



00551
UNAM
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Expresión genética de *Euglena gracilis*
en respuesta a cadmio: análisis
diferencial por la técnica de AFLP

T E S I S

Que para obtener el grado de :
Maestra en Ciencias (Bioquímicas)
P R E S E N T A :
Andrea Edith Hernández Navarro

Tutor: Dra. Herminia Loza Tavera



Mexico D.F.

Noviembre 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



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.

Expresión genética de *Euglena gracilis* en respuesta a cadmio: análisis diferencial por la técnica de AFLP

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera en el laboratorio 105 del edificio E del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Herminia Loza Tavera Facultad de Química, UNAM
Dra. Imelda López Villaseñor Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Felipe Cruz García Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Rafael Moreno Sánchez, del Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología quien participó activamente como invitado en todos los exámenes tutorales y en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de cromatografía líquida de alta presión, espectrofotometría de absorción atómica y el cultivo de *Euglena gracilis*.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. César Avilés Rodríguez y del Biol. David Mendoza Cózatl en el manejo de cultivos de *E. gracilis*, la cromatografía líquida de alta presión y del espectrofotómetro de absorción atómica.

Se reconoce la colaboración y asesoría del Dr. Felipe Cruz García, miembro del comité tutorial en el manejo de la técnica de AFLP, así como en los experimentos de clonación que se llevaron a cabo en su laboratorio.

Se reconoce la asesoría del M. en C. Martín Vargas Suárez, técnico académico del laboratorio 105.

El proyecto fue apoyado por PAIP-FQ-UNAM 6290-04 y por UC-MEXUS-CONACYT 2001 a través del proyecto "Mechanisms of heavy metal sequestration and resistance in microalgae" del cual fueron responsables el Dr. Rafael Moreno Sánchez y el Dr. Norman Terry de la Universidad de California, Berkeley y en el que participó la Dra. Herminia Loza Tavera.

Para la realización de la presente tesis, durante los estudios de maestría gocé de las becas otorgadas por CONACYT y DGEP-UNAM.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Alicia González Manjarréz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIATURAS

AAS	Espectrofotometría de absorción atómica
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
APSR	Adenosin 5' fosfosulfato reductasa
ATPS	ATP sulfurilasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
+ Cd	<i>Euglena gracilis</i> Klebs Z cultivada sin cadmio
- Cd	<i>Euglena gracilis</i> Klebs Z cultivada en presencia de cadmio
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
DO	Densidad óptica
γ -EC	γ -glutamylcisteína
γ -ECS	γ -glutamylcisteína sintetasa
EGTA	Ácido etilen-glicol-bis(β -amino-etil eter) N, N, N', N'-tetraacético
FQ	Fitoquelatinas
FS	Fitoquelatina sintetasa
GSH	Glutación reducido
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSP	Heat shock protein (s)
kD	Kilodaltones
kb	Kilobases
mRNA	RNA mensajero
poli A ⁺	RNA poliadenilado
PABP	Poly-A binding protein
RNA	Ácido ribonucleico
TPI	Triosa fosfato isomerasa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
Mecanismos de tolerancia/resistencia a cadmio	5
Expulsión activa	6
Unión a compuestos celulares	7
Compartimentalización	9
Otros mecanismos de respuesta a cadmio: regulación transcripcional y traduccional	10
<i>Euglena gracilis</i> como modelo para el estudio de los mecanismos de respuesta a cadmio	13
cDNA-AFLP	14
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Cultivo y cosecha de células	19
Determinación de viabilidad	19
Captación de cadmio	20
Determinación de cisteína, glutatión y fitoquelatinas	20
Purificación de RNA total	21
Purificación de RNA poli-A	22
Síntesis de cDNA	22
cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism)	23
Purificación de cDNAs del gel de poliacrilamida	26
Amplificación de cDNAs recuperados del gel de poliacrilamida	27
Amplificación y clonación de los cDNAs recuperados	28
Transformación genética	28
Purificación de DNA plasmídico	29
Reacciones de digestión de los plásmidos con los cDNAs Clonados	30

