una temperatura de 30°C. Posteriormente se tomaron muestras a cada 1 ó 2 hrs (según de la cepa de la que se trate) hasta completar una cinética de por lo menos 24 h. Ocasionalmente se verificó al microscopio que los cultivos no estuvieran contaminados. Todo lo anterior se realizó en un medio de esterilidad.

## VII. TÉCNICA PARA LA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

### VII. 1. Soluciones

#### \* TAMPÓN I

TRIS - HCl ..... 100mM  
KCl ..... 80mM  
MgCl<sub>2</sub> ..... 12.5mM  
Beta-mercaptoetanol . 5mM  
Ajustar pH a 7.4 con HCl.

#### \* OTRAS

- MgCl<sub>2</sub> 1M en solución
- Acido acético glacial
- Acido acético al 0.5N
- Acetona

### VII. 2. Método

Se crecieron las células en medio YPD (II.1.1.) a 30 °C con agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.4 - 0.6 (fase media-log) a 660nm. Se centrifugó a 10,000 rpm/5 min/4 °C para empastillar las células y se desechó el sobrenadante. Se lavaron las células con 20ml de tampón I. En seguida, se centrifugó a 15,000 rpm/20 min/4 °C y se tiró el sobrenadante. Posteriormente se rompieron las células mecánicamente con perlas de vidrio (0.45 mm de diámetro), 30 seg al vortex y 30 seg en hielo. Se verificó al microscopio que las células estuvieran rotas. Una vez rotas se centrifugó a 15,000 rpm/20 min/4 °C y al sobrenadante se le agregó 0.1 vol de MgCl<sub>2</sub> 1M y 2 vol de ácido acético glacial simultáneamente, y con agitación magnética se mantuvo a 4 °C/30 min. Al término de este tiempo se centrifugó a 15,000 rpm/10 min/4 °C. El sobrenadante se colocó en bolsas para diálisis (diámetro de 2.1cm) y se dializó contra ácido acético al 0.5N a 4 °C. Cuando la proteína ya se había dializado, se procedió a congelar la muestra con acetona e hielo seco, para liofilizarlas dentro de frascos viales.

## VII. PREPARACION DE LA PROTEINA PARA ELECTROFORESIS

La proteína liofilizada se disolvió en urea 8M. Se tomaron muestras de esta disolución para cuantificarla (Lowry, 1951). Sabiendo la concentración que se tenía se procedió a agregarle amortiguador de muestra, se hirvieron las muestras en un baño María durante 3 min y se agregó 50 ug de proteína por carril en un gel discontinuo tipo Maizel (Maizel, 1971).

## IX. TECNICA PARA ELECTROFORESIS (GEL DISCONTINUO DE MAIZEL - UNIDIMENSIONAL) (Maizel, 1971).

### IX.1. Soluciones

Solución A.- Acrilamida - Bis acrilamida (30:0.8).

30g acrilamida + 0.8g Bis - acrilamida para 100ml de agua bidestilada. Filtrar a través de papel Whatman No.1. Guardar en botellas oscuras a 4°C.

Solución B.- TRIS de pH 8.8.

12.11g de TRIS + 50ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8.8 con HCl. Se aforó a 100ml.

Solución C.- SDS al 10% en agua bidestilada.

Solución D.- TRIS de pH 6.8.

6g de TRIS + 20ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl. Se aforó a 50ml.

Amortiguador de corrida.

Glicina .....	14.4g
TRIS .....	3g
SDS 10% .....	10ml



Agua bidestilada ..... 1000ml  
 Amortiguador de muestra  
 Solución D ..... 1.0ml  
 Solución C ..... 1.0ml  
 Beta-mercaptoetanol ..... 0.1ml  
 Glicerol ..... 1.0ml  
 Rojo de fenol (0.1% en agua) ..... 0.1ml  
 Agua bidestilada ..... 6.8ml

Solución para teñir el gel

Azul de coomassie al 0.2% en ácido acético glacial al 7% y etanol al 50%.

Teñir por 30 min.

Solución para desteñir el gel

Acido acético al 7%

Etanol al 50%

OTRAS

Persulfato de amonio al 10%

TEMED (NNN'N'-tetrametiletildiamina)

Marcadores de peso molecular:

Proteína	PM (Da)
Lisozyrna	14,300
Beta-lactoglobulina	18,400
Anhidrasa carbónica	29,000
Ovoalbumina	43,000
Albumina sérica de bovino	68,000
Fosforilasa B	97,400
Miosina (cadena H)	200,000

## IX.2. Método

Se preparó la cámara para el gel en donde fué vaciada la solución para el gel. Posteriormente, se preparó la solución para un gel al 15%, la cual consistió en: 15 ml de solución A, 11.25 ml de solución B, 0.3 ml de solución C, agua 3.25 ml, TEMED 25 ul (en este momento se desgacificó durante 2 min en una cámara de vacío) y por último 120 ul de persulfato de amonio (10%). Todo se mezcló perfectamente y se vació entre los cristales ya preparados, cuidadosamente para que no se formaran burbujas. En seguida se le agregó SDS (1%) para aplanar la superficie del gel y se dejó polimerizar, Mientras tanto se preparó el gel espaciador mezclando lo siguiente: 1.33 ml de solución A, 1.25 ml de solución D, 100 ul de solución C, 5 ul de TEMED, 7.2 ml de agua, se desgacificó y por último se le agregó 100 ul de persulfato de amonio (10%).

Cuando el primer gel polimerizó, se le quitó el SDS, se enjuagó con agua y se secó cuidadosamente para quitarle el exceso. En seguida se le agregó la solución preparada para el gel espaciador, se colocó el peine (0.5cm arriba del primer gel) y se dejó polimerizar.

Cuando el gel estuvo listo, se procedió a colocarlo en la cámara de electroforesis, la cual contenía amortiguador de corrida. Se cuidó que en la parte inferior del gel no hubieran burbujas. Se colocaron las muestras en los pocillos junto con marcadores de pesos moleculares, se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió el gel a 100 V hasta que el colorante de la muestra llegó hasta la parte inferior del gel.

El gel fué colocado en un recipiente con solución para teñir y se mantuvo con muy lenta agitación durante unos 20 min. Después se sacó, se enjuagó con agua bidestilada y se le agregó solución para desteñir.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Tolerancia al choque térmico

Las temperaturas para los choques térmicos, se eligieron con base en lo reportado en la literatura. McAlister (McAlister et al, 1979) menciona que un cambio de 23 °C a 30 °C no altera significativamente el patrón de síntesis de proteínas de la levadura, pero un cambio de 23 °C a 36 °C sí da cambios notorios. Mager (Mager, 1993) opina que el cambio de 23 °C a 36 °C es un choque térmico "leve", ya que la temperatura de 36 °C está dentro del rango normal de crecimiento de la levadura; aunado a esto, Lindquist (Lindquist, 1981) somete a la levadura Saccharomyces cerevisiae a un choque térmico de 45 °C y menciona que la levadura aún es viable a esa temperatura.

