



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DE LA TIROSINA EN LA RESPUESTA A  
ESTRES EN *Saccharomyces cerevisiae*

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
**P R E S E N T A**  
**LINA RAQUEL RIEGO RUIZ**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ALICIA GONZALEZ MANJARREZ

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION DE CIENCIAS

MEXICO, D. F.

ABRIL DE 1997

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

*"Papel de la tirosina en la respuesta a estrés en  
Saccharomyces cerevisiae".*

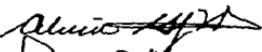
realizado por *Lina Raquel Riego Ruiz*

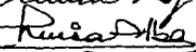
con número de cuenta *8935461-2* , pasante de la carrera de *Biología*

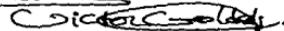
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario *Dra. Alicia González Nanjarrez.* 

Propietario *Dra. Luisa Alvarina Alba Lois.* 

Propietario *M. en C. Víctor Manuel Valdés López.* 

Suplente

*Dra. Annie Pardo* **FACULTAD DE CIENCIAS**

Suplente

*N. en IBB Hiram Oliv...*

  
*M. en C. Alicia Martínez Nena*

**COORDINACION GENERAL  
DE BIOLOGIA**

**A mis padres Raquel y Manuel por el apoyo y el cariño que me han expresado durante mi vida, por ser los pilares de este logro. Gracias.**

**A mis hermanos Sandra y Manuel por todos los momentos compartidos.**

**A mi abuelo Manuel y mi tía Soledad que, donde quiera que esten, comparten esta etapa conmigo.**

**A Fernando: fuente de mis sueños y compañero de andanzas. Porque después de los años todavía cree en la magia...**

**A la Dra. Alicia González por confiar en mí cuando de repente aparecí en su laboratorio y por darme la oportunidad de vivir estos años de enseñanzas y experiencias. Gracias Mami por la paciencia cuando desaparecía frecuentemente en alguno de mis viajes.**

**A Jesús Manuel y Elizabeth por fungir como mis ángeles guardianes y fomentar uno de mis vicios: la lectura.**

**A Lourdes Miranda por la adopción durante un verano, por revisar esta tesis y por tratar de bajarme un poco de las nubes con sus oportunos consejos.**

**A Adriana por su gran amistad.**

**A mis compañeros de laboratorio actuales y pasados: Simón, Amaranta, Cristina, Sandra, Lourdes, Augusto, Soledad. Y a las nuevas adquisiciones: Alexander y Mauricio.**

**A mis sinodales: Dra. Luisa Alba, Dra. Alicia González, M. en IBB. Hiram Olivera, Dra. Annie Pardo y M en C. Víctor Valdés por su disposición en la revisión de esta tesis y sus atinadas sugerencias.**

**A Ise, Roxana, Ariadna y Aide por ser cómplices de travesuras preparatorias.**

**A todos mis amigos de la facultad, en especial a Poncho por el cine.**

**A todas las personas que directa o indirectamente participaron en la realización de esta tesis.**

**Al Dr. Helmut Ruis y a su laboratorio por el apoyo recibido durante mi estancia de mes y medio.**

**Al programa Jóvenes a la Investigación, al Programa Universitario de Investigación en Salud y a Aditivos Mexicanos, SA por el apoyo recibido para la estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Helmut Ruis.**

**Esta investigación fue financiada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, Proyectos No. IN-201894 e IN-204695.  
Este trabajo se realizó en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>Estrés oxidativo y formación de especies reactivas de oxígeno.</b>	<b>11</b>
<b>Mecanismos implicados en la eliminación de radicales libres.</b>	<b>12</b>
<b>Enzimáticos.</b>	<b>12</b>
<b>No enzimáticos.</b>	<b>16</b>
<b>Los aminoácidos, sistemas adicionales de protección en la respuesta a estrés.</b>	<b>17</b>
<b>Los radicales libres como segundos mensajeros.</b>	<b>19</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>21</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>Cepas.</b>	<b>26</b>
<b>Medios de crecimiento.</b>	<b>27</b>

Condiciones de cultivo.	28
Viabilidad.	30
OBJETIVO	31
RESULTADOS	32
Caracterización fisiológica de la cepa R3.	32
Caracterización fisiológica de la tétrada 101.	42
Espora A, fenotipo <i>TYR1</i> <sup>+</sup> , <i>SO</i> <sup>+</sup> (+,+).	42
Espora B, fenotipo <i>TYR1</i> <sup>+</sup> , <i>so</i> <sup>-</sup> (+,-).	43
Espora C, fenotipo <i>tyr1</i> <sup>±</sup> , <i>SO</i> <sup>+</sup> (±,+).	44
Espora D, fenotipo <i>tyr1</i> <sup>±</sup> , <i>so</i> <sup>-</sup> (±,-).	45
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	60
PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	63

## ABREVIATURAS

<b>ARO7</b>	Gen que codifica para la corismato mutasa de levadura.
<b>3AT</b>	Análogo 3-amino-L-tirosina.
<b>atm</b>	Atmósferas.
<b>ATX1</b>	Gen que codifica para una proteína que comparte una alta homología con las proteínas transportadoras de metales presentes en bacterias.
<b>°C</b>	Grados centígrados.
<b>catalasa A</b>	Catalasa peroxisomal de levadura.
<b>catalasa T</b>	Catalasa citosólica de levadura.
<b>CTA1</b>	Gen que codifica para la catalasa citosólica de levadura.
<b>CTT1</b>	Gen que codifica para la catalasa peroxisomal de levadura.
<b>DAHP sintasa</b>	7-fosfo-3-deoxi-D-arabino heptulosonato sintasa.
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>EMS</b>	Etilmetanosulfonato.
<b>Fig</b>	Figura.
<b>glutaminasa B</b>	Enzima citoplásmica del catabolismo de glutamina. A partir de la degradación de glutamina forma amonio y ácido glutámico.

<b>GS</b>	Glutación reducido.
<b><i>GSH1</i></b>	Gen que codifica para la glutación reductasa de levadura.
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado.
<b><i>HAP1</i></b>	Factor de transcripción que se une específicamente a las UAS ("upstream activation sequences") promoviendo la transcripción de una gran variedad de genes.
<b><i>HAP2/3/4</i></b>	Complejo general de transcripción implicado en la regulación de varias funciones celulares. Este complejo responde a dos estímulos: a hemo y a fuentes de energía no fermentables.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno.
<b>h</b>	Horas.
<b>hsp</b>	Proteínas de choque térmico (heat shock proteins).
<b>inos</b>	Inositol.
<b>μ</b>	Micras.
<b><i>Mac1</i></b>	Factor de transcripción que se requiere para la transcripción mediada por peróxido del gen de la catalasa citosólica.
<b>min</b>	Minutos.
<b>mg</b>	Miligramo.
<b>μg/ml</b>	Microgramos por mililitro.
<b>mg/ml</b>	Miligramos por mililitro.

<b>ml</b>	<b>Mililitro.</b>
<b>μl</b>	<b>Microlitro.</b>
<b>MM</b>	<b>Medio mínimo.</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar.</b>
<b>Mn</b>	<b>Manganeso.</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido.</b>
<b>nm</b>	<b>Nanometros.</b>
<b>μmoles</b>	<b>Micromoles.</b>
<b>nmoles</b>	<b>Nanomoles.</b>
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxígeno singulete.</b>
<b>O<sub>2</sub></b>	<b>Oxígeno molecular.</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>Anión superóxido.</b>
<b>OH<sup>·</sup></b>	<b>Radical hidroxilo.</b>
<b>PFD</b>	<b>Prefenato deshidrogenasa.</b>
<b>phe</b>	<b>Fenilalanina.</b>
<b>pL5</b>	<b>Plásmido obtenido a partir de un banco genómico de levadura el cual contiene un inserto en donde se encuentra el gen <i>TYR1</i>.</b>
<b>RAS/AMPc</b>	<b>Vía en donde la proteína Ras estimula a la adenilato ciclasa, la cual es responsable de catalizar la formación de AMP cíclico.</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico.</b>

<b>ROIs</b>	<b>Intermediarios reactivos de oxígeno.</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto.</b>
<b>SngIn</b>	<b>Medio mínimo con glutamina como única fuente de nitrógeno.</b>
<b>SO</b>	<b>Nombre asignado al gen que, junto con <i>TYR1</i>, confiere el fenotipo de sensibilidad al oxígeno y a la temperatura. Las siglas significan Sensible a Oxígeno.</b>
<b>SOD1</b>	<b>Gen que codifica para la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc de levadura.</b>
<b>SOD2</b>	<b>Gen que codifica para la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso de levadura.</b>
<b>tyr</b>	<b>Tirosina.</b>
<b>TYR1</b>	<b>Gen que codifica para la pteridina deshidrogenasa.</b>
<b>TRX2</b>	<b>Gen que codifica para la tiorredoxina de levadura.</b>
<b>ura</b>	<b>Uracilo.</b>
<b>yAP1/yAP2</b>	<b>Factores de transcripción homólogos al de humano los cuales son capaces de unirse a una secuencia específica del DNA. Se sugiere que tienen un papel en la expresión redox-regulada de algunos genes en levadura.</b>

## **RESUMEN**

Durante la respiración, la molécula de oxígeno puede ser reducida hasta formar intermediarios reactivos de oxígeno conocidos como ROI's. Como una consecuencia fisiológica de la respiración siempre existe una cierta concentración de ROI's dentro de la célula; sin embargo un exceso en la concentración de estas especies da como resultado una situación de estrés oxidativo. Para contender con esta situación, la célula expresa una serie de mecanismos de protección tanto enzimáticos como no enzimáticos. Existen algunos reportes en los cuales de manera adicional a los sistemas antes mencionados, se implican a los aminoácidos como protectores en la respuesta a estrés.

