

03072

1



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES**

**OBTENCION Y CARACTERIZACION
DE MUTANTES OSMO Y/O
HALOSENSIBLES DE LA LEVADURA
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

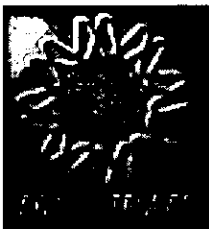
T E S I S

PRESENTADA POR

ESPERANZA BENITEZ BELLON

**PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

273392



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CUERNAVACA, MOR.

FEBRERO DEL 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la asesoría del Dr. Roberto Gaxiola Ariza y bajo la supervisión de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles.

**"Obtención y caracterización de mutantes osmo y/o halosensibles de la levadura
Saccharomyces cerevisiae"**

INDICE GENERAL	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	1
1. Abreviaturas	2
2. Introducción	3
3. Materiales y métodos	15
4. Hipotesis - Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. Resultados	22
Obtención de mutantes sensibles a estrés	22
Caracterización genética de las mutantes obtenidas	25
Características primarias de las mutantes seleccionadas	29
Caracterización mediante el estudio de acumulación intracelular de iones ..	39
Análisis de la relación epistática entre los genes	48
6. Conclusiones y Relevancia del trabajo	55
7. Referencias	60
8. Apéndice	67

Indice de Figuras

Figura 1: Cepa y concentraciones de sal usadas

Figura 2: Diagrama de la mutagénesis con etil-metano-sulfonato

Figura 3: Diagrama de la selección de células mutagenizadas con EMS

Figura 4: Obtención de “mating type”

Figura 5: Generación de diploides por las retrocruzas con la cepa parental

Figura 6: Potenciales isoosmóticos de diferentes compuestos

Figura 7: Segregación de tétradas del diploide NKd/58RS en medio mínimo SD

Figura 8: Segregación de tétradas del diploide NKd/58RS en medio mínimo SG

Figura 9 y 10: Cinética de expresión del fenotipo de sensibilidad de las mutantes NKd y IN1

Figura 11: Curvas de crecimiento de las cepas indicadas en medio rico sin estrés

Figura 12: Complementación de NKd y $\Delta hog1$ en medio SD, con y sin estrés

Figura 13: Cinética de entrada de sodio en las cepas 58RS, NKd y IN1, durante el tratamiento de 90 minutos con 0.7 M NaCl

Figura 14: Cinética de salida de sodio intracelular posterior al tratamiento

Figura 15: Cinética de entrada de sodio en las cepas indicadas durante el tratamiento

Figura 16: Cinética de entrada de litio en las cepas indicadas durante el tratamiento

Figura 17: Cinética de entrada de potasio durante el tratamiento

Figura 18: Cinética del comportamiento de potasio posterior al tratamiento

Figura 19: Cinética de la relación sodio/potasio durante el tratamiento

Figura 20: Cinética de la relación sodio/potasio posterior al tratamiento

Figura 21: Estudio de complementación entre las mutantes IN1 y $\Delta hog1$ en SD

Figura 22: Segregación de la diploide formada por IN1 y $\Delta hog1$ en diferentes medios, cada uno con la concentración señalada.

Resumen

Saccharomyces cerevisiae es un organismo eucariota con múltiples ventajas como modelo experimental. *S. cerevisiae* comparte con los procariotes la mayor parte de las ventajas técnicas que permitieron un rápido progreso de la genética molecular de éstos. Algunas de estas propiedades incluyen un rápido crecimiento, la facilidad de realizar réplicas y aislar mutantes, un sistema genético bien definido, al igual que un sistema de transformación genética muy versátil. A esto se suma el importantísimo hecho de que se conoce la secuencia completa de su genoma y que ésta se encuentra disponible.

La respuesta al estrés es un mecanismo multigénico y por lo tanto, complejo. Estos mecanismos que involucran la percepción y la vía de transducción de señales, llevan a la modificación de proteínas ya existentes y la inducción o represión transcripcional de un juego de genes que darán respuesta al estrés impuesto.

En este trabajo decidimos abordar el análisis de la respuesta al estrés salino mediante el aislamiento de mutantes generadas por el agente mutagénico etil-metano-sulfonato (EMS), y su posterior caracterización con la finalidad de entender mejor la complicada respuesta de las células eucariotas al estrés producido por la sal. Puesto que el efecto deletéreo de la sal en las células se caracteriza por dos componentes: el estrés osmótico y la toxicidad iónica, las mutantes obtenidas fueron caracterizadas utilizando tratamientos con diferentes sales (que pueden producir uno o los dos tipos de estrés), en medios con diferentes fuentes de carbono (que regulan diferentes vías metabólicas), lo cual nos permitió determinar de una manera más específica la sensibilidad a sal que cada una de las mutantes presentó.

Abreviaturas

- . EMS: etil metano sulfonato
- . PKA: proteína cinasa A
- . DNA: ácido desoxirribonucleico
- . RNA: ácido ribonucleico
- . PAP: 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato
- . ATPasa: adenosin trifosfatasa
- . GPD: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
- . HOG: High Osmolarity Glycerol
- . MAP: mitogen-activated-protein
- . AMPc: adenosin monofosfato cíclico
- . YPD: medio rico con glucosa
- . SD: medio mínimo con glucosa
- . SG: medio mínimo con galactosa
- . ade: adenina
- . ura: uracilo
- . leu: leucina
- . his: histidina
- . trp: triptofano
- . HO: endonucleasa HO
- . h: horas
- . min: minutos
- . seg: segundos
- . D.O.: densidad óptica
- . dw: peso seco

Introducción

Todos los organismos presentan un modo de adaptación a las constantes fluctuaciones del medio ambiente en el que viven. Se define como estrés a aquel factor externo que ejerce una influencia o efecto desventajoso sobre la viabilidad o crecimiento de un sistema determinado. La respuesta al estrés es un mecanismo multigénico y por lo tanto, complejo. Estos mecanismos que involucran la percepción y la vía de transducción de señales, llevan a la modificación de proteínas ya existentes y la inducción o represión transcripcional de un juego de genes que darán respuesta al estrés impuesto.

Entre los factores que limitan la productividad de los cultivos, la salinidad es uno de los más importantes. Alrededor del 15% de las tierras áridas y semiáridas presentan problemas de salinidad, situación que se ve agravada por el hecho de que las plantas en ellas cultivadas deben enfrentar además condiciones de extrema sequía. El problema de la salinidad se presenta de igual modo en gran parte de las tierras de cultivo irrigadas pues, disueltas en el agua de riego se encuentran sales que permanecen en el suelo al evaporarse o filtrarse el agua.

El efecto deletéreo de la sal en las células se manifiesta de dos formas: el estrés osmótico y la toxicidad iónica. El componente osmótico no es específico de la sal, sino que resulta de la deshidratación y pérdida de turgor inducida por la concentración de solutos externos; en el caso de la sal sería entonces la concentración de sal (Serrano, 1996). Existen datos que apuntan a que en la halotolerancia el control de la relación Na^+/K^+ es de suma importancia (Gaxiola *et al.*, 1992).

Los organismos que viven o se encuentran temporalmente en estos ambientes necesitan adaptarse, ya que el agua sale de la célula, y para contrarrestar este hecho necesitan aumentar el potencial osmótico interno. Este proceso se puede llevar a cabo por la síntesis intracelular de osmolitos o por la incorporación de solutos osmóticamente activos y no tóxicos al metabolismo celular (Delauney *et al.*, 1993). Ejemplos de estos compuestos se encuentran en todos los organismos vivos y los que preferencialmente se acumulan en condiciones de estrés se clasifican en cuatro grupos: polioles y azúcares; aminoácidos; ureas y metilaminas; y por último, iones orgánicos (Yancey *et al.*, 1982).

Sin embargo, en la naturaleza existen también organismos que crecen perfectamente en ambientes altamente salinos (halófitos) lo que sugiere que éstos poseen mecanismos para contrarrestar la toxicidad iónica. Los organismos glicófitos, poco resistentes a sal, pueden poseer cierta tolerancia aunque los mecanismos moleculares de este comportamiento solo recientemente comienzan a ser entendidos. En base a la información acumulada hasta ahora, se ha propuesto que para mejorar la halotolerancia, se debe enfocar los esfuerzos a los siguientes aspectos: 1) la síntesis de osmolitos, 2) los sistemas de transporte de iones, 3) las funciones más sensibles a la deshidratación y a las altas concentraciones de sal (Serrano, 1996).

Un modelo experimental alternativo que ha ayudado al aislamiento de genes implicados en la tolerancia a estrés salino de plantas es la levadura *S. cerevisiae*. Este organismo ha tenido que desarrollar estrategias adaptativas de regulación osmótica que le permitan vivir en condiciones ambientales cambiantes. La levadura comparte con las plantas algunas características morfológicas que son relevantes para el estudio de los mecanismos de osmorregulación, como son el tener pared celular, vacuola y el ser sésiles.

La levadura, *S. cerevisiae*, está considerada como uno de los modelos eucariotes útiles para realizar estudios biológicos. Dada la complejidad de la respuesta adaptativa a estrés abiótico, este microorganismo ha servido como un buen modelo para abordar las bases moleculares de diferentes aspectos de esta respuesta. *S. cerevisiae* comparte con los procariotes la mayor parte de las ventajas técnicas que permitieron un rápido progreso de la genética molecular de éstos. Algunas de estas propiedades incluyen un rápido crecimiento, la facilidad de realizar réplicas y aislar mutantes, un sistema genético bien definido, al igual que un sistema de transformación de DNA muy versátil. A esto se suma el importantísimo hecho de que se conoce la secuencia completa de su genoma. *S. cerevisiae* presenta estados haploides y diploides estables y existe una gran variedad de marcadores genéticos que hacen más fácil su utilización para el trabajo experimental. Gracias a los mecanismos de recombinación homóloga, acoplados a altos niveles de conversión génica, se han desarrollado técnicas para el reemplazamiento directo de secuencias de DNA normales por otras alteradas *in vitro*.

La adaptación de la levadura a situaciones de estrés, es el resultado de una respuesta compleja constituida por cambios a nivel transcripcional, post-transcripcional, a nivel de acumulación de determinadas proteínas y post-traduccionales, así como a cambios en el transporte y consecuente descompartimentalización de diferentes iones y/u osmolitos, etc. En resumen, algunas de las respuestas más importantes pueden dividirse en grupos según los diferentes niveles en los que se expresan:

A nivel fisiológico: Cambios en la cinética de crecimiento, compartimentalización de iones, engrosamiento en la pared celular, aumento en el tamaño de la vacuola.

A nivel bioquímico: Regulación del transporte de iones, cambios en la actividad metabólica

de enzimas, protección de enzimas, cascadas de transducción de señales.
A nivel genético: Activación y/o inhibición de la transcripción de genes.

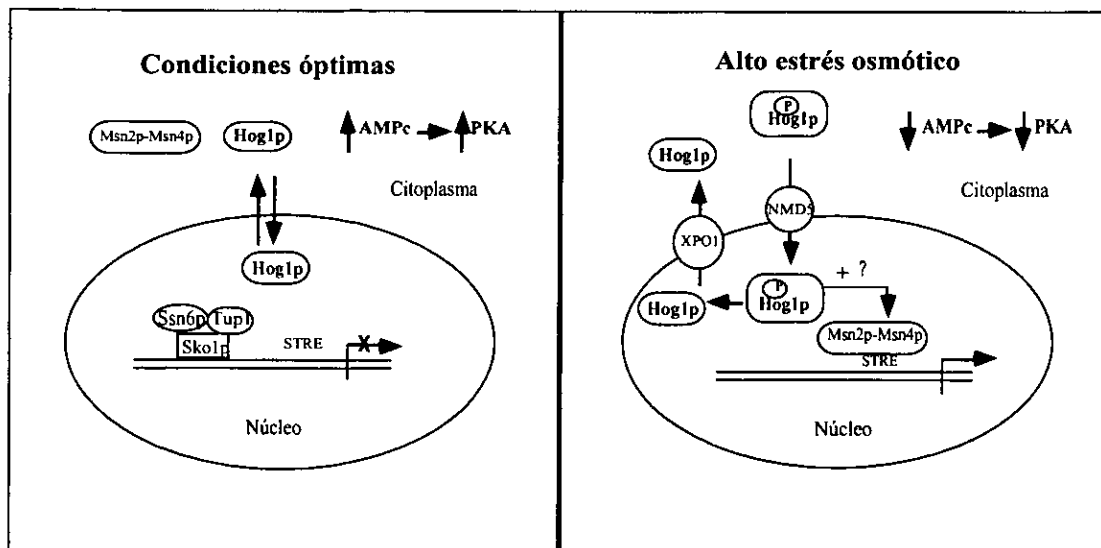
El estudio de genes relacionados con la respuesta al estrés producido por sal se ha llevado a cabo de muy diversas formas. Por interrupciones de genes y caracterización fenotípica de las mutantes, se llegó a determinar la importancia de muchos genes que dan respuesta. Gracias al estudio de fenotipos de mutantes que revelaron vías de regulación relevantes, se llegó a la consecuente caracterización de éstas y al mejor entendimiento de la respuesta. Otra forma alternativa, es la de identificar genes relevantes para la tolerancia a estrés mediante la sobreexpresión de los mismos.

Es difícil determinar cual es la primera respuesta que da una célula ante una circunstancia de estrés. Una de las primeras respuestas es la activación de diversas vías de señalización, las cuales provocan la inducción y/o represión de un gran número de genes, entre los cuales no sólo se encuentran aquellos asociados directamente al estrés, sino también genes relacionados con la modulación del metabolismo general del organismo. Es a través de esta respuesta múltiple como se podría contrarrestar un posible efecto deletéreo. Se ha observado que durante la respuesta a estrés osmótico/salino, la levadura sufre cambios en su metabolismo de tal forma que aún cuando se encuentren una fase logarítmica de crecimiento en la cual se utiliza su habitual fuente de carbono (glucosa) por la vía de fermentación, ahora inicia un proceso de respiración semejante al que utiliza este organismo en sus fases lentas de crecimiento, como la post-díauxica y la estacionaria. En éstas, los niveles de AMPc disminuyen.

Uno de los ejemplos más característicos en el que se ve involucrada la vía metabólica

es la vía de transducción de señales dada por la proteína cinasa A (PKA), cuya actividad está modulada por AMPc (Marchler *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1998; Varela and Mager, 1996). La cinasa PKA está compuesta por tres subunidades catalíticas, codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* y por una subunidad reguladora (que inhibe la actividad) codificada por el gen *BCY1* (Marchler *et al.*, 1993). Las subunidades catalíticas ejercen una fuerte retroinhibición en la síntesis de AMPc por una vía que hasta el momento no está clara. Un fenotipo pleiotrópico está asociado a cepas de levadura en las que se presentan niveles muy altos o muy bajos de la vía de PKA (Thevelein, 1994). Niveles bajos de AMPc reflejan unos niveles bajos en la actividad de PKA, que en conjunto correlacionan con un aumento en la tolerancia a estrés. La actividad de la proteína cinasa A dependiente de AMPc es esencial para el crecimiento de las células y es uno de los factores mejor estudiados en la denominada represión catabólica. La actividad alta de PKA reprime la inducción de los genes de respuesta a estrés así como la acumulación de reservas de glucógeno (Smith *et al.*, 1998; Varela and Mager, 1996). Las células deficientes en su actividad quedan arrestadas en G1, acumulan reservas de carbohidratos (trehalosa y glucogeno) y se vuelven resistentes a determinados tipos de estrés. La desrepresión transcripcional de muchos genes debida a la ausencia de actividad de PKA se sabe que al menos es dependiente de la presencia de dos activadores transcripcionales, Msn2p y Msn4p (Smith *et al.*, 1998). La vía de transducción de HOG (ver pág. 9) regula también la activación de los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p que se acumulan en el núcleo bajo condiciones de estrés osmótico o bajo la presencia de compuestos como el etanol o el sorbato. Se ha demostrado que estos factores transcripcionales se unen al elemento de respuesta en *cis*, denominado STRE, produciendo la activación de muchos genes que poseen esa secuencia en sus promotores. La localización nuclear de estos factores dada por el estrés está correlacionada inversamente con con los niveles de

AMPc y con la actividad de PKA. En la siguiente figura, se pueden apreciar parte de los cambios que se presenta a nivel intracelular cuando el ambiente produce un alto estrés osmótico.

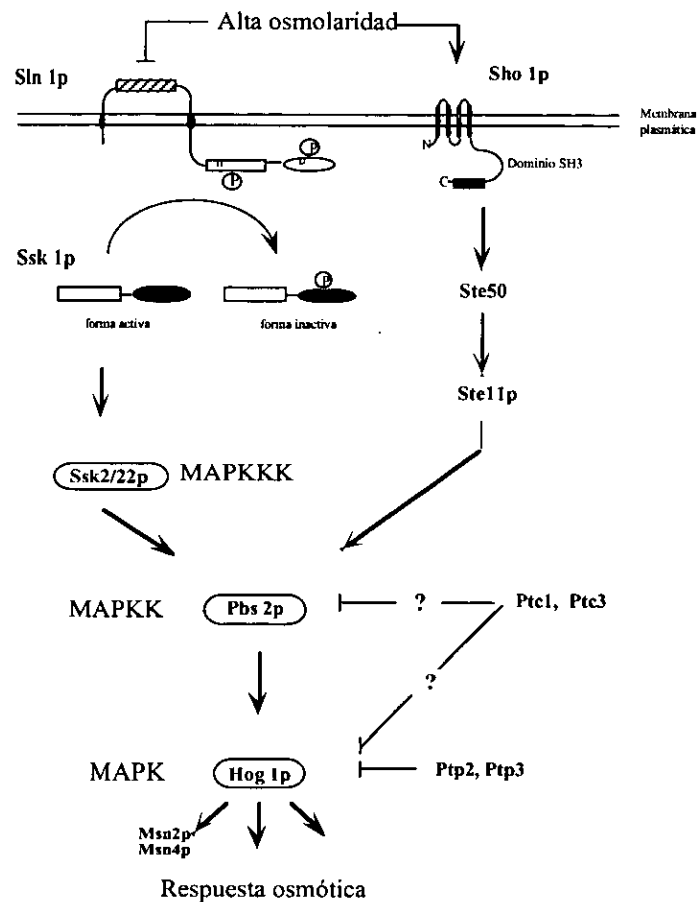


Modelo de una célula crecida en medio óptimo y en condiciones de estrés osmótico

Entre las respuestas adaptativas rápidas de la levadura ante un estrés hiperosmótico, se encuentra la síntesis de glicerol, el osmolito compatible de este organismo, así como la disminución en el transporte de salida de éste (Blomberg, 1997; Blomberg and Adler, 1989; Larsson *et al.*, 1993; Varela and Mager, 1996). En *Saccharomyces cerevisiae* existen 3 copias del gen que codifica para la enzima responsable de la síntesis de glicerol, GPD1, GPD2 y GPD3. El transcrito de *GPD1*, glicerol-3-fosfato dehidrogenasa, se induce en condiciones de estrés hiperosmótico (Albertyn *et al.*, 1994; Rep *et al.*, 1999a). Otra de las isoformas de dicho gen, *GPD2*, no se induce en esas condiciones de estrés. La interrupción del gen *GPD1*, y no de *GPD2*, produce fenotipo de osmosensibilidad; también la doble interrupción de los genes da lugar a una levadura altamente osmosensible (Ansell *et al.*, 1997). Se han descrito dos transportadores de glicerol, uno funciona por

difusión facilitada y otro por difusión activa (Sutherland *et al.*, 1997). La regulación osmótica para la formación del glicerol, se puede concluir que es el resultado de la interpolación de diversas vías de señales, algunas de las cuales todavía no están identificadas (Rep *et al.*, 1999b).

