

00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

2
13.

**“Caracterización genética y molecular de mutantes con una
termotolerancia intrínseca elevada de la levadura
Saccharomyces cerevisiae”.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA)
PRESENTA:**

BIOLOGO J. SERGIO CASAS FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

268761

Cuernavaca, Morelos, 1998.

**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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de plantas del
Instituto de Biotecnología de la U. N. A. M.
Bajo la dirección del Doctor Jorge Luis Folch Mallol y del Dr. Jorge Nieto Sotelo.

Cuernavaca, Morelos., 1998

AGRADECIMIENTOS:

Primeramente quiero agradecer al Dr. Jorge Luis Folch Mallol y al Dr. Jorge Nieto Sotelo por haber dirigido esta tesis.

De igual forma quiero agradecer a la Dra. Alicia González Manjarréz, a la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, al Dr. Jorge Nieto Sotelo, al Dr. Jorge Luis Folch Mallol y a la Bióloga Esperanza Benítez Bellón, quienes formaron parte de mi comité tutorial y ayudaron a la mejora de éste trabajo con sus acertadas críticas.

Asi mismo agradezco a la Dra. Alicia González Manjarréz, a la Dra. Patricia León Mejía, a la Dra Rosana Sánchez López, al Dr. Jorge Nieto Sotelo y al Dr. Jorge Luis Folch Mallol quienes amablemente aceptaron revisar este trabajo y lo enriquecieron con sus críticas y comentarios.

Agradezco a la tecnico Luz María Martínez por su apoyo técnico y los comentarios hechos durante la realización de este trabajo.

Quiero agradecer a las autoridades del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

Agradezco de igual forma al CONACyT y a la DGAPA por el apoyo brindado para el financiamiento del proyecto del laboratorio y por lo tanto para la realización de éste trabajo.

INDICE:

Introducción.	1
Función de las hsps como chaperonas moleculares.	3
Hsps de bajo peso molecular.	4
Familia hsp60.	6
Proteínas TF55/TCP.	7
Familia Hsp70.	8
Familia hsp90.	12
Hsps con función desconocida en la tolerancia al estrés por calor.	13
Familia hsp100 (hsp104).	14
Otros sistemas proteolíticos descritos en <i>Escherichia coli</i> .	18
El papel del sistema de degradación ubiquitina en la respuesta al estrés por calor.	19
Genes que codifican para enzimas glicolíticas inducibles por calor en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	21
Regulación de la expresión de los genes inducibles por calor en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	22
Regulación de los genes de estrés por calor por los elementos de respuesta al estrés (STREs) en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	24
Los elementos de respuesta al estrés AP-1 (AREs) en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	26
Factores intrínsecos que afectan la tolerancia al estrés por calor en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	26
El efecto de la limitación de nutrientes en la termotolerancia en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	28
El papel de la vía de transducción de señales Ras-cAMP en la termotolerancia.	29
Antecedentes.	31
Objetivos.	32
Materiales y métodos.	33
Material biológico.	33
Plásmidos.	34
Medios de cultivo.	34
Protocolos para la determinación del nivel de termotolerancia intrínseca de cepas de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	35

Determinación del porcentaje de reversión de tamaño de colonia chico a grande.	36
Aislamiento de revertantes independientes de tamaño de colonia chico a grande (no hermanas).	37
Obtención de diploides de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	37
Transformación de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por el método de acetato de litio.	38
Extracción de DNA genómico de levadura.	38
Extracción de DNA plasmídico usando columnas de intercambio aniónico.	39
Determinación de proteína por el método de Bradford.	40
Determinación de la actividad específica de β -galactosidasa	40
Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	41
Marcaje de la sonda por el método de iniciadores al azar "Random primer".	42
Hibridación DNA-DNA (Southern blot).	42
Resultados.	44
Determinación de grupos de complementación en las mutantes <i>hsr</i> .	44
Análisis de la termotolerancia intrínseca durante las diferentes fases del desarrollo en cultivos líquidos de la cepa silvestre W303 y de las mutantes W303 Δ <i>hsp104</i> , ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT8, ScIBT14 y <i>hsr1</i> .	47
Análisis de reversión de tamaño de colonia chico a grande de las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada.	57
Actividad de un promotor quimérico de respuesta al estrés por calor (<i>HSP26/HSP70</i>) fusionado al gen reportero <i>LacZ</i> en diferentes fondos mutantes.	64
Discusión.	66
Conclusiones.	79
Bibliografía.	80

RESUMEN:

Al incubar a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* 10°C a 15°C por arriba de su temperatura óptima de crecimiento (temperatura supraóptima), muchas de sus funciones celulares se ven afectadas, pero las células no mueren. Durante la exposición a estas temperaturas supraóptimas se induce un grupo de proteínas, llamadas proteínas de estrés por calor (hsps), las cuales a 25°C no se inducirían (Parsell, 1993). Cuando las levaduras son expuestas 25°C por arriba de su temperatura óptima, la gran mayoría de las células mueren (temperatura letal), sin embargo, si se expone a las células a una temperatura supraóptima no letal por cierto periodo de tiempo y después se exponen a una temperatura letal el porcentaje de sobrevivencia aumenta; a este fenómeno se le denomina termotolerancia inducida por calor. Se ha reportado que de todas las hsps estudiadas solamente una juega un papel importante en la termotolerancia inducida: ésta es la HSP104 (Sánchez, 1992). También se ha descrito que células en fase G₀ del ciclo celular y mutaciones en el gen que codifica para la adenilato ciclasa (*hsr1*) (Iida, 1988) y para el factor de transcripción de genes inducibles en respuesta al estrés por calor (*hsf1*) (Sewell, 1995), presentan termotolerancia intrínseca elevada. Por el contrario, mutaciones en genes que codifican para la síntesis de trehalosa (De Virgilio, 1994), para protein-cinasas dependientes de cAMP (Verma, 1988) y para enzimas que participan en cascadas de fosforilación involucradas en la transferencia de señales intracelulares, presentan bajos niveles de termotolerancia inducida (Coote *et al.*, 1992).

En el laboratorio del Dr. Jorge Nieto estamos interesados en dilucidar los mecanismos involucrados en la termotolerancia intrínseca de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para este propósito se aislaron 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Estas mutantes presentan diferentes grados de termotolerancia intrínseca, que va de 10 a varios miles de veces en relación a la cepa silvestre. En general las mutantes más termotolerantes (1000X), muestran tiempos largos de duplicación, mientras que las de mediana y baja termotolerancia muestran tiempos de duplicación más cercanos al de la cepa silvestre. En la mayoría de los casos los tiempos de duplicación muestran una relación directa con el nivel de termotolerancia. El análisis genético de estas mutantes demostró que las mutaciones son recesivas para la mayoría de los casos y solamente dos resultaron ser codominantes. En la mayoría de los casos estudiados el análisis de tétradas sugiere que la mutación puede ser nuclear y monogénica. Estudios recientes han demostrado que las mutantes ScIBT1 y ScIBT8 presentan más de una mutación.

Resultados de análisis de complementación realizadas con las 16 mutantes demostraron la existencia de 6 grupos de complementación. Los resultados obtenidos para la mayoría de nuestras mutantes *hsr* fueron niveles de termotolerancia muy elevados en todos los estadios del desarrollo, incluso en fase postdiáuxica. En estos estadios la mayoría de los organismos con crecimiento semejante al de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son muy sensibles a temperaturas letales. La excepción fue la mutante ScIBT14, la cual fue más termotolerante que la cepa silvestre sólo al inicio de la fase logarítmica, pero después su comportamiento fue semejante a esta. Un comportamiento parecido al de nuestras mutantes fue detectado en la mutante en Adenilato ciclasa (*hsr1*, Iida 1988). Para algunas de las mutantes (las de mayor nivel de termotolerancia) se determinó un alto porcentaje de reversión de tamaño de colonia chico a grande. Análisis de termotolerancia para 20 revertantes no hermanas derivadas de la mutante ScIBT2 demostraron que en 19 de los casos, las revertantes presentaron un nivel de termotolerancia semejante al de la cepa silvestre (0.02% de sobrevivencia), en tanto que una de las revertantes presentó nivel de termotolerancia elevado (6.4%), el cual no es el parental. Este resultado sugiere la existencia de al menos dos formas de reversión en la mutante ScIBT2: uno donde el tamaño de colonia está ligado con la termotolerancia y otro que no está ligado a la termotolerancia, siendo más frecuente el primero. Debido a que algunas mutantes presentan un alto porcentaje de reversión de tamaño chico de colonia a grande y esto representa un problema para la clonación del gen, decidimos averiguar si este problema de reversión está mediado por un mecanismo tipo príon y si al eliminar a *HSP104* podemos disminuir la frecuencia de reversión de tamaño de colonia chico a grande. Los resultados de estos experimentos con la mutante ScIBT2 revelaron que la disrupción de *HSP104* no tiene ningún efecto sobre la frecuencia de reversión. Pruebas de termotolerancia basal demostraron que no se requiere de *HSP104* para mantener los niveles de termotolerancia de la mutante ScIBT2. Los resultados obtenidos para la actividad de β -galactosidasa de la construcción quimérica *hsp26/hsp70* mostraron que la mutante ScIBT2 presenta niveles de actividad más elevados que la cepa silvestre W303 y que la cepa mutante *hsr1* a temperaturas no estresantes (25°C) y a temperaturas estresantes (39°C).

INTRODUCCION:

La gran diversidad de seres vivos existentes en la Tierra es una consecuencia de la amplia variedad de ambientes y oportunidades para los diferentes modos de vida en nuestro planeta. Las especies que han prosperado al máximo, son las que se han adaptado a dichos cambios y estas a su vez, heredan la información que les ha permitido sobrevivir a las siguientes generaciones (Dobzhansky, 1975).

Todos los organismos vivos presentan puntos óptimos de desarrollo en términos de condiciones fisiológicas y ambientales, incluyendo parámetros como humedad, pH, salinidad, luz y temperatura, entre otros; esto sugiere que durante el transcurso del tiempo, desde el origen de los primeros seres vivos hasta nuestros días, se han generado mecanismos que han permitido la adecuación de los organismos a los cambios ambientales en diferentes nichos ecológicos.

En términos biológicos definimos al fenómeno de estrés como aquel factor que provoca disminución en el crecimiento y/o la viabilidad celular. Si se somete a un organismo a condiciones extremas de estrés, este muere; sin embargo, se ha visto que algunas formas moderadas de estrés pueden inducir rápida y dramáticamente la expresión y síntesis de un grupo de proteínas (por ejemplo las proteínas de respuesta al estrés por calor) y la represión de la expresión y síntesis de muchas otras. La respuesta a diferentes tipos de estrés involucra mecanismos fisiológicos relevantes necesarios para la sobrevivencia del organismo (Atkinson, 1985).

Los cambios de temperatura en el medio de desarrollo de un organismo pueden provocar disminución en crecimiento y/o la viabilidad. La termotolerancia es definida como la habilidad que presentan los organismos para sobrevivir a temperaturas elevadas diferentes a su temperatura óptima de crecimiento por exposiciones cortas de tiempo.

Al incubar a los organismos a temperaturas moderadas elevadas (temperatura supraóptima no letal), muchas de sus funciones celulares se ven afectadas, pero no mueren. Durante la exposición a estas temperaturas supraóptimas moderadas se induce un grupo de proteínas, llamadas proteínas de estrés por calor (hsps), (Parsell y Linnquist, 1993). Cuando los organismos son expuestos a temperaturas letales, la gran mayoría de las células mueren; sin embargo, si estas

mismas células se exponen previamente a una temperatura supraóptima no letal y después se exponen a una temperatura letal, el porcentaje de sobrevivencia aumenta; a este fenómeno se le denomina termotolerancia. Este pretratamiento también les confiere resistencia a otros tipos de estreses (algunos metales pesados y altas concentraciones de etanol) dependiendo del individuo y de su contenido genético. De igual forma, células expuestas a los estreses mencionados, provocan un aumento en los niveles de termotolerancia (Parsell y Lindquist, 1993).

El calor daña una amplia gama de estructuras celulares y procesos metabólicos (Nover, 1991). La magnitud y la duración del estrés por calor determina el daño causado; las células mueren cuando el daño es excedido. En los eucariotes superiores uno de los efectos observables más inmediatos es una extensiva disrupción del citoesqueleto (Falkner *et al.*, 1981). En algunos tipos celulares el calor provoca la desorganización de la red de microfilamentos citoplásmica del núcleo. La sensibilidad de las células mitóticas al calor correlaciona perfectamente con el daño al huso mitótico y la disrupción de la red intracelular de microtúbulos. Además, se ha observado que células en interfase que sufren daño por calor a nivel de citoesqueleto, difícilmente se recuperan.

El calor también provoca efectos de toxicidad en otras estructuras citoplásmicas; se ha observado que en algunos tipos celulares el calor provoca la fragmentación del aparato de Golgi, un incremento en el número de lisosomas y el número de mitocondrias se ve reducido; esto trae como consecuencia una reducción en la respiración la fosforilación oxidativa; el calor severo desacopla por completo ambos procesos (Patriarca y Maresca, 1990).

La síntesis de muchas macromoléculas también se ve afectada por temperaturas elevadas; uno de estos daños es en la síntesis de proteínas; en muchos tipos celulares los polisomas desaparecen durante la exposición a temperaturas supraóptimas no letales (Nover, 1991). La disrupción de la síntesis de proteínas no es un simple efecto de toxicidad provocado por las altas temperaturas, en muchos tipos celulares esto es parte de una respuesta regulatoria que facilita la expresión de las hsps; la disrupción de la traducción elimina la competencia de los mRNAs de otras proteínas diferentes a los mRNAs de las hsps por los ribosomas, facilitando la síntesis inmediata

de estas proteínas. Otro efecto provocado por el calor es la interrupción de los mRNAs inmaduros del *Splicing* (procesamiento de mRNA) (Yost y Linquist, 1986), también se han observado cambios en la maquinaria del procesamiento de mRNA; esto tiene un pequeño efecto positivo sobre la expresión de las hsps ya que muchos de sus mRNAs no contienen intrones y los daños provocados en la maquinaria del procesamiento del mRNA puede favorecer su síntesis.

En el nucleolo el procesamiento de los pre-rRNA se ve alterado y la transcripción realizada por la RNA polimerasa I se aborta (Bell *et al.*, 1988). Estos efectos metabólicos coinciden con el drástico cambio morfológico del nucleolo (Welch y Suhan, 1985). La transcripción realizada por la RNA polimerasa II también se aborta por el efecto del calor (Yost y Linquist, 1986).

La síntesis de DNA se ve afectada a nivel de iniciación y terminación por temperaturas elevadas (Warters y Stone, 1983); además, el estrés por calor puede inhibir la estructuración de la cromatina, dejando el DNA en una conformación inestable que lo hace más susceptible al ataque de nucleasas. El contenido de proteínas de estrés por calor se ve incrementado en el núcleo por el choque térmico (Lazlo, 1992).

El estrés por calor también induce cambios en las membranas celulares, incluyendo cambios en su morfología, incremento en la fluidez de la bicapa, la agregación de proteínas integrales de membrana; el número y la actividad de los receptores de membrana también se ven afectados (Parsell y Lindquist, 1993).

Función de las hsps como chaperonas moleculares:

El término chaperona fue utilizado por Laskey para describir el papel de las nucleoplasminas en el empaquetamiento de la cromatina y popularizado por R. J. Ellis (1989) en la descripción de estudios sobre el ensamblaje de la Rubisco en el cloroplasto. Las chaperonas moleculares se definieron originalmente como proteínas que median el ensamblaje correcto de otras proteínas sin llegar a formar parte de la estructura final de esta (Miernyk, 1997). Recientemente las chaperonas se han definido como aquellas proteínas que se unen y estabilizan una conformación inestable a través de un ciclo de pegado y liberación para facilitar el funcionamiento adecuado de la proteína

(Miernyk, 1997). Las chaperonas moleculares son requeridas para una amplia gama de procesos a temperaturas normales y estresantes, incluyendo el plegamiento, desnaturalización, oligomerización y localización subcelular de proteínas. Un gran número de proteínas han sido reportadas con actividad de chaperonas moleculares. Muchas chaperonas moleculares son proteínas de estrés y fueron originalmente descritas como proteínas de choque térmico (hsps) (Miernyk, 1997). Subsecuentemente se demostró que la síntesis de muchas proteínas de choque térmico pueden ser inducidas por otros tipos de estreses y que además muchas se expresan en condiciones no estresantes. A muchas chaperonas se les nombra con la primer nomenclatura [hsp (heat shock protein) seguido por un número, indicando el peso molecular en kilodaltones] (Figura 1) y en muchos de los casos cuando un grupo de chaperonas llega a conformar una familia también se les ha nombrado con esta misma nomenclatura (Miernyk, 1997).

El papel de las hsps en la termotolerancia inducida no es muy claro; sin embargo, estudios bioquímicos de algunas de estas proteínas indican que son necesarias para prevenir la acumulación de proteínas dañadas. La acumulación de proteínas anormales es suficiente para la inducción de la síntesis de hsps (Goldberg, 1972). Ensayos *in vitro* han demostrado que algunas hsps previenen la acumulación de proteínas dañadas tratadas con agentes desnaturalizantes de tres maneras: 1) previniendo la agregación de proteínas desnaturalizadas; 2) promoviendo su replegamiento y 3) facilitando la degradación de proteínas anormales (Nover, 1991).

Las hsps estudiadas son de tamaños diversos, composición oligomérica y algunas de ellas pueden tener la misma función. Las funciones de algunas hsps son plegar y desplegar proteínas, además, facilitan el ensamble y desensamble de múltiples complejos enzimáticos. Las hsps son elementos clave en la prevención de asociaciones impropias de las proteínas en la célula cuando ésta se encuentra en condiciones fisiológicas normales y estresantes. Una característica muy importante de las chaperonas es que imparten la conformación estérica de otras proteínas. La conformación que deriva de la interacción de las chaperonas con los péptidos nacientes está contenida en la secuencia primaria de a.a (aminoácidos) de la proteína misma. Las chaperonas simplemente facilitan el proceso de plegamiento de los péptidos.

TABLA 1. Proteínas de estrés por calor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Mager y Moradas (1993).

Nombre	Localización celular	Función
hsp104	Nucleólo	Tolerancia al estrés
hsp90	Citosol/núcleo	Chaperona
hsp70		
ssa1	Citosol	Chaperona
ssa2	Citosol	Chaperona
ssa3	Citosol	Chaperona
ssa4	Citosol	Chaperona
ssb1	Desconocida	Desconocida
ssb2	Desconocida	Desconocida
ssc1	Mitocondria	Chaperona
ssd1 (kar2)	Retículo endoplásmico	Chaperona
hsp60	Mitocondria	Chaperona
hsp30	Membrana plasmática	Desconocida
hsp26	Citosol/núcleo	Desconocida
hsp12	Citosol?	Desconocida
ubiquitina	Citosol	Degradación de proteínas
enzimas		
Enolasa	Citosol	Glucolisis
Gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa	Citosol	Glucolisis
Cinasa de fosfoglicarato	Citosol	Glucolisis
Catalasa	Citosol	Defensa antioxidativa

Durante la “vida” de una proteína pueden presentarse diferentes problemas para establecer una interacción con otra proteína generando un producto no funcional. Durante el inicio de la síntesis de las cadenas polipeptídicas nacientes estas son susceptibles de interactuar con otras proteínas o con ellas mismas antes de su liberación del ribosoma, esta interacción puede ser con las chaperonas moleculares, las cuales en su interacción con el péptido naciente hacen que este adopte la conformación adecuada para su buen funcionamiento (Parsell y Lindquist, 1993).

Hsps de bajo peso molecular:

De todas las familias de hsps, las de bajo peso molecular son las menos conservadas y de las que menos se conoce su función. Las proteínas varían bastante en tamaño (de 12 kd a 40 kd) y en composición de aminoácidos. Las hsps de bajo peso molecular se encuentran en procariotes (mycobacteria) y en citosol de eucariotes. Son particularmente abundantes en plantas donde además de citosol se encuentran en los sistemas de endomembranas y cloroplastos (Vierling, 1991). Las hsps citosólicas de bajo peso molecular muestran un complejo patrón de localización en respuesta a cambios de temperatura y otros estímulos (Arrigo y Tanguay, 1991; Nover, 1991; Rossi y Lindquist, 1989). En respuesta a temperaturas extremas las hsps de bajo peso molecular son particularmente abundantes y forman grandes estructuras llamadas “gránulos de choque térmico”. (Arrigo y Tanguay, 1991; Nover, 1991).

Función de las hsps de bajo peso molecular: Estudios bioquímicos *in vitro* de las hsps de bajo peso molecular indican una función de estas como chaperonas moleculares. En estudios con la hsp25 de ratón se observó que estas suprimen la agregación de la proteína β L-cristalina a 58°C y de la α -glucosidasa a 49°C en una relación molar de 1:20 y 1:10 respectivamente (hsp:sustrato) (Merck *et al.*, 1993). En otro estudio con la hsp25 de ratón, la hsp27 y la α -cristalina de humano, se demostró que todas ellas previenen la agregación inducida por calor de la citrato sintasa y de la α -glucosidasa y promueven la renaturalización de estas proteínas después de su desnaturalización con urea (Jacob *et al.*, 1993). Sin embargo, en ningún estudio se ha reportado la formación de un complejo binario estable entre las hsps de bajo peso molecular y su sustrato.

En contraste con las actividades de chaperona de hsp70 y hsp60, la actividad de chaperona de las hsps de bajo peso molecular es independiente de ATP.

Análisis genéticos de la función de las hsps en mamíferos y levaduras han dado resultados diferentes. Selección de líneas celulares CHO (chinese hamster ovary) termotolerantes seleccionadas a hipertermia produjeron un grupo de mutantes en las cuales el único cambio detectado fue la sobreproducción de hsp27 (Chretien y Landry 1988). La transfección de células CHO silvestres con genes de hsp27 que se expresan de manera constitutiva confieren una termotolerancia basal elevada a estas células transfectantes. La levadura *S. cerevisiae* solamente contiene dos hsps de bajo peso molecular, la hsp12 y la hsp26 (Petko y Lindquist, 1986), donde la sobreexpresión de la proteína hsp26 provee un incremento ligero en la termotolerancia (Susek y Lindquist, 1989; Tuite *et al.*, 1990). La delección del gen *HSP26* no genera ningún efecto sobre el crecimiento: a) a cualquier temperatura en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono; condiciones aeróbicas ó anaeróbicas; b) altas concentraciones de etanol en fase logarítmica y estacionaria; c) en la termotolerancia (Petko y Lindquist, 1986).

Los estudios realizados hasta ahora han mostrado que las hsps de bajo peso molecular juegan un papel importante en la termotolerancia en células de mamífero y un papel menos importante en células de levadura.

Familia hsp60:

Las proteínas hsp60 se encuentran en el citosol bacteriano (conocidas como GroEL) y en matriz mitocondrial y estroma de cloroplastos de eucariotes (conocidas como chaperonina-60) (Ellis y van der Vies, 1991; Hatl *et al.*, 1992; Lorimer, 1992). GroEL es una de las proteínas más abundantes a temperaturas normales, la cantidad de proteína fluctúa entre 1-2%. La hsp60 de eucariotes comprende aproximadamente el 1% de la proteína total de la matriz mitocondrial. Todas las proteínas de esta familia presentan un 60% de identidad a nivel de la secuencia de aminoácidos (Hemmingsen *et al.*, 1988; Reading *et al.*, 1989). La mayoría de estas proteínas presentan una estructura oligomérica común en forma de doble dona formada por dos anillos cada uno con siete miembros

(Ellis y van der Vies, 1991; Hendrix, 1979; McMullin y Hallberg, 1988), mientras que la hsp60 mitocondrial es un sólo anillo (Viitanen *et al.*, 1992). En la mayoría de los casos estudiados la proteína Hsp60 presenta actividad de ATPasa la cual incrementa con la temperatura. La unión de ATP induce el cambio conformacional adecuado en la estructura del oligómero (Saibil *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1991).

Hsp60 funciona de una manera dependiente de otra proteína inducible por calor, la hsp10 (también conocida como chaperonina-10 para eucariotes o GroES para procariotes). Al igual que las proteínas hsp60, hsp10 se encuentra en bacterias, mitocondrias y cloroplastos (Ellis y van der Vies, 1991; Hatl *et al.*, 1992). La proteína hsp10 forma homo-oligómeros en forma de anillo, conformado por siete miembros (Chandresekhar *et al.*, 1986). Las hsp10 se unen a las hsp60 regulando su actividad de ATPasa y su asociación con el substrato (Langer *et al.*, 1992; Saibil *et al.*, 1993).

Función de hsp60 a temperaturas normales: La proteína hsp60 se une a proteínas desplegadas promoviendo su plegamiento. La afinidad de esta chaperona molecular por proteínas nativas es muy baja o no la hay, pero cuando se adiciona urea o análogos de a.a. (aminoácidos) (desnaturalizantes de proteínas) en buffers fisiológicos, la afinidad de hsp60 por estos péptidos desnaturalizados aumenta.

Las proteínas hsp60's bacteriana y mitocondrial son necesarias para el crecimiento a todas las temperaturas. Mutantes de levadura en hsp60 sensibles al calor, presentan desplegamiento y agregación de proteínas oligoméricas de la matriz, incluyendo la F₁-ATPasa a temperaturas no permisibles (Cheng *et al.*, 1989; Horwich y Willison, 1993).

La función plegadora de hsp60 *in vitro* es fuertemente dependiente de temperatura. Cuando se agregan agentes desnaturalizantes como la urea a la proteína Rubisco en presencia de bajas concentraciones de hsp60 y a temperaturas por arriba de los 25°C, la actividad de la enzima Rubisco es muy baja. Cuando se incrementan la concentración de hsp60, aumenta la actividad enzimática de la Rubisco (Goloubinoff *et al.*, 1989).

La proteína hsp60 mitocondrial se asocia con una amplia variedad de proteínas a altas temperaturas. Esta asociación presumiblemente impide la agregación de proteínas y promueve el replegamiento cuando las células son regresadas a temperaturas normales de crecimiento.

Proteínas TF55/TCP:

Hasta ahora se ha visto que hsp60 juega un papel muy importante en el plegamiento de proteínas en bacterias y organelos eucariotes. De esto surge la pregunta de: ¿quién realiza esta función en el citosol de eucariotes? Hasta ahora se tiene una respuesta parcial de una fuente inesperada. La arqueobacteria *Sulfolobus shibatae* expresa una proteína a altas temperaturas denominada TF55 de 55 kd (Trent *et al.*, 1990). La estructura oligomérica de TF55 es similar a la de hsp60 (Trent *et al.*, 1990). Otras especies de arqueobacterias y eucariotes sintetizan proteínas con estructuras similares a altas temperaturas.

En eucariotes estas proteínas reciben el nombre de TCPs (the T-complex proteins), son citosólicas y sorprendentemente no son inducibles por calor. Las proteínas TF55 y TCPs muestran una baja pero convincente homología a nivel de secuencia de aminoácidos con hsp60 (Lewis *et al.*, 1992). Estas proteínas al igual que hsp60 se pegan a una amplia gama de proteínas desnaturalizadas (Trent *et al.*, 1991). TCP también posee actividad de chaperonina parecida a la de hsp60. En cambio, para TF55 no se ha demostrado que facilite el plegamiento de ningún sustrato desnaturalizado. De manera diferente a las eubacterias y eucariotes que inducen fuertemente entre 5 y 15 hsps en respuesta a altas temperaturas, *Sulfolobus* produce solamente a la proteína TF55. Para el caso de TCP no existen evidencias de que juegue algún papel en la termotolerancia.

Familia Hsp70:

Las hsp70s son una familia de proteínas altamente conservada, el porcentaje de identidad a nivel de secuencia de a.a. entre los diferentes miembros de diversas especies se acerca al 50%. Los distintos miembros de esta familia se encuentran en retículo endoplásmico, mitocondria, cloroplasto, núcleo citoplasma y en citosol bacteriano. Algunas son constitutivamente expresadas y otras son inducidas por calor o frío.

