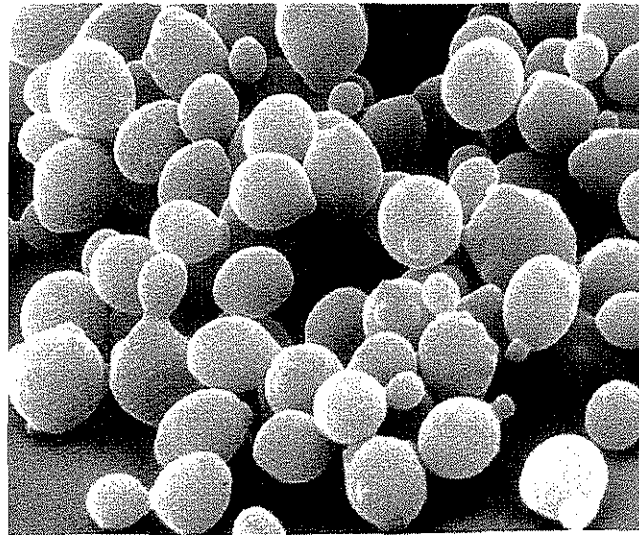




005513

**Caracterización de un Gen de Levadura que Confiere
Tolerancia a Diferentes Condiciones de Estrés.**



Tesis para optar al título de Maestro en Ciencias Bioquímicas.

Estudiante : Isadora Clark Ordoñez.

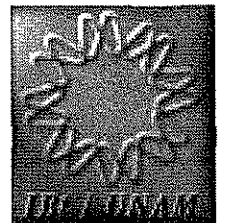
Tutor : Dra. Adriana Garay Arroyo.

Instituto de Biotecnología.

Universidad Nacional Autónoma de México.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





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.

Esta tesis se llevó a cabo en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de las Doctoras Adriana Garay Arroyo y Alejandra Covarrubias Robles y la supervisión del siguiente comité tutorial:

Dr. Miguel Angel Cevallos

Dr. Jordi Folch Mallol

Dra. Adriana Garay Arroyo

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Este trabajo se realizó con el apoyo de CONACYT mediante la beca-crédito No. 128387.

Dedicado a.....

Quien me trajo.....mis Padres Lucia y Alex

Con quien yo traje.....Gerardo

Quien trajimos.....Marco

AGRADECIMIENTOS

A Gerardo, por todo lo nuestro, por lo mejor de nuestras vidas, Marco.

A mis padres, por ser como solo ellos.

A mi Alex y mi Claret, porque son gran parte de mi.

A las Dras: Adriana Garay y Alejandra Covarrubias, por toda su ayuda y empeño para que esto fuera una enseñanza.

A los que fueron mis compañeros durante este trabajo: Oscar, Esperanza, Liz Patricia, Abraham, Emmanuel, José Luis, Sonia, Marina, Erika, Rosy, Adriana,, Wendy, Pancho, MaryPaz, Ricardo, Gisel, y Rosita. Y, a ellos junto con Jordy, Luzma, Larissa, Paco, José Luis y María Jesús por hacer del laboratorio un lugar muy agradable para trabajar.

A todos los amigos que hicieron muy grata mi estancia en Cuernavaca durante estos años, muy en especial a Sonia, por la gran amistad, a Lolita y Beto, Gaby y Hector, Vannesa y Ricardo, Adriana y Mauricio, MaryPaz y familia, por los momentos compartidos.

A mis amigos Olivia, Omar, Liliana, Esthela, Abel, Ismenia, Tony, Magui, Eva, Ricardo, Sonia, Erika, que aún en la distancia me han apoyado.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2-42
EL ESTRÉS OSMÓTICO	2
OSMORREGULACIÓN	4
Solutos compatibles.....	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Ventajas de <i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudio	7
RESPUESTA A ESTRÉS EN LEVADURA	8
Estrés general.....	8
Estrés por falta de nutrientes.....	10
Estrés por calor.....	11
Estrés oxidativo	12
Estrés por sales	13
Estrés osmótico.....	14
<i>Estrés hipo-osmótico</i>	14
<i>Estrés hiperosmótico</i>	15
FISIOLOGÍA DE <i>S. cerevisiae</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS	
HIPEROSMÓTICO	16
Acumulación de glicerol	19
Vías de transducción de señales involucradas en la respuesta a	
estrés hiperosmótico	21
<i>Vía de HOG</i>	21
<i>El complejo represor Ssn6-Tup1-Sko1</i>	26
<i>Vía de PKA</i>	27

ANTECEDENTES -----	31
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS -----	34
MÉTODOS Y MATERIALES -----	35
RESULTADOS -----	43
1. CON RESPECTO AL AISLAMIENTO DEL GEN AFECTADO EN LA MUTANTE <i>sy</i> -----	43
1.1. Determinación de la representación del banco genómico de la mutante <i>sy</i> -----	43
1.2. Determinación del método de selección de las transformantes positivas -----	44
1.3. 1 ^{ra} Transformación con el banco genómico de <i>sy</i> -----	45
1.4. 2 ^{da} Transformación con el banco genómico de <i>sy</i> -----	48
1.5. 3 ^{ra} Transformación con el banco genómico de <i>sy</i> -----	49
1.6. 4 ^{ta} Transformación con el banco genómico de <i>sy</i> -----	51
1.7. 5 ^{ta} Transformación con el banco genómico de <i>sy</i> -----	53
2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA MUTANTE <i>sy</i> EN DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS -----	56
2.1. En diferentes condiciones de estrés osmótico la mutante <i>sy</i> es más tolerante que la cepa silvestre RS58 y depende de Hog1p-----	56
2.2. En condiciones de estrés oxidativo y estrés por etanol <i>sy</i> es más tolerante que RS58 y parcialmente independiente de la vía de HOG-----	58
2.3. En condiciones de estrés por alta temperatura <i>sy</i> es más tolerante que RS58, parcialmente independiente de la vía de HOG y semidominante sobre un fondo genético silvestre -----	59

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS EN LA MUTANTE <i>sy</i>, Y COMPARACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS CON OTROS FONDOS GENÉTICOS	61
3.1. La mutación <i>sy</i> no provoca una expresión constitutiva significativa de los genes de respuesta a estrés	62
3.2. La acumulación de mensajeros que se sabe están fuertemente regulados por la vía de HOG, los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p y la vía de PKA; en condiciones de estrés osmótico, es mayor en la mutante <i>sy</i>	62
3.3. La cinética de expresión de los genes de respuesta a estrés GRE1, GRE2, GRE3, CTT1, TPS1 y GPD1 es muy parecida entre la cepa silvestre RS58 y la mutante <i>sy</i>	64
3.4. El efecto de la mutación <i>sy</i> induce la expresión de genes de respuesta a estrés independientes de la vía de HOG en condiciones de estrés osmótico	64
4. FENOTIPO DE TOLERANCIA DE LA MUTANTE <i>sy</i> EN UN FONDO GENÉTICO <i>msn2p/msn4p</i> Y EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	69
4.1. <i>sy</i> no parece ser ninguno de los factores de transcripción Msn2p o Msn4p, y no depende de ellos para tolerar el estrés oxidativo	69
4.2. El fenotipo de crecimiento y tolerancia de <i>sy</i> aparentemente no se afectan al cambiar la fuente de carbono	71
DISCUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	79

RESUMEN.

Es importante comprender los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al estrés en diferentes organismos debido a su impacto en el avance de la ciencia básica y de la ciencia que apoya el campo de la biotecnología, la agricultura y la medicina. Sin embargo, el estudio se dificulta en eucariotes superiores por lo que tradicionalmente se han utilizado organismos modelo ya que en estos se facilita y agiliza el empleo de las herramientas moleculares. Uno de ellos es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que además de ser un modelo eucariote sencillo, desde 1996 se conoce la secuencia de su genoma completo. Por otra parte, la aplicación de las levaduras en la biotecnología tradicional como la industria fermentativa, panificadora, y vinatera; requiere de cepas resistentes a las condiciones de estrés que se dan en tales procesos (calentamiento, oxidación, hiperosmolaridad, desecación, rehidratación y congelamiento). En resumen, el estudio de la respuesta al estrés en *S. cerevisiae* es importante por su papel como modelo eucariote y por su gran aplicación en la industria alimenticia (Attfield, 1997).

El presente trabajo trata de la caracterización de una mutante de la levadura *S. cerevisiae* nombrada como *sy* (super yeast). *sy* es una mutante espontánea y se aisló en este laboratorio (Garay A.A). Una caracterización previa demostró que segrega como una mutación monogénica, tiene un fenotipo tolerante en varias condiciones de estrés y es dominante en un fondo genético silvestre. Mediante un estudio detallado del fenotipo de esta mutante se encontró que es mucho más tolerante que la cepa silvestre a condiciones de estrés osmótico, oxidativo, por etanol, choque térmico y congelamiento. Además, en un análisis de la acumulación de varios transcritos de genes que se sabe están involucrados y regulados de diferente manera en la respuesta al estrés, encontramos que la mutación *sy* está modulada por estrés y al parecer participa en alguna vía de respuesta general a estrés o varias vías de señalización. Por otra parte se trató de aislar el gen afectado en la mutante *sy* complementando el fenotipo tolerante en la cepa silvestre, propósito que no se logró mediante el método diseñado.

INTRODUCCIÓN.

EL ESTRÉS OSMÓTICO.

Estrés es aquella condición ambiental que demanda una respuesta celular específica y que puede imponer un efecto negativo en el crecimiento, es decir, no es la condición óptima de crecimiento. Todos los organismos están expuestos a situaciones de estrés, algunas se dan durante el desarrollo y otras por imposición ambiental. Las condiciones de estrés más comunes son: el estrés nutricional, el estrés osmótico, el estrés por temperatura, el estrés oxidativo y la exposición a agentes tóxicos. La mayoría de los organismos son capaces de responder y adaptarse a tales condiciones, siempre y cuando no sean extremas (Hirayama, 1995).

El estrés osmótico está considerado como el factor ambiental que más limita el crecimiento y productividad de las plantas (principalmente de zonas áridas). Esta condición de estrés representa una dificultad en la disponibilidad de agua y puede ser generado por la osmolaridad del medio y por altas o bajas temperaturas (aquellas que provocan congelamiento) (Lee, 1999). Sabemos que el proceso de la vida demanda agua, y que el papel del agua es central en la vida celular debido a que: i) provee un ambiente apropiado para la estructura de los componentes celulares (proteínas, ácidos nucleicos y membranas); ii) es el principal solvente de las reacciones bioquímicas y, iii) determina la turgencia, forma y tamaño de las células y el organismo completo (Hohmann, 1997).

Los organismos necesitan mantener el contenido de agua dentro de ciertos límites ya que los procesos biológicos requieren una concentración óptima de agua. Si un organismo experimenta un cambio en la disponibilidad de agua se está enfrentando a una condición de estrés osmótico. Por ejemplo, un incremento en la osmolaridad externa induce una situación de déficit de agua (estrés hiperosmótico), la cual podría reducir el crecimiento y viabilidad celular como consecuencia de la pérdida del potencial osmótico a través de la membrana. En términos

bioquímicos el estrés osmótico está dado por un cambio en el potencial hídrico externo (Ψ_w), es decir, un cambio en la cantidad de energía libre del agua.

En organismos que tienen pared celular y membrana plasmática como bacterias, hongos y plantas, el potencial hídrico (Ψ_w) es la suma del potencial de presión (Ψ_p), el potencial osmótico o potencial del soluto (Ψ_s), el potencial gravitacional (Ψ_g) y el potencial de matriz (Ψ_m). Se sabe que la aportación de este último potencial a la Ψ_w es significativo en casos de severa deshidratación celular y se refiere al agua unida a superficies extremadamente secas; cuando no es así su valor es insignificante o nulo (Fisher, 2000).

$$\Psi_w = \Psi_p + \Psi_s + \Psi_g + \Psi_m$$

Donde:

$$\Psi_p = P$$

$$\Psi_s = -\pi$$

$$\Psi_g = P_w g h$$

$$\Psi_m = 0$$

P = Presión de turgencia: representa la presión hidrostática generada por la membrana plasmática en contra de la pared celular.

π = Presión osmótica: está determinada por la concentración de solutos y es de valor negativo debido al potencial de los mismos .

P_w = densidad del agua.

g = aceleración gravitacional.

h = distancia relativa al punto de referencia.

Dado que los solutos aumentan las fuerzas cohesivas del agua, las moléculas de agua tienen mas libertad de movimiento (potencial o energía libre) en una solución poco concentrada. Es por esto que en dos soluciones de diferente concentración separadas por una membrana semipermeable, el agua fluye a favor de su gradiente (de la región menos concentrada a la mas concentrada) hasta igualar las diferencias entre los potenciales hídricos de ambas soluciones. Es decir, en una

célula que enfrenta una condición de estrés hipo-osmótico (un potencial hídrico externo mas alto), el agua entra a la célula hasta que la dilución ejerce la presión de turgencia necesaria para equilibrar las diferencias de presión entre el interior y el exterior celular. En el caso contrario, una condición de estrés hiperosmótico (potencial hídrico externo mas bajo) el agua sale de la célula provocando deshidratación y disminución de la presión de turgencia hasta que esta se equilibra con la presión osmótica ejercida por la concentración intracelular de solutos.

Para mantener una cantidad de agua intracelular que le permita a la célula contender con algún tipo de estrés osmótico no letal, los organismos han desarrollado mecanismos de osmorregulación, esto es, equilibran las presiones hídricas modulando los niveles intracelulares de osmolitos (solutos compatibles); ya sea induciendo procesos de catabolismo y/o expulsión de solutos en el caso de una condición de estrés hipo-osmótico, o por biosíntesis y/o reclutamiento de solutos del medio en una condición de estrés hiperosmótico. De esta manera la célula trata de mantener una presión de turgencia que le permita realizar procesos propios de la vida celular como la expansión y división (Blomberg,1997).

OSMORREGULACIÓN.

Ante un aumento en la concentración de solutos de la solución externa (estrés hiperosmótico) se produce deshidratación celular vía ósmosis como consecuencia de la alta permeabilidad de las membranas biológicas. La cantidad de agua que se pierde en respuesta al estrés hiperosmótico está determinada por la magnitud del estrés (concentración extracelular de solutos) y por características específicas de la célula como la elasticidad o resistencia mecánica de la pared celular, composición lipídica de la membrana plasmática, concentración intracelular de osmolitos, etc. Para contender con este tipo de estrés las células bajan su potencial osmótico acumulando solutos compatibles y ajustando algunos iones tratando de mantener y eficientizar su contenido de agua. Este proceso fisiológico por el cual las células se adaptan a condiciones de

estrés osmótico regulando su contenido de agua, es conocido como osmorregulación (Blomberg, 1997).

Se sabe que el ajuste iónico a través de canales, bombas y antiportadores juega un papel importante en la respuesta al estrés osmótico en bacterias, algas y plantas (Blomberg, 1992). Sin embargo, una de las principales respuestas mantenidas a través de la evolución en organismos que viven en condiciones hiper-osmóticas es la síntesis y acumulación de solutos compatibles. Tal estrategia de adaptación es empleada por todos los tipos celulares para ajustar la osmolaridad intracelular a la del medio (Garay y Covarrubias, 1999).

Solutos compatibles.

Se les llama solutos compatibles porque son compuestos con bajos efectos deletéreos en la maquinaria metabólica celular, es decir, no afectan los procesos físicos y bioquímicos que ocurren al interior celular. También se les conoce como osmolitos u osmoprotectores y, entre ellos, se destacan los polioles (glicerol, sorbitol, manitol), azúcares no reductores (trehalosa, sacarosa), aminoácidos (glutamato, prolina, glicina-betaina) y algunos iones. Cabe aclarar que estos solutos compatibles son específicos de cada especie y del estado de crecimiento, y son acumulados tanto en microorganismos como en eucariotes superiores (Nomura, 1998).

Los solutos compatibles pueden ser sintetizados y acumulados por la célula y/o transportados del medio. Hasta ahora se ha reportado que su contribución como osmoprotectores se debe a que: (1) aumentan la fuerza cohesiva del agua, (2) mantienen la plasticidad de la membrana y (3) estabilizan las proteínas contra desnaturalización (Serrano, 1993)

La producción de solutos compatibles está controlada a nivel de expresión génica en levaduras, plantas y mamíferos. Para regular la expresión génica la célula percibe los cambios osmóticos y transmite la señal al núcleo. Se ha observado que la mayoría de las células eucariotas emplean vías de transducción a través de proteínas cinasas (MAP) para este propósito (Rep, 2000).

Saccharomyces cerevisiae.

Desde la antigüedad esta levadura se ha utilizado ampliamente en la industria fermentativa. Es un eucariote unicelular y pertenece al grupo de levaduras anaerobias facultativas. Se reproduce asexualmente por gemación (mitosis) y sexualmente por apareamiento de dos células haploides formando un cigoto diploide el cual puede crecer mitóticamente o dividirse por meiosis para generar 4 células haploides nuevas. Esta habilidad de controlar la alternancia entre la reproducción sexual y asexual facilita el análisis de segregación génica.

En condiciones de aereación, *S.cerevisiae.* tiene la habilidad de crecer a través de metabolismo aeróbico o anaeróbico, dependiendo de la fuente de carbono disponible. Cuando hay abundante glucosa disponible, esta levadura apaga los mecanismos para utilizar fuentes de carbono alternativas, y cataboliza glucosa principalmente por fermentación. Como se muestra en la figura 1, un cultivo de levadura en medio rico (YPD) muestra distintas fases de crecimiento: después de un período corto de ajuste al medio (fase lag) las células se dividen exponencialmente (fase exponencial) utilizando como fuente de carbono azúcares fermentables, principalmente glucosa y fructosa. Estos azúcares inmediatamente entran a la vía glucolítica donde se obtiene ATP de la fosforilación del sustrato y los mismos son convertidos a piruvato y después a etanol y CO₂. Cuando la concentración de glucosa es menor de 0.2%, las células experimentan un arresto transitorio (cambio diáuxico) donde reprograman su metabolismo para la respiración (fase post-diáuxica) y para poder utilizar los productos de la fermentación (etanol, acetato y otros) como fuente de carbono. En esta fase (Figura 1), la tasa de división celular baja y empieza la acumulación de los carbohidratos de reserva, glucógeno y trehalosa, los que serán utilizados para mantener el cultivo en la última fase (fase estacionaria). En la fase estacionaria las células cesan la división, tienen una tasa metabólica muy baja y se adaptan a la falta de nutrientes, promoviéndose la desrepresión de muchos genes de respuesta a estrés (Fuge, 1997).

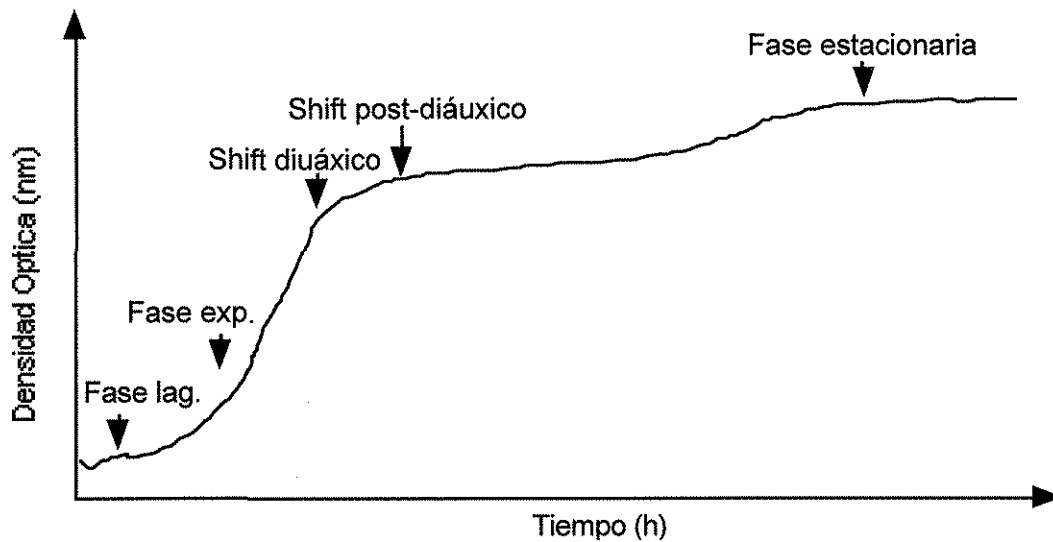


Figura 1. Curva de crecimiento de *S. cerevisiae* en medio rico (YPD).

Ventajas de *S. cerevisiae* como modelo de estudio.

Algunas de las particularidades que hacen de esta levadura un organismo modelo son (1) en cuanto a su crecimiento: su rapidez, no patogenicidad, un patrón de gemación que produce células y colonias aisladas, lo que facilita la réplica y aislamiento de mutantes a través de marcadores. (2) Un sistema genético sencillo, es decir, su reproducción sexual a partir de células haploides, formación de un diploide y generación de 4 esporas permite el estudio de la dominancia y segregación génica a través del aislamiento manual y por auxotrofias de las células hijas. (3) Un sistema de transformación del DNA versátil: con la introducción de plásmidos y por recombinación homóloga, se pueden reemplazar genes con alelos alterados o interrumpidos e identificar mutaciones o genes por complementación con bibliotecas genómicas. (4) La disposición comercial de un gran número de cepas con diferentes marcadores y el conocimiento de la secuencia de su genoma completo. Todas estas características hasta ahora han permitido un gran avance en la biología molecular de este organismo (Güldener, 1996) (Ito, 2000).

Dadas las ventajas que ofrece como modelo de estudio y el gran impacto de su estudio en el sector agrícola, biotecnológico y médico; uno de los mecanismos más incursionados en levadura es la respuesta al estrés .

RESPUESTA A ESTRÉS EN LEVADURA.

Durante su ciclo de vida *S. cerevisiae* se enfrenta a constantes cambios en el ambiente y, su sobrevivencia depende de su capacidad de adaptación ante ellos. Es decir, cuando las condiciones ambientales cambian abruptamente, las células necesitan ajustar rápidamente su programa de expresión génica para contender con la nueva condición. El mecanismo de adaptación se puede dividir en tres partes: (1) percepción de la señal externa; (2) transmisión intracelular de esta señal, lo que permite (3) una respuesta adaptativa que involucra la modulación de proteínas preexistentes e inducción transcripcional del grupo de genes correspondientes a otras proteínas que participan en contrarrestar los efectos impuestos por el estrés. Es decir, algunas proteínas constitutivas de la célula pueden ser activadas por señales de estrés dando lugar a una respuesta inmediata como la activación de algunas cinasas. Tal respuesta tiene dos funciones: proveer una protección mínima contra el estrés inicial, e iniciar una respuesta tardía (P. ejemplo, la activación de mecanismos moleculares implicados en procesos homeostáticos), la cual puede proteger a las células por más tiempo y permitir una adaptación permanente al estrés (Wuytswinkel, 2000).

Estrés general.