La caracterización de mutantes incapaces de sintetizar glicerol y cuyo fenotipo es de osmosensibilidad ante una situación de estrés osmótico, llevó a la identificación de la vía de transducción de señales denominada HOG (por High Osmolarity Glycerol) (ver figura mas adelante) (Brewster *et al.*, 1993). Esta vía regula la expresión de muchos genes que dan respuesta a situaciones de estrés (un ejemplo de ellos es *GPD1*) y de ese modo se induce la síntesis y posterior acumulación de glicerol. La respuesta se lleva a cabo por un sistema de dos componentes (Maeda *et al.*, 1994). Tres MAP cinasas se van fosforilando consecutivamente hasta llegar a la última MAP cinasa Hog1p que fosforila factores de transcripción y otras proteínas que directamente permiten la respuesta al estrés (Posas and Saito, 1997; Posas *et al.*, 1996). La MAP cinasa que fosforila en un residuo de tirosina a Hog1p está codificada por el gen *PBS2* (Schuller *et al.*, 1994). Por estudios de mutaciones en los genes que integran esta vía de transducción se observó que la respuesta debía involucrar al menos a otro osmosensor diferente del primero encontrado (*SLN1-SSK1*). Este segundo osmosensor putativo, que es transmembranal, se denominó Sho1p (Maeda *et al.*, 1995). Está demostrado que las respuestas determinadas por los dos osmosensores no siempre convergen y hay especificidad y no cruce en cada una de las vías. Los dos osmosensores juntarían sus respuestas en la cinasa *PBS2* que actuaría como reclutadora de ambas vías (Posas and Saito, 1997; Posas *et al.*, 1996). Un sistema de diferentes fosfatasas (*PTP2*, *PTP3*, *PTC1* y *PTC3*) son las que regulan negativamente los últimos pasos de la vía de respuesta (Maeda *et al.*, 1994).



Via de transducción de señales de HOG.

Se ha demostrado que esta respuesta es muy rápida (un minuto de estrés moderado (0.3 M NaCl)) (Brewster *et al.*, 1993; Posas *et al.*, 1996). Por estudios más recientes se demostró que *HOG1* tiene que estar fosforilada para estar activa y ese último evento tiene que realizarse dentro del núcleo (Ferrigno *et al.*, 1998). Esta vía regula la activación de los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p que son los responsables de la activación de muchos genes de respuesta a estrés (Boy *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1996; Schmitt and McEntee, 1996).

La selección de fenotipos de respuesta a estrés, dada por el método antes mencionado de la sobreexpresión de genes, llevó a la identificación de diversos genes de los cuales se caracterizó la relevancia en la respuesta estudiada. Utilizando un banco de sobreexpresión de genes y aislando aquellas levaduras que presentaron un fenotipo de halotolerancia, se llegó al aislamiento de los genes HAL. *HAL1* fue el primer gen de origen eucariote, aislado de levadura, capaz de conferir halotolerancia, (Gaxiola *et al.*, 1992). La caracterización de *HAL1* reveló que la transcripción de este gen se incrementa por altas concentraciones de NaCl, KCl o sorbitol. La interrupción del gen disminuye la tolerancia a sal de las células y su sobreexpresión da lugar a un aumento en la concentración intracelular de potasio (Gaxiola *et al.*, 1992; Rios *et al.*, 1997). Este gen está conservado en plantas superiores y por estudios de su regulación se observó que se induce por estrés osmótico al igual que por tratamientos con la fitohormona ácido abscísico (ABA).

El gen *HAL2*, idéntico a *MET22* también de levadura (Murguía *et al.*, 1995; Murguía *et al.*, 1996), es un gen involucrado en la vía de síntesis de metionina y su sobreexpresión confiere halotolerancia bajo condiciones de estrés con NaCl y LiCl. *HAL2* codifica para una fosfatasa sensible a sodio y a litio que hidroliza 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (PAP). En este caso, la toxicidad a sal en la levadura está dada por la pérdida de actividad de Hal2p y por la consecuente acumulación de PAP, lo que provoca la inhibición de la asimilación de sulfatos y el procesamiento de RNA. El suplemento con metionina o el incremento de la dosis génica de *HAL2* da lugar a dicha resistencia (Gil *et al.*, 1999; Glaser *et al.*, 1993).

El gen *HAL3* codifica para una proteína reguladora de función desconocida. Este gen está expresado constitutivamente y no se induce por estrés salino. La sobreexpresión

de *HAL3* (Ferrando *et al.*, 1995) permite el crecimiento de la cepa silvestre de levadura expuesta a concentraciones tóxicas de sodio y de litio. Las mutantes con deficiencia en la actividad de *HAL3* son sensibles a sal. Se comprobó que regula de manera inhibitoria la actividad fosfatasa de Ppz1p, que a su vez regula negativamente la actividad de la ATPasa codificada por el gen *ENAI*. Este mismo grupo determinó que la halosensibilidad que presentan las mutantes en la fosfatasa calcineurina se suprime con la sobreexpresión del gen *HAL3*. La calcineurina, al igual que Hal3p y Ppz1p, se requiere para una adecuada expresión, tanto en condiciones de estrés como normales, del gen *ENAI*. Las mutantes en los dos genes (calcineurina o hal3) son especialmente defectuosas en la inducción de la ATPasa (*ENAI*) a altas concentraciones de sal (de *et al.*, 1998; Ferrando *et al.*, 1995).

Utilizando como método de selección la interrupción o delección de genes, se llegó a determinar la importancia de éstos en la respuesta al estrés. La calcineurina es importante en la regulación de la relación Na^+/K^+ en la levadura. La calcineurina es de las fosfatasas del tipo PP2B, que requiere para su actividad del ion Ca^{2+} y de calmodulina. Es necesaria para la tolerancia a NaCl y a LiCl en levadura y las interrupciones de alguno de los genes de las subunidades catalíticas de la enzima (*CNA1* y *CNA2*), así como del gen de la subunidad reguladora (*CNBI*), provocan la pérdida de la actividad de la enzima, así como un nivel anormalmente elevado de Li^+ . Este fenotipo de sensibilidad a sal es el resultado de una expresión reducida del gen *ENAI* (Mendoza *et al.*, 1996; Mendoza *et al.*, 1994). Es posible que tales mutantes presenten sensibilidad a sal porque el contenido intracelular de potasio baja y el de sodio o litio sube. Por los datos anteriores se ha sugerido que la calcineurina podría coordinar la expresión de los genes y la actividad de los diferentes transportadores para facilitar la homeostasis de los iones en la célula (Varela and Mager, 1996).

La capacidad de expulsar la sal es una propiedad adquirida por las células desde tiempos ancestrales para sobrevivir, ya que existía una necesidad de controlar la osmolaridad celular. Las membranas plasmáticas y endoplasmáticas presentes en células eucariotas contienen diversos tipos de bombas y transportadores. Las ATPasas tipo P (la nomenclatura deriva de que existe un intermediario fosforilado en la reacción) están involucradas en el transporte de protones, de sodio, de potasio y de calcio. El primer sistema de salida de sodio identificado en eucariotas no animales fue la ATPasa codificada por el gen *ENAI/PMR2* (Haro *et al.*, 1991; Márquez and Serrano, 1996; Rudolph *et al.*, 1989). Análisis genéticos han establecido que dicho gen representa el sistema más importante de expulsión de sodio de *S. cerevisiae*. El sistema que determina los niveles intracelulares de potasio también afecta indirectamente la tolerancia a sal. Un parámetro relevante en la toxicidad a sal puede estar dado, como mencionamos anteriormente, por la relación Na^+/K^+ . El gen *NHA1*, en la misma *S. cerevisiae*, codifica para un antiportador que permite la salida de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática en condiciones de un pH ácido. En otros organismos cercanos evolutivamente a éste como en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, se identificó un sistema de salida de iones diferente, un putativo antiportador Na^+/H^+ codificado por el gen *sod2* (Jia *et al.*, 1992; Banuelos *et al.*, 1998). La expresión de *sod2*, gen de *S. pombe*, complementó la deficiencia de la ATPasa *ENAI* en *S. cerevisiae* (Hahnenberger *et al.*, 1996). Estos datos nos indican que tanto *ENAI*, *NHA1* como *sod2* codifican para sistemas de transporte de sodio y no son los sistemas reguladores de la salida del ion (Banuelos *et al.*, 1995). La acción de cada sistema de transporte se puede complementar con otros sistemas existentes. De este modo se puede mantener un estado de equilibrio intracelular de Na^+ y K^+ .

La expresión del gen *ENAI/PMR2* es regulada por HOG en respuesta a condiciones de bajo estrés osmótico. Además, *ENAI* está específicamente inducido por altas concentraciones de sodio a través de regulación post-traducciona por calmodulina, vía un mecanismo independiente de calcineurina (Wieland *et al.*, 1995). Este gen responde de igual modo a otro tipo de regulación, la represión por glucosa (Alepuz *et al.*, 1997). Esta represión transcripcional se ejerce de manera independiente a la vía de calmodulina. En la levadura *S. cerevisiae*, un complejo co-represor general, *SSN6(CYC8)-TUP1*, se demostró que inhibe la transcripción de diversos genes regulando su expresión cuando ésta no es requerida. La función represora se lleva a cabo por un dominio específico de Tup1 que requiere componentes de la holoenzima RNA polimerasa II (Conlan *et al.*, 1999). Se han presentado evidencias de que en los genes que reprimen su transcripción por glucosa, la represión se lleva a cabo por el complejo *SSN6-TUP1* y que se da a través de la proteína activadora/represora Mig1p (Treitel and Carlson, 1995). Otro de los aspectos importantes de la regulación de la proteína Ena1p es que se encuentra directamente activada por la calcineurina y regulada de forma negativa por proteínas fosfatasas codificadas por PPZ (Balcells *et al.*, 1997; Posas *et al.*, 1995). Tras lo expuesto anteriormente podemos encontrar una conexión entre las concentraciones intracelulares de calcio y de sodio que nos reflejan la complejidad de las señales en estas condiciones. En un artículo reciente, en el que se estudió la regulación del gen *ENAI(PMR2)*, se identificó una proteína de unión a DNA que incorpora al complejo (*SSN6-TUP1*) para su mecanismo de represión y que esta unión era dependiente de la vía de transducción de señales de HOG (Márquez *et al.*, 1998; Proft and Serrano, 1999). Al factor represor se le denominó Sko1p.

Materiales y métodos

Cepas de levadura, medios y condiciones de crecimiento.

Las cepas de *S. cerevisiae* usadas en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla 1. Las células fueron rutinariamente crecidas en medio mínimo SD (2% glucosa, 0.7% Yeast Nitrogen Base sin amino ácidos (Difco) y 0.05M MES (Sigma) pH 6.0) suplementado con adenina (3mg/ml), uracilo (3mg/ml), histidina (3mg/ml) y leucina (10mg/ml) a 25°C, a menos que esté indicado. El medio sólido contiene 2% agar (Difco). Para todos los experimentos de choque osmótico, las células fueron crecidas en medio mínimo SD o SG hasta fase logarítmica media (D.O. 660nm 0.5) y las siembras se realizaron por goteos con 3 µl del cultivo. (para la descripción de los medios, ver apéndice)

Tabla 1. Cepas de levadura usadas en este trabajo

Cepas	Genotipo	Referencias
58RS	MATa <i>ura3, leu2, his4, adel</i>	Gaxiola <i>et al.</i> , 1992
NK-d	MATa <i>ura3, leu2, his4, adel, hog1</i>	este trabajo
IN1	MATa <i>ura3, leu2, his4, adel, ena1</i>	este trabajo
W3031A	MATa <i>ura3, leu2, his3, trp1, ade2, can1</i>	donación
Δpmr2	W3031A <i>pmr2:: HIS3</i>	donación
<i>hal3</i>	W3031A <i>hal3-1:: LEU2</i>	donación
<i>cnb1</i>	W3031A <i>cnb1::LEU2</i>	donación
Δ <i>hog1</i>	W303 <i>hog 1::URA3</i>	donación

Mutagénesis con etil-metano-sulfonato (EMS)

1- Inocular 10 ml de medio rico (YPD) con una cepa de levadura hasta la obtención

de una concentración de $\approx 1 \times 10^6$ cel/ml. Incubar toda la noche a 30 °C con agitación. Alcanzando la concentración de 2×10^8 cel/ml.

2- Como control tomar 2.5 ml de un cultivo crecido toda la noche y, lavar dos veces con 50 mM de tampón fosfato de potasio a pH 7.0. Finalmente, resuspender en un tubo con 10 ml de ese tampón. La concentración celular debe ser de 5×10^7 cel/ml.

3- Añadir 300 μ l de EMS a los 10 ml de cultivo celular (al control le añado el mismo volumen de agua) y agitar vigorosamente en vortex. Incubar 30 min a 30 °C.

4- Parar la mutagénesis se agregó un volumen igual al que teníamos de una solución fresca 10% (w/v) filtrada de tiosulfato de sodio, mezclar bien. Centrifugar 10 min a 4,500 g para recoger las células y lavarlas dos veces con agua estéril.

5- Resuspender las células y el control en 40 ml de YPD.

6- Alicuotar en tubos de 5 ml (1 ml/tubo)

El control solo en un tubo.

7- Tomar 10 μ l llevarlo hasta 10 ml con agua y sembrar cada caja con 100 μ l. Hacer duplicado.

8- Poner a crecer los tubos en 30 °C y agitación hasta fase estacionaria.

Medida de potencial osmótico (Dew Point Microvoltímetro)

Método de Punto de Rocio

La unión entre los dos cables de diferentes metales que forman la termocopla, se enfría por el paso de una corriente eléctrica dada, (parámetro determinado de fábrica para cada termocopla según los metales y el diámetro del microambiente que rodea la termocopla), de manera que la temperatura de la unión es mas baja que la del microambiente y el agua que había llegado a la saturación se condensa en la unión. Una vez que la corriente de enfriamiento cesa, el agua condensada se evapora liberando calor de

vaporización que, a la vez, calienta la unión hasta llegar a la temperatura de punto de rocío (el punto en el que se forma la primera gota de agua), manteniéndose constante durante la medición (gracias a la corriente suministrada por el microvoltímetro). La diferencia de temperaturas, antes del enfriamiento y después de la evaporación, está relacionada con la medición del potencial hídrico.

- 1- Ajustar el aparator en μV .
- 2- Realizar la medición.

Glucuronidasa (tratamiento para micromanipular)

- 1-Poner 300 μl de agua.
- 2- Añadir asada de lo que está esporulando y agitar por vortex.
- 3- Añadir 3 μl de glucuronidasa disuelta en agua a 1/10 del volumen e incubar de 2 a 6 min. a temperatura ambiente.
- 4- Tomar $\approx 40 \mu\text{l}$ para dejar caer una gota en una caja de Petri inclinada y marcada para micromanipular.

Gliceroles

50 % del cultivo en YPD y 50 % de glicerol 30%

Método de transformación de levaduras (Fink)

- 1- Crecer en YPD un cultivo durante toda la noche.
- 2- Inocular 10 ml de YPD con 200 μl del O.N. Incubar por 6 h.
- 3- Centrifugar y resuspender en LiAcTE 1X. Dos veces.
- 4- Decantar y resuspender las células del tubo en el volumen que queda.
- 5- Agregar 10 μl de "carrier" (2-10 mg/ml)

- 6- Agregar el DNA de interés (5 µg). Vortex.
- 7- Agregar 1 ml de 50% PEG3350 en LiAcTE. Vortex.
- 8- Incubar en tambor a 30 °C por 30 min.
- 9- Dar un choque a 42 °C por 20 min.
- 10- Agregar 5 ml de YPD resuspendiendo las células.
- 11- Dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente.
- 12- Centrifugar, decantar y resuspender en líquido residual para platear.

10X LiAcTE: 1 M Acetato de litio.

0.1 M Tris HCl pH 8.0

10 mM EDTA pH 8.0

PEG-LiAcTE: 9 vol de 50% PEG-3350 y 1 vol de LiAcTE 10X

Método de transformación de levaduras (PLATE)

- 1- Tomar 0.5 ml de cultivo, centrifugarlo y decantar
- 2- Agregar 10 µl de "carrier" DNA (100 µg) + 1 µg DNA transformante.
Agitar con vortex.

