

0038121
Rey.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARACTERIZACION GENETICA Y FISIOLÓGICA DE
MUTANTES DE *S. CEREVISIAE* ALTERADAS EN
LA RESPUESTA A ESTRES: UN PAPEL
ALTERNATIVO DE LA BIOSINTESIS DE TIROSINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

M. EN C. SANDRA AMALIA EDVIGE LUPO RIZZO

263773

DIRECTORA DE TESIS: DRA MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

Abstract

Los microorganismos que crecen en forma aeróbica están sujetos al efecto de los intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs), como por ejemplo el radical superóxido el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas moléculas se generan como consecuencia de los procesos metabólicos celulares normales como la respiración. Como consecuencia del efecto perjudicial de estas especies reactivas de oxígeno, los organismos aeróbicos han desarrollado una amplia variedad de estrategias de protección frente al estrés oxidativo. En *Saccharomyces cerevisiae* hay varios genes que están implicados en esa protección. En este trabajo presentamos la caracterización fenotípica de una mutante de *S. cerevisiae* que no crece en agitación. Cuando esta cepa se incubaba en condiciones aeróbicas no crece y pierde viabilidad, sin embargo puede crecer en condiciones de microaerofilia o anaerobiosis. La pérdida de viabilidad se previene si se le agrega al medio el antioxidante 2-mercaptoetanol o el agente que secuestra iones Fe^{+2} . El fenotipo de esta mutante sugiere que la cepa es incapaz de contener con las especies reactivas de oxígeno generadas como consecuencia del metabolismo aeróbico. Esta cepa fue complementada con una biblioteca genómica de levadura. Las transformantes obtenidas portan plásmidos que llevan el gen *TYR1*, el cual codifica para una de las enzimas que participan en la biosíntesis de tirosina. Otra mutante *tyr1* monogénica proveniente del Yeast Genetic Stock Center mostró una sensibilidad mayor al peróxido de hidrógeno en relación a la cepa *TYR1*. Esta sensibilidad se curó cuando la cepa fue complementada con el gen *TYR1*. Considerando los resultados obtenidos, nosotros proponemos que los maninoácidos podrían tener un papel adicional al de formar parte de las proteínas y que la tirosina participa en la protección frente al estrés oxidativo.

Abstract

All aerobically growing microorganisms encounter reactive oxygen intermediates (ROIs), including the superoxide anion free radical, hydrogen peroxide and the hydroxyl radical. These molecules are generated as a consequence of normal cellular metabolic processes such as respiration. As a result of the harmful nature of ROIs, aerobically growing organisms have developed a wide variety of strategies for protection from oxidative stress. There are a number of genes involved in the stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this study we report the phenotypic characterization of a *S. cerevisiae* mutant unable to grow under agitated conditions is presented here. When this strain was incubated under aerobic conditions, it did not grow and the viability of the culture decreased but growth in microaerophilic or anaerobic cultures. The loss in viability was prevented by the addition of 2-mercaptoethanol antioxidant or 1,10-phenanthroline Fe^{+2} chelating agents to the medium. The phenotype of this mutant suggested that this strain was unable to withstand the reactive oxygen species generated as a consequence of aerobic metabolism. This strain was complemented with plasmids from a yeast genomic library. The transformants that were obtained carried plasmids harboring the *TYR1* gene, which codes for one of the enzymes involved in tyrosine biosynthesis. A monogenic *S. cerevisiae tyr1* mutant obtained from the Yeast Genetic Stock Center showed higher sensitivity to hydrogen peroxide than *TYR1* strain. This sensitivity was reverted when this strain was complemented with the *TYR1* gene. Considering this results, we propose that the amino acid could play additional roles to their fundamental function in the buildup of proteins and tyrosine plays a role in the protection against oxidative stress.

*A mis hijos Carolina y Marcos (por orden de aparición)
porque son lo mas importante.*

A Julio que siempre estuvo a mi lado y sin él quién sabe.

*A mi mamá y a mi hermano que nunca dejaron de alentarme
y siempre están conmigo.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alicia González, por todo lo que aprendí a su lado, por sus sugerencias, por las discusiones diarias, por su afecto y por la paciencia que me tuvo.

A los miembros del Comité Tutorial: Dra. Alicia González, Dra. Annie Pardo y Dr. Luis Servín por la discusión y sugerencias durante la realización del trabajo.

A los miembros del Jurado: Dra. Alicia González, Dra. Annie Pardo, Dra. Guadalupe Espin, Dra. Carmen Gómez, Dr. Luis Servín, Dr. Edgardo Escamilla y Dr. Roberto Coria por la revisión y corrección de la tesis.

A todos compañeros del laboratorio, Lichi, Cristina, Lina, Simón, Lourdes, Amaranta, Alex, Mauricio y a Carlos (del lab. 302-ote) por su constante apoyo y por hacerme sentir como en casa.

A Simón y Alex además por ayudarme con las figuras.

Al Dr. Roberto Coria por su ayuda en la construcción del plásmido pSL8, por proporcionarme el vector y por siempre estar dispuesto a responder a mis dudas.

Al Dr. Roberto Gaxiola por sus consejos en la manipulación del RNA.

A todos los que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores del gobierno de México por el otorgamiento de mi Beca de Doctorado.

Al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado, por el financiamiento parcial del proyecto de investigación.

Esta investigación fue financiada por la Dirección General del Personal Académico, UNAM, Proyectos N° IN-201894 y IN-204695 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (N°. 400360'5'2549 PN).

El trabajo fué realizado en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

RESUMEN

Para contrarrestar el efecto perjudicial de las especies reactivas de oxígeno, generadas en los procesos metabólicos normales, los organismos aerobios han desarrollado en el curso de la evolución diversas estrategias de protección frente al estrés oxidativo. En *Saccharomyces cerevisiae* existen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de protección. Varias enzimas como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas participan directamente en la detoxificación de peróxido de hidrógeno y de radicales superóxido. Existen también compuestos cuya protección se produce mediante mecanismos no enzimáticos. El alfa tocoferol (vitamina E) y el glutatión funcionan como quelantes de radicales libres. Todos estos procesos actúan en conjunto para proteger a la célula del daño producido por radicales libres.

En este trabajo se presenta la caracterización fenotípica de una cepa mutante de *S. cerevisiae* (CN50) sensible a oxígeno. Esta mutante pierde viabilidad si se incuba en medio mínimo con glutamina y en alta concentración de oxígeno. La pérdida de viabilidad se revierte con el agente antioxidante B-mercaptoetanol, el compuesto quelante de hierro OFA (1-10 fenantrolina), en condiciones de microaerofilia o en anaerobiosis. Estos resultados sugieren que la cepa CN50 tiene una mutación que genera una condición hiperoxidante con la cual las células no pueden contener y se mueren. Debido a que la mutante CN50 es estéril, no se pudo hacer un análisis genético. Con el fin de identificar el gen responsable del fenotipo pleiotrópico que presentó la mutante, se complementó la cepa CN50 con un banco genómico de *S. cerevisiae*. De esta forma se obtuvo el plásmido pSL5, el cual establece el fenotipo silvestre a la mutante. En base al mapa de restricción del inserto se ubicó el gen que

complementó el fenotipo y se secuenció un fragmento EcoRI-HindIII de 900pb del mismo. La comparación de la secuencia obtenida, con las reportadas en el GeneBank nos permitió identificar al gen *TYRI*. Este gen codifica para la enzima p-nitrofenol deshidrogenasa, la cual cataliza la conversión de p-nitrofenol a p-hidroxifenilpiruvato, un intermediario de la vía de síntesis de tirosina. Por otra parte la actividad de p-nitrofenol deshidrogenasa que presentó la mutante fue muy baja. Estos resultados indican que la cepa CN50 tiene una mutación en *TYRI* y que está involucrada en la sensibilidad a oxígeno. Para investigar si *TYRI* está involucrado en la tolerancia al estrés oxidativo, y al estrés por calor, se determinó el efecto del H_2O_2 y de la temperatura sobre la viabilidad de cepas auxótrofas y protótrofas para tirosina. Las cepas auxótrofas presentaron mayor sensibilidad tanto a peróxido de hidrógeno como al calor. Estos resultados indican que *TYRI* está involucrado en la protección contra el estrés inducido por H_2O_2 y por calor. Sin embargo el gen no se induce en estas condiciones.

La existencia de una nueva ruta de síntesis de tirosina en *S. cerevisiae* se investigó mediante la interrupción del gen *TYRI*, en una cepa *tyr1⁻* revertante no auxótrofa para tirosina. Mediante la interrupción se obtuvieron solo auxótrofos de tirosina por lo tanto no existió otra ruta de biosíntesis.

La tirosina podría tener un efecto protector debido a la presencia de un grupo fenol, el cual al interaccionar con el radical hidroxilo produce un radical fenoxilo que puede estabilizarse. Por otra parte mediante la oxidación de la tirosina por peroxidasas, se consume peróxido de hidrógeno. Estos dos mecanismos contribuirían a disminuir la cantidad de radicales libres y por lo tanto a disminuir el daño producido por estos. Otros estudios nos permitirán establecer cuál es el papel que cumple la tirosina.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
	Estrés producido por calor	4
	Estrés producido por alta osmolaridad	7
	Estrés oxidativo	9
	Mecanismos de protección frente al estrés oxidativo	11
	Regulación de la transcripción de los genes que responden a estrés	15
	Papel de los aminoácidos en la protección frente al estrés	18
	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos	21
	Genes y enzimas	22
	Fenilalanina y tirosina	24
	Regulación de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos	26
	Regulación de la actividad enzimática	28
II.	OBJETIVOS	30
III.	LA TIROSINA PARTICIPA EN LA PROTECCIÓN FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO EN <i>S. CEREVISIAE</i>	31
IV.	RESULTADOS ADICIONALES	32
	Sensibilidad a temperatura	32
	Expresión de <i>TYR1</i> en respuesta al calor	36
	Existe una ruta alternativa a la mediada por <i>TYR1</i> para la biosíntesis de tirosina en <i>S.cerevisiae</i> ?	37
V.	DISCUSIÓN	39
VI.	CONCLUSIONES	49
VII.	PERSPECTIVAS	50
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	51

I. INTRODUCCION

La sobrevivencia de los organismos en la naturaleza depende de su capacidad de adaptación a los cambios producidos en el ambiente. Para ello se han seleccionado diversos mecanismos que permiten sentir esos cambios y responder con adaptaciones metabólicas. Estas implican mecanismos moleculares que se inducen en condiciones adversas y en su conjunto se denominan respuesta al estrés. Ruis & Schuller (1995) definen al estrés como los factores ambientales que causan una reducción en la tasa de crecimiento.

La respuesta al estrés permite tanto la protección ante los posibles daños producidos por las condiciones adversas como su reparación (Mager y Hoheman, 1997). Esta respuesta es universal e implica la inducción de cerca de 80 proteínas denominadas proteínas de estrés. Esta inducción ocurre entre 10 y 20 minutos después de aplicado el estrés. Si bien no se conoce exactamente la función de todas las proteínas que participan en la respuesta a estrés, los estudios hechos tanto en eucariotas como procariontes permiten correlacionar la presencia de estas proteínas con la resistencia de los organismos a diferentes tipos de estrés. El proceso puede considerarse como una respuesta general de las células a disturbios metabólicos (Mager & Moradas-Ferreira, 1993).

También en la respuesta al estrés la mayoría de los genes necesarios para el crecimiento disminuyen su expresión o no se expresan. La reducción en la expresión génica puede ser el resultado de la sensibilidad de los componentes esenciales de la maquinaria de transcripción a condiciones de estrés (Ruis & Schuller, 1995).

Diversos factores ambientales son capaces de desencadenar la respuesta al estrés (Tabla 1). Cuando las células se someten a diferentes tipos de estrés, se induce la síntesis de diferentes proteínas, pero existe una respuesta cruzada a diferentes

clases de estrés. Por ejemplo un pretratamiento de las células no muy severo pero que es capaz de inducir las proteínas de estrés, protege a las células de un tratamiento posterior a condiciones letales. La termo-resistencia se induce no solo por calor sino también es adquirida si se somete a las células a otros tipos de estrés como es el caso de cultivos con etanol o alta osmolaridad (Mager & Moradas-Ferreira, 1993). De la misma forma el ayuno por nutrientes convierte a las células en resistentes a otros tipos de estrés. Por otra parte la exposición de las células a diversos tipos de estrés provoca la activación de mecanismos que normalmente están implicados en los procesos homeostáticos (Mager y Hohman, 1997).

Tabla 1 . Factores que causan estrés en *S. cerevisiae* (Ruis & Schuller, 1995)

Ayuno por nutrientes
Utilización de fuentes de carbono no fermentables
Oxígeno y metabolitos derivados
Altas y bajas temperaturas
Iones de metales pesados
Alta y baja osmolaridad
pH altos o bajos
Agentes que dañan al DNA
Altas concentraciones de etanol
Desecación

En levaduras, el espectro de proteínas inducidas por estrés es similar al que se induce en otros organismos. Estas proteínas están localizadas en diferentes lugares de la célula en relación con la función que cumplen, muchas de ellas son chaperonas y en estas condiciones participan en protección frente a la desnaturalización térmica (Tabla 2).

Tabla 2.- Proteínas de estrés en levaduras. (Tomado de Mager & Moradas-Ferreira 1993)

Denominación	Localización celular	Función
Hsp150	Secretada	Desconocida
Hsp104	Núcleo	Tolerancia al estrés
Hsp83	Citosol/núcleo	Chaperonina
Hsp70	citosol/núcleo	Regulación del HSF
ssa1	Citosol	Chaperona
ssa2	Citosol	Chaperona
Ssa3	Citosol	Chaperona
Ssa4	Citosol	Chaperona
Ssb1	Desconocida	Desconocida
Ssb2	Desconocida	Desconocida
Ssc1	Mitocondria	Chaperona
Ssd1 (kar2p)	Retículo endoplásmico	Chaperona
Hsp60	Mitocondria	Chaperonina
Hsp26	Citosol/núcleo	Desconocida
Hsp12	Citosol	Desconocida
Ubiquitina	Citosol	Degradación de proteínas
Metalotioneina	Citosol	Fijan iones Fe y Cu
Enzimas		
enolasa	Citosol	Glicolisis
Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa	Citosol	Glicolisis
Fosfoglicerato quinasa	Citosol	Glicolisis
Catalasas	Citosol y peroxisoma	Defensas antioxidantes
γ-glutamilcisteino sintetasa		
Superóxido dismutasas	Citosol y mitocondria	Defensas antioxidantes
Factores de transcripción	núcleo	Inducción de la transcripción

De los varios factores que inducen una respuesta a estrés, las respuestas al estrés por calor, choque osmótico y oxidativo son las mejor caracterizadas. Probablemente estas respuestas están relacionadas, ya que tanto el estrés por calor como el osmótico resultan en alteraciones en las membranas celulares y por otra parte el estrés por calor también resulta en un aumento de radicales libres en las células (Moradas-Ferreira y cols., 1996; Varela & Mager, 1996).

Estrés producido por calor

La inducción de la síntesis de proteínas por calor se produce por un cambio en la temperatura de 23°C a 37°C. La mayoría de las proteínas inducidas tienen una estructura muy conservada, por ejemplo Hsp104, Hsp90, Hsp70 y Hsp60 fueron encontradas tanto en procariotas como en eucariotas. Mientras que otras como la Hsp26 se ha encontrado solamente en eucariotas (Craig, 1992). Aparentemente las funciones que cumplen en todos los organismos estudiados, son similares.

La proteína Hsp104 es miembro de una familia muy conservada que tiene como homólogas en *E. coli* las proteínas ClpA y ClpB. La proteína ClpA en *E. coli* funciona como una ATPasa, regulando a la proteasa ClpP, por lo cual se propone que en *Saccharomyces* podría tener la misma función (Parsell y cols., 1991). Estudios realizados en eucariotas superiores, demostraron que la proteína Hsp104, se localiza en el nucleolo, por lo cual se le atribuye una función de protección en la formación de los ribosomas (Mager & Moradas-Ferreira, 1993). Esta proteína es codificada por el gen *HSP104* (Sanchez y Linqvist, 1990; Parsell y cols. 1991), el cual se expresa en bajos niveles en condiciones óptimas para el crecimiento pero se induce mucho en respuesta al calor o cuando las células entran en fase estacionaria (Mager & Moradas-Ferreira, 1993). También participa en la adquisición de termotolerancia. La

expresión del gen *HSP104* es necesaria tanto para la termotolerancia de las células en la fase estacionaria como de las esporas, para la viabilidad a largo término en temperaturas bajas y para la tolerancia al etanol (Craig, 1992).

Las proteínas Hsp90 son codificadas por los genes *HSC82* y *HSP82* en *S. cerevisiae* (Farrelly and Finkelstein, 1984; Borkovich y cols. 1989). Estas proteínas son idénticas entre sí en un 97%. Son altamente conservadas en todos los organismos compartiendo al menos un 50% de identidad en la composición de aminoácidos en eucariotas que son distantes evolutivamente y el 40% con la proteína C62.5 de *E. coli* (Craig, 1992). Se supone que estas proteínas funcionan como chaperonas, es decir tienen la capacidad de unirse a otras proteínas y estabilizan una conformación particular. El gen *HSC82* se expresa en forma constitutiva y sólo se induce débilmente luego de la exposición de las células a una condición de estrés. En cambio *HSP82* se expresa poco a nivel basal y se induce luego de un aumento de temperatura, en la fase estacionaria y durante la esporulación (Kurts y cols. 1986). Ambos genes son esenciales y redundantes. Las cepas con mutaciones en alguno de ellos son viables mientras que la doble mutante no lo es (Borkovich y cols. 1989).

Las proteínas Hsp70 son similares bioquímicamente, tienen 50% de identidad en total y presentan en algunas regiones una identidad mayor (entre 50 y 97%). Estas proteínas son capaces de unirse a péptidos de secuencias variadas preferentemente hidrofóbicos, también unen ATP presentando una actividad de ATPasa débil. Se supone que algunas de las proteínas Hsp70 se unen a regiones desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas de proteínas y que participan en el transporte a través de las membranas (Craig, 1992). Las proteínas Hsp70 son codificada por una familia multigénica subdividida en 4 subfamilias (*SSA*, *SSB*, *SSC*, *SSD*) (Craig, 1992). La expresión de estos genes está modulada en forma diferente en respuesta a los cambios de temperatura y evidencian una expresión diferente en distintas

condiciones. En *Saccharomyces* se han identificado 8 genes relacionados con los genes *HSP70* de eucariotas (Tabla 2). La subfamilia *SSA* es indispensable para el crecimiento y codifica proteínas citoplásmicas. Los genes *SSA1* y *SSA2* presentan un nivel basal de expresión, aunque *SSA1* aumenta mucho su expresión cuando aumenta la temperatura. Otros genes de esta familia como *SSB1* y *SSB2*, en cambio, disminuyen luego de un aumento en la temperatura. La cepa doble mutante (*ssb1*, *ssb2*) presenta sensibilidad a baja temperatura. El gen *SSC1* codifica para una proteína de la matriz mitocondrial y también es esencial para el crecimiento fermentativo y respiratorio.