Todas las proteínas hsp70 estudiadas tienen un dominio N-terminal el cual es el más conservado y presenta alta afinidad por ATP (Flaherty *et al.*, 1990). El dominio C-terminal es menos conservado y es el responsable de la unión a los sustratos (péptidos nacies y proteínas). Esta organización sugiere que las hsp70 han conservado el dominio de unión a ATP y han variado el dominio C-terminal para el reconocimiento de una amplia gama de sustratos.

Funciones de las hsp70 a temperaturas normales: Las proteínas hsp70 se unen a péptidos pequeños preferentemente a los aminoácidos hidrofóbicos (Flynn *et al.*, 1991), a cadenas nacies sobre los polisomas (Beckman *et al.*, 1990), a proteínas que han sido marcadas para transportarse a los compartimentos celulares (Bird, 1987), a algunas proteínas mutantes (Gething *et al.*, 1986), a ciertas subunidades protéicas que son expresadas en ausencia de las otras subunidades (Munro y Pelham, 1986) y a ciertas proteínas oligoméricas que se encuentran en proceso de ensamble o desensamble y procesos de translocación (DeLuca-Flaherty *et al.*, 1990; Georgopoulos y Ang, 1990). Por ejemplo, una hsp70 facilita el ensamble de proteínas en el retículo endoplásmico, otra facilita el transporte de proteínas a través de la membrana, otras se encuentran en el citosol manteniendo a algunas proteínas en un estado de traslocación competente y otras trabajan en el retículo endoplásmico o en la matriz mitocondrial facilitando la translocación de proteínas a través de la membrana (Craig *et al.*, 1990; Deshaies *et al.*, 1988; Neupert *et al.*, 1990), donde el uso de ATP permite la liberación del producto en todos los casos (Gething y Sambrook, 1992).

Funciones de las hsp70 en la tolerancia al estrés: En muchos organismos las hsp70s son inducidas por calor, los primeros experimentos realizados mostraron una amplia relación entre la inducción de estas proteínas y la inducción de

la termotolerancia y un alto porcentaje de sobrevivencia a altas temperaturas (Li y Lazlo, 1985). La importancia de las proteínas hsp70 inducibles por calor reside en su papel en la tolerancia al estrés a temperaturas supraóptimas no letales, además pueden estar protegiendo a los organismos de la muerte a temperaturas extremas. Sin embargo, la importancia de hsp70 en la tolerancia al estrés varía sorprendentemente entre los diferentes organismos.

Las mutaciones en el gen *DnaK* (hsp70) de *E. coli* no son letales, pero reducen su tasa de crecimiento celular a 30°C y dejan de crecer a 16°C y 40°C. Estas mutaciones promueven la expresión constitutiva de otras hsps. Mutaciones en el factor σ^{32} suprimen el efecto de mutaciones en *dnaK* a 30°C, lo que sugiere que la proteína DnaK regula negativamente a algunas hsps a 30°C. Por otro lado se ha demostrado que DnaK protege a la RNA polimerasa manteniéndola activa ante un choque térmico y reactiva a la RNA polimerasa que fue previamente desnaturalizada (Skowyra *et al.*, 1990). En estudios recientes se demostró que DnaK reactiva la actividad de la luciferasa *in vivo* e *in vitro* (Schroeder *et al.*, 1993)

La levadura *S. cerevisiae*, presenta tres hsp70 inducibles por calor (*SSA1*, *SSA3* y *SSA4*) y una que se expresa a 25°C (*SSA2*) que también eleva su nivel de expresión ante un choque térmico. Mutaciones en los genes *SSA1* y *SSA2* inhiben el crecimiento a temperaturas elevadas no letales (37°C), pero no provoca ningún efecto a temperaturas extremas (50°C), (Werner-Washburn *et al.*, 1987). Mutaciones en *SSA1*, *SSA3* y *SSA4* reducen la sobrevivencia únicamente cuando se combinan con mutaciones en el gen *hsp104*, que codifica para la única hsp que se ha visto juega un papel importante en la termotolerancia inducida en la levadura *S. cerevisiae* (Sánchez *et al.*, 1993). Al parecer, las proteínas hsp70 inducibles por calor no juegan un papel importante en la sobrevivencia de la levadura a temperaturas letales (50°C), pero sí a temperaturas supraóptimas no letales (39°C).

A diferencia de *E. coli* y *S. cerevisiae*, en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, la proteína hsp70 parece tener el papel más importante en la tolerancia a temperaturas letales (40-42°C). En este organismo al igual que otros varias hsp70s se expresan de manera constitutiva (Craig *et al.*, 1983). La única hsp70 inducible por calor es indetectable a temperaturas normales de crecimiento (25°C), pero es inducida

más de mil veces cuando se exponen a las moscas a 37°C permitiéndole sobrevivir a temperaturas extremas (Velázquez *et al.*, 1983). Líneas celulares de *Drosophila melanogaster* transformadas con copias extras del gen que codifica para la proteína hsp70 inducible por calor acumulan más rápidamente esta proteína cuando son cambiadas a 37°C y adquieren termotolerancia más rápidamente que las células no transformadas. En otros experimentos se ha observado que líneas celulares transformadas con genes antisentido para la proteína hsp70 que son expuestas a 37°C acumulan más lentamente la proteína y adquieren termotolerancia de una manera más deficiente que las no se transformaron (Solomon *et al.*, 1991). Estas líneas celulares sobreexpresan otras hsps. Cuando se expresa hsp70 a partir de un promotor heterólogo independientemente de las demás hsps, se ha visto que la sola expresión de esta proteína confiere termotolerancia a las células de estos organismos ante una exposición directa a 42°C (Solomon *et al.*, 1991), esto confirma la importancia de hsp70 en la respuesta al choque térmico (Craig y Gross, 1991; DiDomenico *et al.*, 1982), sugiriendo que las otras hsps no juegan un papel tan importante en respuesta al estrés por calor en *Drosophila melanogaster*.

Como se ha visto hasta ahora la proteína hsp70 es muy importante en *Drosophila melanogaster* para la sobrevivencia a altas temperaturas, pero es perjudicial para el crecimiento y/o la división celular a temperaturas normales si se sobreexpresa (Feder *et al.*, 1992). Células que expresan la hsp70 inducible por calor a temperaturas normales detienen su crecimiento y es acompañado por el secuestro de hsp70 en grandes gránulos. Gránulos semejantes aparecen en la cepa silvestre aproximadamente 12 horas después de un tratamiento de inducción de la termotolerancia por calor. El secuestro rápido de hsp70 en los gránulos puede ser esencial para la recuperación de un desarrollo normal de los de las células después de un choque térmico.

El papel de hsp70 en la termotolerancia inducida ha sido extensivamente estudiado en células de vertebrados. Existen contradicciones respecto al papel de las hsp70s que se expresan constitutivamente y las que son inducibles por calor con respecto a su papel en la termotolerancia inducida. Para muchos de los casos estudiados la inducción de la termotolerancia coincide con la expresión de hsp70 sin la

expresión de otras hsp (Li y Werb, 1982; Li y Lazlo, 1985). En líneas celulares de varios vertebrados resistentes a temperatura, seleccionadas por tratamientos de hipertermia, se observó que éstas sobreexpresan la proteína hsp70 (Lazlo y Li, 1985). Por otro lado, deleciones en el N-terminal conservado de las hsp70, no provocan deficiencia en la inducción de la termotolerancia, lo cual sugiere que al menos éste dominio no es importante para la inducción de la termotolerancia (Li *et al.*, 1992).

Familia hsp90:

Los miembros de esta familia se encuentran localizadas en los compartimentos citosólico, nuclear y en el retículo endoplásmico de los eucariotes superiores analizados. Esta familia también se ha localizado en procariotes, *E. coli* tiene a la proteína HtpG que tiene un 40% de identidad con las proteínas eucariotes. HtpG es una proteína moderadamente abundante a temperaturas normales y es fuertemente inducida por calor. Deleciones del gen que codifica para HtpG no tiene efecto en el crecimiento a temperaturas normales, pero a temperaturas elevadas provoca una ligera disminución en el crecimiento (Bardwell y Craig, 1988). En la levadura *S. cerevisiae* la proteína hsp90 es esencial para el crecimiento a todas las temperaturas. La proteína hsp90 de levadura presenta una gran afinidad por ATP y presentan actividad de ATPasa (Csermely y Kahn, 1991). Proteínas hsp90 purificadas de diferentes organismos presentan diferentes niveles de actividad de ATPasa. Mutaciones sitio dirigidas en el dominio consenso para actividad de ATPasa no presentan efecto detectable *in vivo* (Parsell y Lindquist, 1993)

Fuciones de hsp90 a temperaturas normales: Miembros de la familia hsp90 interactúan con muchas proteínas celulares como es el caso de Caseína cinasa II (Miyata, y Yahara 1992), varios receptores de hormonas esteroides (Pratt *et al.*, 1992), calmodulina (Minami *et al.*, 1993), etc. Sin embargo, la actividad de hsp90 como chaperona es modesta comparada con la actividad de hsp60. Estudios *in vitro* de la interacción de hsp90 con la Caseína cinasa II, proveen una fuerte evidencia de la función de chaperona de esta hsp (Miyata y Yahara, 1992). En este caso, hsp90 impide la agregación de la cinasa, promueve la desagregación y potencia la actividad de la cinasa más de 20 veces. Dos características funcionales que hacen diferente a hsp90 de

otras chaperonas como hsp60 y hsp70 son: 1) hsp90 presenta alta especificidad por los sustratos y 2) la interacción de hsp90 con sus sustratos es de “vida larga” y juegan papeles regulatorios muy importantes.

Funciones de hsp90 en la tolerancia al estrés: Análisis genéticos de la levadura *S. cerevisiae* demostraron que la cantidad de hsp90 requerida para el crecimiento, incrementa conforme aumenta la temperatura (Borkovich *et al.*, 1989). Se ha visto que hsp90 es importante para el crecimiento de la levadura a temperaturas normales, pero su papel a temperaturas extremas aún no es claro. Experimentos en líneas celulares de mamíferos con RNA antisentido para hsp90, indican que la ausencia de esta chaperona hace más sensibles a las células, en cambio, análisis mutacionales del gen *HSP90* de levadura indican que esta proteína no es necesaria para la tolerancia a temperaturas supraóptimas (Borkovich *et al.*, 1989).

Hsps con función desconocida en la tolerancia al estrés por calor:

A varias peptidil-prolil-isomerasas (PPIs), se les ha identificado como hsps en una gran variedad de especies. Estas proteínas se distinguen de otras hsps en que ellas actúan con una verdadera catálisis del plegamiento de proteínas.

En las proteínas nativas muchos de los péptidos unidos se encuentran en configuración *trans*. La configuración *trans* es producida durante la síntesis de proteínas, pero aproximadamente el 60% de estas tienen al menos una unión prolil en posición *cis* (Stewart *et al.*, 1990). El establecimiento de la configuración *cis* de una unión específica prolil es un paso limitante en el plegamiento de muchas proteínas *in vitro* (Schmid *et al.*, 1992). La catálisis de isomerización de la configuración *cis* a configuración *trans* puede ser igualmente importante en el plegamiento de proteínas *in vivo*. Las PPIs no son requeridas para el plegamiento de proteínas *in vitro*, pero aumentan la tasa de plegamiento (Fischer, *et al.* 1984; Schmid, *et al.* 1992). Mutaciones realizadas en los genes que codifican para PPIs en levadura revelan la importancia de estas durante la exposición a estrés. Una mutación en la ciclofilina mitocondrial (PPI) codificada por *CPR3* impide el crecimiento en lactosa a 37°C (Davis *et al.*, 1993). Otras dos PPIs, la ciclofilina citoplásmica codificada por *CYP1* y la ciclofilina de retículo endoplásmico codificada por *CYP2* son inducibles por

temperatura. Mutaciones en uno o en ambos genes (*CYP1* o *CYP2*) provocan que las células mueran cinco veces más rápido que la cepa silvestre a 48°C (Sykes *et al.*, 1993). Los sustratos de estas proteínas aún no han sido identificados. Estudios con estas hsp han demostrado su interacción con hsp70 y hsp90, formando complejos con una gran variedad de receptores de hormonas esteroideas (Nadeau *et al.*, 1993) inducidos por temperatura y se corregulan con hsp70 y hsp90. Estas evidencias sugieren un papel importante de las PPIs ante un estrés por calor.

Familia hsp100:

El 15% del recambio de proteínas anormales en *E. coli* es llevado a cabo por las proteasas Clp (también conocidas como proteasas Ti) (Katayama *et al.*, 1988). Clp es un hetero-oligómero compuesto por dos tipos de subunidades, ClpP y ClpA. La actividad proteolítica la conforma un dodecámero de subunidades ClpP cada uno con un peso molecular de 21.5 kd. Por otro lado ClpA, la subunidad regulatoria del complejo ClpP es un péptido de 83 kd que se hexameriza de una manera dependiente de ATP antes de su asociación con el dodecámero de ClpP. El ATP es necesario para el ensamble de ClpA con ClpP y para la proteólisis del sustrato por ClpP.

Las subfamilias ClpA no son inducibles por calor, mutantes *clpA* presentan el mismo nivel de termotolerancia que la cepa silvestre y no presentan problemas de crecimiento a cualquier temperatura.

La subfamilia ClpB incluye proteínas de bacterias, levaduras, tripanosomas y plantas. Para el caso de *E. coli* se ha demostrado que ClpB es la subunidad regulatoria de ClpP. Todas ellas son fuertemente inducidas por calor. La proteína hsp104 de la levadura *S. cerevisiae* pertenece a esta subfamilia y al igual que ClpA presenta actividad de ATPasa, sin embargo estudios *in vitro* han demostrado que no interactúa con ClpP para promover la proteólisis (Woo *et al.*, 1992). Mutantes *hsp104* y *clpB* no presentan defectos proteolíticos (Parsell *et al.*, 1993); sin embargo, estas mutantes presentan defectos en la termotolerancia inducida (Sánchez y Lindquist, 1990; Squires *et al.*, 1991) (ver más adelante otros sistemas proteolíticos en *Escherichia coli*).

El porcentaje de identidad a nivel de secuencia de a.a. entre estas subfamilias de proteínas oscila entre 50% y 80%. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la

proteína hsp104 presenta dos dominios de unión a ATP con diferentes funciones. Uno de los dominios controla el ensamble de la proteína en un complejo homooligomérico y el otro dominio es el responsable de la mayor actividad de ATPasa (Parsell *et al.*, 1994).

Todas las proteínas incluidas en la subfamilia ClpB son inducibles por calor y presentan alta homología entre ellas. Esto sugiere que estas proteínas pueden tener funciones muy relacionadas en respuesta al estrés (Gottesman *et al.*, 1990; Squires y Squires, 1992). Análisis genéticos de los miembros inducibles de esta subfamilia como son hsp104 de *Saccharomyces cerevisiae* y ClpB de *Escherichia coli* confirman esta hipótesis.

Células de levadura que crecen a 25°C, son pretratadas a 37°C se termoinducen y sobreviven a un choque térmico letal a 50°C entre 100 y 1000 veces más que aquellas que no son pretratadas. La termotolerancia inducida se ve seriamente afectada por mutaciones en el gen *hsp104*; mutaciones en este gen permiten la termoinducción de manera transitoria, esto se observó en una cinética de termotolerancia a 50°C. Durante los primeros minutos de exposición la cepa silvestre y la mutante presentan el mismo comportamiento, a los 5 minutos del tratamiento las células mutantes comienzan a morir entre 100 y mil veces más rápidamente que la cepa silvestre (Sánchez Y Lindquist, 1990). La proteína hsp104 parece estar especializada para funcionar a condiciones extremas de temperatura. Mutaciones en *hsp104* no provocan ningún efecto sobre el crecimiento en medio de cultivo con glucosa a 25°C y 37°C (Sánchez *et al.*, 1992). Micrografías electrónicas de células silvestres y mutantes en *hsp104* expuestas a altas temperaturas, acumulan agregados de mRNA y proteínas de bajo peso molecular. después de unos minutos la cepa silvestre los disuelve y la mutante no. Al parecer el hecho de no poder deshacer estos agregados es lo que provoca la muerte de las mutantes en *hsp104*.

Al igual que mutaciones en *hsp104*, mutaciones en el gen inducible *ClpB* de *E. coli*, no presentan ningún efecto a temperaturas normales de crecimiento, pero provocan que las células portadoras de la mutación mueran más rápidamente que la cepa silvestre a temperaturas supraóptimas (Squires *et al.*, 1991).

La importancia de hsp104 para diferentes tipos de estrés varía

dramáticamente. Mutaciones por delección en el gen *hsp104* no tienen efecto ante exposiciones a altas concentraciones de cobre y cadmio. El efecto de la mutación es mínimo en altas concentraciones de arsenito (Sánchez *et al.*, 1992). Esto sugiere que el daño provocado por estos agentes es diferente al provocado por calor. Sin embargo, *hsp104* juega un papel muy importante en la tolerancia de las levaduras a altas concentraciones de etanol. De igual forma que la temperatura, *hsp104* es importante sólo en condiciones extremas. Mutantes en *hsp104* crecidas en medio de cultivo con concentraciones con 20% de etanol, disminuyen la sobrevivencia varias miles de veces, en tanto que concentraciones 15% de etanol, disminuyen la sobrevivencia mínimamente (Sánchez *et al.*, 1992). Análisis genéticos de dobles mutantes *hsp104*, *hp70* han proporcionado algunas pistas de la posible función de *hsp104*. Delecciones en el gen *hsp104* no presentan efecto en el crecimiento, pero reducen drásticamente la sobrevivencia a temperaturas extremas. Por otro lado, mutaciones en los genes inducibles *Hsp70*: *SSA1*, *SSA3* y *SSA4* no tienen efecto en la sobrevivencia a temperaturas extremas, pero arrestan el crecimiento a 37°C. Dobles mutantes en *hsp104* y cualquiera de los genes *SSA1*, *SSA3* y *SSA4*, eliminan la termotolerancia inducida residual que presentan mutantes sencillas *hsp104* durante los primeros minutos en un choque letal a 50°C. La sobreexpresión de la proteína *hsp70* incrementa ligeramente la tolerancia en mutantes *hsp104*, por otro lado la sobreexpresión de *hsp104* compensa los bajos niveles de *hsp70* en el crecimiento (Sánchez *et al.*, 1993). Estos resultados sugieren fuertemente que las proteínas *hsp104* y *HSP70* pueden estar funcionando en la misma vía o vías paralelas que se sobreponen.

Hasta hace poco, solamente se sabía del papel de *hsp104* en la tolerancia a diferentes tipos de estrés. En los últimos años se ha descubierto el papel de *hsp104* en fenómenos tipo prión (ver más adelante) en condiciones no estresantes como es el caso del factor traduccional [*PSI*], el cual parece ser un prión en la levadura. Los priones fueron descubiertos en mamíferos como los causantes de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en el hombre y el Scrapie en ovejas (Prusiner, 1994). En este caso el agente transmisible de estas enfermedades no es un ácido nucleico a través de un vector tal

como un virus, sino una proteína celular (PrP^C) con una conformación alterada (PrP^{Sc}). Cuando la proteína ha obtenido la conformación alterada no solamente es patogénica sino que además es capaz de inducir que otras proteínas adopten la conformación alterada patógena sosteniendo y propagando la enfermedad de generación en generación.

El hecho de que ciertos cambios en el fenotipo de células de levadura puedan ser debidos a proteínas con una conformación alterada fue primeramente observada por Wikner (1994). En este trabajo se enfocó a decifrar el comportamiento raro del elemento genético $[URE]^+$, notando que este fenómeno tipo prión también podía explicar el fenómeno provocado por el elemento $[PSI]^+$. Estos elementos son dominantes y se transmiten genética y citoplásmicamente.

Cuando $[PSI]^+$ está presente en células de levadura se reduce la fidelidad traduccional, un fenómeno detectado por la supresión de mutaciones sin sentido, también llamado supresor omnipotente debido a que puede suprimir las tres mutaciones sin sentido existentes. Cuando una cepa $[PSI]^+$ es cruzada por una cepa $[psi-]$, el diploide es siempre $[PSI]^+$ y sus cuatro productos meióticos también son $[PSI]^+$. La hipótesis de que $[PSI]$ representa una alteración heredable en la conformación de la proteína (Wikner, 1994) tuvo un fuerte soporte cuando cuando se descubrió que la persistencia de $[PSI]$ dependía fuertemente de la proteína hsp104 (Chernoff *et al.*, 1995). Tratando de identificar qué factores pueden influir sobre la acción de $[PSI]$ usando un banco genómico de levadura, se encontró un plasmido que restableció la fidelidad traduccional que contenía al gen *hsp104* (Chernoff y Ono, 1992). Mutaciones puntuales sobre el gen de *hsp104* demostraron que esta era el único factor que provocaba el cambio fenotípico (Chernoff *et al.*, 1995). La sobreexpresión de la proteína hsp104 en cepas $[PSI]$ provoca una reversión del fenotipo $[PSI]$ a fenotipo $[psi-]$ y las cura del prión (Chernoff *et al.*, 1995). $[PSI]$ también puede ser curado por la delección de *hsp104*, provocando un fenotipo $[PSI]$ -nunca más ($[PSI]$ -no more), las cepas nunca llegan a ser $[PSI]$ ni aún sobreexpresando la proteína Sup35, lo cual demuestra que hsp104 es necesaria para la preservación del prión $[PSI]$.

La subfamilia ClpC incluye proteínas de bacterias y plantas en la que los miembros eucarióticos de este grupo contienen una secuencia de importe a cloroplasto en el amino terminal, que probablemente juegan un papel muy importante en el recambio de proteínas de cloroplasto (Squires y Squires, 1992).

Al parecer, las proteínas ClpX y ClpY de *E. coli* son miembros truncados de la familia hsp100 (ClpB). Estas proteínas carecen de secuencia líder, secuencia espaciadora y de los primeros nucleótidos del dominio de unión a ATP que presentan los miembros de la familia hsp100. ClpX es una proteína inducible por calor sintetizada del mismo operón que ClpP, pero al igual que mutaciones en ClpP, mutaciones en ClpX (la cual regula la actividad proteolítica de ClpP), presentan el mismo nivel de termotolerancia que la cepa silvestre. Experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el complejo ClpX/ClpP degrada la proteína “O” del fago lambda.

Otros sistemas proteolíticos descritos en *Escherichia coli*:

En condiciones óptimas de crecimiento la “vida media” de muchas proteínas celulares en *E. coli* es larga (entre 5 y 20 minutos aproximadamente) comparada con el tiempo de generación corto de la bacteria (20 minutos). Sin embargo, las proteínas anormales como aquellas que contienen análogos de aminoácidos, polipéptidos truncados y algunas proteínas mutantes son reconocidas y degradadas rápidamente reduciendo la posibilidad de una interacción entre estos polipéptidos y las proteínas funcionales, previniendo así la acumulación de agregados proteicos insolubles además de generar la liberación de aminoácidos de los péptidos no funcionales para la síntesis de nuevas proteínas. La degradación de muchas proteínas citosólicas anormales en *E. coli* es realizada por varias proteasas.

La proteasa Lon de *E. coli*, pertenece a una familia de proteasas de serina (Americkn *et al*, 1991; Chin *et al*, 1988) la cual es una proteína dependiente de ATP y está compuesta de cuatro subunidades idénticas de 783 a.a. La proteasa Lon cataliza el recambio de varias proteínas regulatorias importantes como Sula, la cual incrementa sus niveles cuando hay daño en el DNA y se inhibe con la septación celular. Una vez que el daño al DNA ha sido reparado *Sula* es reprimido y rápidamente degradado por Lon. Mutantes *lon* presentan altos niveles de Sula. Debido a la preferencia de Lon

para degradar proteínas anormales y aunado a que se induce por calor y otros tipos de estrés se ha llegado a la hipótesis de que esta proteasa ayuda a eliminar proteínas que son desnaturalizadas durante el estrés; sin embargo mutantes *lon* presentan el mismo nivel de termotolerancia que la cepa silvestre.

Existen algunas hsp's que tienen un papel proteolítico sobre ciertos sustratos cuya proteólisis es dependiente de su interacción con Lon, este es el caso de DnaK y GrpE. DnaK, DnaJ y GrpE son necesarias para el recambio de algunas proteínas que son sustrato de Lon, tal vez las hsp's cooperan con diferentes proteasas para potenciar la degradación de polipéptidos aberrantes durante el estrés por calor.

La proteasa DegP de *E. coli*, juega un papel muy importante en la degradación de proteínas periplásmicas dañadas por estrés por calor, la cual es una proteasa de serina periplásmica de 48 kd que es fuertemente inducida por calor y es esencial para el crecimiento a altas temperaturas (Lipinska *et al.*, 1989; Strauch *et al.*, 1989). Mutaciones en el gen que codifica para DegP impiden que se dé el recambio de proteínas periplásmicas, pero no de las citosólicas. La información que se tiene de las proteasas Lon, Clp y DegP es evidencia de la importancia de la proteólisis en la tolerancia al estrés.

El papel del sistema de degradación ubiquitina en la respuesta al estrés por calor:

Muchas de las proteínas anormales que son degradadas en el citosol de células eucarióticas son proteolizadas por el sistema ubiquitina (Hershko y Ciechanover, 1992). La vía de ubiquitina no solamente degrada proteínas anormales, también degrada una gran cantidad de proteínas regulatorias de "vida" corta, incluyendo al fitocromo Pfr de plantas, P53 de mamíferos y MATa de levadura (Glutzer *et al.*, 1991; Hochstrasser *et al.*, 1991). La ubiquitina es un pequeño péptido de 76 a.a. abundante y altamente conservado en eucariotes, su papel en la proteólisis es marcar los sustratos que van a ser degradados, siendo activada por el ataque de la enzima E1 (enzima activadora de la ubiquitina) en una reacción dependiente de ATP, posteriormente es transferida a un grupo de proteínas E2 (enzimas conjugadoras de ubiquitina), donde la enzima E2 cataliza la transferencia de ubiquitina a un residuo de

lisina de la proteína que va a ser degradada. Para algunos sustratos, E2s cataliza directamente la transferencia de la ubiquitina al sustrato, mientras que otras requieren de la acción adicional de la enzima E3 (proteína ubiquitina ligasa). Las proteínas que son marcadas por el complejo ubiquitina son degradadas por el proteoma 26S de una manera dependiente de ATP.

La degradación de proteínas dependiente de ubiquitina en respuesta al estrés puede ser por dos vías: 1) Algunas de las reacciones claves son catalizadas por proteínas inducibles por calor; 2) El sistema ubiquitina parece ser el responsable del recambio de muchos polipéptidos dañados por estrés. Cuando los cultivos celulares son sometidos a temperaturas elevadas se observa una gran degradación de proteínas normales (Parag *et al.*, 1987); el aumento en la proteólisis coincide con una reducción en el conjugado ubiquitina-histona libre y un incremento en los conjugados ubiquitina-proteína. Líneas celulares mutantes en la enzima E1 son sensibles a calor, no responden a un cambio en la temperatura con un incremento en la actividad proteolítica y no pueden crecer a temperaturas elevadas.

En una amplia variedad de eucariotes la ubiquitina es sintetizada como una poliproteína, la cual, es subsecuentemente procesada en varias unidades (Ozkaynak *et al.*, 1984). En cada caso probado estas poliproteínas son inducidas por calor. Evidencias genéticas han demostrado que es importante tener altas concentraciones de ubiquitina libre para tener una respuesta adecuada a las condiciones de estrés. Mutantes en el gen *UB14* que codifica para una subunidad del proteoma de levadura crecen a la misma tasa que la cepa silvestre a temperaturas normales, pero son más sensibles que la cepa silvestre a períodos prolongados de incubación a altas temperaturas (Finley *et al.*, 1987).