- 3- Agregar 0.5 ml de PEG/Li-acetato/TE = PLATE

Mezclar con vortex:

90 ml 45% PEG 3350 estéril (Sigma)

10 ml 1 M acetato de litio

1 ml 1 M Tris- HCl pH 7.5

0.2 ml 0.5 M EDTA

- 4- Incubar toda la noche a temperatura ambiente.
- 5- a) Sembrar ≈ 50 µl del fondo del tubo en medio selectivo.

- b) o bien: Lavar con Sorbitol-EDTA y sembrar de dicha solución en medio selectivo.

Concentración intracelular de iones

Los cálculos de concentraciones internas se hacen teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

mM = micromol de Na / ml de agua interna

0.8 D.O. = 0.5 mg dw/ml (miligramos de peso seco por mililitro)

0.3 mg dw = 0.6 μ l agua interna

protocolo:

1-Inocular un matraz con 50 ml de YPD. Dejar crecer hasta llegar a una D.O. de fase logarítmica media \approx 0.5.

2- Tomar 10 ml en tubo de centrifugación y centrifugar 3 min a 3500 rpm.

3- Lavar con 20 ml de agua. Centrifugar 3 min a 3500 rpm.

4- Decantar, pasar a microtubo y centrifugar por 30 seg.

5- Quitar sobrenadante con pipeta y agregar 500 μ l de agua. Mezclar por vortex y guardar en frío.

.....

2'- Después de tomar los 10 ml del principio, añadir al resto del matraz una concentración de sal (ejem. 1M NaCl).

3'- A los 30 min tomar 10 ml y centrifugar 3 min a 3500 rpm.

4'- Lavar con 20 ml de la solución 1.5 M Manitol + 50 mM MgCl₂.

5'- Resuspender en el volumen restante después de tirar el sobrenadante. Seguir los mismos pasos 4 y 5.

.....

- 6- Aforar todos los microtubos a 1 ml.
- 7- Leer D.O.
- 8- Agujerear las tapas de los tubos con una aguja caliente.
- 9- Hervir al baño maria durante 10 min.
- 10- Centrifugar 5 min y tomar del sobrenadante para leer en el flamómetro.

Flamómetro (IL943, Allied IL, Lexington, MA)

Una mezcla de aire, gas propano y una alícuota de la muestra a medir se conduce a una flama. Al quemarse, la luz emitida posee una longitud de onda característica del contenido de sodio, litio o potasio en la solución. La emisión de luz se detecta por unos fotodiodos y la señal es electrónicamente amplificada y registrada en la computadora.

- 1- Inocular medio rico (YPD) con una cepa de levadura para obtener una D.O. que corresponda a la fase logarítmica media, o sea 0.4-0.6. Incubar a 30 °C con agitación.
- 2- Tomar muestras a los tiempos de 0 min= sin añadir la sal, 15 ó 30 min =con la concentración de sal deseada para dar el choque, a 60 ó 90 min y /o a 120 min. Centrifugar 3 min a 3000 rpm. Lavar con una solución isoosmótica de sorbitol con 100 mM MgCl₂ y resuspender después de decantar. Pasar a microtubo, centrifugar 30 seg y añadir un volumen igual a todos los microtubos.
- 3- Medir la D.O. de cada uno de los microtubos
- 4- Hervir 10 min y centrifugar inmediatamente para bajar de nuevo las células.
- 5- Tomar 500 µl del sobrenadante para medir en el flamómetro
- 6- Para la medida de cada uno de los iones, se necesitan diferentes soluciones "standard" y controles que nos indiquen el "cero".

Hipótesis

Las cepas mutantes de levadura que presentan fenotipos de sensibilidad a estrés salino u osmótico se encuentran afectadas en genes que codifican para proteínas involucradas en la respuesta adaptativa al estrés.

Objetivo general

Identificación, aislamiento y caracterización parcial de mutantes osmosensibles y halosensibles de *Saccharomyces cerevisiae*.

Objetivos particulares:

1. Obtención de mutantes mediante el uso del agente mutagénico EMS.
2. Clasificación de las mutantes de acuerdo a los siguientes criterios:
 - a) Ausencia de crecimiento en sales que producen estrés iónico y crecimiento normal bajo condiciones de estrés osmótico.
 - b) Crecimiento normal en altas concentraciones de sales (estrés iónico) y ausencia de crecimiento en otras condiciones de estrés osmótico.
 - c) Mutantes que sean a la vez osmo y halosensibles.
3. Análisis genético de las mutantes escogidas
4. Determinación de las concentraciones intracelulares de iones en las mutantes seleccionada.

Resultados

Obtención de mutantes sensibles a estrés.

La cepa 58RS (MATa *ura3, leu2, his4, ade1*) de *Saccharomyces cerevisiae* fue la utilizada en este trabajo para la obtención de mutantes sensibles a estrés. La caracterización de las mutantes de levadura obtenidas mediante la mutagénesis con EMS (ver materiales y métodos) se llevó a cabo en galactosa o glucosa como fuente de carbono para identificar diferencias existentes dependientes de la fuente de carbono. La sensibilidad a sal se probó tanto con NaCl (que produce estrés osmótico e iónico) como con KCl (únicamente produce estrés osmótico) a las concentraciones indicadas en la Figura 1.

Se clasificaron las mutantes en varios grupos, siguiendo los siguientes criterios: Un grupo incluyó a aquéllas incapaces de crecer en sodio y que mantenían un crecimiento normal, bajo condiciones de estrés osmótico. Otro grupo incluyó a las que tenían un crecimiento normal en condiciones de estrés osmótico y no crecían en concentraciones de estrés iónico. Por último, agrupamos a las mutantes que eran a la vez osmo y halosensibles.

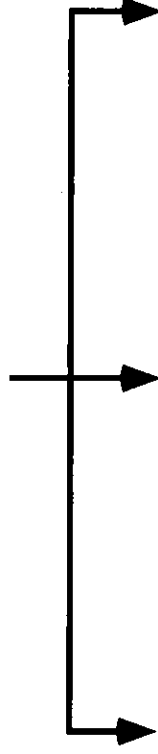
En el diagrama de la Figura 1 se muestra la cepa de levadura que se utilizó como cepa parental, así como las concentraciones de cada una de las sales que establecimos como adecuadas para el análisis del fenotipo de las mutantes obtenidas.

En el diagrama de la Figura 2, se muestra el protocolo seguido para la obtención de mutantes. Se esperaba dado el tipo de agente mutagénico, que en cada una de las células seleccionadas se presentase una única mutación puntual. Para la selección posterior y la amplificación de las mutaciones existentes, se repartió el cultivo en 40 tubos y de ese

CEPA 58-RS (*ade1*, *ura3*, *leu 2*, *his 4*)



Obtención de mutantes



Sensibles a NaCl

Sensibles a KCl

Sensibles a ambos

0.3 M, 0.5 M y/o 0.75 M

0.3 M, 0.5 M y/o 0.75 M

Figura 1 : Cepa y concentraciones de sal utilizadas

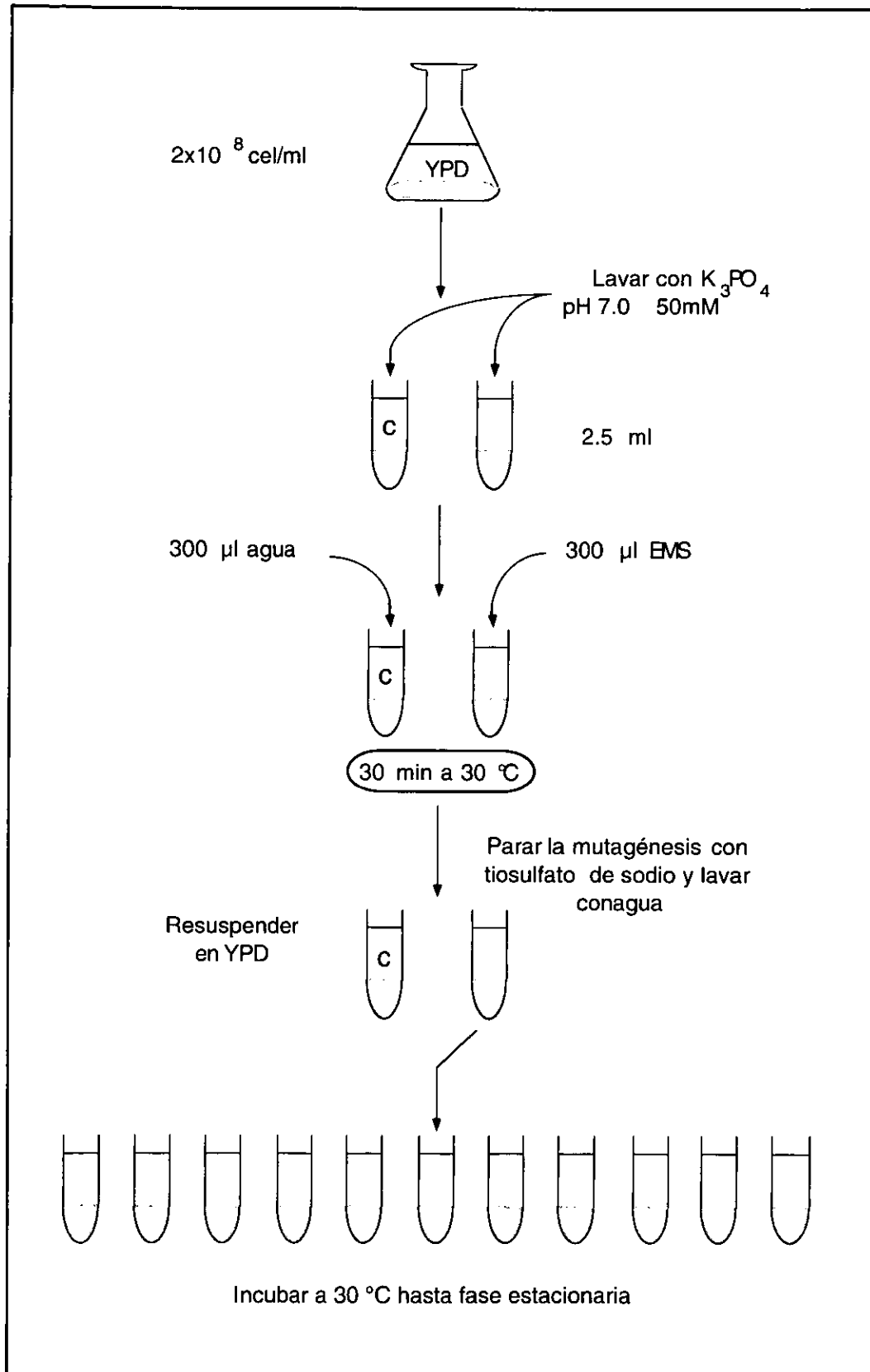


Figura 2: Diagrama de la mutagénesis con etil-metano-sulfonato

modo se amplificaron pequeñas cantidades de cultivo que enriquecían dichas mutaciones.

El fenotipo de sensibilidad se analizó en medios con galactosa como fuente de carbono y, por réplica con terciopelo, se obtuvieron células que crecían bien en dicha fuente de carbono y eran sensibles a diferentes concentraciones de sal (Figura 3). El segundo tamizado se realizó tras el aislamiento de colonias de las ya seleccionadas.

Caracterización genética de las mutantes obtenidas.

Se llevó a cabo la caracterización genética de las mutantes sensibles a NaCl mediante cruces con la cepa silvestre parental. Se obtuvo el otro "mating type" de la cepa parental y para ello se utilizó la transformación con el plásmido que lleva el gen de la endonucleasa HO que produce autodiploidía (Figura 4). La selección de los diploides curados del plásmido HO se llevó a cabo mediante una réplica a medio mínimo sin uracilo. Las células obtenidas se trasladaron a medio de esporulación para identificar únicamente a los diploides. Para la caracterización del "mating type" de las células haploides obtenidas, se gotearon varias de ellas en una caja y se realizó una réplica con terciopelo de una cepa "tester" (de la que se conoce el "mating type") crecida en césped y nuestra caja problema. El experimento se realizó conociendo las auxotrofías que poseía cada una de las cepas y sabiendo que únicamente los diploides podrían crecer en la caja a la que se hizo la réplica. Para la obtención de los diploides de las mutantes con la cepa parental, se transformaron las haploides mutantes con un plásmido que contenía un marcador de auxotrofia específico (plásmido pRS315 que lleva el gen de leucina²) y a la cepa parental con otro plásmido que contenía un marcador diferente (plásmido pRS316 que lleva el gen de uracilo³)(Figura 5). Posteriormente se aislaron los diploides en medio mínimo sin uracilo y sin leucina.

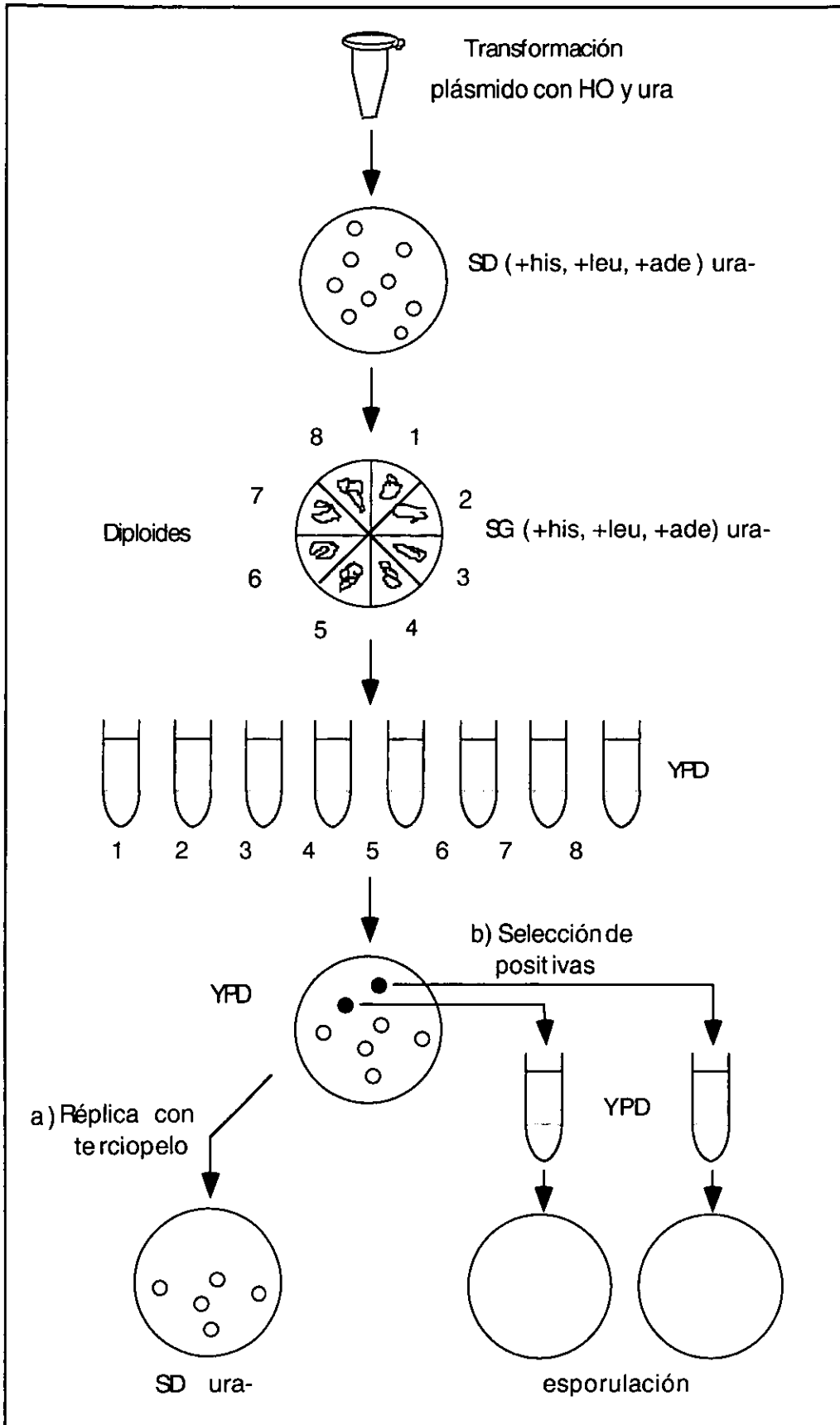


Figura 4: Diagrama de la realización de autodiploidía

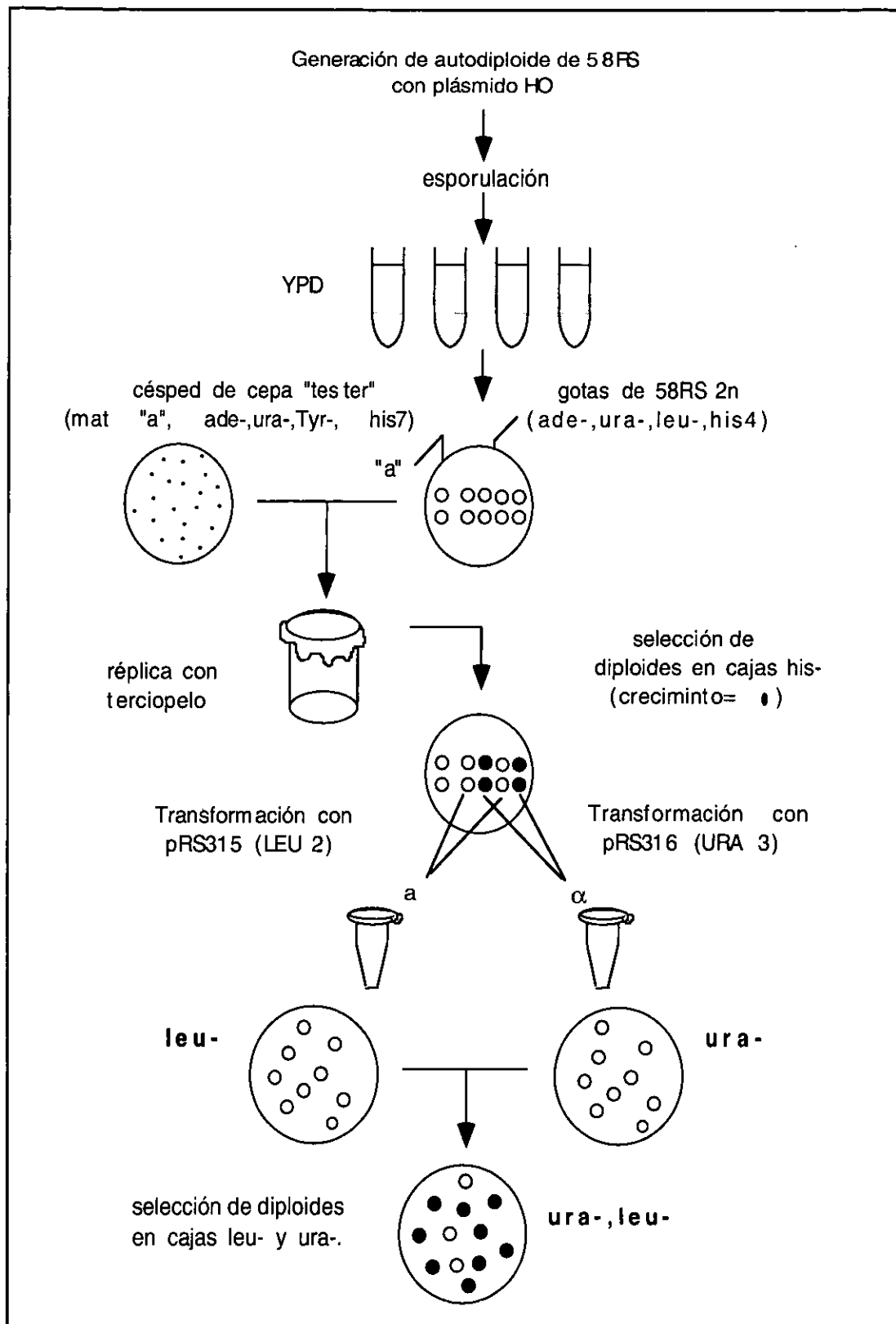


Figura 5: Generación de diploides para las retrocruzas con la cepa parental

Con el análisis del fenotipo de los diploides, pudimos seleccionar aquellas mutaciones que tenían un carácter recesivo. Se realizó un análisis de tétradas, induciendo a esporular a los diploides en los medios adecuados, y se seleccionaron únicamente las mutantes que presentaban fenotipo parental. El hecho de que se escogiesen solamente las mutantes recesivas se debe a que el proyecto global contemplaba el aislamiento de los genes de plantas y levaduras que complementasen a dichas mutantes.