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0

Secuenciación y análisis de cDNAs	30
Purificación de insertos de cDNAs para usarse como sondas	31
Transferencia de RNA a membrana de nylon	31
Marcaje y purificación de sondas	32
Northern blot	32
Despegado de sondas de membranas	33
RESULTADOS	
Establecimiento y caracterización de las condiciones de estudio	34
Cambios en la expresión genética de <i>E. gracilis</i> ocasionados por la exposición a cadmio	41
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
APÉNDICE	65
BIBLIOGRAFÍA	70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I

RESUMEN

Euglena gracilis tiene la capacidad de crecer en presencia de metales pesados como el cadmio (Cd). Estudios a nivel bioquímico muestran que al igual que en las plantas y las levaduras, en *E. gracilis* el glutatión y las fitoquelatinas juegan un papel importante en la inactivación de este metal dentro de la célula. En organismos como levadura y *Caenorhabditis elegans*, se observa que en la respuesta a Cd podrían estar involucrados distintos genes y metabolitos relacionados con el estrés oxidativo, daño a proteínas y DNA entre otros. Sin embargo, en el caso de *E. gracilis*, no existen estudios de biología molecular de la respuesta a Cd, por lo que en este trabajo el objetivo fue buscar genes que se expresaran en la fase temprana de exposición a este metal. Para ello, primero fue necesario establecer y caracterizar las condiciones del sistema de estudio. Tras exponer a *E. gracilis* por 3, 6 y 9 horas a Cd, se determinó el contenido intracelular del metal así como el contenido de glutatión y fitoquelatinas como indicadores de la respuesta bioquímica de las células al Cd. Se encontró que hay acumulación de Cd desde las 3 h, que los niveles de glutatión se modifican por el tratamiento únicamente a las 9 h y que la síntesis de fitoquelatinas se observa desde las 6 h de exposición a este metal. Con base en estos resultados, se decidió utilizar *E. gracilis* tratadas con Cd por 3, 6 y 9 h para realizar este estudio.

Empleando la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) se analizó la expresión genética diferencial de *E. gracilis* expuestas y no expuestas a Cd. Mediante este método se lograron identificar tres fragmentos de cDNA con mayor expresión en células tratadas con Cd. La secuencia de los cDNAs identificados muestran similitud con las proteínas HSP70, triosa fosfato isomerasa (TPI) y una proteína que se une a poli-A. Sólo fue posible corroborar la mayor expresión de la TPI en células expuestas a Cd por 6 y 9 h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Euglena gracilis is able to grow in polluted water containing heavy metals such as cadmium. Biochemical studies have demonstrated that the metabolites cysteine, glutathione and phytochelatins play an important role in cadmium detoxification of several organisms such as *E. gracilis*, plants, algae, animals and yeast. However, in yeast and *Caenorhabditis elegans* proteins and genes associated to oxidative stress, DNA damage and protein denaturalization among others, have been observed in response to cadmium (Cd).

Up to this moment, there are no molecular studies focused on *E. gracilis* Cd response. The aim of this work was to search for genes expressed in *E. gracilis* under short term exposure to Cd. In order to do this, it was first necessary to establish and characterize the studying conditions. Cd accumulation was determined after 3, 6 and 9 h of metal exposure. Cysteine, glutathione and phytochelatins contents were also determined as biochemical sensors of cellular response to the metal. It was found that cadmium accumulated after 3 h of exposure, that glutathione levels increased after 9 h of Cd treatment, and that phytochelatins synthesis occurred after 6 h of metal treatment. Based on these results, we decided to work with *E. gracilis* exposed to cadmium for 3, 6 and 9 h.

Using cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique, we compared the genetic expression patterns between *E. gracilis* cells exposed and not exposed to Cd. With this approach we were able to identify three cDNA fragments with increased expression in Cd exposed cells. Sequence analysis showed that these cDNAs are encoding a HSP70, a triosephosphate isomerase (TPI) and a PolyA Binding Protein. It was only possible to corroborate the differential expression pattern of the putative TPI gene after 6 and 9 h of Cd treatment.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Algunos metales pesados como Cu, Fe, Mg, Mn, Zn son indispensables para el funcionamiento celular, otros, como el As, Hg, Cd, Pb son tóxicos aún a bajas concentraciones. El Cd, en particular, es un metal pesado sin actividad biológica, contaminante del ambiente, que proviene principalmente de la industria minera, del acero y galvanizadora (Galvao y Corey, 1987).