Por otro lado, se sabe que en *S. cerevisiae* sucede algo que se conoce como tolerancia adquirida, donde las células de levadura, previamente expuestas a un estrés moderado, pueden adquirir resistencia contra un estrés severo causado por el mismo factor. También se ha demostrado que las células de levadura expuestas a ciertas condiciones de estrés desarrollan tolerancia contra

algunas otras condiciones de estrés. A este último fenómeno se le llama protección cruzada y sugiere la existencia de un sistema general de respuesta a estrés (Ruis, 1995). Es decir, se cree que además de existir mecanismos de defensa específicos para cada tipo de estrés, también hay mecanismos comunes de protección general que ocurren bajo diferentes condiciones de estrés. Como ejemplos de lo anterior, tenemos que durante una condición de choque térmico se induce la actividad tanto del regulón que involucra al factor Hsf1p, el cual controla un grupo específico de chaperonas, como la actividad del regulón que involucra a los factores de transcripción Msn2p/Msn4p. Similarmente, el estrés oxidativo desencadena por un lado, la actividad de los factores transcripcionales Yap1p y Skn7p, los cuales inducen genes que juegan un papel central en el mantenimiento del potencial redox de la célula, y por otro lado activa la transcripción génica mediada por los factores Msn2p y Msn4p (Garreau, 2000). Es decir, hay genes de respuesta a estrés cuya transcripción está regulada por diferentes condiciones de estrés, y muchos de estos genes contienen en su región promotora la secuencia consenso CCCCT conocida como elemento **STRE** (Elemento de Respuesta a Estrés), este puede ser activado por diferentes condiciones de estrés, como lo son el estrés: osmótico, oxidativo, por falta de nitrógeno, por bajo pH externo y por choque térmico (Moskvina, 1999). Se sabe además, que al elemento STRE se unen los factores **Msn2p** y **Msn4p** para activar la transcripción de genes de respuesta a estrés, y tales factores transcripcionales están modulados por la vía de la proteína cinasa A (**PKA**) dependiente de AMP cíclico (AMPc). Otra respuesta común de la levadura durante diferentes condiciones de estrés, es que presenta una disminución en la tasa de crecimiento celular y, se sabe que la expresión génica relacionada al crecimiento está estimulada por la alta actividad de la vía de PKA. Es decir, cuando la vía de PKA-AMPc se encuentra activa, la transcripción de genes de estrés vía el elemento STRE está reprimida, mientras que la expresión génica relacionada al crecimiento se encuentra activa (Smith, 1998). Además, recientemente se analizó mediante microarreglos la expresión y represión de diferentes genes en diferentes condiciones de estrés, y

se observó que efectivamente hay una respuesta general de estrés, la cual contiene con los requerimientos celulares comunes en diferentes condiciones de estrés, como lo son: la generación y almacenamiento de energía, la defensa contra especies reactivas de oxígeno, la síntesis de osmolitos, el recambio y plegamiento de proteínas, y la reparación del DNA. Todos estos procesos representan un sistema fisiológico que puede proteger a las células bajo cualquier circunstancia (Gash, 2000).

Estrés por falta de nutrientes.

El mecanismo por el cual las células de levadura sobreviven a períodos repetidos de falta de nutrientes involucra una dramática baja en la actividad metabólica, arresto del ciclo celular y, una variedad de cambios morfológicos y fisiológicos que permiten a las células sobrevivir por largos períodos de tiempo sin añadir nutrientes. Este período en el ciclo celular es llamado fase estacionaria. La respuesta a la falta de nutrientes y la entrada a fase estacionaria están relacionadas a la actividad de la vía de **Ras-AMPC**, que señala la disponibilidad de nutrientes (Johannes, 1997). Se sabe que esta vía regula el crecimiento, la progresión del ciclo celular y la actividad metabólica (Pedruzzi, 2000).

El rápido crecimiento de las células de levadura en medio rico correlaciona con una alta actividad de la vía de Ras. En estas células el nivel de AMPC es más alto que el de células creciendo en un medio sin glucosa. En levadura, las proteínas Ras unidas a GTP estimulan la adenilato ciclasa para producir un aumento en el nivel intracelular de AMPC. Cuando esto sucede, el AMPC se une a la subunidad reguladora (bcy1) de la proteína cinasa A (**PKA**), liberándose la subunidad catalítica de PKA. PKA activo puede fosforilar un gran número de proteínas involucradas en transcripción, glucólisis, progresión del ciclo celular y, acumulación de glucógeno y trehalosa (Jiang, 1998). Además, se sabe que cuando PKA se encuentra inactivo, es decir, cuando bajan los niveles de AMPC, se induce la transcripción de genes regulados por el

elemento STRE y/o PDS (cambio post-diáuxico). Este último elemento PDS media la activación durante crecimiento en fase diáuxica, estacionaria y bajo condición de estrés por choque térmico (Pedruzzi, 2000) (ver figura 5).

Estrés por calor.

La respuesta a esta condición de estrés es la mejor caracterizada en levadura. Cuando las células de levadura se enfrentan a una temperatura 12°C por arriba del rango de temperatura normal de crecimiento (25°C - 30°C), sufren un arresto transitorio del ciclo celular y se induce la expresión de un gran grupo de genes, dando lugar a la acumulación temporal de las proteínas de choque térmico (**Hsp's**). Estas proteínas juegan un papel importante protegiendo otras proteínas celulares contra la desnaturalización térmica y restaurando su actividad biológica (Mager, 1997). Además, se induce la síntesis y acumulación citoplásmica de trehalosa, disacárido conocido como uno de los sustratos mas efectivos en la preservación estructural tanto de la membrana plasmática como de la actividad enzimática durante condiciones de desecación, congelamiento y altas temperaturas. Se sabe que las proteínas de choque térmico actúan como chaperonas moleculares en el plegamiento y/o transporte de otras proteínas tanto en condiciones de estrés como en condiciones normales de crecimiento. Se dice que el estrés por altas temperaturas puede ser percibido a nivel de desnaturalización de proteínas; esto provoca la desestabilización del complejo inactivo formado por el factor transcripcional específico de choque térmico **Hsf1p** (**Heat Shock Factor**) con la proteína **Hsp70**, evento que permite la liberación y activación de **Hsf1p**. Al activarse **Hsf1p** se promueve la transcripción vía el elemento consenso de choque térmico **HSE** (**Heat Shock Element**) presente en la región promotora de los genes blanco (Mager y Moradas, 1993). Se ha observado que en condiciones de choque térmico la expresión de algunos genes se induce parcialmente a través del elemento STRE. Tal es el caso de **HSP12**, **HSP78**, **HSP104** y **HSP82** entre otros (Treger, 1998). Esta alternativa (la inducción de genes vía

el elemento **STRE**) es una de las razones por las cuales células pre-expuestas a choque térmico adquieren cierta tolerancia a estrés osmótico y oxidativo (Piper, 1995). Además, recientemente se observó que la cepa mutante $\Delta ptc2ptc3$ (PTCs, fosfatasas que regulan la cinasa Hog1p), no es viable en condiciones de estrés por calor, y que tal letalidad depende de la cinasa Hog1p. Este análisis reveló que la cinasa Hog1p se activa en condiciones de estrés por calor, y algunos ensayos bioquímicos indican que tal activación ocurre en la entrada a la vía de HOG que involucra a la proteína Sho1p, la cual transfiere la señal a través de las proteínas Cdc42, Ste20, Ste50 y Ste11 (Winkler, 2002).

Estrés oxidativo.

Se considera una condición de estrés oxidativo a todo aquel agente que provoca la formación de especies reactivas de oxígeno (**ROS**) en tal cantidad que supere los límites normales de ROS producidas por el propio metabolismo celular. Cabe aclarar que hay varios tipos de ROS y, aunque no todas generan la misma respuesta, si se sobreponen entre ellas. Las especies reactivas de oxígeno se generan por el propio metabolismo celular y por exposición a: radiación ionizante, químicos y metales pesados; estos causan daño principalmente a proteínas, lípidos y DNA (Inoue, 1999). Se ha observado que el estrés oxidativo afecta la fuerza protónica y fluidez de la membrana plasmática. Por lo anterior se ha sugerido que es en este punto donde se percibe tal condición (Piper, 1995). Se sabe que el estrés oxidativo está señalizado por un regulón y se ha observado que son varios los factores transcripcionales que juegan un papel en la respuesta. Entre ellos: **Yap1p** a través del elemento AP-1 (**ARE**), **Msn2p** y **Msn4p** a través del elemento **STRE** (Hong, 2002), **Skn7p**, **Hsf1p** vía el elemento **HSE** (Raitt, 2000a), y **Gcn4p** (Jamieson, 1998). Por medio de todo este gran aparato se induce la expresión de aproximadamente 160 proteínas en condiciones de estrés oxidativo (Godon, 1998). Para responder a tal condición de estrés las células de levadura poseen dos mecanismos de defensa que tienen como propósito

contrarrestar la cantidad de ROS generados. Uno es el mecanismo de defensa antioxidante no-enzimático, el cual incluye moléculas que actúan como reductores del interior celular removiendo así las ROS. Entre estas moléculas se destacan: las metalotioneínas (Cup1, Crs5), flavohemoglobina (Yhb1), tiorredoxinas (Trx1, Trx2) y glutarredoxinas (Grx1, Grx2). El otro mecanismo de defensa antioxidante es enzimático y está compuesto principalmente por las catalasas CTT1 y CTA1; y superoxidodismutasas SOD1 y SOD2; que catalizan la degradación de H₂O₂ y radicales superóxidos respectivamente (Jamieson, 1998).

Se ha observado que la respuesta a estrés oxidativo se sobrepone con la respuesta a estrés osmótico, choque térmico, falta de nutrientes, congelamiento (Park, 1998) y a algunos metales pesados (Wu, 1993). Además, como sucede durante otras condiciones de estrés, las células de levadura tienen mayor tolerancia (capacidad antioxidante) en fase estacionaria (crecimiento respiratorio) que en fase logarítmica de crecimiento (Costa, 1997).

Estrés por sales.

Cuando las células de levadura se transfieren a un medio con una alta concentración de NaCl se observa una respuesta a estrés osmótico mediada por la baja actividad de PKA, esto promueve la transcripción de algunos genes de respuesta a estrés como el gen GPD1 (que codifica la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) (Blomberg, 1999). Además, se desencadenan respuestas específicas provocadas por el ion Na⁺. Este ion entra a las células de levadura a través de los canales de K⁺ (codificados por los genes TRK1 y TRK2) y, al parecer, su toxicidad se debe a que interfiere con los procesos celulares que requieren K⁺. Para prevenir una extensa toma de Na⁺, los canales de K⁺ cambian de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad. Por otro lado, el exceso de Na⁺ que ha entrado a la célula es expulsado a través de una ATPasa de tipo P codificada por el gen ENA1 el cual es inducido por sal y, representa el único sistema de salida de Na⁺ identificado en esta levadura (Norbeck, 1997). Se ha estudiado la relación entre las proteínas

Trk1, Ena1 y **calcineurina**, dado que el fenotipo de la interrupción del gen TRK1 o del gen ENA1 es el mismo que exhiben las cepas deficientes de calcineurina, es decir, muestran un fenotipo sensible a altas concentraciones de Na⁺. Se sabe que calcineurina es una fosfatasa (tipo 2b) que requiere Ca⁺² y **calmodulina** para su activación, y en levadura forma un heterodímero que consiste de una subunidad catalítica codificada por un par de genes homólogos (CNA1 y CNA2) y una subunidad reguladora codificada por el gen CNB1. En células deficientes de calcineurina no se activa la expresión del gen ENA1 y los canales de K⁺ no pueden pasar del estado de baja a alta afinidad en una condición de alta concentración de sal (Varela, 1996).

Se ha demostrado que hay varias proteínas reguladoras involucradas en tolerancia a sal (Hal1p, Hal2p Hal3p, Ppz1p y Ppz2p) pero todas modulan de alguna manera la salida de Na⁺ vía la ATPasa codificada por ENA1 y algunas también afectan el sistema de transporte de K⁺. La inducción de ENA1 por alta concentración de Na⁺ es específica de la vía mediada por calcineurina, y sucede a través del complejo activador de la transcripción **Crz1/Tcn1/Hal8**, mientras que la expresión de ENA1 en respuesta a estrés osmótico provocado por baja concentración de sal está regulada por la **vía de HOG** a través del inhibidor transcripcional **Sko1**. Además, el gen ENA1 está sujeto a represión por glucosa vía el complejo de represión general **Mig1-Ssn6-Tup1** (Crespo, 2001).

Estrés osmótico.

Estrés hipo-osmótico.

Ante una condición de estrés hipo-osmótico las células de levadura liberan glicerol al medio a través del facilitador **Fsp1p**. Este se encuentra inactivo en células expuestas a estrés hiperosmótico y no está regulado por la vía de HOG. Al parecer la actividad del facilitador Fsp1p está modulada por la proteína cinasa C (**PKC**), enzima que, a través de una cascada de MAP cinasas, señala al estrés hipo-osmótico. Se sabe que la proteína cinasas C, codificada por

el gen PKC1, regula la cascada de MAP cinasas compuesta por la MAPKKK **Bck1**, las MAPKKs **Mkk1** y **Mkk2**, y la MAPK **Mpk1**. La vía de PKC1 regula la morfogénesis y el crecimiento celular modulando la síntesis de enzimas involucradas en el ensamblaje de la pared celular, y se ha observado que las mutantes *pkc1*, muestran un fenotipo de lisis y reducción en el contenido de β -glucano en la pared celular. Además, hay evidencia de que en condiciones de estrés hipo-osmótico y estrés por calor, se promueve la desnaturalización proteica y, se observa un adelgazamiento tanto de la pared celular como de la membrana plasmática (Varela, 1996). Lo anterior indica que la vía de PKC se requiere para mantener la integridad de la pared celular en condiciones de baja osmolaridad y estrés por calor (Winkler, 2001). Por otra parte, se demostró que la MAPK Mpk1 es rápidamente fosforilada en respuesta al estrés hipo-osmótico, y que tal fosforilación se mantiene inhibida en condiciones de estrés hiperosmótico, hecho que sugiere hay comunicación entre la vía de PKC y la vía de HOG (Tao, 1999).

Estrés hiperosmótico.

Otra respuesta a estrés bien caracterizada en levadura es la que se da en una condición de estrés hiperosmótico. Entre los cambios fisiológicos que ocurren durante tal situación el más evidente es la síntesis y acumulación de glicerol, principal responsable del mecanismo de osmorregulación, involucrado en el mantenimiento del turgor celular (Miralles, 1995). Se ha demostrado que la biosíntesis de glicerol está regulada a nivel transcripcional principalmente por la **vía de HOG (High Osmolarity Glicerol)**. Esta vía solo se activa en condiciones de estrés hiperosmótico pero además regula la transcripción de genes que se inducen por múltiples condiciones de estrés. Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual se activa la vía de HOG, hay una teoría con fuerte evidencia, la cual propone que la señal es generada por un cambio en el turgor celular mas que por el estrés hídrico (Tamás, 2000). Independientemente de como sea el mecanismo de percepción se ha descrito una proteína putativa de membrana

plasmática Sln1p, que participa en un sistema de percepción y señalización parecido al de dos componentes en bacterias. Se sabe que en condiciones de estrés hiperosmótico los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p se unen al elemento STRE presente en el promotor de los genes blanco de la vía de HOG (Márquez, 1998).

FISIOLOGÍA DE *S. cerevisiae* EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.

Cuando la levadura se enfrenta a una condición de alta osmolaridad externa sufre un cambio inmediato en el volumen celular mediante la pérdida de agua del citosol. Tal deshidratación es un proceso rápido (aprox. 1min) y se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que esta acumula iones tóxicos en beneficio del citoplasma y los organelos (Serrano, 1993). Para sobrevivir y continuar con el crecimiento, las células deshidratadas pueden recuperar el turgor siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable. La proliferación celular se reanuda después de un período de aclimatación el cual varía dependiendo de un número de factores incluyendo el tipo y concentración del estrés, fondo genético de la cepa, y estado de crecimiento (Blomberg, 2000). En esta fase de aclimatación las células de levadura experimentan una serie de cambios como reestructuración del citoesqueleto de actina, arresto transitorio del ciclo celular, y reprogramación del metabolismo (Tao, 1999), al tiempo que se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Además se promueve la expresión de una gran gama de genes (Tabla 1), donde sus productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la producción de proteínas protectoras y el reajuste de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Todo esto para contender con el estrés osmótico (Rep, 2000).

Tabla 1. Genes que se inducen mas de 6 veces en condición de estrés hiperosmótico por sorbitol 0.95M (Tomado de Rep, 2000).

Nombre del gen	Descripción del producto génico
1. De la biosíntesis de glicerol, trehalosa y glucógeno	
<i>GPD1</i>	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa
<i>GPP2</i>	Glicerol 3-fosfatasa
<i>DAK1</i>	Dihidroxiacetona cinasa
<i>UGP1</i>	UDP-glucosa pirofosforilasa
<i>TPS1</i>	Trehalosa-6-fosfato sintasa
<i>TPS2</i>	Trehalosa-6-fosfatasa
<i>TSL1</i>	Subunidad del complejo de trehalosa sintasa
<i>NTH1</i>	Trehalasa
2. Metabolismo de azúcares	
<i>HXT5</i>	Miembro de la familia transportadora de hexosas
<i>STL1</i>	Miembro de la familia de permeasas de azúcar
<i>GLK1</i>	Glucocinasa
<i>GND2</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa
<i>TKL2</i>	Transcetolasa
<i>XKS1</i>	Xilulocinasa
3. Metabolismo de aminoácidos	
<i>CHA1</i>	Serina/treonina deaminasa
<i>ARO10</i>	Indol-3-piruvato descarboxilasa (putativa)
<i>ARO9</i>	Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos
<i>PUT4</i>	Prolina permeasa
<i>CAR1</i>	Arginasa

4. Metabolismo redox	
<i>ALD3</i>	Aldehído deshidrogenasa citosólica
<i>ALD2</i>	Aldehído deshidrogenasa mitocondrial
<i>ALD6</i>	Acetaldehído deshidrogenasa citosólica
<i>ALD4</i>	Acetaldehído deshidrogenasa mitocondrial
<i>GND2</i>	6-fosfogluconato deshidrogenasa
<i>GRE3</i>	Aldosa reductasa
<i>CYB2</i>	Citocromo b2 (L-(+)-lactato citocromo-c oxidoreductasa)
<i>GRE2</i>	Proteína similar a dihidroflavonol-4-reductasa
5. Proteínas protectoras y chaperonas	
<i>HSP12</i>	Proteína pequeña de choque térmico
<i>HSP26</i>	Proteína de choque térmico
<i>HSP42</i>	Proteína de choque térmico
<i>HSP104</i>	Proteína de choque térmico
<i>SSA3</i>	Chaperona de la familia de HSP70
<i>SSA4</i>	Chaperona de la familia de HSP70
<i>SSE2</i>	Chaperona de la familia de HSP70
<i>DDR2</i>	Proteína pequeña de choque térmico
<i>DDR48</i>	Proteína inducida por estrés
<i>ENA1</i>	ATPasa de tipo P
6. Protección contra agentes químicos y oxidativos	
<i>CTT1</i>	Catalasa T, citosólica
<i>GLO1</i>	Glioxilasa

7. Proteínas de superficie celular	
<i>SPS100</i>	Proteína específica de esporulación
<i>SPII</i>	Proteína de pared celular
<i>CWP1</i>	Manoproteína de pared celular
8. Proteínas de biogénesis y función vacuolar	
<i>VPS36</i>	Proteína involucrada en localización vacuolar
<i>PRB1</i>	yscB, proteasa B
9. Proteínas de señalización y control de expresión génica	
<i>TFS1</i>	Regulador del ciclo celular
<i>YAPA</i>	Factor transccripcional bZIP
<i>NAM8</i>	Proteína involucrada en traducción mitocondrial
10. Proteínas involucradas en proteólisis	
<i>SON1</i>	Subunidad de la partícula reguladora el proteosoma
11. Proteínas de función desconocida	
<i>PRY2</i>	Proteína similar a proteínas relacionadas a patogénesis en plantas
<i>NCE3</i>	Proteína involucrada en la vía de exportación de proteínas
<i>SOL4</i>	Proteína relacionada a Sol1p, Sol2p y Sol3p
<i>LPA13</i>	Proteína que se induce en estrés salino y bajo pH
<i>GRE1</i>	Proteína de función desconocida

Acumulación de glicerol.

En *S. cerevisiae* el glicerol es el único soluto compatible y el principal responsable del ajuste osmótico. El glicerol es producido a partir de dihidroxiacetona fosfato (intermediario de la vía glucolítica) en dos pasos enzimáticos (una reducción y una defosforilación) como se muestra en el esquema (fig. 2). Las dos enzimas involucradas son cada una codificadas por dos isogenes altamente homólogos: GPD1 y GPD2 codifican la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, en tanto que GPP1 y GPP2 codifican la enzima glicerol-3-fosfatasa. La expresión de estos genes

está regulada en respuesta a diferentes condiciones del crecimiento. La expresión de GPD2 y GPP1 se estimula bajo condiciones de crecimiento anaerobio donde la producción de glicerol es esencial para la regulación redox. Por otra parte, la transcripción de GPD1 y GPP2 se induce por un aumento en la osmolaridad externa, y se sabe que la vía de HOG juega un papel muy importante, aunque no exclusivo en la inducción osmótica de la expresión de estos genes (Rep, et al 1999a).

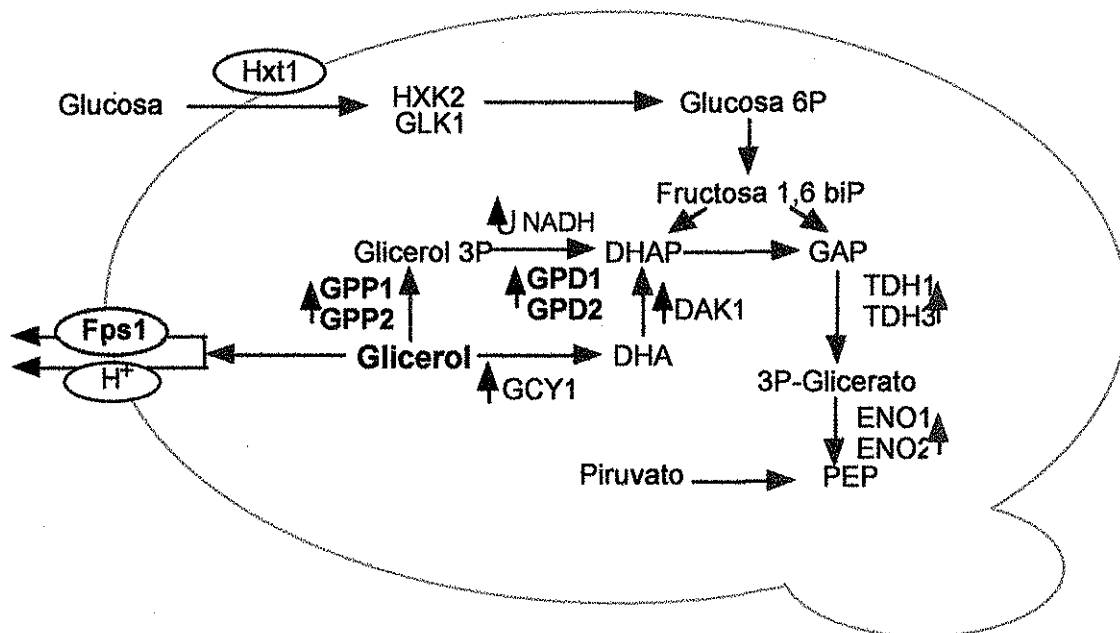


Figura 2. Vía de producción y eliminación de glicerol. Modificado de Norbeck y Blomberg, 1997. Las flechas en azul indican un incremento y las flechas en rojo una disminución en la concentración y/o actividad de las proteínas.