Para mejorar la caracterización, se estudió el crecimiento de las mutantes obtenidas utilizando medios que contenían otras sales y compuestos que provocan en la levadura estrés osmótico o bien toxicidad iónica. Para ello se realizó un estudio de los potenciales isoosmóticos que producen las diferentes concentraciones de cada uno de esos compuestos (Figura 6). El cálculo se realizó tomando diferentes concentraciones de cloruro de sodio, cloruro de litio, sulfato de sodio, sulfato de litio y sorbitol.

Por los estudios de segregación de diploides generados por cruza entre las mutantes recesivas y la cepa parental, utilizando el micromanipulador, se comprobó que el número de genes mutados (refiriéndose al fenotipo) era únicamente uno. La segregación de una mutación monogénica nuclear es 2 : 2. Como se puede apreciar en las figuras 7 y 8 (la diferencia entre las dos figuras es la fuente de carbono) dos haploides de cada una de las tétradas pueden crecer en medio con sal y las otras dos no pueden. El experimento se realizó por goteo (3µl) de las células haploides derivadas de la segregación de tétradas. En la caja control (sin estrés) todas las células pueden crecer.

Características primarias de las mutantes seleccionadas.

Entre las mutantes seleccionadas se encontraron las siguientes:

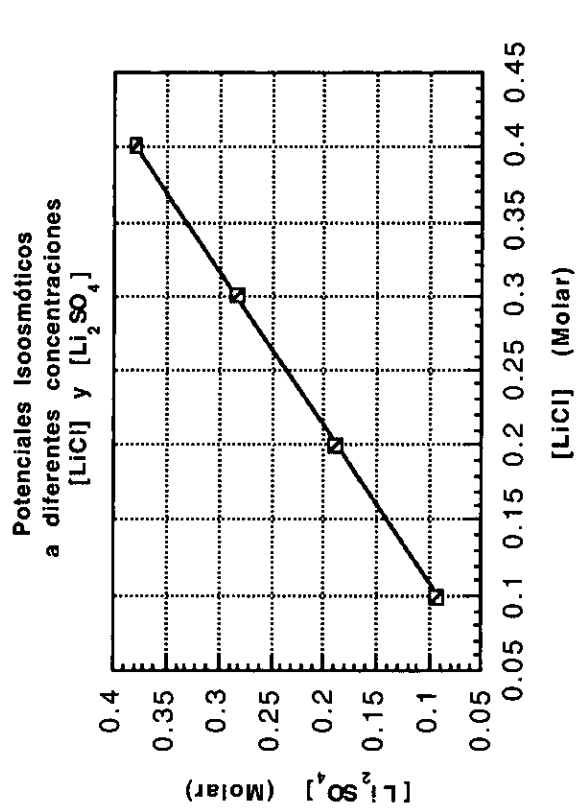
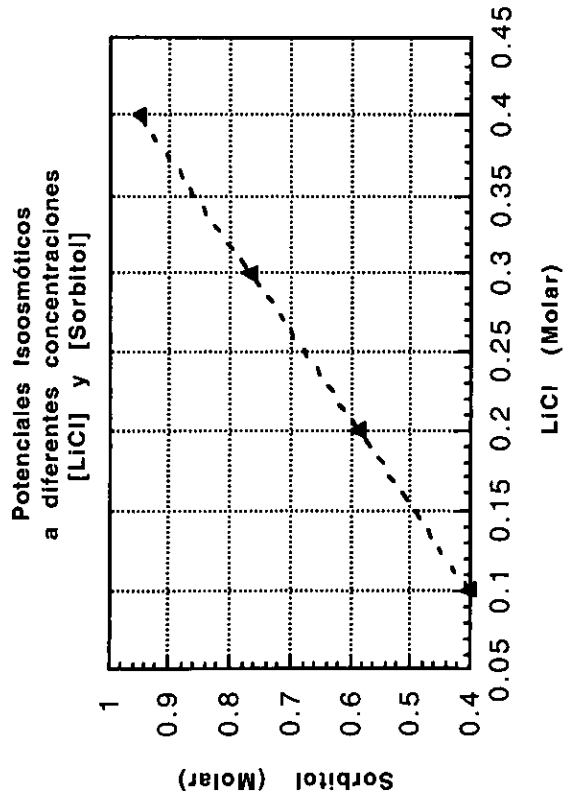
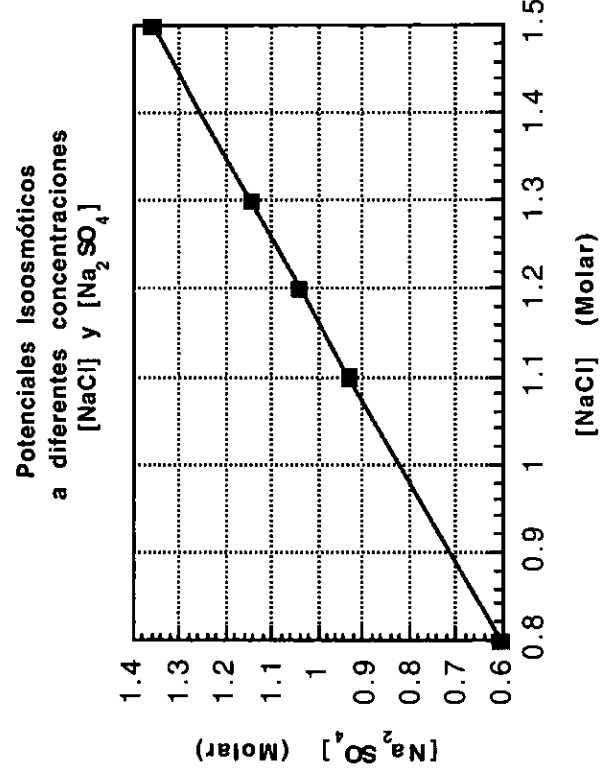
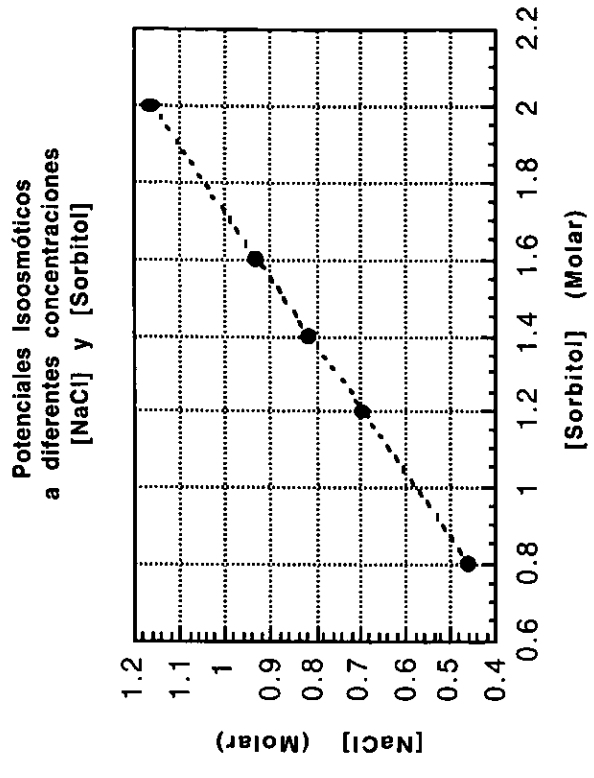


Figura 6: Relación de los potenciales isoosmóticos de diferentes compuestos

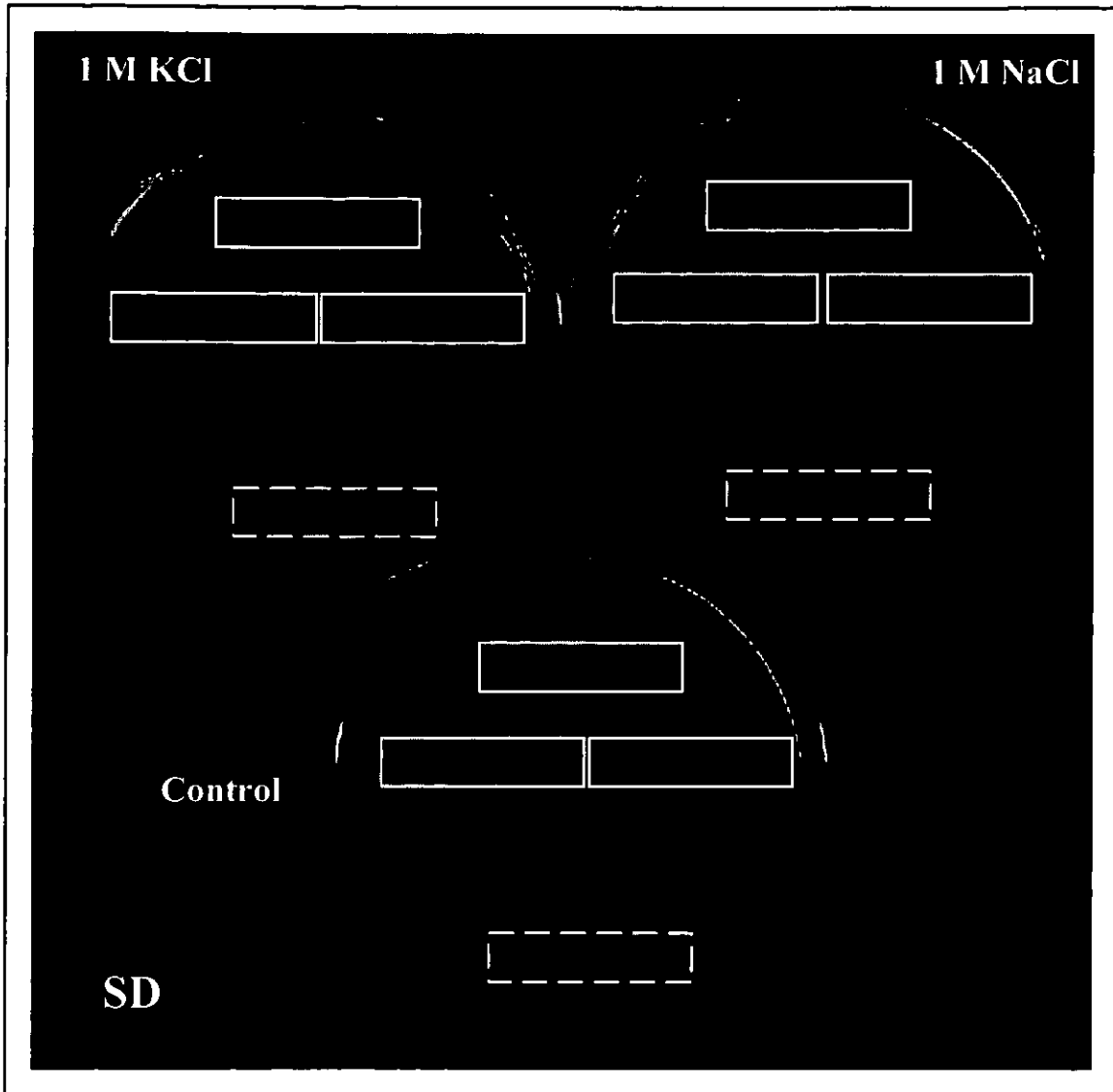


Figura 7: Análisis de la segregación de tétradas del diploide NKd/58RS en cajas con medio mínimo y glucosa como fuente de carbono, en condiciones control sin sal y en estrés salino con 1 M NaCl ó 1 M KCl. Los recuadros continuos señalan la colocación de tétradas, el recuadro discontinuo señala la tétrada control.

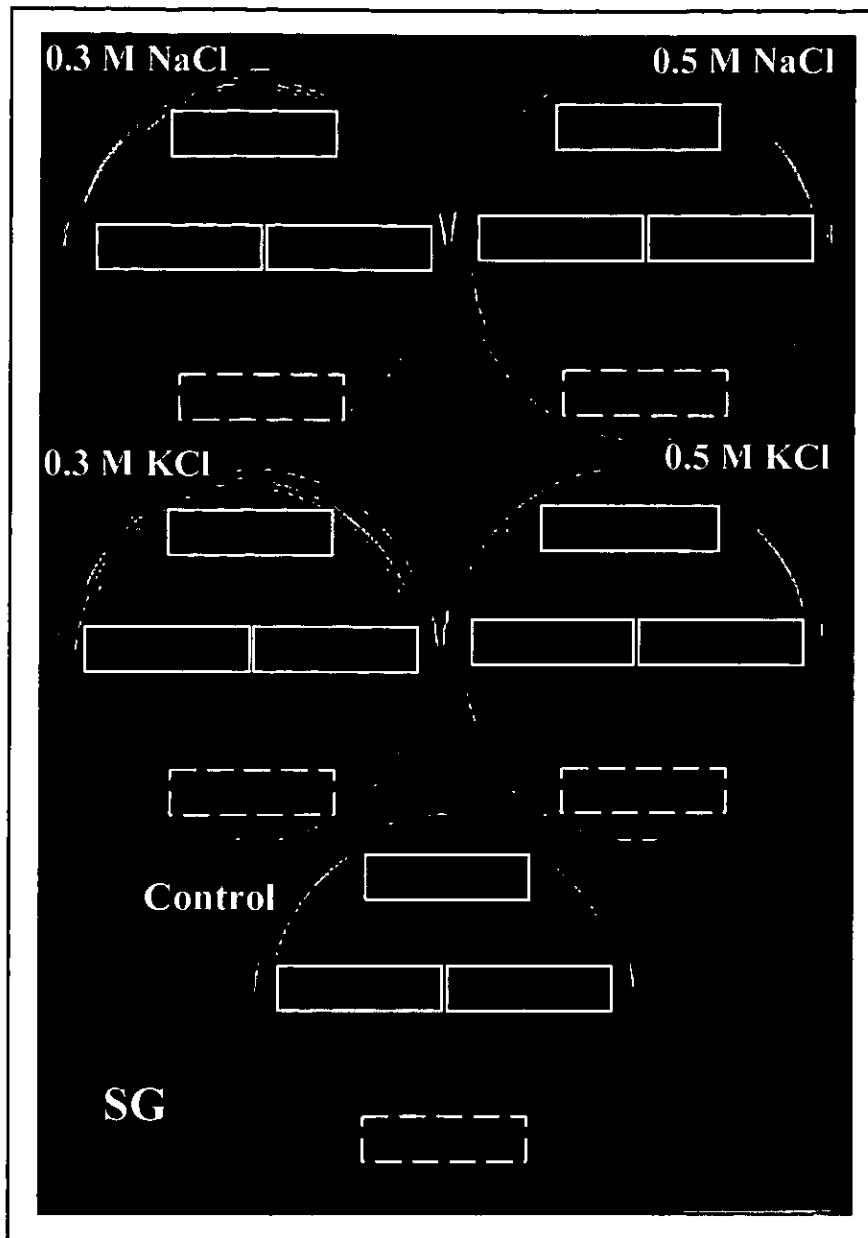


Figura 8: Segregación de tétradas de la diploide NKd/58RS en medio mínimo y galactosa como fuente de carbono, en condición control sin sal y en estrés salino con 0.3 M, 0.5 M NaCl y 0.3 M, 0.5 M KCl.

1N1: presenta una segregación 2 : 2 en medio mínimo SD con NaCl, no crece muy bien en medio mínimo SD con KCl. La segregación de gen único no es muy clara en SG.

4K1: presenta una segregación 2 : 2 en medio mínimo SD con NaCl así como con KCl.

La sensibilidad a sal es más clara en medio con KCl.

17.1: presenta una segregación 2 : 2 en medio mínimo y glucosa como fuente de carbono con NaCl o con KCl. El fenotipo no es muy claro en medio con galactosa.