Los datos obtenidos del análisis fisiológico, de la cepa mutante CN10 (auxótrofa parcial de tirosina), cuyo fenotipo de sensibilidad a oxígeno-temperatura y pérdida de viabilidad podía ser revertido mediante la introducción de un gen *TYR1* silvestre, sugerían que la tirosina pudiese tener algún efecto protector contra un posible estrés oxidativo y calórico.

La caracterización fisiológica de la cepa R3 (revertante con auxotrofia parcial por tirosina) como el análisis fisiológico llevado a cabo con las esporas de la tétrada 101 (obtenida a partir de la cruce de la cepa R3 por una cepa silvestre), nos permitió determinar que el fenotipo de sensibilidad a oxígeno-temperatura se debía a la presencia de dos mutaciones que segregaban de manera independiente. Una de las mutaciones se localizaba en el gen *TYR1* mientras que la segunda mutación, de la cual no conocemos el gen afectado, la denominamos *SO* (sensibilidad a oxígeno). A 35°C, la presencia exclusiva de la mutación en el gen de *TYR1* resultaba en una ligera sensibilidad a oxígeno-temperatura que no se prevenía cuando se agregaba tirosina al medio. Por otro lado, la mutación en el gen *SO*, daba como resultado una disminución en el crecimiento pero sin pérdida de viabilidad. La presencia simultánea de las mutaciones en el gen *TYR1* y en el gen *SO* resultaba en pérdida de viabilidad además de sensibilidad a oxígeno-temperatura. La pérdida de viabilidad se prevenía cuando se le agregaba tirosina al medio o cuando la doble mutante se cultivaba en condiciones de microaerofilia, aunque por otra parte, se vió incrementada cuando al medio de cultivo se le agregó un antioxidante como el  $\beta$ -mercaptoetanol.

Solamente conociendo la identidad del gen *SO* se podrá evaluar una posible función de la tirosina y se intentará establecer la relación que guardan éstos dos genes.

# INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo aerobio facultativo, cuyo corto ciclo de vida, permite su utilización como modelo para el estudio de una gran variedad de fenómenos fisiológicos. En crecimiento aerobio, su energía se genera a partir de la fosforilación oxidativa, en la cual el oxígeno molecular se encuentra disponible como aceptor de electrones, al igual que para una variedad de reacciones enzimáticas. En condiciones de anaerobiosis, la energía necesaria para mantener el crecimiento se obtiene por medio de la fermentación de diferentes moléculas.

Para regular eficientemente el metabolismo celular entre el estado aerobio y el anaerobio, un gran número de genes se expresan de manera diferencial en respuesta a la concentración de oxígeno. En presencia de oxígeno, algunos de los genes que se inducen codifican para funciones respiratorias; mientras que otros tienen funciones implicadas en el control del daño oxidativo.

## **Estrés oxidativo y formación de especies reactivas de oxígeno.**

Durante la respiración, la molécula de oxígeno ( $O_2$ ) puede ser reducida hasta formar intermediarios reactivos de oxígeno conocidos por sus siglas en inglés como ROIs ("Reactive Oxygen Intermediates"). Entre estos intermediarios se encuentran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Como una consecuencia fisiológica de la respiración; siempre existe una cierta concentración de ROIs dentro de la célula. Sin embargo, un exceso en la concentración de estas especies pone a la célula en una situación potencialmente letal, llamada estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno afectan al DNA, el RNA, las proteínas y los lípidos; por lo tanto, la célula requiere expresar una serie de enzimas con actividades antioxidantes y sintetizar moléculas protectoras, así como enzimas que reparen el daño causado en las macromoléculas (Pahl and Baeuerle, 1994).

## **Mecanismos implicados en la eliminación de radicales libres.**

### **Enzimáticos.**

Dentro de los genes que se inducen en condiciones de estrés oxidativo y que codifican para enzimas que participan directamente en la eliminación de radicales, se encuentran los de:

**1) La superóxido dismutasa citosólica dependiente de cobre y zinc, SOD1 y la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso, SOD2.** La superóxido dismutasa convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Una cepa de levadura carente de *SOD1* es intolerante al  $O_2^-$  creado intracelularmente, y presenta auxotrofia por lisina y metionina cuando se cultiva en condiciones de agitación. En cambio, cuando las mutantes tienen afectado el gen *SOD2*, éstas son sensibles a concentraciones elevadas de oxígeno, aunque el crecimiento en concentraciones atmosféricas permanece normal. Cuando una cepa de levadura tiene ambos genes alterados presenta defectos en la esporulación, los cuales están asociados a una alta tasa de mutación; y adicionalmente es incapaz de sintetizar lisina y metionina (Liu *et al.*, 1992).

**2) La catalasa citosólica, CTT1 (Spevak et al., 1983) y la catalasa peroxisomal, CTA1 (Cohen et al., 1985).** Ambos genes se expresan solamente en presencia de oxígeno, lo cual es consistente con su función de eliminación del peróxido de hidrógeno intracelular. La inducción coordinada de la síntesis de catalasa A junto con las estructuras peroxisomales y el sistema de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos sugiere que ésta enzima tiene un papel fundamental dentro del metabolismo peroxisomal. Por otro lado, la catalasa T se induce bajo condiciones de aerobiosis, aumento de temperatura y falta de nutrientes. El estudio de las señales regulatorias que controlan la inducción sugiere una función predominante de esta enzima cuando las levaduras están expuestas a condiciones de estrés oxidativo, en combinación con otros tipos de condiciones adversas. Por ejemplo, se ha demostrado que cepas de *S. cerevisiae* carentes de CTT1 son más sensibles a un shock letal de calor (50°C durante 20 min bajo condiciones de aerobiosis), que una cepa silvestre isogénica (Wieser et al., 1991). Debido a que el efecto protector que provee la catalasa T bajo estas condiciones es menor que las diferencias en la resistencia al choque calórico observadas entre células en fase logarítmica y células en fase estacionaria de crecimiento, es obvio

que la catalasa citosólica es sólo uno de los factores que contribuyen a la sobrevivencia bajo condiciones de estrés calórico (Wieser *et al.*, 1991). Estos experimentos indican que la inducción de la catalasa el choque calórico provee a las células de un mecanismo adicional de protección contra el estrés oxidativo; este estrés se vuelve mas dañino cuando se combina con otros tipos, y por lo tanto las células requieren de más mecanismos que le ayuden a contender contra el mismo.

**3) La glutatión reductasa (GSH1).** Esta enzima es la responsable de transformar el glutatión que se ha oxidado en glutatión reducido usando NADPH como poder reductor, manteniendo de ésta forma una tasa constante del mismo. Se ha observado que mutantes en el gen *GSH1* muestran una alta sensibilidad a los oxidantes, incluyendo tanto los radicales peróxido como los superóxido (Grant *et al.*, 1996).

**4) El gen *ATX1* codifica para un polipéptido de 8.2 kDa que comparte una gran homología con las proteínas transportadoras de metales presentes en bacterias.** En principio, este gen fue aislado por su capacidad de suprimir la toxicidad por oxígeno en levaduras carentes

de *SOD1*. Al parecer su papel en la homeostasis de cobre parece estar relacionado directamente con su habilidad para suprimir la toxicidad por oxígeno. Se ha observado que los defectos aeróbicos que presentan las células carentes de *SOD1* pueden revertirse al tratarlas con dosis elevadas de manganeso o cobre (Thiele *et al.*, 1993 y Chang and Kosman, 1989). La ausencia del gen *ATX1* provoca, tanto en cepas silvestres como en aquéllas que carecen de *SOD1*, una hipersensibilidad al paraquat (un generador de anión superóxido) y un incremento en la sensibilidad al peróxido de hidrógeno (Lin and Culotta, 1995) .

**5) La tiorredoxina (*TRX2*) es una proteína pequeña que presenta un enlace disulfuro reactivo.** Esta proteína existe tanto en su forma reducida (ditiol), como en su forma oxidada donde dos de los residuos de cisteína forman un puente disulfuro intramolecular (Kuge and Jones, 1994). Se ha observado que esta molécula protege del estrés oxidativo atrapando a las especies reactivas de oxígeno (Mitsui *et al.*, 1992), así como regenerando a las proteínas que se inactivan como consecuencia del estrés (Fernando *et al.*, 1992).

## **No enzimáticos**

**Además de las defensas enzimáticas mencionadas anteriormente, todas las células poseen sistemas de defensa no enzimáticos para proteger a sus componentes celulares del daño producido por los radicales libres. Entre estos sistemas se encuentran:**

**1) El glutatión (GS)** (Stephen and Jamieson, 1996). Esta molécula actúa como un atrapador de radicales, con un grupo sulfhidrilo activo que reacciona con los oxidantes dando como producto glutatión en su forma oxidada (GSSG). Mutantes afectadas en la enzima glutatión reductasa y por lo tanto deficientes en la síntesis de glutatión, utilizan otros mecanismos adaptativos para contender con los radicales peróxido y superóxido.