La proteína Hsp60 está localizada en la matriz mitocondrial y es codificada por un gen nuclear (*MIF4*), el cual es esencial. Este gen se expresa en forma constitutiva pero su síntesis es inducida luego de un aumento en la temperatura. Participa en el procesamiento y plegamiento de proteína por un proceso que requiere ATP (Craig, 1992).

Las proteínas de bajo peso molecular inducidas por calor como la Hsp26 y Hsp12, de *S. cerevisiae*, pertenecen a un grupo diverso que presenta elementos estructurales conservados y tienen la capacidad de formar estructuras poliméricas. Los genes *HSP26* y *HSP12* se expresan muy poco durante el crecimiento exponencial pero su transcripción se induce por un aumento brusco en la temperatura, por ayuno, al entrar en fase estacionaria y durante la esporulación (Craig, 1992, Mager & Moradas-Ferreira, 1993). La función que cumplen es hasta ahora desconocida.

La ubiquitina es una proteína encontrada en todas las células eucariotas, se encuentra libre o unida covalentemente a otras proteínas y participa en la degradación selectiva, no lisosomal de proteínas. Es codificada en *S. cerevisiae* por una familia multigénica *UBI1*, *UBI2*, *UBI3*, *UBI4* (Mager & Moradas-Ferreira, 1993). El gen

UBI4 codifica para un precursor de la proteína ubiquitina y es importante en la respuesta a estrés. Este gen se induce fuertemente con el aumento brusco de la temperatura y su transcripción se dispara cuando existen niveles elevados de polipéptidos anormales (Mager & Moradas-Ferreira, 1993).

Estrés producido por alta osmolaridad

Cuando las células se someten a condiciones de alta osmolaridad ocurre un flujo rápido de agua que produce una reducción en la presión de turgor. Esta reducción debe ser contrarrestada y la célula responde sintetizando o acumulando compuestos osmoprotectores (Higgins y cols., 1987; Varela y cols., 1992). *S. cerevisiae* muestra como consecuencia al shock osmótico una reducción en su viabilidad y síntesis de proteínas. También responde acumulando principalmente glicerol y trealosa cuando crece en fuentes no fermentables de carbono fundamentalmente en fase estacionaria (Varela y cols., 1992). Además de estas adaptaciones, se ha reportado la capacidad de *S. cerevisiae* de adquirir tolerancia al estrés osmótico si se somete a las células a un tratamiento previo con NaCl 0.7M (Varela y cols., 1992). Este tratamiento con NaCl 0.7M produce un aumento en la síntesis de 9 proteínas, dos de ellas corresponden a proteínas cuya síntesis se induce por calor: Hsp12 y Hsp26 y una es la glicerol 3- fosfato deshidrogenasa. Este aumento es producido por la inducción de la síntesis de sus mensajeros. La sacarosa (0.8M) también es capaz de producir la inducción pero, en un grado menor (Varela y cols., 1992).

Además de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la inducción de la síntesis de glicerol mediada por estrés, requiere el producto de los genes *HOG1* y *PBS2*. Las proteínas codificadas por estos genes constituyen un sistema de sensores

de la osmoregulación que intervienen en la respuesta a la alta osmolaridad (HOG, high osmolarity glicerol response). Este sistema regula la inducción del gen *CTT1* mediada por estrés osmótico (Schuller y cols., 1994).

Por otra parte la capacidad de crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl depende de varios genes. *HAL1*, fue el primer gen de este tipo que pudo relacionarse directamente con el estrés producido por NaCl (Gaxiola y cols. 1992). Cuando *HAL1* se inserta en un plásmido multicopia permite el crecimiento de la levadura en presencia de una concentración 1M de NaCl. Gaxiola y cols. (1992) demostraron que la expresión de *HAL1* se induce no solo en presencia de NaCl (1M) si no también en presencia de KCl (1M) y sorbitol (1.5M) Si bien *HAL1* no es un gen esencial para la viabilidad en condiciones normales de crecimiento, la interrupción del mismo, produce una disminución del crecimiento en condiciones con NaCl 1M. Se cree que la proteína producto de *HAL1* interacciona con los sistemas de transporte de K^+ , cambiando la relación intracelular Na^+/K^+ aumentando así la concentración interna de K^+ . De esta forma la toxicidad por sodio se contrarresta al mantenerse la relación Na^+/K^+ menor de 0.5. El gen *HAL3* también participa en la protección y su interrupción aumenta la sensibilidad a la sal. *HAL3* al igual que *HAL1* participa en la regulación de la salida de potasio de la célula y al parecer también regula la expresión del gen *ENA1*. Este gen codifica para una ATPasa, el principal mecanismo de salida de sodio de las células (Serrano y cols. 1997). La inducción de la expresión de *ENA1* esta mediada por la via HOG, una activación específica por sodio a través de calcineurina y es reprimida por glucosa (Serrano y cols. 1997; Alepuz y cols. 1997).

Estrés oxidativo

El oxígeno es el aceptor final de la fosforilación oxidativa y como tal ocupa un papel esencial en muchos procesos metabólicos asociados con la existencia aeróbica. Este proceso conduce a la formación de una variedad de especies reactivas de oxígeno (ROs, Reactive Oxygen Species).

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas muy inestables que tienen 1 o más electrones desapareados. Estas especies reactivas se pueden estabilizar extrayendo electrones de otras moléculas, lo cual resulta en la desestabilización de las moléculas donadoras (Halliwell & Aruoma, 1991). Las principales especies reactivas en *S. cerevisiae* son: el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical ($\cdot OH$) y el oxígeno en singulete (O). El radical superóxido es uno de los ROs más comunes en las células y puede generarse de varias formas. En las mitocondrias se genera por la reducción del dioxígeno (O_2) en el complejo I (NADH-ubiquinona) y en el complejo III (citocromo c) durante la respiración. Otras fuentes de generación de éste radical son los eventos celulares que implican transporte de electrones en cloroplastos o en microsomas del retículo endoplásmico (Santoro & Thiele, 1997) y autooxidación en interacciones con NADH y glutatión (reductantes celulares). El radical superóxido puede ser generado por agentes químicos como el paraquat y la menadiona. Si bien esta especie de oxígeno no es la más reactiva, ésta es capaz de generar otras especies reactivas de oxígeno, las cuales son muy reactivas. Debido a esto, la remoción de este radical, es muy importante. Esta se lleva a cabo por acción de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) (Halliwell & Aruoma, 1991; Santoro & Thiele, 1997).

El peróxido de hidrógeno no es considerado un radical libre pero tiene la propiedad de atravesar las membranas y generar el radical hidroxilo de varias formas. El peróxido de hidrógeno se genera por la acción de la superóxido dismutasa o por la acción de oxidasas que normalmente funcionan en la célula.

De todas las especies reactivas de oxígeno el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), es la más reactiva y peligrosa para las células. Se genera a través de la descomposición espontánea del peróxido de hidrógeno, o por aquella mediada por metales de transición como el Fe^{+2} , el Cu^+ y Ti^{+3} , vía la reacción de Fenton (Tabla 3). Luego por la reacción de Heber Weiss, que implica las formas oxidadas de los metales y el anión superóxido, se generan nuevamente las formas reducidas de los metales para acoplarse nuevamente a la reacción de Fenton (Tabla 3). Por lo tanto cualquier aumento en los niveles tanto de peróxido, superóxido o metales como Fe y Cu conduce a la producción de altos niveles de radical hidroxilo. Por otra parte, la radiación ionizante produce la fisión homolítica del enlace O-H del agua generando radicales $\cdot\text{OH}$ (Halliwell & Aruoma, 1991; Santoro & Thiele, 1997).

Tabla 3.- Reacciones que participan en la formación o destrucción de radicales libres (Santoro, 1997)

Superóxido dismutasa	$2\text{O}_2^- + 2\text{H} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
Reacción de Fenton	$\text{Metal}^{(n+1)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Metal}^{(n+1)+} + \text{HO}\cdot + \text{H}_2\text{O}$
Reacción de Heber-Weiss	$\text{Metal}^{(n+1)} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{Metal}^{(n+1)} + \text{O}_2$
Catalasa	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

El estrés oxidativo se produce cuando las especies reactivas de oxígeno no son adecuadamente removidas. Esto puede ocurrir si los antioxidantes se acaban o si se incrementa la producción de radicales libres, superando la capacidad de los

mecanismos antioxidantes naturales.

Los intermediarios reactivos de oxígeno reaccionan con las macromoléculas dañándolas o poniendo en funcionamiento una reacción en cadena en la que el radical libre va pasando de una macromolécula a otra lo que resulta en un daño extenso de las estructuras celulares. Como consecuencia de ello se produce daño en las proteínas e inactivación de enzimas por la oxidación de los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina, metionina y cisteína (Meneghini, 1997). También el radical hidroxilo produce peroxidación de los lípidos en las membranas y daño al DNA. Este radical se genera por el peróxido de hidrógeno que llega al núcleo y los iones Fe^{+2} o Cu^{+2} que se encuentran unidos al DNA (Meneghini, 1997). Las modificaciones producidas en el DNA son: 1) la ruptura de la cadena sencilla y doble del DNA; 2) modificaciones de las bases (Halliwell & Aruoma, 1991), algunas de las cuales como la 8-oxoguanina son potencialmente mutagénicas produciendo la transversión de G→T (Meneghini, 1997); 3) pérdidas de purinas o de pirimidinas y 4) oxidación del enlace fosfodiéster de los azúcares produciendo zonas sensibles a la ruptura (Santoro & Thiele, 1997; Maneghini, 1997).

Mecanismos de protección frente al estrés oxidativo en *S. cerevisiae*

Para poder utilizar al oxígeno como último aceptor de electrones en la producción de energía los organismos tuvieron que desarrollar sistemas muy efectivos de defensa frente a los intermediarios de oxígeno. La vida aeróbica implica un constante esfuerzo por mantener un balance entre la producción fisiológica de radicales libres y la detoxificación por parte de los mecanismos de defensa celulares

(Buttke y Sandstrom, 1994).

De esta forma encontramos que las células han desarrollado una variedad de mecanismos antioxidantes que funcionan como atrapadores de radicales libres y destoxicantes. Enzimas como las superóxido dismutasas y catalasas funcionan directamente como destoxicantes mientras que la γ -glutamilcisteino sintetasa, lo hace indirectamente.

Las superóxido dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que catalizan la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (Tabla 3). *S. cerevisiae* posee una SOD citosólica y dependiente de $\text{Cu}^{+2}/\text{Zn}^{+2}$ que es codificada por el gen *SOD1*. Esta proteína es un homodímero que une un átomo de Zn y un átomo de Cu requeridos para la catálisis. *S. cerevisiae* posee además una SOD mitocondrial, dependiente de Mn^{+2} . Esta es tetramérica y está codificada por el gen *SOD2* (Santoro & Thiele, 1997). La localización de estas dos enzimas es fundamental para la función que cumplen. Las mutantes de *S. cerevisiae* en *SOD1* y *SOD2* son sensibles al oxígeno y a compuestos que generan radicales libres. Por otra parte las células de levaduras mutadas en *SOD1* presentan auxotrofias para lisina, cisteína y metionina cuando crecen en condiciones aeróbicas y son sensibles a los niveles atmosféricos de oxígeno y a los radicales superóxido. Mutantes carentes de *SOD1* son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables. Las dos superóxido dismutasas son inducidas en condiciones de estrés oxidativo (Santoro & Thiele, 1997).

La catalasa cataliza la reacción que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Tabla 3). *S. cerevisiae* posee dos catalasas codificadas por genes diferentes. La catalasa T citosólica codificada por el gen *CTT1* (Spevak y cols. 1983) y la catalasa A peroxisomal codificada por *CTA1* (Cohen y cols. 1985). La expresión de los dos genes está regulada positivamente por el oxígeno y por el grupo hemo

(Hortner y cols. 1982). Por otra parte los dos genes responden en forma diferente a otros tipos de control. Mientras que *CTAI* se induce además por ácidos grasos (Hortner y cols. 1982), *CTTI* está bajo el control negativo del AMP. De esta forma la catalasa T está presente en bajos niveles cuando el organismo crece en condiciones nutricionales favorables pero aumenta mucho en condiciones de bajos nutrientes. La catalasa citosólica también está regulada por calor, estrés osmótico y oxidativo (Wieser y cols., 1991; Marchler y cols. 1993). Debido a que esta enzima está regulada por estos diferentes mecanismos se supone que su función es importante en condiciones donde se combinan varios tipos de estrés (calor, oxígeno, privación de nutrientes).

La γ -glutamilcisteino sintetasa es la enzima que cataliza el primer paso en la síntesis de glutatión. El glutatión juega un rol importante en la respuesta adaptativa en *S. cerevisiae* al estrés oxidativo. Wu y Myne-Rowlwy (1994) reportaron que la expresión de *GSH1*, el gen que codifica para la γ -glutamilcisteino sintetasa, se induce por estrés oxidativo. El papel que juega el glutatión en la respuesta al estrés está relacionado con la fase de crecimiento, ya que se demostró (Izawa y cols., 1995) que el contenido intracelular de este compuesto se incrementa tres veces en fase estacionaria. Este aumento hace suponer que el glutatión, es parcialmente responsable de la mayor resistencia al estrés que presentan las levaduras en fase estacionaria. La importancia biológica del glutatión se debe a la capacidad de capturar radicales libres a través del grupo sulfidriilo de la cisteína. Como consecuencia de esto se oxida a GSSG. El glutatión se regenera por la acción de la glutatión reductasa (codificada por *GLR1*) que depende de NADPH. La expresión de *GLR1* también se induce en presencia de oxidantes por medio del factor de transcripción yAP-1 (Grant y cols. 1996).

Otras proteínas como las metalotioneínas o el producto del gen *ATX1*,

participan en la homeostasis de metales (Halliwell & Aruoma, 1991; Lin y Culotta, 1995). El Cu y el Fe son metales ubícuos en las células y están presentes en la estructura de muchas proteínas y enzimas. Como elementos de transición sus formas iónicas participan en las reacciones de transferencia de electrones. Esa capacidad les permite participar como grupos prostéticos de enzimas que catalizan reacciones redox (Meneghini, 1997). Por otra parte, tienen un efecto negativo ya que intervienen en reacciones que generan radicales libres (Tabla 3). Debido a su importancia como cofactores y a su efecto perjudicial, las células deben tener mecanismos muy finos que les permitan mantener la homeostasis de esos iones. En *S. cerevisiae* la regulación de la homeostasis se lleva a cabo por la regulación del transporte de Fe y Cu y por proteínas que secuestran metales. Las metalotioneínas son proteínas reguladas por metales que unen iones de Fe^{+2} y Cu^{+2} secuestrándolos de forma que no estén en exceso dentro de la célula. El gen *CUPI* codifica para la metalotioneína de *S. cerevisiae*. La transcripción del mismo se induce en condiciones de estrés oxidativo (Thiele, 1996). La proteína codificada por *ATXI* presenta una alta similitud e identidad con varias proteínas bacterianas que son transportadores de metales. En *S. cerevisiae* se piensa que participa en la homeostasis de metales a través del transporte y/o secuestro del cobre. El gen *ATXI* se induce por estrés oxidativo, su sobreexpresión confiere a las células protección frente a radicales superóxido y frente al peróxido de hidrógeno mientras que su delección produce hipersensibilidad al estrés oxidativo (Lin y Culotta, 1995).

Finalmente otras moléculas no enzimáticas solubles como los pigmentos carotenoides, el ácido ascórbico y el ácido úrico secuestran radicales libres y pueden funcionar como antioxidantes solubles. El ácido ascórbico es sintetizado por las plantas y animales pero el hombre lo requiere en su dieta. Este compuesto es un agente reductor que reduce Fe^{+3} a Fe^{+2} y además ayuda en la destoxificación

de radicales libres, ya que reacciona con radicales $\cdot\text{OH}$, radicales superóxido y oxígeno en singulete para dar semidehidroascorbato el cual no es muy reactivo (Halliwell & Gutteridge, 1989). El ácido úrico tiene la capacidad de secuestrar oxígeno en singulete, radical peroxilo, y radicales hidroxilo. Se supone que, al ser soluble en el plasma cumple una función antioxidante y que en el hombre la pérdida de la enzima urato oxidasa durante la evolución tuvo un efecto benéfico (Ames y cols. 1981). Las moléculas como el α -tocoferol, en cambio, son lipofílicas y su acción se restringe a las membranas celulares en donde impiden la peroxidación de los lípidos por su capacidad de reaccionar con los radicales libres y bloquear la reacción en cadena que se produce por la oxidación de los componentes de la membrana (van Acker, 1993; Halliwell & Aruoma, 1991).

Regulación de la transcripción de los genes que responden a estrés.

La respuesta a condiciones de estrés está mediada por factores de transcripción que se unen a secuencias consenso en los promotores de los genes que regulan. Esta respuesta es compleja y son varios los factores de transcripción identificados que son capaces de inducirla (Tabla 4).

Tabla 4.- Regulación de la transcripción de los genes inducidos por estrés

Gen	Elemento	Factor
<i>CTT1</i>	STRE, HSE	Mnsp, HSF, Mac1p
<i>HSP104</i>	STRE, HSE	Mnsp, HSF
<i>DDR2</i>	STRE	Mnsp
<i>TPS2</i>	STRE	Mnsp
<i>GSY2</i>	STRE	Mnsp
<i>GPH1</i>	STRE	Mnsp
<i>HSP12</i>	STRE	Mnsp
<i>UBI4</i>	HSE	Mnsp
<i>SSA3</i>	PDS	desconocido
<i>GSH1</i>	ARE	yAP-1
<i>GLR1</i>	ARE	yAP-1
<i>TRX2</i>	ARE	yAP-1
<i>SSA1</i>	ARE, HSE	yAP-1, HSF
<i>SOD/CuZn</i>	ARE	yAP-1
<i>HOG1</i>	STRE	Mnsp
<i>CUP1</i>	HSE	HSF, Ac1p

Los primeros elementos que se descubrieron, participan en la respuesta al estrés por calor. HSE (heat shock element) es una secuencia consenso de 5 pares de bases que se repiten alternando su orientación (5' AGAA_n 3'), situada en los promotores de genes que se inducen por calor (Mager & Kruijff, 1995). Al elemento HSE se une el factor de HSF (heat shock factor) que activa la transcripción de los genes que regula. En *S. cerevisiae* el factor HSF permanece siempre unido al elemento en los promotores y se cree que su actividad está regulada negativamente por la proteína Hsp70. El mecanismo de regulación estaría explicado por el siguiente modelo (Ruis, 1995; Mager & Kruijff, 1995): 1) el estrés producido por calor aumenta la demanda de la proteína Hsp70 como consecuencia del incremento de proteínas dañadas; 2) esto conduce a la disociación del complejo Hsp70/HSF; 3) al disociarse este complejo, se activa la transcripción y se inducen los genes; 4) al aumentar la síntesis de Hsp70 se vuelve a asociar, existiendo una autoregulación por parte de su síntesis y dándole un carácter transitorio a la respuesta.