En *Saccharomyces cerevisiae* el gen de la poliubiquitina (*UB14*) es necesario para la tolerancia al estrés. Bajo condiciones normales la ubiquitina es sintetizada por los genes *UB11*, *UB12* y *UB13* (Finley *et al.*, 1989). Cada uno de estos genes codifica para proteínas fusionadas con una ubiquitina en el C-terminal y en el N-terminal de proteínas ribosomales, las cuales son cortadas precisamente después de la síntesis (Finley *et al.*, 1989). El ataque transitorio de la ubiquitina a proteínas ribosomales parece facilitar su ensamble, sugiriendo que la ubiquitina puede funcionar como una

chaperona molecular específica para aquellas proteínas a las que se fusiona. Es posible que la hsp ubiquitina juegue ambos papeles, uno en la degradación de proteínas y otro en el ensamble y plegamiento de proteínas como chaperona molecular (Finley *et al.*, 1989).

El responsable de la degradación de las proteínas marcadas por el complejo ubiquitina es un multicomplejo enzimático con actividad de proteasa dependiente de ATP conocido como proteosoma 26S, este complejo incluye a la subunidad multicatalítica 20S y a otras proteínas (35-110 kd) (Hershko y Ciechanover, 1992; Rechteiner *et al.*, 1993). Una de las subunidades de alto peso molecular (S4) del complejo 26S que tiene actividad de ATPasa (Dubiel *et al.*, 1992; Erdmann, *et al.*, 1991), presenta alta homología con la proteína ClpA de *E. coli* en el primer sitio de unión a ATP, lo cual sugiere una homología funcional del proteosoma 26S con las proteínas bacterianas Clp. Muchos de los componentes del proteosoma 26S no son inducibles por calor; sin embargo, este complejo es muy importante para la tolerancia al estrés por calor. Cepas de levadura con una mutación sin sentido en el gen que codifica para una subunidad del proteosoma (*pre1*), muestran sensibilidad a altas temperaturas y a análogos de aminoácidos.

Más del 90% de la proteólisis eucariótica se lleva a cabo en el lisosoma. La proteólisis lisosomal durante el ayuno de los organismos también puede ser dependiente de ubiquitina (Bohley y Seglen, 1992). Células ayunadas que son deficientes de ubiquitina presentan deficiencia en las tasas de proteólisis lisosomal (Gropper *et al.*, 1991).

Genes que codifican para enzimas glicolíticas inducibles por calor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*:

En la levadura *Sacharomyces cerevisiae* se ha demostrado que tres enzimas glicolíticas son inducibles por calor: La enolasa (Hsp48) (Iida y Yahara, 1985), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Hsp35), y una fosfato cinasa. Un aumento en la expresión de las enzimas glicolíticas puede estar reflejando la necesidad de una mayor cantidad de sus productos para cubrir la demanda energética en condiciones estresantes. *ENO1* (enolasa) es expresado a niveles muy similares cuando las células se

crecen en fuentes de carbono glicolíticas o gluconeogénicas, pero la síntesis de Enolp incrementa durante la fase estacionaria, durante la privación de azufre o bien después de un choque térmico (Iida y Yahara, 1985).

El gen que codifica para la proteína inducible por calor de 35 kd fue identificado como el gen *G3PDH* que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa previamente descrito (McAlister y Holland, 1985). Existen otros dos genes estrechamente relacionados con *G3PDH*, que no son inducibles por calor (*TDHI* y *3*). La isoforma *G3PDH* inducible por calor, es de las más abundantes en condiciones normales de crecimiento, además es necesaria para el crecimiento óptimo a temperaturas normales. Mutantes en esta enzima presentan una tasa de crecimiento reducida a 25°C y 37°C.

El gen *PGK1* que codifica para la fosfoglicerato cinasa es expresado a niveles muy elevados a 25°C en medio de crecimiento rico con glucosa como fuente de carbono. Cuando las células se cambian de 25°C a 37°C los niveles de la fosfoglicerato cinasa se ven incrementados entre seis y siete veces más. En el promotor del gen *PGK1*, se encuentra un elemento de choque térmico HSE (heat shock element), el cual es necesario para incrementar los niveles de mensajero bajo condiciones de estrés por calor (Piper *et al.*, 1988).

Regulación de la expresión de los genes inducibles por calor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*:

La regulación transcripcional de los genes inducibles por calor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es mediada por una secuencia activadora río arriba, UAS_{Hs} (Slater y Craig, 1987), la cual es muy similar al potenciador de la transcripción (enhancer) HSE primeramente descrito en *Drosophila melanogaster* (Bienz y Pelham, 1987). Se ha reportado que no es suficiente una sola copia de HSE para la inducción de los genes inducibles por calor en *Drosophila melanogaster*.

Un gran número de genes inducibles por calor también son expresados a niveles sustanciales durante el crecimiento exponencial de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los genes *HSP82* y *SSA1* presentan un nivel de expresión basal en fase exponencial de crecimiento y se ha observado que un solo HSE es necesario para

umentar su inducción por calor (Slater y Craig, 1987). Mutaciones en el elemento HSE incluidos en la región promotora de *HSP82*, provocan una disminución de 95% en la expresión inducida por calor. Para *SSA1*, uno de los tres HSEs (HSE2) localizado a 199 nucleotidos del 5' terminal, es necesario para producir 80% de la expresión inducida por calor. Los HSEs 2 y 3 son necesarios para la expresión basal de los genes inducibles por calor.

Las secuencias HSE son reguladas transcripcionalmente por la unión del factor de transcripción de respuesta al estrés por calor (HSTF) (Sorger y Pelham, 1987; Wiederrech *et al.*, 1987; Sorger y Nelson, 1989). Se ha descrito al HSTF como un trímero, tanto en solución como cuando está unido al DNA; la oligomerización es mediada por una región (entre 327 y 424 a.a) que forma cierres de isoleucina, la cual forma hélices anfipáticas (Sorger y Nelson, 1989). El HSTF aislado de células de levadura a temperatura control o tratadas por calor se encuentra unido con la misma afinidad al DNA (Sorger *et al.*, 1987), lo cual es contrastante con el aumento en la afinidad por el DNA del HSTF de células de *Drosophila* y mamíferos cuando se someten a temperaturas de inducción de la termotolerancia. Experimentos *in vivo* indican que HSTF de levadura se encuentra unido constitutivamente a las secuencias HSE durante el crecimiento exponencial (Jakobsen y Pelham, 1988). Después de un choque térmico HSTF es fosforilado en múltiples sitios; el 18% de los aminoácidos HSTF son serinas y treoninas, los cuales son posibles sitios de fosforilación. Estos eventos de fosforilación correlacionan con un incremento en la capacidad del HSTF para estimular la transcripción, pero no se ha demostrado claramente que las fosforilaciones sean las responsables directas de la activación de HSTF. Mutaciones por delección en HSTF de levadura son letales, lo cual sugiere que este factor es necesario para la expresión basal de algunos genes de choque térmico (Sorger *et al.*, 1987; Wiederrecht *et al.*, 1987).

Análisis de mutantes por delección en HSTF fusionados a *yAP-1* y al gen reportero *LacZ* han permitido determinar que HSTF contiene al menos dos dominios de activación flanqueando al dominio de unión al DNA (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990). También se determinó que la actividad de estos dominios es reprimida bajo condiciones normales de crecimiento por elementos en trans (Nieto-Sotelo *et al.*).

Además análisis de mutaciones en la secuencia HSE fusionada al gen reportero *LacZ* dieron como resultado niveles constitutivos elevados de expresión (Pelham *et al.*, 1991). El mecanismo involucrado en el aumento de la actividad de HSTF ante un choque térmico aún no ha sido determinado, pero se ha propuesto que hsp70 puede estar jugando un papel importante en la regulación de la actividad de HSTF por una interacción directa de hsp70 con este factor transcripcional (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990).

Sustituciones en los codones 206 y 256 del HSTF confieren dos fenotipos a la levadura, por una parte provocan una elevada actividad transcripcional del mutante HSTF, que resulta en termotolerancia constitutiva. El segundo fenotipo potencia la afinidad de unión por el HSE que se encuentra en el extremo 5' del promotor CUP, dando como resultado una transcripción elevada de metalotionina (Sewell *et al.*, 1995).

Regulación de los genes de estrés por calor por los elementos de respuesta al estrés (STREs) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se identificó un elemento de respuesta al estrés independiente de HSTF en la región promotora de un gen que responde al daño en el DNA (*DDR2*) (Kobayashi y McEntee, 1993) y en el gen que codifica para la catalasa citoplásmica T (*CTT1*) (Wieser *et al.*, 1991; Marchler *et al.*, 1993). HSTF no se une a la secuencia consenso AGGGG ó CCCCT (Wieser *et al.*, 1991; Kobayashi y McEntee, 1993). Con base en la observación de que este elemento es activado por múltiples factores estresantes como la deprivación de nitrógeno, estrés osmótico, estrés oxidativo, etanol, etc se le denominó elemento de respuesta al estrés ó STRE (del término en inglés: Stress Response Element). El o los factores transcripcionales de respuesta al estrés aún no ha sido bien identificados en su totalidad, observaciones recientes demostraron que los activadores transcripcionales Msn2p y Msn4p (Estruch y Carlson, 1993) se unen específicamente a estos elementos de respuesta al estrés y son los responsables de elevar los niveles de expresión de los genes que contienen los elementos STRE en respuesta al estrés por calor y otros tipos de estrés (Ruis *et al.*, 1995). Estos activadores transcripcionales no son necesarios para la activación de los genes dependientes de la secuencia STRE en respuesta a un choque

osmótico. Además de los genes *CTT1* y *DDR2* se ha demostrado que los genes *TPS2* (que codifica para la trehalosa fosfato fosfatasa), el gen *GSY2* (que codifica para una glicogeno sintasa), *HSP12* y *hsp104* también son regulados por la vía STRE (Gounalaki y Thireos, 1994). El elemento PDS (*Post Diauxic Shift*) (Boorstein y Craig, 1990) del gen *SSA3* (que codifica para la proteína HSP70) puede ser una variante del elemento STRE. Al igual que el elemento STRE es regulado negativamente por la cinasa A de proteínas y es activado durante la fase diáuxica y durante la fase estacionaria. Sin embargo, en contraste con STRE, el elemento PDS no es activado por estrés por calor ó por alta osmolaridad. El consenso del elemento PDS del gen *SSA3* contiene la secuencia AGGGA, la cual puede compararse con el consenso AGGGG del elemento STRE.

La transcripción de un gran número de genes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, particularmente los de *CTT1* y *SSA3* se encuentra bajo la regulación negativa de la cinasa A de proteínas dependiente de cAMP (PKA), los elementos STRE y PDS (Marchler *et al.*, 1993; Boorstein y Craig, 1990; Belazzi *et al.*, 1991; Engelberg *et al.*, 1994). Los niveles transcripcionales basales e inducidos dependientes de la vía STRE son potenciados en mutantes *ras2* con una baja actividad de cinasa A de proteínas y son dramáticamente reducidos en mutantes *bcy1* con una alta actividad de cinasa A de proteínas. Estudios epistáticos indican que el control de la actividad de STRE por las vías que regulan la osmolaridad elevada (HOG) y la de la cinasa A de proteínas dependiente de cAMP ocurren en paralelo (Schuler *et al.*, 1994). Esto es consistente con las primeras observaciones que se hicieron donde la resistencia al estrés puede ser inducida en células que carecen de la subunidad regulatoria de la proteína cinasa A, si la actividad de la subunidad catalítica es atenuada (Cameron *et al.*, 1988). Se ha sugerido que la subunidad catalítica de la cinasa A de proteínas juega un papel directo en el metabolismo nitrogenado, de la trehalosa y de la actividad del elemento STRE.

En contraste con la expresión de los genes dependientes del elemento HSE, la transcripción regulada por el elemento STRE presenta todas las características de una vía más general de respuesta al estrés en la levadura. Existe una excelente correlación entre el efecto de las mutaciones (particularmente en las de la vía RAS-cinasa A de

proteínas) sobre la adquisición de la tolerancia al estrés y sobre la expresión mediada por el elemento STRE. Esta correlación es también válida a nivel de factores fisiológicos. Los factores que inducen estrés, inducen la vía STRE y esta inducción cruza, dando como resultado protección ante otros tipos de estrés (Marchler *et al.*, 1993, Schuler *et al.*, 1994).

Los elementos de respuesta al estrés AP-1 (AREs) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

YAP-1 es un gen de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* homólogo a la familia de factores transcripcionales AP-1 de mamíferos, los cuales regulan la expresión de genes que confieren resistencia a varios tipos de estreses. Mutaciones que provocan la pérdida de la función YAP-1, traen como consecuencia la hipersensibilidad a peróxido de hidrógeno, implicando como función al gen en la protección al estrés oxidativo. Consistentemente, entre los genes blanco del activador transcripcional YAP-1p se encuentran TRX2 que codifica para la Thioredoxina, la cual es inducida por estrés oxidativo vía la unión de YAP-1p al elemento ARE y GSH1 que codifica para la γ -glutamyl-cisteína sintetasa, la enzima limitante en la síntesis del glutatión. Los promotores dependientes de STRE son sensibles a deleciones en YAP-1, sin embargo, YAP-1 no se une al elemento STRE. Esto contrasta con la actividad de HSTF la cual no es dependiente de YAP-1, puesto que muestra una actividad normal en un fondo genético *yap-1* Δ (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990)

Factores intrínsecos que afectan la tolerancia al estrés por calor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*:

Los cambios en la expresión de las hsp durante el desarrollo y en respuesta a condiciones fisiológicas correlacionan perfectamente con los cambios en la termotolerancia. Por ejemplo, la hormona esteroidea "ecdisona" induce la síntesis de hsp y la termotolerancia en *Drosophila* (Berger y Woodward, 1983). Las hsp también se expresan de manera constitutiva en células de hongos que están esporulando y en fase estacionaria, estas células presentan altos niveles de termotolerancia (Iida y Iahara, 1984; Kurtz *et al.*, 1986). Un ejemplo particularmente interesante es provisto

por los hongos patógenos dimórficos, los cuales inducen la síntesis de las hsp's cuando se mueven del ambiente externo al hospedero de sangre caliente. El grado con que ellos pueden inducir las hsp's coincide con su patogenicidad (Patriarca *et al.*, 1990).

Recientes pruebas genéticas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en relación a los cambios en la expresión de las hsp's en respuesta a los diferentes estadios de desarrollo y a cambios nutricionales, han ayudado a entender las diferencias en los niveles de termotolerancia bajo estas condiciones. La expresión de la proteína hsp104 es necesaria para la viabilidad de esporas y células en fase estacionaria. También es necesaria su expresión para que estos tipos celulares obtengan los niveles naturales de termotolerancia a altas temperaturas (Sánchez *et al.*, 1992). Además, los niveles de hsp104 son más abundantes en células que crecen en fuentes no fermentables de carbono como el acetato, que aquellas que crecen en fuentes fermentables de carbono. Esto último, correlaciona con que las células que respiran son más termotolerantes que las células que fermentan y que hsp104 es necesaria para la termotolerancia (Sánchez *et al.*, 1992).

Otro factor involucrado en la tolerancia al estrés por calor es el disacárido trehalosa el cual se acumula en varios organismos durante la fase estacionaria de crecimiento y durante un choque térmico a temperaturas supraóptimas no letales, estas dos condiciones también inducen altos niveles de tolerancia al estrés por calor. Experimentos *in vitro* con trehalosa han demostrado que esta evita la inactivación irreversible de enzimas durante la desecación (Colaco *et al.*, 1992).

Las diferencias observadas de la termotolerancia entre los organismos en las distintas etapas del desarrollo y bajo variadas condiciones fisiológicas siempre correlaciona con una expresión diferencial de las hsp's.

Un fenómeno más enigmático es la gran variación que presentan en la termotolerancia basal organismos muy relacionados crecidos en las mismas condiciones fisiológicas y el mismo estadio del desarrollo.

El efecto de la limitación de nutrientes en la termotolerancia en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*:

Las células de levadura crecidas en medio líquido rico con glucosa como fuente de carbono, pasan por una fase exponencial de crecimiento, una fase diáuxica y una fase estacionaria (Matile *et al.*, 1969; Lilie y Pringle, 1980). A medida que la levadura va creciendo en el medio de cultivo, cambia su metabolismo y se va haciendo más termotolerante a temperaturas letales (50°C). En la fase exponencial del crecimiento, las levaduras son más sensibles al calor y en la fase estacionaria son más termotolerantes (Schenberg-Francino y Moustacchi 1972; Parry *et al.*, 1976). De igual forma las células que sufren limitación de nutrientes en el medio de cultivo, son más resistentes a temperaturas letales (Paris y Pringle, 1983; Plesset *et al.*, 1987). La expresión de un subgrupo de genes inducibles por calor, incluyendo *SSA3*, *HSP26*, *HSP82*, *hsp104* y *UB14*, es inducida en células que se aproximan a fase estacionaria (Werner-Washburne *et al.*, 1989; Boorstein y Craig, 1990). La expresión de *hsp104* en la levadura es necesaria para la adquisición de una alta termotolerancia natural para células en fase estacionaria y para las esporas (Sánchez *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado que algunos mRNAs de genes de hsp disminuyen su expresión en el cambio a la fase diáuxica, este es el caso para *SSA1*, *SSC1* y *KAR2/SSD1*. De forma similar sucede para mRNAs de otros genes que no son inducibles por calor (Werner-Washburne *et al.*, 1989).

Debido a que no todas las hsp se expresan durante la aproximación a la fase estacionaria, podría suponerse que las secuencias HSE no son los únicos elementos regulatorios responsables de la regulación de la inducción en fase estacionaria. La secuencia HSE de *SSA3*, la cual es suficiente para la inducción de este gen ante una exposición por calor, no es capaz de inducir la transcripción de otros genes bajo el control de esta secuencia consenso durante la aproximación a la fase estacionaria de crecimiento (Boorstein y Craig, 1990). Los análisis por delección de la región promotora de *SSA3*, han proporcionado información para la identificación de un elemento río arriba de la secuencia HSE, el elemento PDS (*Post Diauxic Shift*) que regula la expresión de los genes que se expresan durante la aproximación a la fase estacionaria y en fase estacionaria.

El papel de la vía de transducción de señales Ras-cAMP en la termotolerancia.

Las cinasas de proteínas dependientes de cAMP juegan un papel muy importante en respuesta al ayuno (Gibbs y Marshall 1989), incluyendo la regulación de la expresión de algunas hsp's. Los niveles de cAMP son regulados por la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa de cAMP. La adenilato ciclasa, codificada por el gen *CYR1*, es regulada por Ras1p y Ras2p (proteínas "G" monoméricas). Cuando las proteínas Ras son activadas, se incrementan los niveles intracelulares de cAMP, provocando una regulación negativa sobre la subunidad regulatoria de la cinasa de proteínas de cAMP (codificada por *BCY1*), esto hace que BCY1 se desprege de la subunidad catalítica TPK1 provocando su activación. Los niveles de cAMP disminuyen bajo condiciones de limitación de nutrientes, resultando como consecuencia la inactivación de las proteínas cinasas dependientes de cAMP por unión de la subunidad regulatoria BCY1 a la subunidad catalítica TPK1.

Mutaciones que afectan la vía de regulación para la síntesis de cAMP, exhiben una expresión alterada de las hsp's y de sus niveles de termotolerancia. Iida y Yahara (1984) aislaron mutantes termotolerantes constitutivas a las cuales les llamaron *hsr1*. Años más tarde, se aislaron mutantes en la adenilato ciclasa (*cyr1*), estas mutantes presentan termotolerancia constitutiva (Shin *et al.*, 1987), posteriormente se determinó que CYR y HSR1 son alélicas (Iida, 1988). En contraste a las mutantes en la adenilato ciclasa, células de levadura portadoras de mutaciones en *bcy1*, nunca llegan a ser termotolerantes aún en periodos prolongados de crecimiento (Toda *et al.*, 1987). Los genes *UBI4* y *SSA3* han mostrado que son regulados por calor y cAMP (Tanaka *et al.*, 1988, 1989; Werner-Washburne *et al.*, 1989). Ambos genes son inducidos cuando los niveles de cAMP son bajos y ninguno de los dos es inducido durante largos períodos de crecimiento en mutantes *bcy1*. La misma región promotora de *SSA3* es necesaria para la inducción de este en fase estacionaria de crecimiento y es responsable de la inducción de *SSA3* cuando los niveles de cAMP son bajos. Por otro lado la inducción durante la aproximación a la fase estacionaria de crecimiento es debida a bajos niveles de cAMP. Esto trae como consecuencia una disminución en la actividad de las proteínas cinasas dependientes de cAMP.

Al parecer la inducción es por una vía alterna al de la activación por el factor de transcripción en respuesta al estrés por calor (HSTF). Existen evidencias de que las proteínas cinasas dependientes de cAMP están involucradas en la respuesta al estrés por calor. Por ejemplo, la termotolerancia no es inducida en células mutantes *bcy1* durante la aproximación a la fase estacionaria o después de un choque térmico. Esto puede ser porque las cinasas de proteínas dependientes de cAMP controlan negativamente la expresión de las hsp's críticas para la termotolerancia y otros factores y no a través de HSTF. Shin *et al.*, (1987) reportaron que células mutantes *bcy1* expuestas a una temperatura supraóptima no letal expresan algunas hsp's entre ellas Hsp72a, Hsp72b y Hsp41 y no presentan termotolerancia ante una exposición a una temperatura letal.

El ayuno y la aproximación a la fase estacionaria provocan que las células se paren en G0 del ciclo celular (Iida y Yahara 1984a). Al parecer este arresto en G0 está relacionado con la adquisición de la termotolerancia.

El choque térmico a una temperatura supraóptima no letal provoca que células de levadura se arreten transitoriamente en la fase G0 del ciclo celular, de igual manera estas células se vuelven termotolerantes.

Mutantes de ciclo celular *cdc25*, *cdc33* y *cdc35* muestran un fenotipo termotolerante cuando se exponen a 37°C por largos períodos de tiempo debido a que su función codificada es sensible a calor quedando arrestadas en la fase G0 del ciclo celular. Estas mutantes mantienen un alto nivel de termotolerancia cuando se les expone a 50°C previa inducción a 37°C por varias horas (Plesset *et al.*, 1987). La progenitora silvestre de estas mutantes alcanza los máximos niveles de termotolerancia a 50°C durante los primeros 60 minutos de incubación a 37°C. Pasados los 60 minutos comienza a disminuir su nivel de termotolerancia (Plesset *et al.*, 1987).

ANTECEDENTES.

En el laboratorio del Dr. Jorge Nieto estamos interesados en dilucidar los mecanismos involucrados en la termotolerancia intrínseca de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para este propósito se mutagenizó a la cepa silvestre W303a con EMS (Etil Metano Sulfonato) en un cultivo líquido separándolo en un total de 40 alícuotas. Posteriormente se tomaron fracciones de 5 alícuotas diferentes (9, 10, 11, 12 y 13) y se les dieron cinco ciclos de enriquecimiento con choques letales a 50°C, obteniendo 13 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada, ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT5, ScIBT6, ScIBT7, ScIBT8, ScIBT9, ScIBT11, ScIBT12, ScIBT14, ScIBT15 y ScIBT16 (Folch *et al*, 1995; Nieto-Sotelo *et al*, 1997). Algunas de las mutantes presentaron tamaño de colonia chico, otras casi silvestre y otras son de tamaño de colonia silvestre (Folch *et al*, 1995). Posteriormente se seleccionaron 3 mutantes más por eventos de reversión espontánea de tamaño de colonia chico a grande de tres de las mutantes originales (ScIBT1 dió origen a ScIBT4, ScIBT2 dió origen a ScIBT10 y ScIBT11 originó a ScIBT13), lo cual dió un total de 16 mutantes termotolerantes constitutivas (ScIBT1....ScIBT16). Estas mutantes presentan diferentes grados de termotolerancia constitutiva, que va de 10 a varios miles de veces en relación a la cepa silvestre. Prosiguiendo con la nomenclatura propuesta por Iida y Yahara (1984) para una mutante con termotolerancia intrínseca elevada al cual llamaron *hsr1* (proveniente del Inglés *heat shock response*) se decidió llamar a las mutantes ScIBT como mutantes *hsr*. También se observan diferencias en las tasas de crecimiento de varias de estas mutantes *hsr* (Folch *et al*, 1995; Nieto-Sotelo *et al*, 1997). En general las mutantes más termotolerantes (1000X), muestran tiempos largos de duplicación, mientras que las de mediana y baja termotolerancia muestran tiempos de duplicación más cercanos al de la cepa silvestre. En la mayoría de los casos los tiempos de duplicación muestran una relación directa con el nivel de termotolerancia. El análisis genético preliminar de estas mutantes indicó que las mutaciones son recesivas para la mayoría de los casos con excepción de dos que resultaron ser codominantes. En la mayoría de los casos estudiados el análisis de tétradas (con un ensayo de termotolerancia cualitativo) sugirió que las mutaciones podían ser nucleares y monogénicas (Folch *et al*, 1995; Nieto-Sotelo *et al*, 1997).

OBJETIVOS.

Ojetivo general: Hacer una análisis genético y molecular de los mecanismos que intervienen la termotolerancia intrínseca de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos particulares:

1) Determinar los grupos de complementación para las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada en fase logarítmica aisladas previamente en el laboratorio del Doctor Jorge Nieto Sotelo.

2) Determinar los niveles de termotolerancia de las mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada en diferentes estadios de crecimiento en cultivos líquidos.

3) Hacer un análisis de la reversión del tamaño de colonia de chico a grande en las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada.

4) Determinar si la proteína hsp104 juega algún papel en la termotolerancia intrínseca elevada y en el alto porcentaje de reversión de la mutante ScIBT2.

5) Hacer uso de las secuencias de un promotor sintético de genes de *heat shock* fusionados al gen reportero *LacZ* para determinar si la mutante ScIBT2 está alterada en alguna de las vías de transducción de señales de respuesta al estrés.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico:

Cepas de *Escherichia coli*:

DH5 α *F'*_{f_M15(lacZ-argF)} U169 *deoR recA1 endA1 hsd17 (rkmk⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1/f proAB⁺ lacI_{qZ}_M15 zzf::Tn5 [Km^R].*

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* :

W303a *Mat a ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1::LEU2*
W303-6B *Mat α ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1.*
W303 Δ *hsp104* *Mat a ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 Δ hsp104::LEU2.*
ScIBT1 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr4-1::LEU2*
ScIBT2 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3 1::LEU2*
ScIBT3 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-1::LEU2*
ScIBT4 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr4-2::LEU2*
ScIBT5 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr1-2::LEU2*
ScIBT6 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-2::LEU2*
ScIBT7 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-3::LEU2*
ScIBT8 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr5-1::LEU2*
ScIBT9 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-4::LEU2*
ScIBT10 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-2::LEU2*
ScIBT11 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-5::LEU2*
ScIBT12 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-6::LEU2*
ScIBT13 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-7::LEU2*
ScIBT14 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr6-1::LEU2*
ScIBT15 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-8::LEU2*
ScIBT16 *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-9::LEU2*
SC0012* *Mat α ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr5-1*
SC0013** *Mat α ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1*
SC0014*** *Mat α ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr2-2*
SC0017**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0018**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0019**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0020**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0021**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0022**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0023**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
SC0024**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*

SC0025**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0026**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0027**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0028**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0029**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0030**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0031**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0032**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0033**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0034**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0035**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 SC0036**** *Mat a ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1::LEU2*
 JF090 \square *Mat ? ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3 1 hsp104::LEU2*
 JF091 \square *Mat ? ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3 1 hsp104::LEU2*
 JF092 \square *Mat ? ade-1 can1-110 tis3-11 15 leu2-3 112 ura3-1*
 JF093 \square *Mat ? ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1*
 JF102 \square *Mat ? ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1 hsp104::LEU2*
 JF103 \square *Mat ? ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3 1*
 JF104 \square *Mat ? ade-1 can1-110 trp1-1 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1 hsr3-1 hsp104::LEU2*
 JF105 \square *Mat ? ade-1 can1-110 his3-11 15 leu2-3 112 ura3-1*
hsr1 *Mat α ade-1 ura1 his7 lys2 tyr1 gal1 hsr1*

* Derivada de ScIBT8 X W303

** Derivada de ScIBT2 X W303-6B

*** Derivada de ScIBT6 X W303-6B

**** Derivadas de ScIBT2 por eventos de reversión independientes de tamaño de colonia chico a grande.

\square Derivada de ScIBT2 X W303 Δ *hsp104*

Plásmidos:

YCP50 *URA3 CEN4 ARS1 ori bla tet* (Rose et al., 1987).