**2) El ácido úrico** es un potente antioxidante, el cual atrapa oxígeno singulete y otros radicales resultando tan efectivo como el ascorbato (Ames *et al.*, 1981).

**3) Los compuestos fenólicos, como algunos flavonoides y vitaminas** (Zhou and Zheng, 1991). Se ha demostrado que estos compuestos presentan más de un mecanismo de acción contra los radicales libres y pueden suprimir el proceso a dos niveles, evitando: 1) la formación de superóxido y 2) la producción de lipoperóxidos.

### **Los aminoácidos, sistemas adicionales de protección en la respuesta a estrés.**

Los mecanismos y moléculas descritos anteriormente constituyen los sistemas celulares primordiales de respuesta al estrés y por lo tanto, han sido mejor estudiados y caracterizados. Adicionalmente, existen algunos reportes en donde también se han implicado a los aminoácidos (la vía de biosíntesis, un derivado o al aminoácido mismo) como moléculas que participan la respuesta a estrés.

Respecto a la biosíntesis, en *S. cerevisiae* se ha observado que una mutación en el gen *ARO7*, que codifica para la corismato mutasa, da como resultado sensibilidad a sal (estrés osmótico) (Ball *et al.*, 1986). Por otra

parte, en *Aspergillus nidulans* se ha sugerido que en conidias en germinación, las cuales tienen auxotrofia por algunos aminoácidos, se presenta un problema en la vía RAS/AMPC que da como resultado la supresión de la reparación del DNA, confiriéndole mayor sensibilidad al estrés oxidativo y calórico (Donnelly *et al.*, 1994).

En cuanto a los derivados de aminoácidos se sabe, por ejemplo, que la mieloperoxidasa secretada por fagocitos activados puede emplear el peróxido de hidrógeno para oxidar a la L-tirosina a un radical tirosilo, dando lugar a la ditirosina (Heinecke *et al.*,1993). También se ha observado que la ovoperoxidasa, que se encuentra en el embrión del erizo de mar, forma uniones de ditirosina en la cubierta protectora de fertilización en una reacción dependiente de peróxido (Foerder, C A and B M Shapiro, 1977). En *Saccharomyces cerevisiae*, una enzima similar a la citocromo P-450 reductasa, también forma uniones de ditirosina entre proteínas en la pared de la espora (Briza *et al.*,1986). En plantas, el ácido ferúlico, derivado del metabolismo de fenilalanina y tirosina, posee propiedades antioxidantes y es usado como fotoprotector disuelto en lociones

cosméticas, así como conservador natural contra la peroxidación lipídica (Graf, 1992).

Con respecto al efecto del aminoácido *per se*, se ha observado que los aminoácidos aromáticos (triptófano y tirosina), los aminoácidos que contienen azufre como la metionina y la cisteína, y, la histidina pueden reaccionar con el oxígeno singulete provocando su inactivación ("physical quenching" o apagamiento físico) o pueden reaccionar químicamente con este radical dando lugar a la oxidación, en general destructiva, del aminoácido ("chemical quenching" o apagamiento químico) (Michaeli and Feitelson, 1994). Cada aminoácido presenta una mayor o menor tasa de reacción, siendo el mejor la histidina y el menos reactivo, la tirosina.

## **Los radicales libres como segundos mensajeros**

Las células eucariotes no sólo se protegen a sí mismas del estrés oxidativo, sino que además han desarrollado la habilidad de controlar la síntesis de especies reactivas de oxígeno. Estos radicales además se

utilizan como segundos mensajeros para activar la transcripción de factores como:

1) *HAP1* y *HAP2/3/4* (regulados por hemo) que a su vez, inducen la transcripción de la catalasa citosólica, así como la de la superóxido dismutasa mitocondrial (*SOD2*) dependiente de Mn ( Zitomer and Lowry, 1992).

2) *yAP1/yAP2*, los cuales regulan la expresión de los genes que codifican para la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa y la glucosa 6- fosfato deshidrogenasa (Kuge and Jones, 1994).

3) *Mac1* que se requiere para la transcripción inducida por peróxido del gen de catalasa citosólica ( Jungmann *et al.*, 1993).

4) *NF- $\kappa$ B* que activa la transcripción de genes que forman parte de la red primaria de defensa contra condiciones patológicas (citocinas y sus receptores, factores de crecimiento y moléculas de adhesión).

## **ANTECEDENTES**

Datos previos obtenidos en el laboratorio de la Dra. González mostraron que algunas cepas carentes de glutaminasa B eran incapaces de crecer y perdían viabilidad cuando se cultivaban en agitación en un medio con glutamina como única fuente de nitrógeno, tanto a 30° como a 35° C. Al analizarlas fisiológicamente se encontró que en la mutante CN10 la pérdida de viabilidad no ocurría, si las células se cultivaban en glutamina en presencia de: a) un antioxidante como el  $\beta$ -mercaptoetanol o b) de tirosina en el medio. También se observó que esta mutante podía crecer en condiciones de microaerofilia, en medio con glutamina a 30° ó 35° C.

Al complementar la cepa CN10 con un banco genómico de levadura se obtuvo un plásmido (pL5), con el cual la cepa CN10 recuperaba su capacidad de crecer en aerobiosis en un medio de cultivo con glutamina como única fuente de nitrógeno a 30°C y 35°C. Al subclonar, secuenciar y comparar el inserto del plásmido pL5 en un banco de datos, se encontró que la secuencia correspondía a la del gen *TYR1*, que codifica para la

prefenato deshidrogenasa (PFD), enzima involucrada en la vía de biosíntesis de tirosina (fig.1) (Mannhaupt *et al.*, 1989).

La tirosina en *S.cerevisiae* se sintetiza partiendo del ácido prefénico, intermediario común en las vías de biosíntesis de fenilalanina y tirosina, por medio de las enzimas prefenato deshidrogenasa, que cataliza la formación de p-hidroxifenilpiruvato; y la tirosina aminotransferasa, que cataliza la formación de tirosina a partir del p-hidroxifenilpiruvato (fig. 1).



Figura 1. Vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos

La mutante CN10, al poseer una actividad baja pero detectable de la enzima PFD, era entonces una auxótrofa parcial de tirosina, ya que podía crecer en microaerofilia en ausencia de este aminoácido. Estos datos sugerían que la tirosina podría tener un papel al evitar la muerte de las células dado el posible estrés oxidativo al que se someten cuando se cultivaban en agitación (250 rpm) y temperatura (35° C) (Lupo *et al.*, en preparación).

Para analizar si el fenotipo que tiene una mutante se debe a la presencia de una sola mutación, se realiza un análisis de segregación de tétradas. Dado que la CN10 es una cepa estéril y que esta característica no se remedia en ninguna de las condiciones mencionadas anteriormente, este estudio no pudo llevarse a cabo. Fue necesario obtener una nueva mutante que fuera fértil para tratar de saber, si la sensibilidad a aeración y temperatura, acompañada de la pérdida de viabilidad eran el resultado de una simple auxotrofia parcial por tirosina o si había más genes implicados.

A partir de una mutante auxótrofa de tirosina (afectada en el gen de la pterinato deshidrogenasa), obtenida del Stock Center, se realizó una mutagénesis química con etilmetanosulfonato (EMS). Se obtuvieron 17

revertantes protótrofas inducidas con EMS y 70 revertantes protótrofas espontáneas capaces de crecer en medio sin tirosina (Figuroa, 1997).

Se ha reportado que las mutantes de *S. cerevisiae* afectadas en el gen de *TYR1* son sensibles al análogo 3-amino-L-tirosina (3AT), además de que presentan una poza de fenilalanina elevada mientras que la de tirosina es baja, debido a un bloqueo parcial en la vía de biosíntesis de este aminoácido. El fundamento de esta prueba consiste en que si la cepa problema está sintetizando una cantidad baja de tirosina, el análogo añadido al medio de cultivo a concentración de 1mg/ml, compite con la tirosina sintetizada endógenamente y es incorporado en las proteínas impidiendo el crecimiento de la cepa, haciéndola por tanto sensible al análogo. En las cepas protótrofas de tirosina, el proceso es semejante: ganando la competencia la tirosina sintetizada endógenamente, que permite el crecimiento de la cepa (Fukuda *et al.*, 1991).

De las 17 revertantes inducidas con EMS, solamente 7 fueron sensibles al análogo 3AT. Se eligieron las primeras cinco revertantes (R1-R5) y se les midió la actividad de la enzima PFD así como las pozas intracelulares de fenilalanina y tirosina (Tabla 1). Las cinco revertantes

presentaban una biosíntesis de tirosina disminuída comparada con una cepa silvestre (MC3) (Figuroa, 1997). De estas revertantes se escogió la cepa R3 para su posterior caracterización fisiológica, ya que presentaba una actividad de PFD similar a la encontrada en la CN10.