Como ya se mencionó anteriormente se ha identificado y caracterizado un canal protéico específico de glicerol en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, Fps1p (fig. 2). Este facilitador está involucrado en la liberación de glicerol una vez que disminuye la condición de estrés hiperosmótico. Sin embargo, Fps1p puede transportar glicerol en ambas direcciones y su actividad está regulada por estrés osmótico. Es decir, bajo una condición de estrés hiperosmótico Fps1p se cierra, asegurando la acumulación intracelular de glicerol (Tamás, 2000).

Además de tener un papel en osmorregulación, los polioles entre ellos el glicerol, pueden servir como reserva de carbohidratos, fuentes de poder reductor, y reguladores del pH celular ya que son un producto final neutro (Blomberg, 1992).

Vías de transducción de señales involucradas en la respuesta a estrés hiperosmótico.

La estimulación de la expresión génica después de un choque osmótico está mediada por diferentes vías, y entre ellas, la **vía de HOG** juega un papel central. Esta vía de MAP cinasas está involucrada a diferentes niveles en la expresión de aproximadamente 150 genes de respuesta a estrés (Rep, 2001). Muchos de los genes que se inducen por la vía de HOG son reprimidos por el complejo **Ssn6-Tup1-Sko1** y/o por la **vía de PKA**, la cual está modulada por la concentración de glucosa en el medio (Márquez, 1998), hecho que sugiere una relación entre la respuesta al estrés y el metabolismo. Además, hay otras dos vías de señalización activadas por estrés osmótico de las cuales se conoce poco. La primera involucra a la proteína **calcineurina**, que no responde a estrés osmótico general pero sí a alta concentración de sales. La otra se relaciona con alguna vía no caracterizada de **fosfoinosítidos**, ya que en condiciones de estrés hiperosmótico se acumula rápidamente fosfatidilinositol 3,5 bisfosfato, del cual se sabe que bajo otras condiciones actúa como segundo mensajero. Todo lo anterior significa que ante una condición de estrés osmótico la levadura activa coordinadamente varias vías de señalización (Eriksson, 2000).

Vía de HOG.

Como ya se dijo anteriormente, ante un aumento en la osmolaridad externa la vía de HOG juega un papel principal en la levadura *S. cerevisiae*. Además, es la vía mejor descrita en esta levadura. Se sabe que la **vía de HOG** está controlada por dos rutas alternas que pueden mediar de manera independiente su activación. Estas rutas se encuentran representadas por las proteínas transmembranales **Sln1p** y **Sho1p**, proteínas que convergen en la MAPKK **Pbs2p** (ver fig. 4). **Sln1p** forma parte de un sistema de fosforilación junto con **Ypd1p** y 2 reguladores alternos:

Ssk1p y Skn7p. Por otro lado, **Sho1p** se encarga de reunir un complejo de señalización en la membrana plasmática, donde se sabe participan las proteínas Ste50p y Ste11p, entre otras. Ante un aumento en la osmolaridad externa, los sensores de las dos entradas a la vía de HOG activan la cascada de MAP cinasas promoviendo rápidamente la fosforilación de la MAPK Hog1p y su translocación al núcleo. Se cree que una vez en el núcleo Hog1p fosforila los factores de transcripción responsables de la expresión de una gran familia de genes de respuesta a estrés hiperosmótico entre ellos GPD1, CTT1, GRE1, GRE2, GRE3, HSP12, DDR48, ALD2, etc. Entre los reguladores transcripcionales involucrados se encuentran **Msn2p/Msn4p**, **Msn1p**, **Hot1p**, **Skolp** y quizás otros aún no descritos (Reiser, 1999).

La entrada a la vía de HOG representada por la proteína **Sln1p**, contiene un sistema de fosforilación de tres componentes, **Sln1p**, **Ypd1p**, y **Ssk1p** (ver fig. 4). Estas tres proteínas son estructural y funcionalmente similares a las proteínas reguladoras que forman los sistemas de fosforilación de dos-componentes o tres-componentes en ciertas bacterias e incluso plantas y otros eucariotes. Sln1p está compuesto por un dominio extracelular NH₃-terminal, un dominio citoplásmico de histidina cinasa, y un dominio receptor en su COOH-terminal el cual contiene un residuo aspartato conservado entre las proteínas pertenecientes a los sistemas de señalización de dos componentes. Se ha postulado que Sln1p puede ser un osmosensor, porque además de ser una proteína transmembranal y formar parte de un sistema de fosfotransferencia, tiene gran similitud con el osmosensor de *Escherichia coli* EnvZ. Aunque la estructura completa de EnvZ es similar a la de Sln1p, EnvZ perdió el dominio receptor COOH-terminal presente en Sln1p (Gustin, 1998).

En condiciones de baja osmolaridad externa, Sln1p se encuentra activo y promueve su autofosforilación transfiriendo el fosfato de un ATP a un residuo conservado de histidina (576) en su dominio histidina cinasa. De la histidina 576 de una proteína Sln1p el fosfato es transferido al residuo aspartato (D1144) conservado en el dominio receptor COOH-terminal de una segunda proteína Sln1p como se muestra en la Figura 4. Posteriormente, el fosfato es transferido a un

residuo histidina en Ypd1p, y de ahí a un residuo aspartato conservado en el dominio receptor de **Ssk1p** o su homólogo **Skn7p**, se sabe que la actividad de ambas proteínas depende del estado de fosforilación de este residuo aspartato conservado (Li, 1998).

En condiciones de alta osmolaridad externa abunda la forma no fosforilada de la proteína **Ssk1p**, la cual se une y activa a las MAPKKs redundantes **Ssk2p** y **Ssk22p**, evento que promueve la activación de la MAPKK **Pbs2p** y posteriormente de la MAPK **Hog1p**. Una mutación en cualquiera de los cuatro aminoácidos conservados en las tres proteínas que forman el sistema de fosfotransferencia (Sln1p-His a Sln1p-Asp a Ypd1p-His a Ssk1p-Asp) bloquea completamente la regulación negativa de la vía de HOG, y como resultado de lo anterior hay una superactivación de la cascada de MAPK y por lo mismo toxicidad y muerte celular (Ketela, 1998). Además, se sugiere que el sistema Sln1p-Ssk1p media parte de la respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂ de manera independiente a Skn7p (Singh, 2000).

Por otro lado, se ha observado que **Skn7p** puede coordinar patrones de expresión génica en respuesta a estrés osmótico y a estrés oxidativo. Se sabe que la fosforilación de Skn7p en su residuo aspartato conservado a través del sistema Sln1p-Ypd1p, estimula su actividad transcripcional en respuesta a estrés osmótico involucrada en el ensamblaje de la pared celular, y la expresión de la ciclina G1, pero no en la respuesta a estrés oxidativo (Ketela, 1998). Sin embargo, se observó que la expresión del gen TRX2 a través de Skn7p responde a ambas vías, esto sugiere que puede haber un set de genes que responden tanto a estrés osmótico vía Sln1p-Ypd1p, como a estrés oxidativo, a través de la actividad de Skn7p de manera independiente al sistema Sln1p-Ypd1p (Li, 1998).

La segunda entrada a la vía de HOG requiere a las proteínas **Sho1p**, la proteína G **Cdc42**, la cinasa activada por p21 **Ste20** las proteínas **Ste11p**, y **Ste50p** para transmitir la señal de estrés osmótico (Winkler, 2002). La proteína Sho1p presenta cuatro dominios transmembranales cerca de su NH₃-terminal, y un dominio SH3 citoplásmico en su COOH-terminal que se une a un

segmento rico en prolina en el NH₃-terminal de Pbs2p. Se ha propuesto que el principal papel de Sho1p es anclar a las proteínas Ste11p, Ste50p, y Pbs2p a la membrana plasmática, complejo donde la MAPKK Pbs2p se activa al ser fosforilado por la MAPKKK Ste11p (Raitt, 2000). Ste50p es una subunidad integral y esencial de la cinasa Ste11p, se une a un sitio específico en su NH₃-terminal y la interacción es constitutiva, es decir, no está afectada por condiciones osmóticas ambientales. Se sabe además que Ste11p participa en otros módulos de MAP cinasas que regulan la respuesta a apareamiento, desarrollo pseudohifal, y respuesta a crecimiento invasivo (Posas, 1998).

Una vez que se fosforiló Pbs2p, la fosforilación de Hog1p en respuesta a un estrés hiperosmótico es rápida y transitoria. Se puede observar la fosforilación en tirosina de hog1p y su translocación al núcleo después de 1 minuto de exposición a 0.5M de NaCl (este tiempo depende de la severidad del estrés). Hog1p permanece fosforilado y localizado en el núcleo por aprox. 10 minutos, tiempo en el que se hace aparente un incremento en el nivel de mRNA de genes inducidos por estrés hiperosmótico (Rep, 2000).

Hasta ahora se ha observado que los genes de respuesta a estrés hiperosmótico están regulados positivamente por cuatro factores cuya contribución individual puede variar considerablemente dependiendo de los promotores específicos. Varios de los genes de respuesta a estrés hiperosmótico responde vía un par de factores funcionalmente redundantes, Msn2p y Msn4p, dos proteínas con dedos de zinc que actúan como factores transcripcionales generales de estrés. Estos factores se unen al elemento STRE, que usualmente se encuentra en dos o más copias en el promotor de los genes blanco. Una vez aplicado el estrés, Msn2p/Msn4p son fosforilados y translocados al núcleo, evento que se promueve sólo si baja la actividad de PKA (Fig. 4). Aún cuando se sabe la importancia de esta cinasa para la translocación de Msn2p/Msn4p al núcleo, también Hog1p juega un papel importante, ya que la inducción por estrés hiperosmótico de los promotores que contienen cajas STREs, se abate si se interrumpe la actividad de la vía de HOG,

lo que sugiere que además de PKA, también Hog1p controla la actividad de Msn2p/Msn4p en tales condiciones (Alepez, 2001)(Rep, 2000).

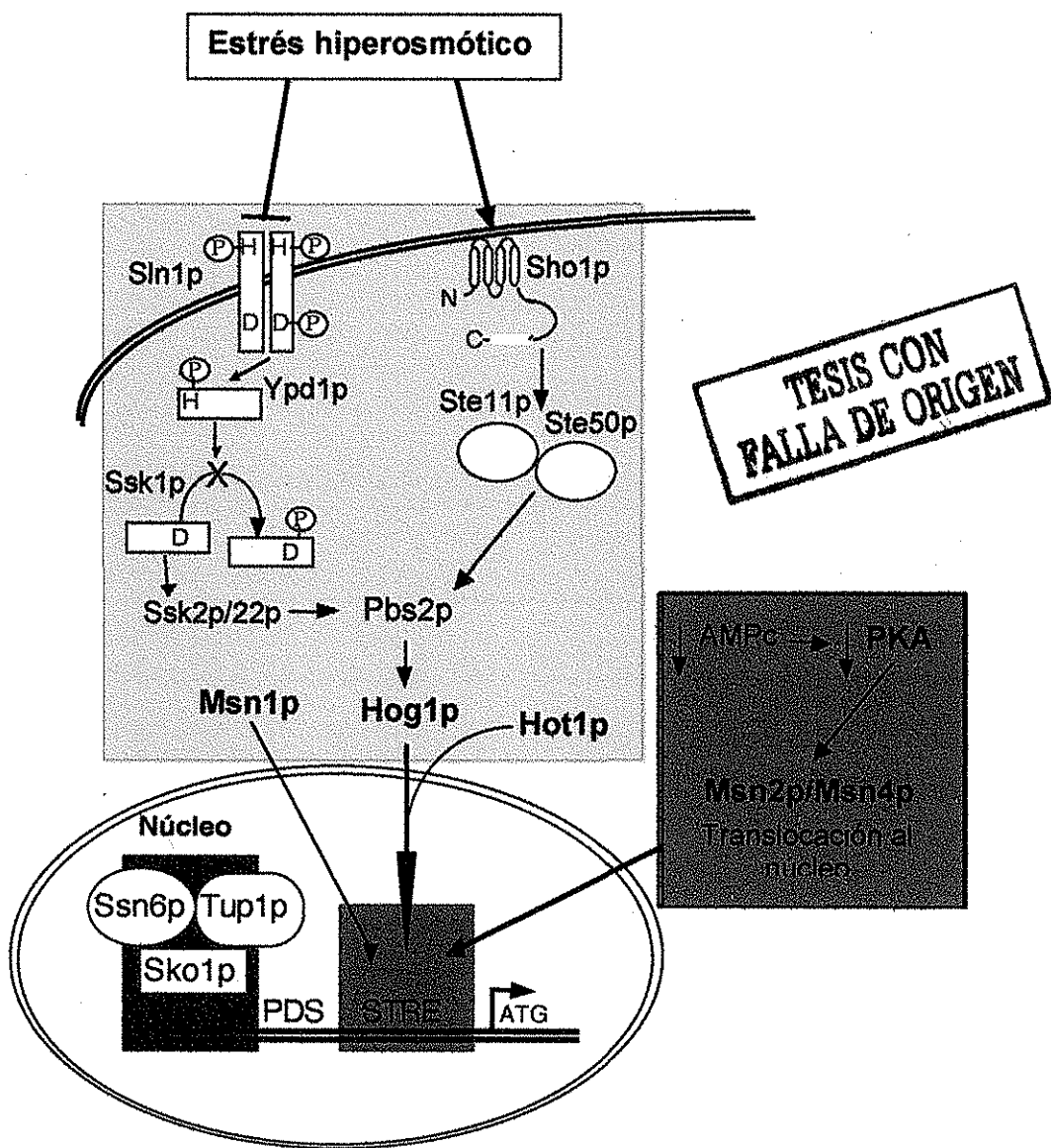


Figura 4. Vía de HOG

Una pequeña fracción de genes de respuesta a estrés hiperosmótico requiere de **Hot1p** y/o **Msn1p**, dos miembros de una familia peculiar de factores transcripcionales en levadura. Al parecer Hot1p, es particularmente importante para la inducción específica de los genes

involucrados en la producción de glicerol tales como GPD1 y GPP2 (esta inducción se ve dramáticamente disminuida en una mutante *hot1p*). *Hot1p* es hasta ahora el único factor de unión a DNA que se sabe interactúa físicamente (interactúan en un sistema de dos híbridos) con la MAPK *Hog1p* (Rep, 1999b).

Además de estar regulada indirectamente por la vía de PKA, la vía de HOG también está regulada negativamente de manera directa por la acción de las fosfatasa **Ptp2p**, **Ptp3p**, **Ptc1p** y posiblemente **Ptc3p**, las cuales defosforilan a la MAPK *Hog1p*. La actividad de *Hog1p* requiere de fosforilación dual en un residuo de treonina y un residuo de tirosina. *Ptp2p* y *Ptp3p* median la defosforilación de *Hog1p* en tirosina, mientras que *Ptc1p* y quizás *Ptc3p* median la defosforilación en treonina. La remoción o inactivación de estos reguladores negativos provoca reducción en el crecimiento celular y toxicidad a través de la superactivación de la vía de HOG (Mattison, 2000).

El complejo represor Ssn6-Tup1-Sko1.

El complejo proteico **Ssn6p-Tup1p** reprime por lo menos 6 grupos de genes en esta levadura, incluyendo genes reprimidos por glucosa, genes regulados por la presencia de oxígeno (genes hipóxicos), genes específicos de la feromona α , genes específicos de cepas haploides, un grupo de genes inducidos por daño a DNA y un grupo de genes de respuesta a estrés osmótico. Al parecer, para la represión de cada grupo de genes, el complejo *Ssn6p-Tup1p* interactúa con una proteína específica de unión a DNA que lo dirige a la región de éste donde reprime la transcripción a través la RNA polimerasa I y II. Ejemplos de lo anterior son **Mig1p**, proteína que se une a secuencias **UAR** y modula genes reprimidos por glucosa; **Rox1p**, que modula genes regulados por la presencia de oxígeno (Redd, 1997); y en el caso del grupo de genes de respuesta a estrés osmótico *Ssn6p-Tup1p* interactúa con **Sko1p** que se une a secuencias **CRE** (Alepuz, 2001). Por lo tanto, mutaciones en el complejo *Ssn6p-Tup1p* liberan la represión de estos grupos de genes. También se sabe que las mutantes nulas en alguna o ambas de las proteínas del

complejo Ssn6p-Tup1p son viables, tienen alto nivel constitutivo de invertasa, flocculan, tienen crecimiento termosensible, defectos en reproducción específica de la feromona α , y fallas en la esporulación de diploides homocigotas (Treitel, 1995).

Como mencionamos anteriormente, Ssn6p-Tup1p en complejo con Sko1p actúan como represores de un pequeño grupo de genes inducidos por estrés hiperosmótico. Es decir, genes que son activados por la vía de HOG en respuesta a estrés osmótico, son reprimidos por el complejo Ssn6p-Tup1p-Sko1p (fig. 4). Las mutaciones nulas de este complejo pueden suprimir parte del fenotipo osmosensible de mutantes de Hog1p (Márquez, 1998). Sko1p pertenece a la familia de reguladores transcripcionales bZip, éste se une al elemento de respuesta a AMPc (CRE) en el promotor de los genes blanco, reclutando así al correpresor general Ssn6p-Tup1p. Recientemente se demostró que la desrepresión de los genes reprimidos por el complejo Ssn6p-Tup1p-Sko1p está dirigida por la MAPK Hog1p. Esto es, en condiciones de estrés hiperosmótico, Hog1p fosforila a Sko1p, evento que desestabiliza al complejo Ssn6p-Tup1p-Sko1p, liberándose la represión transcripcional de algunos genes de respuesta a estrés hiperosmótico tales como ENA1 (ATPasa de Na^+), HAL1 (proteína de homeostasis iónica) y GRE2 (homólogo de la reductasa isoflavonoide de plantas) (Rep, 2001). Además, se demostró que la proteína cinasa A PKA, fosforila a Sko1p *in vitro*, y que la localización nuclear de Sko1p requiere de la alta actividad de PKA (Ahuir, 2001).

Vía de PKA.

La levadura puede contender con varias condiciones ambientales debido a una regulación coordinada del crecimiento, progresión del ciclo celular y actividades metabólicas. La vía de **Ras-AMPc** es esencial para el control e integración de estos procesos; en particular con respecto al estado nutricional. La reprogramación del metabolismo en la transición diáuxica cuando la glucosa ya casi se termina, así como las subsecuentes adaptaciones durante la fase post-diáuxica cuando las células crecen a través de su metabolismo respiratorio, utilizando etanol como fuente

de carbono, y durante la entrada en la fase estacionaria, son controladas negativamente por la vía Ras/AMP. Esto es, las células con elevada actividad de PKA no acumulan reservas de carbohidrato para una apropiada transición a fase diáuxica y no se arrestan en G1 una vez que empiezan a ser limitantes los nutrientes. Como resultado, estas células permanecen muy sensibles a estrés por calor y rápidamente pierden viabilidad en fase estacionaria. En contraste, las células deficientes de PKA-AMPC, exhiben los cambios fisiológicos contrarios (Pedruzzi, 2000).

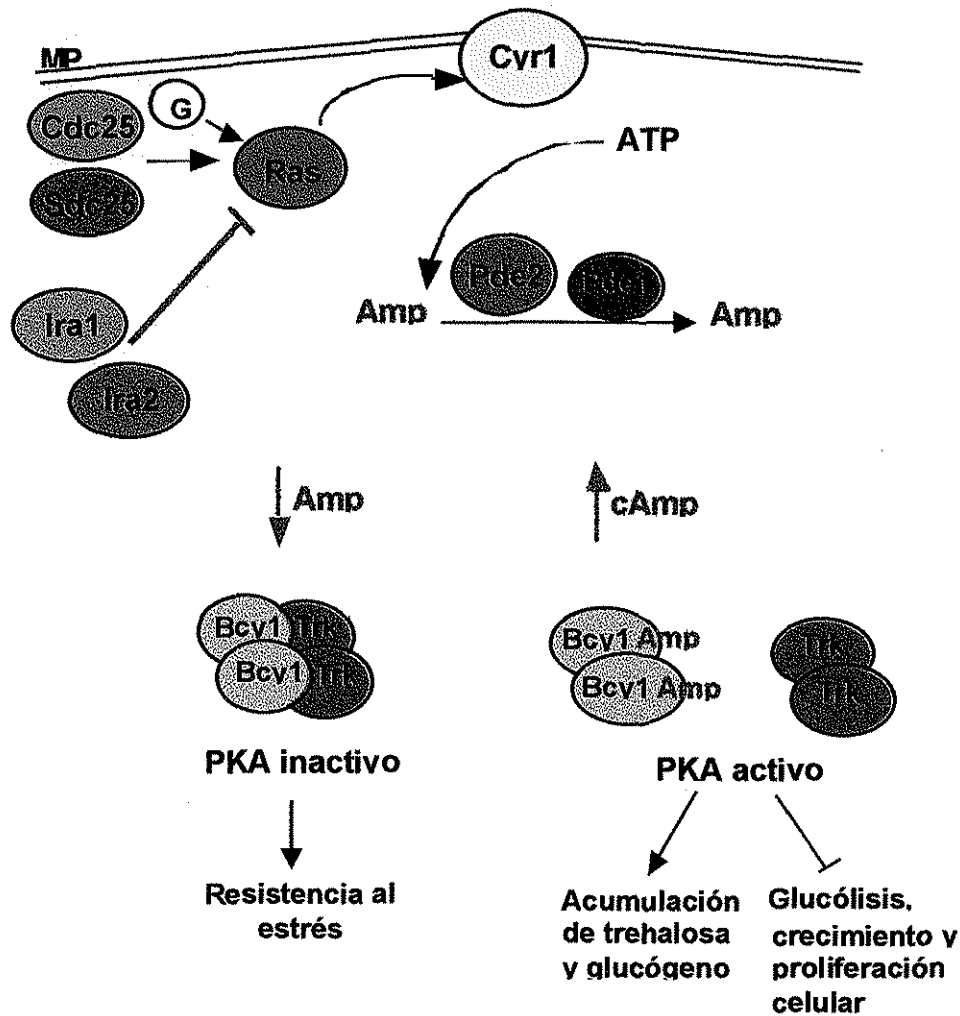


Figura 5. Vía de PKA

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

Cuando la levadura se crece en azúcares fermentables como fuente de carbono hay un aumento en la concentración de AMPc. Este aumento en el nivel intracelular de AMPc está controlado por dos mecanismos opuestos. 1) Uno es la síntesis de AMPc a través de la señal desencadenada por las proteínas **Ras** (Fig. 5). Se sabe que en éste y otros organismos, las proteínas Ras pueden transmitir una señal reguladora entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP. En levaduras, esta unión está regulada positivamente por la proteína (**CDC25**), que estimula el intercambio GDP-GTP y, negativamente, por las proteínas (**IRA1-IRA2**), que estimulan el intercambio GTP-GDP. Las proteínas Ras unidas a GTP estimulan la adenilato ciclasa codificada por el gen **CYR1** o **CDC35**, para sintetizar AMPc provocando un aumento en el nivel intracelular. 2) El mecanismo opuesto es la hidrólisis de AMPc a AMP, mediada por las fosfodiesterasas **PDE1** y **PDE2** (de baja y alta afinidad, respectivamente), (ver figura 5).