P β 11 *URA3 2 μ ARS1 HSP26::HSE2(HSP70)::CYC1::LacZ ori bla*
 (Slater and Craig, 1987; Guarente y Ptashne, 1981)

Medios de cultivo:

YPDA: Extracto de levadura al 1%, bacto-peptona al 2%, dextrosa al 2% y 40 mg/lt de sulfato de adenina.

Medio mínimo: Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos al 0.67%

(Difco), dextrosa al 2%, más los aminoácidos necesarios.

Medio de preesporulación: Extracto de levadura al 0.8%, bacto-peptona al 0.3%, agar bacteriológico al 2% y dextrosa al 10%.

Medio de esporulación: Acetato de potasio al 1%, extracto de levadura al 0.1%, agar bacteriológico al 2%, dextrosa al 0.05% y requerimientos al 25% de la concentración para el medio mínimo completo.

Medio LB: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%.

Cuando fue necesario utilizar medio de cultivo sólido, se adicionó agar bacteriológico Difco ó Fluka al 2%.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó a 110°C por 20 minutos.

Requerimientos de auxotrofia (aminoácidos y nucleótidos): Sulfato de adenina 40 mg/lt, uracilo 20 mg/lt, L-triptofano 20 mg/lt, L-Histidina-HCl 20 mg/lt y L-Leucina 30 mg/lt.

Protocolos para la determinación del nivel de termotolerancia intrínseca de cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*:

a) Método cuantitativo: 2 ml de medio de cultivo YPDA se inocularon con una colonia aislada de la cepa a trabajar y se incubaron a 25°C por 24 horas. De este precultivo se reinocularon 4 mililitros de medio de cultivo YPDA a una D. O 600nm de 0.05, se incubaron a 25°C y se llevaron a una D. O 600nm entre 0.4-0.6. Posteriormente, se tomaron 100 µl del cultivo y se hizo una dilucion 1/10,000 con agua destilada, se platearon 50 µl por duplicado en medio de cultivo sólido YPDA y se incubaron a 25°C por el tiempo necesario (entre 48 y 72 horas). El resto del cultivo se incubó a 50°C por 10 minutos e inmediatamente, se colocaron 5 minutos en

hielo para posteriormente hacer las diluciones adecuadas, dependiendo del nivel de termotolerancia, se platearon 50 μ l por duplicado en medio de cultivo s33lido YPDA y se incubaron a 25°C por el tiempo necesario (entre 48 y 72 horas). Una vez que fueron visibles las colonias, se contaron preferencialmente en aquellas cajas que conten33an un n33mero entre 30 y 300 colonias. Para determinar el porcentaje de sobrevivencia, se multiplic33 el n33mero de colonias contadas en la condici33n de 50°C por 100 y el resultado se dividi33 entre el n33mero de unidades formadoras de colonia contadas para la condici33n a 25°C, tomando en cuenta las diluciones efectuadas.

b) M33todo cualitativo: 2 ml de medio de cultivo YPDA fueron inoculados con una colonia aislada de la cepa a trabajar y se incubaron a 25°C por 24 horas. Al d33a siguiente, se inocularon 4 mililitros de medio de cultivo YPDA con el precultivo a una D. O 600nm de 0.05, se incubaron a 25°C y se llev33 a una D. O 600nm entre 0.4-0.6. Posteriormente, se tomaron 100 μ l del cultivo, se hicieron diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000 con agua destilada, se gotearon 3 μ l de cada diluci33n en orden descendente en medio de cultivo s33lido YPDA por duplicado y se incubaron a 25°C por el tiempo necesario (entre 48 y 72 horas). El resto del cultivo se incub33 a 50°C por 10 minutos e inmediatamente, se coloc33 5 minutos en hielo para posteriormente, gotear 3 μ l del cultivo sin diluir y enseguida, se hicieron diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10, 000, se gotearon 3 μ l de cada diluci33n en orden descendente en medio de cultivo s33lido YPDA y se incubaron a 25°C por el tiempo necesario (entre 48 y 72 horas). Finalmente, se determin33 visualmente la presencia o ausencia de colonias en las diferentes diluciones a 50°C, se compararon con las cajas control (25°C) y se determin33 el nivel de termotolerancia de una manera cualitativa.

Determinaci33n de porcentaje de reversi33n de tama33o de colonia chico a grande.

4 ml de medio de cultivo YPDA fueron inoculados con una colonia aislada y fresca de la cepa a trabajar, se incubaron a 25°C y se llev33 a una D. O 600nm entre 0.4-0.6. Se hicieron diluciones 1/10, 1/100, 1/1,000 y 1/10,000, se platearon por duplicado 50 μ l de cultivo sin diluir y 50 μ l por duplicado de las diferentes diluciones en medio de cultivo s33lido YPDA. Como control de tama33o de colonia se incluy33 en

paralelo a la cepa silvestre (W303a), plateando en medio de cultivo sólido YPDA las mismas diluciones que las cepas experimentales. Se incubaron a 25°C por el tiempo necesario (entre 48 y 96 horas), se eligieron las cajas con la dilución y el tiempo de crecimiento adecuados para el conteo de las revertantes, ya que se observó que densidades poblacionales elevadas reducen el tamaño que alcanzan las colonias de una misma cepa y que las incubaciones prolongadas llevan a las colonias de diferentes cepas a alcanzar el mismo tamaño. Posteriormente se hizo el cálculo de la reversión multiplicando el número de unidades formadoras de colonia revertantes detectadas por cien, se dividió entre el número de unidades formadoras de colonia totales y se expresaron los valores de reversión en porcentaje.

Aislamiento de revertantes independientes de tamaño de colonia chico a grande (no hermanas):

20 colonias chicas fueron inoculadas cada una en 4 ml de medio de cultivo YPDA, se incubaron a 25°C con agitación y fueron crecidas a saturación. Se hizo una dilución 1/1,000 de cada cultivo y se platearon por separado en medio de cultivo sólido YPDA. Se incubaron a 25°C por el tiempo necesario (entre 48 y 72 horas). Se eligió una colonia grande de cada evento y se creció en medio de cultivo sólido YPDA para checar el tamaño de colonia, comparando con la cepa mutante original y la cepa silvestre. Posteriormente se midió el nivel de termotolerancia intrínseca a cada una de las revertantes.

Obtención de diploides de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Con un asa microbiológica se tomó una colonia chica de las cepas a cruzar con factor de apareamiento diferente (a ó α) y con marcadores de auxotrofia complementarios y se dejaron crecer a 25°C por el tiempo adecuado (de 48 a 98 horas). Posteriormente se tomó una asada pequeña de las dos cepas haploides y se inocularon en medio de cultivo sólido YPDA, se mezclaron con el asa microbiológica y se incubaron a 25°C por 24 horas. Para purificar los diploides se tomó una asada pequeña de la mezcla de las cepas haploides, se estrió en medio mínimo de selección (sin los requerimientos de complementación), se incubaron a 25°C por el tiempo

necesario y se seleccionaron como diploides aquellas que crecieron en el medio mínimo de selección.

Transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por el método de acetato de litio (Modificado de Schiestl and Gietz *et al.*, 1992).

50 ml de medio YPDA fueron inoculados con 4 colonias por cada 4 ml de medio de cultivo para el caso de las mutantes que revierten de tamaño de colonia chico a grande y para el caso de la cepa silvestre a partir de un precultivo de 24 horas a una D. O_{600nm} de 0.05, se crecieron a una D. O_{600nm} de 0.8. Se transfirió el cultivo a un tubo falcon, se centrifugó a 2000 rpm por dos minutos en una centrífuga clínica, se decantó el sobrenadante, se lavaron las células dos veces en 25 ml 1X TELiOAc {Preparado a partir de: TE 10X (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.01 M, pH 7.5) y 10X LiOAc (1 M LiOAc pH 7.5 ajustado con ácido acético)}, se centrifugaron durante dos minutos a 2000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el líquido residual. Se adicionaron en el orden siguiente: 25 µl de DNA de esperma de salmón a una concentración de 10 mg/ml en TE pH 7.5, 10 µg de DNA del plásmido, 5 ml de PEG 4,000 al 50% (PEG 4,000 al 50% en 1X TELiOAc, filtrado y almacenado a 4°C), se mezclaron bien y se incubaron a 25°C por 30 minutos. Posteriormente se incubaron a 42°C por 20 minutos, se centrifugaron 2 minutos a 2000 rpm, se lavaron 2 veces con medio mínimo sin requerimientos, se resuspendieron en 2 ml de medio mínimo sin requerimientos. Finalmente se platearon 200 µl de la mezcla de transformación en medio mínimo selectivo y se incubaron a 25°C por el tiempo necesario.

Extracción de DNA genómico de levadura.

2 ml de medio de cultivo YPDA fueron inoculados con una colonia aislada de la cepa a trabajar y se incubaron a 25°C por 24 horas. Este precultivo se inoculó a 50 ml de medio de cultivo YPDA a una D. O_{600nm} de 0.05, se incubó a 25°C y se llevó a una D. O_{600nm} de 4.0 (saturación). Se centrifugó el cultivo en tubos estériles de polipropileno de 17X100 mm a 3,000 rpm por 5 minutos en una centrífuga clínica a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 2.5 ml de agua bidestilada, se transfirieron las células a 5 tubos de microcentrífuga, se

centrifugaron por 5 segundos a temperatura ambiente, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células por agitación suave. Se agregaron por tubo 0.2 ml de buffer de lisis (Tritón 2%; SDS 1%; NaCl 100mM; Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM y EDTA, pH 8.0, 1mM), 0.2 ml de perlas de vidrio, 0.2 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se agitaron fuertemente durante 3 minutos. Se adicionaron 0.2 ml de buffer TE (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.01 M, pH 7.5) y se agitaron suavemente. Se centrifugaron 5 minutos a 15,000 rpm en una microcentrífuga, se transfirió la fase acuosa a tubos de microcentrífuga limpios, se adicionó 1.0 ml de etanol 100%, se mezcló por inversión, se centrifugaron 3 minutos a 15,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 0.4 ml de buffer TE. Se agregaron 30 µl de RNAsa (1 mg/ml), se incubó a 37°C por 30 minutos, se agregaron 10 µl de acetato de amonio 4.0 M, 1.0 ml de etanol 100%, se mezcló por inversión, se centrifugó 3 minutos a 15,000 rpm, se decantó el sobrenadante, se secó el botón, se resuspendió en 0.2 ml de buffer TE, se dieron tres extracciones fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente se resuspendieron en 0.1 ml de buffer TE. Cuando fue necesario previamente a la lisis se agregaron 5 µl de liticasa a los cultivos, se incubaron 60 minutos a 37°C para eliminar la pared celular.

Extracción de DNA plasmídico usando columnas de intercambio aniónico (Maxipreparaciones para obtener de DNA plasmídico) (Qiagen™).

5 ml de medio de cultivo LB fueron inoculados con una colonia de la cepa (*E. coli*) que contiene el plásmido y se incubaron a 37°C por 24 horas. Al día siguiente se reinocularon 500 ml de medio de cultivo LB con 5 ml del precultivo, se llevó a saturación y se centrifugaron las células con el uso de un rotor JA-10 por 15 minutos a 6,000 rpm a 4°C. Se resuspendió el botón en 10 ml de buffer **P1** con RNAsa, se pasó a un tubo estéril de polipropileno de 17X100 mm, se adicionaron 10 ml de buffer **P2**, se agitó suavemente por inversión (6 veces), se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 10 ml de buffer **P3** frío y se incubó en hielo por 20 minutos. Se centrifugó con el uso de un rotor JA-20 por 30 minutos a 12,000 rpm a 4°C. Se equilibró la columna (**Maxi**) agregando 10 ml de buffer **QBT** y se vació por gravedad, se puso el sobrenadante del paso anterior en la columna y se vació por

gravedad. Se lavó dos veces la columna aplicando 30 ml de buffer **QC**, se eluyó el DNA agregando 15 ml de buffer **QF**, recuperándolo en un tubo limpio, se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, se centrifugó inmediatamente 30 minutos a 12,000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante. Finalmente se agregaron 2 veces 5 ml de etanol al 70%, se decantó, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 300 µl de buffer TE (Ver Qiagen® Plasmid Handbook).

Determinación de proteína por el método de Bradford (Microensayo) (Bio-Rad™).

Se prepararon cuatro soluciones del standard de proteína (BSA): 10 µg/ml; 5 µg/ml; 2.5 µg/ml y 1.25 µg/ml. El rango lineal del ensayo para BSA esta entre 1.2 a 10 µg/ml. Se colocaron por duplicado en un tubo 800 µl de cada dilución de la muestra standard ó de las muestras problema en un tubo limpio y seco. Después se agregó a cada tubo 200 µl del colorante concentrado (Bio-Rad) y se agitó vigorosamente. Posteriormente se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente para finalmente medir la absorbancia a 595 nm (ver manual Bio-Rad protein assay).

Determinación de la actividad específica de β-galactosidasa (Rose y Bostein, 1983).

A partir de un precultivo de toda la noche, crecido en el medio adecuado (medio mínimo-glucosa) a 25°C de las cepas a determinar, se inocularon 50 ml de medio mínimo-glucosa a una D.O_{600nm} de 0.05, se pusieron en agitación a 25°C hasta alcanzar una D. O_{600nm} entre 0.4-0.5, en este punto se tomaron 5 ml de cultivo para posteriormente realizar los pasos siguientes del ensayo. El resto del cultivo se incubó a 39°C por diferentes tiempos (60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos) y se tomaron alícuotas de 5 ml en cada punto. Inmediatamente después de colectar las muestras se pusieron en hielo 5 minutos, posteriormente se cosecharon las células por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. Se tiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en 250 µl de buffer de ruptura (Tris-Cl 100 mM, pH 8.0; Dithiothreitol 1mM y glicerol al 20%), las células se congelaron a -20°C en ese momento. Para realizar el ensayo se descongelaron las células en hielo y se agregaron

perlas de vidrio (0.45 a .5 mm de diámetro) justo debajo del menisco formado por el líquido, se adicionaron 12.5 μ l de PMSF (40 mM en isopropanol al 100%). Se agitaron las muestras en un "vortex" varias veces y se pusieron en hielo durante la agitación. Se adicionaron 250 μ l de buffer de ruptura, se mezclaron bien, posteriormente se extrajo la parte líquida con una micropipeta de 1 ml y se colocó en tubos eppendorff de 1.5 ml, se centrifugaron en una microcentrífuga a 13,000 rpm por 15 minutos para eliminar los restos celulares y se procedió a realizar el ensayo de β -galactosidasa.

Por cada condición experimental se adicionó a un tubo 0.01-0.1 ml de cultivo y 0.9 ml de buffer Z (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM de KCl, 1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM de β -mercaptoetanol, a pH 7.0) y se ajustaron a 1 ml con buffer de ruptura y se agitó vigorosamente. Se dejaron reposar las muestras cinco minutos a 28°C. Se agregaron 0.2 ml de ONPG (ortonitrofenolgalactósido) (4 mg/ml preparado en buffer Z a pH 7.0) a cada tubo y se agitaron vigorosamente los tubos. La reacción se paró con 0.5 ml de Na_2CO_3 1 M. Se leyó la D. O. a 420 nm de los tubos de reacción. Se hizo la determinación de proteína por el método de Bradford y la actividad se reportó como ng de ONPG oxidado por minuto por mg de proteína a 28°C.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se utilizó el kit GENE CLEAN[®] II BIO 101. En este método se aprovecha la capacidad del vidrio para adherir el DNA por carga eléctrica (Vogelstein y Gillespie, 1979).

Se corrió un gel de agarosa con el DNA a purificar, se cortaron las bandas seleccionadas de acuerdo al patrón de peso molecular dados por λ Hind III y se colocaron en un tubo eppendorf, se le añadieron 3 volúmenes de yoduro de sodio 6 M y se incubó a 65°C hasta que se disolvió completamente la agarosa. Se añadieron 10 μ l de glass powder (gránulos de vidrio) y se mezcló en un vortex, se incubó en hielo 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 2 minutos en frío y se guardó el sobrenadante por si el DNA hubiera quedado allí. Al tubo con la pastilla de

vidrio, se le añadieron 500 μ l de buffer de lavado frío y se agitó en vórtex, se centrifugó 2 minutos a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se lavó 2 veces más y posteriormente se resuspendió en 30 μ l de agua bidestilada estéril, se incubó a 42°C por 5 minutos. Para verificar la banda purificada, se corrió un gel 1% con una alícuota de la muestra.

Marcaje de la sonda por el método de iniciadores al azar “Random primer”, (Amersham™).

Mezcla de reacción. La mezcla se preparó en un tubo eppendorf en el orden siguiente: se desnaturalizaron 10 μ l de la sonda de DNA (25 μ g/ml) por calentamiento a 95°C por dos minutos, se puso en hielo, se agregaron 10 μ l de buffer (solución 1), 4 μ l de dATP, dTTP, dGTP no radiactivos (solución 1a-1d), 5 μ l de buffer (solución 1e), 5 μ l de cebador (solución 2), 1 μ l de agua bidestilada, 5 μ l de [α -³²P] dCTP, 2 μ l de enzima (solución 3), se mezcló cuidadosamente con una micropipeta, se centrifugó por 3 segundos en una microcentrífuga, se incubó a 37°C por 30 minutos en un termoblock. Finalmente se verificó que el porcentaje de incorporación del nucleótido radioactivo fuera el adecuado (75%-80%) y que la actividad específica fuera la recomendada en el protocolo (2×10^9 dpm/ μ g de DNA) (Ver *Multiprime DNA labeling systems handbook*, Amersham).

Hibridación DNA-DNA (Southern blot).

La hibridación DNA-DNA, se realizó según Southern (1975). Primeramente se corrió un gel de agarosa al 1% con las muestras de DNA cromosomal digerido con enzimas de restricción. El gel fue teñido con bromuro de etidio, se tomó una fotografía del gel con una regla milimétrica alineada con alguno de los carriles, para determinar la distancia de migración. Posteriormente se calcularon los pesos moleculares de las bandas en base a los marcadores de peso molecular dados por λ Hind III.

a) Desnaturalización del gel:

El gel fue colocado en 5 volúmenes de una solución 0.25 M de HCl con agitación suave durante 15 minutos. En seguida se colocó el gel en 5 volúmenes de

una solución NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M por 20 minutos con agitación suave a temperatura ambiente por dos veces.

b) Neutralización del gel:

El gel fue colocado en una solución Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M pH 7.5 por 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave por dos veces.

c) Transferencia del DNA:

El gel fue colocado en una cámara de transferencia con solución SSC 20X, en seguida se colocó sobre el gel un filtro de *nylon* del mismo tamaño, se montó la torre de transferencia con filtro *Whattman* y papel absorbente, se dejó transfiriendo toda la noche. Posteriormente se secó el filtro a temperatura ambiente y se fijó el DNA dando dos pulsos con el *Stratalinker* en *autolink*.

d) Prehibridación de la membrana:

Soluciones: Formamida 50%, SSPE 6X (NaCl 3 M, NaH₂PO₄·H₂O, NA₂EDTA 0.002M, pH 7.4), Denhardt 5X, SDS 1%, DNA de esperma de arenque 10 mg/ml.

El filtro fue colocado en un tubo de hibridación con solución de prehibridación. Se utilizaron 20 µl de DNA de esperma de arenque por cada ml de solución de prehibridación; este se hirvió previamente por 10 minutos para su desnaturalización, inmediatamente se colocó en hielo, después se adicionó la solución de prehibridación al tubo de hibridación con el filtro y se dejó toda la noche a 42°C.

e) hibridación de la membrana:

Se utilizaron las mismas soluciones que en la prehibridación pero en un 1/2 del volumen original y además se le adiciona la sonda marcada, previamente desnaturalizada por ebullición y se dejó hibridando toda la noche a 42°C.

f) Lavado del filtro:

Para una alta astringencia se lavó 2 veces en una solución SSC 5X, SDS 5% durante 5 minutos, después se lavó con una solución SSC 0.1X, SDS 1%, durante 30 minutos, finalmente se lavó una vez con una solución SSC 2X durante 5 minutos.

La membrana fue expuesta en una placa de rayos X por el tiempo conveniente y se reveló.

RESULTADOS

I) Determinación de grupos de complementación en los mutantes *hsr*.

Con la finalidad de explorar el posible alelismo entre las 16 mutantes termotolerantes (Folch *et al*, 1995; Nieto-Sotelo *et al*, 1997) *hsr*, se procedió a determinar los grupos de complementación. Estas pruebas revelaron la existencia de 6 grupos de complementación (Figura 2). Dado que todas las mutantes aisladas tienen el factor de apareamiento a , se decidió obtener una cepa derivada de la mutante ScIBT6 con factor de apareamiento α y así poder realizar cruza entre esta mutante y las demás. El diploide resultante de la cruza ScIBT6 a X W303-6B α se esporuló y de los productos meióticos, se eligió a la cepa haploide SC0014, por presentar factor de apareamiento α , marcadores de auxotrofías complementarios a la cepa progenitora de los mutantes ScIBT para la selección de diploides en medio mínimo y con un nivel de termotolerancia semejante al de la mutante parental ScIBT6. Posteriormente, se cruzó SC0014 por las 16 mutantes termotolerantes originales, para determinar el posible alelismo que pudiera existir entre ellas y SC0014. Aquellas diploides que presentaron un nivel de termotolerancia semejante al de la cepa silvestre, complementandose la función de los genes mutantes recesivos correspondientes, se les consideró como mutaciones no alélicas. Las diploides cuyo nivel de termotolerancia fue igual o mayor al de las cepas mutantes termotolerantes involucradas en la cruza, se clasificaron como alélicas, ya que al no haber complementación del gen mutante se dedujo que la mutación se encuentra en el mismo locus (Figura 1). El primer grupo, se determinó por medio de un análisis cualitativo de termotolerancia (ver materiales y métodos); los resultados indican que 8 de las mutantes (ScIBT3, ScIBT7, ScIBT9, ScIBT11, ScIBT12, ScIBT13, ScIBT15 y ScIBT16) son alélicas a la mutante ScIBT6, en tanto que las otras 7 no lo son (ScIBT1, ScIBT2, ScIBT4, ScIBT5, ScIBT8, ScIBT10 y ScIBT14) (Figura 3). Es importante aclarar que aunque el la figura 3 no es muy claro el fenotipo del diploide ScIBT6XScIBT7, hubo otros dos experimentos donde si se aprecia claramente que son mutaciones alélicas. Para el siguiente grupo, se seleccionó a la cepa haploide SC0013 α derivada de la mutante ScIBT2 a . Se hicieron cruza entre SC0013 α y las mutantes ScIBT1, ScIBT2, ScIBT4, ScIBT8, ScIBT10 y ScIBT14.

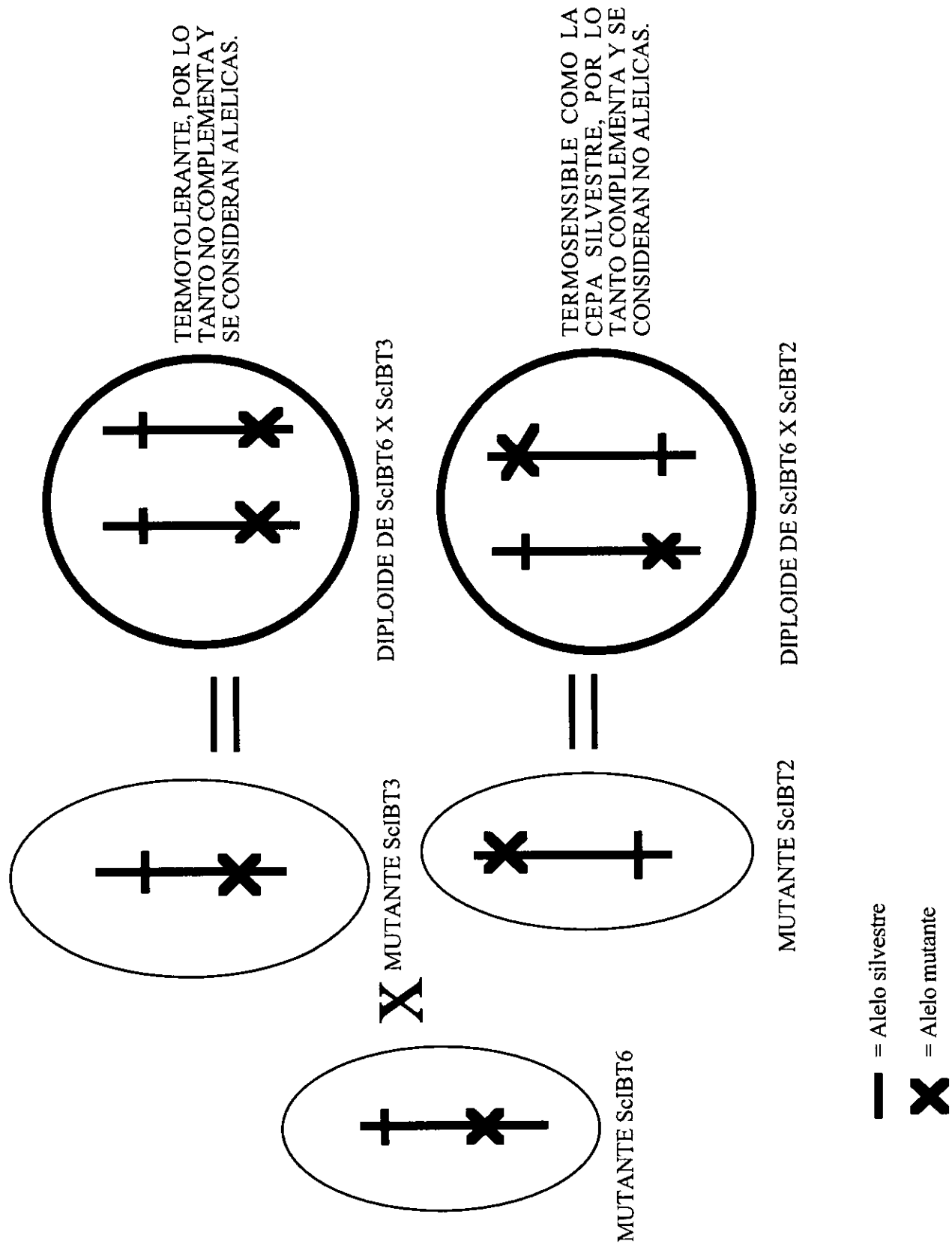


Figura 1. Diagrama que muestra el criterio utilizado para definir el alelismo entre mutantes recesivos *hsr*.