**Tabla 1.** Actividad de PFD, pozas de aminoácidos aromáticos y sensibilidad/resistencia a 3AT en cepas revertantes y una silvestre. (Tomado de Figuroa, C A; 1997).

CEPA	PFD <sup>a</sup>	Phe <sup>b</sup>	Tyr <sup>b</sup>	S/R 3AT <sup>c</sup>
R1	0.40	7.37	0.00	S
R2	2.00	2.51	0.27	R
R3	0.15	12.54	0.00	S
R4	2.50	3.05	0.27	R
R5	0.45	7.34	0.00	S
MC3	4.35	0.28	1.16	R
CN10	0.15	nd <sup>d</sup>	nd	nd

a. actividad específica en nmoles de 4-hidroxifenil pirúvico formado/min/mg de proteína.

b.  $\mu$ moles/mg de proteína.

c. S=sensible y R=resistente a 3AT.

d. nd=no determinado.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**CEPAS:** En la tabla 2 se muestran las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron en este trabajo.

**Tabla 2.** Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
CN 10	Glutaminasa B <sup>-</sup> <i>tyr1</i> <sup>±</sup>	Soberón, et al; 1986
R1	<i>TYR1</i> <sup>+</sup> <i>ura3</i> <sup>-</sup>	Figueroa, C A; 1997
R2	<i>TYR1</i> <sup>+</sup> <i>ura3</i> <sup>-</sup>	Figueroa, C A; 1997
R3	<i>MATα TYR1</i> <sup>±</sup> <i>ura3</i> <sup>-</sup>	Figueroa, C A; 1997
R5	<i>TYR1</i> <sup>+</sup> <i>ura3</i> <sup>-</sup>	Figueroa, C A; 1997
101A	<i>TYR1</i> <sup>+</sup> <i>INOS</i> <sup>+</sup> <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Figueroa, C A; 1997
101B	<i>TYR1</i> <sup>+</sup> <i>inos</i> <sup>-</sup> <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Figueroa, C A; 1997
101C	<i>tyr1</i> <sup>±</sup> <i>INOS</i> <sup>+</sup> <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Figueroa, C A; 1997
101D	<i>tyr1</i> <sup>±</sup> <i>inos</i> <sup>-</sup> <i>URA3</i> <sup>+</sup>	Figueroa, C A; 1997
R3/pL5	<i>TYR1</i> <sup>+</sup> <i>ura3</i> <sup>-</sup>	Lupo, S; en preparación
LA1	<i>ura3</i> <sup>-</sup>	Alba, L.A; 1995

## **Medios de crecimiento.**

**MEDIO RICO (YPD):** se preparó según la fórmula de Difco Yeast Base con extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2%, dextrosa 2%. Este medio se utilizó para el crecimiento de precultivos. Para medio sólido, se añadió agar al 2%. Se esterilizó en autoclave (120°C, 1.5 atm, 20 min).

**MEDIO MINIMO (MM):** se preparó con sales, vitaminas y elementos traza, según la fórmula de Difco Yeast Base. Se utilizó dextrosa al 2% como fuente de carbono y sulfato de amonio 40 mM como fuente de nitrógeno. Se esterilizó en autoclave.

**MEDIO SIN NITRÓGENO (SNGIn):** se preparó de la misma forma que el medio mínimo, pero sin agregar sulfato de amonio. Se esterilizó en autoclave y se añadió glutamina como única fuente de nitrógeno a una concentración de 1mg/ml. La glutamina se esterilizó por filtración (Micropore, 0.22 $\mu$ ) y se adicionó después de autoclaveado el medio.

**MEDIO SIN NITRÓGENO + URACILO (Sngln+ura):** medio sin nitrógeno más uracilo a una concentración de 20µg/ml. Se esterilizó en autoclave.

**MEDIO SIN NITRÓGENO + TIROSINA (Sngln+tyr):** medio mínimo más tirosina a una concentración de 30µg/ml. Se esterilizó en autoclave.

**MEDIO SIN NITRÓGENO + INOSITOL (Sngln+inos):** medio mínimo más inositol a concentración de 20µg/ml. Se esterilizó en autoclave.

**MEDIO SIN NITRÓGENO + URACILO + INOSITOL + TIROSINA (Sngln+ura+ inos+tyr):** medio mínimo más los compuestos mencionados a las concentraciones arriba señaladas. Se esterilizó en autoclave.

### **Condiciones de cultivo.**

**CULTIVOS LIQUIDOS EN AGITACIÓN:** todas las cepas usadas para las curvas de crecimiento se pre-cultivaron en medio YPD en matraces de 250ml, con 50ml de medio de cultivo (relación medio/aire de 1/5). Los pre-

cultivos se incubaron a 30°C/250rpm y se colectaron cuando alcanzaron una absorbancia de 0.8 a 600nm. Las células se lavaron 2 veces con agua bidestilada estéril y se inocularon en los medios de crecimiento para cada experimento, con relaciones de medio/aire de 1/5, a una absorbancia de entre 0.03 y 0.05 a 600nm. Los cultivos agitados se incubaron a 250rpm y la temperatura según el caso fué 30°C, 35°C ó 37°C. El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia del cultivo a una longitud de onda de 600 nm.

**CULTIVOS LÍQUIDOS EN MICROAEROFILIA:** se hizo un pre-cultivo de cada cepa en YPD, de la misma forma que en los cultivos agitados. Se inoculó un matraz con 200 ml de medio a una absorbancia de entre 0.03 y 0,05 a 600nm. El medio se repartió en 10 tubos de ensayo con capacidad de 20 ml con tapa de rosca, los cuales se llenaron hasta dos centímetros por debajo de su capacidad total. Los tubos se pusieron a incubar en gradillas a la temperatura que requería el experimento. Para cada punto en la curva de crecimiento se tomó uno de los tubos, se agitó por inversión para homogenizar el cultivo y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

## **Viabilidad.**

Se inoculó un cultivo líquido de la misma forma que para el caso de los cultivos en agitación. Para cada punto de la gráfica se tomaron 100µl del cultivo, los cuales se diluyeron en un tubo eppendorf que contenía 900µl de agua bidestilada estéril (dilución  $10^{-1}$ ). Se agitó la dilución  $10^{-1}$  por medio de un Vortex y se tomaron 100µl, los cuales se diluyeron nuevamente en 900µl de agua bidestilada (dilución  $10^{-2}$ ). Se agitó la dilución  $10^{-2}$  y se tomaron 100µl, los cuales se diluyeron en 900µl de agua estéril para realizar la última dilución ( $10^{-3}$ ). De esta última dilución ( $10^{-3}$ ), se tomaron 100µl para plaquearlos en cajas de petri que contenían YPD sólido. Las cajas se incubaron a 30°C durante tres días. Se contó el número de colonias por caja y se obtuvo, para cada uno de los puntos, el porcentaje de colonias viables comparadas con las colonias del tiempo inicial. Cada punto de la curva es el promedio de colonias viables de cinco cajas.

## **OBJETIVO**

Los datos obtenidos del análisis fisiológico de la cepa mutante CN10 (auxótrofa parcial de tirosina), en donde el fenotipo de sensibilidad a oxígeno/temperatura y pérdida de viabilidad podía ser revertido mediante la introducción de un gen *TYR1* silvestre, sugerían que la tirosina pudiese jugar algún papel en contra de un posible estrés oxidativo y calórico.

El objetivo de este trabajo fue estudiar ese posible efecto de la tirosina en una mutante que posee una síntesis disminuída de este aminoácido en *Saccharomyces cerevisiae*.

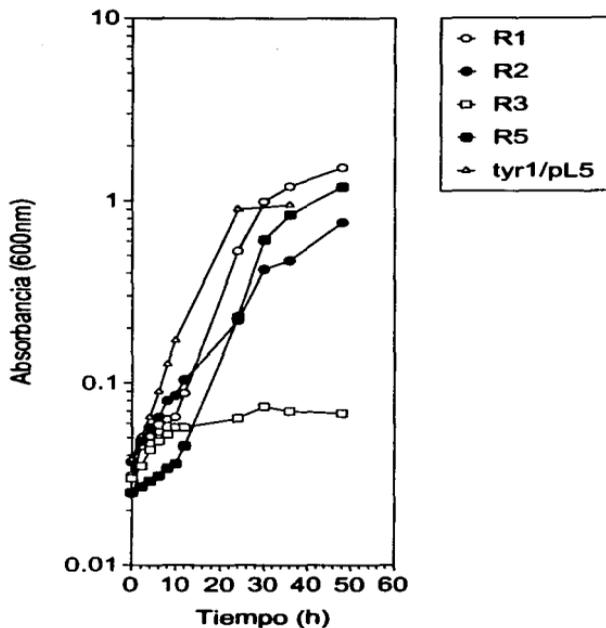
## **RESULTADOS**

### **Caracterización fisiológica de la cepa R3.**

El análisis fisiológico realizado a la cepa CN10 sugirió que la tirosina pudiera tener un papel en la protección contra el daño causado cuando las células se incubaban en presencia de oxígeno (agitación a 250 rpm) y alta temperatura (35°C). La suposición de que el fenotipo de la CN10 pudiera estar relacionado con una situación de estrés oxidativo, se fundamenta en dos observaciones: 1) la adición de antioxidantes al medio de cultivo evitaba la pérdida de viabilidad y 2) el que la cepa creciera en condiciones de microaerofilia.