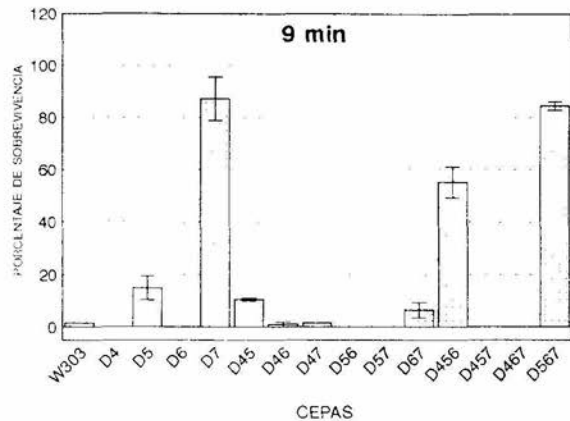
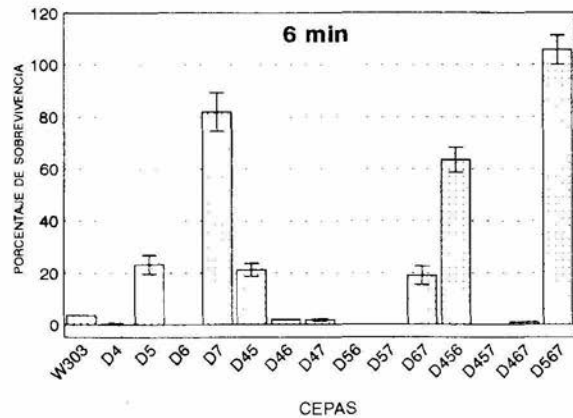
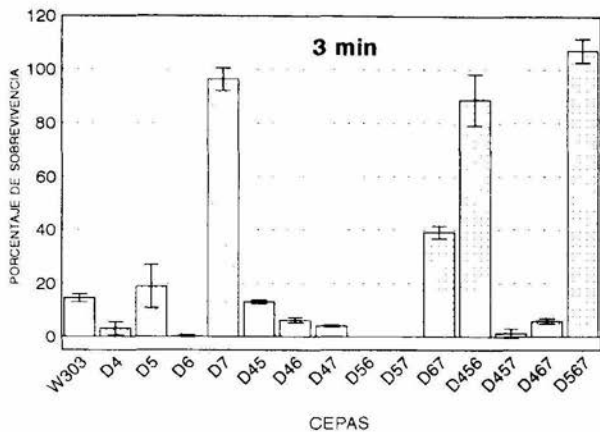
El procedimiento que se siguió para someter a las 15 diferentes cepas a choque térmico fue cambiarlas bruscamente de temperatura, de 30 a 45 °C. Inmediatamente después, a los 3, 6 y 9 min se tomaron muestras del cultivo para hacer diluciones 1:1000, 1:10,000 y 1:100,000 de las que a su vez se tomaron alícuotas para espatular en placas con medio YPD-agar (II.1.1.). Los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla I. Cabe mencionar que los valores de cero, fueron a causa de que en esas cepas, el choque térmico fue letal, por eso, ni a diluciones menores hubo células viables. Posteriormente, se presenta el promedio y con sus respectivas desviaciones estándar (D.E.), y la normalización de éstos resultados, en la Figura 4.

En general, la respuesta de las mutantes ante el choque térmico a 45 °C se puede dividir en tres categorías: las que no toleran el choque térmico, las resistentes a él y las que se comportan como la cepa parental W303. Como ejemplo de la primera categoría están las mutantes D4, D6, D56, D57, y D457 que mueren en un cien por ciento antes de 3 min a 45 °C. Hay que hacer notar que la ausencia de una sola proteína ribosomal ácida, a saber, YP2 alfa o YP1 beta (cepas D4 y D6) confiere un fenotipo de termosensibilidad. En la segunda categoría, aquella en la que la sobrevivencia celular es significativamente mayor que la de la cepa parental, están las cepas D7, D456 y D567. Nuevamente, llama la atención que la ausencia de una proteína ribosomal ácida, en este caso YP1 alfa (cepa D7), confiere un fenotipo de termotolerancia. En la tercera categoría se encuentran las cepas que se

Tabla I

CEPAS	CONTROL	3 min	6 min	9 min
W303	92	16	3	3
	108	13	4	0
D4	134	2	0	0
	138	9	0	0
	97	1	0	0
	127	3	1	0
D5	68	13	13	15
	68	7	20	7
	62	22	15	8
	78	10	16	11
D6	133	1	0	0
	98	0	0	0
	115	0	0	0
D7	40	44	34	41
	51	40	41	44
	42	44	34	38
D45	89	10	19	8
	72	11	15	9
D46	162	11	3	3
	150	8	3	0
D47	125	5	2	2
	151	6	3	2
D56	153	0	0	0
	161	0	0	0
	133	0	0	0
D57	81	0	0	0
	99	0	0	0
	91	0	0	0
D67	78	35	13	3
	91	31	19	8
D456	90	82	49	51
	77	66	52	41
D457	25	0	0	0
	34	0	0	0
	23	1	0	0
D467	100	7	1	0
	106	5	1	0
D567	113	127	129	96
	117	117	115	98
	107	131	129	97
	127	122	117	101

Sobrevivencia de las diferentes cepas sometidas a choque térmico de 45 °C. Las cifras corresponden a experimentos independientes a diluciones de 1/10,000.



**Figura 4**  
**PORCENTAJE DE**  
**SOBREVIVENCIA DE LAS**  
**DIFERENTES CEPAS**  
**EXPUESTAS AL CHOQUE**  
**TERMICO DE 45°C**

comportaron de manera similar a la cepa parental W303, éstas son: D45, D46, D47, D67 y D467, las cuales a mayor tiempo de exposición a 45 °C es menor la sobrevivencia celular. La cepa D5 es la única que independientemente del tiempo de exposición mantiene un porcentaje de sobrevivencia de aproximadamente un 10%.

Los resultados no muestran antagonismo o cinergismo, por ejemplo, se esperaría que las cepas con la ausencia de YP1 alfa sobrevivieran aun más que la parental, como la cepa D57, pero no fué así; o que las cepas con la ausencia de YP1 beta y/o YP2 alfa no sobrevivieran, como la cepa D456, que se esperaría no fuera viable y resultó serlo.

Se procedió a probar choques térmicos a 40 °C y 42 °C y así poder observar si al disminuir la temperatura la sobrevivencia de las cepas con disrupciones simples variaba con respecto a los resultados obtenidos a 45 °C y al tiempo de exposición (3, 6 y 9 min). En especial observar si la cepas D4 y D6 logran sobrevivir a estas temperaturas. Para ésto se sometieron a cambio brusco de temperatura de 30 °C a 40 °C o 42 °C a las cepas W303, D4, D5, D6 y D7. Los resultados de los experimentos para choque térmico a 40°C y 42 °C se muestran en las Tablas II y III, respectivamente. Los promedios y la normalización de éstos resultados se observan en la Figura 5, donde se compara cómo se comportan cada una de las cepas ante el choque térmico de 40, 42 y 45 °C durante 3, 6 y 9 min.

El comportamiento de W303 es, tanto a 40 °C como a 42 °C y 45 °C, que a mayor tiempo de exposición al choque térmico, menor es su sobrevivencia.

Para D4 la viabilidad celular a 40°C es similar e independiente de los tiempos de exposición (3, 6 y 9 min), pero al aumentarle la temperatura a 42 °C y 45 °C, su comportamiento es similar al de W303.

El comportamiento de la cepa D5 sigue en general un mismo patrón. Que al sentir el cambio brusco de temperatura (de 30 °C a 40, 42 o 45 °C) disminuye su porcentaje de sobrevivencia, pero lo mantiene, no importando el tiempo de exposición.