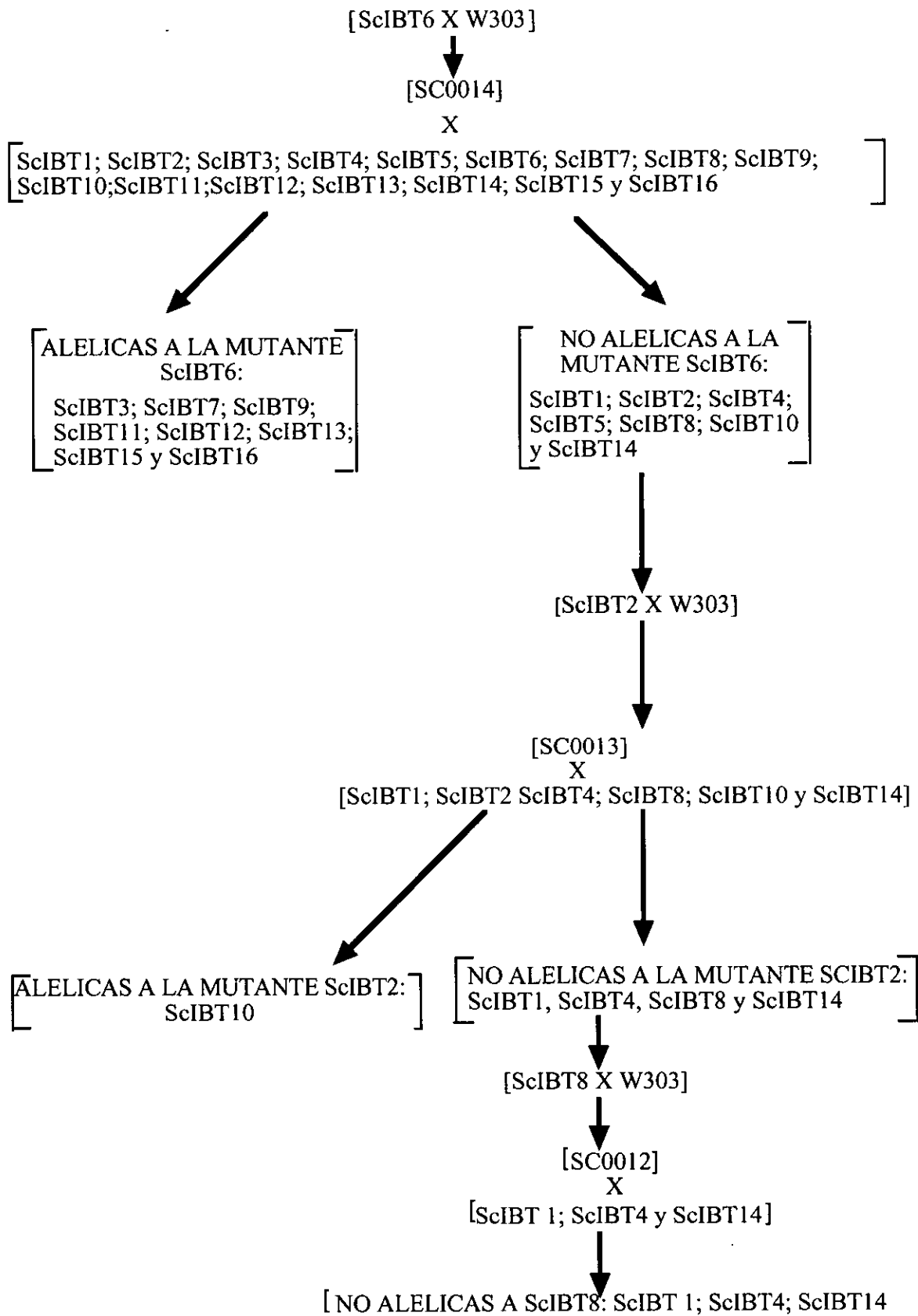


Figura 2. Diagrama de flujo utilizado para definir los grupos de complementación de las mutantes *hsr*.

El fenotipo de los heterocigotos resultantes de esta cruce fue determinado por medio de un análisis de termotolerancia cualitativo (ver materiales y métodos) para las mutantes ScIBT2, ScIBT8, ScIBT10 y ScIBT14 y por el método cuantitativo para las mutantes ScIBT1 y ScIBT4 (Tabla 2A) debido a que el método cualitativo no nos permitió observar diferencias entre los diploides heterocigotos generados y sus controles haploides. Los resultados de estos experimentos indicaron que solamente la mutante ScIBT10 es alélica a la mutante ScIBT2, esto era de esperarse ya que la mutante ScIBT10 se originó de un evento de reversión de tamaño de colonia de chico a grande. Cabe añadir que de acuerdo a estudios llevados a cabo previamente (Nieto-Sotelo *et al*, 1997) únicamente la mutante ScIBT5 resultó ser alélica a la mutante *hsr1* (Iida y Yahara, 1984)(de sus siglas en inglés: *heat shock response*) proporcionada por el Dr. Hidetoshi Iida, por lo cual ya no se incluyó en experimentos subsiguientes. Para definir al siguiente grupo de complementación se eligió a la cepa haploide SC0012 α (derivada de la mutante ScIBT8a) y se cruzó con las mutantes ScIBT1, ScIBT4 y ScIBT14. Posteriormente se determinó el alelismo por el método cuantitativo obteniendo como resultado que la mutante ScIBT14 no es alélica a la mutante ScIBT8 (Tabla 2B). Los resultados obtenidos para las cruces de SC0012 α por ScIBT1 y ScIBT4 no son confiables ya que presentaron valores por arriba de lo que consideramos codominante, aunado a estos resultados, recientes análisis de tétradas realizados por Folch, J. y Ventura, L. (datos sin publicar) han demostrado que las mutantes ScIBT1 y ScIBT8 presentan más de una mutación.

II) Análisis de la termotolerancia intrínseca durante las diferentes fases del desarrollo en cultivos líquidos de la cepa silvestre W303 y de las mutantes W303 $\Delta hsp104$, ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT8, ScIBT14 y *hsr1*.

Los cultivos de levadura en medio líquido progresan de fase exponencial de crecimiento a fase estacionaria mostrando considerables variaciones en la termotolerancia al efecto letal del calor. Las células de levadura son muy termosensibles en la fase logarítmica de crecimiento en contraste, las células de levadura que llegan a la fase estacionaria, son muy termotolerantes

Mutante	Alelo	Tolerancia absoluta	Tamaño de colonia	Reversión de chica a grande	Grupo	
SCIBT5	<i>hsr1-2</i>	15.1 ± 6.5	casi silvestre	<3X10 ⁻³	I	
ScIBT3	<i>hsr2-1</i>	34.3 ± 2.8	chica	4X10 ⁻³	II	
ScIBT6	<i>hsr2-2</i>	2.74 ± 1.6	silvestre	N.D.		
ScIBT7?	<i>hsr2-3</i>	3.1 ± 1.6	chica	<1X10 ⁻³		
ScIBT9	<i>hsr2-4</i>	4.0 ± 1.8	silvestre	N.D.		
ScIBT11*	<i>hsr2-5</i>	7.0	silvestre	N.D.		
ScIBT12	<i>hsr2-6</i>	1.0 ± 0.3	chica	< 8X10 ⁻⁴		
ScIBT13	<i>hsr2-7</i>	1.3 ± 0.4	chica	< 3X10 ⁻⁴		
ScIBT15	<i>hsr2-8</i>	0.9 ± 1.0	casi silvestre	< 7X10 ⁻³		
ScIBT16	<i>hsr2-9</i>	0.2 ± 0.07	silvestre	N.D.		
ScIBT2	<i>hsr3-1</i>	56.0 ± 2.9	chica	7X10 ⁻³		III
ScIBT10	<i>hsr3-2</i>	5.0	silvestre	N.D.		
ScIBT1	<i>hsr4-1</i>	60.5 ± 15.5	chica	1X10 ⁻³		IV
ScIBT4	<i>hsr4-2</i>	30.6 ± 4.1	chica	6X10 ⁻³		
ScIBT8	<i>hsr5</i>	5.5 ± 4.8	silvestre	N.D.		V
ScIBT14	<i>hsr6</i>	1.0 ± 0.9	silvestre	N.D.		VI

TABLA 1. Mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* con alta termotolerancia intrínseca (50°C, 20')

*Contiene una auxotrofia adicional a la progenitora W303a *LEU+*, causada por EMS.

N.D. = No determinado ?= resultado dudoso

Los datos de termotolerancia absoluta son de por lo menos 3 experimentos para cada mutante. Para aquellas que no tienen desviación estandar no hay más que un dato

TABLA A:
CEPA % TERMOTOLERANCIA

W303	0.01
ScIBT1	89.7
ScIBT1 X W303	5.5
ScIBT2	28.2
ScIBT2 X W303	0.02
ScIBT4	76.1
ScIBT4 X W303	7.3
ScIBT2 X ScIBT2	22.8
ScIBT2 X ScIBT1	7.2
ScIBT2 X ScIBT4	6.7

TABLA B:
CEPA % TERMOTOLERANCIA

W303	0.02
ScIBT8	2.7
ScIBT8 X W303	0.02
ScIBT8 X ScIBT8	1.9
ScIBT14	0.7
ScIBT8 X ScIBT14	0.02

Tabla 2. Muestra los resultados de las pruebas de termotolerancia por el método cuantitativo para las cruza de las cepa silvestre W303 por las mutantes ScIBT1, ScIBT2, ScIBT4, ScIBT8 y ScIBT14, así como las cruza de ScIBT2 por ScIBT1, ScIBT4 y de la mutante ScIBT8 por las mutantes ScIBT2 y ScIBT14. Los resultados son el promedio de por lo menos 2 experimentos.

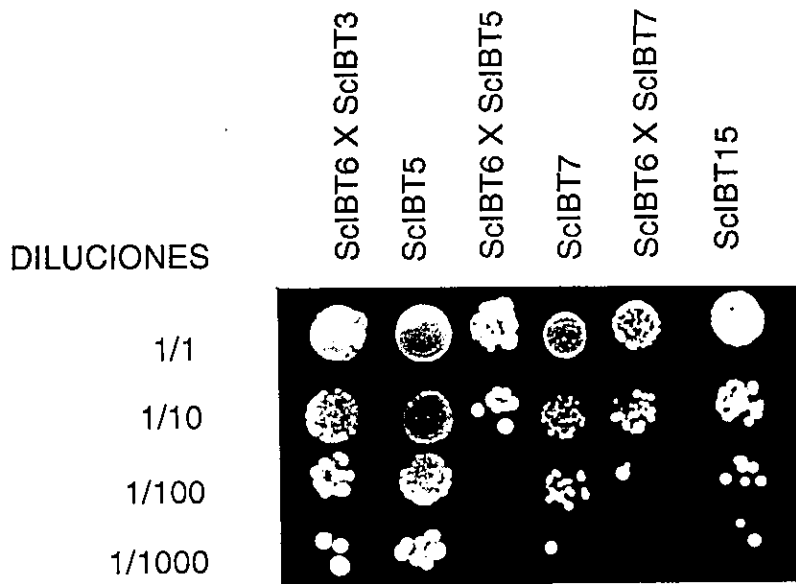
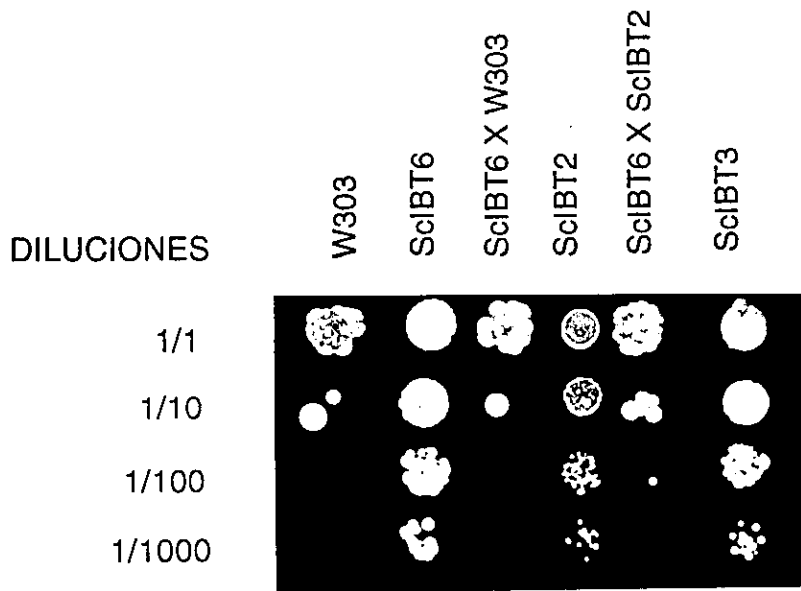


Figura 3. Ilustra la prueba de termotolerancia (50°C, 10') para las cruzas realizadas de la mutante SciBT6 por la cepa silvestre (W303) y por las mutantes SciBT2; SciBT3; SciBT5 y SciBT7 con sus respectivos controles haploides.

(Schenberg-Frascino y Moustacchi, 1972; Werner-Washburne, *et al.*, 1996); estas células se encuentran paradas en las fases G0 del ciclo celular. En un cultivo líquido en fase exponencial se distinguen dos fracciones celulares, las cuales presentan diferentes grados de resistencia a las temperaturas letales (50-52°C): a la primera fracción pertenecen las células que se encuentran gemando (fase S y G2) las cuales son más sensibles a choque térmico letal (50-52°C). La segunda fracción que corresponde a las células que no están gemando (se encuentran en fase G0 del ciclo celular) (Schenberg-Frascino y Moustacchi, 1972) son más termotolerantes. También se ha demostrado que la proteína hsp104 es necesaria para mantener los altos niveles de termotolerancia intrínseca en células de levadura que se encuentran en fase estacionaria; células portadoras de una mutación en el gen *HSP104* son muy sensibles a un choque térmico letal a 50°C (Sánchez, *et al.*, 1992).

Con la finalidad de caracterizar a nuestras mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada de fase logarítmica, se decidió hacer pruebas a lo largo de la cinética de crecimiento en cultivos líquidos para mutantes tomadas al azar: ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT8, ScIBT14 y para la cepa progenitora silvestre W303a. Además, se incluyó como referencia comparativa a las mutantes *hsr1* (Iida, 1984) y *W303Δhsp104* (Sánchez y Lindquist 1992).

Los análisis de termotolerancia intrínseca para las diferentes cepas, se hicieron en cultivos líquidos iniciados a una D.O_{600 nm} de 0.05. y se crecieron durante 200 horas a 25°C hasta fase estacionaria (8 días de crecimiento). La termotolerancia intrínseca se midió como la viabilidad después de incubar alícuotas del cultivo a 50°C por 10 minutos (choque térmico letal).

Los resultados de los análisis de termotolerancia intrínseca mostraron que la cepa silvestre W303 presenta diferentes niveles de termotolerancia a lo largo de su fase de crecimiento en cultivos líquidos (Figura 4a). En la fase exponencial (entre 0 y 12 horas de crecimiento) es muy sensible al choque térmico letal a 50°C (0.08-0.8% de sobrevivencia); a medida que el cultivo hace el cambio diáuxico y entra a la fase postdiáuxica temprana (entre 12 y 48 horas de crecimiento) incrementan su nivel de termotolerancia alcanzando un 8%. La tolerancia se estabiliza alrededor del 10% entre el día 2 y 5 elevándose nuevamente para alcanzar su máximo nivel de

sobrevivencia (100%) en la fase estacionaria después de 144 horas de crecimiento. Estos datos confirman los resultados obtenidos por Schember-Frascino y Moustacchi (1971).

La cepa mutante *W303Δhsp104* mostró mayor sensibilidad durante las primeras 12 horas de crecimiento (fase logarítmica). Una vez que cambió de metabolismo fermentativo a respiratorio (fase diáuxica y postdiáuxica) aumentó su nivel de termotolerancia alcanzando un 0.8% como máximo en estas fases de crecimiento; el nivel más elevado de termotolerancia de esta cepa fue de 3% a las 144 horas de crecimiento (fase estacionaria) (Figura 4b). Este último dato confirma la importancia de la proteína *hsp104* en la fase estacionaria, ante un choque térmico letal (Sánchez, 1992).

Para el caso de la mutante *ScIBT1*, a las 6 horas de crecimiento (fase logarítmica) presentó un 16% de sobrevivencia (Figura 4c), a las 8 horas alcanzó el 100% en esta misma fase. A las 12 horas en el cambio a fase diáuxica bajó el porcentaje de sobrevivencia a un 30%. Después de 24 horas de crecimiento, en la fase postdiáuxica alcanzó el máximo de sobrevivencia pasando ligeramente del 100% manteniéndose hasta fase estacionaria (144-196 horas de crecimiento) con ligeras oscilaciones alrededor del 100%.

En la figura 4d se puede observar que la mutante *ScIBT2* presenta elevados niveles de termotolerancia en la fase exponencial comparados con la cepa silvestre. A las 6 horas de crecimiento se detectó 45% de sobrevivencia y a las 8 horas se determinó una termotolerancia de 60%, bajando a 40% a las 12 horas de crecimiento. A las 24 horas, una vez que alcanzó la fase postdiáuxica rebasó ligeramente el 100% de sobrevivencia manteniéndose así hasta la fase estacionaria (pasadas las 144 horas de crecimiento) (Figura 4d).

La mutante *ScIBT3* presentó un comportamiento similar al de la mutante *ScIBT2* (ver figura 5a).

Al igual que *ScIBT1*, la mutante alélica *ScIBT4* presentó aproximadamente un 16% de sobrevivencia a las 6 horas de crecimiento, a las 8 horas alcanzó un 55% de sobrevivencia y las 12 horas sufrió una baja llegando a un 28% (Figura 5b). En la fase postdiáuxica (24 horas de crecimiento) la mutante *ScIBT4* alcanzó su máximo de

sobrevivencia (100%). En tanto que en la fase estacionaria los valores de sobrevivencia oscilaron entre el 60 y el 100%.

La mutante en Adenilato ciclasa *hsr1* (Iida y Yahara, 1988), alélica a la mutante ScIBT5, presentó niveles de termotolerancia muy elevados en fase exponencial (14-18%), después de las 24 horas de crecimiento los valores estuvieron entre el 70 y el 100% de sobrevivencia (Figura 5c), manteniéndose así hasta las 144 horas de crecimiento. Después de este tiempo disminuyó el porcentaje de sobrevivencia aproximadamente 10 veces; esto último posiblemente debido a la formación de grumos en los cultivos que pudo haber disminuido las unidades formadoras de colonia. El comportamiento de la mutante *hsr1* en general fue parecido al de la mutante ScIBT4 (Figura 5b).

La mutante ScIBT7 presentó en las primeras 6 horas (fase exponencial) un 35% de sobrevivencia. Entre las 8 y 12 horas fue de 70% y en la fase postdiauxica (a las 24 horas de crecimiento) alcanzó el máximo de sobrevivencia (100%) manteniéndose así hasta las 120 horas (Figura 5d). Para esta cepa, sólo se determinaron los porcentajes de sobrevivencia hasta las 120 horas debido a la excesiva formación de grumos en el cultivo.

La mutante ScIBT8 durante la fase exponencial presentó valores de sobrevivencia mayores a los de la cepa silvestre, pero menores a los de las mutantes ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4 y ScIBT7. A las 6 horas de crecimiento presentó un 2% de sobrevivencia, 3.5% a las 8 horas y 22% a las 12 horas. Una vez alcanzada la fase postdiáuxica (24 horas) llegó a 98% de sobrevivencia y alcanzó un máximo a las 72 horas de crecimiento. A las 144 horas bajó hasta un 15% y a las 192 horas subió a un 90% de sobrevivencia (Figura 6a).

La mutante ScIBT14 presentó un comportamiento semejante al de la cepa silvestre en casi todos los estadios del crecimiento, excepto en el primer punto de la fase exponencial. En las primeras 6 horas de crecimiento se determinó 0.3% de sobrevivencia, lo cual es 22 veces más elevado que el punto correspondiente en la cepa W303; a las 8 y 12 horas disminuyó su porcentaje de sobrevivencia a 0.18 y 0.15% respectivamente (por debajo de la cepa silvestre) y a partir de este punto el nivel de termotolerancia fue en aumento hasta igualar su nivel de termotolerancia de

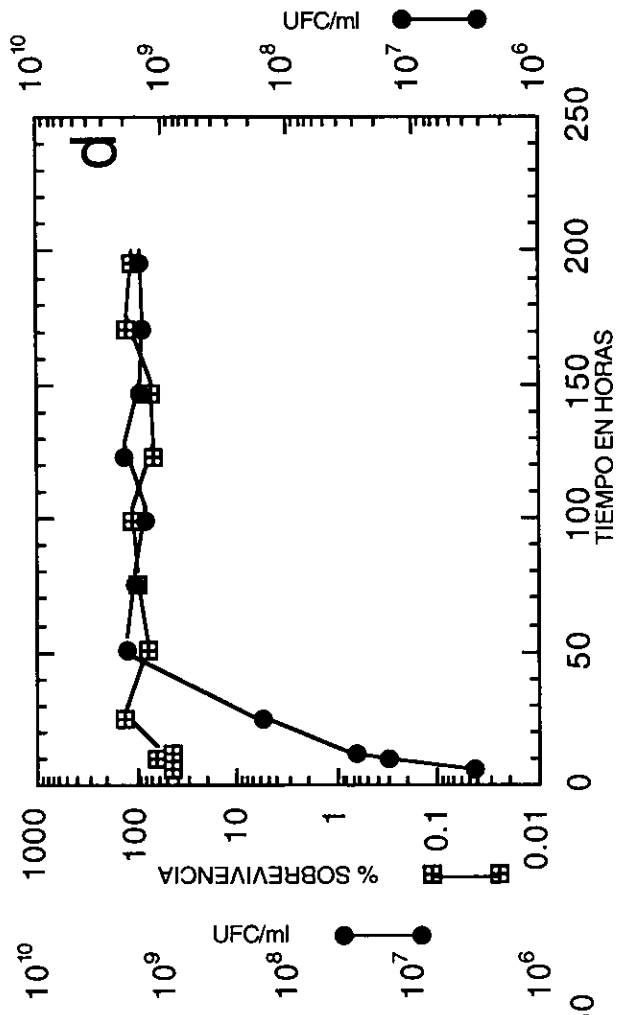
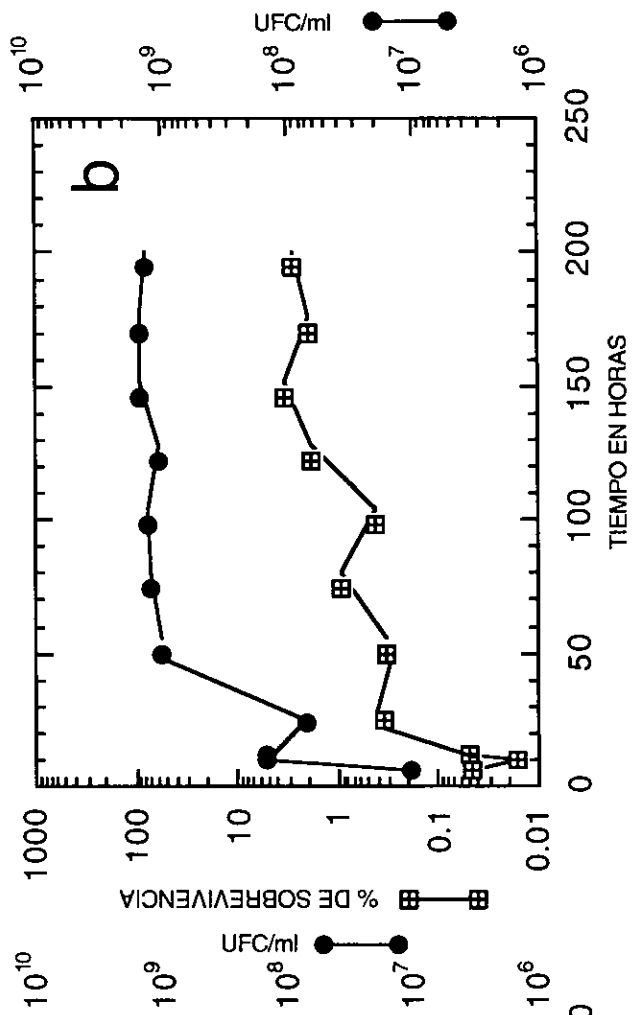
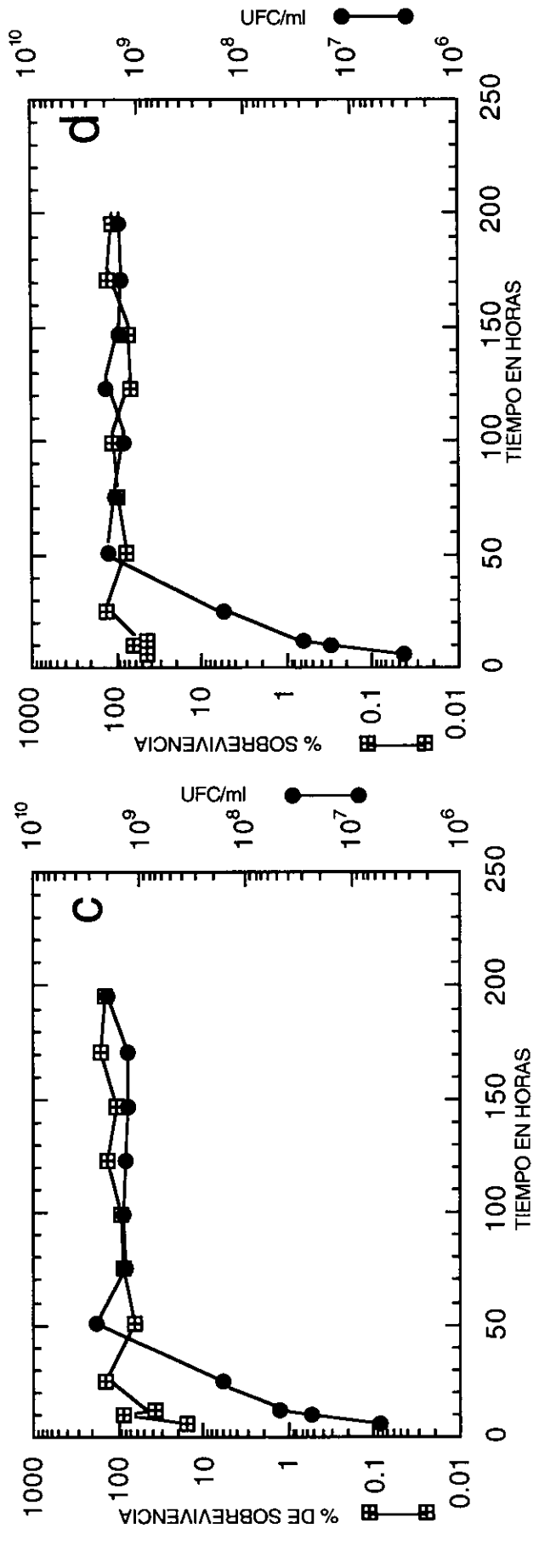
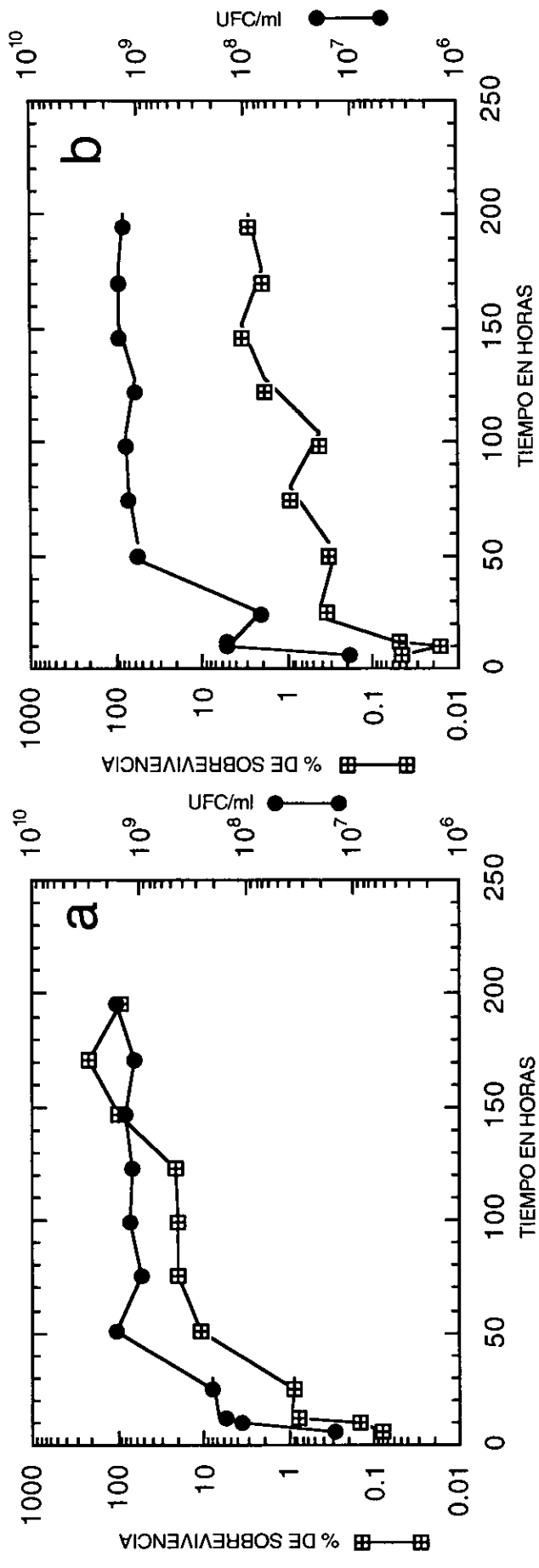


Figura 4. Cinética de termotolerancia a un choque térmico letal (50°C, 10') en diferentes estadios de crecimiento de cultivos líquidos crecidos a 25°C de la cepa silvestre W303 (a), de las cepas mutantes W303 Δ hsp104 (b), ScIBT1 (c) y ScIBT2 (d).