Dado que la CN10 es una cepa estéril, no se pudo determinar si la sensibilidad a aeración y temperatura, así como la pérdida de viabilidad, eran el resultado de una simple auxotrofia parcial por tirosina o si había más genes implicados. Fue necesario partir de una nueva mutante que fuera fértil y que además conservara una síntesis disminuida de tirosina.

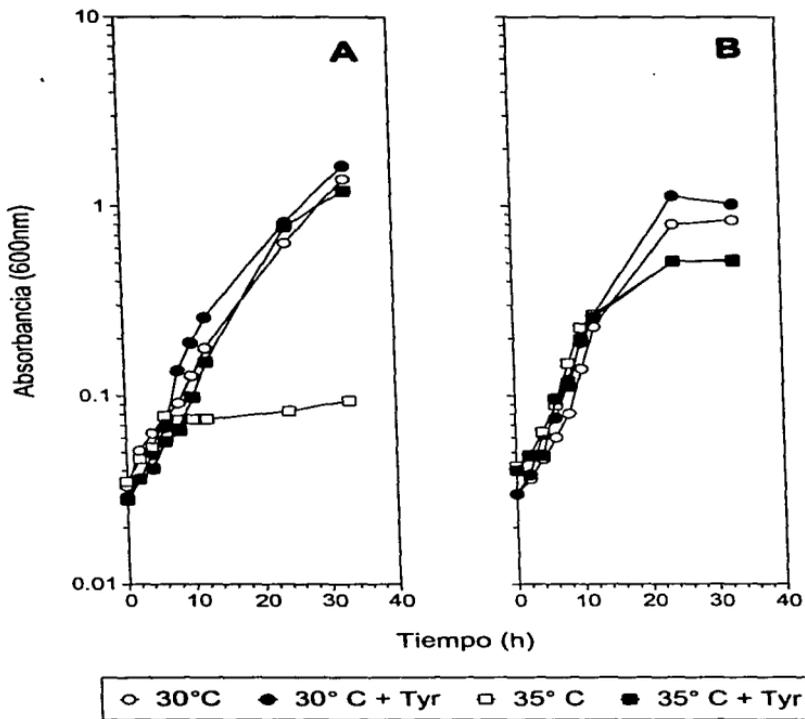
De las revertantes R1, R2, R3 y R5, que tenían una biosíntesis de tirosina disminuída, se escogió a la cepa R3 para su posterior caracterización fisiológica con base en que la actividad de PFD era muy baja y similar a la encontrada en la CN10, además de ser la única que conservaba el fenotipo de no crecimiento en SNGln a 35°C (fig 2).



**Figura 2.** Curva de crecimiento de las revertantes espontáneas (R1, R2, R3 y R5) y de una cepa *tyr1'* complementada con el plásmido pL5. Todas las cepas se incubaron en MM en agitación (250rpm) y a 35°C.

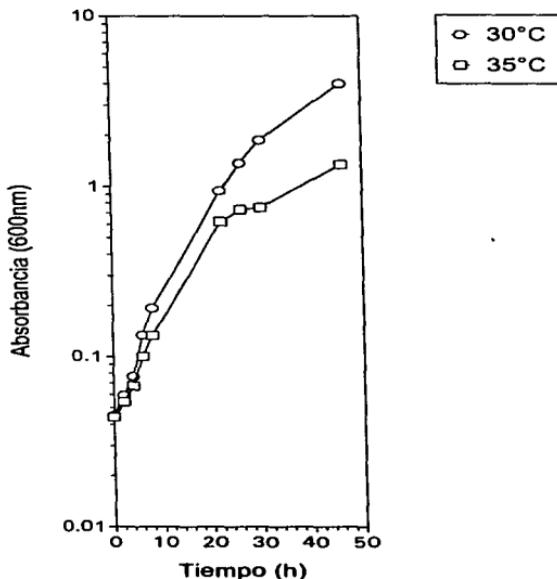
Los resultados del análisis fisiológico de la cepa R3, demostraron que ésta era capaz de crecer a 30°C, pero no a 35°C en agitación a 250 rpm (fig 3A), en medio con glutamina como única fuente de nitrógeno (SNGln). Sin embargo, si se adicionaba tirosina al medio de cultivo a la misma concentración utilizada para revertir el fenotipo de la cepa CN10 incubada a 35°C (30µg/ml), la cepa recuperaba la capacidad de crecer a 35°C. A 30°C, la R3 crecía de la misma forma en ausencia o en presencia de tirosina (fig. 3A).

Se observó también que en condiciones de microaerofilia (SNGln) a 35°C, la cepa R3 era capaz de crecer, tanto en presencia como en ausencia de tirosina (fig. 3B). Estos datos sugerían que la cepa R3 era sensible a temperatura y oxigenación.



**Figura 3.** Curva de crecimiento de la cepa R3 en SNGIn en A) agitación (250rpm) y B) microaerofilia a 30°C y 35°C, con y sin tirosina (30µg/ml).

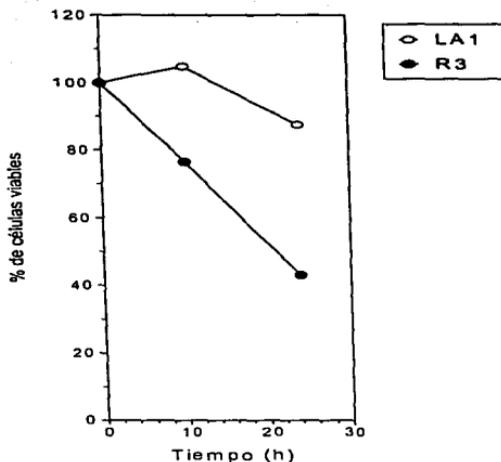
La capacidad de crecer a 35°C en agitación (SNGln) también se recuperó al transformar a la cepa R3 con el plásmido pL5, que contiene el gen *TYR1* silvestre (fig. 4).



**Figura 4.** Curva de crecimiento de la cepa R3 complementada con el plásmido pL5. La cepa se incubó en SNGln en agitación (250rpm), a 30°C y 35°C, con y sin tirosina (30µg/ml).

Con estos resultados se confirmó que la presencia de tirosina en el medio o la introducción del gen de *TYR1*, le permite a la cepa R3 crecer en condiciones variables de oxígeno-temperatura.

Se probó la viabilidad de la cepa R3 en medio de cultivo SNGln en agitación a 35°C, condiciones en que generalmente no crecía. Se encontró que había una disminución importante de la viabilidad; ya que a las 24 hrs, sólo el 43% de las células sobrevivían, comparada con la cepa silvestre LA1 donde al mismo tiempo el 87% de las células se encontraban viables (fig 5).



**Figura 5.** Viabilidad de las cepas R3 y LA1, expresada como porcentaje de células viables a las 10 y 24 h. Se incubaron en SNGln en condiciones de agitación a 35°C.

Los datos anteriores indicaban que una biosíntesis disminuida de tirosina daba lugar a una alteración en la capacidad de la levadura para contener contra el oxígeno en cultivos agitados a una temperatura de 35°C.

Paralelamente Figueroa (1997) demostró, por medio del análisis genético de varias tétradas provenientes de la cruce entre la mutante R3 y una cepa silvestre (MC3), que el fenotipo de sensibilidad a oxígeno-temperatura se debía a la presencia de dos mutaciones, las cuales segregaron independientemente. Una de ellas afectó el gen de *TYR1*, lo que hace a la cepa una auxótrofa parcial de tirosina; mientras que se desconoce que gen fue afectado por la segunda mutación.

La auxotrofia parcial por tirosina podía demostrarse por medio del ensayo de sensibilidad / resistencia a 3AT referido anteriormente. Las cepas con la mutación en el segundo gen al que se denominó SO, eran sensibles a oxígeno y temperatura. El fenotipo expresado por este segundo gen podía ser monitoreado por medio de curvas de crecimiento en agitación a 30°C y 35°C.

Para tratar de entender la contribución de los genes al fenotipo de sensibilidad a oxígeno-temperatura que se debía a la auxotrofia parcial por tirosina y a la presencia de la segunda mutación, decidimos caracterizar fisiológicamente una de las tétradas proveniente de la cruce arriba mencionada (tétrada 101). Esta tétrada presentaba todas las

combinaciones posibles entre los dos genes; es decir, de las cuatro esporas que la formaban, dos de ellas poseían el fenotipo de cada uno de los padres y las dos restantes eran las combinaciones nuevas (tabla 3).

**Tabla 3.** Fenotipos de los componentes de la tétrada 101, así como el de sus progenitores.

CEPA	TYR1	SO (2° GEN)
101 A	+	+
101 B	+	-
101 C	±	+
101 D	±	-
R3	±	-
MC3	+	+

A continuación, se describen las características de crecimiento en SNGln y viabilidad de las esporas provenientes de la tétrada 101, en condiciones de agitación y microaerofilia a 30°C, 35°C y 37°C; así como su respuesta a la adición de tirosina al medio de cultivo.