Con respecto a D6 se puede decir que lo que ocurrió a 45°C, sucede también a 40 y 42°C. Esta cepa no resiste al calor, ya que a 40 °C y a 3 min la cepa prácticamente muere,

**Tabla II**

CEPAS	CONTROL	3 min	6 min	9 min
W303	124	36	21	13
	114	37	22	13
D4	78	66	81	78
	93	68	74	81
D5	24	17	14	14
	35	25	23	15
D6	161	20	1	1
	159	10	0	0
	110	10	0	0
D7	89	84	55	70
	79	69	68	75
	93	90	70	80

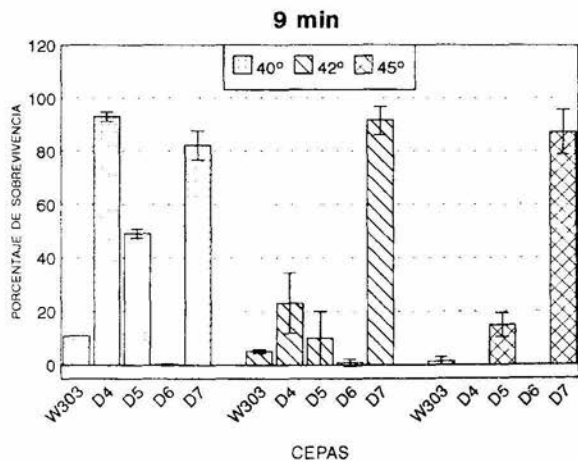
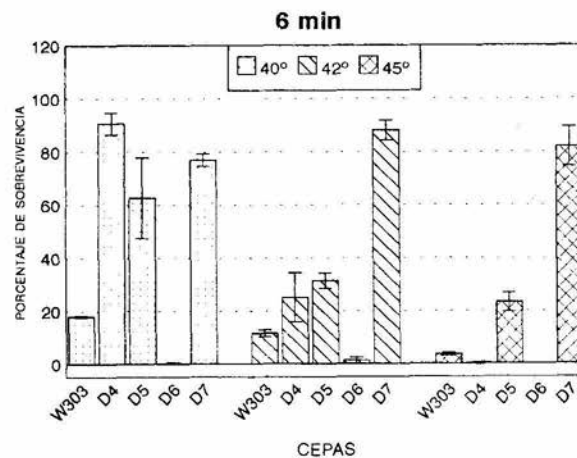
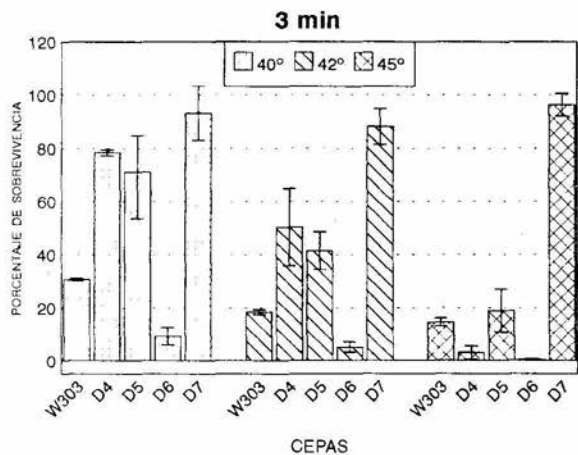
Sobrevivencia de las cepas W303, D4, D5, D6 y D7 sometidas a choque térmico de 40 °C. Las cifras corresponden a experimentos independientes a diluciones de 1:100,000.

Tabla III

CEPAS	CONTROL	3 min	6 min	9 min
W303	151	30	20	9
	159	27	16	7
D4	75	49	26	26
	76	27	12	9
D5	41	17	12	0
	29	12	10	7
D6	98	3	3	3
	110	8	0	0
	104	5	1	0
D7	57	48	52	47
	47	45	47	53
	63	54	48	53

Sobrevivencia de las cepas W303, D4, D5, D6 y D7 sometidas a choque térmico de 42 °C. Las cifras corresponden a experimentos independientes a diluciones de 1:100,000.





**Figura 5**  
**PORCENTAJE DE**  
**SOBREVIVENCIA DE LAS**  
**CEPAS EXPUESTAS A**  
**CHOQUE TERMICO**

siendo las condiciones mínimas de estrés a las que fué sometida. Estos resultados apoyan el que la ausencia de la proteína ribosomal ácida YP1 beta (cepa D6) confiere un fenotipo de termosensibilidad.

Para D7 se observa que, ni el tiempo de exposición (3, 6 y 9 min), ni las temperaturas a las que se sometió (40, 42 y 45°C) afectaron significativamente su sobrevivencia celular si se compara con la cepa parental. De todas las mutantes, D7 fué la que más resistió a la temperatura. Estos resultados muestran que la ausencia de la proteína ribosomal ácida YP1 alfa (cepa D7), confiere un fenotipo de termotolerancia. La causa de esta termotolerancia de acuerdo a algunos autores (Mcalister, 1980; Fung y col, 1995; Watson y col, 1984 y Lindquist 1981), parece deberse a un incremento en los niveles intracelulares de las proteínas de choque térmico (HSPs), los cuales son proporcionales a los niveles de tolerancia. Pero, de acuerdo a VanBogelen (VanBogelen, 1987) y Watson (Watson, 1984), esta tolerancia no se da necesariamente porque haya un incremento en la síntesis de HSPs, ya que ellos mencionan que puede haber inducción de HSPs sin termotolerancia o viceversa. Por lo tanto, se puede pensar que la ausencia de YP1 alfa pudiera resultar en la síntesis constitutiva de proteínas de choque térmico, por lo cual la cepa D7 es viable o que la termotolerancia en ausencia de YP1 alfa no requiere necesariamente de la vía de síntesis de HSPs, o bien una combinación de las dos posibilidades anteriores.

### **Tolerancia al estrés salino**

Debido a que la tolerancia al NaCl varía dentro de las especies de un mismo género de levaduras (Watson, 1970), el primer experimento se diseñó con el objetivo de explorar el rango de concentración de NaCl a la que es tolerante la cepa W303 y las 14 cepas con disrupciones. Para ello se realizó lo siguiente. En base a la cepa FRD, que tolera hasta 2M de NaCl (Gaxiola, tesis de maestría, 1987) y al trabajo de Watson (Watson, 1970), se prepararon cajas con medio SD-agar con diferentes concentraciones de sal, sobre las cuales se sembraron las cepas FRD (como control positivo de tolerancia), W303 y las 14 cepas con disrupciones como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos indican que todas las cepas crecen de manera similar hasta una concentración de 0.75 M de NaCl como se puede observar en la Figura 6. Para poderlos comparar entre sí, los resultados de la Figura 6 se normalizaron: ++++ = 100% de intensidad de crecimiento celular para cada

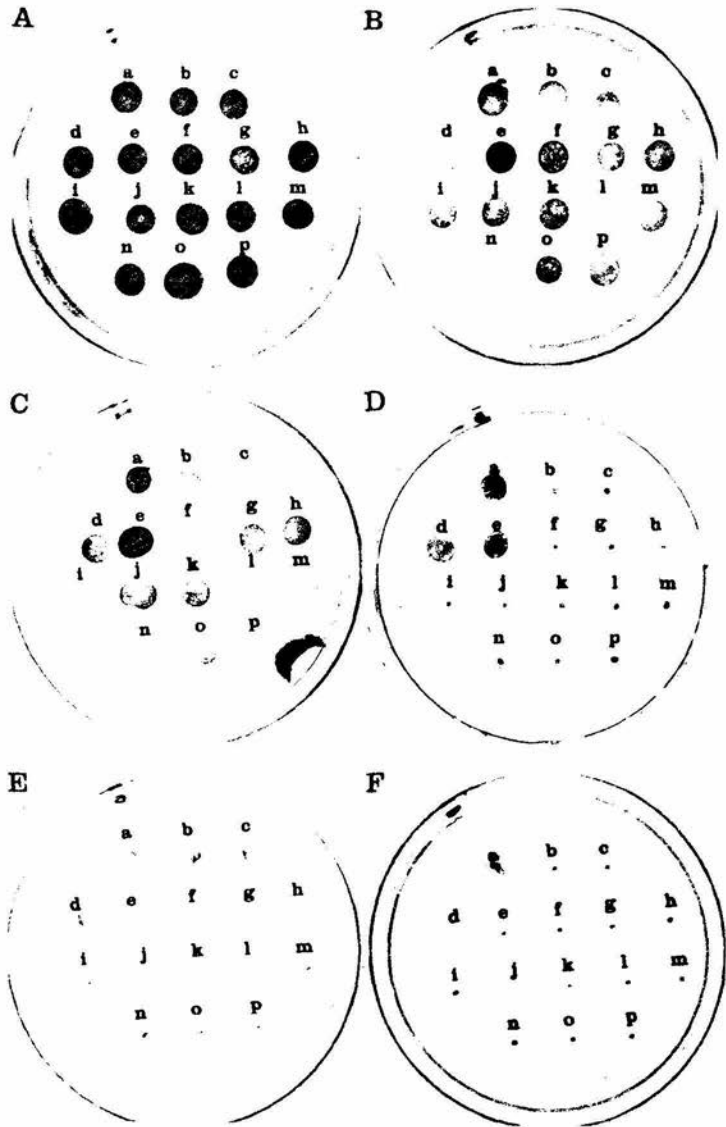


Figura 6. Crecimiento celular de las cepas FRD, W303 y las 14 cepas con disrupciones, en cajas con medio SD-agar con diferentes concentraciones de NaCl. A = medio SD-agar (control), B = SD-agar con 0.5 M de NaCl, C = SD-agar con 0.75 m, D = SD-agar con 1.0 M, E = SD-agar con 1.25 M, F = SD-agar con 1.5 M de NaCl. a = FRD, b = W303, c = D4, d = D5, e = D6, f = D7, g = D45. h = D46, i = D47, j = D56, k = D57, l = D67, m = D456, n = D467, p = D567.