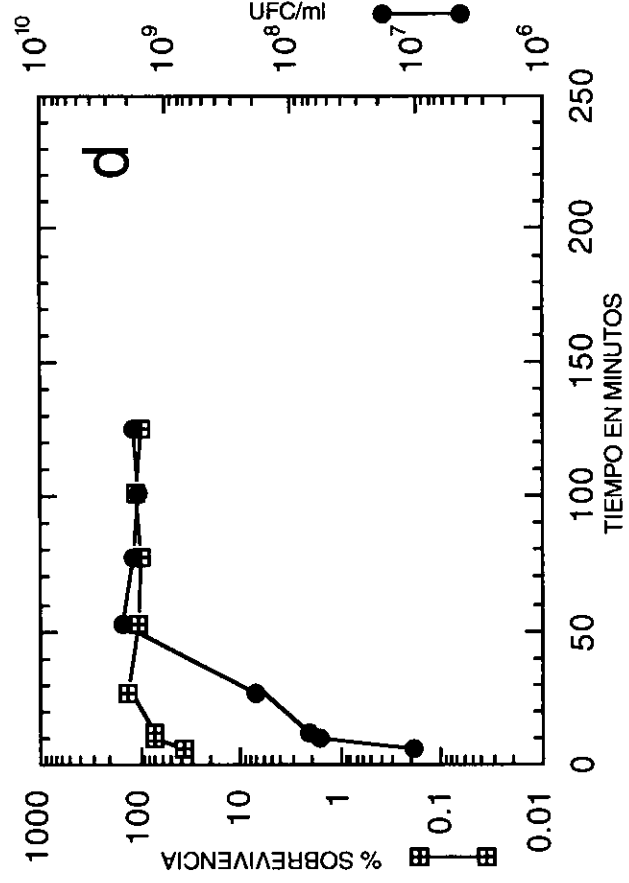
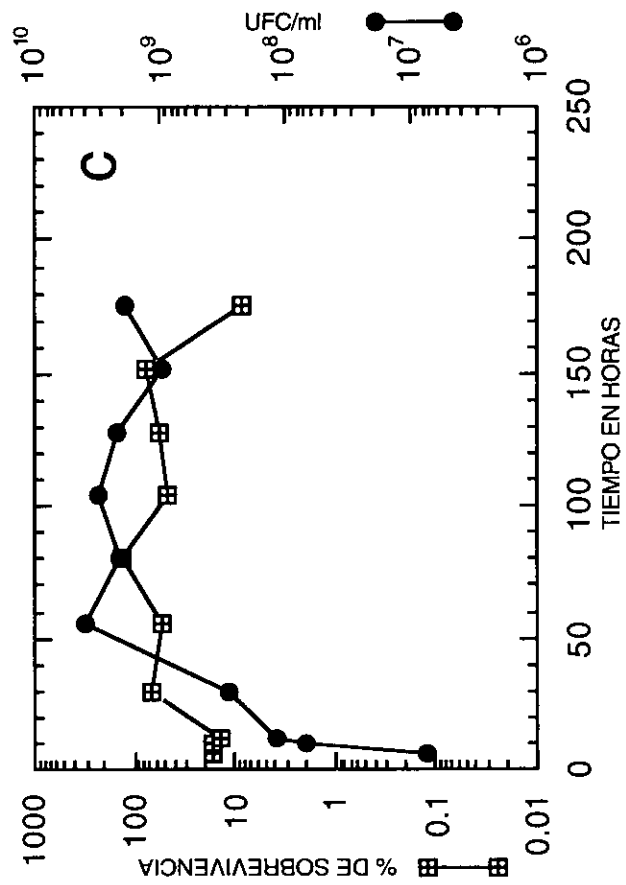
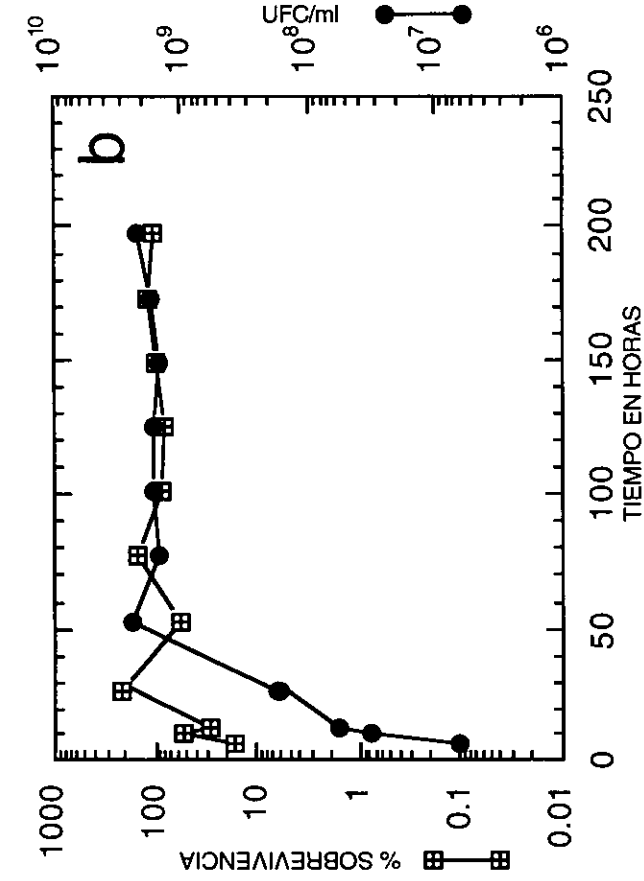
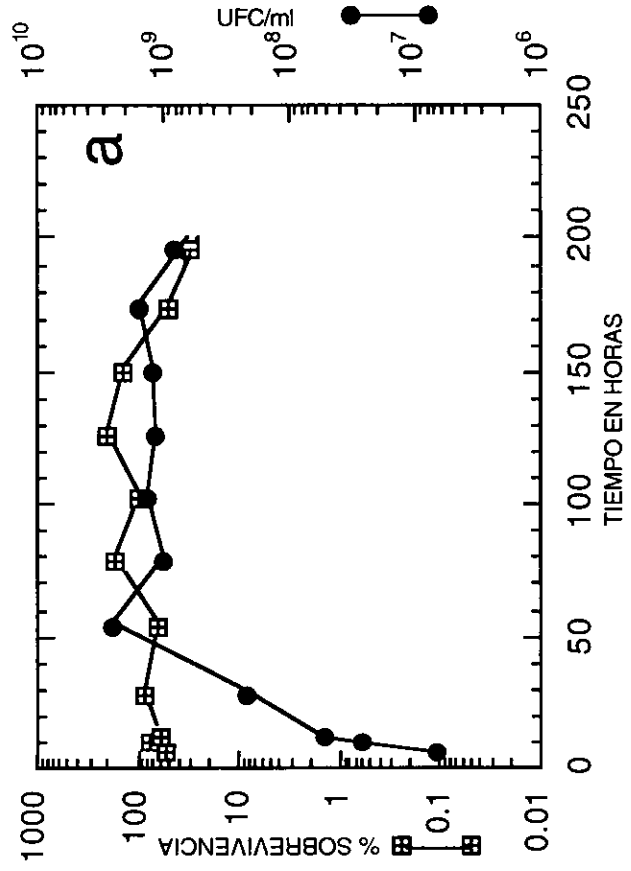


Figura 5. Cinética de termotolerancia a un choque térmico letal (50°C , 10^6) en diferentes estadios de crecimiento de cultivos líquidos crecidos a 25°C de las cepas SciBT3 (a), SciBT4 (b), *hsr1* (c) y SciBT7 (d).

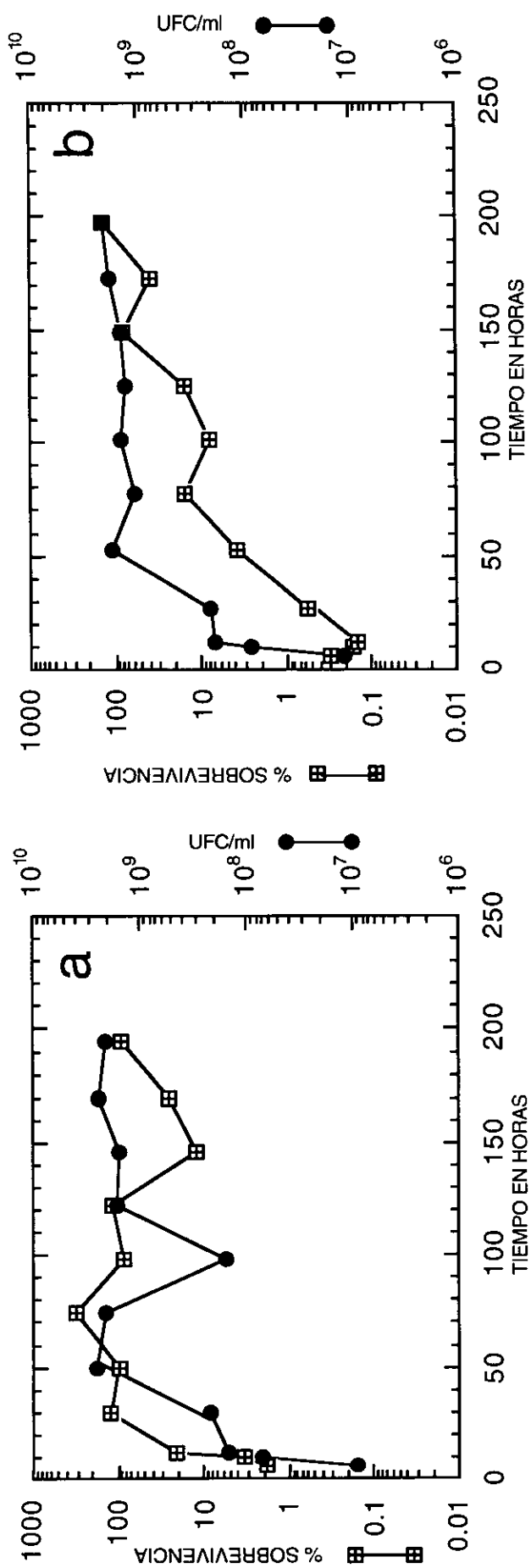


Figura 6. Cinética de termotolerancia a un choque térmico letal (50°C, 10') en diferentes estadios de crecimiento de cultivos líquidos crecidos a 25°C de las cepas mutantes ScIBT8 (a) y ScIBT14 (b).

la cepa silvestre a las 72 horas y su máximo a las 144 horas de crecimiento (entrada a fase estacionaria) al igual que la cepa silvestre (Figuras 4a y 6b).

El desarrollo de una termotolerancia intrínseca de 100% requiere de un máximo de 24 horas de crecimiento para ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT8 y para *hsr1*, mientras que para W303 y ScIBT14 requiere de 144 horas de crecimiento. La mutante W303 Δ *hsp104* alcanzó su máximo nivel de termotolerancia (3%) a las 144 horas.

III) Análisis de reversión de tamaño de colonia chico a grande de las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada.

a) Análisis del fenotipo de reversión:

Folch *et al*, 1995; Nieto-Sotelo *et al*, 1997, observaron que las mutantes con mayor nivel de termotolerancia, presentaban tamaño de colonia chico y a su vez, notaron la aparición de colonias grandes cuando se crecieron en condiciones no selectivas (25°C) a una alta frecuencia; en un estudio preliminar para la mutante ScIBT1, se determinó que estas revertantes pierden la alta termotolerancia intrínseca. Tomando en cuenta que el fenotipo de termotolerancia es recesivo, que el tamaño de colonia para algunas de las mutantes es chico y que este fenotipo puede ser utilizado para la complementación del gen mutante con un banco genómico silvestre ya que también es recesivo, se podría esperar que al complementar el gen mutante con el gen silvestre se complemente el fenotipo de tamaño de colonia y nivel de termotolerancia del silvestre. Por tal motivo, se procedió a realizar un análisis cuantitativo del fenómeno de reversión debido a que las revertantes podrían pasar por falsas positivas puesto que se confundirían con las complementantes al transformar con el banco genómico silvestre. Para ello primero se inoculó una colonia chica, fresca, en 4 ml de YPDA para evitar partir de un cultivo que contenga un número elevado de revertantes. Posteriormente se creció el cultivo a una D. O_{600 nm} entre 0.4-0.6 y se platearon diferentes diluciones para monitorear diferentes densidades de población y determinar en cual de ellas es posible cuantificar la frecuencia de reversión. Esto se hizo debido a que las mutantes presentan diferentes tamaños de colonia (silvestre, casi

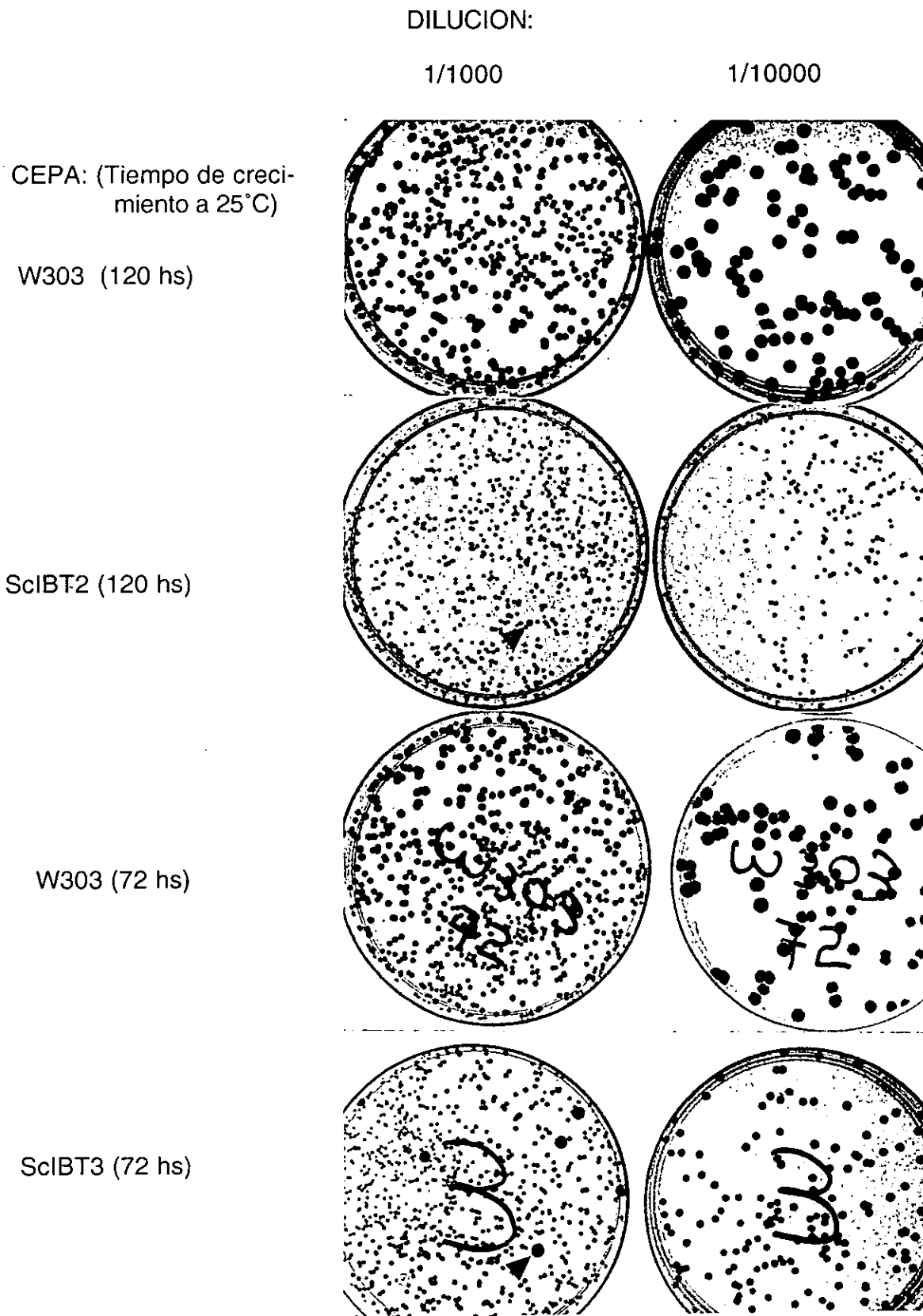


Figura 7. Muestra el alto porcentaje de reversión de tamaño de colia chica a grande de las mutantes SciBT2 y SciBT3 comparadas con la cepa silvestre (W303) en las diluciones 1/1000 y 1/10000.

silvestre y chica) y al aumentar la densidad poblacional por caja pueden mostrar el tamaño de las de la cepa silvestre (Figura 7). El frecuencia de reversión para las mutantes ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3 y ScIBT4 resultó ser mucho mayor a la frecuencia de reversión espontánea que ha sido reportado: 1×10^{-9} a 1×10^{-6} . Para la mutante ScIBT1 fue de 1×10^{-3} ; para la mutante ScIBT2 se detectó una de reversión de 7×10^{-3} ; para el caso de la mutante ScIBT3, de 4×10^{-3} y finalmente, la mutante ScIBT4 presentó un nivel de reversión de 6×10^{-3} (Tabla 1). Para las mutantes como ScIBT5, ScIBT7, ScIBT12, ScIBT13 y ScIBT15 no fue posible determinar la reversión de tamaño de colonia a las densidades que mostraron una clara diferencia de tamaño con las colonias silvestres. Por lo tanto para estas mutantes el nivel de reversión es menor a los valores indicados en la tabla (Tabla 1). Las mutantes ScIBT6, ScIBT8 ScIBT9, ScIBT10, ScIBT11, ScIBT14 y ScIBT16 presentaron tamaño de colonia silvestre, para estos mutantes no fue posible medir sus límites máximos de reversión con este ensayo (Tabla 1).

b) ¿Está ligada la reversión de tamaño de colonia chico a grande de las mutantes con la pérdida en termotolerancia intrínseca ?

Como se mencionó en la parte a) de este apartado, Folch *et al*, 1995 y Nieto-Sotelo *et al*, 1997 detectaron la reversión de tamaño de colonia chico a grande. Entonces, surgió la pregunta: ¿Está ligada la reversión de tamaño de colonia chico a grande de las mutantes con la termotolerancia ? O bien, ¿Las revertantes de tamaño de colonia chico a grande siguen siendo termotolerantes?

Para contestar esta pregunta, se aislaron revertantes de la mutante ScIBT2 partiendo de eventos independientes; ésto se logró plateando 20 colonias chicas por separado en medio de cultivo sólido YPDA a una dilución 1/1000 (ver materiales y métodos). Posteriormente, se seleccionó al azar 1 colonia grande de cada caja sumando un total de 20 revertantes. A estas revertantes se les determinó el nivel de termotolerancia por el método cuantitativo. En 19 de los casos, las revertantes presentaron un nivel de termotolerancia similar al de la cepa silvestre (0.02% de sobrevivencia), en tanto que una de las revertantes (SC0030) presentó nivel de

Experimento # 1

Experimento # 2

CEPA	% DE SOBREVIVENCIA	CEPA	% DE SOBREVIVENCIA
W303	0.027	W303	0.021
ScIBT2	65.16	ScIBT2	13.62
SC0017	0.163	SC0027	0.04
SC0018	0.036	SC0028	0.062
SC0019	0.108	SC0029	0.068
SC0020	0.073	SC0030	6.4
SC0021	0.059	SC0031	0.036
SC0022	0.029	SC0032	0.037
SC0023	0.04	SC0033	0.042
SC0024	0.075	SC0034	0.059
SC0025	0.033	SC0035	0.076
SC0026	0.014	SC0036	0.045

Tabla 3. Prueba de termotolerancia a (50°C, 10') para 20 revertantes de tamaño de colonia chica a grande de la cepa mutante ScIBT2.

termotolerancia elevado (6.4%), sin embargo no es el nivel parental (Tabla 3). Este resultado, nos sugiere que existen al menos dos formas de revertir, uno donde el tamaño de colonia está ligado con la termotolerancia y otro no ligado a la termotolerancia, siendo más frecuente el primer caso.

c) ¿Juega algún papel la proteína hsp104 en la termotolerancia intrínseca y en el fenómeno de alta frecuencia de reversión de tamaño de colonia chico a grande de la mutante ScIBT2?

De todas las hsps estudiadas se ha visto que solamente hsp104 juega un papel importante en la termotolerancia inducida. Mutantes de *S. cerevisiae* en el gen *HSP104* no presentan termotolerancia inducida a exposiciones prolongadas de tiempo, pero sí a exposiciones cortas (Sánchez, 1992).

Además de la importancia de hsp104 en la termotolerancia inducida, se ha reportado que esta proteína juega un papel muy importante en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en fenómenos tipo prión confiriendo un alto porcentaje de supresión universal (ver introducción). Cuando se muta al gen de la proteína hsp104 o se sobreexpresa, las levaduras se curan del prión y adquieren su fenotipo original de baja frecuencia de supresión (Chernoff *et al*, 1995). Por ello, decidimos averiguar si el problema de reversión de nuestras mutantes estaría mediado por la proteína hsp104.

Como una primera aproximación al examen de esta hipótesis decidimos estudiar a la mutante ScIBT2. Se cruzó con la cepa W303 $HSR3\Delta hsp104::LEU2$ por la mutante recesiva ScIBT2 (*hsr3-1 hsp104*) para lograr heterocigotas que fueron esporuladas para obtener haploides con los genotipos *hsr3-1-\Delta hsp104::LEU2* y *hsr3-1 hsp104*. A los haploides resultantes de la cruce se les nombró JF090, JF091, JF091, JF093, JF102, JF103, JF104 y JF105. Los resultados de termotolerancia basal con las dobles mutantes *hsr3-2-\Delta hsp104*, revelaron que la presencia de la ruptura en *hsp104* (utilizando al marcador *LEU2* y confirmando la disrupción mediante análisis tipo southern) (Figura 8), presentan una ligera disminución en el nivel de termotolerancia intrínseca (Tabla 4), lo cual sugiere que existen otros factores además de hsp104 que regulan la manifestación del alto nivel de termotolerancia de estas mutantes.

CEPA	MARCADOR LEU	DISRUPCION	TERMOTOL	REVERSION
W303HSP104	-	NO	0.0149	-----
W303Δhsp104	+	SI	0.058	-----
ScIBT2	-	NO	75.71	7.1X10 ⁻³
JF090 (chica)	+	SI	51.85	1.3X10 ⁻⁴
JF091 (chica)	+	SI	67.41	3.4X10 ⁻⁴
JF092 (grande)	-	NO	0.105	-----
JF093 (grande)	-	NO	0.037	-----
JF102 (grande)	+	SI	0.117	-----
JF103 (chica)	-	NO	79.06	5X10 ⁻⁴
JF104 (chica)	+	SI	22.79	2X10 ⁻³
JF105 (grande)	-	NO	0.014	-----

Tabla 4. Prueba de termotolerancia (50°C, 10') y de reversión de tamaño de colonia de chico a grande para dos tetradas resultado de la cruce de la mutante ScIBT2 por la cepa W303Δhsp104.

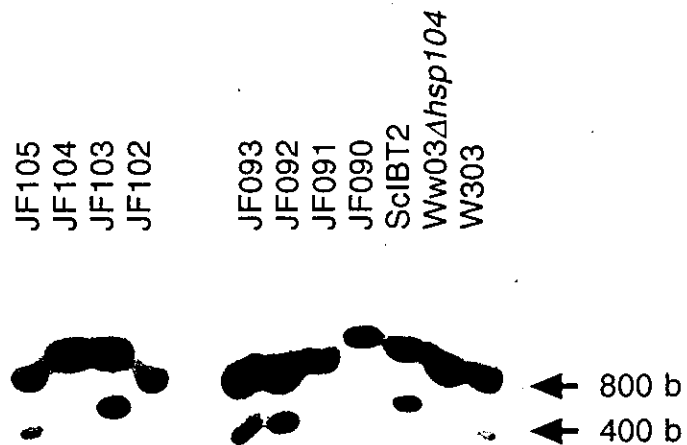


Figura 8. Análisis tipo southern de las cepas W303, W303Δ*hsp104*, ScIBT2 y para dos tétradas derivadas de la cruce de W303Δ*hsp104* por ScIBT2: JF090, JF091, JF092, JF093; JF102, JF103, JF104 y JF105. El DNA genómico fue cortado con las enzimas de restricción BglI y EcoRI. Se hibridó con la sonda *HSP104* cortada con las enzimas de restricción EcoRI y Hind III.

Los resultados de estos experimentos también revelaron que la ruptura de *hsp104* no tiene ningún efecto sobre la frecuencia de reversión puesto que la cepa JF104 (*hsr3 -1 Δhsp104::LEU2*) presentó niveles de reversión tan altos como la mutante parental termotolerante ScIBT2 (7×10^{-3}) (Tabla 4); adicionalmente, las mutantes JF090 y JF091 que también son $\Delta hsp104::LEU2$ presentaron niveles bajos de reversión (1.3×10^{-4} y 3.4×10^{-4} respectivamente) comparados con la cepa mutante parental ScIBT2 (7×10^{-3}). Además, la haploide JF103 (*hsr3-1 hsp104*), presentó una disminución en la reversión de tamaño de colonia chico a grande de 14 veces en relación a la cepa mutante parental termotolerante (Tabla 4). Estos resultados nos sugieren que la proteína *hsp104* no está involucrada en el fenómeno de alta reversión de nuestras mutantes; sin embargo, también sugiere la existencia de otro factor involucrado en este fenómeno de reversión que es segregado durante la meiosis y por lo tanto, no está ligado a la mutación *hsr3-1*.

Los resultados del análisis tipo southern realizados para confirmar la ruptura en *hsp104* se presentan en la figura 8. Para la cepa con el gen silvestre *HSP104* se esperaban dos fragmentos: uno de 800 y otro de 400 bases. Para las cepas portadoras de la mutación $\Delta hsp104::LEU2$ se esperaba solamente el fragmento de 800 bases.

Actividad de un promotor quimérico de respuesta al estrés por calor (*HSP26/HSP70*) fusionado al gen reportero *LacZ* en diferentes fondos mutantes.