30.2: presenta una segregación 2 : 2 en medio mínimo que tiene galactosa como fuente de carbono con NaCl así como con KCl. No crece bien en medio con glucosa.

39.1: presenta una segregación 2 : 2 en medio mínimo y glucosa con NaCl, no crece muy bien en medio mínimo con KCl. En medio mínimo con galactosa como fuente de carbono las células presentan una sensibilidad muy baja.

NK-d: presenta una segregación 2 : 2 en medio mínimo que tiene ya sea galactosa o glucosa como fuente de carbono con NaCl o con KCl.

En las Figuras 9 y 10 se muestran como ejemplo las cinéticas de crecimiento con las diferentes concentraciones de sales de la mutante NKd y de la mutante 1N1.

De las mutantes arriba descritas, dos de ellas presentaron fenotipos interesantes. El resto de las mutantes no se caracterizaron dado que el fenotipo no era tan estricto. La mutante 1N1 es sensible a toxicidad iónica ejercida por el sodio y por el litio (es sensible a 1 M NaCl y a 100 mM LiCl), sin que eso implicase una sensibilidad osmótica, únicamente ejercida por el potasio. La mutante NK-d es sensible a choque osmótico (tanto por NaCl como por KCl) desde concentraciones de 0.3 M NaCl ó 0.3 M KCl, en galactosa como fuente de carbono.

A continuación presento una tabla que resume la características de dichas mutantes:

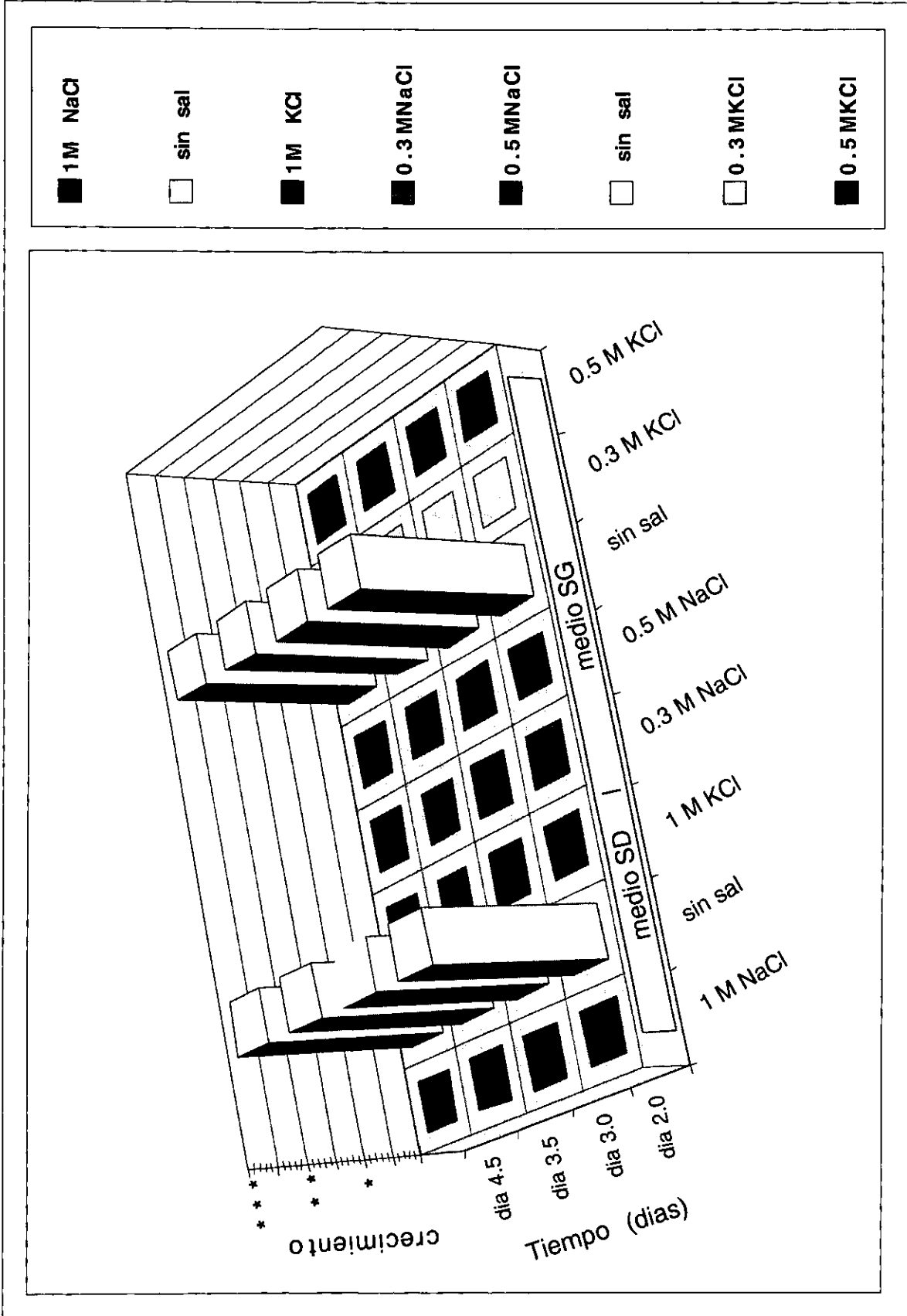


Figura 9: Cinética de expresión del fenotipo de sensibilidad de la mutante NK-d en medio mínimo con dos tipos de fuente de carbono, con diferentes concentraciones de sal.

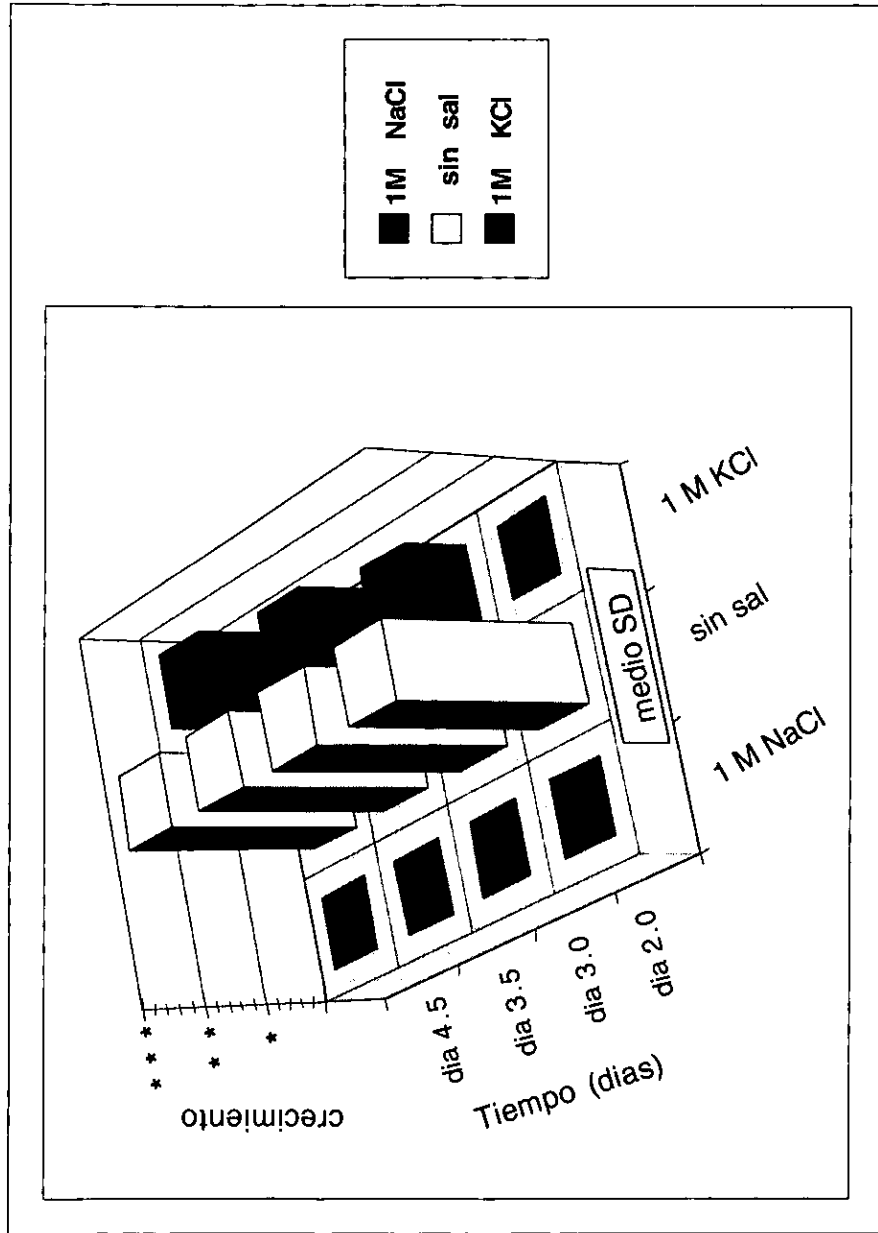


Figura 10: Cinética de expresión del fenotipo de sensibilidad de la mutante 1N1 en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono, con diferentes concentraciones de sal.

Mutante Nk-d

- Mutante de la cepa 58RS.
- Halo y osmosensible, monogénica y recesiva
- La mutación se obtuvo con EMS
- Sensible en glucosa a:
 - 1 M NaCl
 - 1 M KCl en medio mínimo (SD)
 - 0.5 M K₂SO₄

 - 1M Sorbitol : en medio rico (YPD)
- Sensible en galactosa, medio mínimo (SG) a:
 - 0.3 M y 0.5 M NaCl
 - 0.3 M y 0.5 M KCl
 - 0.3 M y 0.5 M NH₄Cl
 - 0.15 M y 0.25 M K₂SO₄
- Poco sensible en medio mínimo y glucosa (SD) a: 100 mM LiCl

Mutante 1N1

- Mutante de la cepa 58RS
- Halosensible, monogénica, recesiva
- La mutación se obtuvo con EMS
- Sensible a la toxicidad iónica dada por:
 - 1 M NaCl (SD)
 - 100 mM LiCl (SD)

- Insensible a: 0.5 M Sorbitol (SD)
- 1 M KCl (SD)
- 0.5 M K₂SO₄ (SD)
- 1 M Sorbitol (YPD)

Para un estudio más detallado de NK-d y 1N1 se analizaron las velocidades de crecimiento de estas mutantes y de la cepa parental 58RS. Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas entre estas mutantes con la cepa parental (Figura 11).

Dado que los fenotipos de las mutantes se parecían a mutaciones ya descritas, se pidieron éstas últimas a otros laboratorios para realizar estudios de complementación. Una célula diploide formada a partir de dos haploides que contienen una mutación, presenta dos copias de cada uno de los genes y el estudio de complementación nos refleja si la mutación de cada una de ellas es o no la misma. La diploide puede crecer en medio selectivo si las mutaciones son diferentes y no puede crecer si las mutantes lo son en el mismo gen. Los estudios de complementación se realizaron con las siguientes mutantes: la interrupción de *HAL3*, una mutante en la subunidad reguladora de la calcineurina (*cnb1*), la interrupción de los genes en tandem *PMR2* (*ENAI*) y por la interrupción de *HOG1*.

Por los estudios de complementación de NK-d, demostramos que esta mutante porta una mutación nuclear alélica al gen *HOG1* (Figura 12). Por otro lado, la mutante 1N1 lleva una mutación que se estudió por complementación y comprobamos que es

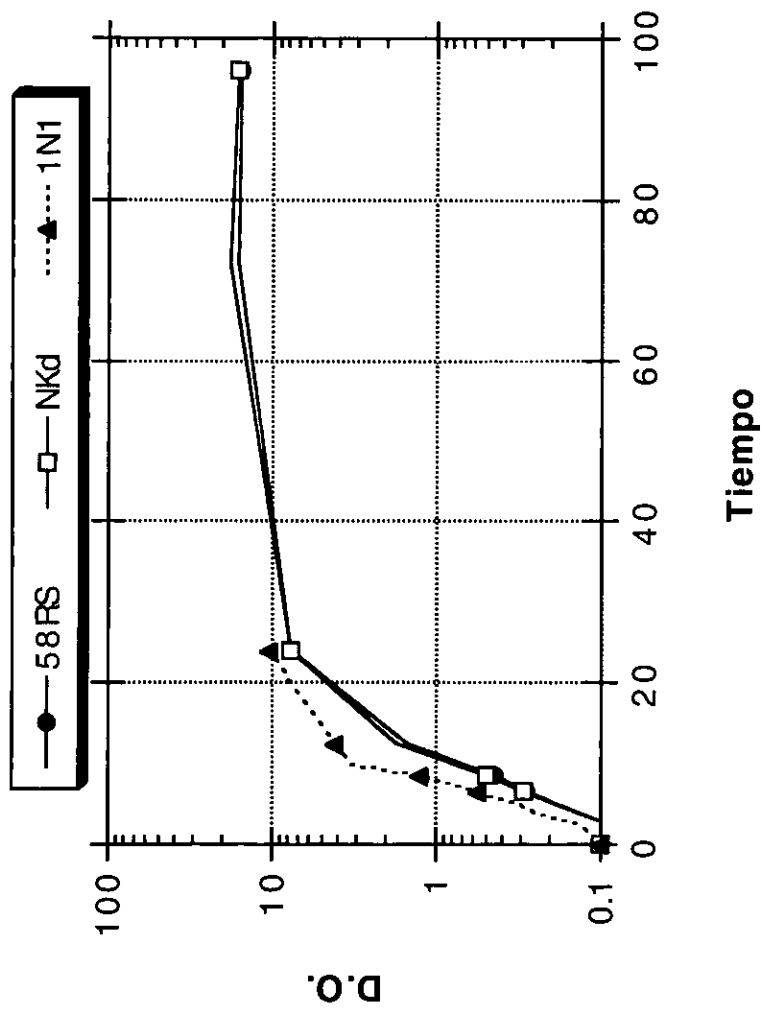


Figura 11: Curvas de crecimiento de las cepas indicadas en medio rico sin estrés.

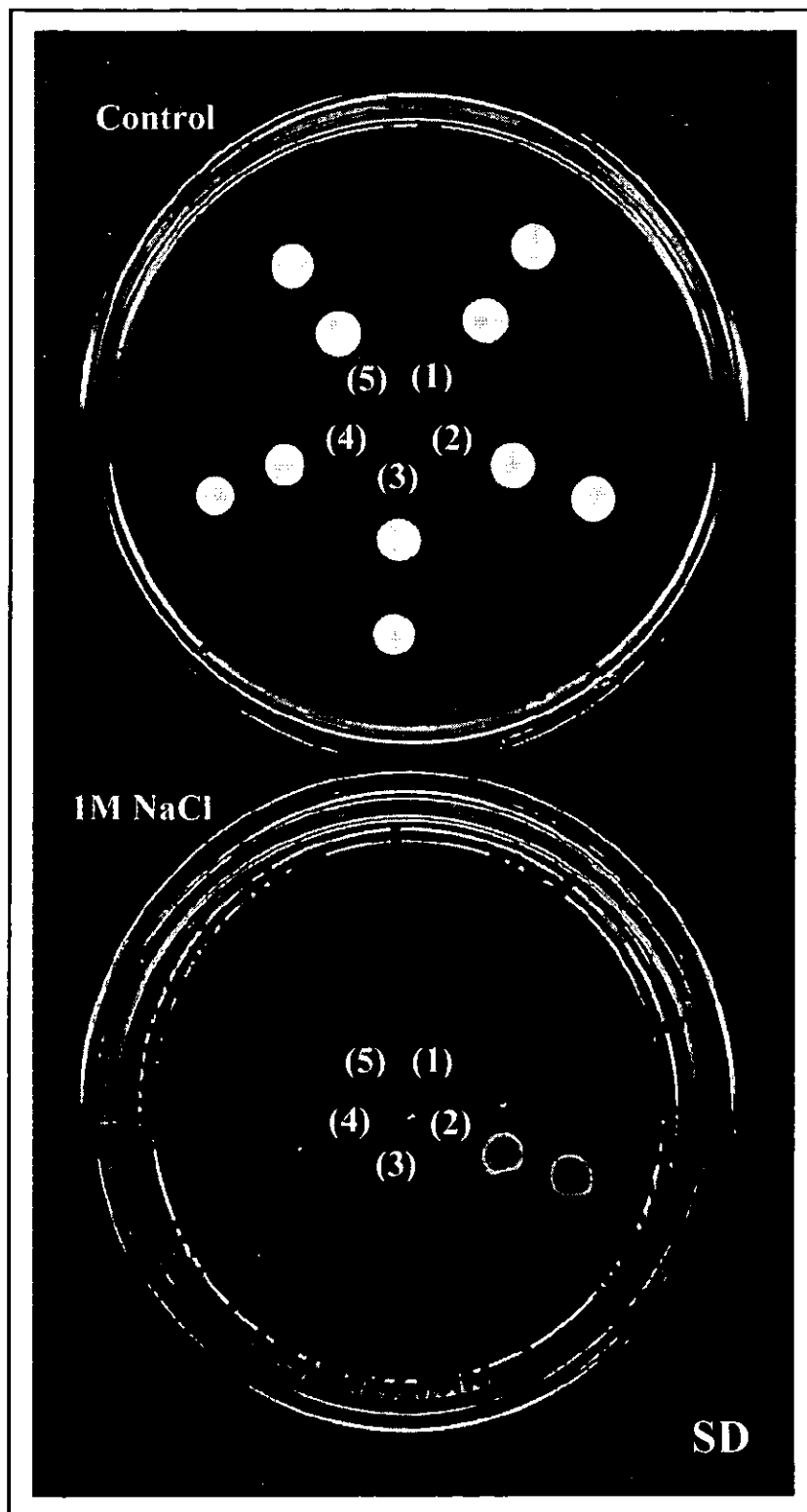


Figura 12 : Complementación de NKd y Δ hog en cajas de Petri con medio mínimo y glucosa como fuente de carbono (SD), en caja control sin sal o con una concentración de sal de 1 M NaCl.

[(1) NKd, (2) diploide NKd/58RS, (3)y(4) Diploide NKd/ Δ hog, (5) Δ hog]

alélica al gen nuclear *PMR2 (ENAI)* (datos no mostrados).