Como se muestra en la Figura 5, la holoenzima PKA es un tetrámero que consiste de un homodímero de dos subunidades reguladoras (codificadas por el gen **BCY1**) y dos subunidades catalíticas (codificadas por los genes **TRK1**, **TRK2**, y **TRK3**). La activación de PKA se da por unión de dos moléculas de AMPc a cada subunidad reguladora, promoviéndose la disociación y por lo tanto activación de las subunidades catalíticas. La glucosa es la única señal extracelular identificada hasta el momento que enciende la vía de Ras/adenilato ciclasa. La adición de este azúcar a las células permite un aumento transitorio en los niveles de AMPc y consecuentemente la activación de PKA. Esta activación transitoria facilita la transición del crecimiento respiratorio al crecimiento fermentativo. Además PKA activo puede fosforilar un gran número de proteínas involucradas en transcripción, glucólisis, progresión del ciclo celular y acumulación de glucógeno y trehalosa (Jiang, 1998). Estudios en mutantes con alta o baja actividad de PKA, respectivamente, confirman el papel de esta proteína en la señalización nutricional. De hecho las mutantes $\Delta bcy1$ tienen un fenotipo con alta actividad de PKA constitutiva y muestran las siguientes características: no acumulan carbohidratos de reserva, no pueden crecer en otras fuentes de carbono además de glucosa, son sensibles a estrés, no esporulan y tienen baja

viabilidad en fase estacionaria. La mayoría de estos fenotipos se revierten al extremo opuesto en mutantes con baja actividad de PKA constitutiva (Griffioen, 2000).

La desrepresión/activación transcripcional de un gran número de genes (CTT1, DDR1, HSP12, GRE3 y TPS2 entre otros) está negativamente regulada por PKA-AMPC a través de uno o más elementos STRE, los cuales confieren activación transcripcional en respuesta a una gran variedad de tipos de estrés, incluyendo calor, oxidativo, choque osmótico, y limitación de nutrientes (Mager, 1995). Además, se sabe de un grupo de genes regulados transcripcionalmente vía Msn2p/Msn4, que se inducen en la transición diáuxica y están reprimidos por AMPC (Marcotte, 1998). El control de la expresión por PKA-AMPC de los genes dirigidos por STRE está mediada vía Msn2p/Msn4p, y como se dijo anteriormente, PKA regula la localización de estos factores. Cuando PKA tiene baja actividad permite la entrada de Msn2p y Msn4p al núcleo, mientras que la alta actividad de PKA estimula la salida e inhibe la entrada de estos al núcleo (Görner, 1997).

También se sabe de un grupo de genes independientes de Msn2p y Msn4p cuya expresión está controlada negativamente por PKA. El elemento localizado en esta serie de genes, es el elemento del cambio post-diáuxico **PDS (Post Diauxic Shift)**, que media la activación transcripcional en respuesta a la limitación nutricional y a estrés por calor, pero no a otros tipos de estrés (Garay, 1999). Al parecer AMPC-PKA regula la actividad transcripcional vía el elemento PDS a través de la cinasa Rim15. Lo anterior indica que STRE y PDS están controlados negativamente por diferentes mecanismos dependientes de PKA (Pedruzzi, 2000).

ANTECEDENTES.

El estrés hiperosmótico puede ser generado por sequía, alta osmolaridad del medio (p. ejemplo, salinidad) o congelamiento. Está considerado como el factor ambiental que más limita el crecimiento y productividad de las plantas, principalmente de zonas áridas (donde la salinidad afecta la productividad en más de un 40%). Lo anterior es una de las razones por la cual es de gran importancia caracterizar los componentes moleculares involucrados en la respuesta a tal estrés, ya que provee grandes aplicaciones en la agricultura, entre otras. Las bases moleculares de la tolerancia a estrés osmótico se han estudiado en levadura, la cual es considerada como uno de los sistemas modelo más poderosos en biología molecular de células eucariotas (Lee, 1999). Una de las ventajas de usar levadura como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta al estrés osmótico se debe a que posee muchos de los mecanismos básicos que una célula eucariótica requiere para responder y adaptarse a los cambios osmóticos del ambiente (Hohmann, 1997). La información obtenida en levaduras se ha transferido a plantas de interés agrícola; tal es el caso del gen de calcineurina, identificado en levadura, que participa como inductor en una vía de transducción de señales bajo estrés salino. El aislamiento y caracterización de este gen permitieron la construcción de plantas transgénicas de tabaco cuyo fenotipo resultó con una mayor tolerancia a salinidad (Pardo, 1997).

En el laboratorio estamos interesados en estudiar algunos aspectos en la respuesta de levadura al estrés osmótico principalmente, con la finalidad de utilizar este conocimiento en plantas. Una de las estrategias utilizadas ha sido la de buscar levaduras con fenotipo de tolerancia a diferentes condiciones de estrés. Con este fin se han sobreexpresado en levadura genes de respuesta a estrés tanto de plantas como de levaduras y durante este proceso, se aisló de manera azarosa una mutante en el fondo genético *hog1*, conocida como *sy* (Garay A.). Para obtener la mutación *sy* en un fondo genético silvestre, se cruzaron las cepas *hog1 sy* y RS58

(cepa silvestre), cruza de la que se obtuvieron y analizaron varias tétradas (Garay, Folch, Colmenero, Benítez), una de estas se muestra en la Figura 6a, donde podemos observar que además de ser una mutante espontánea, *sy* presenta las siguientes características:

* **Es una mutación diferente a la mutación *hog1* (6a)**, ya que la segregación siempre muestra dos haploides sensibles en condiciones de estrés osmótico y estrés salino, dados por el fondo genético *hog1*, y dos haploides tolerantes en condiciones de estrés oxidativo y estrés por calor debido a la mutación *sy*.

* **Segrega como una mutación en un solo gen (monogénica) (6a)**, es decir, en una proporción 2:2 en todas la tétradas analizadas ,

* **Es más tolerante que la cepa silvestre a condiciones de estrés osmótico, oxidativo y alta temperatura (6b)**, esto es, presenta un fenotipo pleiotrópico de resistencia a estrés ,

• **La mutante es dominante en un fondo genético silvestre (6b)**,

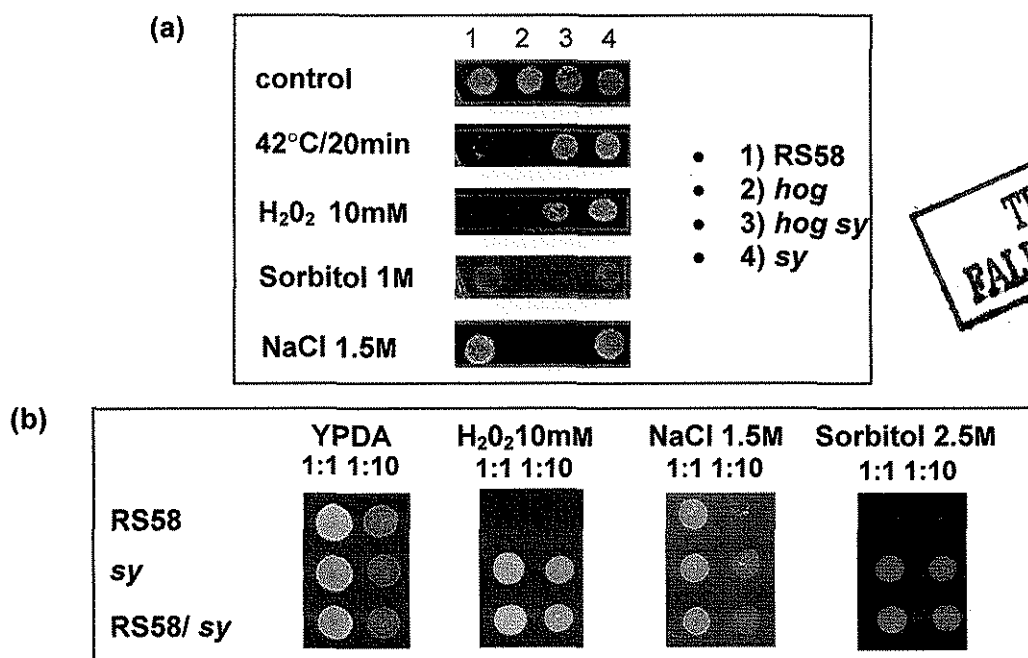


Figura 6. Características fenotípicas de *sy*; (6a) caracterización fenotípica de una tétrada obtenida del diploide RS58/*hog sy* en diferentes condiciones de estrés, (6b) análisis para determinar si el fenotipo tolerante de la mutación en *sy* es dominante en su fondo genético silvestre (RS58).

Se sabe que la levadura responde al estrés osmótico principalmente a través de la vía de HOG y que una mutante en la cinasa *hog1* además de ser sensible a tal condición de estrés, también lo es ante ciertas condiciones de estrés oxidativo y choque térmico. Si analizamos el fenotipo de la mutante *hog sy* (Figura 6a) podemos observar que esta mutación es menos sensible que la mutante *hog* a algunas condiciones de estrés (oxidativo y choque térmico). Al parecer la mutación *sy* se encuentra en un gen que participa en alguna vía de señalización de estrés. El estudio de la mutante *sy* resulta interesante ya que además de ser tolerante en diferentes condiciones de estrés, no muestra alteraciones en el crecimiento, como sucede con la gran mayoría de las mutantes reportadas que exhiben fenotipo de tolerancia a estrés. Tal es el caso de la mutante *ssn6-tup1* que además de tener afectada la tasa de crecimiento, también floclula. Para continuar el estudio de la mutante *sy*, trataremos de aislar el gen afectado complementando con un banco genómico de la mutante *sy* el fenotipo sensible de la cepa silvestre (RS58). Además, con el fin de caracterizar bien el fenotipo de la mutante *sy*, se analizará mas a detalle su crecimiento en diferentes condiciones y severidades de estrés, y se comparará con otros fondos genéticos. Por otra parte, para conocer más acerca de ésta mutación, observaremos su influencia en lo que respecta a la expresión génica concerniente a la respuesta a estrés en levadura.

HIPÓTESIS.

El gen de *sy* codifica para una proteína involucrada en la regulación de la respuesta a estrés general en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS.

General.

Aislamiento y caracterización funcional del gen afectado en la mutante *sy*.

Particulares.

- 1.- Aislar el gen mutado en *sy* a través de la complementación del fenotipo resistente a diferentes condiciones de estrés en la cepa silvestre RS58.
- 2.- Identificación y caracterización del gen.
- 3.- Caracterizar y comparar con las cepas Wt (RS58), *hog*, *hog sy*, *Wt/hog sy* y *Wt/sy* el fenotipo de la mutante *sy* en diferentes condiciones de estrés osmótico, oxidativo y de temperatura.
- 4.- Analizar la expresión de diferentes genes que responden a condiciones de estrés oxidativo, osmótico y por calor, en el fondo genético de *sy*, y comparar la acumulación de los transcritos con las cepas Wt (RS58), *hog*, *hog sy*, y *Wt/sy*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

CEPAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se describen en la tabla 2. Los cultivos de levadura se crecieron normalmente a 25°C en medio YPDA o medio SD suplementado con algunos de los aminoácidos: histidina, leucina y triptófano, y/o las bases nitrogenadas: adenina y uracilo, a la concentración final de (40 µg/ml) en los casos indicados. En algunos ensayos se utilizó medio mínimo con diferentes fuentes de carbono tales como SG 2% o SGal 2%. Los medios sólidos de YPDA o SD contienen además 2% de agar. Para generar la esporulación (tétradas) del diploide *sy×msn2/msn4*, se mantiene a las levaduras en medio de pre-esporulación por 1 día y posteriormente se transfieren a medio de esporulación donde permanecen de 4 a 5 días. Las cepas, medios y condiciones de crecimiento para los ensayos de tolerancia a estrés se especifican en cada caso. Además se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli* XL1 blue para amplificación de plásmidos.

Medios

YPDA

1% extracto de levadura (Difco)

2% bacto-peptona (Difco)

2% glucosa

SG

2% de glicerol

SD

2% glucosa

0.7% base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco)

SGAL

2% de galactosa

Pre-esporulación

0.8% extracto de levadura (Sigma)

0.3% bacto-peptona (Difco)

10% dextrosa (J.T. Baker)

2% agar (Research Organics)

Esporulación

1% acetato de potasio

0.1% extracto de levadura (Sigma)

0.05% dextrosa (J.T. Baker)

2% agar (Research Organics)

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

Cepa	Genotipo
RS58	MAT" a " <i>ura3, leu2, his4, ade2</i>
<i>hog1</i>	MAT" a " <i>ura3, leu2, his4, ade2</i> <i>hog1::URA3</i>
<i>sy</i>	MAT" α " <i>ura3, leu2, his4, ade2</i> <i>sy</i>
<i>hog1-sy</i>	MAT" α " <i>ura3, leu2, his4, ade2</i> <i>hog1::URA3, sy</i>
RS58/ <i>hog1-sy</i>	<i>ura3, leu2, his3, ade2</i>
RS58/ <i>sy</i>	<i>ura3, leu2, his3, ade2</i>
W303	MAT " a " , <i>SUC2, ade2, can1,</i> <i>his3, leu2, trp1, ura3</i>
<i>msn2-msn4</i>	<i>SUC2, ade2, can1, leu2, ura3</i> <i>msn2::HIS3 y msn4::TRP1</i>

ENSAYOS DE TOLERANCIA.

Goteo en medio sólido.

Para los ensayos de estrés, las células de levadura se crecieron a 25°C en YPDA. De un cultivo de toda la noche se inocula a una DO de 0.1₆₆₀ hasta que el cultivo llega a una DO de 0.5₆₆₀ 5 a 6 h aprox. Una vez que el cultivo llega a esta densidad óptica se siembran las células en medio sólido de YPDA con las diferentes condiciones de estrés (NaCl 0.5M, 1M, y 1.5M o sorbitol 0.5M, 1.5M, y 2M). En el caso del estrés oxidativo (H₂O₂) y del etanol se dan los choques en medio líquido por 1 h., posteriormente se gotean en medio sólido de YPDA y se incuban aprox. 30 h. El ensayo de termotolerancia se realiza sin preadaptar los cultivos al cambio de temperatura, es decir, una vez que los cultivos en medio líquido a 25°C alcanzaron la densidad

óptica deseada (0.5_{660}), se transfieren a una temperatura de 50°C por 5', 10', y 15'. Posteriormente se gotean en medio sólido de YPDA y se incuban aprox. 3 días.

Cuentas viables.

Además de realizar los goteos en medio sólido para observar el fenotipo, se realizaron también cuentas viables con las mismas cepas y en las mismas condiciones de estrés. El ensayo se realizó por triplicado de la siguiente manera. Una vez que los cultivos en líquido llegaron a la DO de 0.5_{660} se cultivaron en medio sólido de YPDA diferentes diluciones (10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), tanto de los cultivos en condición control, como de aquellos en las condiciones de estrés anteriormente descritas. Posteriormente se hizo un conteo manual de las colonias sobrevivientes y se calcularon los porcentajes de sobrevivencia de cada cepa con respecto al número de colonias que crecieron sin estrés.

COMPLEMENTACIÓN DE LEVADURA.

Construcción del banco genómico de la mutante *sy*.

Se realizó una digestión parcial del DNA genómico de la cepa mutante *sy* con la enzima SAU3A, los fragmentos se separaron en un gradiente lineal de sacarosa del 10% al 40 %. El primer banco se realizó con insertos de aprox. 5kb, ligados al sitio BamHI del plásmido unicopia y centromérico pRS316, mientras que el segundo banco se realizó con insertos de 10kb a 13kb, ligados al plásmido pRS314.

Transformación de levadura.

Se utilizó el método de acetato de litio de la siguiente manera:

- 1) De un cultivo de toda la noche inocular 10 ml de medio YPDA a 0.1_{660} e incubar aprox. 5 h. a 25°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5_{660} .
- 2) Centrifugar las células 5' a 4500 rpm y lavarlas con acetato de litio 1X dos veces, posteriormente se decantar y resuspender en el líquido restante.

- 4) Incubar la mezcla 30' a 30°C y someterla a un choque térmico de 42°C por 20'
- 5) Resuspender la mezcla en 5ml de YPDA y dejar reposar 5' a temperatura ambiente.
- 6) Centrifugar a 4500 rpm por 5', decantar y resuspender en el líquido residual para sembrar en cajas petri con medio mínimo sin la auxotrofia de selección.

Soluciones

Acetato de Litio 10X

1M acetato de litio

0.1M tris HCl pH8

10mM EDTA pH8.

Polietilenglicol (PEG) PM. 3350 50%

disolver 50g de PEG pM 3350 en 30ml de agua estéril y

ajustar el volumen a 100ml

Esterilizar y mantener la solución a temperatura ambiente.

Buffer TE

10mM Tris-HCl

1mM Na₂ EDTA, pH 8.0

Acarreador de DNA

disolver 200mg de DNA de esperma de arénque en

100ml de buffer TE estéril y sonicar hasta obtener fragmentos de aprox. 200pb.

EXPERIMENTOS TIPO NORTHERN.

Obtención de células para extracción de RNA.

Para la extracción de RNA se inocula con un cultivo de toda la noche, un matríz con 50ml de YPDA a DO 0.1₆₆₀ y se crecen las células hasta alcanzar una DO aproximada de 0.5₆₆₀. El cultivo celular se lava con agua una vez y el paquete se puede congelar a -20°C o seguir con el protocolo de extracción.

Extracción de RNA con fenol caliente.

- 1) El paquete celular se resuspende en 400µl de fenol y 400µl de TES se agita con el vortex por 10" y se incuba 45' a 65°C agitando con vortex cada 15'. Posteriormente mantener la mezcla 5' en hielo y centrifugar 5' a 14000 rpm.

- 2) Transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorff y agregar 400µl de fenol. Se agita con vortex y se mantiene la mezcla 5' en hielo. Posteriormente centrifugar 5' a 14000 rpm.
- 3) Transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorff y se agregar 400µl de cloroformo, agitar con vortex y centrifugar 5' a 14000 rpm.
- 4) Para precipitar hay que transferir la fase acuosa a otro tubo y añadir 40µl de acetato de sodio 3M pH 5.3 y 1ml de etanol 100% (frío); centrifugar 3' a 14000 rpm, decantar y lavar con etanol del 70% frío (v/v). Resuspender la pastilla en 200µl de agua y, si se quiere remover los RNAs de transferencia precipitar con LiCl 2M.
- 5) La pastilla se deja reposar por 1h a 4°C en 400µl de LiCl 2M. Posteriormente centrifugar por 5' a 14000 rpm ; decantar y lavar dos veces con etanol frío al 70% (v/v).
- 6) Finalmente resuspender la pastilla en agua mQ y determinar la concentración en espectrofotómetro. Guardar los RNAs a -20°C.

Soluciones

TES

10mM Tris HCl pH 7.5

10mM EDTA

0.5% SDS

Ensayos tipo Northern.

Para realizar los experimentos tipo Northern se hizo lo siguiente:

- 1) Se separan 10 µg de RNA total (de las diferentes cepas y tratamientos) por electroforésis en geles de agarosa 1.2% - formaldehído - MOPS 10X.
- 2) Para cargar las muestras de RNA en el gel se calientan a 65°C por 5', y se transfieren a hielo donde se les añade buffer de muestra 1.25 X. Los geles de RNA se corren a 100v hasta que el colorante llega al final del gel.

- 3) Posteriormente el RNA se transfiere durante toda la noche a membranas Hybond N⁺ (Amershan) con una solución SSC 10X.
- 4) Después de la transferencia el RNA es fijado a la membrana de Hybond N⁺ con NaOH 0.05 M en agitación por 5'. Posteriormente la membrana se enjuaga dos veces con agua y una vez con SSC 2X para eliminar los residuos de NaOH y preparar la membrana para la hibridación (las membranas se deben mantener siempre humedecidas).

Soluciones

MOPS 10X

20.9 gr MOPS

10 ml EDTA 0.5 M pH 8.0

2.04 gr acetato de Na

aforar a 500 ml

Buffer de muestra 1.25 X

4.4 ml formamida

1.6 ml formaldehído

1.0 ml MOPS 10 X

0.8 ml glicerol 80%

0.2 ml azul de bromofenol

40 µl bromuro de etidio

SSC 10X

175.3 gr NaCl

88.2 gr citrato de Na

aforar a 2 L

ajustar pH a 7.0 con HCl

esterilizar 20' a 120°C

Amplificación de fragmentos por PCR.

Para obtener la secuencia completa de los genes GRE1, GRE2 (3'), GRE3, GPD1, DDR48 y HSP26, se hicieron amplificaciones por PCR usando oligos específicos determinados de acuerdo a la secuencia correspondiente obtenida de la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* de la Universidad de Standford. Las reacciones de PCR se hicieron usando DNA genómico de la cepa RS58 como templado. Todos los genes se amplificaron durante 30 ciclo, donde los ciclos de desnaturalización fueron de 30" a 94°C, los tiempos y temperaturas de alineamiento de los oligos y extensión de las secuencias, se muestran en la Tabla 3, para cada gen:

Tabla 3. Tiempos y temperaturas de alineamiento y extensión.

GEN	Alineamiento y Extensión
GRE1 ($\approx 0.6\text{Kb}$)	30'' a 55°C y 30'' a 70°C
GRE2 (3') ($\approx 0.2\text{Kb}$)	30'' a 50°C y 30'' a 70°C
GRE3 ($\approx 1.2\text{kb}$)	30'' a 55°C y 1' 30'' a 70°C
GPD1 ($\approx 1.6\text{Kb}$)	30'' a 60°C y 1' 30'' a 70°C
DDR48 ($\approx 1.2\text{Kb}$)	30'' a 65°C y 1' 30'' a 70°C
HSP26 ($\approx 0.6\text{Kb}$)	30'' a 60°C y 30'' a 70°C

Marcaje de sondas.

El marcaje de sondas se hace con un kit comercial de Dupont, y el protocolo que se siguió es el siguiente.

1. Se prepara y hierve por 5' la siguiente mezcla:

30 a 100 ng de DNA de interés

2 μl de mezcla de hexanucleótidos

agua (calcular para ajustar a un volumen final de 16.5 μl)

2. La mezcla se deja reposar 5' en hielo y se agrega:

2.5 μl buffer de Klenow,

2.5 μl mezcla de nucleótidos,

2.5 μl BSA,

2.5 μl ddtp (^{32}P) (12.5 μCi),

1 μl (1 unidad) de ADN polimerasa (Klenow).

3. La reacción se incuba por 30' a 37°C.

Hibridación.

Las condiciones de hibridación y lavado son de alta astringencia para todos los casos. El buffer utilizado es PSE y se realiza lo siguiente:

En un tubo de hibridación con 10 ml de solución PSE se hibridan las membranas a 65°C por 12 h. Posteriormente se lavan 2 veces por 20' con 40 ml de una solución de fosfatos, se enjuagan con agua, y se exponen a -70°C.