## **CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LA TÉTRADA 101.**

### **ESPORA A, FENOTIPO TYR1<sup>+</sup>, SO<sup>+</sup> (+,+).**

En esta espora los dos genes se encontraban en su forma silvestre, lo cual claramente se reflejó en el crecimiento a las diferentes temperaturas. Como se puede observar en la figura 6, la espora en condiciones de agitación en medio SNGln a 30°C, 35°C y 37°C creció bien y no presentaba diferencias en el tiempo de duplicación a las distintas temperaturas (tabla 4). En condiciones de microaerofilia (fig. 7) la espora 101 A, a las mismas

temperaturas, se encontraron los mismos resultados que en agitación (tabla 5).

Al añadir tirosina al medio de cultivo, la espora no mostró diferencias en crecimiento al compararla en medio sin tirosina, a las mismas temperaturas, tanto en condiciones de aeración (tabla 4 y fig. 6) como en microaerofilia (tabla 5 y fig. 7).

### **ESPORA B, FENOTIPO *TYR1*<sup>+</sup>, *so*<sup>-</sup> (+,-).**

En esta espora el gen de *TYR1* se encontraba en su forma silvestre y el gen *SO* en su forma mutada. Como se puede observar en la figura 6, la espora en condiciones de agitación creció a 30°C y 35°C, pero no a 37°C. Si se comparan los tiempos de duplicación a 30°C y 35°C de la cepa (+,-) con los de la (+,+), se observa que hay un ligero aumento de alrededor de 1.5 horas. Este aumento en el tiempo de duplicación se debió principalmente a su característica *so*<sup>-</sup> (tabla 4). La cepa en agitación a 37°C aunque era incapaz de crecer, no perdió viabilidad (fig. 8). En

microaerofilia la espora creció sin diferencias importantes en las tres temperaturas analizadas (fig. 7 y tabla 4).

El añadir tirosina al medio de cultivo en condiciones de agitación no tuvo ningún efecto (fig. 6) a 30 y 35°C; sin embargo, para el caso de 37°C, la tirosina fue incapaz de revertir la ausencia de crecimiento de la espora. A 30°C y 35°C no se observó una diferencia en los tiempos de duplicación (tabla 4).

En microaerofilia para todas las temperaturas analizadas, se observó un aumento en el tiempo de duplicación comparado con el que se presentaba cuando la espora se cultivó en ausencia de tirosina (tabla 5).

### **ESPORA C, FENOTIPO $tyr^{\pm}$ , $SO^+$ ( $\pm$ ,+).**

En esta espora el gen de *TYR1* se encontraba en su forma mutante ( $tyr1^{\pm}$ ) y el gen *SO* en su forma silvestre. Como se puede observar en la figura 6, la espora 101 C creció en condiciones de agitación a las tres temperaturas

analizadas, aunque conforme aumentaba la temperatura se observó un aumento en el tiempo de duplicación (tabla 4). En microaerofilia la espora creció bien (fig. 7), sin diferencias importantes en los tiempos de duplicación en las tres temperaturas analizadas (tabla 5).

El añadir tirosina al medio de cultivo en condiciones de agitación o de microaerofilia no tuvo ningún efecto (figs. 6 y 7), lo cual se ve reflejado en los tiempos de duplicación para cada temperatura (tablas 4 y 5).

### **ESPORA D, FENOTIPO $tyr^+$ , $so^-$ ( $\pm$ , -).**

Esta espora tenía presentes las dos mutaciones  $tyr^+$ ,  $so^-$  y como se observa en la figura 6, sólo era capaz de crecer en agitación a 30°C. Se realizó la prueba de viabilidad para esta espora y se encontró que a las 24h a 37°C sobrevivieron el 46% de las células (fig. 8). Esta espora a diferencia de la (+,-) no creció a 37°C y perdió viabilidad.

Para evitar la pérdida de viabilidad de la cepa 101 D se adicionó al medio de cultivo un antioxidante ( $\beta$ -mercaptoetanol), a las concentraciones en las cuales se había observado un efecto protector para la cepa CN10 (50, 25 y 10mM). En todas las concentraciones probadas, al parecer el antioxidante no funcionó, dado que la cepa perdió viabilidad. En microaerofilia, la espora creció como el resto de los componentes de la tétrada (fig. 7), sin diferencias en los tiempos de duplicación a 30°C y 35°C, pero observándose un ligero aumento en el tiempo de duplicación de 1.5 horas a 37°C (tabla 5).

Al añadir tirosina al medio de cultivo en condiciones de agitación, se observó que a 35°C la espora era capaz de crecer, más no a 37°C (tabla 4 y fig. 6). En microaerofilia tampoco se observó un efecto al añadirse tirosina al medio (tabla 5 y fig. 7).

**TABLA 4. AGITACIÓN.** Tiempos de duplicación (expresados en horas) de los componentes de la tétrada 101. Las cepas se cultivaron en SNGln en condiciones de agitación a 30°C, 35°C y 37°C, con y sin tirosina (30µg/ml).

CEPA	30°C <sup>a</sup>	30°C + tyr <sup>a</sup>	35°C <sup>a</sup>	35°C + tyr <sup>a</sup>	37°C <sup>a</sup>	37°C+ tyr <sup>a</sup>
A (+,+)	3	3	3	3	4	3.5
B (+,-)	4.5	4.5	5	5	nd	nd
C (±,+)	3	3	4.5	4.5	8	7
D (±,-)	7.5	5.5	nd	6.5	nd	nd

nd= no detectable

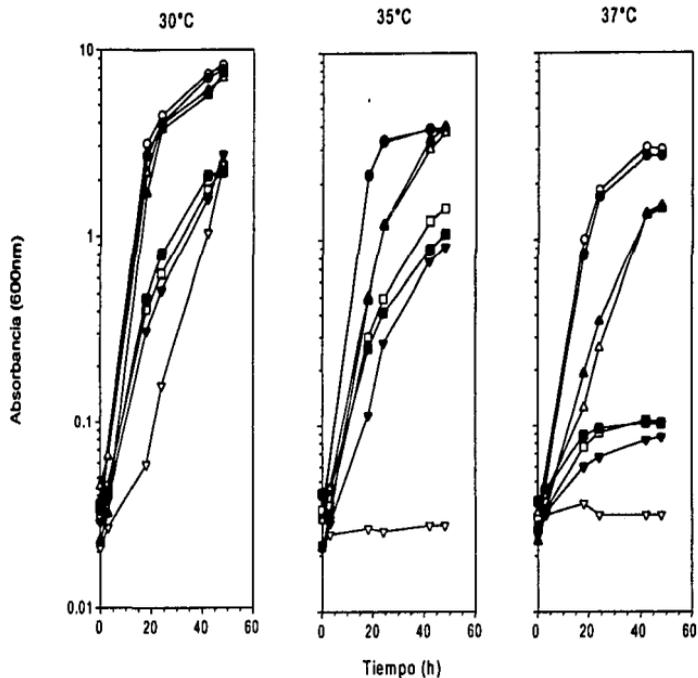
a= tiempos de duplicación expresados en horas

**TABLA 5. MICROAEROFILIA.** Tiempos de duplicación (expresados en horas) de los componentes de la tétrada 101. Las cepas se cultivaron en SNGln en condiciones de microaerofilia a 30°C, 35°C y 37°C, con y sin tirosina (30µg/ml).

CEPA	30°C <sup>a</sup>	30°C + tyr <sup>a</sup>	35°C <sup>a</sup>	35°C + tyr <sup>a</sup>	37°C <sup>a</sup>	37°C+ tyr <sup>a</sup>
A (+,+)	4	4	4	4	4	5
B (+,-)	5.5	7.5	6	7	6	8.5
C (±,+)	5	5	5	5	6	7
D (±,-)	4.5	4.5	4.5	4.5	6	6

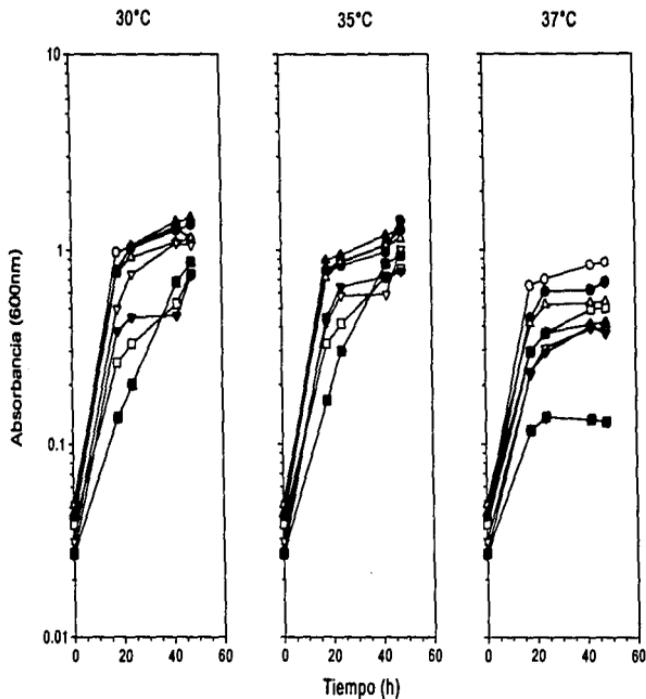
nd= no detectable

a= tiempos de duplicación expresados en horas



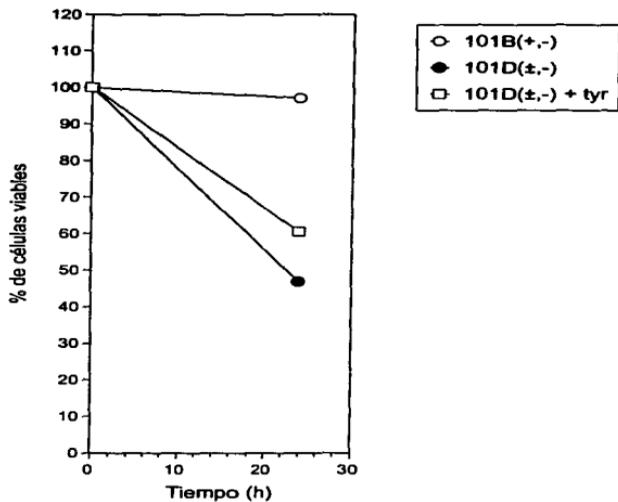
○ A(+,+), ● A(+,+)+ tyr, □ B(+,-), ■ B(+,-)+ tyr, △ C(+,+), ▲ C(+,+)+ tyr, ▽ D(+,-), ▼ D(+,-)+ tyr