Los datos obtenidos nos desalentaron en el sentido de que ambas mutantes estaban reportadas en la bibliografía. Sin embargo, una característica de los mismos es de gran importancia para la realización de estudios posteriores, ésto es, son mutantes puntuales. Los análisis fenotípicos de mutantes caracterizadas hasta el momento, se han realizado con interrupciones del gen y no con mutaciones puntuales. Las mutaciones puntuales pueden evitar la transcripción o traducción del gen a estudiar, lo que no aportaría datos adicionales. De igual forma, es posible que la mutación puntual produzca una proteína deficiente que refleje fenotipos diferentes en ciertas ocasiones.

Caracterización de las mutantes mediante el estudio de acumulación intracelular de iones

La caracterización prosiguió con el estudio de la acumulación intracelular de iones. Realizamos las medidas de éstos en las cepas en estudio a diferentes tiempos (10, 30, 60 y 90 min), después de aplicar el estrés con 0.7M NaCl. Se realizaron al menos dos experimentos con mediciones diferentes de cada una de las cepas y omitimos las desviaciones estándar debido a que los datos representaban la misma tendencia pero con valores dispersos. Con la medida de la concentración intracelular de Na^+ [usando el flamómetro (ver materiales y métodos)], determinamos que en las mutantes, conforme avanza el tiempo y en condiciones de estrés, la concentración del ion en el interior de las células aumenta. La acumulación de sodio en ambas mutantes (1N1 y NK-d) con respecto a la silvestre presenta una cinética similar (Figura 13). Dicha acumulación pudiera deberse a una mayor entrada de los iones o a una falla en la salida de éstos. Para determinar si los iones tóxicos pueden salir del interior de dichas células cuando pasan a una situación sin

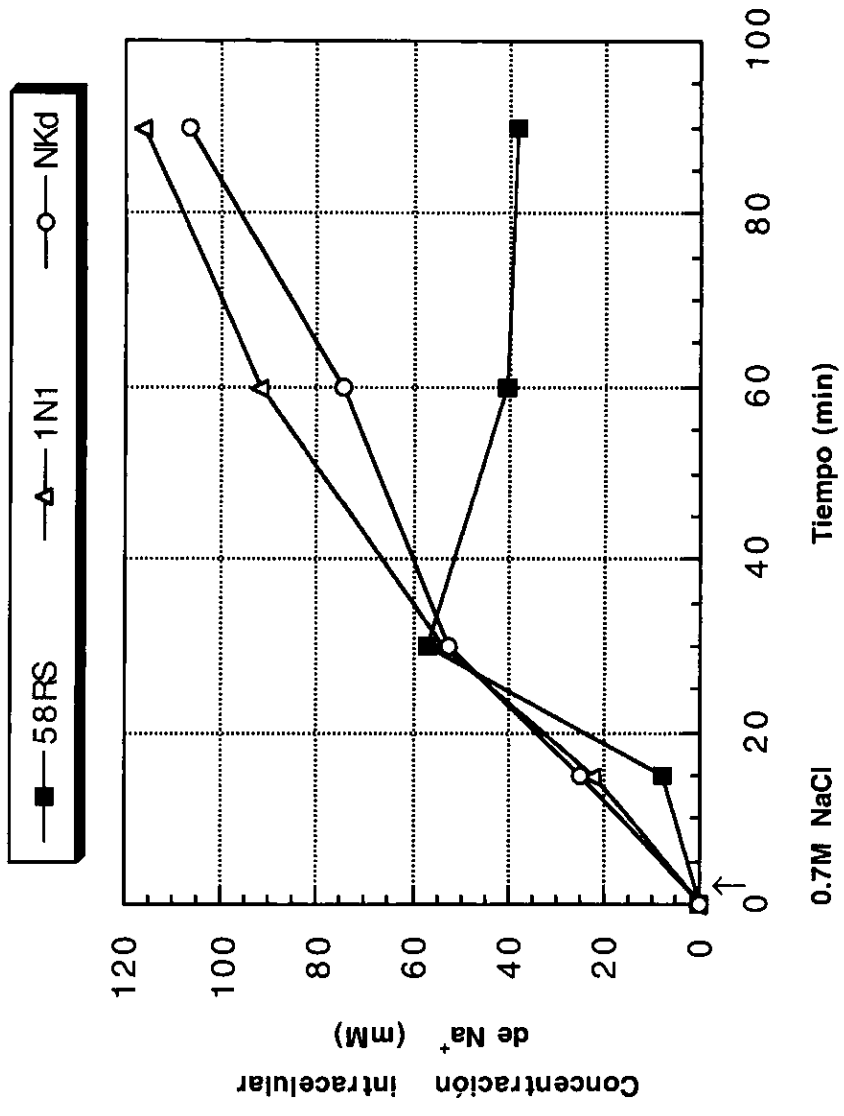


Figura 13: Cinética de entrada de sodio en las cepas 58RS, NK-d y 1N1, durante un tratamiento de 90 minutos con 0.7 M NaCl .

estrés, realizamos los estudios de las concentraciones intracelulares después de 90 min. de tratamiento con sal, poniendo a las células en medio rico sin estrés. Con estos estudios de la cinética de salida de los iones de sodio en las dos mutantes, se pone de manifiesto que no presentan ningún problema en el mecanismo de salida de los iones tóxicos (Figura 14). La cepa parental saca todo el sodio intracelular muy rápido, al menos el detectable con nuestro sistema de medida, tal como se esperaría al pasar de un medio con estrés a uno con ausencia de estrés. Las mutantes también sacan los iones tóxicos, sin embargo, mantienen por más tiempo concentraciones más altas debido a la acumulación del ion que éstas ya presentaban. Los datos antes mencionados sugieren que si el transporte y la acumulación de iones durante un tratamiento con sal en la mutante NK-d (*hog1*) está defectuoso, esto refleja una relación entre este gen y el transporte de iones con el sistema de regulación del choque osmótico. Por estudios ya reportados de la mutante en *ENAI* la salida de los iones tóxicos durante estrés es defectuosa y nuestros datos confirman esa característica. Realizamos los estudios de acumulación de iones sodio intracelulares en la mutante que porta la interrupción de todos los genes ENA, así como en la que porta la interrupción del gen *HOG1* (Figura 15). La mutante NK-d se comporta muy similar aunque no igual, como era de esperar, a la cepa que contiene la interrupción del mismo gen. La mutante IN1, sin embargo, presenta una menor acumulación de sodio que la mutante que nos habían proporcionado, comportamiento también esperado debido a que dicha mutante contiene la interrupción de los cinco genes ENA en tandem que la levadura posee. Esta última cepa también presenta un fenotipo mayor de halosensibilidad.

El estrés iónico fue impuesto con la administración de 100 mM LiCl al medio de cultivo. El comportamiento de la cepa parental y de las cepas mutantes es igual al que presentan por tratamiento con sodio (Figura 16).

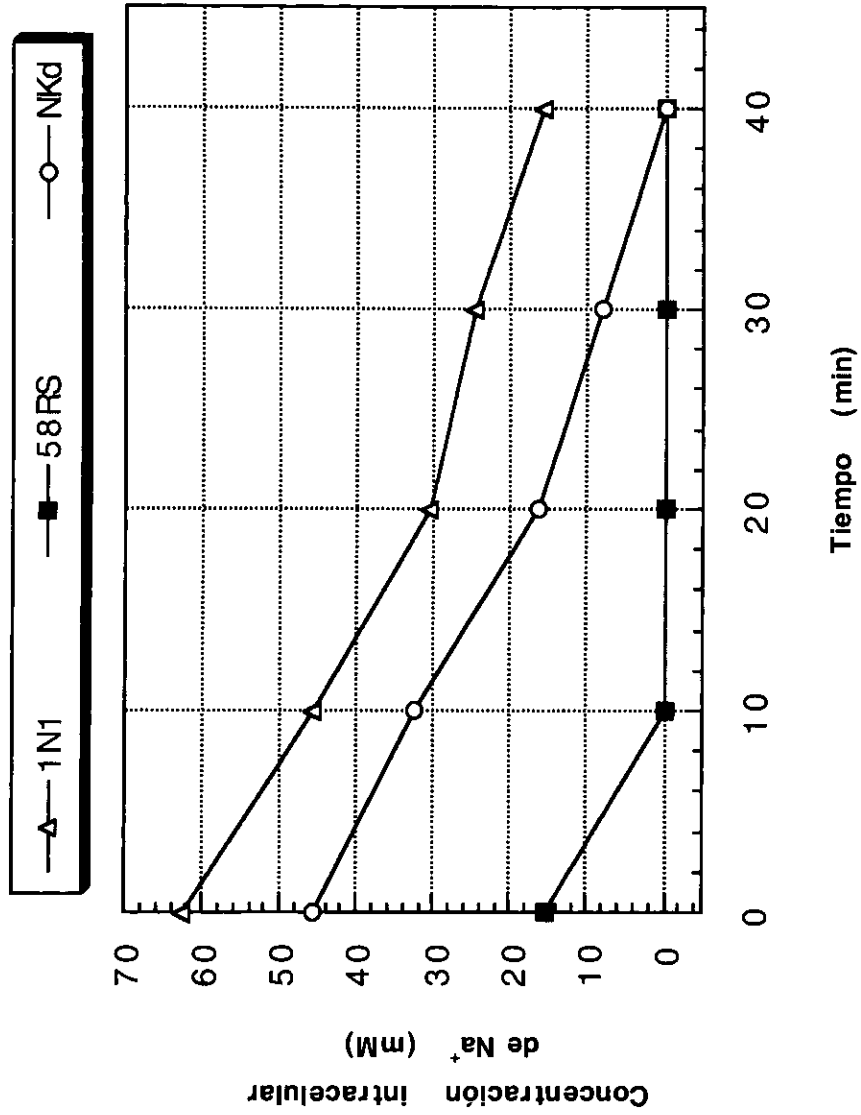


Figura 14: Cinética de salida de sodio intracelular posterior al tratamiento, durante 90 minutos, con una concentración de sal de 0.7 M NaCl.

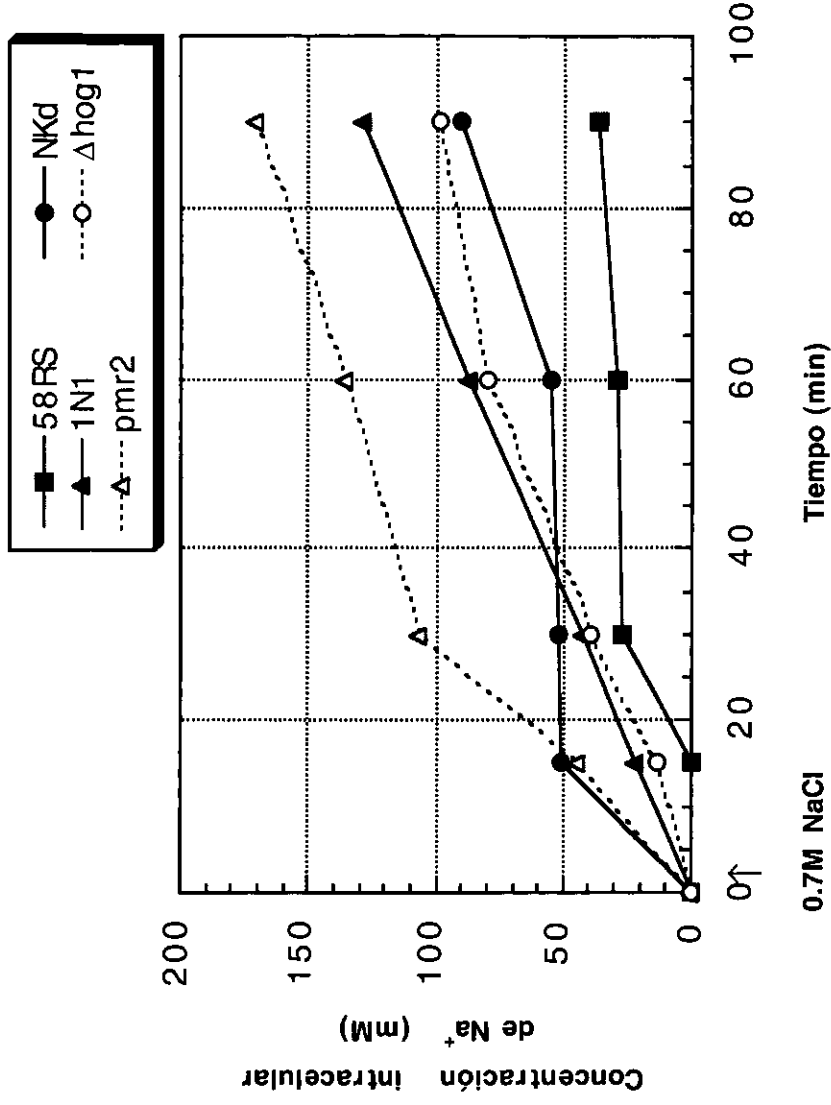


Figura 15: Cinética de entrada de iones sodio en las cepas indicadas, durante un tratamiento de 90 minutos con una concentración de 0.7 M NaCl .

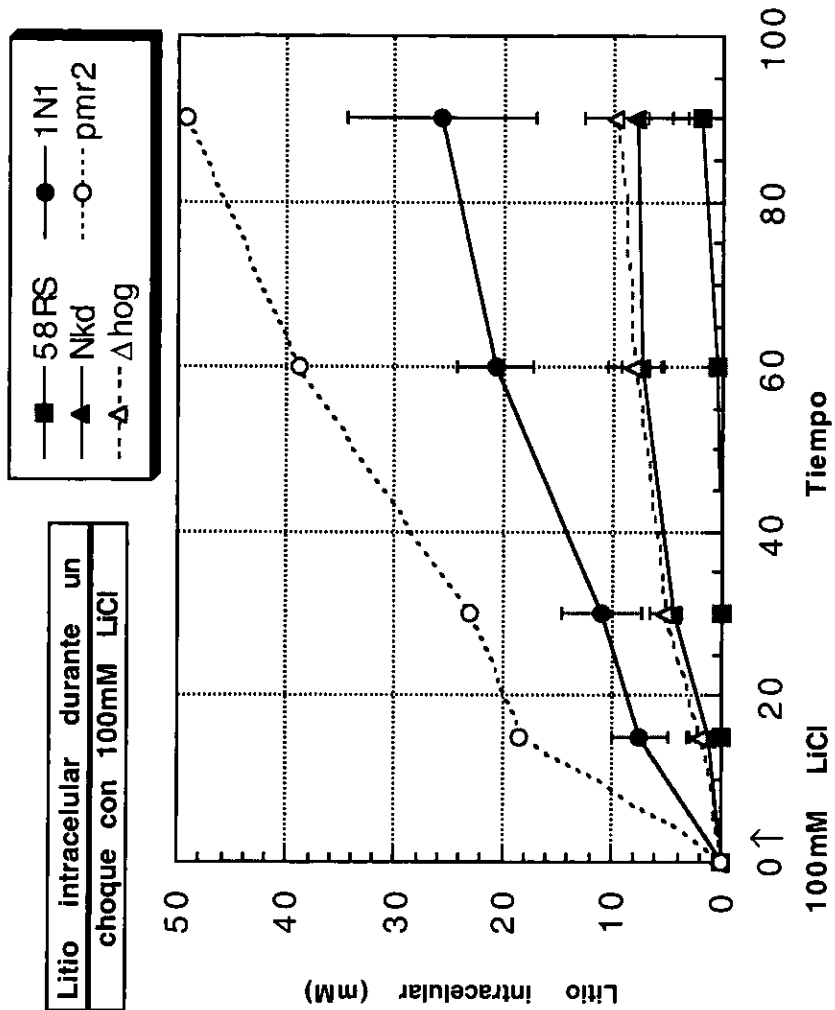


Figura 16 : Cinética de entrada de litio durante un tratamiento de 90 minutos con 100 mM LiCl .

Como se mencionó con anterioridad, propiedades importantes para la resistencia o sensibilidad a sal son: la relación Na^+/K^+ intracelular óptima y la producción de osmolitos compatibles que contrarresten la toxicidad. La relación Na^+/K^+ se puede modificar cambiando la concentración de K^+ intracelular en el momento del choque. Realizamos los estudios de medida de concentraciones internas de este ion en todas las cepas (Figura 17) y lo observado fue que, aunque en un principio en todas ellas se presenta una salida de potasio inmediatamente después del choque, únicamente la cepa parental (58RS) puede reclutar suficientes iones potasio del medio para contrarrestar la toxicidad de los iones sodio o litio. Otra posibilidad es que esta cepa pueda inducir la producción de glicerol u otro compuesto como osmolito compatible que ejerza el mismo efecto. Cualquiera de estos métodos permite el crecimiento de esta cepa silvestre en las concentraciones de sal estudiadas. Cuando analizamos la concentración del ion potasio al traspasar a las células a condiciones normales después de 90 min de estrés con NaCl, observamos que el aumento de la concentración es ligero pero progresivo con respecto al tiempo, aunque el medio no contenga una concentración alta de este ion. Sin embargo, este aumento no es más rápido en la cepa parental que en las mutantes, ya que las pendientes de las rectas que nos indican las constantes de velocidad de entrada de iones, son muy similares.