Soluciones

Buffer PSE

1.5 ml $\text{Na}^+\text{NaH}_2\text{PO}_4$

1.5 ml agua

7 ml SDS 10%

20 μl EDTA

Sol. de alta astringencia

125ml agua

15 ml $\text{Na}^+\text{NaH}_2\text{PO}_4$

10 ml SDS 10 %

RESULTADOS

1. CON RESPECTO AL AISLAMIENTO DEL GEN AFECTADO EN LA MUTANTE *sy*.

1.1. Determinación de la representación del banco genómico de la mutante *sy*.

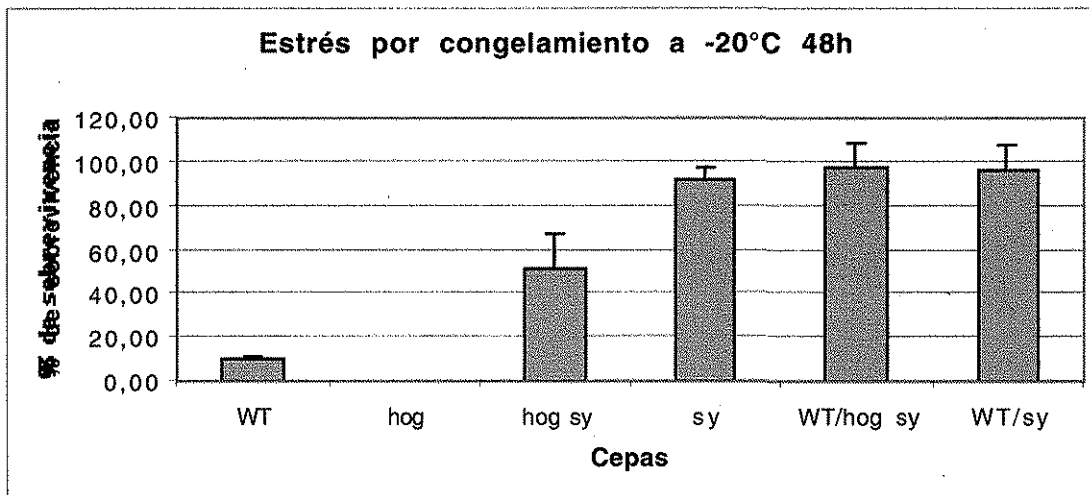
Para hacer un cálculo aproximado de la representación génica del banco de la mutante *sy* (clonado en el vector unicopia pRS316 con URA3 como marcador de selección), se complementó la auxotrofia por triptófano de la cepa W303. Si suponemos que la representación del genoma de *S. cerevisiae* no sufrió gran alteración durante la amplificación y clonación de los diferentes insertos. Se calcula que dado el tamaño de los fragmentos de DNA clonados en el vector de transformación (aprox. 5kb) y el tamaño del genoma de *S. cerevisiae* (12,050 Kb), cada gen está representado una vez en 2500 clonas diferentes. En los resultados de la Tabla 4, podemos ver que en las transformaciones con mayor rendimiento (transformación 1, 2 y 3), aproximadamente hay una colonia complementada en 8,000 transformantes, es decir, 1:8,000 es la representación génica de este banco. Además se calculó la cantidad de DNA utilizada durante el protocolo de transformación que rinde mayor número de transformantes. Si analizamos los datos que se muestran en la Tabla 4, podemos ver que el rendimiento de la transformación no es proporcionalmente lineal según la cantidad de DNA utilizada, de hecho se observa que con una dosis muy alta de DNA (30µg) el rendimiento baja. Por lo anterior se decidió utilizar cantidades entre 5µg y 10µg de DNA en las transformaciones posteriores.

transformación	µg de DNA (PRS316-B. <i>sy</i>)	Rendimiento de transformación	# de colonias complementadas
1	5µg	≈40,000	5
2	7µg	≈50,000	7
3	10µg	≈45,000	6
4	30µg	≈30,000	2

Tabla 4. Transformación y complementación de la cepa W303 con el vector PRS316-B.*sy*. Selección de las colonias complementadas en SD HAL.

1.2. Determinación del método de selección de las transformantes positivas.

Se realizaron experimentos bajo diferentes condiciones de estrés en las cepas RS58 (silvestre) y *sy* (mutante) para deducir el tipo y severidad de estrés que pudiera servir como método de selección de las transformantes positivas (con el fenotipo multiresistente de la mutante *sy*). Tenemos como antecedentes que el crecimiento de las cepas en una condición severa de estrés osmótico (NaCl 1.5M o sorbitol 2.0M) en medio sólido es muy lento, por lo que se decidió probar una condición de estrés oxidativo (H_2O_2) en medio sólido, así como de estrés por congelamiento a $-20^{\circ}C$. Para determinar la eficiencia de estos tratamientos, se analizó la diferencia en número de células y tiempo de crecimiento entre las cepas RS58 y *sy* bajo las condiciones indicadas. La fase experimental se describe a continuación; una vez que los cultivos de ambas cepas crecieron a una DO de 0.5₆₆₀, una parte del cultivo se incubó a $25^{\circ}C$ en medio YPDA sólido con diferentes concentraciones finales de H_2O_2 (2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM y 4mM) y, otra parte se congeló en tubos eppendorff (1.5ml) a $-20^{\circ}C$ por dos días, para posteriormente plaquearlo sobre YPDA sólido e incubarlo a $25^{\circ}C$. Los resultados del número de colonias sobrevivientes en la condición de estrés con H_2O_2 no se muestran pero dados los porcentajes de sobrevivencia obtenidos en la condición de estrés por congelamiento que se muestran en la Gráfica 3, concluimos que tal condición es la mejor opción para una primera selección de transformantes con el fenotipo de la mutante *sy*, dado que la mutante *sy* es aprox.10 veces más tolerante que la cepa silvestre a esta condición de estrés .



Gráfica 1. Porcentajes de sobrevivencia en condición de estrés por congelamiento. Se realizaron cuentas viables de los cultivos control (sin estrés), y de los cultivos estresados a -20°C durante 48h.

1.3. 1^{ra} Transformación con el banco genómico de sy.

Para complementar el fenotipo sensible de la cepa silvestre RS58 se transformó con el banco genómico de la mutante sy (B.sy), la pastilla de transformación se diluyó a la DO inicial (0.5_{660}) y antes de someter a estrés por congelamiento, se cultivó una fracción en SD HAL (medio mínimo sin uracilo) para seleccionar las células que contenían el vector de clonación PRS316-URA y determinar así el rendimiento. El resto de la transformación se congeló a -20°C por 2 días, posteriormente se sembró en SD HAL y se incubó a 25°C .

Este ensayo mostró que aprox. se transformaron 30,000 células, en las que se esperaba estuviera tres veces representado cada gen (entre ellos el gen de interés). Del total de células transformadas sólo sobrevivieron al estrés por congelamiento 1,500 células (5%). Esto indicó que el congelamiento funcionaba como un buen método de selección (Tabla 5).

Rendimiento	1 ^{ra} selección	Sobrevivientes
≈30,000 transformantes	-20° C / 2 días	≈1,500 transformantes

Tabla 5. Transformación de la cepa RS58 con el banco genómico de la mutante sy (RS58/pRS316-B.sy), y selección de transformantes con tolerancia a estrés por congelamiento. El rendimiento y el No. de sobrevivientes se determina en medio SD HAL .

Las transformantes (colonias) que sobrevivieron al congelamiento se sometieron a una segunda selección en estrés (Tabla 5). Primeramente se parcharon 500 colonias en medio YPDA con 3.5mM de H₂O₂, ensayo donde no se observó selección alguna, quizás porque las células en una colonia muy densa se protegen contra tal situación de estrés. Por lo anterior decidimos probar con otras 500 colonias, las cuales se diluyeron y gotearon c/u en YPDA con 3.5mM de H₂O₂, método con el que tampoco se obtuvo selección alguna. Pensando que no solo la densidad celular sino también la fase de crecimiento pueden afectar la selección de fenotipos tolerantes a esta condición de estrés. Decidimos crecer cada una de las colonias restantes (480 de las 1,500) a una DO de 0.5₆₆₀ y gotear en YPDA con 3.5mM de H₂O₂. Ensayo donde sólo sobrevivieron 2 colonias (colonia No.3 y No.15), como se muestra en la Tabla 6. Al parecer los dos primeros tratamientos de selección no funcionaron debido a que no se controló la densidad celular y las colonias ya se encontraban en fase estacionaria, donde se sabe se expresan genes de respuesta general a estrés. Estos datos sugieren que tanto la densidad celular como la fase de crecimiento pueden afectar la selección de fenotipos tolerantes a estrés.

2 ^{da} selección	Sobrevivientes
500 colonias se parcharon en cajas con 3.5mM de H ₂ O ₂	≈500 colonias, no hay selección
500 colonias se diluyeron y gotearon en cajas con 3.5mM de H ₂ O ₂	≈500 colonias, no hay selección
480 colonias se crecieron a 0.5 ₆₆₀ y gotearon en cajas con 3.5mM de H ₂ O ₂	2 colonias, colonia No. 3 y No. 15

Tabla 6. Transformantes sobrevivientes a la 1^{ra}selección de estrés por congelamiento (-20° C/2 días) y sometidas a una 2^{da}selección con estrés oxidativo (3.5mM de H₂O₂) en diferentes condiciones de densidad celular y fase de crecimiento.

Se llevó a cabo un análisis más detallado de las dos transformantes posiblemente positivas (colonia No.3 y No.15). Las candidatas se crecieron a 0.5₆₆₀ (fase logarítmica) y se gotearon en medio sólido con NaCl 1.5M o se sometieron a choque oxidativo con H₂O₂ 10mM/1h, condiciones de estrés donde exhibieron fenotipo tolerante. Para determinar si algún plásmido introducido por transformación era el responsable del fenotipo de tolerancia de las candidatas No.3 y No.15; por un lado se curaron las dos cepas en SDFOA (medio de crecimiento donde se pierde el plásmido), y por otro, se purificó y amplificó plásmido de estas dos cepas y se transformó la cepa silvestre RS58. Todas las colonias curadas seguían manteniendo el fenotipo de tolerancia al estrés y ninguna de las transformantes (con plásmido extraído de las candidatas No.3 o No.15) exhibió fenotipo de tolerancia. Por lo anterior concluimos que el fenotipo de ambas candidatas no se debía al vector de transformación con algún fragmento genómico de interés (pRS316-B.*sy*), sino que, éste era probablemente producto de mutaciones cromosomales adquiridas por la presión de selección.

1.4. 2^{da} Transformación con el banco genómico de sy.

Ya que en el experimento anterior no se consideró la influencia del tiempo de recuperación de las transformantes (5' sugeridos en el protocolo), y dado que ésto podría ser una limitante para la expresión del gen de interés, se decidió transformar con la misma cantidad de DNA y recuperar las células por un mínimo de 1 hora antes de someterlas a alguna condición de estrés. Para la selección del fenotipo de sy se decidió que las células transformantes sobrevivientes al primer tratamiento por congelamiento se someterían a varios tratamientos consecutivos de estrés, pensando que en cada tratamiento se irían eliminando aquellas transformantes tolerantes, falsas positivas. Como se muestra en los resultados de la Tabla 7, con este tratamiento no se logró eliminar las células falsas positivas como se esperaba. Una interpretación a este resultado es que las células sometidas a diferentes condiciones de estrés consecutivas, más bien desarrollan una respuesta adaptativa al estrés. Por otro lado, es posible pensar que el protocolo de transformación preadapta las células a situaciones posteriores de estrés ya que durante la transformación las células son lavadas con LiCl, PEG y sometidas a choque térmico (ver protocolo de transformación pág. 30).

Tratamiento	Sobrevivientes
① -20° C/2 días.	≈ 3,000/ml
② -20° C/2 días-- H ₂ O ₂ 10m / 1h.	≈ 2,000/ml
③ -20° C/2 días-- H ₂ O ₂ 10m / 1h -- NaCl 1.5	≈ 1,500/ml
④ -20° C/2 días-- H ₂ O ₂ 10m / 1h -- -20 C/2 días.	≈ 3,000/ml
⑤ -20° C/2 días-- H ₂ O ₂ 10m / 1h -- -20 C/2 días-- NaCl 1.5	≈ 3,000/ml

Tabla 7. Transformación de la cepa RS58 con el banco genómico de la mutante sy (RS58/pRS316-B.sy), y selección de transformantes con fenotipo tolerante a estrés con varios tratamientos consecutivos de estrés. El No. de sobrevivientes se determina en medio SD HAL.

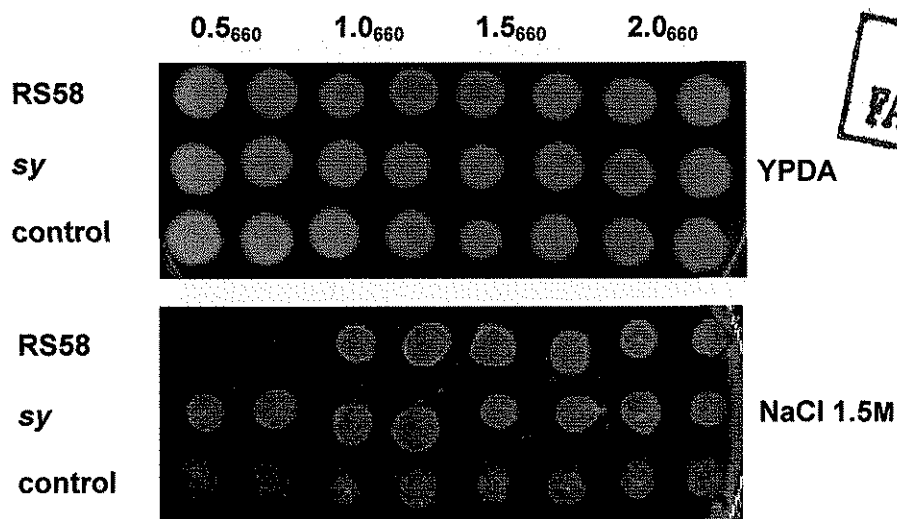
1.5. 3^{ra} Transformación con el banco genómico de *sy*.

Volvimos a transformar la cepa silvestre RS58 con el banco genómico de la mutante *sy* bajo las condiciones ya establecidas (cantidad de DNA y tiempo de recuperación). Además, para tener un punto de referencia se puso como control la transformación de la cepa silvestre con el vector pRS316 (no clonado con el banco de *sy*). En base a los experimentos anteriores decidimos hacer réplicas de las colonias sobrevivientes al congelamiento de (-20°C/2días) en cajas con 1.5M de NaCl, ya que éste representa un estrés más fuerte que 3.5mM de H₂O₂ en la mutante *sy*. Como se muestra en los resultados de la Tabla 8, no se observa una primera selección en estrés por congelamiento (-20°C/2 días), ni diferencia en el número de sobrevivientes entre las transformantes provenientes de la transformación control y de la que porta el banco de *sy* como se esperaría. Esta falla de reproducibilidad puede deberse a que el ensayo de congelamiento se llevó a cabo en mayor volumen (tubos falcon 50ml) en el cual las células no sufren el mismo impacto. Y, por supuesto a que no eliminamos la posibilidad de que el protocolo de transformación preadapte las células a situaciones posteriores de estrés. En el ensayo de réplicas en medio sólido con NaCl 1.5M observamos un crecimiento de casi todas las transformantes replicadas sobrevivientes al congelamiento, lo cuál indicó que en estas condiciones un estrés por NaCl 1.5M tampoco representa un buen método de selección para transformantes con fenotipo de la mutante *sy*.

Transformación RS58/	Rendimiento de transformación 10ml	-20° C / 2 días (sobrevivientes)	Réplicas en NaCl 1.5M
pRS316	≈3,000transf/ml	≈2,000transf/ml	Crecen todas
pRS316-B. <i>sy</i>	≈3,500transf/ml	≈2,000transf/ml	Crecen todas

Tabla 8. Transformación de la cepa silvestre RS58 con el vector control (vector pRS316) y con el banco de la mutante *sy* (pRS316-B.*sy*). Determinación de las colonias sobrevivientes a la primera selección de estrés por congelamiento (-20° C/2 días) y sometidas a una segunda selección en estrés hiperosmótico (NaCl 1.5 M).

Con la finalidad de determinar si la densidad celular es un factor que influye en el fenotipo de resistencia al estrés, se realizó el siguiente experimento. Se crecieron las cepas silvestre (RS58), mutante (*sy*) y el control de transformación (RS58/pRS316) a diferentes densidades ópticas y se gotearon en medio con NaCl 1.5 M. En la Figura 7 observamos que la sensibilidad de la cepa silvestre y el control de transformación al medio con NaCl 1.5 M varía dependiendo de la densidad celular; es decir a mayor densidad celular, mayor tolerancia a las condiciones de estrés.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Tolerancia a estrés osmótico con NaCl 1.5M dependiente de la densidad óptica en las cepas RS58, *sy*, y el control de transformación (RS58/pRS316).

En base a los experimentos anteriores establecimos los siguientes criterios para mejorar el método de selección:

- ① Que el tiempo de recuperación después de la transformación sea suficiente para que las transformantes positivas expresen su(s) producto(s).
- ② Que una vez transformadas las células, sean pasadas por fase logarítmica para eliminar la tolerancia a estrés posiblemente adquirida durante el método de transformación.

③ Que los tratamientos posteriores de estrés para seleccionar fenotipos de tolerancia se llevaran a cabo en células en fase logarítmica de crecimiento y no en fase post-diáuxica, preferentemente en densidades ópticas (DO_{660}) aproximadas a 0.5.

④ Que el tratamiento por congelamiento a $-20^{\circ}\text{C}/2\text{días}$ se realizara en volúmenes pequeños, para asegurar que todas las células sufrieran un tratamiento con intensidades similares.

1.6. 4^a Transformación con el banco genómico de *sy*

La siguiente transformación se realizó incorporando los criterios antes mencionados. Los cultivos transformados con el banco se diluyeron a una DO de 0.05_{660} en medio selectivo (SD HAL) y se incubaron hasta llegar a una DO de 0.3_{660} ; en este punto el cultivo se sometió a congelamiento de $-20^{\circ}\text{C}/2\text{días}$. Con el fin de descartar las transformantes que hubiesen adquirido tolerancia durante el primer congelamiento y, para seleccionar y enriquecer la clona de la mutante *sy*, los cultivos de transformación se diluyeron nuevamente a una DO de 0.05_{660} en medio selectivo (SD HAL) y, se incubaron hasta llegar a 0.3_{660} para aplica un segundo ciclo de estrés por congelamiento. Este ciclo se repitió una tercera vez. Como se puede ver en la Tabla 9, los datos obtenidos indicaron que en el segundo ciclo de estrés se dio un claro enriquecimiento con respecto al primer ciclo; así que fue de este tratamiento de donde analizamos exhaustivamente las posibles candidatas a contener el gen *sy*.

❶ Para ello tomé parte del cultivo crecido a una DO de 0.3_{660} antes de aplicar el tercer tratamiento de congelamiento y lo sometí a un estrés con H_2O_2 15mM/1h, posteriormente sembré en medio selectivo (SD HAL). De las colonias sobrevivientes probé algunas en estrés oxidativo, las que seguían siendo tolerantes (16) se sometieron a un tratamiento de curación del plásmido con SDFOA y a la par les extraje plásmido para retransformar la cepa silvestre y probar si éste contenía el fenotipo esperado. Las 16 candidatas que se probaron resultaron tolerantes a estrés oxidativo aún después de haber perdido el plásmido, mientras que las retransformantes con los respectivos plásmidos eran sensibles al estrés.

② Del segundo ciclo por congelamiento estrié todas las colonias de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en medio sólido con NaCl 1.5M y, las primeras que crecieron (23) se sometieron a estrés oxidativo (en líquido). De éstas 23 candidatas, 18 colonias seguían manteniendo fenotipo de tolerancia. Al igual que en el caso anterior, las 18 colonias se sometieron a curación con FOA. Por otro lado, se extrajo plásmido de 16 colonias y, con ello se retransformó. Los resultados mostraron que las colonias curadas mantuvieron el fenotipo tolerante y las retransformantes no exhibieron tal.

Lo anterior demostró que bajo estos tratamientos (por alguna razón difícil de explicar), predomina el enriquecimiento de las mutaciones cromosomales y no así del gen sy mutado, supuestamente contenido en el banco genómico.

Número de células sobrevivientes al primer congelamiento.

Transformación	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
Wt/ banco sy	273 col. (8.8%)	24 col. (7.5%)
Wt/ PRS316	117 col. (3.4%)	19 col. (4.7%)

Número de células sobrevivientes al segundo congelamiento.

Transformación	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
Wt/ banco sy	≈ 3,000 col.	256 col.
Wt/ PRS316	≈ 400 col.	74 col.

Número de células sobrevivientes a un tercer congelamiento.

Transformación	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
Wt/ banco sy	Incontables	≈ 3,000 col.
Wt/ PRS316	Incontables	≈ 1,000 col.

Tabla 9. Ciclos de selección con estrés por congelamiento (-20°C por 2días) para descartar las transformantes con fenotipo de tolerancia adquirida y enriquecer la clona de sy. El porcentaje es relativo al numero de células antes del tratamiento con estrés.

1.7. 5^a Transformación con el banco genómico de sy

Finalmente, llevé a cabo un último intento, en el cual se consideró que la selección de las transformantes positivas se facilitaría después de sólo un ciclo de enriquecimiento, ya que los datos anteriores sugerían que a través de varios ciclos se enriquecen en mayor proporción las mutaciones cromosomales, las cuales aparentemente se encuentran en mayor proporción con respecto a la frecuencia en que el gen sy está representado en el banco. Adicionalmente, para mejorar la representación del gen sy en la biblioteca genómica, se construyó un nuevo banco en el vector de clonación pRS314 (marcado con LEU). La representación de esta biblioteca se determinó por complementación de la auxotrofia de Trp en la cepa W303 (*ura3, leu2, his3, ade2, trp1*). Los resultados de la complementación se muestran en la Tabla 10.

Complemen- tación	µg de DNA	Tiempo de recuperación	Rendimiento en colonias	# de colonias complemen- tadas
1	5 µg	15'	≈ 200,000	≈ 200 colonias

Tabla 10. Complementación para la auxotrofia de Trp en la cepa W303 (*ura3, leu2, his3, ade2, trp1*) con el nuevo banco genómico de la mutante sy (*ura3, leu2, his3, ade2*). Para determinar el número de colonias complementadas el cultivo de transformación se incubó en medio SD HAU.

De acuerdo a los resultados, la representación del banco se mejoró considerablemente (de 1:8,000 a 1:1,000), por lo que procedimos a transformar la cepa silvestre con esta nueva biblioteca (Tabla 11) y utilizamos el mismo método de selección (ciclos de enriquecimiento y estrés por congelamiento). Es decir, los cultivos de transformación se diluyeron a una DO de 0.05₆₆₀ en medio selectivo (SD HAU) y se incubaron hasta llegar a una DO de 0.3₆₆₀, para someter el cultivo a un primer ciclo de estrés por congelamiento de -20°C/2días.

Posteriormente se realizaron otros dos ciclos de enriquecimiento (Tabla 12). Se rastrearán colonias después de un primer ciclo de enriquecimiento.

Transformación a 0.5 ₆₆₀	Volumen	µg de DNA	Tiempo de recuperación	Rendimiento en colonias
RS58/ nB. sy	10 ml	5 µg	1h	≈ 170,000
RS58/ pRS314	10 ml	5 µg	1h	≈ 150,000

Tabla 11. Transformación de la cepa silvestre WT (RS58) con el nuevo banco genómico de la mutante sy (RS58/pRS314-nB.sy) y transformación de la cepa silvestre con el vector de clonación como control (RS58/pRS314).