NOTA: Aquí se omite la caja de la concentración de 0.25 M de NaCl, porque el resultado es igual que el de la caja control.

una de las cepas sembradas en medio SD-agar (control), +++ = 750 %, ++ = 50% y + = 25% según la intensidad de crecimiento relativa al control, que presentaron en las diferentes concentraciones de sal a las que fueron sometidas (Tabla IV). En la Figura 7 se muestra gráficamente los resultados de la Tabla IV, Se puede observar que a partir de la concentración de 0.75M, el comportamiento de las diferentes cepas se puede clasificar en 3 categorías:

I.- las que se comportan como FRD (que toleran altas concentraciones de sal); la única cepa que se comportó como FRD fué la cepa D5, lo cual nos sugiere que la ausencia de la proteína ribosomal ácida YP2 beta, le confiere a la cepa un fenotipo de halotolerancia.

II.- está integrada por aquellas cepas que no toleran más allá de 0.75M de NaCl, las cuales fueron: D4, D7, D47, D456, D457 y D567. Al parecer la ausencia de las proteínas ribosomales ácidas YP2 alfa (D4) y/o YP1 alfa (cepa D7), les confiere a éstas cepas un fenotipo de halosensibilidad. Y

III.- está integrada por aquellas cepas que se comportan como la cepa parental W303 y son: D6, D45, D46, D56, D57, D67 y D467, que sobrevivieron hasta un rango no mayor de 1.0 M de NaCl, hecho que sugiere una significativa disminución en la sobrevivencia celular en estas mutantes.

Se probó la tolerancia a sal de otra manera, la cual consistió en realizar curvas de crecimiento en medio SD (como se describe en Materiales y Métodos) con las cepas FRD, W303, D4, D5, D6 y D7. Los resultados obtenidos muestran que en medio líquido las 6 cepas son capaces de tolerar hasta una concentración de 1.25 M de NaCl (Figura 8 A y B). Con respecto a la cepa FRD cabe mencionar que ésta resiste hasta 2 M de NaCl pero con períodos de incubación hasta de 4 o 5 días. Como podemos ver, los resultados indican nuevamente que la cepa D5 puede tolerar hasta 1.5 M de sal y que en menor grado, las cepas D4 y D6 también toleran una concentración de 1.5 M de sal, en contraste con las cepas W303 (control) y D7, las cuales toleran no más de 1.25 M de NaCl. Con esto se apoya el que al faltar la proteína ribosomal ácida YP2 beta (cepa D5), la cepa adquiere un fenotipo halotolerante, pero a comparación del crecimiento en medio sólido, en medio líquido también las cepas D4 y D6 son halotolerantes.

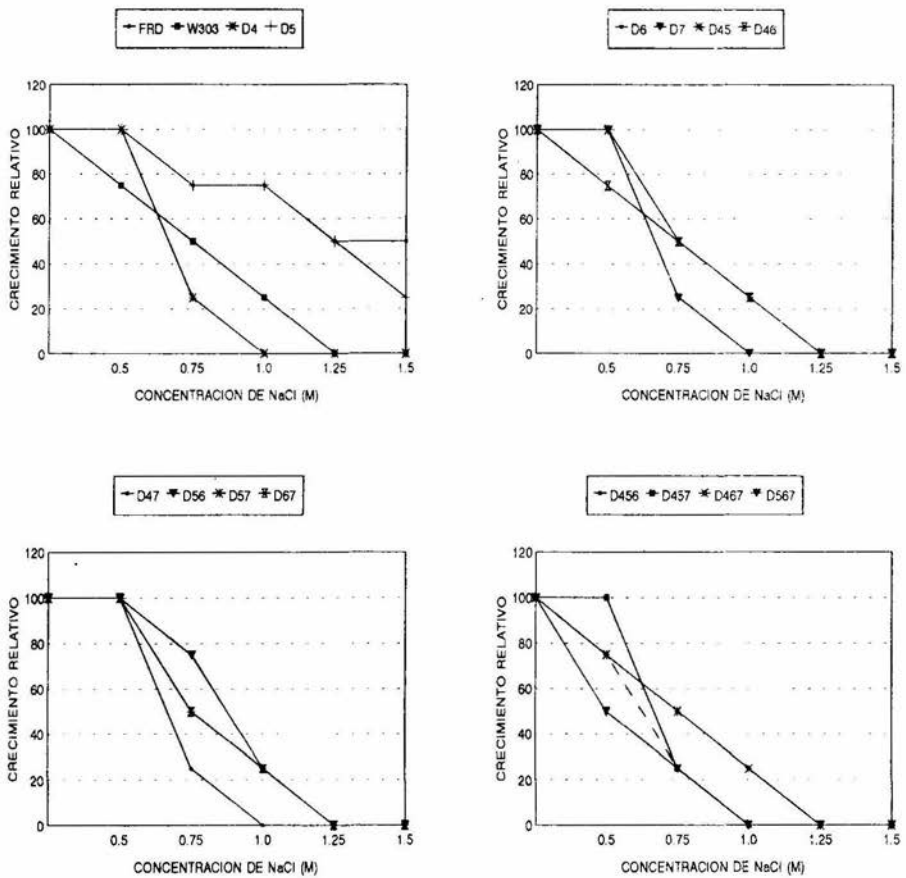
**Tabla IV**

---

Cepa	0.5M	0.75M	1.0M	1.25M	1.5M
FRD	++++	+++	+++	++	++
W303	+++	++	+	-	-
D4	++++	+	-	-	-
D5	++++	+++	+++	++	+
D6	++++	++	+	-	-
D7	++++	+	-	-	-
D45	++++	++	+	-	-
D46	+++	++	+	-	-
D47	++++	+	-	-	-
D56	++++	+++	+	-	-
D57	++++	++	+	-	-
D67	++++	++	+	-	-
D456	+++	+	-	-	-
D457	++++	+	-	-	-
D467	+++	++	+	-	-
D567	++	+	-	-	-

---

Crecimiento celular de las diferentes cepas estresadas con diferentes concentraciones de NaCl, representado como: ++++ = 100% (éste 100% se basó en el crecimiento de cada una de las cepas sobre medio SD-agar sin NaCl), +++ = 75%, ++ = 50% y + = 25% de intensidad relativa de crecimiento.