Además, Liu & Thiele (1996) encontraron evidencias de que el HSF es fosforilado como respuesta a un aumento de la temperatura y a radicales superóxido. Esta fosforilación es inducible y ocurre en paralelo con la inducción del gen *CUP1*. Se piensa que la fosforilación es responsable de la activación de la transcripción mediada por estrés por calor y estrés oxidativo.

Existe otro elemento consenso en los promotores de algunos genes que responden a estrés que es independiente de HSE. A este elemento se le llama STRE (stress responsive element), el cual es una secuencia consenso (AGGGG o CCCCT) a la que se unen otros factores de transcripción y no se une el factor que responde al calor (HSF). El elemento STRE responde a otros tipos de estrés como: ayuno por nitrógeno, aumento en la osmolaridad, estrés oxidativo, disminución del pH, presencia de ácidos orgánicos y de etanol (Ruis & Schuller, 1995). La secuencia

STRE está presente en el promotor de numerosos genes que se inducen en condiciones de estrés (Tabla 4). Los activadores de la transcripción que se unen al elemento STRE son codificados por los genes *MSN2* y *MSN4*. Ambos genes son redundantes y la interrupción de los dos convierte a las levaduras en hipersensibles al estrés oxidativo, al estrés osmótico y al estrés producido por calor (Martinez-Pastor y cols., 1996; Schmitt & McEntee 1996).

Además de HSF y Msnp, las proteínas Yap1p y Yap2p son factores de transcripción que regulan la inducción de la respuesta adaptativa al estrés oxidativo producido por H₂O₂ de algunos genes (Tabla 4) (Stephen y cols., 1995).

Papel de los aminoácidos en la protección frente al estrés

Hemos visto hasta ahora que existen varios mecanismos utilizados por la célula en la protección frente a situaciones de estrés ya sean enzimáticos o no enzimáticos. Sin embargo, otros genes aparentemente no relacionados directamente con la protección juegan un papel importante dado que mutaciones en ellos producen una mayor sensibilidad de los organismos al estrés. El gen *HAL2*, identificado por Glaser y cols. (1993), está involucrado en la protección contra el estrés producido por sales. Este gen es idéntico a *MET22*, y participa en la biosíntesis de metionina. Este gen codifica para una nucleotidasa que participa en una reacción lateral importante para la biosíntesis de metionina (Serrano y cols. 1997). Se sabe que cuando este gen está en una dosis más alta que la genómica, permite el crecimiento de *S. cerevisiae* en medios que contienen NaCl 1.5M o LiCl 0.2-0.4M. Sin embargo no tiene ningún efecto sobre el crecimiento en medios normales o con KCl 1M. La expresión de *HAL2* es constitutiva y no se induce en presencia de sal. En condiciones óptimas de crecimiento la interrupción del gen sólo evidencia una auxotrofia para metionina

(Glaser y cols. 1993). Estos resultados sugieren una interrelación entre la biosíntesis de metionina y la protección frente al estrés por sal. Los autores proponen que como la proteína codificada por *MET22* es especialmente sensible a condiciones salinas, para poder crecer en éstas condiciones, se requieren dosis adicionales del gen *MET22*. Esto fue corroborado porque cuando le agregaron metionina (30ug/ml) a una cepa silvestre observaron que su capacidad de crecer en 1M de NaCl aumentaba (Glaser y cols., 1993).

También Ball y cols. (1986) demostraron que el gen *OSM2=ARO7* está vinculado con el crecimiento en medios hipertónicos. *ARO7* es el gen estructural de la enzima corismato mutasa, la que cataliza el paso de corismato a pterinato en la vía de síntesis de tirosina y fenilalanina (Lingens y cols. 1966). Las mutaciones en este gen hacen a las levaduras incapaces de crecer en medios hipertónicos. No se sabe en que forma es necesario este gen para la protección frente a sal pero se supone que una mutación en *ARO7* produce una disminución de intermediarios de fenilalanina y tirosina conduciendo a un mal funcionamiento de la membrana celular. Se sabe que los mutantes hipersensibles al alcohol fenílico son auxótrofos de aminoácidos y la inhibición del crecimiento por este compuesto se debe a su efecto sobre la membrana celular. En este sentido, los aminoácidos aromáticos resultarían muy importantes en la integridad de la membrana y de esta forma en la protección frente a medios hipertónicos (Lingens y cols., 1966).

En el estrés oxidativo se identificaron genes de biosíntesis de aminoácidos que de alguna forma participan en la protección frente al estrés. El gen *LYS7* de *S. cerevisiae* codifica para la proteína Lys7p. Esta proteína es una enzima que cataliza el segundo paso en la biosíntesis de lisina. Se supone que podría tener otro papel ya que una mutación en él produce un efecto pleiotrópico (Horecka y cols., 1996). Gamonet y Lauquin (1997) estudiando mutantes *lys7Δ* demostraron que estas células

evidenciaban además de la auxotrofia para lisina otros fenotipos asociados al estrés oxidativo y en particular a la disminución de la actividad de la enzima SOD-Cu/Zn. Este fenotipo pleiotrópico se manifiesta por una elevada sensibilidad al oxígeno, a los agentes que generan radical superóxido, a la irradiación por luz y en la auxotrofia para metionina y lisina. Los autores suponen que el producto del gen *LYS7* podría actuar en el paso entre el Cu y la Cu/Zn-SOD, dado que el análisis de secuencia de *Lys7p* evidencia un sitio potencial de unión a Cu. Actuaría entonces como un transportador de Cu hacia la Cu/Zn-SOD apoproteína o como una chaperona de la SOD (Gamonet y Lauquin, 1997).

Estudios hechos con otros hongos como *Aspergillus nidulans* también pusieron en evidencia que los aminoácidos son importantes en la protección tanto frente a agentes mutagénicos como a otros tipos de estrés (Donnelly y cols., 1994). Donnelly y cols. (1994) pusieron en evidencia que los conidios de cepas auxótrofas para lisina, arginina, metionina, prolina y tirosina de *Aspergillus nidulans* cuando germinaban eran más sensibles al calor, al estrés oxidativo, a las radiaciones ultravioletas y a los mutágenos químicos en relación con cepas no auxótrofas. También, las esporas de las cepas auxótrofas fueron más susceptibles a la muerte por irradiación con UV que las de las cepas silvestres. Los autores sugieren un posible defecto en el mecanismo RAS/cAMP causado por mutaciones en genes esenciales como los del metabolismo de aminoácidos. Esto aumentaría la tasa de mutaciones al afectar los sistemas reparadores normales del DNA.

Es evidente que en la protección frente a condiciones de estrés no solo participan mecanismos directos sino que también otras proteínas están implicadas en la protección de *S. cerevisiae*. Nosotros hemos aislado una mutante en *S. cerevisiae* sensible a oxígeno. Esta mutante evidenció además de hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno, una braditrofia para el aminoácido tirosina.

Biosíntesis de aminoácidos aromáticos

Los pasos enzimáticos que participan en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos son muy similares en todas las especies estudiadas, pero existen diferencias en la organización y en la regulación de los genes que codifican las enzimas participantes (Crawford, 1975; Welch & Gartner, 1980). Por ejemplo los genes de la vía del triptófano, en *E. coli* están dispuestos en un operón y son regulados simultáneamente (Yanofsky, 1984). En eucariotas en cambio están distribuidos por todo el genoma y cada uno de ellos requiere su propia regulación (Hutter y cols. 1986).

Las arqueobacterias, eubacterias, hongos y plantas son capaces de sintetizar de novo los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptófano. Los animales en cambio sólo pueden sintetizar tirosina, a través de la hidroxilación de la fenilalanina y por lo tanto requieren este aminoácido en la dieta (Haslam, 1974).

Particularmente en *S. cerevisiae* las primeras 7 reacciones en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos son comunes para los tres. Estas reacciones conducen desde la eritrosa-4 fosfato y el fosfoenol piruvato hasta el ácido corísmico. El ácido corísmico es el último intermediario común en la vía. A partir de este intermediario se sintetizan por distintas vías, tirosina, fenilalanina, triptófano y derivados de éstos como la vitamina K, ubiquinona y p-aminobenzoato (Fig 1).

La vía de síntesis del triptófano es igual en todos los organismos estudiados, en cambio hay dos posibles rutas de síntesis tanto para la fenilalanina como para la tirosina. La fenilalanina puede derivar del arogenato o del fenilpiruvato y la tirosina se puede sintetizar a partir del arogenato o del hidroxifenilpiruvato. En *S. cerevisiae* la vía que existe es aquella en la que participan solamente fenilpiruvato y 4-hidroxifenilpiruvato (Herrmann & Somerville, 1983).

Genes y enzimas

En *S. cerevisiae* se conocen todos los genes que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de los tres aminoácidos aromáticos. Recientemente se identificaron los genes que codifican para la fenilalanina aminotrasferasa, tirosina aminotransferasa (*ARO8*) y triptofano aminotransferasa (*ARO9*). La enzima codificada por *ARO8* cataliza los pasos finales en las ramas de biosíntesis de tirosina y fenilalanina. El producto del gen *ARO9* cataliza la transferencia del grupo amino del triptofano (Iraqi y cols., 1998; Urrestarazu y cols., 1998).

En la Tabla 5 se muestran las 7 reacciones catalizadas por enzimas que son comunes en la síntesis de los aminoácidos aromáticos y son codificadas por 4 genes. El corismato es el primer punto de ramificación en la vía biosintética.

TABLA 5.- Genes y enzimas que participan en la biosíntesis del Corismato (tomado de Braus, 1991)

Reacción	Compuesto	Enzima	Gen	Cromosoma
1	PEP+E4P	DAHP sintasa	ARO 3	IV
	↓		ARO 4	II
2	DAHP	DHQ sintasa	ARO1C	IV
	↓			
3	DHQ	DHQ deshidratasa	ARO1E	IV
	↓			
4	DHS	DHS deshidrogenasa	ARO1D	IV
	↓			
5	Sikimato	Sikimato kinasa	ARO1B	IV
	↓			
6	Sikimato 3-fosfato	EPSP sintasa	ARO1A	IV
	↓			
7	EPSP	Corismato sintasa	ARO2	VII
	↓			
	CORISMATO			
	↓			
	Phe, Tyr, Trp, ubiquinona, p-aminobenzoato, vitamina K			

DAHP= 3-Deoxy-D-arabinoheptulose 7-fosfato, DHQ= 5-dehidroquinato, DHS= 3-dehidroquinato PEP= fosfoenol piruvato, E4P= eritrosa 4-fosfato, EPSP=5-enolpiruvilsikimato 3-fosfato, Phe= fenilalanina, Tyr= tirosina, Trp= triptofano.

El primer paso en la biosíntesis es la condensación del fosfoenol piruvato (PEP) con la eritrosa 4-fosfato para formar 3-deoxi-D-arabinoheptulose 7-fosfato (DAHP). Existen dos isoenzimas de la DAHP sintasa en *S.cerevisiae* y ambas son inhibidas por el producto final. Una por L-fenilalanina y la otra por L-tirosina. Los genes que la codifican son *ARO4* y *ARO3* respectivamente.

Sin embargo otros microorganismos (*E. coli* y *Neurospora crassa*) poseen tres isoenzimas la actividad de las cuales está regulada por cada uno de los tres aminoácidos aromáticos (Nimmo & Coggins, 1981; Byng y cols., 1983).

Los siguientes 5 pasos (reacciones 2 a 6 en Tabla 5), son catalizados por una enzima, Arom codificada por el gen *ARO1*, la que es pentafuncional y tiene varios dominios monofuncionales. El orden de los distintos dominios en el gen no se correlaciona con la sucesión de las correspondientes reacciones catalizadas en la vía de biosíntesis (Duncan y cols. 1987). Este tipo de enzimas Arom parecerían ser exclusivas de hongos y euglenoides (Ahamed & Giles, 1969). La última reacción antes del corismato es catalizada por la enzima corismato sintasa.

Fenilalanina y tirosina.

El ácido corísmico es el último intermediario común a los tres aminoácidos aromáticos y es distribuido hacia la rama de biosíntesis de tirosina y fenilalanina. La poza de corismato en la célula es necesaria para la síntesis de otros compuestos aromáticos como vitamina K, ubiquinona o p-aminobenzoato. El corismato es convertido a p-fenato el cual es el último compuesto común en la biosíntesis de los dos aminoácidos. En las tablas 6 y 7 se resumen los genes y enzimas que participan en la síntesis de estos aminoácidos.

Tabla 6.- Genes y enzimas que participan en la biosíntesis de fenilalanina.
(modificada de Braus, 1991)

Reacción	Compuesto	Enzima	Gen	Cromosoma
8	Corismato ↓	Corismato mutasa	ARO7	XVI
9	Prefenato ↓	Prefenato deshidratasa	PHA2	XIV
10	Fenilpiruvato ↓ ↓ Fenilalanina	Fenilalanina aminotransferasa	ARO8 (ARO9)	

Tabla 7.- Genes y enzimas que participan en la biosíntesis de tirosina
(modificada de Braus, 1991)

Reacción	Compuesto	Enzima	Gen	Cromosoma
8	Corismato ↓	Corismato mutasa	ARO7	XVI
11	Prefenato ↓ ↓	Prefenato deshidrogenasa	TYR1	II
12	4-hidroxifenilpiruvato ↓ ↓ Tirosina	Tirosina aminotransferasa	ARO8 (ARO9)	

La síntesis de prefenato es catalizada por la corismato mutasa, el primer paso de la vía. La enzima es codificada por el gen *ARO7* y es común en todos los organismos estudiados. En *S. cerevisiae*, *ARO7* codifica una corismato mutasa monofuncional (Kradolfer y cols., 1977) lo que también se reporta para otras levaduras (Bode y cols. 1990), para algunas plantas (Gilchrist & Connelly, 1987),

para *Bacillus subtilis* (Llewwlyn y cols. 1980) y para *Streptomyces aureofaciens* (Goerisch, 1987).

En la biosíntesis de fenilalanina y tirosina existen dos rutas alternativas. Una es la del fenilpiruvato y 4-hidroxifenilpiruvato respectivamente y la segunda ruta es la del L-arogenato. En *S. cerevisiae* y *E. coli* las rutas descritas son las del fenilpiruvato y 4-hidroxifenil piruvato (Braus, 1991). Las plantas utilizan el L-arogenato como precursor de ambos aminoácidos (Bonner & Jensen, 1987). En los microorganismos existen varias combinaciones de los dos mecanismos. Por ejemplo en cianobacterias la tirosina se sintetiza via arogenato y la fenilalanina via fenilpiruvato; en otras bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* coexisten las dos vías para fenilalanina y tirosina (Herrmann & Somerville, 1983).

Los siguientes pasos en la síntesis de fenilalanina son catalizados por la prefenato deshidratasa y por aminotransferasas (Tabla 6). La prefenato deshidratasa cataliza la conversión de prefenato en fenilpiruvato mientras que la aminotransferasa cataliza la transaminación del fenilpiruvato para dar fenilalanina.

La tirosina en *S. cerevisiae*, se obtiene por la descarboxilación oxidativa y deshidratación del prefenato, catalizada por la enzima prefenato deshidrogenasa y posterior transaminación del 4-hidroxifenilpiruvato. La prefenato deshidrogenasa es codificada por *TYR1* (Mannhaupt y cols. 1989) y la aminotransferasa por *ARO8* (Tabla 7).

Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos.

La biosíntesis de aminoácidos aromáticos en *S. cerevisiae* está controlada por la regulación a nivel de la síntesis de las enzimas mediante el control de la expresión génica y por la regulación de las actividades enzimáticas que controlan el flujo de

carbono. La mayoría de los genes estructurales están regulados por el activador de la transcripción *GCN4* (Hinnebusch, 1988). La modulación de las actividades enzimáticas controla el flujo de carbono en el primer paso de la vía y en los puntos de ramificación. Por otra parte los productos finales, fenilalanina, tirosina y triptofano actúan como sensores para controlar el flujo de carbono (Figura 1).

Los genes que están desreprimidos bajo el sistema de control general por *GCN4* son: 4 de los genes *TRP* (*TRP2*, *TRP3*, *TRP4* y *TRP5*) (Miozzari y cols., 1978), *ARO3*, *ARO4* (Teshiba y cols. 1986) y *ARO2* (Braus, 1991). La respuesta de estos genes al control general de regulación no es igual en todos los casos. Los genes *ARO3* y *ARO4* responden al control general aumentando la actividad de la DAHP sintasa seis veces en condiciones no reprimidas. En cambio otras enzimas, las codificadas por *TRP* aumentan su actividad dos o tres veces (Miozzari y cols., 1978; Teshiba y cols., 1986). En estos genes el factor activador de la transcripción Gcn4p cumple dos funciones, por un lado mantiene un nivel basal de transcripción de *ARO3* en presencia de aminoácidos y por otro aumenta la transcripción de *ARO3* y *ARO4* en condiciones de falta de aminoácidos. La expresión de *ARO8* también responde al control general de aminoácidos mediado por *GCN4* y presenta en su promotor una secuencia consenso de unión a este factor (Iraqi y cols. 1998).

Si bien el control general regula la mayoría de los genes de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos, los promotores de los genes *ARO7*, *TRP1*, y *TYR1* no están regulados por *GCN4* (Braus y cols. 1988; Mannhaupt y cols. 1989; Schmidheini y cols., 1990). El gen que codifica para la pterinato deshidrogenasa (*TYR1*), no tiene secuencias consenso de unión de *GCN4* en su promotor y la regulación transcripcional parece depender de la presencia o ausencia de fenilalanina (Mannhaupt y cols., 1989). *ARO7* aparentemente no está regulado tampoco en forma específica (Schmidheini y cols., 1990). *ARO9* se induce en

presencia de los aminoácidos aromáticos y en las mutantes *aro8* (Iraqi y cols. 1998).