Las causas de los comportamientos observados pueden ser varias: el método de experimentación puede no ser el idóneo (se necesitarían medidas a tiempos más cortos en los primeros minutos que determinasen específicamente la pendiente), las cepas en estudio pueden modificar la toxicidad elevando la concentración intracelular de potasio, de igual forma, pueden inducir la síntesis de compuestos (osmolitos) que no podemos determinar por este método. El aumento de la concentración intracelular de potasio es, por lo tanto, una medida adoptada por las células para evitar la toxicidad o la acumulación de sodio

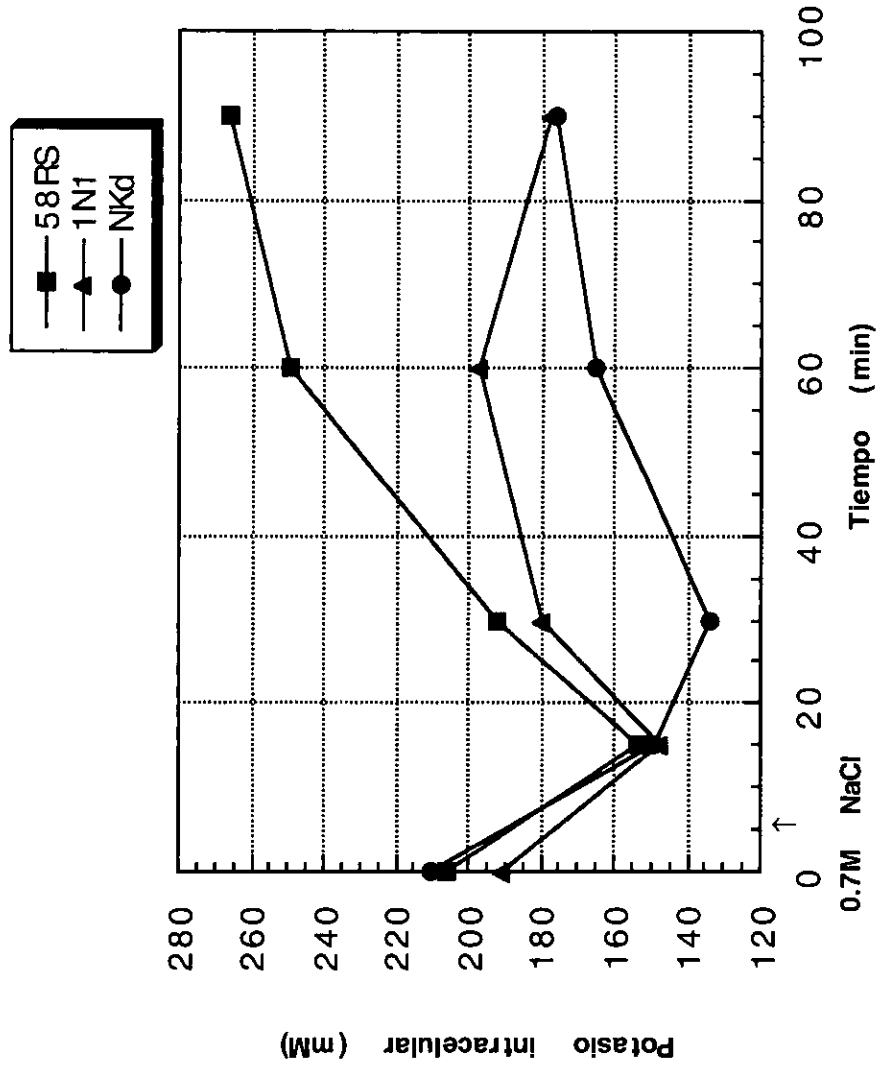


Figura 17: Cinética de entrada de potasio durante un tratamiento de 90 minutos con 0.7 M NaCl

que se produce (Figura 18). En consecuencia, la sensibilidad a sal de las mutantes que estudiamos puede deberse a la ineficiencia en evitar la acumulación del ion tóxico (acumulación dependiente posiblemente de la concentración de potasio), o bien a la falla en la regulación de la síntesis de los compuestos osmoprotectores.

Decidimos entonces, para abordar el problema, realizar las gráficas de la relación sodio/potasio durante y posterior al tratamiento con sal. Estos datos podrían reflejar que el aumento de la concentración de potasio puede ser el medio utilizado por estas células para evitar la toxicidad, aunque el sodio a muy baja concentración es el que determina la relación existente entre ambos iones. La cepa parental silvestre (más resistente), puede contrarrestar la toxicidad del sodio, sin embargo las mutantes sensibles no pueden. Por la relación sodio/potasio obtenida durante y después del estrés, concluimos que ésta es mayor en ambas mutantes que en la silvestre (Figura 19 y 20). Por todo lo anterior, consideramos que la obtención de dicha relación es un buen parámetro para determinar la resistencia o sensibilidad de una cepa respecto a su silvestre, aunque no podamos discernir entre los mecanismos utilizados por la célula para llegar a esa relación.

Análisis de la relación epistática entre los genes.

Para el análisis de la relación entre los dos genes, obtuvimos el diploide producido entre las dos mutantes haploides (1N1/NK-d) y como se puede observar en la imagen de las cajas de Petri, las dos mutaciones mapean en genes independientes y es por ese motivo que la diploide puede crecer en cajas con sal, es decir, las mutaciones se complementan (Figura 21). Debido a que en cada una de las haploides aparece la copia silvestre del gen mutado que tiene la otra cepa haploide, las diploides de estas dos mutantes no son halosensibles. Como control pusimos a la cepa parental diploide, a la

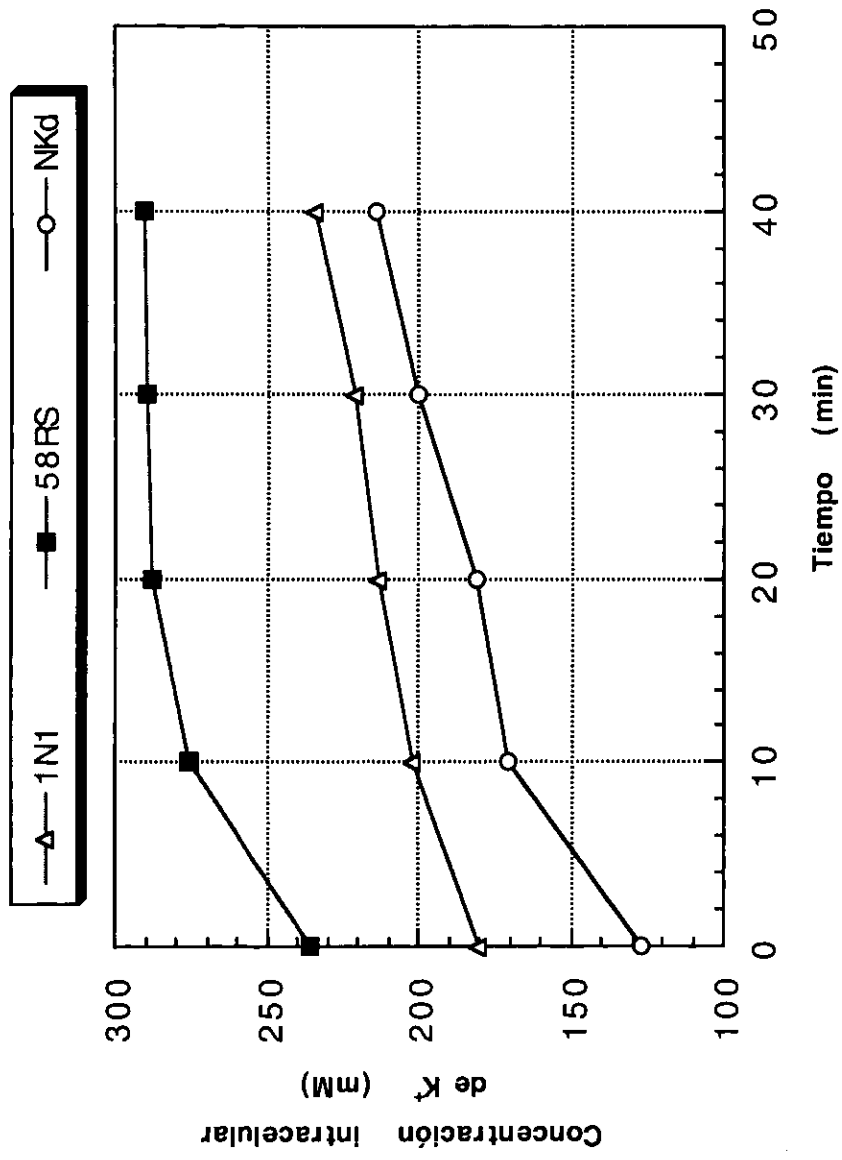


Figura 18: Cinética de la movilidad de potasio posterior al tratamiento de 90 minutos con una concentración de 0.7 M NaCl.

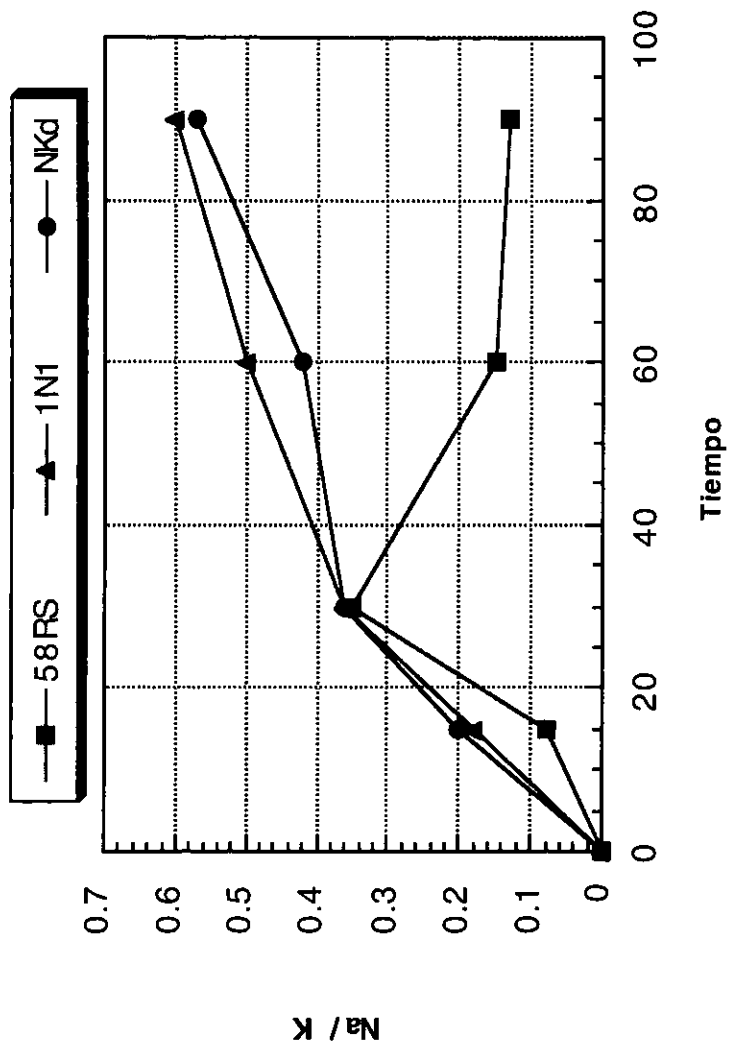


Figura 19: Cinética de la relación sodio/potasio en las cepas indicadas, durante un tratamiento de 90 minutos con una concentración de 0.7 M NaCl .

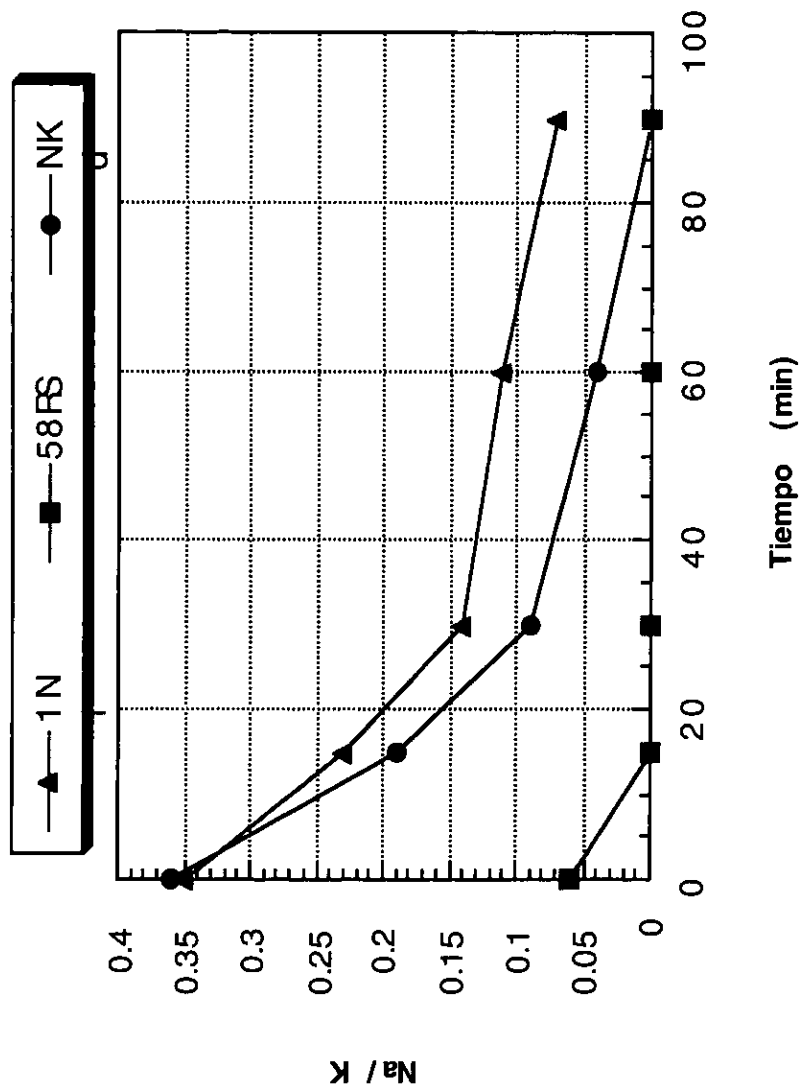


Figura 20: Cinética de la realación sodio/potasio en las cepas indicadas, durante un tratamiento de 90 minutos con una concentración de 0.7 M NaCl.

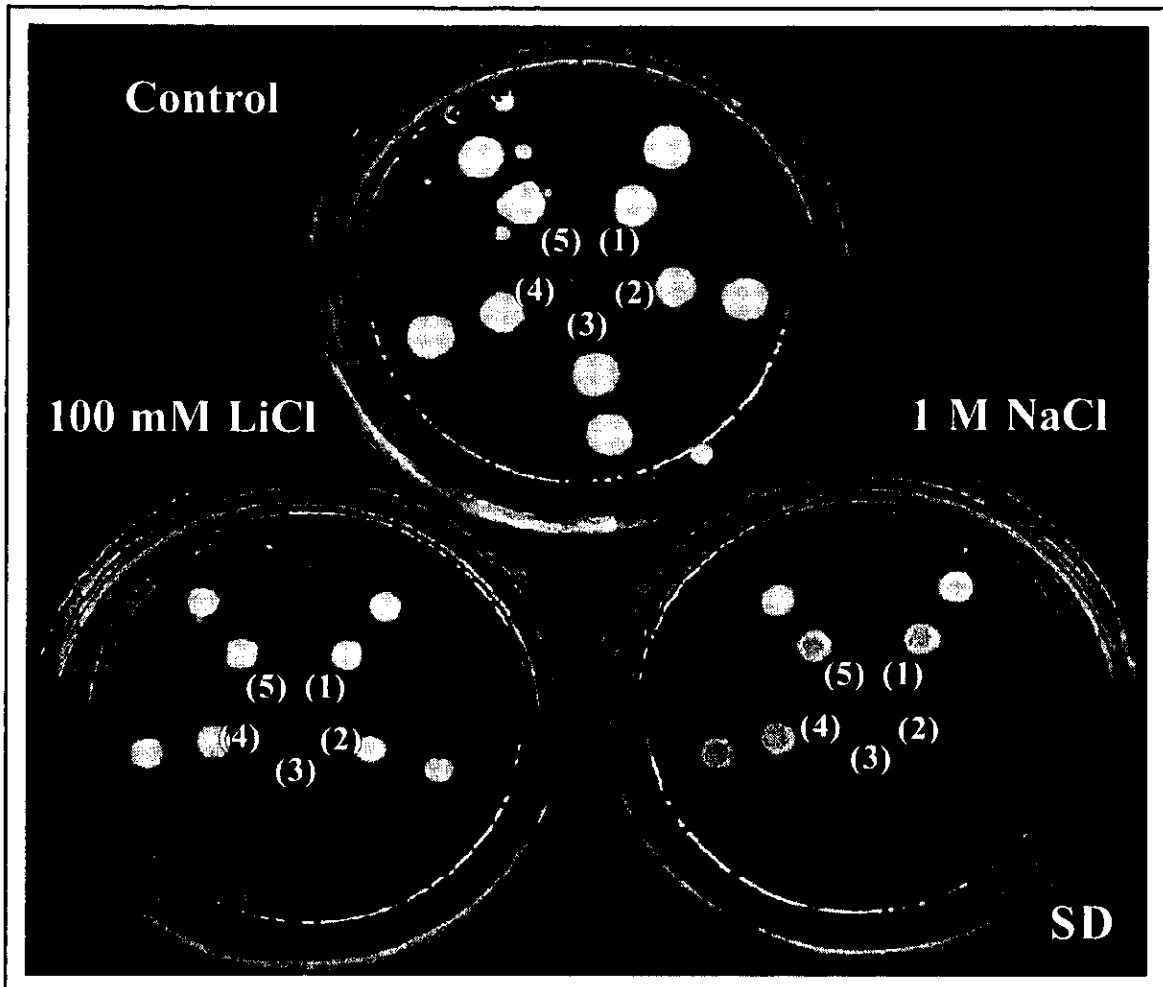


Figura 21: Estudio de complementación en el diploide entre las mutantes 1N1 y $\Delta hog1$ en medio mínimo y glucosa como fuente de carbono, en caja control sin sal y en cajas con sal, 100 mM LiCl ó 1 M NaCl.
 [(1) diploide 1N1/ Δhog , (2) diploide 1N1/58RS, (3) Δhog , (4) 1N1, (5) 58RS 2n]

diploide obtenida entre 1N1 y su parental (1N1/58RS) y a las haploides por separado.