Células sobrevivientes al primer congelamiento.

Transformación	Dilución 10 ⁻¹
RS58/ nB. sy	1500 col. (1.5%)
RS58/ pRS314	1500 col. (1.5%)

Células sobrevivientes al segundo congelamiento.

Transformación	Dilución 10 ⁻¹
RS58/ nB. sy	≈ 600 col. (0.6%)
RS58/ pRS314	≈ 50 col. (0.05%)

Células sobrevivientes al tercer congelamiento.

Transformación	Dilución 10 ⁻¹
RS58/ nB. sy	≈ 300 col. (0.3%)
RS58/ pRS314	≈ 300 col. (0.3%)

Tabla 12. Ciclos de selección con estrés por congelamiento (-20°C por 2días) para descartar las transformantes con fenotipo de tolerancia adquirida y enriquecer la clona de sy. El porcentaje es relativo al número de células antes del tratamiento con estrés.

① Tratando de montar las condiciones para determinar el fenotipo de tolerancia de muchas transformantes a la vez, se sembraron en medio sólido por picadura \cong 4000 transformantes del primer ciclo y se recuperaron por unas horas en medio mínimo selectivo en pozos de cajas de elisa. Posteriormente se sometieron a estrés por H_2O_2 15mM/1h y se crecieron en medio sólido con SD HAU. En este ensayo crecieron \cong 120 colonias que mostraron un fenotipo de tolerancia. Para corroborar este fenotipo, las colonias se crecieron ahora en medio líquido y pasando por fase logarítmica de crecimiento. Ninguna colonia repitió el fenotipo de tolerancia, probablemente debido a la falta de una buena agitación durante el primer ciclo selectivo.

② Dado que en el segundo ciclo de estrés es donde se observó un claro enriquecimiento con respecto al primer ciclo (Tabla 12) y una diferencia significativa en número de colonias con respecto al control, fue de este tratamiento de donde seguimos analizando las posibles candidatas de *sy*. Con el método anterior (en cajas de elisa) pero cambiando las condiciones de agitación, analizamos \cong 1500 colonias, de donde aparentemente 50 colonias tenían fenotipo tolerante; Sin embargo, nuevamente este no repitió al ensayar de nuevo en medio líquido en tubo y pasando por fase logarítmica de crecimiento.

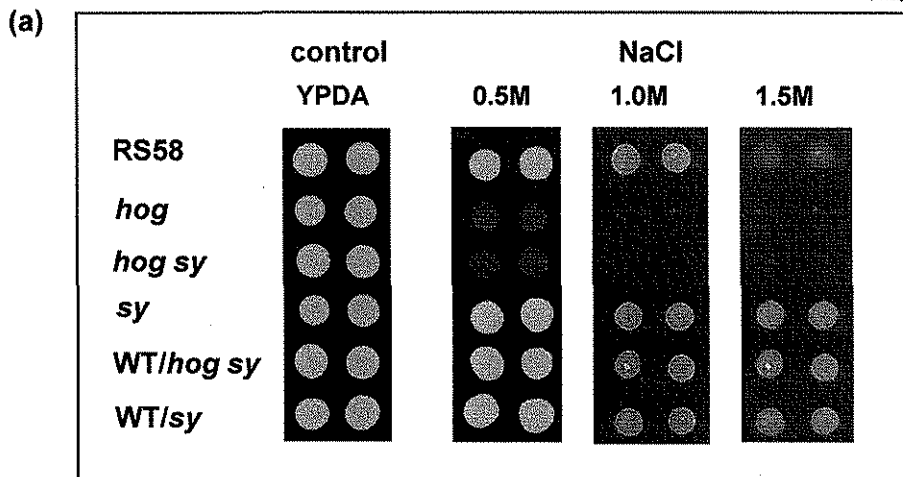
No logramos montar un método masivo de selección por estrés dado que nos fue imposible normalizar las condiciones de agitación y densidad óptica de los cultivos. Para realizar una verdadera selección de transformantes positivas es necesario hacer el ensayo en suficiente volumen de manera tal que se asegure la agitación y homogeneidad del cultivo, a la vez debe cuidarse de que el cultivo se encuentre en fase logarítmica (no mas saturado de 0.8_{660}). Además, ignoramos las razones de por qué pareciera que predomina el enriquecimiento de las mutaciones cromosomales y no de la contenida en el banco genómico de *sy*.

2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA MUTANTE *sy* EN DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS.

2.1. En diferentes condiciones de estrés osmótico la mutante *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58 y depende de Hog1p.

Como se indica en la sección de Materiales y Métodos, los ensayos de tolerancia a estrés osmótico se realizaron en diferentes concentraciones de sorbitol y NaCl. Si comparamos el fenotipo de las cepas *sy*, *WT/hog sy*, y *WT/sy* que se muestran en la Figura 8 (a) y 8 (b) vemos que la mutación *sy* es dominante en un fondo genético silvestre. Además, podemos observar que la mutante *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58 (WT) en condiciones de estrés osmótico extremas (NaCl 1.5M y sorbitol 2M). Todo lo anterior podemos corroborarlo analizando los porcentajes de sobrevivencia que se muestran en las gráficas 2 (a) y 2 (b). En las condiciones de estrés osmótico impuestas por las concentraciones de NaCl (0.5M y 1.0M) y sorbitol (0.5M y 1.5M) observamos claramente que la resistencia de las cepas silvestre RS58 y mutante *sy* dependen totalmente de Hog1p. Es decir, aunque la mutación *sy* es más tolerante que la cepa silvestre a condiciones extremas de estrés osmótico no rescata el fenotipo osmosensible de la mutante *hog*. Cabe aclarar que el estrés provocado con altas concentraciones de NaCl induce además una respuesta a estrés iónico.

TESIS CON FALLA LE ORIGEN



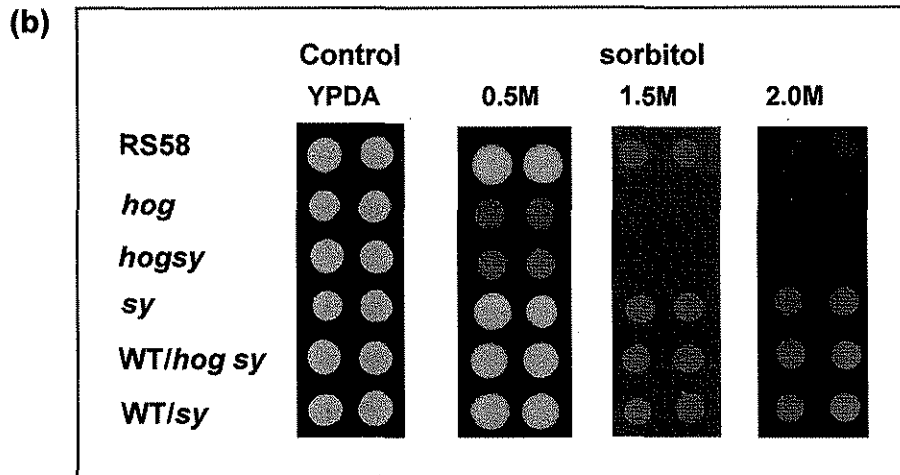
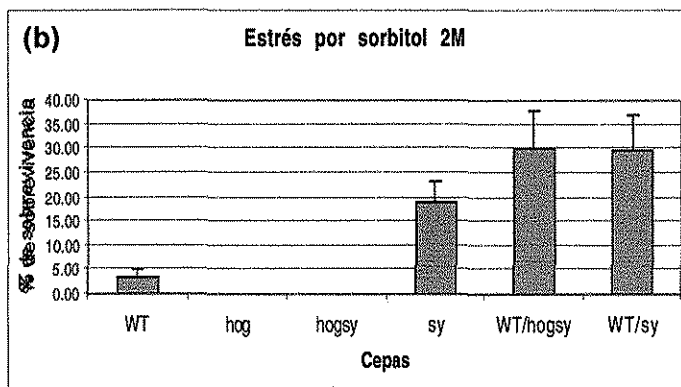
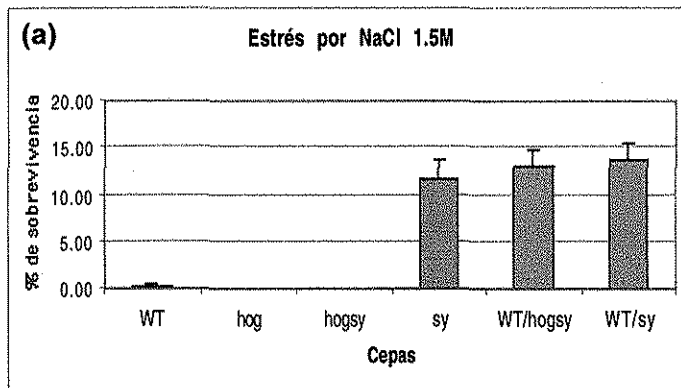


Figura 8. *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58, es dominante en un fondo genético silvestre WT/*sy* y depende totalmente de Hog1p para contender con el estrés osmótico, comparar *hog sy* y *sy*. Todas las cepas se encontraban en media fase logarítmica de crecimiento DO₆₆₀ de 0.5, se hicieron goteos directos (1:1) de cada cultivo en medio control (YPDA), (8a) NaCl (0.5, 1.0 y 1.5M) y (8b) sorbitol (0.5, 1.5 y 2.0M) y se incubaron a 25°C de 1-3 días.



Gráfica 2. Porcentajes de sobrevivencia en condiciones severas de estrés hiperosmótico (a) NaCl 1.5M, (b) sorbitol 2.0M. Se realizaron cuentas viables de todas las cepas a una DO₆₆₀ de 0.5 en medio control (YPDA) y medio con estrés (YPDA-NaCl o YPDA-Sorb).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2.2. En condiciones de estrés oxidativo y estrés por etanol *sy* es más tolerante que RS58 y parcialmente independiente de la vía de HOG.

Como se muestra en la Figura 9, *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58 y dominante en un fondo genético silvestre (ver fenotipo de WT/*sy*) en condiciones de estrés oxidativo y estrés por etanol, al igual que en condiciones de estrés osmótico. También en estas condiciones de estrés observamos que la mutante *hog* es todavía más sensible que la cepa silvestre RS58 en las concentraciones de H₂O₂ y etanol donde RS58 aún crece. En este fenotipo de tolerancia *sy* parece no depender totalmente de la vía de HOG (a diferencia de lo que ocurre durante estrés osmótico), ya que el fenotipo sensible de la mutación en *hog1p* se rescata en una cepa que contiene también la mutación *sy* (ver fenotipo de la cepa *hog sy*). Por otro lado, si analizamos los porcentajes de sobrevivencia en las gráficas 3 (a) y 3 (b) observamos que las cepas *hog sy* y *sy* no muestran el mismo grado de tolerancia, esto quiere decir que *sy* no es totalmente independiente de la vía de HOG y/o utiliza de manera principal otra vía de señalización para ser tolerante.

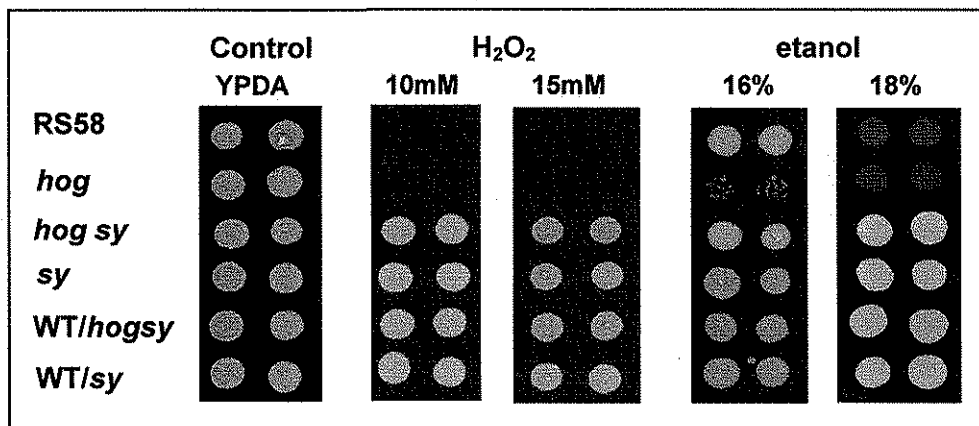
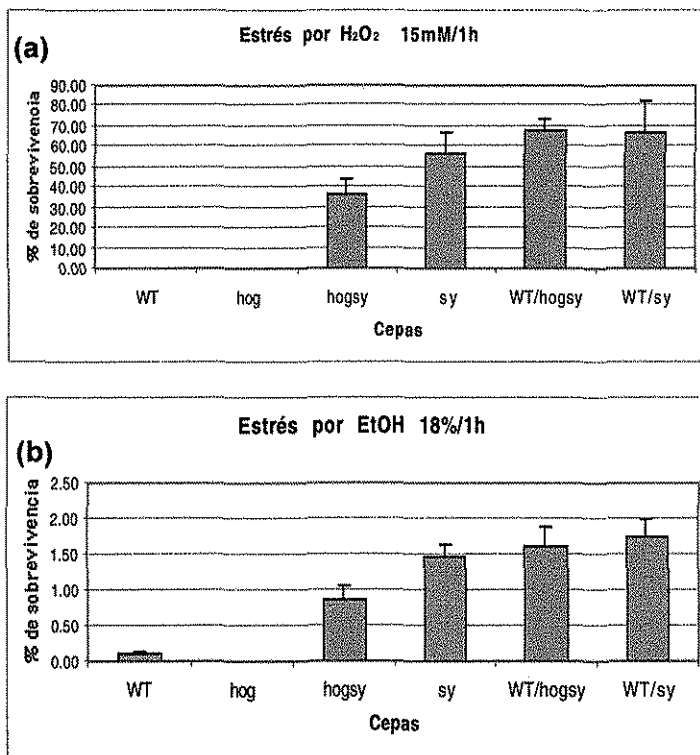


Figura 9. *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58, es dominante en un fondo genético silvestre WT/*sy* y rescata el fenotipo sensible de la mutante *hog* en las condiciones de estrés probadas (comparar *hog sy* y *sy*). A los cultivos en media fase logarítmica de crecimiento DO₆₀₀ de 0.5 se les añade H₂O₂ o etanol, a una concentración final de 10mM y 15mM de H₂O₂ o 15% y 18% de etanol, se dejan en agitación por 1h a 25°C, posteriormente se gotean directamente (1:1) en medio YPDA y se incuban aprox. 30 h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 3. Porcentajes de sobrevivencia en condiciones severas de estrés (a) oxidativo (H₂O₂ 15mM/1h), (b) por etanol (18%/1h). Se realizaron cuentas viables de los cultivos control (sin estrés), y de los cultivos con estrés (H₂O₂ y etanol) a una DO₆₆₀ de 0.5 en medio YPDA.

2.3. En condiciones de estrés por alta temperatura *sy* es más tolerante que RS58, parcialmente independiente de la vía de HOG y semidominante sobre un fondo genético silvestre.

Como se muestra en la Figura 10 y en la Gráfica 4, *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58 (comparar las cepas RS58 y *sy*) y rescata parcialmente el fenotipo sensible de la mutante *hog* (comparar las mutantes *hog* y *hog sy*) de la misma manera que en las condiciones de estrés oxidativo y por etanol. Sin embargo, las cepas RS58 y *hog* muestran la misma sensibilidad a estas condiciones de estrés (comparar RS58 y *hog* en la condición 50°C por 5min). Además, en este caso el diploide WT/*sy* no muestra tanto crecimiento como el haploide *sy*, pero sí muestra más crecimiento que el haploide silvestre RS58, corroborando la idea de que la mutación *sy* es semidominante en un fondo genético silvestre y bajo ciertas condiciones de estrés.

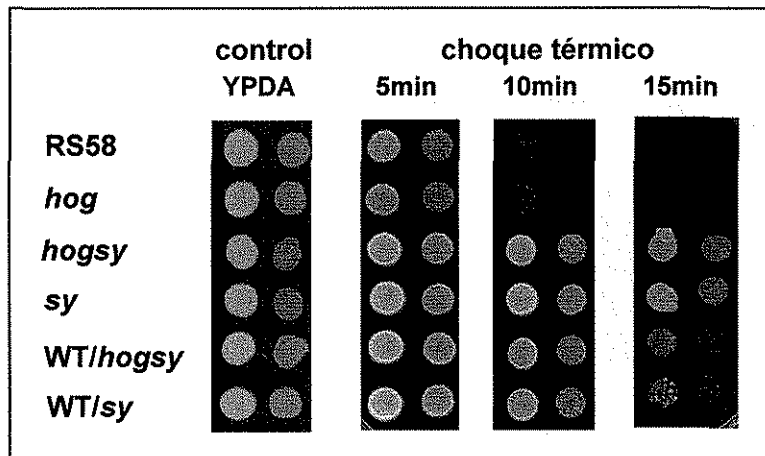
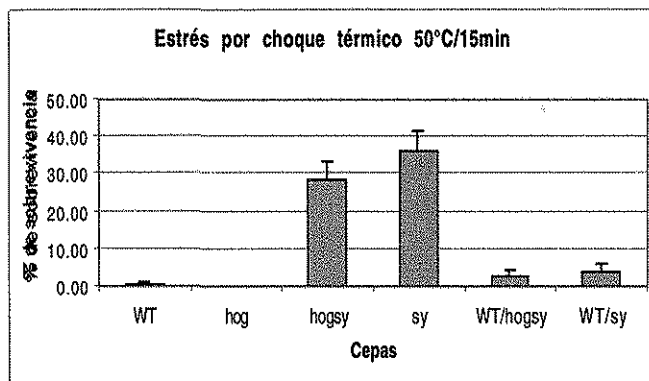


Figura 10. *sy* es más tolerante que RS58, parcialmente independiente de la vía de HOG y semidominante sobre un fondo genético silvestre en condiciones de estrés por choque térmico. Una vez que los cultivos en medio líquido a 25°C alcanzaron una DO₆₆₀ de 0.5, se transfieren a una temperatura de 50°C por 5', 10', y 15', posteriormente se gotean en medio YPDA y se incuban aprox. 3 días.



Gráfica 4. Porcentajes de sobrevivencia en una condición severa de estrés por choque térmico (50°C/15min). Se realizaron cuentas viables de todos los cultivos control (sin estrés) y los cultivos estresados (50°C/15min) una DO₆₆₀ de 0.5 en medio YPDA.

En todas las condiciones de estrés probadas se observa que la mutante *sy* es más tolerante que la cepa silvestre RS58. Además se observó que para las condiciones de estrés oxidativo, por etanol y choque térmico, *sy* es parcialmente independiente de la vía de HOG, falta aún construir la cepa Δ *hog sy* para asegurarnos de este fenotipo. Sin embargo, en las condiciones de estrés osmótico vemos que *sy*, al igual que la cepa silvestre RS58, depende totalmente de la vía de HOG.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS EN LA MUTANTE *sy*, Y COMPARACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS CON OTROS FONDOS GENÉTICOS.

Dado que la caracterización fenotípica de la mutante *sy* muestra que tal mutación otorga un fenotipo muy tolerante a diferentes condiciones de estrés, y en algunos casos este fenotipo es parcialmente independiente de la principal vía de respuesta a estrés osmótico (Vía de HOG), resulta interesante analizar el efecto de la mutación *sy* en la acumulación de algunos mensajeros de genes que se sabe están regulados de diferente manera por condiciones de estrés, y comparar tal acumulación con los diferentes fondos genéticos utilizados en la caracterización fenotípica, tratando de determinar si hay alguna relación entre el fenotipo de *sy* y su efecto en la acumulación de mensajeros de genes de estrés.

Podemos suponer que el fenotipo de la mutante *sy* (mayor tolerancia que la cepa silvestre a diferentes condiciones de estrés), puede deberse a una expresión constitutiva de los genes de respuesta a estrés o a una mayor inducción de estos en comparación con la cepa silvestre en condiciones de estrés. Para saber al respecto, se comparó la expresión de un grupo de genes previamente caracterizados como de respuesta a estrés, entre la cepa silvestre y la mutante *sy*, en una condición sin estrés y en una condición donde se inducen los genes de respuesta a estrés osmótico y se puede apreciar el crecimiento de ambas cepas. Además se analizó el efecto de la mutación *sy* en un fondo genético *hog-* y en un fondo heterocigoto del gen SY, para saber si hay alguna relación entre la expresión de los genes de estrés y los fenotipos en estas cepas. El análisis se realizó a través de experimentos tipo Northern, los cuales se llevaron a cabo con RNAs purificados de las cepas haploides RS58, *hog*, *hog sy*, *sy* (pertenecientes al tetratipo) y de la cepa diploide WT/*hog sy*, crecidas a una DO de 0.5₆₆₀ en una condición control (sin estrés) y una condición de estrés hiperosmótico (NaCl 0.4M o 1M

durante 30min). Los genes que se utilizaron como sonda fueron CTT1 (catalasa t citosólica), TPS1 (trehalosa fosfato sintasa), GRE1 (proteína similar a las proteínas LEAs de plantas), GRE2 (proteína similar a dihidroflavonol-4-reductasa de plantas), GRE3 (aldosa reductasa), GPD1 (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), DDR48 (proteína inducida por estrés de función protectora) y HSP26 (proteína pequeña de choque térmico).

3.1. La mutación *sy* no provoca una expresión constitutiva significativa de los genes de respuesta a estrés.

Si comparamos la acumulación de los diferentes mensajeros analizados en la mutante *sy* entre la condición sin estrés (control) y la condición con estrés (NaCl 0.4M), que se muestra en la Figura 11, podemos observar que al igual que en la cepa silvestre, en la mutante *sy* en una condición sin estrés no hay una señal significativa de los diferentes mensajeros en comparación con la condición de estrés, donde si se aprecia la acumulación de los diferentes transcritos. Lo anterior significa que el fenotipo tolerante de la mutante *sy* no es la causa de una expresión constitutiva de los genes de respuesta a estrés, es decir, el efecto de la mutación *sy* con respecto a la inducción de estos genes, está regulado por una señal de estrés.

3.2. La acumulación de mensajeros que se sabe están fuertemente regulados por la vía de HOG, los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p y la vía de PKA, en condiciones de estrés osmótico, es mayor en la mutante *sy*.

Con respecto a la acumulación de los diferentes mensajeros analizados en condición de estrés osmótico (NaCl 0.4M/30'), podemos ver que entre las diferentes cepas se conserva un patrón de expresión. Como se muestra en la Figura 11, en el caso de los genes GRE1, GRE2, GRE3, CTT1 y TPS1, claramente se ve que en la condición de estrés osmótico, hay una mayor

acumulación de los transcritos en las cepas *sy* y *WT/hog sy* con respecto a la cepa silvestre RS58 (WT). Además, el efecto de la mutación *sy* en cuanto a la acumulación de este grupo de mensajeros en condiciones de estrés osmótico, es dominante en su fondo genético silvestre, es decir, la presencia del gen silvestre SY en el diploide *WT/hog sy*, no abate la inducción mediada por la mutación *sy*.