Regulación de la actividad enzimática

En *S. cerevisiae* la regulación de las actividades enzimáticas juega un papel importante en el flujo de aminoácidos a través de la vía de síntesis. En la biosíntesis de aminoácidos aromáticos el punto de control principal está en la entrada a la vía mediante la distribución del corismato en dirección del triptofano o de fenilalanina/tirosina. Las moléculas efectoras son los productos finales de la vía metabólica (Figura 1). El paso inicial está catalizado por la dos DAHP sintetasas y es inhibido por fenilalanina y por tirosina. La fenilalanina inhibe a la enzima codificada por *ARO3*, mientras que la tirosina inhibe la enzima codificada por *ARO4* (Figura 1). Las dos DHP sintetetasas poseen un 70% de similitud en la secuencia (Braus 1991). En el primer punto de ramificación el complejo antranilato sintasa es inhibido por el producto final triptofano y la corismato mutasa es inhibida por tirosina. Esta última enzima es activada por el triptofano, que es el producto final de la otra rama. Este doble control de inhibición por tirosina y activación por triptofano es único en relación con las enzimas correspondientes en otros organismo (Braus, 1991).

Las enzimas corismato mutasa y antranilato sintasa controlan la distribución del corismato hacia triptofano y fenilalanina/tirosina. El mecanismo de control negativo del triptofano sobre la antranilato sintasa reduce el flujo hacia el triptofano del 10 al 20% de su capacidad normal in vivo (Miozzari y cols. 1978). Mientras que la actividad de la antranilato sintasa en la célula puede incrementarse 3 veces por activación de la transcripción por el sistema de control general, la

corismato mutasa puede incrementar su actividad hasta 10 veces por el efector específico triptofano. A bajas concentraciones de sustrato, en ausencia de aminoácidos aromáticos el corismato derivaría preferencialmente hacia triptofano en cambio a altas concentraciones de sustrato el flujo sería hacia la rama de la fenilalanina/tirosina. Como la inhibición por retroalimentación por tirosina es eliminada por el triptofano el flujo para esta parte de la vía es aumentada en exceso de triptofano ya que este compuesto inhibe la antranilato sintasa y activa la corismato mutasa (Braus, 1991). En *S. cerevisiae* las concentraciones normales de aminoácidos aromáticos son 0.6M de fenilalanina, 0.5M de tirosina y 0.02M de triptofano (Braus, 1991).

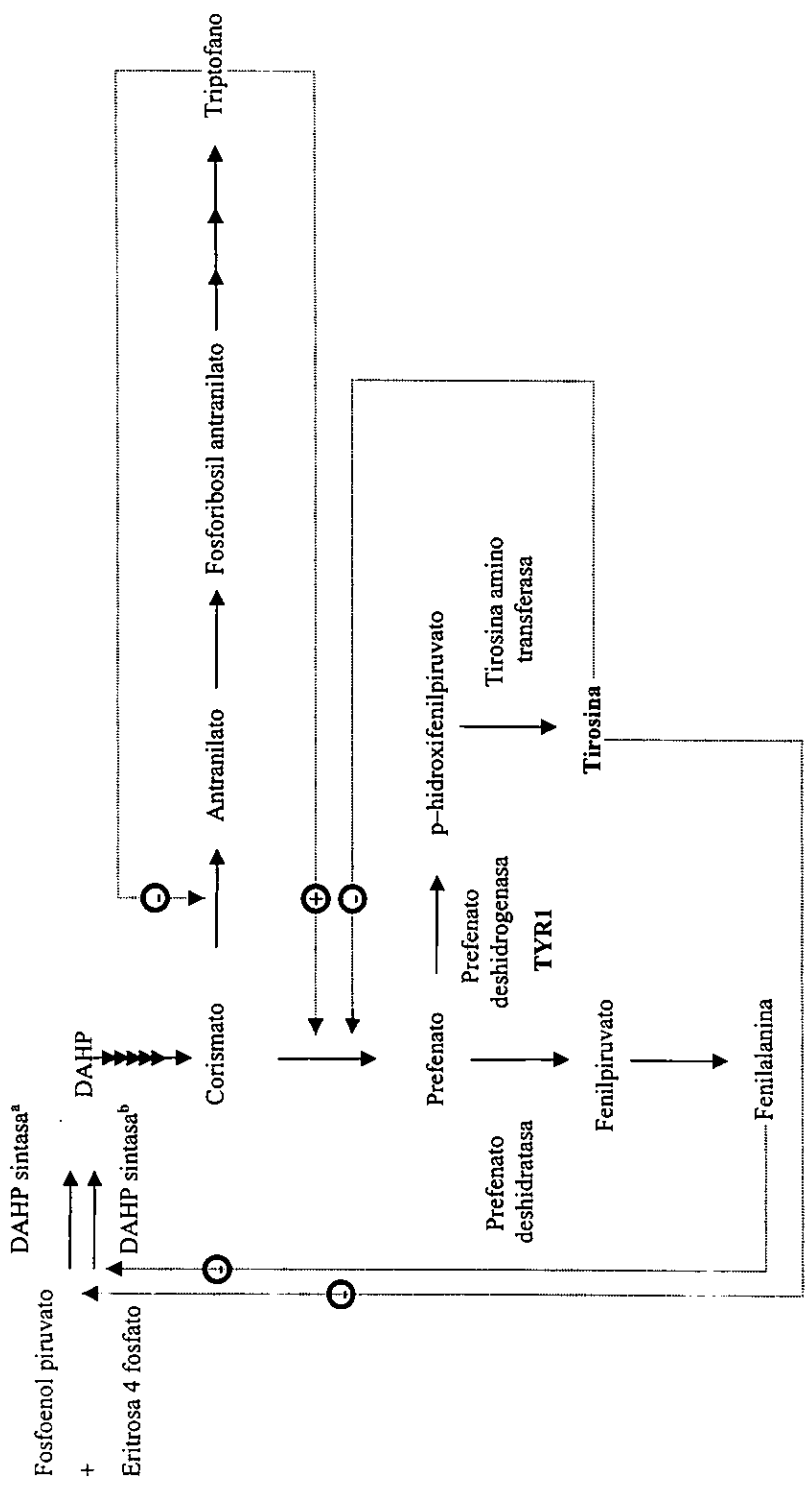


Figura 1.- Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en *Saccharomyces cerevisiae* (* isoenzima codificada por *ARO3* y ^b isoenzima codificada por *ARO4*).

II. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar el efecto de mutaciones en genes cuyos productos participen en la protección frente al estrés producido por condiciones de aerobiosis. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener mutantes sensibles a oxígeno
- Caracterizar fenotípicamente la mutante seleccionada
- Obtener mutantes nulas utilizando el o los genes clonados y estudiar el fenotipo.

**III. La tirosina participa en la protección frente al estrés oxidativo
en *Saccharomyces cerevisiae***

Tyrosine is involved in protection from oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*

Sandra Lupo, Cristina Aranda, Lourdes Miranda-Ham, Hiram Olivera, Lina Riego, Luis Servin, and Alicia González

Abstract: The phenotypic characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant unable to grow under agitated conditions is presented here. When this strain was incubated under aerobic conditions, it did not grow and the viability of the culture decreased. The loss in viability was prevented by the addition of antioxidants or chelating agents to the medium, indicating that this mutant was unable to withstand the oxidative stress generated by aerobic metabolism. This strain was complemented with plasmids from a yeast genomic library. The transformants that were obtained carried plasmids harbouring the *TYRI* gene, which codes for one of the enzymes involved in tyrosine biosynthesis. A monogenic *S. cerevisiae tyr1* mutant obtained from the Yeast Genetic Stock Center showed higher sensitivity to hydrogen peroxide than a *TYRI* strain. This sensitivity was reverted when this strain was complemented with the *TYRI* gene. Considering these results, we propose that tyrosine plays a role in the protection against oxidative stress.

Key words: oxidative stress, amino acid biosynthesis, reactive oxygen intermediates, nitrogen metabolism.

Résumé : Nous avons caractérisé le phénotype d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* incapable de croître dans des conditions d'agitation. Lorsque cette souche est incubée en aérobie, elle ne pousse pas et la viabilité de la culture diminue. Cette perte de viabilité pouvait être prévenue par l'addition d'antioxydants ou d'agents chélateurs dans le milieu, ce qui confirme que le mutant était incapable de supporter le stress oxydatif généré par le métabolisme aérobie. Cette souche a été complétée à l'aide des plasmides d'une banque génomique de levures. Les transformants obtenus contenaient des plasmides porteurs du gène *TYRI* qui code une des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la tyrosine. Un mutant monogénique *S. cerevisiae tyr1* obtenu du Yeast Genetic Stock Center s'est révélé plus sensible au peroxyde d'hydrogène que la souche *TYRI*. Cette sensibilité était contrée lorsque la souche était complétée avec le gène *TYRI*. Selon ces résultats, nous croyons que la tyrosine joue un rôle dans la protection contre un stress oxydatif.

Mots clés : stress oxydatif, biosynthèse d'acides aminés, intermédiaires d'oxygène réactif, métabolisme de l'azote.

[Traduit par la rédaction]

Introduction

All aerobically growing microorganisms encounter reactive oxygen intermediates (ROIs), including the superoxide anion free radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical (OH^{\cdot}). These molecules are generated as a consequence of normal cellular metabolic processes such as respiration. A single electron transfer to an oxygen molecule results in the production of $O_2^{\cdot-}$. Superoxide dismutases convert $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2 , a less reactive ROI. Catalases

catalyze the hydrolysis of H_2O_2 into water and oxygen. In the presence of transition metal ions, such as iron, copper, or nickel, H_2O_2 gives rise to the highly reactive OH^{\cdot} via the Fenton reaction. The toxicity of ROIs is due to their ability to damage various cellular constituents. ROIs produce double-stranded breaks in DNA (Storz et al. 1987). Lipids are damaged by the formation of lipid peroxides, and in proteins, amino acid side chains can become oxidized (Zhou and Zheng 1991). As a result of the harmful nature of ROIs, aerobically growing organisms have developed a wide variety of strategies for protection from oxidative stress. Many of the genes whose products are involved in the stress response are regulated by transcription factors that react to intracellular levels of ROIs and bind to regions of conserved sequences (STRE) that are present in the promoter regions of the genes involved in the stress response (Marchler et al. 1993). In this sense, ROIs are used as secondary messengers to activate gene expression.

There are a number of genes involved in the stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Krems et al. 1995). Most of the genes that respond to stress conditions code for enzymes that participate directly in the detoxification of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , such as superoxide dismutases (*SOD1*, Bermingham-McDonogh et al. 1988; *SOD2*, Marres et al. 1985), catalases (*CTT1*, Harting and Ruis 1986 and Spevak et al. 1983; *CTA1*, Cohen et al. 1988), and peroxi-

Received March 5, 1997. Revision received June 25, 1997.

Accepted August 1, 1997.

S. Lupo, C. Aranda, H. Olivera, L. Riego, and A. González.¹

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,

Apartado Postal 70-242, México, D.F. 04510, México.

L. Miranda-Ham. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Ex-Hda, Xcupich, Apartado Postal 87, Cordemex, 97310, Mérida, Yucatán, México.

L. Servin. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, México, D.F. 04510, México.

¹ Author to whom all correspondence should be addressed (e-mail: amanjarr@ifcsun1.fisiol.unam.mx).

dases. Another gene that plays a crucial role in the detoxification of reactive oxygen species is *ATX1* (Su-Ju Lin and Culotta 1995). This gene acts in the transport and (or) partitioning of copper. Loss of *ATX1* function renders the mutant paraquat hypersensitive and increases its sensitivity towards H_2O_2 . It has thus been proposed that *ATX1* protects cells against the toxicity of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 . A gene coding for a transcription factor required for H_2O_2 -induced transcription of the cytosolic catalase gene has been recently cloned (*MAC1*) (Jungmann et al. 1993). The Mac-1 protein contains a copper-binding domain and regulates transcription of a copper- and iron-reducing complex in addition to the catalase gene. The *mac-1* mutant yeasts are hypersensitive to heavy metals, as well as to H_2O_2 .

Other genes code for enzymes like glutathione reductase whose action results in a nonenzymatic system of protection (Krems et al. 1995). Unsaturated fatty acids are also sensitive to reaction with oxygen radicals. In this sense, α -tocopherol (vitamin E) functions as donor of single hydrogen atoms leading to nonradical forms of lipid derivatives (Buettner 1993; Wolff et al. 1986). Vitamin E has been reported as the major lipid-soluble, peroxy-radical-trapping, chain-breaking antioxidant in human blood (Saskia et al. 1993).

Oxygen radicals and other oxygen-derived species could be important causative agents of aging and several human diseases (Halliwell and Gutteridge 1985). Phenolic compounds have been studied extensively and reported to possess both antiradical and antioxidation properties. They are promising potential drugs for combating pathologies in which free radicals play a role (Zitomer and Lowry 1992).

In this study, we report the effect of tyrosine auxotrophy on the sensitivity of *S. cerevisiae* to oxidative stress. Our results indicate that tyrosine could play a role as a defense mechanism against oxidative stress in *S. cerevisiae*.

Materials and methods

Strains, plasmids, and gene library

The wild-type strain S288C (*MAT α* , *mal1*, *gal2*), AH22 (*Mata*, *leu2-3*, *leu2-112*, *his3*, *can1*), and D286-2A (*Mara*, *ade1*, *his1*) mutant strains came from the Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, N.Y.). Strain CN1 (*MAT α* , *ino1-13*, *ino2-8*, *gal2*, *can2*, *gln*) has been previously described (González et al. 1985). Strain S507C (*MAT α* , *gal2*, *tyr1*, *ade2*, *ade6*, *leu1*) was obtained from the Yeast Genetic Stock Center. Strains S507C/pSL5 and S507C/pSL8 are transformants obtained from complementation of S507C. CN15 (*MAT α* , *gal2*, *tyr1*, *ade2*, *ade6*, *LEU1*) is a spontaneous leucine revertant obtained from strain S507C. Bacterial strain DH5 α (*F-8*, *LacZ*, *M15*, *endA1*, *recA1*, *hsdR17* [*r-k* - {*m+k*}] *supE44*, *th-1*, *d-*, *gyrA96*) was obtained from the ATCC collection.

Plasmid pSL5 was selected from the YCp50 *S. cerevisiae* genomic library (Ap^R, *URA3*, *CEN4*, *ARS1*) built by Rose et al. (1987) by complementing the CN50 mutant. pSL6 contains an *EcoRI* 4.4-kb fragment from pSL5 subcloned in YCp50 *EcoRI* site. pSL7 is the *EcoRI*-religated, 11.5-kb remaining fragment from pSL5. pSL8 was constructed by inserting a 1.4-kb amplified fragment of the *TYR1* gene, which includes the complete coding sequence, into the pCUP vector. The following oligonucleotides were designed, based on the *TYR1* sequence. In the forward oligonucleotide a *NcoI* site was generated by substituting an A for a C: 5'-CATATCCACTTGATAACCATGGTATCAGAGGAT-3'. In the backward oligonucleotide (5'-TTACAGATTTTTGAGGTACCTTTGTCACAAT-3'), four bases were changed to generate a *KpnI* site. The amplified

fragment was inserted in the pCUP (Kang et al. 1990) vector using the *NcoI* and *KpnI* sites, thus fusing the pCUP promoter to the *TYR1* coding sequence.

Growth conditions

Strains were routinely grown on minimal media (MM) containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of Difco yeast nitrogen base. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.01%. Glucose (2% w/v) was used as the carbon source and 7 mM glutamine was used as the nitrogen source. All cultures were inoculated with washed cells obtained from overnight 10-mL cultures of YPE rich medium containing 1% yeast extract, 2% peptone, and 2% ethanol. Cells were incubated at 30°C with orbital shaking (250 rpm). Microaerophilic cultures were grown at 30°C without shaking. Anaerobic cultures were obtained by evacuating 125-mL culture bottles sealed with plastic caps with butyl septa and containing 50 mL of MM. After evacuation bottles were flushed with a 1200 mL/min sterile N_2 stream for 20 min under shaking conditions. Cells were added with an insulin syringe. Cultures were grown at 30°C with orbital shaking (250 rpm). For the experiments on cell viability, overnight cultures were prepared in YPE.

Bacterial strains were grown on complete Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook et al. 1989). The final concentration of ampicillin in LB was 200 μ g/mL.

Mutagenesis and mutant selection

To obtain mutants unable to utilize nonfermentable carbon sources on MM, strain S288C was mutagenized by treatment with ethyl methanesulphonate, following the method of Fink (1970). After mutagenesis, the cells were allowed a period of growth on MM containing 2% glucose as the carbon source. Cells that could not use ethanol as the carbon source were selected by using the antibiotic *N*-glycosyl-polyfungin (Polaina and Conde 1981). Cells were spread on MM plates with 2% glucose as the carbon source and incubated at 30°C. Cells which failed to grow on ethanol as the carbon source were purified and further characterized.

Transformation in *S. cerevisiae* and *E. coli*

Saccharomyces cerevisiae was transformed by the spheroplast method (Hinnen et al. 1978). Transformants were selected for their capacity to grow on MM with glutamine as the sole nitrogen source and ethanol as the carbon source. *Escherichia coli* cells were prepared for transformation as in Cohen and Hsu (1972). *Escherichia coli* transformants were selected for Ap^R in LB medium supplemented with the antibiotic.

DNA and RNA manipulation

Yeast DNA was prepared from 50 mL of MM overnight cultures. Yeast minipreparations were done as in Nasmyth and Reed (1980). Total yeast RNA was prepared as described previously (González et al. 1992). YPD overnight cultures were washed, resuspended in sterile water and used to inoculate 100-mL cultures of MM. These were incubated to an OD of 1.0 at 600 nm. Cultures were centrifuged and total RNA was prepared from the pellet. For the H_2O_2 -treated cultures, YPD overnight cultures were grown with orbital shaking (250 rpm) at 30°C. These were centrifuged and used to inoculate 100-mL YPD cultures that were grown to an OD of 1.0 and centrifuged. The pellet was resuspended in 100 mL YPD. H_2O_2 (1 mM) was added and after 30 minutes the cultures were centrifuged and total RNA was prepared from the pellet.

The 1.0-kb *TYR1 EcoRI-HindIII* fragment (Fig. 3) was subcloned in mp18 and mp19 vectors. The chain-termination DNA sequencing method (Sanger et al. 1977) was used for sequencing.