Con la finalidad de explorar si la mutante ScIBT2 esta alterada en alguna de las vías de respuesta al estrés, se utilizó al plásmido p β 11, el cual es una construcción quimérica portadora de un fragmento de la región promotora del gen *HSP26*, que reprime su propia expresión a temperaturas no estresantes (Susek y Lindquist, 1990) y es el responsable de la inducción por calor y en fase estacionaria de este gen; río arriba de este fragmento se encuentra el elemento HSE2 de *SSA1* que es el responsable de un 80% de la expresión a temperaturas estresantes de éste gen (Slater y Craig, 1987); la caja TATA de esta construcción corresponde al gen *CYC1* de

levadura y están fusionados al gen reportero *LacZ*. Esta construcción contiene en la región promotora 5 elementos HSE (4 de *HSP26* y 1 de *SSA1*) y 3 elementos STRE (de *HSP26*).

La actividad de β -galactosidasa de la construcción determinada a 25°C para la cepa silvestre W303 fue de 0.51 (Figura 9). Cuando se sometió a la cepa silvestre a una temperatura de termoinducción (39°C) en los primeros 60 minutos la actividad fue de 60.8, a los 120 minutos la actividad determinada fue de 76.7, a los 180 minutos la actividad fue de 202.6 y en el último punto, a los 240 minutos se determinó una actividad de 437.2 (Figura 9). Para el caso de la cepa mutante ScIBT2, los niveles de expresión a 25°C fueron de 87.7, 174 veces mayor que los de la cepa silvestre; a los 60 minutos de termoinducción los valores obtenidos fueron de 231.6 unidades, la actividad determinada a los 120 minutos aumentó a 777.2 y a los 240 minutos los valores fueron de 1045.2 (Figura 9). A los 180 minutos no fue posible determinar debido a que las células no se rompieron adecuadamente. Los resultados obtenidos para la cepa mutante *hsr1* a 25°C fueron de 1.0, a los 60 minutos de inducción por calor se obtuvo 46.0 de actividad, a los 120 minutos 360.7, a los 180 disminuyó la actividad a 313.9 y a los 240 disminuyeron los valores a 192.4 (Figura 9). La mutante en adenilato ciclasa presenta un comportamiento muy parecido a la cepa silvestre W303 a 25°C y en la cinética de termoinducción a 39°C, sólo que en los tiempos 180 y 240 minutos la actividad comienza a decaer, en tanto que la cepa mutante ScIBT2 presenta valores muy elevados a 25°C en relación a la cepa silvestre y va en aumento conforme aumenta el tiempo de inducción por calor (Figura 9).

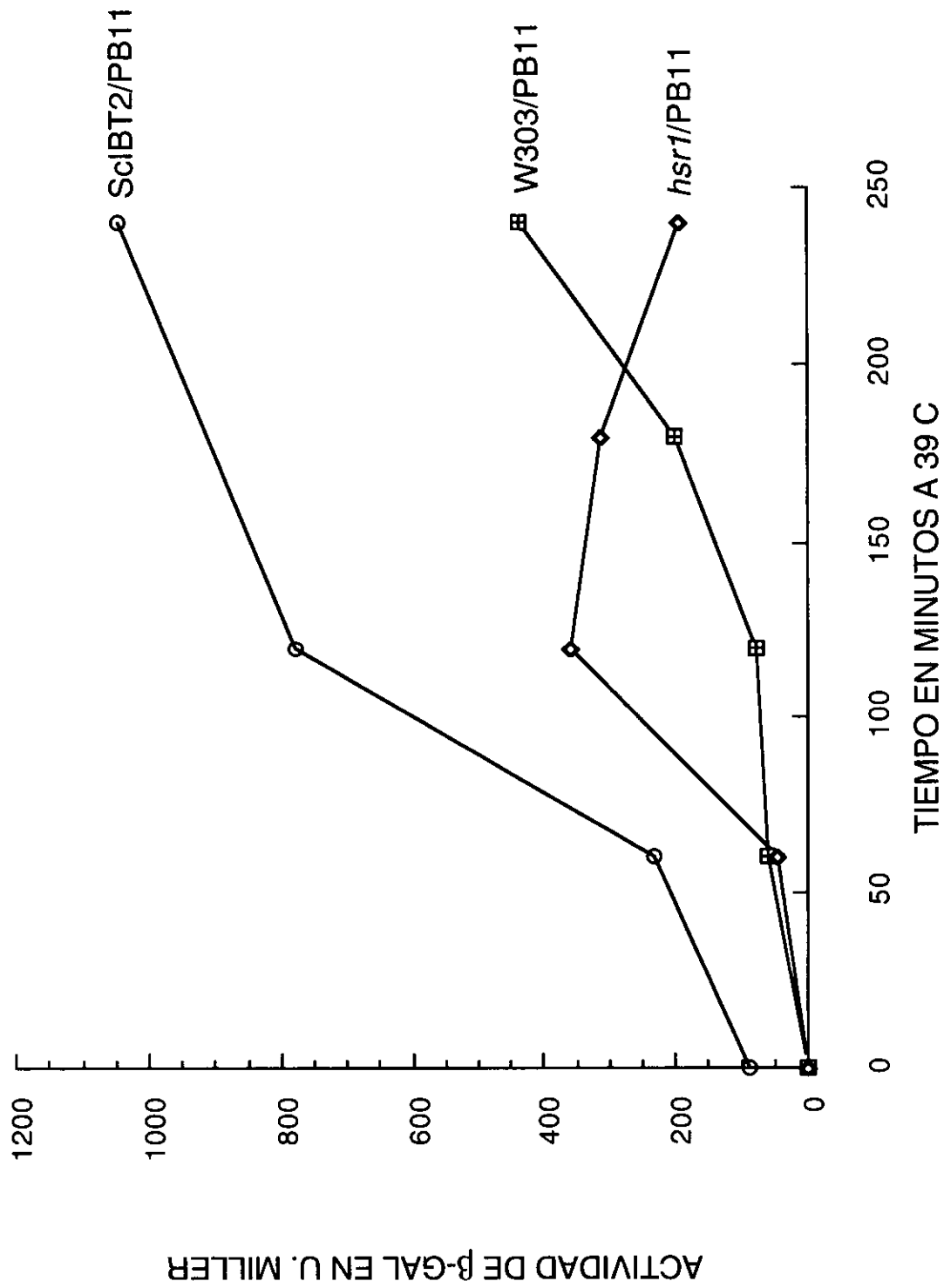


Figura 9. Cinética de termoinducción a 39°C de la cepa silvestre W303, de las cepas mutantes ScIBT2 y *hsr1* transformadas con el plásmido pβ11 que contiene el promotor quimérico HSP26/HSP70::LacZ.

DISCUSION

1) Determinación de grupos de complementación.

Las pruebas de complementación ubicaron a las 16 mutantes en 6 grupos (Tabla 1). El primer grupo fue determinado por Jorge Luis Folch (1995) encontrando que la mutante ScIBT5 es alélica a la mutante en adenilato ciclasa *hsr1* (Iida y Yahara, 1984) (Tabla 1).

Un segundo grupo de complementación (resultados de la presente tesis) lo integran las mutantes ScIBT3, ScIBT6, ScIBT7, ScIBT9, ScIBT11, ScIBT12, ScIBT13, ScIBT15 y ScIBT16 (Tabla 1) ya que los diploides heterocigotos generados con la mutante ScIBT6 no complementaron al fenotipo de termotolerancia.

El tercer grupo de complementación lo integran las mutantes ScIBT2 y ScIBT10 (Tabla 1) ya que al realizar la cruce y determinar su fenotipo, no se complementó el fenotipo mutante.

Es importante mencionar que la mutante ScIBT10 deriva de la mutante ScIBT2 y que fue aislada como una colonia de tamaño casi silvestre como resultado de una “reversión” espontánea, la cual conservó el fenotipo de termotolerancia (Luz María Martínez, datos sin publicar). La mutante ScIBT10 presenta un nivel de termotolerancia 11.2 veces menor que la cepa ScIBT2; sin embargo, es 100 veces más termotolerante que su progenitora silvestre, la cepa W303a (Tabla 1).

El cuarto grupo lo conforma la mutante ScIBT14 (Tabla 1). Los diploides generados con esta y con una mutante representativa de los demás grupos de complementación, nunca dió como resultado un fenotipo termotolerante, lo cual la clasifica en un grupo de complementación diferente (Tablas 1 y 2).

Las pruebas de termotolerancia para las cruces de mutante ScIBT8 por ScIBT1 y ScIBT4 no son confiables debido a que se observaron valores por

arriba de los esperados para un caracter codominante, sin embargo podríamos suponer que no son alélicas por las características en que difieren ScIBT1 y ScIBT4 de ScIBT8, donde las dos primeras son codominantes, de colonias pequeñas y con un elevado nivel de termotolerancia en tanto que ScIBT8 es recesiva, de tamaño silvestre y con niveles de termotolerancia mucho más bajos, además, provienen de alicuotas distintas de la mutagénesis. Por estos motivos suponemos que son mutaciones diferentes. Pruebas recientes realizadas por Folch, J. y Ventura, L. (datos sin publicar) han demostrado que las mutantes ScIBT1 y ScIBT8 presentan más de una mutación, lo cual puede estar ocasionando que no se distinguan los valores esperados de codominancia para poder afirmar que verdaderamente no son alélicas estas mutantes.

Para las cruzas de algunas de las mutantes por ScIBT1 y ScIBT4 siempre se observó un fenotipo intermedio (excepto para las cruzas por ScIBT8) por lo cual se infiere que el gen silvestre no es capaz de complementar el fenotipo mutante (Tabla 2), pero sí nos permite diferenciar entre mutaciones en alelos diferentes ya que de ser mutaciones en el mismo gen se espera una expresión del alelo mutante al 100%.

Es importante mencionar que no fue posible determinar el alelismo entre ScIBT1 y ScIBT4, debido a que no se pudieron lograr los diploides adecuados para la determinación del nivel de termotolerancia; pero asumimos que son alélicas porque la mutante ScIBT4 fue seleccionada como un evento de reversión espontánea de tamaño de colonia chico a grande de la mutante ScIBT1.

Posteriormente se observó que la mutante ScIBT4 presentaba tamaño de colonia chico; estas dos mutantes también presentan niveles de termotolerancia semejantes y ambas son codominantes. Por los motivos mencionados anteriormente en este párrafo se ha considerado que estas mutantes pertenecen al mismo grupo de complementación.

Tomando en cuenta que algunas de las mutantes fueron seleccionadas por un evento de reversión de tamaño de colonia chico a grande sobre las

mutantes originales, se esperaba que al hacer las cruzas se ubicaran en el mismo grupo de complementación de la mutante donde se reselectionaron, este es el caso de las mutantes ScIBT2 que dió origen a ScIBT10; ScIBT1 que originó a ScIBT4 y ScIBT11 que dió origen a ScIBT13 (Tabla 1).

Sabiendo que los grupos de complementación se obtuvieron mediante cruzas entre una mutante retrocruzada una sola vez con las demás mutantes originales, existe la posibilidad de que los grupos de complementación sufran cambios una vez que se utilicen cepas con un mayor número de retrocruzas. No habrá modificación en los grupos si todas las mutantes son auténticamente monogénicas y nucleares.

Actualmente existen evidencias por los cuales se podrían modificar los grupos de complementación son: 1) el método cualitativo de termotolerancia utilizado por Folch para el análisis de tétradas presenta un margen de error muy grande y no permite diferenciar claramente el tipo de segregación en los productos meióticos en cuanto al nivel de termotolerancia. Este método consiste en tomar una asada pequeña de la cepa, hacer varias diluciones y gotearlas en una caja con YPDA sólido, sellarlas y someterlas a un choque térmico letal (50°C) en un baño de agua por diferentes tiempos; 2) Los resultados del análisis de tétradas de la cruce de la mutante ScIBT1 por la cepa W303 Δ *hsp104* en la cual se obtuvieron segregaciones 2:2 y 3:1 en cuanto a termotolerancia y tamaño de colonia, indicando que podría haber más de una mutación involucrada en el fenotipo de alta termotolerancia (Ventura L, sin publicar); así mismo recientes análisis cuantitativos de tétradas (Folch sin publicar) han demostrado que por lo menos la mutante ScIBT8 no presenta una segregación 2:2 como se creía anteriormente.

Pruebas genéticas posteriores con otras mutantes ya reportadas y las nuestras nos ayudaran a completar la información referente a los grupos de complementación.

II) Análisis de la termotolerancia intrínseca durante las diferentes fases del desarrollo en cultivos líquidos de la cepa silvestre W303 y de las mutantes W303 Δ hsp104, ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT8, ScIBT14 y hsr1.

Ciertos cambios en respuesta a condiciones ambientales y fisiológicas correlacionan con los cambios en la termotolerancia. Por ejemplo, células de hongos que están en fase estacionaria se encuentran en fase G0 del ciclo celular, tienen bajos niveles de cAMP, la actividad de cinasas de proteínas dependientes de cAMP es relativamente baja y presentan altos niveles de termotolerancia (Kurtz *et al.*, 1986). De igual forma, células de levadura que son sometidas a una temperatura supraóptima no letal por un cierto período de tiempo son arrestadas transitoriamente en G0 tienen bajos niveles de cAMP y presentan altos niveles de termotolerancia (Iida y Yahara, 1984).

Observaciones hechas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, indican que los cambios en respuesta a diferentes estadios de desarrollo y a cambios nutricionales conllevan a cambios en los niveles de termotolerancia basal bajo estas condiciones. Por ejemplo, la expresión de la proteína HSP104 es necesaria para la viabilidad de esporas y células en fase estacionaria. También es necesaria su expresión para que estos tipos celulares obtengan los niveles naturales de termotolerancia a altas temperaturas (Sánchez *et al.*, 1992).

Un fenómeno más enigmático es la gran variación que presentan en la termotolerancia basal organismos muy relacionados taxonómicamente que son crecidos en las mismas condiciones fisiológicas y estadio de desarrollo. Estas observaciones permiten especular que la diferencia en la termotolerancia intrínseca es debida a diferencia en los niveles de expresión de las hsp's o a otros factores que no implican estas proteínas.

Interesados en dilucidar el comportamiento de nuestras mutantes en las diferentes etapas del crecimiento se hizo una cinética de termotolerancia en diferentes estadios de desarrollo en paralelo con las mutantes ScIBT1, ScIBT2,

ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT8, ScIBT14, W303 Δ *hsp104*, *hsr1* y la cepa silvestre W303, estas cepas representan a cada uno de los grupos de complementación determinados. Los resultados obtenidos para la mayoría de nuestras mutantes *hsr* fueron niveles de termotolerancia muy elevados en todos los estadios del desarrollo, incluso en fase postdiáuxica (ver resultados y Figuras 4, 5 y 6). En estos estadios de desarrollo la mayoría de los organismos con crecimiento semejante al de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son muy sensibles a temperaturas letales. La excepción fue la mutante ScIBT14, la cual fue más termotolerante que la cepa silvestre sólo al inicio de la fase logarítmica, pero después su comportamiento fue semejante a ésta. Un comportamiento parecido al de nuestras mutantes fue detectado en la mutante *hsr1* (Iida 1988) (Figuras 4, 5 y 6); se ha reportado en la literatura que mutantes que producen bajos niveles de cAMP presenta termotolerancia constitutiva. La semejanza en comportamiento de nuestras mutantes con la mutante en Adenilato ciclasa nos sugiere que estas mutantes pudieran estar alteradas en algunas de las vías de transducción en respuesta al estrés (HSE, STRE y YAP-1) ó en otra vía diferente aún no descrita que regule la entrada a fase estacionaria y/o la termotolerancia. Como se mencionó en la introducción, está reportado en la literatura una mutante en HSTF (Sewell, 1995) con una alta termotolerancia constitutiva, cuyo fenotipo en condición diploide con la cepa silvestre es codominante. En el grupo de las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada existen dos (ScIBT1 y ScIBT4) también son codominantes, por lo cual existe la posibilidad de que estas se encuentren alteradas en la vía de transducción de señales para la activación de HSTF.

Se sabe que células de levadura con mutaciones en los genes *cdc25*, *cdc33* y *cdc35* expuestas a condiciones que las lleva a un arresto celular (células que no geman), presentan termotolerancia constitutiva (Plesset *et al.*, 1987); nuestras mutantes con tamaño de colonia chica presentan tiempos de duplicación más largos (ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3, ScIBT4, ScIBT7, ScIBT11 y ScIBT13)

que la cepa silvestre y esto correlaciona con el nivel de termotolerancia: a mayor tiempo de duplicación, es mayor el nivel de termotolerancia (Folch *et al.*, 1995) Estos datos nos hacen pensar que posiblemente algunas de nuestras mutantes pueden estar alteradas en los mecanismos que regulan el ciclo celular como es el caso de la vía de transducción de señales Ras-cAMP.

Una vez identificados los genes involucrados en el fenotipo de alta termotolerancia intrínseca de nuestras mutantes posiblemente logremos descifrar la posición en la cual se ubica el producto de los genes alterados.

III) Análisis de reversión de tamaño de colonia chico a grande de las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada.

a) Análisis del fenotipo de reversión:

Como se describió en resultados Folch y Martínez observaron que las mutantes con mayor nivel de termotolerancia presentaban tamaño de colonia chico (Tabla 1) y a su vez notaron la aparición a una alta frecuencia de colonias grandes cuando se crecieron en condiciones no selectivas (25 °C).

Para algunas de nuestras mutantes como la ScIBT2 la reversión resultó ser mucho mayor (7×10^{-3}) a la tasa de mutación espontánea que ha sido reportado para el locus *lys2* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones no selectivas: 4.9×10^{-9} (Foster, 1993). Los valores reportados para *Escherichia coli* en condiciones no selectivas para varios locus fluctua entre 3.0×10^{-6} a 9.4×10^{-11} .

Para el caso de nuestras mutantes fue posible medir la elevada tasa de reversión solamente en las mutantes que presentan el mayor nivel de termotolerancia: ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3 y ScIBT4 (Tabla 1). Existen algunas mutantes como la ScIBT5, ScIBT7, ScIBT12, ScIBT13 y ScIBT15 que presentan tamaño de colonia chico a las cuales no se les detectó reversión de tamaño de

colonia con el ensayo utilizado (Tabla 1). Esto sugiere, que presentan una frecuencia de reversión por abajo del nivel de detección con el ensayo utilizado. Las mutantes ScIBT6, ScIBT8, ScIBT9, ScIBT10, ScIBT11, ScIBT14 y ScIBT16 presentaron tamaño de colonia silvestre, para este tipo de colonia no es posible medir su nivel de reversión con este ensayo (Tabla 1). Existen varios mecanismos que pueden explicar una frecuencia de reversión mayor a la esperada por mutación espontánea en los organismos vivos. Uno de ellos puede ser el de los supresores omnipotentes o fenómenos tipo prión de levadura los cuales pueden conferir un alto nivel de supresión (Chernof *et al.*, 1995). Por ejemplo, cuando [PSI]⁺ está presente en células de levadura reduce la fidelidad traduccional, aumentando la frecuencia de supresión de mutaciones sin sentido, este es llamado un supresor omnipotente debido a que puede suprimir las tres mutaciones sin sentido existentes. El carácter [PSI]⁺ es dominante en una cruce por cepas [psi]⁻ y su segregación no es mendeliana (4:0), en este caso la proteína alterada que porta la cepa [PSI]⁺ provoca que las proteínas normales de la cepa [psi]⁻ cambien a la conformación alterada, heredando este factor tipo prión de manera citoplasmática a los productos meióticos. Sin embargo, este no parece ser el caso para ScIBT1 y ScIBT2 ya que las segregantes de la cruce de una revertante por la mutante original correspondiente no presentaron una segregación 4:0 (Folch sin publicar).

El fenómeno utilizado en la generación de las Inmunoglobulinas (Ig's), donde se utiliza una RNA polimerasa que transcribe con una tasa de error elevada en la región variable de los genes que codifican para las Ig's puede ser otra opción para suprimir las mutaciones (Lewin, 1994).

Otro mecanismo alternativo es el fenómeno que presenta la levadura para cambiar de factor de apareamiento en poblaciones donde solamente existen levaduras con un solo tipo de factor de apareamiento; este proceso es parecido al de transposición donde las cepas que presentan actividad de endonucleasa HO, llevan a cabo un corte y una transferencia direccional donde la secuencia *HMLa*

(que codifica para el factor de apareamiento α) reemplaza la secuencia α en el locus *HML α* (que codifica para el factor de apareamiento α) o viceversa (Lewin, 1994).

Los elementos genéticos móviles como es el caso de los transposones pueden explicar también este alto fenómeno de reversión, ya que estos elementos al transponerse en alguna región del DNA son capaces de conformar un rearrreglo en otras secuencias genómicas, además pueden destruir un gen o bien alterar la regulación de los genes vecinos en el lugar donde se transponen. Para el caso de la levadura los transposones Ty pueden considerarse como uno de los factores que pueden conferir las mayores tasas de mutación en el genoma, estos presentan una frecuencia de transposición entre 10^{-7} - 10^{-8} , la cual se ve incrementada durante la exposición de las levaduras a estrés (Lewin, 1994).

Adicionalmente a estos posibles mecanismos por los cuales podemos explicar la alta frecuencia de supresión, pueden existir otro u otros mecanismos aún no descritos.

b) ¿Está ligada la reversión de tamaño de colonia chico a grande de las mutantes con la termotolerancia?

Como ya se mencionó en el primer apartado de esta sección, algunas de las mutantes originales dieron lugar a otras mediante reversión de tamaño de colonia chico a grande pero con la conservación de un elevado nivel de termotolerancia (ScIBT1 dió origen a ScIBT4; ScIBT2 a ScIBT10 y ScIBT11 dió origen a ScIBT13). Entonces surgió la pregunta: ¿en que proporción se conserva o se pierde la termotolerancia una vez que ocurre la reversión de tamaño de colonia chica a grande?

Únicamente se hizo un estudio al respecto utilizando revertantes independientes de la mutante ScIBT2 (Ver materiales y métodos). A estas revertantes se les determinó el nivel de termotolerancia por el método cuantitativo. En 19 de los casos, las revertantes presentaron un nivel de

termotolerancia semejante al de la cepa silvestre (0.02% de sobrevivencia), en tanto que una de las revertantes presentó nivel de termotolerancia elevado (6.4%), el cual no es el parental (Tabla 3). Este resultado sugiere la existencia de al menos dos formas de reversión en la mutante ScIBT2: uno donde el tamaño de colonia está ligado con la termotolerancia y otro que no está ligado a la termotolerancia, siendo más frecuente el primero. Estos datos también indican que posiblemente sean varios los mecanismos de supresión, podríamos inferir que en la mutante ScIBT2 puede haber más de una mutación que regula la termotolerancia. De ser este el caso las dos mutaciones estarían muy cercanas en el mapa genético de la levadura, ya que el análisis de segregación de 10 tétradas provenientes de la cruce entre ScIBT2 y W303 mostró una segregación para la termotolerancia y tamaño de colonia de 2:2 en todos los casos. Resta por hacer un análisis detallado de las demás mutantes que presentan este fenómeno de alta reversión.

c) ¿Juega algún papel la proteína HSP104 en la termotolerancia intrínseca y en el fenómeno de alta frecuencia de reversión de tamaño de colonia chico a grande de la mutante ScIBT2 ?

Los resultados de termotolerancia basal con las dobles mutantes *hsr3-2-Δhsp104LEU2*, revelaron una ligera disminución en el nivel de termotolerancia intrínseca (Tabla 4); sin embargo estas dobles mutantes *hsr3-2-Δhsp104LEU2* siguen siendo miles de veces más termotolerantes que la cepa silvestre, lo cual sugiere que otros factores además de HSP104 están involucrados en la termotolerancia de la mutante ScIBT2.

Los mutantes de ciclo celular *cdc25*, *cdc33* y *cdc35* muestran un fenotipo termotolerante cuando se exponen a 37°C por largos períodos de tiempo debido a que su función codificada es sensible a calor quedando arrestadas en la fase G1 del ciclo celular.

Estas mutantes mantienen un alto nivel de termotolerancia cuando se les expone a 50°C previa inducción a 37°C por varias horas (Plesset *et al.*, 1987). La progenitora silvestre de estas mutantes alcanza los máximos niveles de termotolerancia a 50°C durante los primeros 60 minutos de incubación a 37°C. Pasados los 60 minutos comienza a disminuir su nivel de termotolerancia (Plesset *et al.*, 1987).

Posiblemente alguna de nuestras mutantes esté alterada en algún punto control de la entrada a la fase estacionaria por las características de un largo tiempo de duplicación y de alta termotolerancia que algunas mutantes de este circuito regulatorio presentan.

Otra mutante reportada por Sewell *et al* (1995), está afectada en el factor transcripcional de respuesta al estrés por calor (HSTF). En el grupo de las 16 mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada, hay 2 que comparten las características de ser codominantes y una alta termotolerancia constitutiva con la mutante en HSTF, por lo cual no podemos descartar la posibilidad de que sean alélicas hasta no tener la evidencia genética.

Hasta hace poco, solamente se sabía del papel que juega la proteína HSP104 en la tolerancia a diferentes tipos de estrés. En los últimos años se ha descubierto el papel de HSP104 en fenómenos tipo prión a temperaturas no estresantes como es el caso del factor traduccional [PSI⁺], el cual parece ser un prión de la levadura (ver introducción). Estos elementos son dominantes y se transmiten con una herencia citoplásmica. Cuando una cepa [PSI⁺] es cruzada por una cepa [psi⁻] el diploide es siempre [PSI⁺] y sus cuatro productos meióticos también son [PSI⁺]. La hipótesis de que [PSI⁺] representa una alteración heredable en la conformación de la proteína (Wikner, 1994), tuvo un fuerte soporte al descubrir que la persistencia de [PSI⁺] dependía fuertemente de la proteína HSP104 (Chernoff *et al.*, 1995).

La sobreexpresión de la proteína HSP104 en cepas [PSI⁺] provoca reversión del fenotipo [PSI⁺] a [psi⁻] y cura a la levaduras del prión (Chernoff *et al.*, 1995). [PSI⁺] también puede ser curado por la delección de *HSP104* provocando un fenotipo [PSI⁺]-nunca más ([PSI⁺]-no more). Estas cepas nunca llegan a ser [PSI⁺] ni aún sobreexpresando la proteína Sup35, lo cual demuestra que HSP104 es necesaria para la preservación del prión [PSI⁺]. Tuite y Linqvist (1996), proponen que la proteína HSP104 es necesaria como chaperona para que [PSI⁺] adopte su conformación y para que se mantenga en esta conformación, de tal forma que cuando se sobreexpresa o se elimina a la proteína HSP104 se perturba el equilibrio y no puede mantenerse la forma infectiva. Debido a que nuestras mutantes presentan una tasa de reversión mayor que la tasa espontánea, decidimos averiguar si el problema de reversión de nuestras mutantes estaría mediado por un mecanismo tipo prión dependiente de la proteína HSP104.

Para ello se cruzó la cepa W303 (*Ahsp104::LEU2 HSR3*) por la mutante recesiva ScIBT2 *HSP104 hsr3-1* para lograr heterocigotas que fueron esporuladas para obtener haploides con los genotipos $\Delta hsp104::LEU2-hsr3-1$ y *HSP104-hsr31*. Los resultados revelaron que la ruptura del gen *HSP104* no tiene ningún efecto sobre la frecuencia de reversión ya que algunas de las esporas *hsr3 -1 hsp104::LEU2* presentan niveles de reversión tan altos como la mutante parental (Tabla 4). Además, haploides *hsr3-1 HSP104*, presentaron una disminución en la reversión de tamaño de colonia chico a grande 14 veces en relación a las cepas mutantes parentales termotolerantes (Tabla 4). Los resultados demostraron que la proteína HSP104 no está involucrada en el fenómeno de alta reversión de ScIBT. También sugiere la existencia de otro factor involucrado en el fenómeno de reversión de ScIBT2 que se está segregando durante la meiosis.