**Figura 7**  
**CRECIMIENTO RELATIVO DE**  
**LAS DIFERENTES CEPAS**  
**SOMETIDAS A ESTRES SALINO**  
**CON NaCl.**

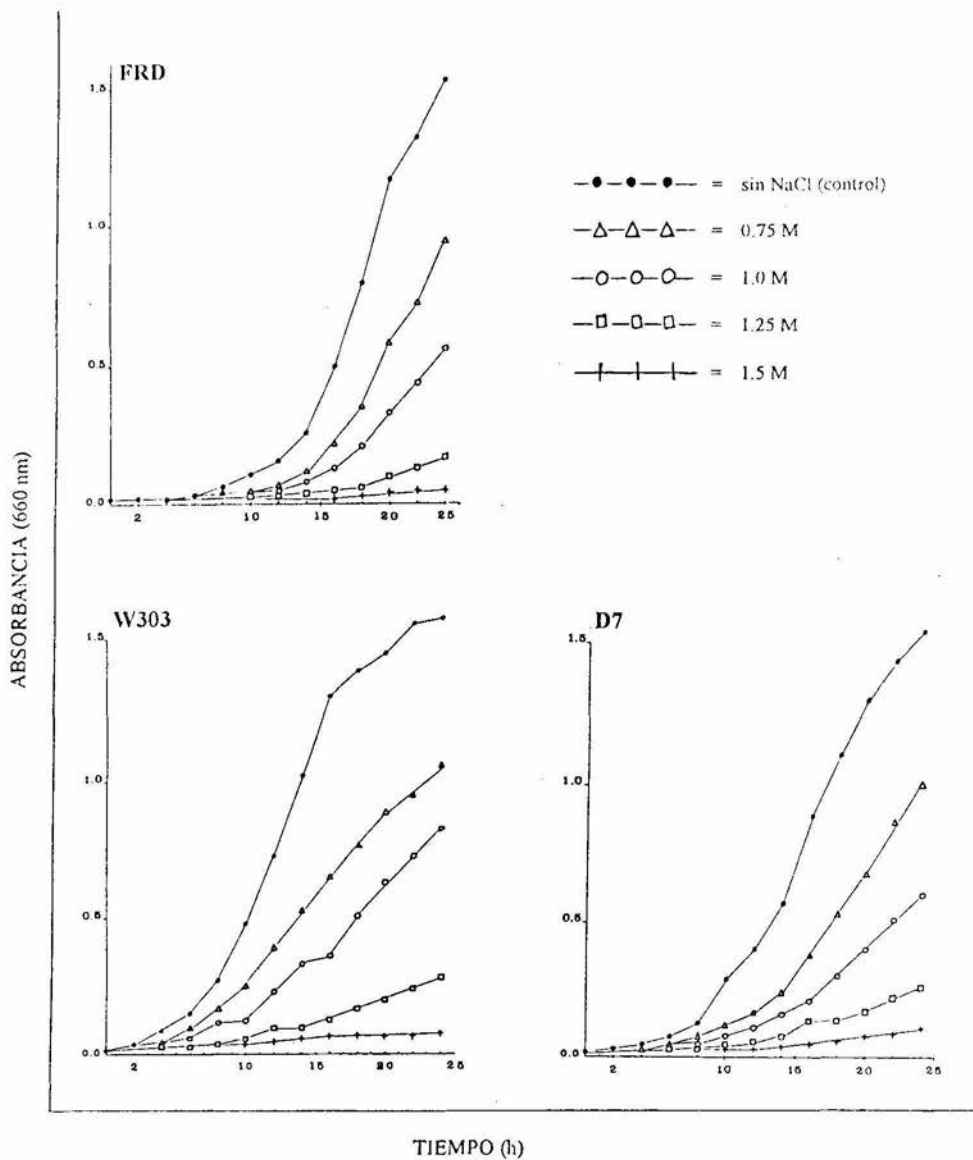


Figura 8 A. Curvas de crecimiento de las cepas FRD, W303 y D7 en medio SD con diferentes concentraciones de NaCl

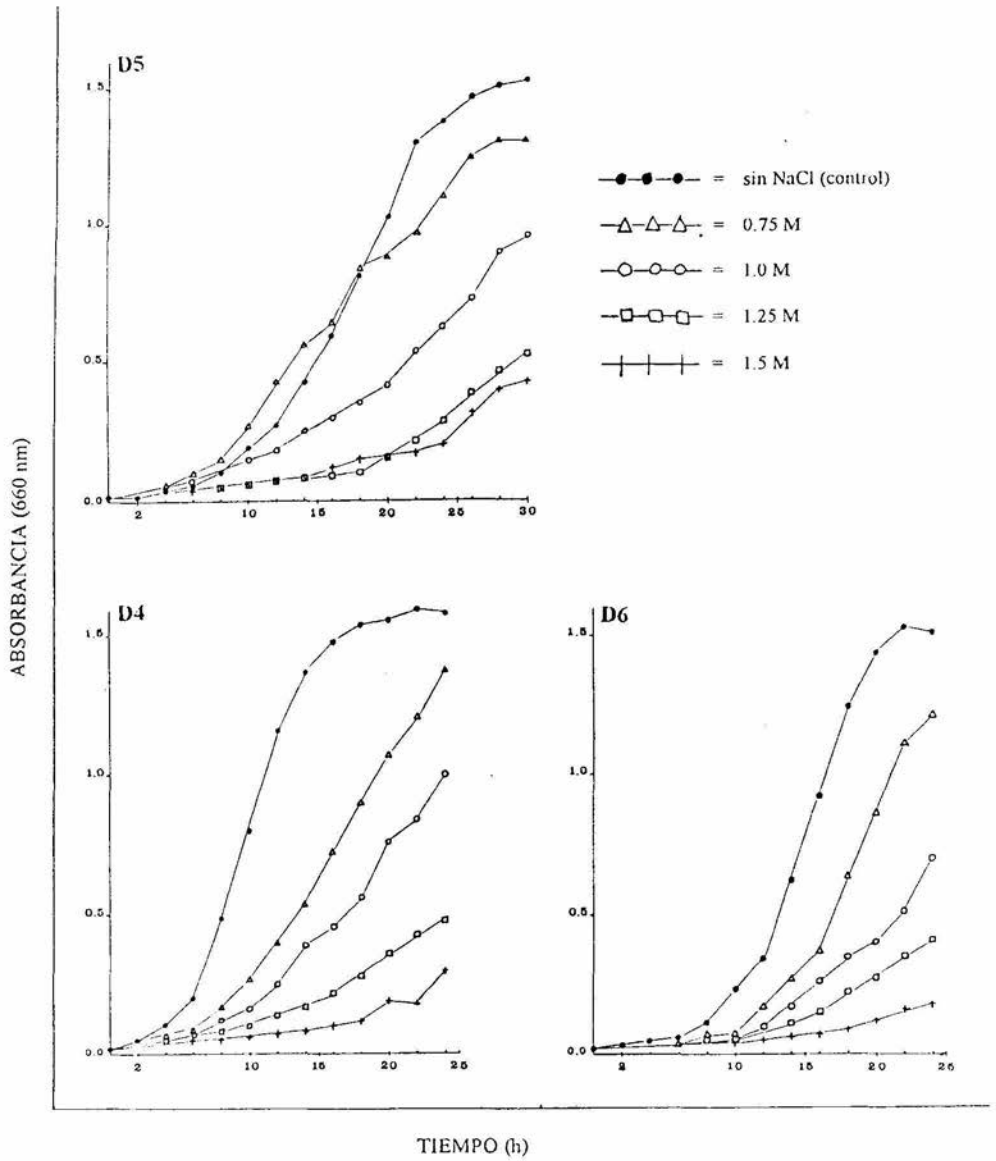


Figura 8 B. Curvas de crecimiento de las cepas D4, D5 y D6 en medio SD con diferentes concentraciones de NaCl.



Una observación interesante es la diferencia en el crecimiento de las cepas entre el medio sólido y el medio líquido. Todas crecen mejor en medio líquido. De acuerdo a Hellerbust (Hellerbust, 1976), esto se puede deber a que las levaduras en estado de reposo no son capaces de regular eficientemente sus sistemas de transporte de electrolitos, por lo que el crecimiento en medio sólido es más bajo.