Restriction enzymes and ligase were from New England Biolabs; reaction conditions were those recommended by the manufac-

turer. DNA agarose gel electrophoresis was performed according to the method described by Sambrook et al. (1989). RNA electrophoresis was done in 2% agarose in the presence of 6% formaldehyde. Transfer to hybond-N membranes and hybridization conditions were as recommended by the manufacturer (Amersham International plc for both DNA and RNA). Single restriction bands were recovered from the gel in low-melting GTG Seaplaque Agarose Bioproducts and were labelled with a random-priming reaction kit from Boehringer. Radiochemicals were from New England Nuclear.

Determination of prephenate dehydrogenase activity

Cells were grown in the appropriate medium, harvested, washed, and suspended in extraction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Soluble extracts were prepared by grinding the cells in a vortex with glass beads (0.45–1 mm). Extracts were centrifuged at 14 000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was treated with protamine sulfate (0.62 mg/mL of extract) and then desalted through Sephadex G-25 columns. Prephenate dehydrogenase (EC 1.3.1.12) activity was measured according to the method of Dayan and Sprinson (1970), with the following modifications: extract volumes of 0.05–0.2 mL were used and the blanks were stopped at zero time and treated with 2.0 mL of 1 M borate in 2 M arsenate, in the same way as the samples.

Cell viability determination in nongrowing cultures and determination of the effect of H₂O₂ on cell viability

To determine cell viability, exponential phase overnight cultures were grown aerobically in YPE. Cells were collected by centrifugation, washed once with distilled water, and inoculated to the appropriate culture medium at an OD of 0.1 at 600 nm. Aliquots were taken at 0, 3, and 6 h, diluted, and plated onto YPD plates. Cell viability was estimated by counting the colony number after the plates had been incubated at 30°C for 72 h.

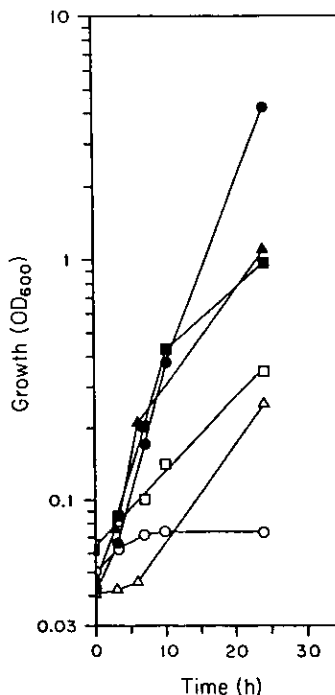
To determine the effect of H₂O₂ on culture viability, exponential phase overnight cultures grown on YPE were centrifuged, washed once with distilled water, and used to inoculate MM containing 7 mM glutamine as the nitrogen source and supplemented with the auxotrophic requirements, to an OD of 0.1 at 600 nm. Cells were incubated for 3 h at 30°C and 250 rpm, collected by centrifugation, and resuspended in 5 mL of 100 mM K₂HPO₄ (pH 7.4) that had been treated with 1% Cellex-CM to avoid ion contamination and subsequently supplemented with 4 mM H₂O₂. Cells were incubated at 30°C and 250 rpm for 30 and 45 min, after which the cells were diluted and plated out in YPD plates. Prior to H₂O₂ addition one aliquot was diluted and plated on YPD. Cell viability was determined by counting the colonies that appeared after 72 h of incubation at 30°C on YPD agar plates.

Results

Isolation and characterization of an oxygen-sensitive mutant strain

The capacity to grow on nonfermentable carbon sources depends on the functioning of an intact aerobic metabolism. This includes the accurate operation of the mechanisms required to contend with the reactive oxygen intermediates produced during respiration. To obtain mutants altered in some of the pathways involved in protection from oxidative stress, we decided to select mutants that were able to grow on rich media but not on MM in the presence of nonfermentable carbon sources. This selection would discard classical petit strains, allowing the selection of mutants unable to synthesize a particular metabolite that could be present in rich

Fig. 1. Growth of strains S288C and CN50 under different conditions. Strains S288C (●) and CN50 (○) grown on MM supplemented with 7 mM glutamine with shaking (250 rpm); strains S288C (▲) and CN50 (△) grown on MM supplemented with 7 mM glutamine under microaerophilic conditions; strains S288C (■) and CN50 (□) grown on MM supplemented with 7 mM glutamine under anaerobic conditions.

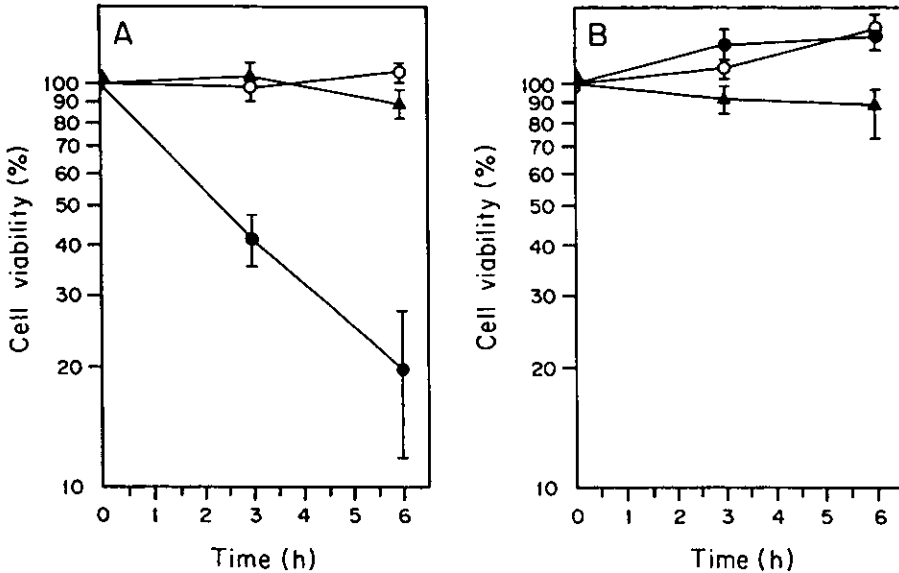


medium and would be needed to grow through aerobic metabolism.

A mutant unable to grow on MM supplemented with 2% ethanol was isolated from the wild-type strain S288C, as described in Materials and methods. This mutant (CN50) was able to grow as well as the wild-type strain on rich medium supplemented with ethanol (YPE) (data not shown). Mutant CN50 was mated with strains AH22 and D286-A. The diploids obtained were able to grow on MM supplemented with ethanol, showing that the mutation was recessive. However, these diploids sporulated poorly and formed large aberrant cells.

To analyze whether the CN50 strain was oxygen sensitive, it was cultivated on MM supplemented with 2% glucose under aerobic conditions (shaken cultures), microaerophilic conditions (static cultures), and anaerobic conditions. We found that growth was impaired in the aerobic cultures but not in the microaerophilic or anaerobic cultures (Fig. 1). When the viability of the cells incubated aerobically was determined, we found that after 6 h of incubation only 20% of the population was viable (Fig. 2A). To analyze whether a strain incubated under nongrowing conditions lost viabil-

Fig. 2. (A) Cell viability of *S. cerevisiae* CN50 incubated under different conditions: 7 mM glutamine (●); 7 mM glutamine + 50 mM 2-mercaptoethanol (○); 7 mM glutamine + 500 μ M 1,10-phenanthroline (OFA) (▲). (B) Wild-type strain S288C incubated on 7 mM glutamine without carbon source (▲), strain CN1 incubated on 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ without glutamine (●), and strain S507C incubated without tyrosine (○). Bars represent the SD of three experiments.



ity, we incubated the S288C wild-type strain in MM devoid of a carbon source, the CN1 glutamine auxotroph in MM without glutamine, and the S507C tyrosine auxotroph in MM in the absence of tyrosine. As Fig. 2B shows none of these strains lost viability, although all of them were unable to grow. Since the CN50 mutant strain was able to grow as well as the wild type under microaerophilic or anaerobic conditions, we considered that the cause of viability loss could be due to increased oxygen sensitivity related to an inability to overcome oxidative stress. To analyze this proposition, the CN50 mutant strain was incubated under aerobic conditions in the presence of the antioxidant 2-mercaptoethanol. As Fig. 2A shows, the addition of this compound completely prevented viability loss. In the presence of Fe^{3+} and H_2O_2 , hydroxyl ions are formed via the Fenton reaction, so we tested the viability of the CN50 mutant strain incubated in the presence of 1,10-phenanthroline (OFA), which is a Fe^{3+} -chelating agent. As shown (Fig. 2A), the addition of OFA prevented the loss of cell viability. These results suggested that the CN50 mutant strain was unable to overcome the oxidative stress generated by the production of the reactive oxygen intermediates that accompany aerobic metabolism.

The results presented above support the proposition that the CN50 mutant strain is oxygen sensitive.

Cloning of a gene complementing the oxygen-sensitive phenotype

Since we were unable to obtain CN50 *ura3* derivatives by either cross-mating or selecting for FOA resistance, we selected transformants that were able to grow on MM supplemented with 2% ethanol as the carbon source. Thirteen

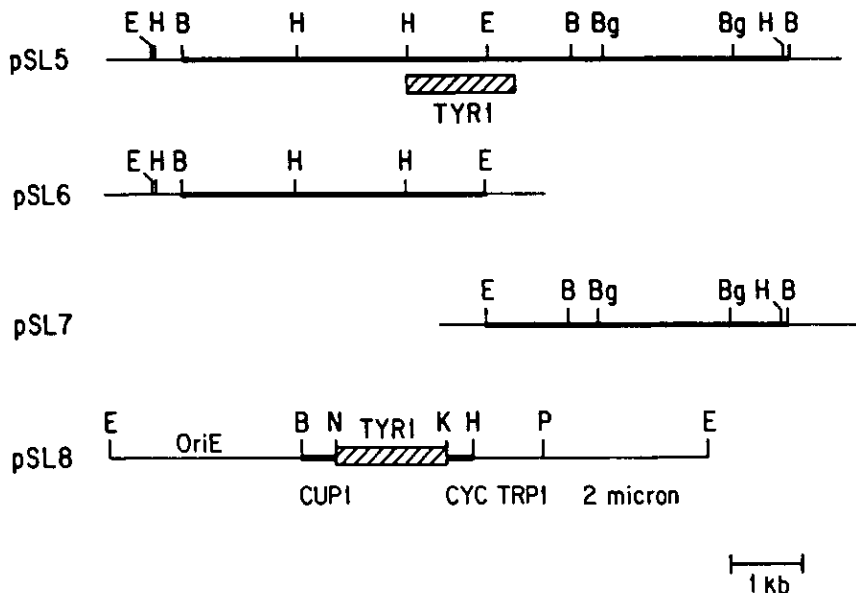
transformants were recovered when 10 μ g of DNA was used. All transformants were able to grow on aerobic cultures.

Yeast DNA minipreparations were made from each of the transformants and used to transform *E. coli* DH5 α to ampicillin resistance. Thirteen plasmids were recovered. Restriction enzyme analysis and gel electrophoresis showed that all of them shared some fragments. All of them were able to restore CN50 capacity to grow on MM with 2% ethanol and on MM with 2% glucose under aerobic conditions.

To obtain a smaller DNA fragment capable of complementing the capacity to grow on ethanol, pSL5 (Fig. 3) was digested with *Eco*RI and the 4.4-kb fragment was subcloned in YCp50 (pSL6), the rest of pSL5 was religated (pSL7) (Fig. 3). The CN50 mutant was transformed independently with pSL6 and pSL7 and no transformants were obtained. These results showed that the complementing region present in pSL5 had been lost in pSL6 and pSL7. Accordingly, an *Eco*RI–*Hind*III 1-kb fragment present in pSL5, but halved in the pSL6 and pSL7 constructions, was sequenced and compared to the yeast genes reported in GenBank. We found that our fragment carried a sequence which corresponded to the previously reported *TYR1* gene of *S. cerevisiae* (Mannhaupt et al. 1989). A pSL5 fragment containing the full coding sequence of *TYR1* was subcloned in pCUP (Kang et al. 1990) as described in Materials and methods, generating pSL8 which was able to complement the CN50 mutant strain (Fig. 3). Thus, the ability to confer the capacity to grow either on ethanol or glucose in aerobic cultures was confined to the *TYR1* gene.

These results indicated that the mutant strain CN50 could have a mutation in *TYR1*. Thus, we determined the activity

Fig. 3. Restriction map of pSL5, pSL6, pSL7, and pSL8. The thin line indicates the YCp50 or pCUP vectors and the bold line represents yeast sequences. The dashed box represents the *TYR1* coding region. B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*III; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; N, *Nco*I; K, *Kpn*I; P, *Pst*I.



of prephenate dehydrogenase, which is the enzyme coded by *TYR1*. As Table 1 shows, the CN50 strain only retained 3.0% prephenate dehydrogenase activity. Considering this result, the CN50 mutant was grown in aerobic cultures in the presence of tyrosine. As Fig. 4 shows, under this condition, the CN50 mutant grew as well as the wild-type strain. Figure 4 also shows that the CN50 strain was able to grow on nonfermentable carbon sources (e.g., ethanol) in media supplemented with tyrosine.

The results presented above indicate that the CN50 mutant strain was a tyrosine bradytroph. As mentioned above, the CN50 mutant strain was sterile. This sterility was not cured by the presence of the *TYR1* gene and the complemented CN50/*TYR1* strain was also infertile. Thus, we were not able to perform a genetic analysis that could determine whether the pleiotropic phenotype displayed by our mutant was only due to impaired tyrosine biosynthesis. Although the above-mentioned results suggest that the sterility could be due to another mutation.

Cell viability and peroxide sensitivity of tyrosine auxotrophs (*tyr1*)

The results presented above indicate that diminished tyrosine biosynthesis could result in decreased cell viability. However, Fig. 2B shows that tyrosine auxotrophy does not result in decreased cell viability. Similar results were obtained with glutamine auxotrophs (CN1) (González et al. 1985; Fig. 2B). Furthermore, Fig. 2B also shows that when a wild-type strain was incubated on medium lacking a carbon source the strain did not grow, however cell viability did not diminish,

Table 1. Prephenate dehydrogenase activity.

Strain	Condition	Specific activity ^a
S288C	MM	0.86
S288C	MM + tyrosine	0.88
CN50	MM	0.025
CN50	MM + tyrosine	0.025
S507C	MM + tyrosine	nd ^b
S507C/p565	MM	0.87
S507C/p565	YPD	0.20
S507C/p565	YPD + 2 mM H ₂ O ₂	0.22

Note: Cells were incubated for 12 h at 30°C with agitation (250 rpm) on MM or MM plus 0.01% tyrosine.

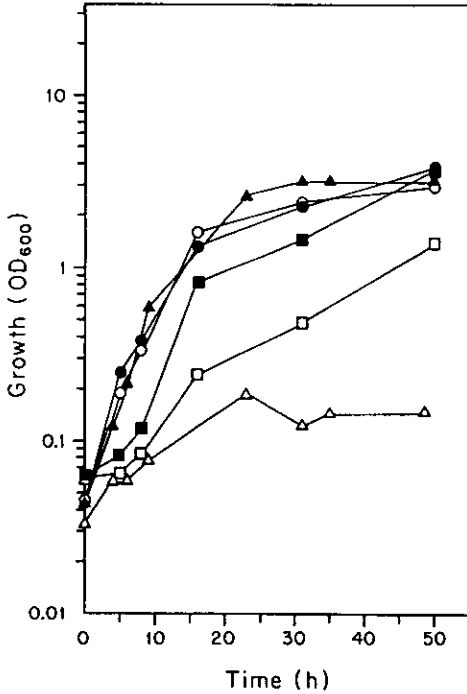
^aSpecific activity is reported as nanomoles of 4-hydroxy-phenylpyruvate formed per minute per milligram of protein.

^bNot detected.

and thus, a nongrowing condition does not necessarily result in decreased cell viability.

To determine whether the biosynthesis of tyrosine was involved in the oxidative stress response, the *tyr1* strain (S507C) obtained from the Yeast Genetic Stock Center was incubated in the presence of H₂O₂. As Fig. 5 shows, this strain was more sensitive to H₂O₂ than the *tyr*⁻ strain complemented with pSL5, since after 45 min of incubation with H₂O₂, only 5% of the *tyr1*⁻ population was viable while 20% of the S507C/pSL5 population was still viable under identical conditions (Fig. 5). The *tyr1* strain was transformed simultaneously to uracil and tyrosine prototrophy with pSL8.

Fig. 4. Growth of strains S288C and CN50 under different conditions. Strains S288C (●) and CN50 (○) grown on MM supplemented with 7 mM glutamine and 0.14 mM tyrosine; strains S288C (▲) and CN50 (△) grown on MM with 2% ethanol as the carbon source; strains S288C (■) and CN50 (□) grown on MM with ethanol as the carbon source and 0.01% mM tyrosine.

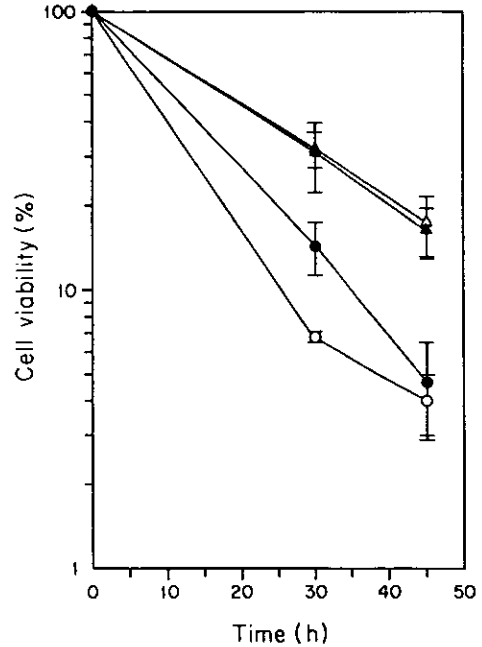


The frequency of transformation was $1 \times 10^{-3}/\mu\text{g DNA}$. One of these transformants (S597C/pSL8) was treated with H_2O_2 , and as shown in Fig. 5, this strain displayed a viability similar to that found in a S507C/pSL5 strain. The *tyr1* strain from the Yeast Genetic Stock Center was also *leu*⁻. A spontaneous *LEU* revertant (CN15) was obtained and treated with H_2O_2 . Figure 5 shows that CN15 strain presents the same decrease in cell viability found for the S507C parent strain. These data indicate that an impairment in the capacity to synthesize tyrosine results in higher sensitivity towards peroxide.