**Figura 6.** Curva de crecimiento de las esporas de la tétada 101 en condiciones. de agitación. Se cultivaron en SNGln a 30°C, 35°C y 37°C, con y sin tirosina (30µg/ml).



○ A(+,+) ● A(+,+)+tyr □ B(+,-) ■ B(+,-)+tyr ◇ C(±,+) ▲ C(±,+)+tyr ▼ D(±,-) ▽ D(±,-)+tyr

**Figura 7.** Curva de crecimiento de las esporas de la tétada 101 en condiciones de microaerofilia. Se cultivaron en SNGln a 30°C, 35°C y 37°C, con y sin tirosina (30µg/ml).



**Figura 8.** Viabilidad de las cepas 101B (+,-) y 101D (±,-), expresada como porcentaje de células viables a las 22 h. Se incubaron en SNGln en condiciones de agitación a 37°C.

El análisis fisiológico de cada uno de los componentes del tetratipo, permitió confirmar que el fenotipo que presentaba la cepa R3 se debía a la presencia de dos mutaciones y además saber que:

1) La espora que presentaba los genes *TYR1* y *SO* en su versión silvestre, fué capaz de crecer en todas las condiciones, comportándose de manera similar a su progenitor silvestre (MC3).

2) La sola mutación en el gen de *TYR1* aunque daba lugar a un ligero aumento en el tiempo de duplicación, comparado con el tiempo de duplicación de una cepa (+,+), resultaba en una sensibilidad a oxígeno-temperatura.

3) La sola mutación en el gen *SO* daba como resultado una disminución en el crecimiento a 35°C y su ausencia a 37°C, en comparación con el observado a 30°C. Aunque a 37°C no hubo crecimiento, tampoco se observó pérdida de viabilidad (fig. 8).

4) La presencia simultánea de las mutaciones en el gen *TYR1* y en el gen *SO* resultaban en pérdida de viabilidad (fig. 8), además de

sensibilidad a la agitación y a la temperatura. Esta doble mutante perdía viabilidad cuando se incubaba en glutamina como única fuente de nitrógeno, tanto a 35°C como a 37°. Sólo en el primer caso, se recuperaba el crecimiento cuando se le agregaba tirosina al medio, mientras que en el segundo, no hubo crecimiento pero tampoco hubo pérdida de viabilidad en presencia de tirosina. La cepa tampoco perdía viabilidad cuando se cultivaba a 35°C o 37°C en condiciones de microaerofilia.

## DISCUSIÓN

La obtención de revertantes (Figuroa, 1997) a partir de una cepa auxótrofa de tirosina, permitió obtener a su vez una serie de cepas que presentaban una biosíntesis disminuída de este aminoácido comparadas con la cepa silvestre. De estas revertantes, sólo se trabajó con la cepa R3, la cual presentaba la menor actividad de PFD, y que además era sensible a oxígeno-temperatura como la cepa CN10. Las demás revertantes podían crecer en condiciones bajo las cuales a la R3 no le era posible, lo que sugeriría que solamente la R3 presentaba la combinación de dos mutaciones, responsables de la sensibilidad a oxígeno-temperatura. Si se realizara el análisis fisiológico a las demás revertantes, aún cuando éstas presentaran una biosíntesis disminuída de tirosina, deberían tener sólo la mutación en el gen de *TYR1*, de forma similar a la espora 101C. Es interesante resaltar que la cepa R3 aunque fue obtenida de una forma totalmente independiente de la CN10 y con un método de selección diferente, comparte ciertas características fenotípicas con la misma; el mecanismo por el cual se da este parecido es algo que todavía no se puede explicar.

La caracterización fisiológica de la cepa R3, así como el análisis fisiológico y de segregación, llevado a cabo con las esporas de la tétrada 101, permitió determinar que el fenotipo de sensibilidad a oxígeno-temperatura se debía a la presencia de dos mutaciones que segregan de manera independiente. A 35°C, la mutación en el gen de *TYR1* resultaba en una ligera sensibilidad a oxígeno-temperatura que no se evitaba al agregar tirosina al medio. La mutación en el gen *SO*, daba lugar a una disminución en el crecimiento, sin pérdida de viabilidad. La presencia simultánea de las mutaciones en el gen *TYR1* y en el gen *SO* resultaba en pérdida de viabilidad, además de sensibilidad a oxígeno-temperatura. La pérdida de viabilidad se evitaba con la adición de tirosina al medio o cuando la doble mutante se cultivaba en condiciones de microaerofilia.

Se debe notar que en una cepa doble mutante, la ausencia del gen *TYR1* en su versión silvestre, es fundamental para la pérdida de la viabilidad. A 37°C, solamente cuando este gen estaba afectado y se daba la segunda mutación, las cepas además de ser sensibles a oxígeno-temperatura, perdieron viabilidad y no fue posible revertir el fenotipo, añadiendo tirosina al medio. Tampoco la cepa que presentaba el gen de

**TYR1** en su versión silvestre y el gen **SO** mutado fue capaz de crecer a 37°C, pero no perdió viabilidad. Este resultado confirma la importancia que tiene **TYR1** en la viabilidad de la cepa bajo condiciones de estrés calórico, aunque falta precisar de que manera están relacionados.

La temperatura de 35°C puede considerarse como de estrés calórico, pues se sabe que las proteínas de choque térmico se sintetizan tanto *in vivo* como *in vitro* cuando se exponen las células a temperaturas entre 5-20°C (Courgeon *et al.*, 1988) por encima de su temperatura de crecimiento óptima (30°C). Wieser y colaboradores (Wieser *et al.*, 1991) consideran incluso 30°C para *S. cerevisiae* como estrés calórico mínimo y 37°C como un choque térmico suave. La tirosina sólo fue capaz de revertir el fenotipo a 35°C, lo que podría sugerir un papel preventivo. Posiblemente el choque calórico a 37°C junto con la presencia de oxígeno resulten en un daño severo que la tirosina no puede prevenir.

El papel que juega la tirosina en la reversión del fenotipo de ausencia de crecimiento en condiciones de oxigenación podría proponerse como un nuevo mecanismo, no enzimático y de prevención, que actuaría a

nivel basal, pues la oxigenación a la que fue sometida la cepa R3 no fue mayor que a la que se someten rutinariamente los cultivos de otras cepas de *S.cerevisiae* y operaría en un momento en donde probablemente los demás mecanismos aún no han entrado en acción.

Por otro lado, la sensibilidad a temperatura mostrada por la cepa R3 en conjunción con la sensibilidad a oxigenación no es sorprendente, pues se ha demostrado que las respuestas a diversos tipos de estrés se sobrelapan (Farr and Kogoma, 1991; Wieser *et al.*, 1991). Por ejemplo, en células de *Drosophila* se ha encontrado que el peróxido de hidrógeno induce algunas proteínas de choque térmico (heat shock proteins) y actina (Courgeon *et al.*, 1988). En fibroblastos humanos, el estrés oxidativo y el calórico inducen la transcripción de un gen que codifica para una fosfatasa de tirosina, lo cual es de gran trascendencia pues la fosforilación y la desfosforilación de residuos de tirosina es un proceso central en la regulación del crecimiento, la diferenciación y la oncogénesis (Keyse and Emslie, 1992). En *S.cerevisiae* el gen que codifica para la catalasa T citosólica, es inducido por estrés calorico y nutritivo (Wieser *et al.*, 1991).

También se ha propuesto que el estrés oxidativo juega un papel importante en el efecto letal que tiene el estrés calórico en eucariotes, ya que los cultivos de mutantes que presentan defectos en los sistemas antioxidantes primordiales (catalasas, superóxido dismutasas, citocromo c peroxidases) son más sensibles a la pérdida de viabilidad por choque de calor letal que la cepa silvestre, y en contraste, la sobreexpresión de estas enzimas, así como el crecimiento en anaerobiosis hace varios órdenes de magnitud más resistentes a las cepas mutantes contra el choque de calor letal. Se propone que el efecto letal del aumento en la temperatura es causado por una condición de estrés oxidativo (Davidson *et al.*, 1996). Lo anterior concuerda en cierto modo con los resultados obtenidos en microaerofilia, donde las cepas crecieron sin problemas bajo estrés calórico. Ante este panorama, la importancia de la tirosina como agente protector se incrementaría, pues se hace evidente que podría influir en la protección contra distintos tipos de estrés.