A concentraciones mayores que 1.0 M de NaCl las cepas muestran un aumento considerable en el tiempo de la fase lag, una inhibición aparente en la velocidad del crecimiento y una disminución en la densidad final de población en la fase estacionaria en relación directa a la concentración creciente de sal presente en el medio de cultivo (Figura 8). La inhibición en la velocidad del crecimiento, se pudo corroborar al calcular los tiempos de duplicación para cada una de las cepas (Tabla V), los cuales nos indican que al ir aumentando la concentración de NaCl, el tiempo de duplicación también va siendo mayor, por lo tanto la velocidad de crecimiento disminuye. Estos resultados nos muestran también que la cepa D5 es la que menos incrementó su tiempo de duplicación, lo que nos vuelve a indicar que la falta de la proteína YP2 beta hace a ésta cepa más tolerante al NaCl, pero también podemos observar que la cepa D4 es la que más rápido se duplica a 1.5 M, por lo que podemos decir que también ésta cepa es halotolerante.

El hecho de que no se alcance una misma densidad de población en cultivos crecidos bajo diferentes salinidades, puede explicarse en base a lo sugerido por Norkrans y Kylin (Norkrans y Kylin, 1969), en el sentido de que las levaduras podrían estar ocupando energía de crecimiento para mantener el balance osmótico. Aunado a esto, está lo reportado por Watson (Watson, 1970), en un estudio sobre el efecto del NaCl sobre el metabolismo de Saccharomyces cerevisiae, en donde se demuestra que hay una mayor demanda del sustrato generador de energía (glucosa) debido a los requerimientos energéticos ligados con la homeostasis celular (transporte activo de iones, síntesis de solutos compatibles), lo que conduce a un menor rendimiento de biomasa. Gaxiola (Gaxiola, 1987) menciona también que los efectos de inhibición en el crecimiento pueden deberse no a la acción del NaCl "per se", sino a un estrés por falta de agua, causado por la elevada salinidad.

De acuerdo con Watson (Watson, 1970) y Mager (Mager y col, 1993), la viabilidad de las levaduras a altas concentraciones de NaCl (1.5 M) también depende de otros factores: a) la producción de osmolitos como el glicerol; b) la exclusión intracelular de solutos tóxicos (Na);

**Tabla V**  
Efecto del NaCl sobre el tiempo de duplicación.

	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
CEPAS	0.0 M	0.75 M	1.0 M	1.25 M	1.5 M
FRD	4.01	4.59	5.06	N.D.*	N.D.*
W303	3.96	4.31	4.46	6.46	13.97
D4	3.73	4.34	4.20	5.95	6.45
D5	5.02	5.25	5.77	6.41	7.13
D6	3.85	4.51	5.29	6.34	9.16
D7	3.88	4.42	5.52	6.67	12.44

Los valores están dados en horas. Las cepas se crecieron en medio SD.

\* N.D. = No determinado.

c) la síntesis de trehalosa como componente celular protector; d) la posible participación de una proteína cinasa; y e) la síntesis de algunas proteínas denominadas "proteínas de estrés".

### **Patrones proteicos**

Una posible explicación para los cambios metabólicos mostrados por las mutantes con disrupciones simples pueden ser debido a alteraciones en los patrones de la expresión de la proteínas debida a deficiencias de proteínas ácidas de los ribosomas.

Con la finalidad de observar si existían o no cambios en la expresión de genes estructurales en la adaptación de las cepas W303, D4, D5, D6 y D7 a los dos diferentes tipos de estrés utilizados en este trabajo, se extrajeron las proteínas totales de cada una de las cepas, como se describe en **Materiales y Métodos**.

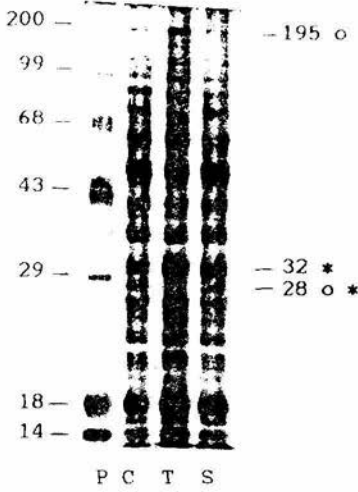
A cada una de las cepas se le creció en medio YPD hasta su fase media logarítmica ( D.O de 0.6 -0.7 a 660 nm ) y se le extrajo la proteína total como se menciona en **Materiales y Métodos**. Este procedimiento se consideró como control. Para extraer proteínas de células estresadas por medio de choque térmico, primero se le dió a cada una de las cepas un choque térmico a 45°C (como se describió en **Materiales y Métodos**). Posteriormente se les sembró en cajas con medio YPD-agar por medio de espátulación. Con las colonias que se formaron después de tres días, se inoculó medio YPD. Los cultivos celulares se crecieron hasta fase media-log y se les extrajo la proteína total. Con respecto a la extracción de proteínas de células estresadas con alta salinidad, se procedió a crecer a cada una de las cepas en medio SD complementado con NaCl al 1 M, hasta fase media-log y se les extrajo la proteína total. Mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS al 15%, y tinción con azul de coomasie se compararon los patrones de las proteínas extraídas (ver **Materiales y Métodos**).

Al comparar el patrón proteico control con el patrón de las células que pasaron por choque térmico (45 °C) y después a la temperatura inicial (30 °C), se pudo ver lo siguiente:

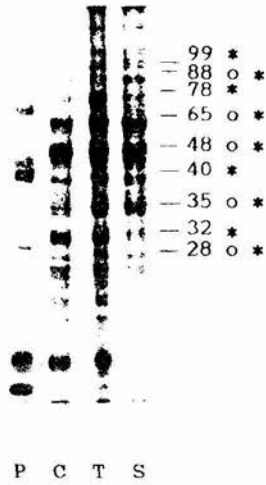
- En el patrón para D4, se presentó un incremento en la cantidad de una proteína de 26 kDa (Fig. 9).

Figura 9. Patrones protéicos de células estresadas y sin estresar. P = Marcadores de Peso Molecular standart, C = Proteína total control, T = Proteína total de células que fueron estresadas térmicamente a 45 °C durante 6 min y posteriormente crecidas a 30 °C, S = Proteína total de células estresadas con NaCl 1 M. Las diferencias obtenidas con respecto al control se designaron con: \* = estrés térmico, o = estrés salino y los valores están dados en kDa.

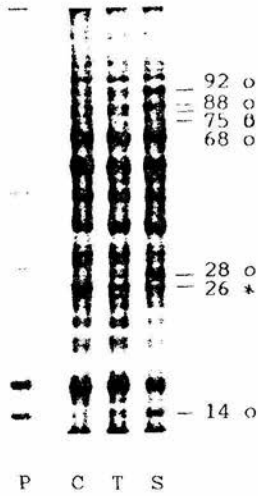
W303



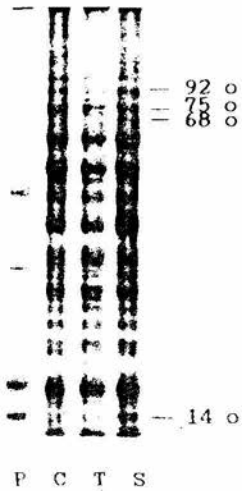
D5



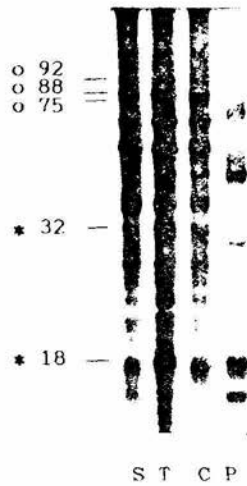
D4



D6



D7



- Una serie de proteínas incrementaron en cantidad en la cepa D5, estos incrementos fueron para las bandas de 28, 32, 35, 40, 48, 65, 78, 88 y 99 kDa (Fig. 9).
- Por último, en el patrón de D7 se presentaron incrementos en las proteínas de 18 y 32 kDa (Fig. 9). Todo esto se puede ver de manera más clara en la Tabla VI.