Regulation of *TYR1* expression

If the *TYR1* product participates in a mechanism involved in the response to the presence of free radicals generated from oxygen or peroxide, it could be expected that the expression of *TYR1* would be modulated by the presence of free radicals. The analysis of *TYR1* expression showed that, when cells were incubated in the presence of 2 mM H_2O_2 , the expression of *TYR1* mRNA did not increase with respect to that found without H_2O_2 (data not shown). Prephenate dehydrogenase activity was determined under these conditions, and as Table 1 shows, activity did not increase in

Fig. 5. Hydrogen peroxide sensitivity of several strains of *S. cerevisiae*. Samples were taken from YPE exponential phase cultures, prior to and 30 and 45 min after the addition of H_2O_2 . Cells were diluted and plated on YPD medium to determine cell viability, as described in Materials and methods. Strain S507C (●), strain CN15 (○), strain S507C/pSL5 (▲), and strain S507C/pSL8 (△). Bars represent the SD of three experiments.



extracts obtained from H_2O_2 -treated cultures when compared to that found in extracts prepared from untreated cultures.

Discussion

The CN50 mutant strain shows what we have called an oxygen-sensitive phenotype. It is unable to grow on nonfermentable carbon sources and, when incubated aerobically with glucose, it does not grow and the culture shows a dramatic decrease in viability, which can be prevented by supplementing the incubation media with antioxidants or Fe^{3+} -chelating agents. The phenotype of this mutant suggested that this strain was unable to manipulate the reactive oxygen species generated as a consequence of aerobic metabolism.

The genetic complementation of the CN50 mutant allowed the cloning of the *TYR1* gene, indicating that this strain was impaired in tyrosine biosynthesis. This suggestion was confirmed when this strain showed low prephenate dehydrogenase activity. Furthermore, the fact that the CN50 mutant bearing the *TYR1* gene recovered a completely wild-type phenotype, and thus the capacity to grow on aerobic cultures and on nonfermentable carbon sources, indicated that tyrosine could play a role in protection from oxidative stress in

a wild-type strain and that impaired tyrosine biosynthesis resulted in an incapacity to withstand aerobic metabolism.

Since the CN50 mutant was sterile, we were unable to determine whether the phenotype displayed by this strain was due to a single gene mutation. Additionally, a well-characterized monogenic *tyr1*⁻ strain obtained from the Yeast Genetic Stock Center was sensitive to H₂O₂, but this sensitivity reverted when this strain was complemented with a plasmid bearing the *TYR1* gene. It is clear that the phenotype displayed by the CN50 mutant is different from that observed in the *tyr1*⁻ strain, since when the latter strain was incubated aerobically in the absence of tyrosine it did not lose viability, and to see the effect of the lack of *tyr1*⁻ activity on cell viability, cells had to be exposed to H₂O₂. In this regard, it could also be that *TYR1* could be acting as a dosage suppressor of an unlinked mutation in CN50, thus explaining the difference in phenotypes displayed by CN50 and the *tyr1*⁻ strain. These results indicate that the sensitivity to reactive oxygen species is higher in the CN50 mutant than in the *tyr1*⁻ strain.

TYR1 gene expression was analyzed and synthesis of *TYR1* mRNA clearly did not increase when the cells were incubated in the presence of H₂O₂. However, the fact that the loss of *TYR1* resulted in higher sensitivity towards H₂O₂ strongly supports our proposition that tyrosine participates in a mechanism for protection against oxidative stress.

Results presented here indicate that amino acids could play additional roles to their fundamental function in the buildup of proteins. It is worth noting that in this context there are two previous observations indicating that amino acid biosynthesis could be involved in the protection from stress. Firstly, an impairment in the gene that codes for chorismate mutase (*ARO7*) results in osmotic sensitivity (Ball et al. 1986). This phenotype has been explained assuming that the depletion of an intermediate in the phenylalanine and tyrosine pathway could lead to the malfunction or absence of a membrane component (Ball et al. 1986). Secondly, in *Aspergillus* it has been suggested that the RAS/cAMP pathway is defective in germinating conidia of amino acid auxotrophs and that this is responsible for suppressing DNA repair and conferring sensitivity to oxidative stress and heat shock (Donnelly et al. 1994). Although it has been reported that overexpression of *MET22* (a gene involved in methionine biosynthesis) can improve the growth of strains incubated in the presence of NaCl and LiCl (Glaser et al. 1993), this phenomenon is different from that observed for *TYR1* in relation to its protective effect against oxidative stress. The phenotypic analysis of *MET22* mutant strains has suggested that the *MET22* protein is an enzyme very sensitive to salt inhibition and is required for methionine prototrophy. This explains why overexpression of this protein improves growth under salt stress (Glaser et al. 1993).

Regarding the mechanism through which tyrosine exerts its protective effect, two main pathways can be suggested. It is known that certain peroxidases, such as the ovoperoxidase present in the nascent sea urchin embryo, forms dityrosine cross-links in its protective fertilization envelope by a reaction that requires H₂O₂ (Foerder and Shapiro 1977). A cytochrome P450-like enzyme similarly cross-links proteins in the spore wall of *S. cerevisiae* (Briza et al. 1986). It has also been shown that the myeloperoxidase secreted by acti-

vated phagocytes can employ H₂O₂ to oxidize L-tyrosine to the tyrosyl radical, yielding dityrosine (Heineket et al. 1993). It could be argued that the production of dityrosine offers a mechanism to use H₂O₂, yielding the stable cross-linked product dityrosine. An alternative explanation of the role of tyrosine in oxidative stress protection is that this molecule includes a phenolic group, and various phenolic compounds are able to scavenge superoxide ions and suppress the production of lipid peroxides (Zitomer and Lowry 1992). However, the mechanism through which tyrosine protects against oxidative stress needs to be studied.

Acknowledgments

We are grateful to Ricardo Tapia and Lourdes Valenzuela for their critical review of the manuscript. This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN201894 and IN204695) and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 400360-5-2549 PN). The authors are also grateful to the Secretaría de Relaciones Exteriores of the Mexican Government for the Fellowship granted to S.L. to support her Ph.D. studies in México.

References

- Ball, S.G., Wickner, R.B., Conarel, G., Schaus, M., and Tirtiaux, C. 1986. Molecular cloning and characterization of *ARO7-OSM2*, a single yeast gene necessary for chorismate mutase activity and growth in hypertonic medium. *Mol. Gen. Genet.* 205: 326–330.
- Berrington-McDonogh, O., Gralla, E.B., and Valentine, J.S. 1988. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 4789–4793.
- Briza, P., Winkler, G., Kalchauer, H., and Breitenbach, M. 1986. Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. *J. Biol. Chem.* 261: 4288–4294.
- Buettner, G.R. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 535–543.
- Cohen, S.N.A.C.Y., and Hsu, L. 1972. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110–2114.
- Cohen, G., Rapatz, W., and Ruis, H. 1988. Sequence of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 and amino-acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.* 176: 159–163.
- Dayan, J., and Sprinson, D.B. 1970. Determination of prephenate dehydrogenase activity. *Methods Enzymol.* 17: 562–563.
- Donnelly, E., Barnett, Y.A., and McCullough, W. 1994. Germinating conidiospores of *Aspergillus* amino acid auxotrophs are hypersensitive to heat shock, oxidative stress and DNA damage. *FEBS Lett.* 355: 201–204.
- Fink, G.R. 1970. The biochemical genetics of yeast. *Methods Enzymol.* 16: 58–78.
- Foerder, C.A., and Shapiro, B.M. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4214–4218.
- Glaser, H.U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdinin-Kerjan, Y., and Serrano, R. 1993. Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12: 3105–3110.
- González, A., Dávila, G., and Calva, E. 1985. Cloning of a DNA

- sequence that complements glutamine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **36**: 123–129.
- González, A., Membrillo-Hernandez, J., Olivera, H., Aranda, C., Macino, G., and Ballario, P. 1992. Cloning of a yeast gene coding for the glutamate synthase small subunit (*GUS2*) by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* glutamate auxotrophs. *Mol. Microbiol.* **6**: 301–308.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1985. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York. pp. 218–313.
- Harting, A., and Ruis, H. 1986. Nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* CTT1-gene and deduced amino acid sequence of catalase T. *Eur. J. Biochem.* **160**: 487–490.
- Heineckel, J., Li, W., Daehnke, III, H.L., and Goldstein, J.A. 1993. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**: 4069–4077.
- Hinnen, A., Hicks, J.B., and Fink, G.R. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 1929–1933.
- Jungmann, J., Reins, H.A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D., and Jentsch, S. 1993. Mac-1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* **12**: 5051–5056.
- Kang, Y.S., Kane, J., Kurjan, J., Stadel, J.M., and Tipper, D.J. 1990. Effects of expression of mammalian G alpha and hybrid mammalian–yeast G alpha proteins on the yeast pheromone response signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2582–2590.
- Krems, B., Charzianis, C., and Entian, K.D. 1995. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr. Genet.* **27**: 427–434.
- Mannhaupt, G., Stucka, R., Pilz, U., Schwarzlose, and Feldmann, H. 1989. Characterization of the prephenate dehydrogenase-encoding gene, *TYR1*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **85**: 303–311.
- Marchler, G., Schuller, C., Adams, G., and Ruis, H. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**: 1997–2003.
- Marres, C.A.M., Van Loon, A.P.M.G., Oudshoorn, P., van Steeg, H., Grivell, L.A., and Slater, E.C. 1985. Nucleotide sequence analysis of the nuclear gene coding for manganese superoxide dismutase of yeast mitochondria, a gene previously assumed to code for the Rieske iron–sulphur protein. *Eur. J. Biochem.* **147**: 153–161.
- Nasmyth, K.A., and Reed, S.I. 1980. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 2119–2123.
- Polaina, J.A., and Conde, J. 1981. Use of the polycene antibiotic *N*-glycosyl-polyfungin in counterselecting yeast mutants. *Mutat. Res.* **91**: 111–114.
- Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D., and Fink, G.R. 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene*, **60**: 237–243.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463–5467.
- Saskia, A., van Acker, B.E., Koymans, L.M.H., and Bast, A. 1993. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biol. Med.* **15**: 311–328.
- Spevak, W., Friederike, F., Rytka, J., Traczyk, A., Skoneczny, M., and Ruis, H. 1983. Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1545–1551.
- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H., and Ames, B.N. 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 8917–8921.
- Su-Ju Lin, and Culotta, V.C. 1995. The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3784–3788.
- Wolff, S.P., Garner, A., and Dean, R.T. 1986. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 27–31.
- Zhou, Y.C., and Zheng, R.L. 1991. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 1177–1179.
- Zitomer, R.S., and Lowry, C.V. 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **56**: 1–11.

IV. RESULTADOS ADICIONALES

Sensibilidad a la temperatura

Se estudió la sensibilidad de la cepa CN50 a la temperatura. Para ello, se realizó un cultivo de la cepa en medio mínimo con glutamina y en microaerofilia, a 30°C y 37°C; determinándose la densidad óptica del cultivo a 600nm durante un período de 30 hs (Fig. 1). La cepa CN50 creció a 30°C pero no a 37°C lo que indica su termosensibilidad. Esta sensibilidad a la mayor temperatura se revirtió si se agregaba tirosina al medio de cultivo.

Dado que la mutación en el gen *TYR1* confería sensibilidad al peróxido de hidrógeno y que la CN50 no crecía a 37°C, era posible que los auxótrofos de tirosina fueran más sensibles también al estrés por calor. Para verificar esta hipótesis se midió la pérdida de viabilidad debida al choque de calor de una cepa auxótrofa para tirosina (S507C) y de las cepa complementada con los plásmidos que llevaban *TYR1* (cepa S507C/pSL5 y cepa S507C/pSL8). La pérdida de viabilidad se determinó en medio mínimo-glutamina suplementado con los aminoácidos requeridos para suplir las auxotrofías. Un mililitro del cultivo (DO=0.3) se calentó a 49°C y se tomaron alícuotas del cultivo a tiempo 0 (sin calentar), a los 10 y 20 minutos. Se realizaron diluciones y se platearon 100µl de cultivo en medio rico (YPD), contabilizando el número de colonias a las 72 hs. Para cada condición se realizaron tres réplicas y los experimentos fueron repetidos 4 veces.

La cepa S507C (*tyr1⁻*) presentó mayor sensibilidad al estrés por calor

(Fig.2). Su pérdida de viabilidad se evidenció en los primeros 10 min por la sobrevivencia de sólo el 2,7% de las células, mientras que a los 20 min. la sobrevivencia fue menor del 1%. El porcentaje de sobrevivencia en las cepas complementadas fue del 8% y menor de 5% a los 10 y 20 minutos, respectivamente no presentando diferencias significativas entre sí.

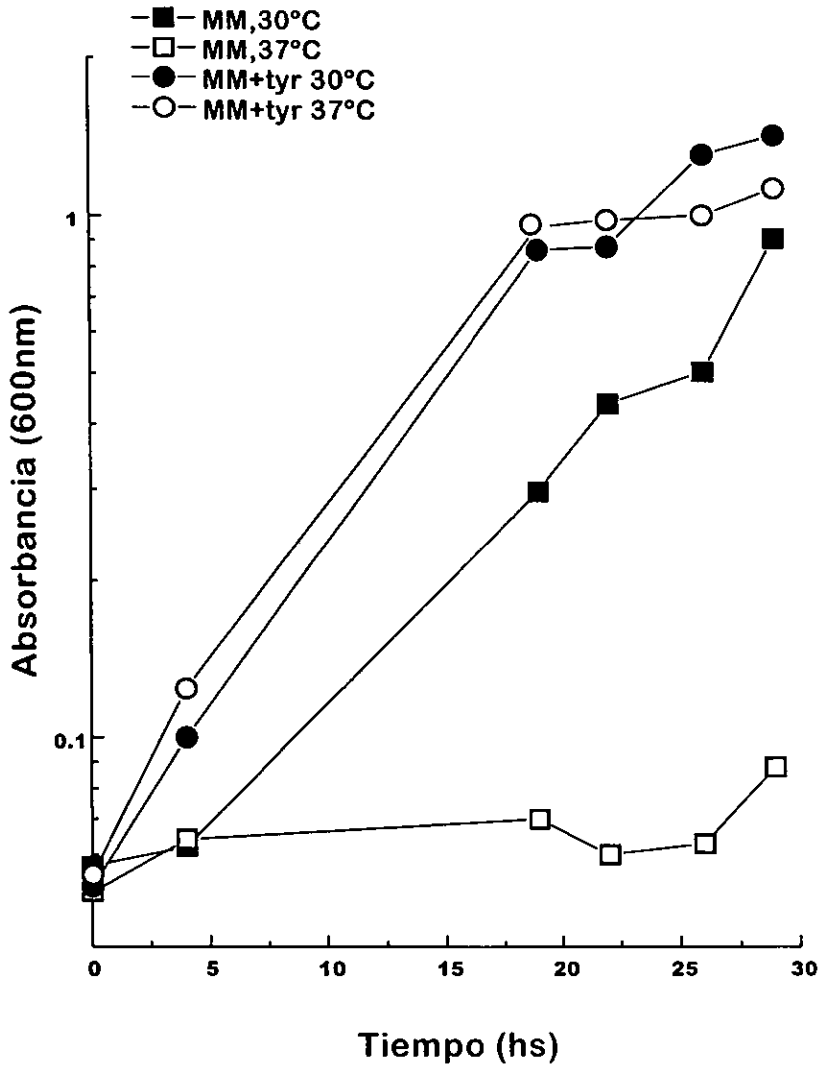


Figura 1.- Crecimiento de la cepa CN50 en medio mínimo (MM) a 30°C y a 37°C y en medio mínimo + tirosina (MM+tyr) a 30 y a 37°C.

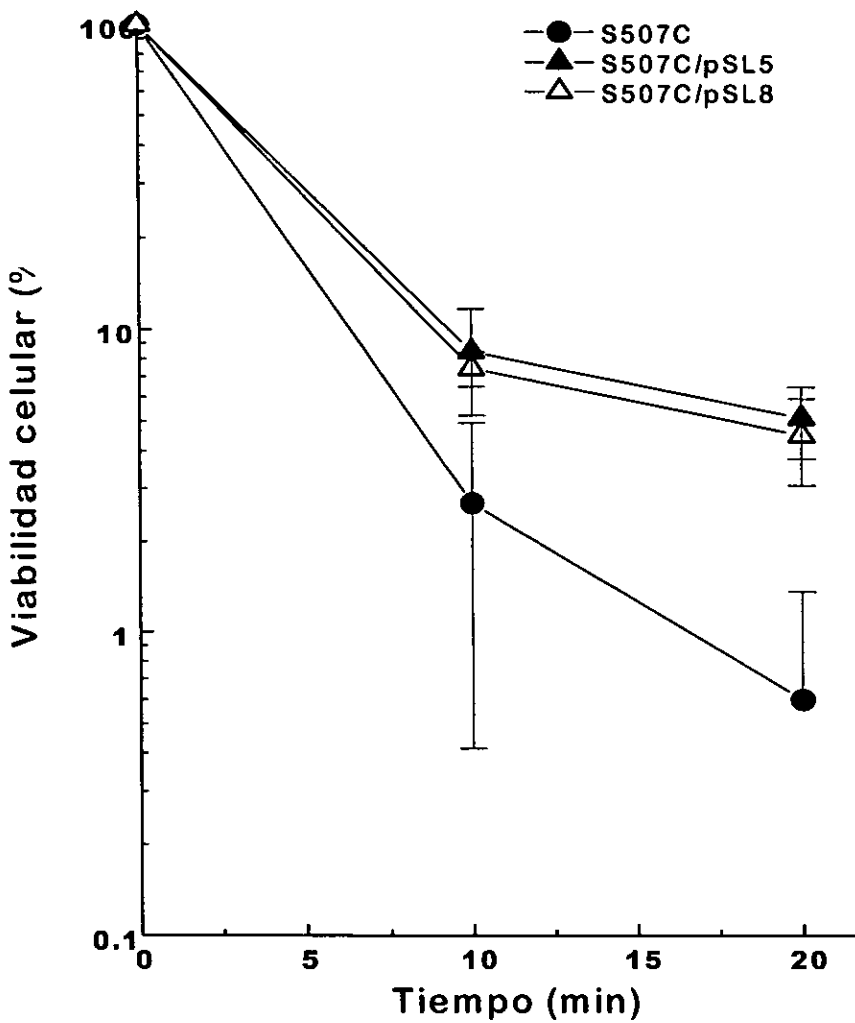


Figura 2.- Resistencia al choque de calor de la cepa *tyr1⁻* (S507C) y de la cepa *tyr1⁻* complementada con *TYR1* (S507C/pSL5) y con *TYR1* bajo un promotor inducible por cobre (S507C/pSL8). Una alícuota de 1ml de las células creciendo en medio rico (YPD) se calentó durante 10 y 20 min. a 49°C.