En esta condición de estrés, la acumulación de transcritos de genes de estrés en la cepa silvestre (WT) se debe principalmente a la actividad de la vía de HOG, ya que como podemos ver en la mutante *hog* se abate casi totalmente tal inducción. Además, si comparamos la cantidad de transcrito entre las cepas WT, *hog*, y *hog sy*, podemos darnos cuenta que la mutación *sy* suprime parcialmente el efecto de la mutación *hog*. De este grupo de genes se sabe que en condiciones de estrés osmótico se inducen principalmente a través de la vía de HOG, y que su transcripción depende en gran parte de los factores Msn2p y Msn4p, es por esto que están fuertemente reprimidos por la vía de PKA (Garay, 1999); (Rep, 1999); (Norbeck, 2000). Por otro lado, y al igual que en los ejemplos anteriores, en el caso del gen GPD1, podemos ver que también está fuertemente regulado por la vía de HOG en condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, recientemente se descubrió que su inducción durante condiciones de estrés osmótico no depende exclusivamente de los factores Msn2p/4p, sino más bien de un grupo de factores (Msn2p, Msn4p, Msn1p, y Hot1), donde al parecer el más importante es Hot1 (Alepez, 2001). Se sabe que GPD1 está sujeto a represión por glucosa de manera independiente de la vía de PKA, es decir, este gen está regulado de diferente manera que el grupo de genes antes descritos. Quizás por esto no se observan claras diferencias en la acumulación de transcrito entre las cepas silvestre RS58 (WT), la mutante *sy* y el diploide *WT/hog sy*.

3.3. La cinética de expresión de los genes de respuesta a estrés GRE1, GRE2, GRE3, CTT1, TPS1 y GPD1 es muy parecida entre la cepa silvestre RS58 y la mutante *sy*.

Para determinar si el efecto de la mutación *sy* en comparación con la cepa silvestre, en cuanto a la acumulación de los diferentes transcritos es real, y no un fenómeno sólo de tiempo; se analizó la cinética de expresión bajo la misma condición de estrés (NaCl 0.4M) de algunos de los genes ya mencionados (GRE1, GRE2, GRE3, TPS1, CTT1 y GPD1), a lo largo del tiempo. En la Figura 12 observamos que, en la mayoría de los genes, la inducción alcanza los niveles máximos entre los 20 min y 30 min en ambas cepas, pero con más intensidad en la mutante *sy*. Al igual que en la Figura 11, también aquí observamos que no hay diferencias significativas en la acumulación del transcrito de GPD1 entre la cepa silvestre RS58 (WT) y la mutante *sy*.

3.4. El efecto de la mutación *sy* induce la expresión de genes de respuesta a estrés independientes de la vía de HOG en condiciones de estrés osmótico.

DDR48 (chaperona de daño al DNA) se induce en condiciones de daño al DNA, estrés oxidativo (Godon, 1998) y estrés hiperosmótico. Se sabe que para su inducción en estrés hiperosmótico es necesaria una concentración mayor de 0.4M de NaCl y que tal inducción es independiente de la vía de HOG y PKA (Miralles, 1995). En el análisis de la acumulación de los mensajeros que se muestra en la Figura 13, vemos que hay una inducción de este mensajero en los diferentes fondos genéticos, entre la condición control y el tratamiento con estrés osmótico (1M NaCl), y que tal inducción es independiente de la vía de HOG (ver mutante *hog*). Además, la inducción de DDR48 en la condición de estrés, se acentúa en la mutante *hog sy*, es decir, la mayor inducción de este gen se debe a la mutación *sy* acompañada de la mutación *hog*. Por otro lado, sabemos que HSP26 se induce en diferentes condiciones de

estrés (estrés oxidativo, choque térmico, estrés osmótico e inanición por glucosa), y por lo que muestran nuestros datos pareciera ser independiente de HOG y estar regulado por la mutación *sy* y la mutación *hog* de la misma manera que el gen DDR48, dado que en ambos casos se observa el mismo patrón de expresión en los diferentes fondos genéticos.

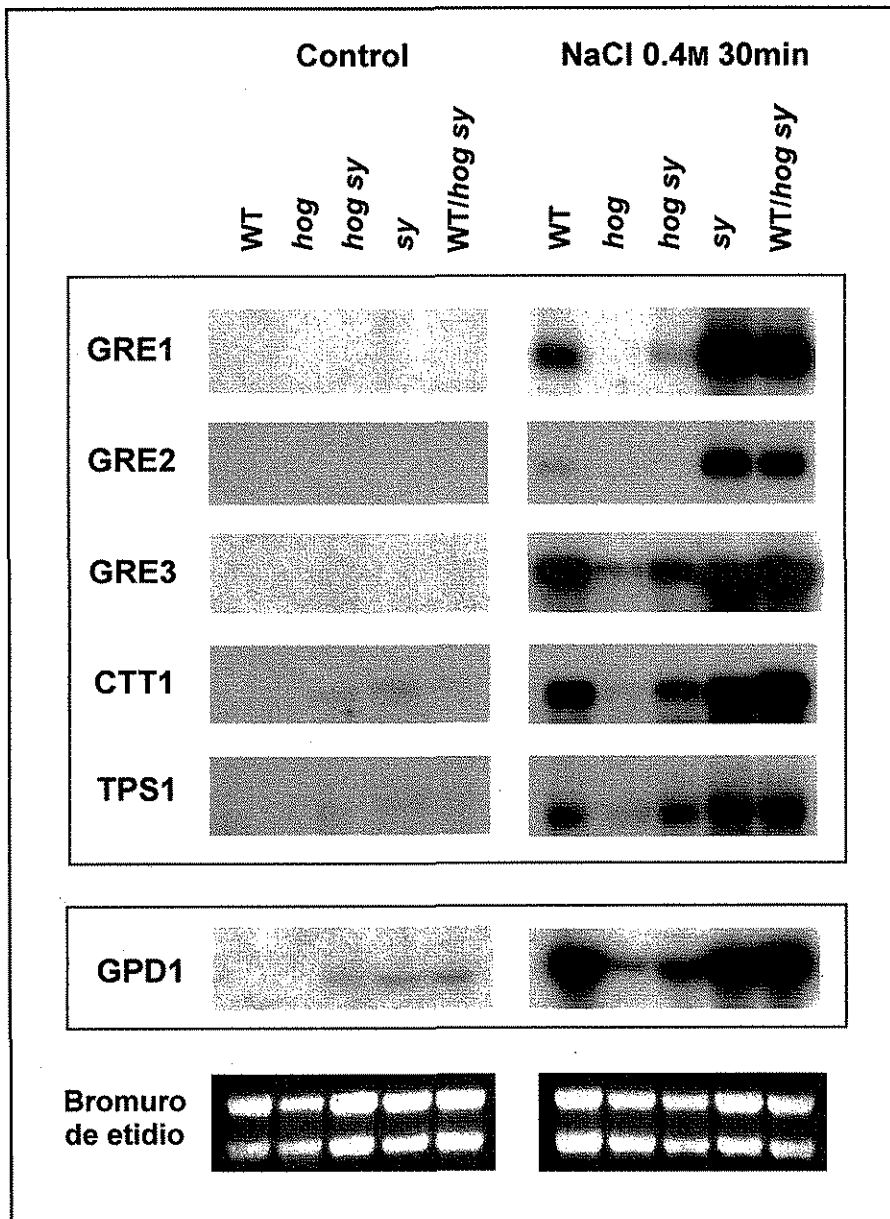


Figura 11. Análisis de la acumulación de transcrito de los genes de estrés GRE1, GRE2, GRE3, CTT1, TPS1, y GPD1; en las cepas WT, *hog*, *hog sy*, *sy* y WT/*hog sy*, en una condición control (sin estrés) y bajo condición de estrés osmótico con NaCl 0.4M por 30min.

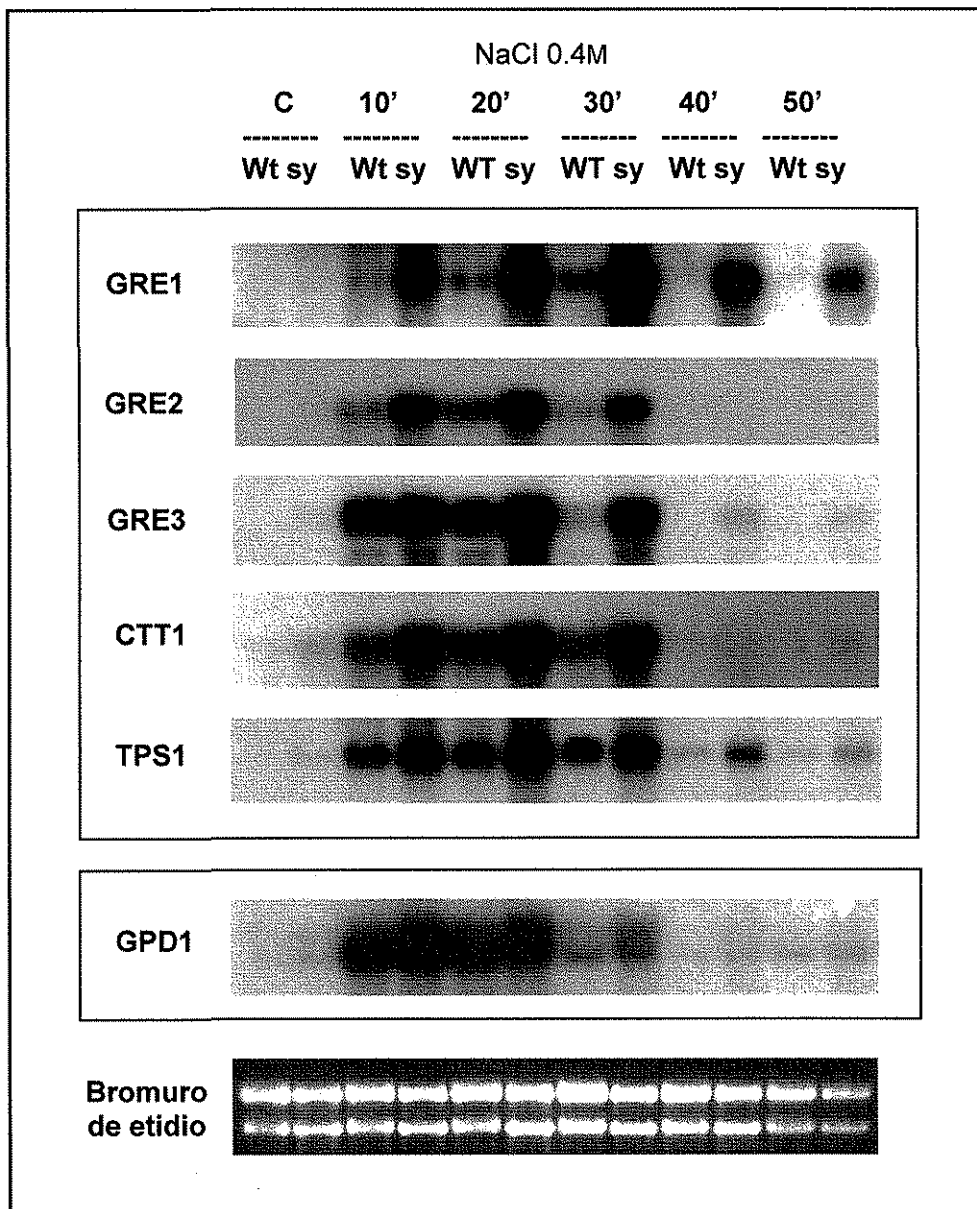


Figura 12. Comparación en la cinética de inducción de los genes GRE1, GRE2, GRE3, CTT1, TPS1 y GPD1; entre las cepas silvestre RS58 (WT) y la mutante sy en condición de estrés osmótico con NaCl 0.4M .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

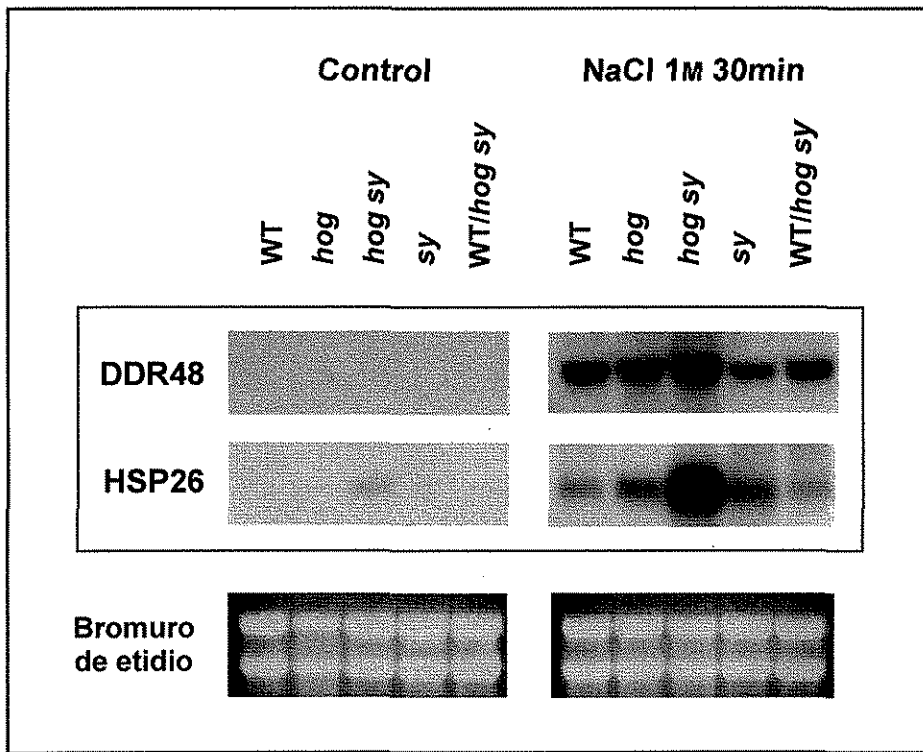


Figura 13. Análisis de la acumulación de transcrito de los genes de estrés DDR48 y HSP26 en las cepas WT, *hog*, *hog sy*, *sy* y WT/*hog sy*, en una condición control (sin estrés) y bajo condición de estrés osmótico con NaCl 1M por 30min.

4. FENOTIPO DE TOLERANCIA DE LA MUTANTE *sy* EN UN FONDO GENÉTICO *msn2p/msn4p* Y EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Como ya se sugirió anteriormente, el efecto de la mutación *sy* parece estar intimamente relacionado con la vía de HOG, los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p y la vía de PKA. Además, recientemente se aisló en el laboratorio un supresor (*pde2*) de la mutación *sy* el cual participa en la vía de PKA. Por lo tanto no se descarta la posibilidad de que *sy* sea uno de estos factores de transcripción o se encuentre en la vía de PKA. De antemano sabemos que las mutantes *msn2* y/o *msn4*, son sensibles al estrés oxidativo y que todas las mutantes reportadas que son tolerantes al estrés osmótico y que participan en la vía de PKA presentan fallas en crecimiento con respecto a la cepa silvestre, es decir, son mas lentas en crecer, o no esporulan, o floculan o se afectan si se les cambia la fuente de carbono. Por lo anterior, analizamos la segregación y el fenotipo de las tétradas generadas del diploide *msn2/msn4* × *sy*; así como el fenotipo de la mutante *sy* en condiciones de estrés oxidativo con diferentes fuentes de carbono (galactosa y glicerol), ya que experimentos previos indican que la mutante *sy* no muestra una tasa de crecimiento significativamente diferente a la cepa silvestre.

4.1. *sy* no parece ser ninguno de los factores de transcripción Msn2p o Msn4p, y no depende de ellos para tolerar el estrés oxidativo.

Para saber si *sy* tenía alguna relación con los factores Msn2p o Msn4p se cruzó la doble mutante *msn2/msn4* con la mutante *sy* complementando la auxotrofia de histidina, y posteriormente se analizaron varias tétradas. Las auxotrofías y el fenotipo de tolerancia de las cepas progenitoras se muestra en la Figura 14 (a), donde se puede observar que la cepa silvestre W303 (fondo genético de la doble mutante *msn2/msn4*) es auxótrofa de histidina y triptófano, y sensible a H₂O₂ (his-, trp- y H₂O₂-15mM), la doble mutante *msn2/msn4* no es protótrofa de histidina ni triptófano (debido a que las interrupciones en MSN2 y MSN4 se

hicieron con los genes TRP e HIS respectivamente) pero si sensible a H₂O₂ (his+, trp+ y H₂O₂- 15mM), mientras que *sy* es auxótrofa de histidina, pero no de triptófano y tolerante a H₂O₂ (his-, trp+ y H₂O₂+ 15mM). En los resultados de la figura 14 (b), se muestra la segregación de las auxotrofías y el fenotipo de tolerancia en una de las tétradas analizadas del diploide *msn2/msn4* × *sy*. Dado que la mutación *msn2* tiene un marcador de triptófano y el fondo genético de *sy* es trp+, la segregación de este gen es 4:0, mientras que la mutación *msn4* tiene un marcador de histidina y como el fondo genético de *sy* es his-, la segregación es 2:2, al igual que la segregación del fenotipo de tolerancia en estrés oxidativo (H₂O₂ 15mM) el cual se debe a la mutación *sy*, ya que las mutaciones *msn2/msn4* juntas o por separado son sensibles a tal estrés. Lo anterior indica que la mutación *sy* suprime la sensibilidad de la mutante *msn2/msn4* y aparentemente no depende de ellos para tolerar el estrés oxidativo.

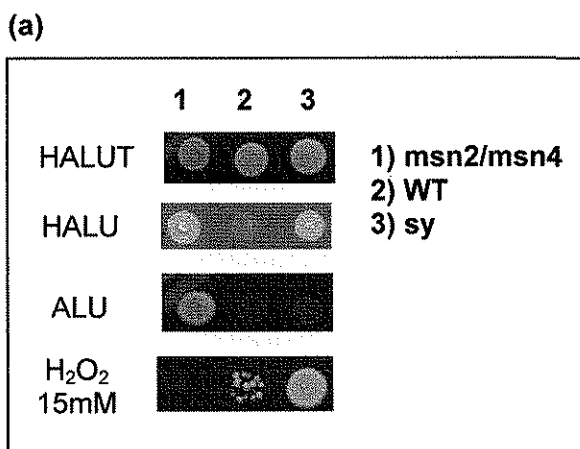
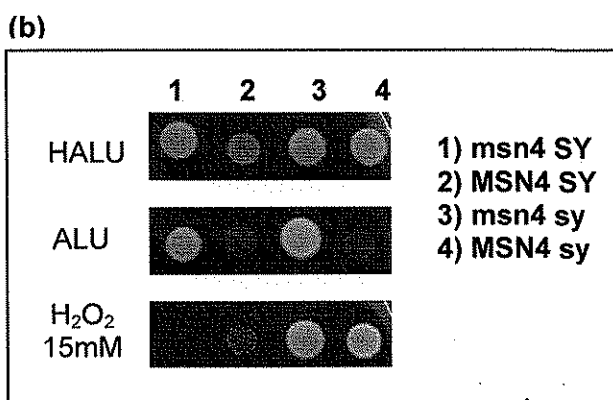


Figura 14. (a) corroboración de auxotrofías y fenotipo en estrés oxidativo (H₂O₂ 15mM/1h) de las cepas *msn2/msn4*, silvestre W303 (WT) y *sy*. (b) análisis de auxotrofia a triptófano e histidina y tolerancia a estrés oxidativo (H₂O₂ 15mM/1h) de una tétrada del diploide *msn2-msn4/sy*.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.2. El fenotipo de crecimiento y tolerancia de *sy* aparentemente no se afectan al cambiar la fuente de carbono.

Se sabe que las mutantes (que se han reportado) con fenotipo de tolerancia a estrés que participan en la vía de PKA tienen fallas en el crecimiento cuando se les cambia la fuente de carbono, y dados los resultados anteriores, podríamos pensar que la mutante *sy* participa en esta vía. Es por esto que se analizó el fenotipo de la mutante *sy* en condiciones de estrés oxidativo con diferentes fuentes de carbono (glucosa y glicerol). Como se muestra en la Figura 15, el fenotipo de tolerancia a estrés oxidativo de la mutante *sy* no se afecta significativamente al cambiar la fuente de carbono, ya que aún en glicerol como fuente de carbono crece y conserva su fenotipo de tolerancia a H_2O_2 . Los goteos y cosechas de las cajas se realizaron en los mismos tiempos.

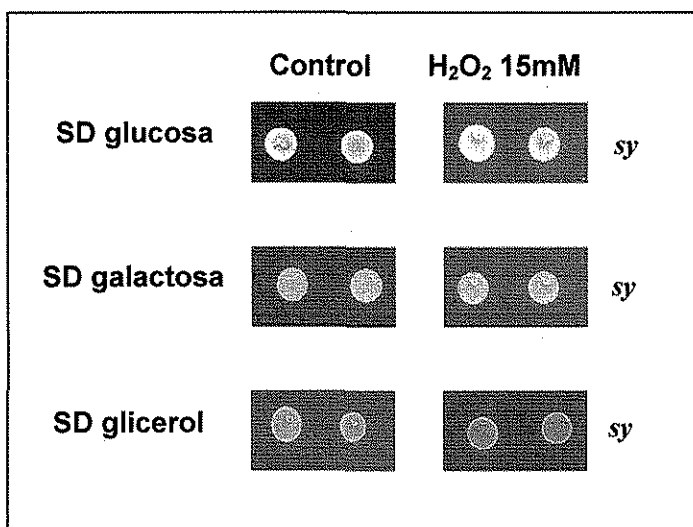


Figura 15. Análisis del fenotipo de la mutante *sy* en diferentes fuentes de carbono (glucosa, galactosa y glicerol) sin estrés y con estrés oxidativo H_2O_2 15mM/1h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN.

La respuesta transcripcional a los cambios ambientales es un tema de gran interés tanto en la investigación básica, como aplicada. Desde el punto de vista de la investigación básica, para entender esta respuesta es necesario descifrar ;(1) cómo se percibe y transmite al núcleo la señal de estrés, para, (2) identificar cuáles genes se inducen bajo cada condición de estrés y, finalmente, (3) establecer las consecuencias fenotípicas de tal inducción en la tolerancia al estrés. La facilidad de hacer investigación genética en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ha hecho de este microorganismo un buen modelo de estudio en la respuesta al estrés a nivel molecular. Además, la información generada se ha utilizado para aislar y caracterizar proteínas relacionadas al estrés en eucariotes superiores y/o para diseñar estrategias que incrementen la resistencia al estrés en organismos de interés industrial.

Por lo anterior y dado el fenotipo pleiotrópico de tolerancia a estrés que presenta la mutante *sy*, resulta interesante saber; (1) cuál es el gen afectado en esta mutante, (2) el fenotipo que provee a la cepa silvestre en diferentes condiciones de estrés, y (3) su posible relación con la respuesta transcripcional al estrés.

Para aislar el gen responsable del fenotipo de la mutante *sy* se propuso complementar el fenotipo sensible a diferentes condiciones de estrés de la cepa silvestre (RS58), con un banco genómico de la cepa mutante *sy*. No se logró aislar el gen afectado en la mutante *sy* con el método propuesto, ya que la selección de las clonas positivas, es decir, transformantes con fenotipo pleiotrópico de tolerancia a estrés, se dificultó por varias razones.