Lo anterior significa que 45 °C induce alteraciones permanentes en el patrón protéico de las cepas D4, D5 y D7. Podemos mencionar que posiblemente las cinco cepas (W303, D4, D5, D6 y D7) tuvieron alteraciones en sus patrones protéicos durante el choque térmico, pero éstas alteraciones no fueron permanentes en las cepas W303 y D7. Esto puede ser explicado en base a lo descrito por Miller (Miller,1979), Welch (Welch, 1993) y Mager (Mager,1993), quienes mencionan que en *Saccharomyces cerevisiae* el cambio de temperatura genera considerables alteraciones en el patrón de biosíntesis de proteínas, pero sólo temporalmente, ya que al cambiar nuevamente la temperatura a la condición inicial, vuelven a tener patrones protéicos normales.

En estrés salino hubo en las levaduras alteraciones protéicas que no sólo se limitaron a incrementos en la cantidad de algunas proteínas, sino al decremento, a la aparición "de novo" y la desaparición de algunas otras proteínas (Figura 9).

De manera resumida, estos resultados se presentan en la Tabla VII, en la cual podemos observar que:

- La cepa parental W303 muestra un decremento en la cantidad de una proteína con un peso molecular de 195 kDa y otra de 28 kDa (Fig. 9).
- Los patrones protéicos para D4 y D6 tienen cierta similitud; ambos muestran el incremento en una proteína de 14 kDa, la aparición de novo de una proteína de 68 kDa y la ausencia de una banda de 75 kDa. Aunado a esto hay un incremento en la síntesis para una proteína de 92 kDa, lo que puede estar relacionado con el mecanismo por el cual estas dos cepas toleraron altas concentraciones de sal (1.5 M de NaCl) (Fig. 9),
- para D5, el decremento de una proteína con un peso de 32 kD y el incremento de proteínas con pesos de 35, 48, 65 y 88 kDa probablemente hacen posible que la cepa sea la más tolerante a la sal (1.5 m de NaCl) (Fig. 9).
- Con respecto al patrón protéico obtenido para la cepa D7, se apreció que faltaba una banda de 75 kDa y el incremento en las proteínas de 88 y 92 kDa. Puesto que estas tres bandas también están presentes en la cepa D4, el cambio en ésta no puede ser el único factor que participa en la tolerancia (Fig. 9).

Tabla VI

BANDAS (kDa)	CEPAS				
	W303	D4	D5	D6	D7
18					↑
26		↑			
28			↑		
32			↑		↑
35			↑		
40			↑		
48			↑		
65			↑		
78			↑		
88			↑		
99			↑		

Cambios en el patrón proteico de la proteína celular total extraída de células estresadas térmicamente a 45 °C durante 6 min y después crecidas a 30 °C con respecto al patrón proteico de células crecidas sólo a 30 °C (control) ↑ = incremento en la intensidad de la banda.

Tabla VII

BANDAS (kDa)	CEPAS				
	W303	D4	D5	D6	D7
14		↑		↑	
28	↓	↑			
32			↓		
35			↑		
48			↑		
65			↑		
68		+		+	
75		--		--	--
88		↑	↑		↑
92		↑		↑	↑
195	↓				

Cambios en los patrones de la proteína celular total extraída de células estresadas con NaCl 1 M con respecto al patrón protéico de cada una de las cepas crecidas en el mismo medio (YPD) sin sal. ↑ = incremento, ↓ = decremento, + = aparición de novo, -- = ausencia



## CONCLUSIONES

- La ausencia de la proteína ácida ribosomal YP1 beta (cepa D6) le confiere a la cepa un fenotipo termosensible, debido a que no tolera la temperatura de 40 °C, que fué la más baja utilizada.
- La ausencia de la proteína ácida ribosomal YP1 alfa (cepa D7) le confiere a la cepa un fenotipo termotolerante, porque en comparación con la cepa parental, el incremento de la temperatura no afectó significativamente su viabilidad.
- La ausencia de la proteína ácida ribosomal YP2 beta ó YP2 alfa(cepa D5 y D4, respectivamente) le confiere a la cepa un fenotipo halotolerante, ya que tolera concentraciones de sal superiores a las que tolera la cepa parental, además de que el tiempo de duplicación de cada una es menor.
- La ausencia de la proteína ácida ribosomal YP1 alfa (cepa D7) le confiere a la cepa un fenotipo halosensible, puesto que fué la cepa que menos toleró los efectos causados por el NaCl.
- Las alteraciones mostradas en los patrones protéicos tanto para choque térmico, como para el estrés salino, indican que las proteínas ácidas ribosomales regulan la expresión diferencial de proteínas.
- Todo esto indica que las proteínas "A" de Saccharomyces cerevisiae además de actuar en el proceso de la traducción, también pueden ser moduladoras de la actividad del ribosoma o de la traducción misma.

## BIBLIOGRAFIA

- Borkovich, K. A.; Farrelly, F. W.; Finkelstein, D. B.; Taulien, J. and Lindquist, S. (1989). *hsp82* is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molec. and Cell. Biol.* Vol 9, No. 9, 3919-3930.
- Csonka, L. N. and Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 569-606.
- Fung, P. A.; Gaerting, J.; Gorovsky, M. A. y Hallberg, R. L. (1995). Requirement of a small cytoplasmic RNA for the establishment of thermotolerance. *Science.* 268, 1036 - 1039.
- Gaxiola, A. R. (Tesis de maestría, 1987). Saccharomyces cerevisiae como modelo eucarionte para el estudio de los mecanismos moleculares que permiten la vida en medios hipersalinos. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. México. pp 143.
- Gaxiola, A. R.; de Larrinoa, I. F.; Villalba, J. M. and Serrano, R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is important for salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11, No. 9 . pp 3157-3164.
- Hall, B. G. (1983). Yeast Thermotolerance does not require protein synthesis. *J. Bacteriology.* 156 - No. 3, 1363-1365.
- Harrington, H. M. and Alm, D. M. (1988). Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. *Plant. Physiol.* 88, 618-625.
- Hellebust (1976). Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 27, 485-505.
- Juan-Vidales, F; Sánchez-Madrid, F. and Ballesta, J. P. (1981). The acidic proteins of eukaryotic ribosomes. A comparative study. *Biochim. Biophys. Acta.* 656, 28-35
- Juan-Vidales, F.; Saenz-Robles, M. and Ballesta, J.P. (1984). Acidic proteins of de large ribosomal subunit in Saccharomyces cerevisiae. Effect of phosphorylation. *Biochemistry*, 23, 390-396.

- Kalthoff, H. and D. Richter. (1979). In vivo studies on the incorporation of microinjected acidic proteins of the large ribosomal subunit from *Escherichia coli* and *Artemia salina* into oocyte ribosomes from *Xenopus laevis*. *Biochemistry*. 18, 4144-4147.
- Kruiswijk, T. and Planta, R. J. (1975). Further analysis of the protein composition of yeast ribosomes. *FEBS Lett.* 58, 102-105.
- Lavergne, J. P.; Conquet, F.; Reboud, J. P. and Reboud, A. M. (1987). Role of acidic phosphoproteins in the partial reconstitution of the active 60S ribosomal subunit. *FEBS. Lett.* 216, 83-88.
- Leer, J. J.; Van Raamsdonk-doin, M. M. C.; Mager, W. H. and Planta, R. J. (1985). Conserved sequences upstream of yeast ribosomal genes. *Current Genetics*. 9, 273-277.
- Liljas, A. (1982). Structural studies of ribosomes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 40, 161-228.
- Lindquist, S. (1981). Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature*. 294, 311-314.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Lindquist, S. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mager, W. H. (1988). Control of ribosomal protein gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* 949, 1-15.
- Mager, W. H. and Moradas, F. P. (1993). Stress response of yeast. *Biochem. J.* 290, 1 - 13.
- Mager, W. H. and Varela J. C. S. (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* 10(2), 253-258.