Analizamos la segregación de tétradas de la diploide obtenida 1N1/ Δ hog y goteamos en diferentes cajas con diferentes compuestos esa misma segregación (Figura 22). Las cajas contenían 1M NaCl (produce estrés osmótico e iónico), 1M Sorbitol (que produce únicamente estrés osmótico) y 100mM LiCl (que produce únicamente estrés iónico) para ver si había o no diferencia entre las células de las diferentes tétradas y si había o no epistasis entre los genes mutados. Pudimos observar que las dos mutaciones segregaron de manera independiente y obtuvimos todas las combinaciones fenotípicas posibles. El primer resultado es de suma importancia, ya que nos indicó que el producto del gen 1N1 es dependiente de la vía de HOG. Esta última característica se puede observar claramente en la segunda tétrada de la figura en la que el crecimiento de cada una de las células depende del medio de selección. La primera célula presenta una mutación en el producto del gen de 1N1 únicamente (aB en la figura), no crece en medio con estrés iónico (100 mM LiCl), ésta misma si crece en medio con estrés únicamente osmótico (1 M Sorbitol) y no crece en medio que produce los dos tipos de estrés (1 M NaCl). La segunda (Ab) presenta una única mutación en *HOG1*, crece debilmente en medio con estrés iónico y ese crecimiento débil demuestra que si se presenta una mutación *hog1*, el producto del gen 1N1 no es tan eficiente. Estas células no crecen en los otros dos tipos de estrés. La tercera célula puede crecer en todos los medios y consideramos entonces que presenta genotipo y fenotipo igual al de una cepa parental silvestre. La cuarta gota (ab en la figura) es de células que presentan las dos mutaciones y por lo tanto el fenotipo es osmo y halosensible.

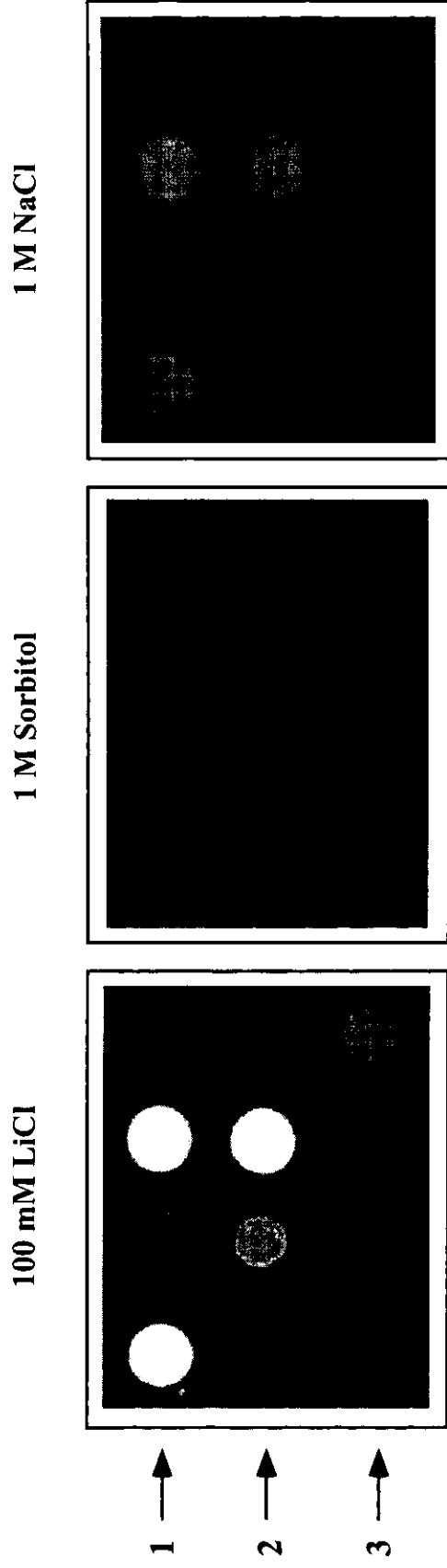


Figura 22: Segregación de la cepa diploide formada por las mutantes $1N1$ y $\Delta hog1$ en los diferentes medios arriba señalados. Las segregaciones son como siguen: tétrada 1 = AB ab AB ab
 tétrada 2 = aB Ab AB ab
 tétrada 3 = Ab aB aB Ab

siendo A = $1N1$ (silvestre), a = $1n1$ (mutado), B = $HOG1$ (silvestre) y b = $hog1$ (mutado)

Conclusiones

Realizamos la mutagénesis para aislar y caracterizar mutantes sensibles a sal de la levadura *S. cerevisiae*. Dos de las mutantes que se identificaron presentaban los fenotipos de halosensibilidad más claros: NK-d y 1N1. Las dos mutantes son sensibles pero no de igual modo al choque iónico dado por NaCl o LiCl y únicamente la mutante NKd es también sensible al choque osmótico dado por NaCl y por otros osmolitos (por ejemplo, 1 M sorbitol). Los genes que identificamos mutados son: *HOG1* en la mutante NK-d y *ENA1* (*PMR2*) en la mutante 1N1.

NK-d se comprobó, realizando la diploide de esta mutante con otra cepa haploide que contenía la interrupción de un gen ya reportado, por estudios de complementación, que correspondía a una mutación puntual, en el gen de *HOG1*. Debido al método de selección fenotípica usado no sabemos si la mutante contenía alguna otra mutación, sin embargo, no se detectó interferencia cuando buscamos sensibilidad a sal. El fenotipo encontrado en dicha mutante es perfectamente acorde con lo ya reportado para la interrupción en el gen *HOG1*. No sabemos si en algún caso específico, la vía de transducción de señales podría verse afectada por una mutación puntual o por la interrupción del gen. Para estudios adicionales y como perspectiva de trabajo con la mutante, podríamos saber si ese es el caso. La cinasa codificada por *HOG1* determina la inducción o la falta de represión de muchos genes que se expresan fundamentalmente en condiciones de estrés. Analizando la expresión de algunos de estos genes de respuesta (*GPD1*, *GRE*, *CTT*, *HAL1*, *DDR48*...) determinaríamos si la mutación puntual que seleccionamos, corresponde efectivamente a una ausencia de actividad de la proteína cinasa o a una falla en la actividad de la enzima.

Estudios relacionados con la reversión de la mutación nos reflejó que la frecuencia con la que encontramos esta característica es muy baja. Este hecho favorece la utilización de la mutante para análisis posteriores, sin embargo, si todos los fenotipos analizados concuerdan con los de la mutante que posee la interrupción del gen, es preferible la utilización de esta última para otros estudios por ser más limpia y más segura bioquímica y genéticamente.

Los datos obtenidos con los estudios de acumulación intracelular de iones nos reflejó un dato interesante. Un fallo en el transporte de iones de la célula durante estrés, es un reflejo del efecto de sensibilidad a sal que esta mutante presenta. La mutación en *HOG1* produce una acumulación intracelular de iones tóxicos durante un tratamiento de estrés con sal.

IN1 se comprobó por estudios de complementación, de nuevo obteniendo la diploide de nuestra mutante con la cepa haploide que contenía la interrupción de un gen ya reportado, que correspondía a una mutación en el gen de *ENA1*. El fenotipo encontrado en dicha mutante es perfectamente acorde con lo ya reportado para la mutación en este gen, sin embargo, el gen *ENA1* es uno de los cinco (*ENA1*, *ENA2*, *ENA3*, *ENA4* y *ENA5*) que aparecen en tandem en *S. cerevisiae* que codifican para la ATPasa de salida de sodio en la membrana plasmática de este organismo. La interrupción de uno de esos genes no refleja una pérdida total de la función que ejercen, y aunque *ENA1* es el gen que posee la actividad más alta entre las cinco copias, el fenotipo de sensibilidad de su mutación es parcial. *ENA1* es un gen dependiente de la vía de HOG. Esta característica reforzó nuestros datos al caracterizar la diploide realizada entre las dos mutantes

seleccionadas. La segregación meiótica que se presentó en el análisis de tétradas de esa diploide nos mostró que los dos genes son independientes, que presentan fenotipos que dependen del estrés al que se somete a las células, y que cada uno de los fenotipos presentes está determinado por la presencia o ausencia de cada uno de los genes. Cuando la situación de estrés estaba dada por LiCl a concentraciones bajas (100 mM) la vía de transducción determinada por HOG no debería estar activada, ya que a esa concentración de sal no hay estrés osmótico, por lo que el fenotipo que presentaban las haploides estudiadas debía depender únicamente de la mutación en el gen *ENA1*. Sin embargo, cuando las células presentaban una mutación en *HOG1* y el gen de la ATPasa de sodio no se encontraba mutado, el comportamiento de las células crecidas a esas concentraciones de sal reflejó un crecimiento no óptimo. El fenotipo de estas últimas indicaría que la función del gen *ENA1* es dependiente de la vía de HOG.

El análisis de la concentración intracelular de iones, así como los estudios de salida de éstos después de la aplicación de un choque salino, nos permitió una mejor caracterización del fenotipo de sensibilidad. Se confirmó que es el comportamiento de la ATPasa de salida de iones sodio en la levadura la vía que determina el fenotipo de sensibilidad a sal de esta mutante. La respuesta a sal de la levadura, sin embargo, está dada por una suma de funciones determinadas por muchos genes que reflejan un fenotipo epistático. Los datos confirmaron lo esperado y posibilitaron el estudio de la diploide obtenida entre las haploides IN1 y NKd. Una perspectiva del trabajo es el análisis más exhaustivo del comportamiento epistático entre los dos genes, su relación con la alta concentración intracelular de iones y por lo tanto su relación con el fenotipo de halosensibilidad.

Relevancia del trabajo

1. Obtuvimos mutantes que expresan fenotipo de sensibilidad a estrés salino debido a un gen único nuclear y recesivo. Se obtuvo un gran número de mutantes que se encuentran disponibles en el laboratorio para posteriores análisis y caracterizaciones.

2. Las dos mutaciones seleccionadas se encuentran en genes diferentes. Estas mutaciones puntuales son NKd, que porta una mutación puntual alélica al gen *HOG1* y 1N1 que porta una mutación puntual alélica al gen *ENAI*. La clonación de cada una de las mutaciones nos permitirá la determinación del fenotipo específico que establece la mutación puntual.

3. Estas mutantes NKd y 1N1, nos permiten el estudio de mutaciones puntuales que no siempre reflejan fenotipos iguales a las que portan interrupciones o deleciones de los genes.

4. La determinación de las concentraciones intracelulares de iones de las mutantes *hog1* y *enal* permitió llegar a las siguientes conclusiones:

. hay un incremento en la concentración intracelular de iones de Na^+ o Li^{2+} durante un tratamiento de estrés con NaCl o LiCl,

. no se afecta la salida de los iones después del tratamiento de estrés

. el aumento en la concentración intracelular de K^+ podría compensar el efecto tóxico del ion Na^+ en una cepa silvestre,

. la relación Na^+/K^+ durante y después del estrés es mayor en ambas mutantes halosensibles que en la silvestre. Dicha relación es un buen parámetro para determinar la resistencia o sensibilidad de una cepa respecto a su silvestre.

5. Existe una relación epistática entre los genes *ENAI* y *HOG1* que caracterizamos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Bibliografía

- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Prior, B.A. (1994) *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity-glycerol response pathway. *Mol Cell Biol*, **14**, 4135-4144.
- Alepuz, P.M., Cunningham, K.W. and Estruch, F. (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol*, **26**, 91-98.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *Embo J*, **16**, 2179-2187.
- Balcells, L., Gomez, N., Casamayor, A., Clotet, J. and Arino, J. (1997) Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase- Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur J Biochem*, **250**, 476-483.
- Banuelos, M.A., Quintero, F.J. and Rodríguez, N.A. (1995) Functional expression of the *ENA1(PMR2)*-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta*, **1229**, 233-238.
- Banuelos, M.A., Sychrova, H., Bleykasten, G.C., Souciet, J.L. and Potier, S. (1998) The Nha1 antiporter of *Saccharomyces cerevisiae* mediates sodium and potassium efflux. *Microbiology*, 2749-2758.
- Blomberg, A. (1997) Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis*, **18**, 1429-1440.

- Blomberg, A. and Adler, L. (1989) Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **171**, 1087-1092.
- Boy, M.E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. and Jacquet, M. (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **180**, 1044-1052.
- Brewster, J.L., de, V.T., Dwyer, N.D., Winter, E. and Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.
- Conlan, R.S., Gounalaki, N., Hatzis, P. and Tzamarias, D. (1999) The Tup1-Cyc8 protein complex can shift from a transcriptional co-repressor to a transcriptional co-activator. *J Biol Chem*, **274**, 205-210.
- de, N.E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N. and Arino, J. (1998) The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7357-7362.
- Delauney, A.J., Hu, C.A., Kishor, P.B. and Verma, D.P. (1993) Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. *J Biol Chem*, **268**, 18673-18678.
- Ferrando, A., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R. and Serrano, R. (1995) Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Molecular and Cellular Biology*, 5470-5481.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. and Silver, P.A. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin beta homologs

NMD5 and XPO1. *Embo J*, **17**, 5606-5614.

Gaxiola, R., de, L.I., Villalba, J.M. and Serrano, R. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *Embo J*, **11**, 3157-3164.

Gil, M.R., Lopez, C.J., Belles, J.M., Serrano, R. and Rodriguez, P.L. (1999) The Arabidopsis *HAL2*-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. *Plant J*, **17**, 373-383.

Glaser, H.U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdin, K.Y. and Serrano, R. (1993) Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *Embo J*, **12**, 3105-3110.

Hahnenberger, K. M., Jia, Z., Young, P. G. (1996) Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na⁺/H⁺ antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5031-5036.

Haro, R., Garciadeblas, B. and Rodriguez, N.A. (1991) A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *Febs Lett*, **291**, 189-191.

Jia, Z.P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. and Young, P. G. (1992) Gene amplification at a locus encoding a putative Na⁺/H⁺ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *Embo J*, **11**, 1631-1640.

Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P. and Adler, L. (1993) A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **10**, 1101-1111.

Maeda, T., Takekawa, M. and Saito, H. (1995) Activation of yeast *PBS2* MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, **269**, 554-558.

- Maeda, T., Wurgler, M.S. and Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast [see comments]. *Nature*, **369**, 242-245.
- Marchler, G., Schuller, C., Adam, 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.
- Márquez, J.A. and Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *Febs Lett*, **382**, 89-92.
- Márquez, J. A., Pascual, Ahuir A., Proft, M. and Serrano, R. (1998) The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *Embo J*, **17**, 2543-2553.
- Martínez, P.M., Marchler, G., Schuller, C., Marchler, B.A., Ruis, H. and Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J*, **15**, 2227-2235.
- Mendoza, I., Quintero, F.J., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (1996) Activated calcineurin confers high tolerance to ion stress and alters the budding pattern and cell morphology of yeast cells. *J Biol Chem*, **271**, 23061-23067.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez, N.A. and Pardo, J.M. (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 8792-8796.
- Murguía, J.R., Belles, J.M. and Serrano, R. (1995) A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science*, **267**, 232-234.

- Murguía, J.R., Belles, J.M. and Serrano, R. (1996) The yeast *HAL2* nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J Biol Chem*, **271**, 29029-29033.
- Posas, F., Camps, M. and Arino, J. (1995) The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J Biol Chem*, **270**, 13036-13041.
- Posas, F. and Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, **276**, 1702-1705.
- Posas, F., Wurgler, M.S., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C. and Saito, H. (1996) Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* "two-component" osmosensor. *Cell*, **86**, 865-875.
- Proft, M. and Serrano, R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* bZIP protein Sko1p confers HOG- dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol*, **19**, 537-546.
- Reiser, V., Ruis, H. and Ammerer, G. (1999) Kinase Activity-dependent Nuclear Export Opposes Stress-induced Nuclear Accumulation and Retention of Hog1 Mitogen-activated Protein Kinase in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **10**, 1147-1161.
- Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J.M., Prior, B.A. and Hohmann, S. (1999a) Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 715-727.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G. and Ruis, H. (1999b) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol*, **19**, 5474-5485.

- Rios, G., Ferrando, A. and Serrano, R. (1997) Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the *HAL1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 515-528.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I. and Moir, D.T. (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMR1*, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, **58**, 133-145.
- Schmitt, A.P. and McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5777-5782.
- Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. and Ruis, H. (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *Embo J*, **13**, 4382-4389.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol*, **165**, 1-52.
- Smith, A., Ward, M.P. and Garrett, S. (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *Embo J*, **17**, 3556-3564.
- Sutherland, F.C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A. and Kilian, S.G. (1997) Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **179**, 7790-7795.
- Thevelein, J.M. (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast*, **10**, 1753-1790.
- Treitel, M.A. and Carlson, M. (1995) Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3132-3136.

- Varela, J.C. and Mager, W.H. (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology*, 721-731.
- Wieland, J., Nitsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H. and Rudolph, H.K. (1995) The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na⁺ pump in the yeast plasma membrane. *Embo J*, **14**, 3870-3882.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, **217**, 1214-1222.

Apéndice

Medios de crecimiento

YPD (medio rico para levadura con glucosa como fuente de carbono)

Extracto de levadura.....	1 %
Peptona.....	2 %
Dextrosa.....	2 %
(Agar.....)	2 %)

Autoclave a 110 °C.

SD (medio mínimo para levadura con glucosa como fuente de carbono)

YNB sin amino ácidos (Difco).....	0.7 %
Glucosa.....	2 %
10xMES 0.5 M a pH 6.0 con Tris Base.....	100 ml/l
(Agar.....)	2 %)

requerimientos: se encuentran a 100 X .

Autoclave 110 °C.

SG (medio mínimo para levadura con galactosa como fuente de carbono)

YNB sin amino ácidos (Difco).....	0.7 %
Galactosa.....	2 %
10xMES 0.5 M a pH 6.0 con Tris Base.....	100 ml/l
(Agar.....)	2 %)

requerimientos: se encuentran a 100 X .

Autoclave 110 °C.

Auxotrofias (100 X)

uracilo 3 mg/ml
leucina 10 mg/ml
adenina 3 mg/ml
histidina 3 mg/ml
triptófano 2 mg/ml

Pre-esporulación

Extracto de levadura.....0.8 %
Bactopeptona..... 0.3 %
Dextrosa.....10 %
Agar..... 2 %

Esporulación

Acetato de potasio.....1 %
Extracto de levadura..... 0.1 %
Dextrosa..... 0.05 %
(Agar..... 2 %)