Se especuló en el subapartado a) de esta sección (III), que algunos eventos de reversión o supresión de las mutaciones podrían ser mediados por varios

mecanismos distintos como es el caso de los priones, las Ig's, etc. Para el caso de la mutante ScIBT2, se descarta la posibilidad de que este fenómeno de alta reversión sea mediado por cualquier mecanismo dependiente de la proteína HSP104; sin embargo no se descarta la posibilidad de que la reversión pueda deberse a un fenómeno epigenético dependiente de priones o supresores independientes de HSP104.

Actividad de un promotor quimérico de respuesta al estrés por calor (*HSP26/HSP70*) fusionado al gen reportero *LacZ* en diferentes fondos mutantes.

Marchler, *et al* (1997) utilizando construcciones que contienen las secuencias HSE y STRE fusionadas al gen reportero *LacZ* reportaron que mutantes *ras2* (las cuales producen bajos niveles de cAMP y son muy termotolerantes) y *bcy1* las cuales presentan un fenotipo opuesto a las mutantes *ras2*, no presentan actividad de β -galactosidasa a temperaturas no estresantes (23°C) al igual que la cepa silvestre. Cuando utilizaron la construcción con la secuencia HSE usando una temperatura de termoinducción las mutantes *ras2* y *bcy1* presentaron los mismos niveles de expresión que la cepa silvestre. Los resultados que obtuvieron para la cepa silvestre y la mutante *ras2* a los 60 minutos de termoinducción utilizando la construcción con la secuencia STRE se elevaron y son muy parecidos para ambas cepas en tanto que para la mutante *bcy1* los valores fueron nulos. Después de los 60 minutos de termoinducción los valores para la cepa silvestre decaen y para la mutante *ras2* siguieron aumentando. La mutante *bcy1* nunca presentó actividad a 37°C.

Los resultados obtenidos en este trabajo a 25°C para el promotor quimérico para la cepa silvestre W303 y para la cepa mutante *hsr1* (Iida y Yahara, 1984) (la cual sería equivalente a la mutante *ras2*) presentan un comportamiento parecido a los obtenidos por Marchler *et al* (1997) para la mutante *ras2* y su silvestre; a diferencia de estos resultados la mutante ScIBT2

que es muy termotolerante, presentó niveles elevados de actividad (174 veces) en relación a la cepa silvestre y se vieron incrementados a medida que aumentó el tiempo de termoinducción.

Los resultados obtenidos en este trabajo hacen suponer que la mutante ScIBT2 se encuentra alterada en algún punto regulatorio de las vías de transducción de respuesta al estrés (HSE y STRE) o bien se encuentra alterada en un mecanismo regulatorio alternativo de respuesta al estrés diferente de aquel mediado por cAMP.

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

CONCLUSIONES:

- 1) SE DEFINIERON UN TOTAL DE 6 GRUPOS DE COMPLEMENTACION PARA LAS 16 MUTANTES CON UNA TERMOTOLERANCIA INTRINSECA ELEVADA.
- 2) TODAS LAS MUTANTES CON UNA TERMOTOLEREANCIA INTRINSECA ELEVADA PRESENTAN NIVELES DE TERMOTOLERANCIA MUY ELEVADOS EN TODAS LAS ETAPAS DE CRECIMIENTO, EXCEPTO LA MUTANTE ScIBT14, LA CUAL SOLAMENTE A ETAPAS MUY TEMPRANAS DE LA FASE EXPONENCIAL ES UNAS CUANTAS VECES MÁS TERMOTOLERANTE QUE LA CEPA SILVESTRE Y EN ETAPAS MAS TARDIAS SE COMPORTA COMO ESTA.
- 3) LAS MUTANTES QUE PRESENTAN EL MAYOR NIVEL DE TERMOTOLERANCIA (ScIBT1, ScIBT2, ScIBT3 y ScIBT4) INTRINSECA SON LAS QUE PRESENTAN UNA MAYOR TASA DE REVERSION.
- 4) LA MUTANTE ScIBT2 PRESENTA AL MENOS DOS FORMAS DE REVERTIR DE TAMAÑO DE COLONIA CHICO A GRANDE, UNO QUE ESTA LIGADO A LA ALTA TERMOTOLERANCIA INTRINSECA Y UN SEGUNDO QUE ES MENOS FRECUENTE EL CUAL NO ESTA LIGADO A LA ALTA TERMOTOLERANCIA INTRINSECA.
- 5) *HSP104* NO ESTA INVOLUCRADO EN EL FENOMENO DE REVERSION DE LA MUTANTE ScIBT2. ESTOS RESULTADOS SUGIEREN QUE POSIBLEMENTE HAY OTRO FACTOR QUE ESTA MEDIANDO ESTE FENOMENO.
- 6) LOS RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL NIVEL DE TERMOTOLERANCIA BASAL DE LAS DOBLES MUTANTES ScIBT2(*hsr3-1-hsp104*) DEMUESTRAN QUE LA PROTEINA HSP104 NO ESTA INVOLUCRADA EN EL FENOMENO DE ALTA TERMOTOLERANCIA INTRINSECA DE ESTA MUTANTE.
- 7) LA ACTIVIDAD DE b-GALACTOSIDASA DE LA CONSTRUCCIÓN QUIMÉRICA *HSP26/HSP70::LACZ* DE LA MUTANTE ScIBT2 ES MAS ELEVADA QUE LA DE LA CEPA SILVESTRE EN CONDICIONES NO ESTRESANTES (25°C) Y EN CONDICIONES ESTRESANTES (39°C)

BIBLIOGRAFIA:

Amerik, A. Y., Antonov, V. K., Gorbalenya, A. E., Kotova, S. A., Rotanova, T. V. 1991. Site-directed mutagenesis of La protease. *FEBS Lett.* **287**: 211-214 pp

Arrigo, A. P. and Taguay, R. M. 1991. Expression of heat shock proteins during development in *Drosophila*. Results probl. *Cell Difer.* **17**: 106-109 pp

Atkinson, B. G. and Walden, D. B. 1985. Changes in eucariotic gene expression in response to environmental stress. Academic Press Inc., London. 339 pp

Bardwell, J. C. and Craig, E. A. 1988. Ancient heat shock gene is dispensable (Published erratum appears in *J. Bacteriol.* 1988. **170**: 4999). *J. Bacteriol.* **170**: 2977-2983 pp

Beckmann, R. P., Mizzen, L. E., Welch, W. J. 1990. Interaction of hsp70 with newly synthesized protein: implications for protein folding and assembly. *Science.* **248**: 850-854 pp

Belazzi, T. *et al.*, 1991. Negative regulation of transcription of *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (*CTT1*) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.* **10**: 585-592 pp

Bell, J., Neilson, L. and Pellegrini, M. 1988. Effect of heat shock on ribosome synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 91-95 pp

Berger, E. M. and Woodward, M. P. 1983. Small heat shock proteins in *Drosophila melanogaster* may confer thermal tolerance. *Exp. Cell. Res.* **147**: 437-442 pp

Bienz, M and Pelham, H. R. 1987. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv Genet.* **24**:31-72 pp

Bird, P., Gething, M. J., Sambrook, J. 1987. Translocation in yeast and mammalian cells: not all signals sequences are functionally equivalent. *J. Cell. Biol.* **105**: 2905-2914 pp

Bohley, P. and Seglen, P. O. 1992. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experimentia.* **48**: 151-157 pp

Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien. L. and Lindquist, S. 1989. Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3919-3930 pp

Boek, D. *et al.*, 1987. *The Saccharomyces cerevisiae CDC25* gene product regulates the RAS/Adenylate cyclase pathway. *Cell.* **48**: 789-799 pp

Bornstein, W. and Craig, E. 1990. Regulation of a yeast *HSP70* gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *EMBO J.* **8**: 2543-2553 pp

Cameron, S. *et al.*, 1988. cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism and heat shock resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* **53**: 555-556 pp

Casas, F. S., Folch, J. L., Martínez, L. M. y Nieto-Sotelo, J. Caracterización genética y molecular de mutantes con termotolerancia constitutiva de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del XXI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Manzanillo, Colima. 134 pp

Chandresekhar, G. N., Tilly, K., Woolford, C., Hendrix, R. and Georgopoulos, C. 1986. Purification and properties of the GroEs morphogenetic protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**: 12414-12419 pp

Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A and Kalousek, F. 1989. Mitochondrial heat shock-protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature.* **337**: 11718-11728 pp

Chernoff, Y. O. and Ono B. I. 1992. Dosage dependent modifiers of psi dependent omnipotent suppesion in yeast. *NATO ASI Ser. H.* **81**: 101.

Chernoff, Y., Lindquist, S., Ono B., Inge-Vechtomov, S and Liebman, S. 1995. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor (*Psi*). *Science.* **268**: 880-884 pp

Chin, D. T., Goff, S. A., Webster, T., Smith, T. and Goldberg, A. L. 1988. Sequence of the *Lon* gene in *Escherichia coli*: A heat shock gene which encodes the ATP-dependent protease La. *J. Biol. Chem.* **263**: 11718-11728 pp

Chretien P. and Landry, J. 1988. Enhanced constitutive expression of the 27-kDa heat shock protein in heat resistant variants from chinese hamster cells. *J. Cell Physiol.* **137**: 157-166 pp

Craig, E., Ingolia, T. D. and Manseau, L. J. 1983. Expression of *Drosophila melanogaster* heat shock cognate genes during heat shock and development. *Dev. Biol.* **99**: 418-426 pp

Craig, E., Kang, P. J. and Boorstein, W. 1990. A review of the role of hsp70 kDa heat shock protein in protein translocation across membranes. *Antonnie Van Leeuwenhoek.* **58**: 137-146 pp

Craig, E. A. and Gross, C. A. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends in biochem. Sci.* **16**: 135-140 pp

Csermely, P. and Kahn, C. R. 1991. The 90 kDa heat shock protein (hsp90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity. *J. Biol. Chem.* **266**: 4943-4950 pp

Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. and Roser, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology.* **10**: 1007-1011 pp

Coote, P. J., Jones, M. V. and Cale, M. B. 1992. TPK gene products mediate cAMP- independent thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology.* **138**: 2551-2557.

Coote, P. J. Cole, M. B. and Junes, M. V. 1991. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *Journal of General Microbiology.* **137**: 1701-1708 pp

Davis, E. S., Becker, A., Heitman, J., Hall, M. N. and Brennan, M. B. 1993. A novel yeast cyclophilin gene essential for lactate metabolism at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 11169-11173 pp

DeLuca-Flaherty, C., Mckay, D. B., Parham, P. and Hill, B. L. 1990. Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LCa to stimulate ATP hydrolysis. *Cell.* **62**: 875-887 pp

Deshaies, R. J., Koch, B. D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A. and Schekman, R. 1988. A subfamily of stress protein facilitates translocation of secretory

and mitochondrial precursor protein. *Nature*. 332: 800-805 pp

DiDomenico, B. J., Bugaisky, G. E. and Lindquist, S. 1982. The heat shock response is self-regulated at both the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cell*. 31: 593-603 pp

Dobzhansky, T. 1975. *Genética del Proceso Evolutivo*. Extemporaneos ed. México. 463 pp

Dubiel, W., Ferrell, K., Pratt, G. and Rechsteiner, M. 1992. Subunit 4 of 26S protease is a member of a novel eukaryotic ATPase family. *J. Biol. Chem.* 267: 22699-22702 pp

Ellis, R. J. and van der Vies, S. M. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 321-347 pp

Engelberg, D. *et al.*, 1994. The yeast and mammalian Ras pathway control transcription of heat shock genes independently of heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4929-4937 pp

Erdmann, R., Wiebel, F. F., Flessau, A., Rytka, J. and Beyer, A. 1991. *PAS1*, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell*. 64: 499-510 pp

Falkner, F. G., Saumweber, H. and Biessman, H. 1981. Two *Drosophila melanogaster* protein related to intermediate filament proteins of vertebrate cells. *J. Cell. Biol.* 91: 175-183 pp

Feder, J. H., Rossi, J. M., Solomon, J., Solomon, M. and Lindquist, S. 1992. The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes Dev.* 6: 1402-1413 pp

Finley, D., Bartel, B. and Barshavsky, A. 1989. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosomes biogenesis. *Nature*. 338: 394-401 pp

Finley, D. and Chau, V. 1991. Ubiquitination. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 7: 25-69 pp

Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. 1984. Detection of enzyme catalysis for cis trans isomerization of peptide bonds using proline containing peptide as substrates. *Biomed. Biochem. Acta.* 43: 1101-1112 pp

Flaherty, K. M., DeLuca, Flaherty. C. and Mckay, D. B. 1990. Three dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. **346**: 623-628 pp

Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. and Rothman, J. E. 1991. Peptide binding especificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*. **353**: 726-730 pp

Folch, J. L., Matínez, L. M. and Nieto-Sotelo, J. 1995. Genetical and molecular analysis of induced thermotolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del VII Congreso Nacional de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Primer Simposium Mexico-Estados Unidos. 174 p

Foster, P. 1993. Adaptative mutation: The uses of adversity. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 467-504 pp

Georgopoulus, C. and Ang, D. 1990. The *Escherichia coli* groE chaperonins. *Semin. Cell. Biol.* **1**: 19-25 pp

Gething, M. J., McCammon, K. and Sambrook. J. 1986. Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell*. **46**: 939-950 pp

Gething, M. J. and Sambrook, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature*. **355**: 33-45 pp

Gietz, D., St. Jean. A., Woods, R.A. and Schiestl, R. H. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **6**:1425

Glotzer, M., Murray, A. W. and Kirchner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. **349**: 132-138 pp

Goldberg, A. L. 1972. Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**: 422-426 pp

Goloubinoff, P., Gatenby, A. A. and Lorimer, G. H. 1989. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxilase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*. **337**: 44-47 pp

Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M. 1990. Conesevation of the regulatory subunit for the Clp ATP-depending protease in

prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 3513- 3517 pp

Gropper, R., Brandt, R. A., Elias, S., Bearer, C. F. and Mayer, A. 1991. The ubiquitin activating enzyme, E1, is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins. *J. Biol. Chem.* **266**: 3602-3610 pp

Gounalaki, N. and Thireos, G. 1994. Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO. J.* **13**: 4036-4041 pp

Guarente, L. and Ptashne, M. 1981. Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome c gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* . **4**:2199-2203

Hartl, F. U., Martin, J. and Neupert, W. 1992. Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 293-322

Harshman, K. D., Moye-Rowley., W. S. and Parker, C. S. 1988. Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4. *Cell.* **2**:321-330 pp

Hemmingsen, S. M., Woolford, C., van der Vies, S. M., Tilly, K. and Dennis, D. T. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature.* **333**: 330-334 pp

Hendrix, R. W. 1979. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol.* **129**: 375-392 pp

Hershko, A. and Ciechanover, A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* **61**: 761-807 pp

Hochtrasser, M., Ellison, M. J., Chau, V. and Varshavsky, A. 1991. The short-lived Mat α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 4606-4610 pp

Horwich, A. L. and Willison, K. 1993. Protein folding in the cell: functions of two families of molecular chaperones, hsp60 and TF55-TCP1. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* **339**: 313-326 pp

Iida, H. and Yahara, I. 1984. A heat shock resistance mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and

altered growth. *Journal of Cell Biology*. **99**: 1441-1450 pp

Iida, H. 1988. Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 5555-5560 pp

Jacob, U., Gaestel, M., Engel, K. and Buchner, J. 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1517-1520 pp

Jakobsen, B. K. and Pelham, H. R. 1988. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5040-5042 pp

Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S. and Clark, W. P. 1988. The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 15226-15236 pp

Kobayashi, N. and McEntee, K. 1990. Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 6550-6554 pp

Kobayashi, N. and McEntee, K. 1993. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 248-256 pp

Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L. and Lindquist, S. 1986. An ancient developmental induction: heat shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science.* **231**: 1154-1157 pp

Langer, T., Pfeifer, G., Martin, J., Baumeister, W. and Hartl, F. U. 1992. Chaperonin-mediated protein folding: GroES binds to one end of the GroEL cylinder, which accommodates the protein substrate within its central cavity. *EMBO J.* **11**: 4757-4765 pp

Lazlo, A. 1992. The effects of hyperthermia on mammalian cells structure and function. *Cell. Prolif.* **25**: 59-87 pp

Lazlo, A. and Li, G. C. 1985. Heat resistant variants of chinese hamster fibroblast altered in expression of heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8029-8033 pp

Lewis, V. A., Hynes, G. M., Sabil, H. and Wilson, K. 1992. T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eucaryotic cytosol. *Nature.*

358: 249-252 pp

Li, G. C. and Lazlo, A. 1985. Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for heat shock proteins. Orlando, F L: Academic. 227-254 pp (Atkinson B G, Walden D B, eds. 1985).

Li, G. C. and Werb, Z. 1982. Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 3218-3222 pp

Li, G., Li, L., Liu, Y., Rehman, M. and Lee, W. 1992. heat shock protein hsp70 protect cell from thermal stress even after deletion of its ATP binding domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **89**: 2036-2040 pp

Lipinska, B., Fayat, O., Baird, L. and Georgopoulos, C. 1989. Identification, characterization and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J. Bacteriol.* **171**: 1574-1584 pp

Lorimer, G. H. 1992. Role of accessory proteins in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**: 26-34 pp

Matile, P. 1969. Prospects of yeast cytology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **35**(Suppl):59-70 pp

Matsumoto, K., Uno, I. and Ishikawa, T. 1985. Genetic analysis of the role of cAMP in yeast. *Yeast.* **1**: 15-24 pp

Marchler, G., Scüler, C., Adam, G. and Ruis, H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**: 1997-2003 pp

McAlister, L. and Finkelstein, D. 1980. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem and Biophys res comm.* **3**: 819-824 pp

McAlister, L. and Holland, M. J. 1985. Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* **28**:15019-15027 pp

McMullin, T. W. and Halberg, R. L. 1988. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli groEL* gene. *Mol.Cell. Biol.* **8**:371-380 pp

Merk, K. B., Groenen, P. J., Vooter, C. E., de Haard Hoekman, W. A. and Horwitz, J. 1993. Structural and functional similarities of bovine alpha crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J. Biol. Chem.* **268**: 1046-1056 pp

Minami, Y., Kawasaky, H., Susuky, K. and Yahara, I. 1993. Calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat-shock protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 9604-9610 pp

Miyata, Y. and Yahara, I. 1992. The 90 kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-agregation and enhanced its kinase activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 7042-7047 pp

Munro, S. and Pelham, H. R. 1986. An hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell.* **46**: 291-300 pp

Nadeau, K., Das. A. and Walsh, C. T. 1993. Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* **268**: 1479-1487 pp

Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda. A and Parker, C. 1990. The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell.* **82**: 807-817 pp

Nieto-Sotelo, J., Folch, J. L., Martínez, L. M., Casas, F. S. and Ventura, L. 1995. Análisis genético-molecular de la termotolerancia intrínseca en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Memorias del II Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. San Miguel de Allende, Gto. 23 pp

Neupert, W., Hartl, F. U., Craig, E. A. and Pfanner, N. 1990. How do polypeptides cross the mitochondrial membranes? *Cell.* **63**: 447-450 pp

Nover, L., Ed. 1991. Heat shock response. Boca Raton, F L: CRC press, 1st ed.

Ozkainak, E., Finley D. and Varshavsky, A. 1984. The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*: **312**: 663-666 pp

Parag, H. A., Raboy, B. and Kulka, R. G. 1987. Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* **6**: 55-61 pp

Paris, S. and Pringle, R. 1983. *Saccharomyces cerevisiae* heat and gluculase sensitivities and starved cells. *Ann. Microbiol (Paris)* **134B**: 379-385 pp

Parry, J., Davies, P. J., and Evans, W. E. 1976. The effect of cell age upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **146**: 27-35 pp

Parsell, D. A. and Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damage proteins. *Ann. Rev. Genet.* **27**: 437-496

Parsell, D. A., Kowall, A. S., Siger M. A and Lindquist, S. 1994. Protein disaggregation mediated by heat shock protein HSP104. *Nature.* **372**: 475.

Parsell, D. A., Taulien, J., Lindquist, S. 1993. The role of heat shock proteins in thermotolerance. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* **339**: 279-286 pp

Patriarca, E. J. and Maresca, B. 1990. Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp. Cell. Res.* **190**: 57-64 pp

Pelham, H. R. 1984. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* **3**: 3095-3100 pp

Petko, L. and Lindquist, S. 1986. Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell.* **45**: 885-894 pp

Piper, P. W. 1995. The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *Microbiology letters.* **134**: 121-127 pp

Piper, P. W., Curran, B., Davies, M.W., Hirst, K., Lockheart, A. and Seward. K. 1988. Catabolite control of the elevation of PGK mRNA levels by heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **3**:353-361

Plesset, J., Ludwin, J. R., Cox, B. S. and McLughlin, C. S. 1987. Effect of the cell cycle position on the thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**: 779-784 pp

Pratt, W. B., Hutchison, K. A. and Scherrer, L. C. 1992. Steroid receptor folding by heat shock proteins and composition of the receptor heterocomplex. *Trends. Exp. Med.* **3**: 326-333 pp

Reading, D. S., Halder, R. L. and Myers, A. M. 1989. Characterization of the yeast *HSP60* gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature.* **337**: 655-659 pp

Rechsteiner, M., Hoffman, L., Dubiel, W. 1993. The multicatalytic and 26S proteases. *J. Biol. Chem.* **265**: 6065-6068 pp

Rose, D. M. Novick, P., Thomas, J. H., Bostein, D and Fink, G. 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromeric-containing shuttle vector. *Gene.* **60**: 237-243 pp

Rossi, J. M. and Lindquist, S. 1989. The intracellular location of yeast heat shock protein 26 varies with metabolism. *J. Cell Biol.* **108**: 425-439 pp

Ruis, H. and Schüler, C. 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays.* **11**: 959-965 pp

Saibil, H. R., *et al.*, 1993. ATP induces large quaternary rearrangements in a cage-like chaperonin structure. *Curr Biol.* **3**: 265-273 pp

Sanchez, Y. and Lindquist, S. 1990. HSP104 is required for induced thermotolerance. *Science.* **248**: 1112-1115 pp

Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taullien, J., Vogel, J. L. and Craig, E. 1993. Genetic evidence for a functional relationship between hsp104 and hsp70. *J. Bacteriol.*

Sanchez, Y., Taullien, J., Borkovich, K. A. and Lindquist, S. 1992. HSP104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.* **11**: 2357- 2364 pp

Sewell, A *et al.*, 1995. Mutated yeast heat shock transcription factor exhibits elevated basal transcriptional activation and confers metal resistance. *Journal of Biological Chemistry.* **42**: 25079-25086 pp

- Scheremberg-Francino, A. and Moustacchi, E. 1972. Lethal and mutagenesis effects of elevated temperature on haploid yeast. *Mol. Gen. Genet.* **115**: 243-257 pp
- Schmid, F. X., Mayr, L., Mucke M and Schombruner E. R. 1992. prolyl isomerase: the role in protein folding . *Adv. Protein. Chem.* In press.
- Schroder, H., Langer, T., Hartl F. U and Backau, B. 1993. DnaK, DnaJ, GrpE form a celular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO. J.* **12**: in press.
- Shin, D. *et al.*, 1987. Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation. *J. Bacteriol* **1**: 244-250 pp
- Schüler, C., Brewster, J. L., Alenxander, M. R., Gustin, M. C. and Ruis, H. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription *via* the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene. *EMBO. J.* **13**: 4382-4389 pp
- Skowyra, D., Georgopoulus, C. and Zylicz, M. 1990. The *Escherichia coli* *dnaK* gene product, the hsp70 homolog con reactivate heat inactivated RNA polymerase in an ATP hidrolisis dependent manner. *Cell.* **62**: 939-944 pp
- Slater, M. and Craig, E. 1987. Transcriptional regulation of an *hsp70* Heat Shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1906-1916 pp
- Solomon, J. M., Rossi, J. M., Golic, K. and Lindquist, S. 1991. Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat shock regulation in Drosophila. *New Biol.* **3**: 1106-1120.
- Sorger, P. K. and Pelham, H. R. 1987. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO. J.* **10**:3035-3041
- Sorger, P. K., Lewis, M. J. and Pelham, H. R. 1987. Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature.* **6134**:81-84 pp
- Sorger, P. K. and Nelson, H. C. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* . **5**:807-813 pp
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503

- Spevak, W. *et al.*, 1983. Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *J. Biol. Chem.* **258**: 1545-1551 pp
- Squires, C. and Squires, C. L. 1992. The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J. Bacteriol.* **174**: 1081-1085 pp
- Squires, C. L., Pedersen, S., Ross, B. M. and Squires, C. 1991. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* **173**: 4254-4262 pp
- Stewart, D. E., Sarkar, A. and Wampler, J. E. 1990. Occurrence and the role of *cis* peptide bonds in protein structure. *J. Mol. Biol.* **214**: 253-260 pp
- Struch, F. and Carlson, M. 1993. Two homolog zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SFN1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3872-3881 pp
- Sykes, K., Getting, M. J. and Sambrook, J. 1993. Proline isomerases function during heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 5853-5857 pp
- Trent, J. D. *et al.*, 1991. A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eucaryotic protein T-complex polypeptide. *Nature.* **354**: 490-493
- Tuite, M. F., Bentley, N. J., Bossier, P. and Fitch, I. 1990. The structure and function of the small heat shock proteins. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Hsp26 protein. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **58**: 147-154 pp
- Velázquez, J. M., Sonada S., Bugaisky, G. and Lindquist, S. 1983. Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell. Biol.* **96**: 286-290 pp
- Vierling, E. 1991. The roles of the heat shock protein in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **42**: 579-620 pp
- Viitanen, P. V., *et al.*, 1992. Mammalian mitochondrial chaperonin 60 as a single toroidal ring. *J. Biol. Chem.* **267**: 695-698 pp
- Vogel, J. L., Parsell, D. A. and Lindquist, S. 1995. Heat shock proteins Hsp104 and Hsp70 reactivate mRNA splicing after heat inactivation. *Curreny Biology.* **5**: 306-317 pp
- Warters, R. L. and Stone, O. 1983. The effect of hyperthermia on DNA replication in HeLa Cells. *Radiat. Res.* **93**: 71-84 pp

Welch, W. J. and Suhan, P. 1985. Morphological study of the mammalian stress response: Characterization on change in cytoplasmatic organelles, cytoskeleton and nucleoli, and apparence of intranuclear actin filaments in rat fibroblast after heat shock treatment. *J. Cell. Biol.* **101**: 1198-1211 pp

Werner-Washburne, M., Stone, D. E. and Craig, E. 1987. Complex interactions among members of an essential subfamily of *hsp70* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Moll Cell Biol.* **7**: 2568-2577 pp

Werner-Washburne, M. *et al.*, 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology.* **19** (6): 1159-1166 pp

Wiederrecht, G., Shuey, D. J., Kibbe, W. A. and Parker, C. S. 1987. The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties. *Cell.* **48**: 507-515 pp

Willem, H. and Moradas, F. 1993. Stres response of yeast. *Biochem J.* **290**: 1-13 pp

Wiemken, A. 1990. Threhalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohidrate. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **58**: 209-217.

Wieser, R. *et al.*, 1991. Heat shock factor-independent control of transcription of the *CTT1* gen encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 12406-12411 pp

Wikner, R. B. 1994. [URE3] as an alteraded URE2 protein: Evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* **264**: 566

Woo, K. M., *et al.*, 1992. The heat shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**: 20429-20434 pp

Yost, H. J. and Lindquist, S. 1986. RNA splicing is interrumped by heat shock and is recue by heat shock protein synthesis. *Cell.* **45**: 185-193 pp