Aunque se desconoce cual es el producto del gen *SO* y por lo tanto su posible interacción con la tirosina, resulta interesante plantearse algunas posibilidades:

1) Tal vez la mutación se encuentre en el gen que codifica para la hsp104, ya que estudios previos sobre las proteínas de choque térmico, en especial aquéllas que pertenecen a la familia de las hsp100, han demostrado que éstas son importantes para el establecimiento de los niveles de termotolerancia, así como para la sobrevivencia a temperaturas un poco por encima de lo normal hasta temperaturas cercanas a la letal (Sanchez *et al.*, 1992).

2) Otra posibilidad podría ser que la segunda mutación se encontrara en el gen *TRX2* el cual codifica para una de las dos tioredoxinas presentes en la levadura. Como se mencionó anteriormente se ha observado, por lo menos con la proteína de humano, que la tioredoxina podría funcionar como atrapadora de radicales, así como proteína de reparación de algún daño causado por el estrés oxidativo sobre otras proteínas. La tioredoxina podría actuar de manera catalítica como una oxidoreductasa y por lo tanto, regenerar a las enzimas que fueron dañadas por la oxidación de sus residuos de cisteínas. Bajo este contexto, el resultado de una mayor pérdida de viabilidad cuando se adicionó el antioxidante podría adquirir significado. El  $\beta$ -mercaptoetanol además de

funcionar como un antioxidante, también funciona como un agente desnaturalizante ya que es capaz de romper los enlaces disulfuro contenidos en las proteínas. Resultaría probable que este agente estuviera reaccionando con la tioredoxina impidiendo de esta forma que desarrollara sus funciones. El papel de la tirosina en esta propuesta también resulta difícil de explicar.

Solamente conociendo la identidad del gen *SO* se podrá evaluar una posible función de la tirosina y se intentará establecer la relación entre estos dos genes.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## CONCLUSIONES

El análisis fisiológico de la cepa R3 portadora de dos mutaciones (*tyr1<sup>±</sup>*, *so<sup>-</sup>*), nos permitió llegar a las siguientes conclusiones:

1) La mutación en el gen de *TYR1* da como resultado una baja sensibilidad a la agitación y a la temperatura, que no se previene al agregar tirosina.

2) La mutación en el gen *SO* que junto con el gen *TYR1* confiere sensibilidad a la agitación y a la temperatura, da como resultado una disminución en el tiempo de duplicación pero sin pérdida de viabilidad.

3) La presencia simultánea de las mutaciones en *TYR1* y en el gen *SO* resulta en una pérdida de viabilidad, además de un aumento en la sensibilidad a la agitación y a la temperatura. Esta doble mutante pierde viabilidad cuando se incuba con glutamina como única fuente de nitrógeno, pero se recupera al agregar tirosina al medio o al cultivarla en condiciones de microaerofilia.

4) El papel de la tirosina en el fenómeno de sensibilidad a oxígeno-temperatura sólo se podrá determinar cuando se conozca la identidad del segundo gen implicado.

## **PERSPECTIVAS**

- 1) Identificar el gen *SO* que está implicado, junto con *TYR1*, en el fenómeno de sensibilidad a oxígeno y temperatura.
- 2) Evaluar la posible función de la tirosina en el fenómeno sensibilidad a oxígeno- temperatura. Determinar la relación que tiene la tirosina con el gen *SO*.

## REFERENCIAS

- **Alba, L A.** (1995). Caracterización genética y fisiológica de un gen (*GUS2/GCN5*) que regula la actividad de glutamato sintasa (*GOGAT*) de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Doctorado en Ciencias. 74 pp.
- **Ames, B N; R, Cathcart; E, Schwiers and P, Hochstein.** (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused ageing and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6858-6862.
- **Ball, S G; R B, Wickner; G, Cottarel; M, Schaus and C, Tirtiaux.** (1986). Molecular cloning and characterization of *ARO7-OSM2*, a single yeast gene necessary for chorismate mutase activity and growth in hypertonic medium. *Mol. Gen. Genet.* **205**: 326-330.
- **Briza, P; G, Winkler; H, Kalchhauser and M, Breitenbach.**(1986). Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. *J. Biol. Chem.* **261**: 4288-4294.
- **Chang, E C and D J, Kosman.** (1989). Intracellular Mn(II)- associated superoxide scavenging activity protects Cu, Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. *J. Biol. Chem.* **264**: 12172-12178.

- **Cohen, G; F, Fessi; A, Traczyk; J, Rytka and H, Ruis.** (1985). Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Mol. Gen. Genet.* **200**:74-79.
- **Courgeon, A M; E, Rollet; J, Becker; C, Maisonhaute and M, Best-Belpomme.** (1988). Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induces actin and some heat-shock proteins in *Drosophila* cells. *Eur. J. Biochem.* **171**: 163-170.
- **Davidson, J F; B, Whyte; P H, Bissinger and R H, Schiestl.** (1996). Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 5116-5121.
- **Donnelly, E; Y A, Barnett and W, McCullough.**(1994). Germinating conidiospores of *Aspergillus* amino acid auxotrophs are hypersensitive to heat shock, oxidative stress and DNA damage. *FEBS Lett.* **355**: 201-204.
- **Farr, S B and T, Kogoma.**(1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561-585.
- **Fernando, M R; H, Nanri; S, Yoshitake; K, Nagata-Kuno and S, Minakami.** (1992). Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* **209**: 917-922.

- **Figuroa, C A.** (1997). Caracterización de una vía alterna de biosíntesis de tirosina en *Saccharomyces cerevisiae*: estudio de su papel en la viabilidad celular. Tesis de Maestría en Biomedicina Molecular, IPN. 55 pp.
- **Foerder, C A and B M, Shapiro.** (1977). Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4214-4218.
- **Fukuda, K; M, Watanabe; K, Asano; K, Ouchi and S, Takasawa.** (1991). Isolation and genetic study of *p*-fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants overproducing  $\beta$ -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **20**: 449-452.
- **Graf, E.** (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free. Radic. Biol. Med.* **13**(4): 435-448.
- **Grant, C M; L P Collinson; J-H Roe and I W Dawes.** (1996). Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* **21**: 171-179.
- **Heinecke, J W; W, Li; H L, Daehnke III and J A, Goldstein.**(1993). Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**: 4069-4077.

- **Jungmann, J; H-A, Reins; J, Lee; A, Romeo; R, Hassett; D, Kosman and S, Jentsch.** (1993). Mac-1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* **12:** 5051-5056
- **Keyse, S M and E A, Emslie.**(1992). Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein- tyrosine phosphatase. *Nature (lett).* **359:** 44-47.
- **Kuge, S and N, Jones.** (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* **13:** 655-664.
- **Lin, S-J and V C, Culotta.**(1995). The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92:** 3784-3788.
- **Liu, X F; I, Elashvili; E B Gralla; J S Valentine; P, Lapinskas and V C Culotta.** (1992). Yeast lacking superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **267:** 18298-18302.
- **Lupo, S et al.** TYR1 is involved in protection from oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. En preparación.

- **Mannhaupt, G; R, Stucka; U, Pilz; C, Schwarzlose and H, Feldmann.** (1989). Characterization of the prephenate dehydrogenase-encoding gene, *TYR1*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. **85**: 303-311.
- **Michaeli, A and J, Feitelson.** (1994). Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem. Photobiol.* **59**: 284-289.
- **Mitsui, A; T, Hirakawa and J, Yodoi.** (1992). Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**: 1220-1226.
- **Pahl, H L and P A, Baeuerle.** (1994). Oxygen and the control of gene expression. *BioEssays* **16**: 497-502.
- **Sánchez, Y; J Taulien; K A Borkovich and S Lindquist.** (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**: 2357-2364.
- **Soberón, M.** (1986). Asimilación de glutamina en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica, UNAM. 65 pp.
- **Spevak, W; F, Fessel; J, Rytka; A, Traczyk; M, Skoneczny and H, Ruis.** (1983). Isolation of the catalase T structural gene of

*Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1545-1551.

- **Stephen, D W S and D J, Jamieson.**(1996). Glutathione is an important molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**:207-212.
- **Tamai, K T; E B, Gralla; L M, Ellerby; J S, Valentine and D J, Thiele.** (1993). Yeast and mammalian metallothioneins functionally substitute for yeast copper-zinc superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8013-8017.
- **van der Klei, I J; J, Rytka; W H Kunau and W Harder.**(1987). Growth of catalase A and catalase T deficient mutants strains of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol and oleic acid. *Arch. Microbiol.* **153**: 513.
- **Wieser, R; G, Adam; A, Wagner; C, Schüller; G, Marchler; H, Ruis; Z, Krawiec and T, Bilinski.** (1991). Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 12406-12411.
- **Zhou, Y-C and R-L, Zheng.**(1991). Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1177-1179.

- **Zitomer, R S and C V, Lowry.** (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**: 1-11.