Como sugieren los datos de la Tabla 6, Tabla 8, y Figura 7; la alta densidad celular y una fase de crecimiento postdiáuxica son factores que pueden dificultar la selección de fenotipos tolerantes a estrés. Pareciera que las células se protegen de cierta manera cuando se encuentran en mayor densidad o en fase postdiáuxica. Lo anterior puede deberse a que un cultivo celular muy denso no sufre el mismo impacto al ser sometido a alguna condición de estrés, que un cultivo menos denso. Por otra parte, se sabe que en levadura después del

cambio diáuxico, se expresan muchos genes de repuesta a estrés que tienen elementos PDS y/o STRE en su región promotora, principalmente aquellos regulados por la actividad de PKA, ya que esta proteína está modulada por la cantidad de AMPc, el cuál disminuye conforme la levadura agota la cantidad de glucosa en el medio y respira, es decir, entra a fase postdiáuxica. Otro punto a tratar, es que, al parecer, el propio método de transformación acondiciona a las células para tolerar situaciones posteriores de estrés, ya que durante la transformación las células son lavadas con LiCl, PEG y sometidas a choque térmico (ver protocolo de transformación pág. 30). Se sabe que si la levadura *S. cerevisiae* es sometida a tratamientos de estrés moderado, adquiere cierta tolerancia contra el mismo u otros tipos de estrés en mayor dosis, fenómenos que se conocen como "Tolerancia adquirida" y "Protección cruzada", y que podemos observar si analizamos los resultados de la Tabla 7, donde pareciera que las células sometidas a tratamientos consecutivos (de diferente tipo) de estrés adquieren cierta tolerancia contra estos. Para evitar los inconvenientes antes mencionados, se propuso que después de las próximas transformaciones, antes de someter los cultivos a una selección por estrés, estos se harían pasar por fase logarítmica de crecimiento y los ensayos de estrés se realizarían en cultivos con una densidad óptica DO_{660} aproximada de 0.5. Además, suponíamos que utilizando el segundo banco, el cual aparentemente tiene mejor representación génica (Tabla 10) y utilizando también el método propuesto (Método de enriquecimiento), se enriquecería la presencia del gen de interés. Anteriormente (1^{ra} Transformación con el banco genómico de *sy*), ya habíamos observado que con los tratamientos de estrés para seleccionar las clonas positivas (con fenotipo de tolerancia), seleccionábamos también transformantes con fenotipo tolerante debido a mutaciones cromosomales (colonia No. 3 y No. 15), las cuáles también se enriquecen con el método utilizado para enriquecer las clonas positivas. Dados los resultados obtenidos de la 4^{ta} Transformación con el banco genómico de *sy* (páginas 51 y 52, Tabla 9), al parecer solo se enriquecen las mutaciones cromosomales. Además, montar un método masivo para

seleccionar fenotipos de estrés en levadura se vuelve tedioso, porque los ensayos de tolerancia deben hacerse rigurosamente cuando las células se encuentran en fase logarítmica de crecimiento y no estacionaria, preferentemente a una DO_{660} aproximada a 0.5, y una vez seleccionadas las transformantes aparentemente positivas, es muy tedioso discernir entre las que exhiben fenotipo de tolerancia debido a una mutación cromosomal o al vector de clonación.

Si realmente el banco estuviera tan bien representado como lo sugiere el dato de complementación para la auxotrofia de triptófano (1:1000), sería muy difícil explicar por qué solo se enriquecen las mutaciones cromosomales, así que una posibilidad es que el dato de complementación para esta auxotrofia no sea significativo para sugerir que los otros genes se encuentran en la misma proporción que éste y otra posibilidad podría ser que el fenotipo de la mutante *sy* esté dado por un rearrreglo cromosómico donde participan varios genes que no están muy distantes unos de otros, de tal manera que segregan como una mutación monogénica, pero se dificulta su representación en un banco genómico debido al tamaño de los insertos de DNA (13 Kb, los fragmentos más grandes). Es decir, si esta última opción fuera el caso, sería necesario complementar la cepa con fragmentos de DNA más grandes, ya sea en cósmidos o YACS. Además, quizás fuera mejor opción complementar una cepa más sensible que la silvestre, por ejemplo la mutante *hog*, y seleccionar con estrés por H_2O_2 o choque térmico, donde el porcentaje de sobrevivencia de la mutante *hog* es casi nulo, mientras que la cepa *hog sy* muestra un porcentaje de sobrevivencia significativo. Otra buena opción para determinar cuál es el gen afectado en la mutante *sy*, sería mapear la mutación, ya que ahora se cuenta con diversos marcadores genéticos para cada uno de los 16 cromosomas de la levadura *S. cerevisiae*.

En la caracterización fenotípica de la mutante *sy* podemos observar que en todas las condiciones de estrés probadas la mutante *sy* es más tolerante que la cepa silvestre. Además, el fenotipo de tolerancia que exhibe la mutante *sy* en condiciones de estrés osmótico y estrés

iónico es totalmente dependiente de la vía de HOG, ya que como se muestra en la Figura 8 y Gráfica 2, en estas condiciones de estrés la mutante *hog sy* es tan sensible como la mutante *hog*, es decir, la mutante *sy* responde a tales condiciones de estrés a través de la vía de HOG, y por lo tanto no es capaz de rescatar el fenotipo de sensibilidad que otorga la mutación en la cinasa Hog1p. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, estrés por etanol y estrés por choque térmico, tal tolerancia es parcialmente independiente de la vía de HOG, ya que la mutación *sy* rescata parcialmente el fenotipo sensible de la mutante *hog* (Figuras 9 y 10, y Gráficas 3 y 4), es decir, en estas condiciones de estrés la mutante *sy* responde alternativamente a través de otra vía independiente de la vía de HOG. Además, a pesar de que en las condiciones de estrés osmótico, estrés oxidativo y estrés por etanol; la mutación *sy* es dominante en un fondo genético silvestre, durante una condición de estrés por choque térmico es semidominante, es decir, la presencia del gen silvestre, titula el efecto fenotípico de la mutación *sy* (Figura 10 y Gráfica 4). Todos estos datos sugieren que la mutación *sy* afecta un gen que está involucrado en por lo menos dos vías de respuesta a estrés, una que señaliza la respuesta a estrés osmótico y estrés iónico, y otra que responde a estrés oxidativo y estrés por choque térmico. No es difícil pensar tal posibilidad ya que a través de la vía de HOG, además de inducirse los genes de respuesta a estrés osmótico, se expresan algunos genes importantes en la respuesta a estrés iónico, tales como ENA1 y HAL1, esto último sucede a través de un mecanismo de desrepresión donde la cinasa Hog1p desactiva el complejo represor Ssn6p-Tup1p-Sko1p presente en el promotor de estos genes (Proft, 2001). Por otro lado, se sabe que al igual que en estrés oxidativo, también en estrés por altas temperaturas se induce la formación de especies reactivas de oxígeno en el interior celular, es por esto que ambos tipos de estrés comparten algunas respuestas y por lo tanto, la regulación de varios genes (Piper, 1995). Aunque, algunos genes de respuesta a estrés oxidativo se inducen principalmente a través de la vía de HOG como el gen CTT1, se sabe que la levadura responde de manera independiente de la vía de HOG a través de varios factores de transcripción a esta condición

de estrés, donde al parecer cada uno está regulado por diferentes agentes causantes de algún tipo de estrés oxidativo, entre estos factores se han descrito: Yap1p, Skn7p, Gcn4p, Hsf1p, Msn2p y Msn4p, principalmente (Godon, 1998).

Por los resultados obtenidos en los ensayos tipo Northern, al parecer, el efecto fenotípico de la mutación *sy*, se debe a que en esta mutante se inducen en mayor proporción muchos genes de respuesta a estrés en comparación con la cepa silvestre, principalmente aquellos genes cuya inducción en respuesta a estrés, está íntimamente regulada por la vía de HOG, los factores de transcripción Msn2/Msn4 y la vía de PKA (figura 11), ya que tal efecto no se detecta en genes regulados de alguna otra manera, como sucede con los genes GPD1, DDR48 y HSP26. Además, en el laboratorio se aisló (Reyes J.L.) una mutante de *Pde2p* en el fondo genético de *sy* que suprime su fenotipo de tolerancia a estrés, dato que apoya la idea de que *sy* efectivamente está relacionada a la vía de PKA. Por otra parte, si analizamos los promotores de los genes cuyos mensajeros se ven aumentados por efecto de la mutación *sy* en respuesta a estrés osmótico, podemos darnos cuenta que casi todos (GRE3, CTT1, TPS1, GPD1, HSP26 y DDR48) contienen por lo menos un elemento STRE en su región promotora. Se sabe que a través de este elemento (STRE) se induce la expresión de los genes en respuesta a diferentes condiciones de estrés, y que la inducción conferida por este elemento está negativamente regulada por la vía de PKA. Estos datos, en conjunto con el hecho de que la mutación *sy* confiere tolerancia en diferentes condiciones de estrés, sugieren fuertemente que *sy* está involucrada en la respuesta general a estrés. Por todo lo anterior pensamos que quizás *sy* podría ser alguno de los factores de transcripción Msn2p/Msn4p, ya que estos responden a situaciones generales de estrés, están regulados por PKA y su dependencia de Hog1p varía según el promotor del gen a regular. Debido a lo anterior cruzamos las mutantes *sy* y *msn2p/msn4p*, y los resultados (Figura 14) nos muestran que *sy* suprime el fenotipo sensible de la mutación *msn4p*, y se sabe que la falta de uno o los dos factores transcripcionales da como resultado una cepa sensible a varias condiciones de estrés. Si *sy* fuera el gen MSN2

habríamos observado alguna tétrada con una proporción de haploides sensibles y tolerantes 3:1, en el total de tétradas analizadas. Sin embargo, en el total de los casos (tétradas analizadas) solo había proporciones de haploides sensibles y tolerantes 2:2 (no se muestra todo el análisis), hecho que sugiere que *sy* no es ninguno de estos factores. Por otro lado, las mutantes reportadas tolerantes a estrés e involucradas con la vía de PKA tienen defectos relacionados al crecimiento ya sea en glucosa o diferentes fuentes de carbono, defectos que no son evidentes en la mutante *sy* (Figura 15), falta aún realizar cinéticas de crecimiento de esta mutante en diferentes fuentes de carbono y ver a detalle si se ve afectada significativamente su tasa de crecimiento.

Es difícil establecer el papel de la mutación *sy* en cuanto a la regulación del gen *GPD1*, ya que en condiciones de estrés osmótico este gen se regula de varias formas, dependiendo de la severidad del estrés. Se sabe que la inducción de *GPD1* en una condición de 0.5M y 0.85M de NaCl es parcialmente dependiente de la vía de HOG, pero que en una condición de 1.4M de NaCl es totalmente dependiente de esta vía (Rep, 1999). Además, se ha observado que la inducción de *GPD1* en condiciones de estrés osmótico es independiente de la vía de PKA (Norbeck, 2000), y que más bien en esta condición de estrés el principal activador transcripcional es *Rap1* a través del elemento PDS presente en el promotor de este gen (Eriksson, 2000). También se ha visto que los factores *Hot1p*, *Msn1p*, *Msn2p* y *Msn4p*, están involucrados en diferente grado con la regulación de este gen (Rep, 2000).

Por otro lado observamos que en la inducción de los genes *DDR48* y *HSP26* (Figura 13) en condiciones de estrés osmótico (NaCl 1M), la mutación *sy* no induce la transcripción de estos genes más de lo que se induce en la cepa silvestre RS58. Sin embargo, en un fondo genético *hog-* la mutación *sy* propicia la inducción de los genes *DDR48* y *HSP26*, dato que sugiere que la presencia de la cinasa *Hog1p* en un fondo genético *sy-*, de alguna manera reprimen la inducción de estos genes en esta condición de estrés.

Miralles en 1995, reportó que la inducción de DDR48 en esta condición de estrés no depende de la vía de HOG, y que mas bien hay algo de represión por está vía. Por otro lado, Márquez en 1998, determina que en condiciones normales de crecimiento (sin estrés), DDR48 está reprimido por el complejo Ssn6p-Tup1p y que mutando este complejo represor, la expresión de DDR48 se vuelve constitutiva. Ahora se sabe que la represión de muchos genes de respuesta a estrés a través del complejo represor Ssn6p-Tup1p, está dirigida por la proteína Sko1p, la cual está regulada por la cinasa Hog1p (Proft, 2001). Estos datos sugieren que la mutación *sy* puede ser una mutación puntual en alguna de las proteínas de este complejo represor. Sin embargo, como podemos observar en las Figuras 11 y 13, el efecto de esta mutación en cuanto a la acumulación de los mensajeros de los genes de respuesta a estrés, está regulado por estrés, es decir, no otorga un efecto constitutivo significativo, como lo hacen las diferentes mutantes reportadas en el complejo Ssn6p-Tup1p-Sko1p, las cuales muestran la misma cantidad de mensajero tanto en condición sin estrés (control) como en condición de estrés (Márquez, 1998).

BIBLIOGRAFIA.

- Alepuz M.P., Jovanovic A., Reiser V., Ammerer G.(2001) Stress-Induced MAP Kinase Hog1 Is Part of Transcription Activation Complexes. *Molecular Cell*. 7: 767-777.
- Attfield V.P. (1997) Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*. 15: 1351-1356.
- Ahuir P.A., Posas F., Serrano R., Profit M. (2001) Multiple Levels of Control Regulate the Yeast cAMP-response Element-binding Protein Repressor Sko1p in Response to Stress. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (40): 37373-37378.
- Belles-Boix E., Babiychuk E., Montagu V.M., Inzé D., Kushnir S. (2000) CEO1, a new protein from *Arabidopsis thaliana*, protects yeast against oxidative damage. *FEBS Letters*. 482: 19-24.
- Blomberg A., Adler L. (1992) Physiology of Osmotolerance in Fungi. *Advances in Microbioal Physiology*. 33:145-206
- Blomberg A. (1997) Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Sacharomyces cerevisiae* . *Electrophoresis*. 18: 1429-1440.
- Blomberg A. (2000) Metabolic surprises in *Sacharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS microbiology Letters*. 182: 1-8.
- Costa V., Amorin M.A., Reis E., Quintanilla A., Moradas F.P (1997) mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Sacharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*. 143: 1649-1656.
- Crespo J., Daicho K., Ushimaru T., Hall M. (2001) The GATA Transcription Factors GLN3 and GAT1 Link TOR to Salt Stress in *Saccharomyces cerevisiae* . *The Journal of Biological Chemistry*. 276(37): 34441-34444.

- Eriksson P., Alipour H., Adler L., Blomberg A. (2000) Rap1p-binding Sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GPD1* Promoter Are Involved in Its Response to NaCl. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(38): 29368-29376.
- Fisher D. (2000) Long-Distance Transport ,Cap15 *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan B.B., Gruissen W., Jones R.L. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland pag.734
- Fuge E.K., Wernwer W.M., (1997) Stationary Phase in the Yeast *Sacharomyces cerevisiae*, Cap. 2 pag. 56 Hohman S., Mager W.H, *Yeast Stress Responses*, R.G. Lands Company
- Garay A., Covarrubias A.A., (1999) Three Genes Whose Expression is Induced by Stress in *Sacharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15:879-892.
- Garreau H., Hasan N.R., Renault G., Estruch F., Boy-Marcotte E., Jacquet M. (2000) Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Sacharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 146: 2113-2120.
- Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. (2000) Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*. 11: 4241-4257.
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M., Labarret J. (1998) The H₂O₂ Stimulon in *Sacharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(34): 22480-22489.
- Görner W., durcschlag E., Martínez P.T., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Rui H., Schüller. (1997) Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes and Development*. 12: 586-597.

- Griffioen G., Anghileri P., Imre E.M., Baroni D.M., Ruis H. (2000) Nutritional Control of nucleocytoplasmic Localization of cAMP-dependent Protein Kinase Catalytic and Regulatory Subunits in *Sacharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 275(2): 1449-1456.
- Gustin M.C, Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998) MAP Kinase Pathways in the Yeast *Sacharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(2): 1264-1300.
- Hirayama T., Maeda T., Saito H., Shinozaki K. (1995) Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (*HOR*) genes of *Sacharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 249:127-138.
- Hong S., Cha M., Choi Y., Kim W., Kim I. (2002) Msn2p/Msn4p Act as a Key Transcriptional Activator of Yeast Cytoplasmic Thiol Peroxidase II. The Journal of Biological Chemistry. 277(14):12109-12117.
- Hohmann S. (1997) Shaping Up: The response of Yeast to Osmotic Stress Cap.4 Hohman S., Mager W.H, Yeast Stress Responses, R.G. Lands Company pag. 101-102.
- Inoue Y., Matsuda Toshifumi, Sugiyama K., Izawa S., Kimura A. (1999) Genetic Analysis of Glutathione Peroxidase in Oxidative Stress Response of *Sacharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 274(38): 27002-27009.
- Ito T., Chiba T., Ozawa R., Yoshiba M., Hattori M., Sakaki Y. (2000) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. PNAS. 98 (2): 4569-4574.
- Jamieson J.D. (1998) Oxidative Stress Responses of the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. Yeast. 14: 1511-1527.
- Jiang Y., Davis C., Broach J. (1998) Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Sacharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. The EMBO Journal. 17(23): 6942-6951.

- Johannes H., Thevelein J., Winderickx (1997) From Feast to Famine: Aaptation to Nutrient Depletion in Yeast. Cap.1 Hohman S., Mager W.H, Yeast Stress Responses, R.G. Lands Company pag. 7-52.
- Ketela T., Brown L.J., Stewart C.R., Bussey H. (1998) Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. Mol. Gen. Genet. 259:372-378.
- Lee H.J., Montagu V.M., Nathalie V. (1999) A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 5873-5877.
- Li S., Ault A., Malone C.L., Raiit D., Dean S., Johnston L.H., Deschenes R.J., Fassler J.S. (1998) The yeast histidine kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. The EMBO journal. 17(23): 6952-6962.
- Mager W.H., Moradas F.P (1993) Stress response of yeast. Biochem. J. 290, 1-13.
- Marcotte B.E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., Jacquet M. (1998) Msn2p and Msn4p Control a Large number of Genes Induced at the Diauxic Transition Which Are Repressed by Cyclic AMP in *Sacharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. 1044-1052.
- Márquez A.J., Pascual A.A., Proft M., Serrano R. (1998) The Ssn6-tup1 repressor complex of *Sacharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. The EMBO Journal. 17(9): 2543-2553.
- Mattison P.C., Ota M.I. (2000) Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. Genes and Development. 14:1229-1235.
- Miralles J.V., Serrano R. (1995) A genomic locus in *Sacharomyces cerevisiae* with four genes up-regulated by osmotic stress. Molecular Microbiology. 17(4), 653-662.

- Moskvina E., Imre M.E., Ruis H. (1999) stress factors acting at the level of the plasma membrane induce transcription via the stress response element (STRE) of the yeast *Sacharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 32(6): 1263-1272.
- Nomura M. (1998). Transgenically Produced Glycinbetaine Protects Ribulose 1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under Salt Stress. *Plant Cell Physiol*. 39(4):425-432.
- Norbeck J. Blomberg A. (1997) Metabolic and regulatory changes Associated with Growth of *Sacharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (9):5544-5554.
- Pardo J.M., Reddy P.M., Yang S., Maggio A., Huh G., Matsumoto T., Coca M., Koiwa H., Yun D., Watad A., Bressan R., Hasegawa P. (1997) Stress Signaling through the Ca²⁺/Calmodulin –dependent Protein Phosphatase calcineurin Mediates Salt Adaptation in Plants. *Plant Biology*.
- Park J., Grant M.C., Davies J.M., Dawes W.I. (1998) The Cytoplasmic Cu,Zn Superoxide Dismutase of *Sacharomyces cerevisiae* Is Required for resistance to freeze-Thaw Stress. *The Journal of biological Chemistry*. 273(36): 22921-22928.
- Pedruzzi I., Bürckert N., Egger P., De Virgilio C. (2000) *Sacharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *The EMBO Journal*. 19(11): 2569-2579.
- Piper W.P. (1995) The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiology Letters*. 134: 121-127.
- Posas F., Witten A.E., Saito H. (1998) Requirement of STE50 for Osmostress-Induced Activation of the STE11 Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Molecular and Celular Biology*. 5788-5796.

- Proft M., Pascual A.A., Nadal E., Ariño J., Serrano R., Posas F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *The EMBO Journal*. 20(5): 1123-1133.
- Raitt D.C., Johnson A.L., Erkin A.M., Makino K., Morgan B., Gross D.S., Johnston L.H. (2000a) The Skn7p response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell*. 11(7):2335-2347.
- Raitt D.C., Posas F., Saito H. (2000b) yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO Journal*. 19(17): 4623-4631.
- Reiser V., Ruis H., 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*. *Molecular Biology of the Cell*. 10: 1147-1161.
- Rep M., Albertyn J., Thevelein M.J., Prior A.B., Hohmann S. (1999-a) Different signaling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress. *Microbiology*. 145:715-727.
- Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein M.J., Hohmann S., Ammerer G., Ruis H. (1999-b) Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Sacharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology*. 5474-5485.
- Rep M., Krantz M., Thevelein J.M., Hohmann. (2000) The Transcriptional Response of *Sacharomyces cerevisiae* to osmotic Shock. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(12): 8290-8300.
- Rep M., Proft M., Remize F., Tamás M., Serrano R., Thevelein J.M., Hohmann S. (2001) The *Sacharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-

- dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Molecular Microbiology*. 40(5): 1067-1083.
- Ruis H. Schuller C. (1995) Stress signaling in yeast. *BioEssays* Vol. 17 No.11 959-965.
- Serrano R. (1993) Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and defense responses. Academic Press.
- Singh K.K. (2000) The *Sacharomyces cerevisiae* SLN1P-SSK1P two-component system mediates response to oxidative stress and in an oxidant-specific fashion. *Free Radical Biology and Medicine*. 29 (10): 1043-1050.
- Smith A., Ward P.M., Garret S. (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *The EMBO Journal*. 17(13): 3556-3564.
- Tamás J.M., Rep M., Thevelein M.J., Hohmann S. (2000) Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Letters*. 472: 159-165.
- Tao W., Deschenes J.R., Fassler S.J. (1999) Intracellular Glycerol Levels Modulate the Activity of Sln1p, a *Sacharomyces cerevisiae* Two-component Regulator. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(1): 360-367.
- Treger M.J., Schmitt P.A., Simon R.J., McEntee K. (1998) Transcriptional Factor Mutations Reveal Regulatory Complexities of Heat Shock and Newly Identified Stress Genes in *Sacharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(41) 26875-26879.
- Treitel A.M., Carlson M. (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:3132-3136.
- Güldener U., Heck S., Fiedler T., Beinhauer J., Hegemann J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*. 24 (13): 2519-2524.

- Varela J., Mager W. (1996) Response of *Sacharomyces cerevisiae* to changes in external osmolariy. *Microbiology*. 142: 721-731.
- Winkler A., Arkind C., Mattison P.C., Burkholder A., Knoche K., Ota I. (2002) Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway, and Protein Tyrosine Phosphatases Are Essential under Heat Stress. *Eucaryotic Cell*. 1(2):163-173.
- Wuytswinkel V.O., Reiser V., Siderius M., Kelders C.M., Ammerer G., Ruis H., Mager H.M. (2000) Response of *Sacharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Molecular Microbiology*. 37(2): 382-397.