- Maizel, J. V. Jr. (1971). *Methods Virol.* 5, 179.
- McAlister, L., Strausberg, S., Kulaga, A. and Finkelstein, D. B. (1979). *Curr. Genet.* 1, 63-74.
- McAlister, L. and Finkelstein, D.B. (1980). Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 93, 819-824.
- Miller, M. J.; Xuong, N. H. and Geiduschek, E. P. (1979). A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5222- 5225.
- Mitsui, K.; Motizuki, M.; Endo, Yaeta.; Yokota, S. and Tsurugi, K. (1987). Characterization of a Novel Acidic Protein of 38 kDa, A0, in Yeast Ribosomes Which Immunologically Cross - Reacts with the 13 kDa Acidic Ribosomal Proteins, A1/A2". *J. Biochem.* 102, 1565-1570.
- Naranda, T. and Ballesta, J. P. G. (1991). Phosphorylation controls binding of acidic proteins to the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 10563-10567.
- Naranda, T.; Remacha, M. and Ballesta, J. P. G. ( 1993). The activity controlling phosphorylation site is not the same in the four acidic ribosomal proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 2451-2457.
- Norkrans, B. and Kilin, A. (1969). Regulation of the Potassium to Sodium ratio and osmotic potential in relation to salt tolerance in yeasts. *J. Bac.* 100, 836-845.
- Oakes, M., Henderson, E., Scheinman, A., Clack, M. y Lake, J. A. (1986). Ribosome, structure, function and evolution: mapping ribosomal RNA, proteins and functional sites in three dimensions. En *structure, function and genetics of ribosomes* (Ed. B. Hardesty y G. Kramer), Springer-Verlag, New York. pp 47-67.
- Ochoa, A. (1995). Comunicación personal. Depto. de Genética. CINVESTAV.

- Payo, J. M. G. (tesis doctoral, 1993). Análisis de la expresión de los genes que codifican las proteínas ácidas ribosómicas de Saccharomyces cerevisiae mediante fusiones con el gen lac Z. Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. España. pp 109.
  
- Remacha, M. (tesis doctoral, 1989). Los genes de las proteínas ribosomales ácidas de Saccharomyces cerevisiae: Caracterización y estudios funcionales. Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid, España. pp 111.
  
- Remacha, M.; Cruz, S. and Ballesta, J. (1990). Disruption of single copy genes encoding acidic ribosomal proteins in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 10, 2182-2190.
  
- Remacha, M.; Saenz - Robles, T.; Vilella, M. and Ballesta, J. P. (1988). Independent genes coding for the acidic proteins of the large ribosomal subunit from S. cerevisiae. J. Biol. Chem. 263, 9094 - 9101.
  
- Remacha, M.; Santos, C.; Bermejo, B.; Naranda, T. & Ballesta, J. P. G. (1992). Stable binding of the eukaryotic acidic phosphoproteins to the ribosome is not an absolute requirement for in vivo protein synthesis. J. Biol. Chem. 267, 12061-12067.
  
- Remacha, M.; Jimenez-Díaz, A.; Bermejo, B.; Rodríguez-Gabriel, M. A.; Guarinos, E.; and Ballesta, J. P. G. (1995). Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 15 ( 9),. 4754-4762.
  
- Rotenberg, M. O. and Woolford, J. L. (1986). Tripartite upstream promoter element essential for expression of Saccharomyces cerevisiae ribosomal protein genes. Mol. Cell. Biol. 6, 674-687.
  
- Sáenz-Robles, M.; Remacha, T. M.; Vilella, M. D.; Zinker, S. and Ballesta, J. (1990). The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. Biochem. Biophys. Acta. 1050, 51-55.

- Sáenz-Robles, M. (Tesis Doctoral). (1985). Proteínas ácidas de la subunidad mayor ribosomal en Saccharomyces cerevisiae. Estudios sobre su estructura y función. Universidad Autónoma de Madrid.
- Sáenz-Robles, M. T.; Vilella, M. D.; Pucciarlli, G.; Polo, F.; Remacha, M.; Ortiz, B. L.; Vidales, F. J. and Ballesta, J. P. (1988). Ribosomal protein interaction in yeast. Protein L15 forms a complex with the acidic protein. Aceptado en Eur. J. Biochem.
- Sánchez-Madrid, F.; Reyes, R.; Conde, P. and Ballesta, J. P. (1979). Acidic ribosomal proteins from eucaryotic cells. Eur. J. Biochem. 98, 409-416.
- Sánchez-Madrid, F.; Juan-Vidales, F. and Ballesta, J. P. (1981). Funtional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukaryotic cells. Biochemistry. 20, 3263-3266.
- Serrano, R. and Gaxiola, R. (1994). Microbial models and salt stress tolerance in plants. Crit. Rev. in Plant Scis. 13 (2), 121-138.
- Terhorst, C. P., Moller, W., Laursen, R. and Wittmann-Liebold, B. (1973). The primary structure of an acidic protein from 50S ribosomes of Escherichia coli which is involved in GTP hydrolisis dependent on elongation factors G and T. Eur. J. Biochem., 34, 138-152.
- Traut, R. R.; Lambert, J. M. and Kenny, J. W. (1983). Ribosomal protein L7/L12 cross-links to proteins in separate regions of the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 258, 14592-14598.
- Tsurugi, K.; Collatz, E.; Todokoro, K.; Ulbrich, N.; Lightfoot, H. N. and Wool, I. G. (1978). Isolation of eukaryotic ribosomal proteins: purification and characterization of the 60S ribosomal subunit proteins La, Lb, P1, P2, L13', L14, L18, L20, and L38, J. Biol. Chem. 253, 946-955.
- Tsurugi, K. and Ogata, K. (1985). Evidence for exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. J. Biochem. 98, 1427-1431.

- Van Agthoven, A. J.; Kriek, J.; Amons, R. and Moller, W. (1978). Isolation and characterization of the 60S ribosomal subunit proteins La, Lb, P1, P2, L13', L14, L18, L20 and L38. *J. Biol. Chem.* 253, 946-955.
- Van Agthoven, A.; J. Kriek; R. Amons and W. Moller. (1978). Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60S ribosomes from Artemis salina and rat liver. *Eur. J. Biochem.* 91, 553-565.
- VanBogelen, R. A.; Acton, M. A. and Neidhart, F. C. (1987). Induction of the heat shock regulon does not produce thermotolerance in Escherichia coli. *Genes Dev.* 1, 525-531.
- Vilella, M. (Tesis doctoral, 1988). Estructura y función de las proteínas ribosomales ácidas y L15 del ribosoma de Saccharomyces cerevisiae. Utilización de anticuerpos monoclonales específicos. Centro de Biología Molecular. Universidad Autónoma de Madrid. España. pp 106.
- Volker, U.; Engelmann, S.; Maul, B.; Riethdorf, S.; Volker, A.; Schmid, R.; Mach, H. and Hecker, M. (1994). Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 140, 741-752.
- Warner, J. R. (1982). The yeast ribosome: structure, function and synthesis. In the molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. (ED. J. N. Stranther, E. W. Jones and J. R. Broach), 529-560.
- Watson, T. G. (1970). Effects of sodium chloride on steady-state growth and metabolism of Saccharomyces cerevisiae. *J. Gen. Microbiol.* 64, 91-99.
- Watson, K.; Dunlop, G. and Cavicchioli, R. (1984). Mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis is not required for heat shock acquisition of ethanol- and thermotolerance in yeast. *FEBS Lett.* 169, 267-273.
- Wei. (1982). *App. Envir. Microbiol.* 43, 757-763.
- Welch, W. J. (1993). How cells respond to stress. *Scientific American.* pp 34-41.

- Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 2745-2749.
  
- Wool, I. G.; Chan, Y. L.; Gluck, A. and Suzuki, K. (1991). The primary structure of ribosomal proteins P0, P1, and P2; proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. Biochemistry. 73, 861-870.
  
- Zinker, S. and Warner, J. R. (1976). The ribosomal proteins from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 251, 1799-1807.
  
- Zinker, S. (1980). P5/P5' the acidic ribosomal phosphoproteins from Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Acta. 606, 76-82.