Expresión de *TYR1* en respuesta al calor

Dado que *TYR1* también participaba en la protección frente a choque de calor, se determinó la expresión del mensajero de *TYR1* en condiciones de calor. Para ello se recuperaron las células de la cepa silvestre S288C en medio rico (YPD) a 23°C ($DO_{600nm} = 0.9$). Estas se resuspendieron en 1ml del mismo medio. Se calentaron durante 15 y 30 minutos a 37°C. Posteriormente se extrajo el RNA total utilizando el protocolo, se transfirió a un filtro y se hibridizó con la sonda de *TYR1* y la sonda de *CTT1* como control positivo. Se utilizaron controles sin calentar. El mensajero de *TYR1* no se indujo por calor y si lo hizo el control de *CTT1* (Figura 3).

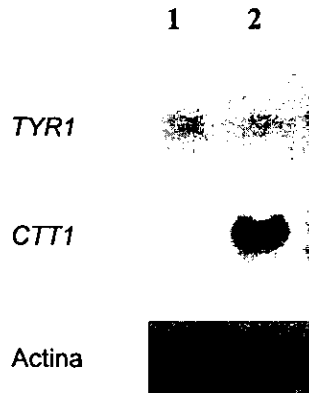


Figura 3. Expresión del mensajero de *TYR1* de la cepa S288C. 1) RNA a 23°C, 2) RNA 15min a 37°C. Se hibridizó con la sonda de *TYR1*, con la sonda de catalasa *CTT1* como control positivo y con la sonda de Actina para normalizar.

¿Existe una ruta alternativa a la mediada por *TYR1* para biosíntesis de tirosina en *S. cerevisiae*?

En virtud de que la cepa CN50 presentaba una actividad de prefenato deshidrogenasa residual pero era incapaz de crecer sin que se agregara tirosina al medio, se podría pensar que existe una vía alternativa de síntesis de tirosina. Una posible ruta de síntesis era la hidroxilación de la fenilalanina, reacción que en mamíferos es catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa (PAH) (Braus, 1991).

Para determinar si existía una ruta alternativa de síntesis de tirosina en *S. cerevisiae* se obtuvo en el laboratorio por mutagénesis química a partir de la cepa CN100 (*tyr1, ura2*) una cepa (R3) que era protótrofa para tirosina (Figueroa, 1997). La cepa R3 tenía un fenotipo similar a la cepa CN50, presentando una actividad de prefenato deshidrogenasa muy baja y la capacidad de crecer sin tirosina en medio mínimo (Figueroa, 1997). Esta cepa R3 podría haber abierto la nueva ruta de síntesis de tirosina. La ausencia de esta otra vía se comprobó mediante la interrupción de *TYR1* en la cepa R3, utilizándose un plásmido integrativo (pSL9). Este, se construyó por la subclonación del fragmento *EcoRI/HindIII* de *TYR1* de 1000 pares de bases en los sitios homólogos del plásmido YIp5 (Struhl y cols., 1979). La cepa R3 se transformó con el plásmido pSL9 linearizado con la enzima de restricción *AflIII*. El sitio de corte de la enzima estaba localizado dentro del inserto a 364 pares de bases del sitio *EcoRI*. Al integrarse el plásmido por recombinación homóloga se interrumpió el gen *TYR1*. Las colonias transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en medio mínimo sin uracilo. Los

fenotipos de las cepas obtenidas se comprobaron por la capacidad de crecer en placa por gota en MM-ura, MM, MM-tyr, MM-tyr-ura.

Todas las colonias obtenidas fueron auxótrofas para tirosina lo cual indica que la cepa no presentaba una vía alternativa para síntesis de tirosina sino que ésta dependía de *TYR1*. Este resultado fue reforzado con la complementación de la cepa R3 con pSL5 en donde se recuperó la actividad de prefenatdo deshidrogenasa que presenta una cepa silvestre (Tabla 1).

Tabla 1.- Actividad de prefenatdo deshidrogenasa

Cepa	Actividad específica ^a
R3	0.15
Δ R3	nd ^b
R3/pSL5	0.86

^a expresada en nanomoles por mililitro por miligramo de proteína

^b no detectada

V. DISCUSION

Se cree que los radicales libres son la causa de varias enfermedades degenerativas y que son los principales protagonistas en los procesos de envejecimiento celular (Ames y cols. 1993; de Grey, 1993). Debido a ello la búsqueda de mecanismos que participen en la protección frente a radicales libres es de indudable importancia y ha permitido la identificación de genes que participan en esta protección.

La levadura *S. cerevisiae* además de ser un organismo aeróbico, capaz de usar el oxígeno para la obtención de energía y por lo tanto estar sujeto a las consecuencias negativas que ello implica, también puede crecer en forma fermentativa. Esto lo hace un organismo ideal para ser utilizado como modelo en el estudio de los mecanismos involucrados en la protección frente al estrés oxidativo. Por otra parte es un organismo eucariota muy fácil de manipular genéticamente y del cual ya se conoce la secuencia completa del genoma.

En este trabajo se aislaron mutantes de *S. cerevisiae* sensibles a oxígeno, las que fueron seleccionadas porque eran incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables. El método de selección que se utilizó, nos permitió aislar mutantes afectadas en genes necesarios para la biosíntesis de metabolitos esenciales para el crecimiento aeróbico. De las mutantes obtenidas se eligió una (CN50) para ser estudiada .

La mutante seleccionada, CN50, resultó incapaz de crecer en medio mínimo en condiciones de aerobiosis y además en éstas condiciones, también presentaba una pérdida de viabilidad. La pérdida de viabilidad no era consecuencia de la incapacidad de crecer , dado que otras cepas cultivadas en condiciones en donde no podían crecer, no mostraban una pérdida en la viabilidad. Sin embargo la viabilidad se recuperó tanto en condiciones de microaerofilia o anaerobiosis así

como si se le adicionaba al medio un agente antioxidante (2-mercaptoetanol) o un compuesto que secuestra iones Fe^{+2} (1,10-fenantrolina). El hecho de que la viabilidad de la mutante, se recuperara por un lado en condiciones en las que se reducía la cantidad de Fe^{+2} , el cual es capaz de generar radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Halliwell & Aruoma, 1991), y por otro lado en condiciones en donde se limitaba o eliminaba la presencia de oxígeno, nos hizo suponer que la cepa CN50 era incapaz de contender con los radicales libres que se generaban durante el metabolismo aeróbico. Por otra parte la cepa CN50 resultó ser sensible a temperatura ya que no creció a 37°C en microaerofilia.

Con la finalidad de hacer un análisis genético de la mutante CN50, se la cruzó con dos cepas silvestres. La cruce produjo diploides que eran capaces de crecer en etanol indicando que la mutación implicada en la capacidad de crecer en etanol era recesiva, pero debido a que las esporas no eran viables, no se pudo determinar cuantas mutaciones determinaban este fenotipo.

Considerando que la mutante no crecía en etanol y con la finalidad de poder clonar el o los genes responsables del fenotipo de la mutante, ésta se transformó con un banco genómico de *S. cerevisiae*, obteniéndose un plásmido pSL5 que complementaba la incapacidad de crecer en etanol. La subclonación del inserto presente en pSL5 y su mapa de restricción nos permitió ubicar en el inserto, el gen que complementaba. Se realizó la secuenciación de un fragmento interno del gen. La comparación de la secuencia encontrada con las reportadas en el GeneBank, nos permitió identificar a *TYR1* como el gen que complementaba. *TYR1* codifica la enzima pefenato deshidrogenasa que participa en la biosíntesis de tirosina (Mannhaup y cols. 1989).

La mutante CN50 portadora de *TYR1* crecía en medio mínimo en condiciones de aereación, por lo tanto, la presencia de *TYR1* complementaba

también la incapacidad de crecer en aerobiosis.

Los resultados sugirieron que la cepa CN50 presentaba una alteración en la biosíntesis de tirosina ya que, cuando se complementaba con un plásmido que llevaba *TYR1*, o si se le agregaba tirosina al medio de cultivo era capaz de crecer en medio mínimo y aerobiosis igual que una cepa silvestre. Es importante destacar además, que ningún otro aminoácido fue capaz de revertir el fenotipo. En concordancia con ello la actividad de pterinato deshidrogenasa que presentó la mutante correspondió al 3% de la actividad de una cepa silvestre. De la misma forma la incapacidad de crecer a 37°C, se recuperaba al adicionarle tirosina. Uno podría pensar que el único problema que tenía la mutante sería una braditrofia para tirosina y por eso no crecía en medio mínimo, pero esta hipótesis se descartó totalmente dado que en microaerofilia y anaerobiosis la mutante no requería tirosina para crecer. Esto podría explicarse de dos maneras. Una posibilidad es que la enzima pterinato deshidrogenasa de la mutante fuera sensible a temperatura y por lo tanto, la cepa CN50 no podía crecer a esa temperatura por que le faltaba tirosina. La otra posibilidad, la más probable considerando lo dicho anteriormente, es que en presencia de oxígeno o a 37°C la tirosina tuviera un efecto de protección. La presencia de *TYR1* no restablecía, sin embargo, la viabilidad de las esporas. Esto nos hizo suponer que la cepa CN50 tenía otra mutación que era la responsable de la esterilidad.

Los datos obtenidos sugieren que el gen *TYR1* puede estar ligado a la protección frente a los radicales libres generados durante el metabolismo aerobio. Esta idea fue corroborada, por el hecho de que otra mutante *tyr1⁻*, del Stock Center, también presentó una mayor sensibilidad a los radicales libres generados por la adición de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo. La mutante *tyr1⁻* era además auxótrofa para leucina, a partir de ella se obtuvo una mutante capaz de

sintetizar este aminoácido. Esta mutante conservó el fenotipo de sensibilidad a estrés oxidativo observado en la cepa *tyr1⁻ leu2⁻*. Tanto la cepa *tyr1⁻* como la cepa isogénica revertante para leucina fueron más sensibles al H₂O₂ que la *tyr1⁻* complementada con *TYR1*. Ambas cepas auxótrofas presentaban la misma sensibilidad a H₂O₂. Los resultados también mostraron que *TYR1* participa además en la protección frente a calor dado que la cepa *tyr1⁻* fué más sensible al choque de calor que las cepas complementadas con *TYR1*. Por lo tanto es posible proponer que la mutación en *TYR1* resulta en una mayor sensibilidad a la temperatura.

Es importante señalar, sin embargo, que la cepa *tyr1⁻* del stock center y la cepa CN50 no presentaban el mismo fenotipo, ya que la *tyr1⁻* no perdía viabilidad en cultivos aeróbicos. Una manera de explicar ésto era suponer que la cepa CN50 era portadora de una mutación adicional, probablemente en algún gen relacionado con la protección frente al estrés, en presencia de la cual se incrementa su sensibilidad a los radicales libres y al calor. Esta otra mutación sería críptica y sólo se manifestaría en presencia de una mutación en *TYR1*.

Dado que la cepa CN50 no era auxótrofa total para tirosina, y presentaba una actividad mínima de prefenato deshidrogenasa, pensamos que podría haber adquirido la capacidad de obtener tirosina por medio de una ruta alternativa. Esta otra ruta de síntesis de tirosina podría ser a través de la enzima fenilalanina hidroxilasa, la que cataliza en mamíferos la reacción de síntesis de tirosina a partir de fenilalanina (Braus, 1991). Dado que la fenilalanina se requiere en esta reacción, la acumulación intracelular de fenilalanina podría favorecer el funcionamiento de dicha ruta alternativa. En este sentido se sabe que algunas cepas de *S. cerevisiae*, con mutaciones en *TYR1* y con una actividad de prefenato deshidrogenasa disminuída, acumulan fenilalanina (Fukuda y cols., 1991). Esta acumulación probablemente se debe al hecho de que al disminuir la poza

intracelular de tirosina, la isoenzima DAHP sensible a tirosina se liberaría de ésta inhibición y dado que no se puede sintetizar tirosina se acumularía fenilalanina (Fukuda y cols., 1991. Por otra parte a partir de una cepa *tyr1⁻* se obtuvieron por mutagénesis (con EMS) revertantes protótrofas para tirosina (Figuroa, 1997). La revertante R3 protótrofa para tirosina, presentaba una actividad de pafenato deshidrogenasa muy baja, por lo cual era sensible a 3-amino tirosina y también acumulaba fenilalanina (Figuroa, 1997). La sensibilidad al análogo de tirosina (3-amino tirosina), es consecuencia de la poca tirosina intracelular ya que el análogo compite con el aminoácido impidiendo el crecimiento. Con el fin de demostrar la existencia de una ruta alternativa para la biosíntesis de tirosina, se interrumpió el gen *TYR1* en la cepa R3. La ausencia de dicha ruta se demostró porque todas las cepas interrumpidas fueron auxótrofas para tirosina. Si existiera otra ruta de síntesis de tirosina, las cepas obtenidas por la interrupción de *TYR1* serían protótrofas, ya que igual estarían sintetizando tirosina. De esta forma se demostró que el crecimiento que presentaban las cepas R3 y CN50, se debía a la actividad residual de pafenato deshidrogenasa. La mínima cantidad de tirosina que podía sintetizar una cepa bradítrofa era suficiente para crecer, ya que en microaerofilia la cepa CN50 no requirió tirosina. Estos datos indicaban claramente que la tirosina tenía más de un papel. Es decir, en aerobiosis o a 37°C la tirosina se requería para algo más que para sintetizar proteínas, lo cual también ocurrió en condiciones de estrés por radicales libres y estrés por calor.

El análisis genético de la cepa R3, mostró que ésta presentaba dos mutaciones, una en *TYR1* que la hacía bradítrofa para tirosina y otra que cuando se presentaba simultáneamente con la mutación en *TYR1* le confería sensibilidad a la cepa tanto al oxígeno como a la temperatura (Figuroa, 1997). La mutante R3 presentaba por lo tanto un fenotipo similar a la CN50. Un hecho sorprendente para

el cual no tenemos una explicación, es que las dos mutantes obtenidas en forma independiente, en un caso a partir de una cepa silvestre y en el otro caso a partir de una cepa *tyr1⁻*, fueron bradítrofas para tirosina y tenían además otra mutación asociada, todo lo cual resultó en una mayor sensibilidad a condiciones de estrés. Aunque la frecuencia de mutaciones producidas utilizando EMS es de 5×10^{-4} a 1×10^{-2} por gen, esta frecuencia es mayor al utilizar N-glicosil-polifungina lo cual podría aumentar la obtención de dobles mutantes.

Si bien podemos decir que la presencia de *TYR1* es necesaria para la protección frente al estrés, a diferencia de otros genes que participan en la protección, su transcripción no se indujo ni con peróxido ni con choque de calor. Tampoco aumentó la actividad de pterinato deshidrogenasa en esas condiciones. Esto concuerda con la ausencia en su promotor de las secuencias consenso denominadas HSE, STRE, y YAP, a las que se unen los factores de transcripción.

La importancia de la biosíntesis de aminoácidos en relación a diferentes tipos de estrés en *S. cerevisiae* ha sido reportada por algunos investigadores, pero la existencia de verdaderos mecanismos de protección que impliquen la biosíntesis de aminoácidos no está demostrada. Glaser y cols. (1993), reportan que el gen *MET22* el cual interviene en la síntesis de metionina, cuando está presente en multicopia, participa en la tolerancia al NaCl y LiCl. En este caso no sería un mecanismo de protección, sino que como la enzima codificada por *MET22* es muy sensible a altas concentraciones de sal, es necesaria la sobreexpresión del gen o la adición de metionina para el crecimiento en esas condiciones. También el producto de *ARO7*, es necesario para el crecimiento en medios hipertónicos y las mutantes (*aro7*) son sensibles al choque osmótico, pero esto se debe probablemente a que la disminución en algún intermediario de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos produce una malformación en la membrana plásmática (Ball y cols., 1986). El

único gen biosintético que aparentemente participa aunque en forma indirecta en la protección frente al estrés oxidativo en *S. cerevisiae*, es *LYS7*. La proteína codificada por *LYS7*, tiene una función adicional a la de participar en la biosíntesis de lisina. Las mutantes en el gen *LYS7* presentan un fenotipo similar al de una célula que no tiene actividad de superóxido dismutasa (SOD), presentan auxotrofia para lisina y metionina, sensibilidad a radicales libres y a sales (NaCl, LiCl). Este fenotipo pleiotrópico se vió que se curaba en presencia de Cu^{++} . La proteína Lys7p al parecer interviene en el funcionamiento de la Cu/ZnSOD a través de facilitar su unión al Cu^{++} (Gamonet & Luquin, 1998).

También en *Aspergillus nidulans* los auxótrofos para varios aminoácidos resultaron ser más sensibles a condiciones de estrés que las cepas protótrofas (Donnelly y cols., 1994). En ese estudio demostraron que los conidios de varias cepas que presentaban auxotrofias para tirosina, prolina, lisina o arginina fueron más sensibles al estrés por calor, al estrés oxidativo y a las radiaciones ultravioletas que sus correspondientes cepas isogénica protótrofas. La disminución en la viabilidad de los conidios se asoció con un aumento en la frecuencia de mutaciones, pero en este caso, tampoco se pudo relacionar directamente a los aminoácidos con una función de protección. (Donnelly y cols., 1994). Asimismo en levaduras se ha encontrado que algunos aminoácidos como histidina y cisteína protegen a la enzima AMP deaminasa de la oxidación producida por radicales libres (Murakami y cols., 1997). Dado que encontraron que la concentración de histidina requerida para alcanzar la mitad del efecto máximo en la protección, estaba dentro de los rangos fisiológicos para ese aminoácido, suponen que la histidina podría funcionar como un “antioxidante” fisiológico (Murakami y cols., 1997).

Por otra parte nuestros resultados sugieren, que en nuestra mutante, la

presencia de por lo menos una copia del gen *TYR1* es necesaria para conferir resistencia a dos tipos de estrés, por radicales libres y por calor. También sugieren que la existencia de otra mutación conjuntamente con la mutación en *TYR1*, afecta la capacidad de la cepa de crecer en condiciones normales (en aerofilia o a 37°C), en donde una cepa silvestre puede crecer. Posiblemente la síntesis de tirosina sea un mecanismo fisiológico de protección adicional, en condiciones en donde se genera un exceso de radicales libres o cuando éstos no son eficientemente eliminados.