El protista *Euglena gracilis* crece de forma natural en aguas contaminadas por metales pesados, lo que lo hace un buen modelo para el estudio de los mecanismos de resistencia a este tipo de contaminantes.

E. gracilis puede captar Cd y compartamentalizarlo en cloroplasto (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002) y mitocondrias (Avilés *et al.*, 2003) utilizando probablemente los sistemas de transporte de metales esenciales como el Zn. Al igual que en plantas y levaduras, en *E. gracilis*, el mecanismo de respuesta a Cd mejor caracterizado es el incremento de la cantidad de cisteína, glutatión y fitoquelatinas, cuyo fin es inactivar al metal (Coppellotti, 1989). En *E. gracilis* heterótrofa se ha observado además, el incremento en la síntesis de ácidos orgánicos como citrato y malato que tienen alta afinidad por Cd (Avilés, 2001). Aún así, la cantidad sintetizada de estos metabolitos parece no ser suficiente para quelar todo el Cd captado. Incluso, una comparación en la síntesis de fitoquelatinas de diversas algas y de *E. gracilis* en la fase logarítmica de crecimiento mostró que *E. gracilis* sintetiza la menor cantidad de fitoquelatinas (Gekeler *et al.*, 1988). A pesar de ello, las células son capaces de sobrevivir.

Por otra parte, en otros organismos se ha detectado que la exposición a Cd provoca que se expresen genes y proteínas distintos a los de la vía de asimilación de azufre y que están relacionados con estrés oxidativo, reparación y degradación de proteínas y reparación de DNA.

Lo anterior, sugiere que en *E. gracilis* podrían existir mecanismos adicionales a los relacionados con la vía de asimilación de azufre para contender contra el Cd y sus efectos. Adicionalmente, se propone que el tipo de respuesta podría depender del tiempo de exposición y de la cantidad de Cd captada.

En este trabajo interesa conocer genes que se expresen en respuesta a Cd en una fase temprana de exposición al metal, analizando tiempos en los que los efectos tóxicos aún no son evidentes pero en los que ya se encuentra Cd dentro de las células y ella esté produciendo moléculas para contender con este metal tóxico. Por la naturaleza de los experimentos, no se descarta la participación de la vía de asimilación de azufre, pero se abre la posibilidad de encontrar otros mecanismos de respuesta.

ANTECEDENTES

Cadmio

Por definición, los metales pesados son aquellos que tiene una densidad mayor a 5 g/mL. En 1980, Nieboer y Richardson los clasificaron de acuerdo a su reactividad con oxígeno, nitrógeno y azufre como:

- Clase A: los que reaccionan más con el oxígeno ($O > N > S$)
- Clase B: los que reaccionan más con el azufre ($S > O > N$)
- Clase C: los que tienen afinidad intermedia

A los metales pesados se les ha prestado mayor atención en los últimos años ya que la concentración de algunos de ellos en el ambiente ha aumentado por las actividades industriales y mineras (Rai *et al.*, 1981). Un ejemplo de esto es que Nriagu y Pacyna reportaron que en 1988 la contaminación mundial anual por metales pesados fue mayor a la contaminación combinada por desechos radiactivos y orgánicos.

La toxicidad de los metales pesados se relaciona con su capacidad para interaccionar con grupos sulfhidrilo de proteínas, así como por su capacidad de generar radicales libres y por tener actividad ionoforética (Vallee y Ulmer, 1972, Díaz-Barriga, 1991).

El Cd es un metal pesado cuya concentración en la corteza terrestre es de aproximadamente 0.18 ppm (Trevors *et al.*, 1986). La contaminación ambiental por este metal se origina principalmente por la actividad minera e industrial. Las industrias que contribuyen mayormente a la contaminación por Cd son las de

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

baterías y acumuladores, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, procesamiento de metales (aleaciones con Cd), colorantes, fertilizantes fosfatados y pesticidas (Galvao y Corey, 1987).