¿Cómo podría estar actuando la tirosina? Varios compuestos de bajo peso molecular funcionan como protectores frente a condiciones de estrés debido a su acción como antioxidantes o a su capacidad de secuestrar radicales libres. El β -caroteno tiene efecto fundamentalmente sobre el oxígeno en singulete, la función antioxidante del β -caroteno depende tanto de la presión parcial de oxígeno como de la concentración del compuesto. A baja presión parcial de oxígeno y a concentraciones bajas funciona como antioxidante (Burton & Ingold, 1984; Ames y cols., 1993). El ácido úrico funciona en la sangre como secuestrador de radicales libres previniendo la peroxidación de los lípidos de la membrana de los eritrocitos, la cantidad de este compuesto presente en el plasma hace que se considere uno de los principales antioxidantes en el hombre (Ames y cols. 1981). El ácido ascórbico, las proteínas con grupos S —H y el glutatión reducido (GSH) funcionan como antioxidantes solubles (van Acker, y cols. 1993). Por otra parte los compuestos que presentan anillos fenólicos, son eficientes antioxidantes y por su capacidad de secuestrar radicales superóxido previenen la peroxidación de lípidos (Zhou, Y.C. & Zheng, R.L., 1991; van Acker, 1993). En especial el α -tocoferol es muy importante en la protección de las membranas ya que por su carácter lipofílico se sitúa en las membranas y por presentar grupos fenólicos tiene la capacidad de secuestrar los

radicales hidroxilo y por lo tanto previene la peroxidación de los lípidos. La capacidad de reacción del α -tocoferol con los radicales libres se debe a la capacidad de transferencia del H de su grupo OH. Como consecuencia de ello se forma un radical fenoxilo que se estabiliza por resonancia o se destruye por la reacción con otro radical fenoxilo (van Acker, 1993). Por otra parte, se demostró que los aminoácidos aromáticos, la histidina, la metionina y la cisteína tienen la capacidad de reaccionar con el oxígeno en singulete. La interacción de estos aminoácidos con el oxígeno en singulete puede conducir a la desactivación del radical o a la oxidación del aminoácido. De todos los aminoácidos estudiados el triptofano fue el que presentó mayor reactividad y la fenilalanina la que presentó menor reactividad. La tirosina en cambio fue más reactiva que la fenilalanina debido a la presencia del grupo OH, que actúa como donador de electrones (Michaeli & Feilson, 1994). Estos autores proponen que la capacidad de reacción, varía en relación a los sustituyentes químicos que presentan los aminoácidos, un sustituyente que ceda electrones incrementa la capacidad de reacción del aminoácido. No es sorprendente entonces que la tirosina confiera protección dado la presencia de un grupo fenólico en su estructura. Se sabe que el grupo fenol de la tirosina puede oxidarse in vitro en presencia de peróxido de hidrógeno y de peroxidasa dando el radical tirosilo que al unirse a otro produce ditirosina, un compuesto estable (Amado y cols., 1984). Este fenómeno ocurre en las proteínas sujetas a oxidación y la presencia de ditirosina se considera un marcador del estado oxidativo de las células en mamíferos (Heinecke y cols., 1993; Giulivi & Davies, 1994). La formación de ditirosina en animales requiere la acción de una peroxidasa la cual consume H_2O_2 durante la reacción (Foerder and Shapiro, 1977; Heinecke y cols. 1993). En la membrana que se forma luego de la fecundación del huevo del erizo de mar, la ditirosina se forma por medio de la acción de una ovoperoxidasa

(Foerder and Shapiro, 1977. En los neutrófilos, la ditirosina se forma durante la respuesta al ataque de patógenos, por la acción de una mieloperoxidasa. Esta enzima usa H_2O_2 como sustrato y en una primera etapa se forma el radical tirosilo y el radical superóxido. El radical tirosilo forma la ditirosina y el radical superóxido puede eventualmente regenerar a la tirosina. Para la síntesis de ditirosina se requieren dos moles de radical tirosilo y cada mol de H_2O_2 produce un mol de radical tirosilo (Heinecke y cols. 1993). Por lo tanto la tirosina podría funcionar como otros compuestos fenólicos que producen una interrupción en la reacción en cadena producida por los radicales libres. Pero además la síntesis de ditirosina podría constituir un sistema de consumo de H_2O_2 , lo cual redundaría en una disminución de la poza intracelular de radicales libres. En este sentido se ha reportado que en *S. cerevisiae* existe una oxidoreductasa capaz de sintetizar ditirosina (Briza y cols. 1994; Briza y cols. 1996).

VI. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son **ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- La cepa CN50 presenta un fenotipo sensible a oxígeno, dado que: 1) recupera el crecimiento en microaerofilia o anaerobiosis y 2) recupera la viabilidad en presencia de un antioxidante o de un compuesto que secuestra iones Fe^{++} .
- El fenotipo de sensibilidad al oxígeno de la cepa CN50 se cura a) en presencia del gen *TYR1* o b) si se agrega tirosina al medio. Esto sugiere que la tirosina pudiera jugar un papel en la respuesta a estrés oxidativo.
- La mayor sensibilidad al estrés oxidativo y al estrés por calor de las cepas auxótrofas para tirosina demuestra que la poza intracelular de este aminoácido es importante en la protección a diferentes tipos de estrés.
- El fenotipo pleiotrópico de la cepa CN50 podría deberse al menos a dos mutaciones, ya que por un lado *TYR1* no complementa la viabilidad de las esporas y por otro una cepa *tyr1⁻* no presenta el mismo fenotipo que la CN50.
- Aparentemente una mutación en *TYR1* que afecta parcialmente la síntesis de tirosina resulta en una sensibilidad al H_2O_2 y al calor, pero por sí sola no afecta el crecimiento de la mutante en condiciones aeróbicas.

- Nuestros resultados sugieren que la alteración simultánea en la biosíntesis de tirosina y en algún otro mecanismo primario que permite contender con el estrés oxidativo o calórico, podría resultar en un fenotipo de mayor sensibilidad a estrés.

VII. PERSPECTIVAS

Este estudio ha puesto de manifiesto una serie de preguntas que nos resultan interesantes. Entre ellas sería importante estudiar cual es el efecto de la sobreexpresión de *TYRI*; esto se podría lograr utilizando un plásmido multicopia o un promotor inducible. Asimismo sería interesante demostrar la existencia de un efecto de dosis en la protección. También es importante estudiar cual es el efecto que tiene una mutación en *TYRI* en cepas portadoras de mutaciones en otros mecanismos de protección frente al estrés. Por otra parte identificar el otro gen responsable del fenotipo de la mutante CN50 o R3, nos permitiría explicar si la biosíntesis de tirosina es un mecanismo fisiológico general de la célula en condiciones hiperoxidantes. Del mismo modo la obtención de nuevos mutantes sensibles a oxígeno a partir de cepas bradítrofas para tirosina y la identificación de los genes responsables, contribuiría a entender la participación de la biosíntesis de tirosina en la protección frente a diferentes tipos de estrés .

- Nuestros resultados sugieren que la alteración simultánea en la biosíntesis de tirosina y en algún otro mecanismo primario que permite contender con el estrés oxidativo o calórico, podría resultar en un fenotipo de mayor sensibilidad a estrés.

VII. PERSPECTIVAS

Este estudio ha puesto de manifiesto una serie de preguntas que nos resultan interesantes. Entre ellas sería importante estudiar cual es el efecto de la sobreexpresión de *TYR1*; esto se podría lograr utilizando un plásmido multicopia o un promotor inducible. Asimismo sería interesante demostrar la existencia de un efecto de dosis en la protección. También es importante estudiar cual es el efecto que tiene una mutación en *TYR1* en cepas portadoras de mutaciones en otros mecanismos de protección frente al estrés. Por otra parte identificar el otro gen responsable del fenotipo de la mutante CN50 o R3, nos permitiría explicar si la biosíntesis de tirosina es un mecanismo fisiológico general de la célula en condiciones hiperoxidantes. Del mismo modo la obtención de nuevos mutantes sensibles a oxígeno a partir de cepas braditrofas para tirosina y la identificación de los genes responsables, contribuiría a entender la participación de la biosíntesis de tirosina en la protección frente a diferentes tipos de estrés .

VIII. BIBLIOGRAFIA

Alepuz, P.M., Cunningham, K.W. & Estruch, F. 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Molecular microbiology* 26:91-98.

Amado, R., Aeschbach, R. & Neukom, H. 1984. Dityrosine: *in vitro* production and characterization. *Methods in enzymology* 107:377-388.

Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. & Hochstein. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6858-6862.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7915-7922.

Ahamed, S.I. & Giles, N.H. 1969. Organization and enzymes in the common aromatic synthetic pathway: evidence for aggregation in fungi. *J. Bacteriol.* 99:231-237.

Ball, S.G., Wickner, R.B., Cottarel, G., Schaus, M. & Tirtiaux, C. 1986. Molecular cloning and characterization for chorismato mutasa activity and growth in hypertonic medium. *Mol. Gen. Genet.* 205:326-330.

Bonner, C. & Jensen, R. 1987. Prephenate aminotransferase. *Methods in Enzymology* 142:479-487.

Bode, R., Schussler, K., Schmidt, H., Hammer, T. & Birnbaum, D. 1990. Occurrence of the general control of amino acid biosynthesis in yeast. *J. Basic. Microbiol.* 30:31-35.

Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J. & 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-

Braus, G.H., Luger, H., Paravicini G., Schmidheini, T., Kirschner, K. & Hutter, R. 1988. The role of the *TRP1* gene in yeast tryptophan biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 263:7868-7875.

Braus, G.H. 1991. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiological Reviews*, **55**:349-370.

Briza, P., Eckerstorfer, M. & Breitenbach, M. 1994. The sporulation-specific enzymes encoded by the *DIT1* and *DIT2* genes catalyze a two-step reaction leading to a soluble LL-dityrosine-containing precursor of the yeast spore wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4524-4528.

Briza, P., Winkler, G. Kalchauer, H. & Breitenbach, M. 1986. Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. *J. Biol. Chem.* **261**:4288-4294.

Burton, G.W. & Ingold, K.U. 1984. β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **224**:569-573.

Buttke, T.M. & Sandstrom, P.A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, **15**:7-12.

Byng, G.S. & Jensen, R.A. 1983. Impact of isozyme upon partitioning of carbon flow and regulation of aromatic biosynthesis in prokaryotes. *Curr Top. Biol. Med. Res.* **8**:115-140.

Cohen, G., Fessler, F., Traczyk, A., Rytka, J. & Ruis, H. 1985. Isolation of the catalase A gene of *Saccharomyces cerevisiae* by complementation of the *cta1* mutation. *Mol. Gen. Genet.* **200**:74-79.

Crawford, I.P. 1975. Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol. Rev.* **39**:87-120.

Craig, E. A. 1992. The Heat-Shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 501-537.

De Grey, A.D.N.J. 1993. A proposed refinement of the mitochondrial free radical theory of aging. *BioEssays* **19**:161-166.

Donnelly, E., Barnett, Y.A. McCullough, W. 1994. Germinating conidiospores of *Aspergillus* amino acid auxotrophs are hypersensitive to heat shock, oxidative stress and DNA damage. *FEBS Letters* **355**:201-204.

Duncan, K., Edwards, R.M. & Coggins, J.R. 1987. The pentafuntional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains. *Biochem. J.* **246**:375-386.

Farrelly, F. & Finkelstein, D. 1984. Complete sequence of hte heat-inducible *HSP90* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**:5745-.

Figueroa, C.A. 1997. Caracterización de una vía alterna de biosíntesis de tirosina en *Saccharomyces cerevisiae*Ñ estudio de su papel en la viabilidad celular. Tesis de maestría en Biomedicina Molecular, IPN. 55p.

Foerder, A. & Shapiro, B.M. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:4214-4218.

Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K. Ouchi, K. & Takasawa, S. 1991. Isolation and genetic study of ρ -fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants overproducing β -phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **20**:449-452.

Gamonet, F. & Lauquin, G.J.M. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* LYS7 gene is involved in oxidative stress protection. *Eur. J. Biochem.* **251**:716-723.

Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F., Villalba, J.M. & Serrano, R.1992. A novel and conserved salt-induced protein es an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* **11**:3157-3164.

Gilchrist, D.G. & Connelly, J.A. 1987. Chorismato mutasa from bean and sorghum. *Methods Enzymol.* **142**:450-463.

Giulivi, C. & Davies, K.J.A. 1994. Dytirosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods in Enzymology* **233**:363-371.

Glaser, H.U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdin-Kerjan, Y. & Serrano, R. 1993. Sant tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* **12**:3105-3110.

Goerisch, H. 1987. Chorismate mutase from *Streptomyces aureofaciens*. *Methods Enzymol.* **142**:463-472.

Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J.H. & Dawes, I.W. 1996. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Molecular Microbiology* **21**:171-179.

Halliwell, B. & Aruoma, O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* **281**:9-19.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press. OXFORD, 543pp.

Haslam, E. 1974. The shikimate pathway. Butterworths, London.

Heinecke, J.W., Li, W., Daehnke III, H.L. & Goldstein, J.A. 1993. Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the Myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *J. Biol. Chem.* **268**:4069-4077.

Herrmann, K.M. & Somerville, R.L. 1983. Amino acid: biosynthesis and regulation. Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass.

Higgins, C.F., Cairney, J., Stirling, D.A., Sutherland, L. & Booth, I.R. 1987. Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? *Trends Genet.* **12**:339-344.

Hinnebusch, A.G. 1988. Mechanisms of the gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**:248-273.

Horecka, J., Kinsey, P.T. & Sprague, G.F. Jr. 1996. Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *LYS7* gene: evidence for function outside of lysine biosynthesis. *Gene (Amst)* **162**:87-92.

Hortner, H., Ammerer, G., Hartter, E., Hamilton, B., Rytka, J., Bilinski, T. & Ruis, H. 1982. Regulation of synthesis of catalases and iso-1-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, oxygen and heme. *Eur. J. Biochem.* **128**:179-184.

Hutter, R., Niederberger & DeMoss, J.A. 1986. Tryptophan biosynthetic genes of eukaryotic microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:55-77.

Iraqi, Y., Vissers, S., Cartiaux, M. & Urrestarazu, A. 1998. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* y *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferasas Y and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol.Gen. Genet.* **257**: 238-248.

Izawa, S., Inoue, Y. & Kimura, A. 1995. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **368**:73-76.

Kradolfer, P., Zeyer, J., Miozzari, G. & Hutter, R. 1977. Dominant regulatory mutants in chorismate mutase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2**:211-216.

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

Lin, Su-Ju & Culotta, V. C 1995. The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**:3784-3788.

Liu, Xiao-dong & Thiele, D.J. 1996. oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes & Development* **10**:592-603.

Llewellyn, D.J., Daday, A. & Smith, G.D. 1980. Evidence for an artificially evolved bifunctional 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase-chorismate mutase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **255**:2077-2084.

Mager, W.H. & Moradas-Ferreira, P. 1993. Stress response of yeast. *Biochem. J.* **290**:1-13.

Mager, W.H. & De Kruijff, A.J.J. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiological Reviews* **59**:506-531.

Mager, W.H. & Hohman, S. 1997. Introduction: Stress response mechanisms in the yeast. In *Yeast stress responses*. Hohmann, S & mager, W (de). Chapman & Hall, New York, pp.1-5.

Mannhaupt, G., Stucka, R., Pilz, U., Schwarzlose, C. & Feldman, H. 1989. Characterization of the prephenate dehydrogenase-encoding gene, *TYR1*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **85**:303-311.

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

Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J.* **9**:2227-2235.

Meneghini, R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine* **23**:783-792.

Michaelis, A. & Feitelson, J. 1994. Reactivity of singlet oxygen toward amino acid and peptides. *Photochemistry and Photobiology* **59**:284-289.

Miozzari, G.P., Niederberger, P. & Hutter, R. 1978. Tryptophan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: control of the flux through the pathway. *J. Bacteriol.* **134**:48-59.

Murakami, K., Onoda, Y., Kimura, J. & Yoshino, M. 1997. protection by histidine against oxidative inactivation of AMP deaminase in yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**:1063-1069.

Nimmo, G.A. & Coggins, J.R. 1981. Some kinetic properties of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **199**:657-665.

Parsell, D.A., Sanchez, Y., Stitzel, J.D. & Lindquist, S. 1991. Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* **353**:270-273.

Ruis, H. & Schuller, C. 1995. Stress signaling in yeast. *BioEssays* **17**:959-965.

Sanchez, Y. & Linquist, S. 1990. *HSP104* required for induced thermotolerance. *Science* **248**:1112-1115.

Santoro, N. & Thiele, D. 1997. Oxidative stress responses in the yeast. In Yeast stress responses. Hohmann, S & mager, W (ed). Chapman & Hall, New York, pp.171-203.

Schmidheini, T., Mosch, H.U., Graf, R. & Braus, G.H. 1990. A GCN4 protein recognition element in the ARO7 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* is not used in vivo. *Mol. Gen. Genet.* **224**:57-64.

Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. & 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.

Serrano, R., Márquez, J.A. & Ríos, G. 1997. Crucial factors in salt stress tolerance. In Yeast stress responses. Hohmann, S & mager, W (ed). Chapman & Hall, New York, pp.147-164.

Spevak, W., Fessl, F., Rytka, J., Traczyk, A., Skoneczny, M. & Ruis, H. 1983. Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Mol. Cell. Biol.* **3**:1545-1551.

Stephen, D.W.E., Rivers, S.L. & Jamielson, D.J. 1995. The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptative oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **16**:415-423.

Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. & Brown, C.M. 1979. High frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* **76**:1035-1039.

Teshiba, S., Furter, R., Niederberger, P., Braus, G., Paravicini, G. & Hutter, R. 1986. Cloning of the *ARO3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation. *Mol. Gen. Genet.* **205**:353-357.

Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, Y. & Grenson, M. 1998. Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaires in transamination. *Mol. Gen. Genet.* **257**:230-237.

van Acker, S.S.B.E., Koymans, L.M.H. & Bast, A. 1991. Molecular pharmacology of vitamin : structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* **15**:311-328.

Varela, J.C.S., van Beekvelt, C. Planta, R.J. & Mager, W.H. 1992. Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Molecular Microbiology* **6**:2183-2190.

Varela, J.C.S. & Mager, W.H. 1996. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology* **142**:721-731.

Welch, G.R. & Gartner, F.H. 1980. Enzyme organization in the polyaromatic-biosynthetic pathway: the *arom* conjugate and other multienzyme systems. *Curr. Top. Cell. Regul.* **16**:113-162.

Wieser, R., Adam, G., Wagner, A. Schuller, C., Marchler, G., Ruies, H. Krawiec, Z & Bilinski, T. 1991. Heat Shock Factor-independent heat control of transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 12406-12411.

Wu, Al. & Myne-Rowlwy, W.S. 1994. *GSH1*, wich encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* **14**:5832-5839.

Yanofsky, C. 1984. comparison of regulatory and structural regions of genes of tryptophan metabolism. *Mol. biol. Evol.* **1**:143-161.

Zhoug, Y.C. & Zheng, R.L. 1991. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochemical Pharmacology* **42**:1177-1179.