En general, el Cd es tóxico para los organismos y no tiene actividad biológica. El daño intracelular ocasionado por Cd incluye la desnaturalización de proteínas, peroxidación de lípidos, ruptura de cadenas de DNA, daño en membranas celulares. Algunos mecanismos mediante los cuales el Cd podría estar ocasionando estos daños son: por unión a grupos tiol y carboxilo de proteínas y biomoléculas, generación de especies reactivas de oxígeno y por tanto estrés oxidativo, interacción con monómeros de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (Valle y Ulmer, 1972), además de que puede ocupar el sitio del Zn en metaloenzimas disminuyendo su capacidad catalítica o inactivándolas totalmente (Strasdeit, 2001).

Desde 1993, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer clasificó al Cd como carcinógeno en humanos (Souza *et al.*, 1996) en quienes una exposición crónica ocasiona la acumulación de este metal principalmente en hígado y riñones (aproximadamente el 50% del Cd absorbido se encuentra en estos órganos), siendo este último uno de los órganos más afectados. Las intoxicaciones agudas se caracterizan principalmente por trastornos respiratorios. La deficiencia de metales esenciales como Zn o Fe, facilitan la absorción de Cd en el intestino (Galvao y Corey, 1987).

Mecanismos de resistencia a Cd

Dada la toxicidad que tienen algunos metales pesados, los organismos han desarrollado mecanismos que les permiten contender contra ellos. Entre estos mecanismos se encuentran: transporte reducido, expulsión activa, compartimentalización, unión a compuestos celulares, biotransformación y atrapamiento extracelular (Moreno-Sánchez *et al.*, 1999) (Fig. 1). En el caso particular del Cd, los mecanismos mejor conocidos son la expulsión activa, unión a compuestos celulares y compartimentalización. Estos mecanismos pueden encontrarse distribuidos en distintas especies como se verá a continuación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

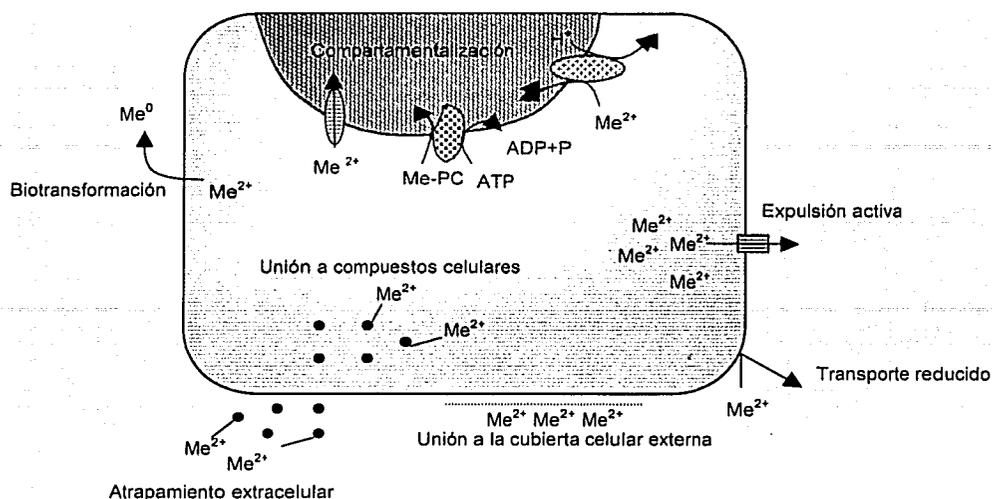


Figura 1. Mecanismos celulares de resistencia a metales pesados.
Modificado de Cervantes y Moreno-Sánchez, 1999.

a) Expulsión activa

Algunos de los mecanismos de expulsión activa mejor estudiados son los que se encuentran en bacterias, específicamente los determinados por los operones *cadA* en bacterias gram positivas y el operón *czc* en bacterias gram negativas (Nies y Silver, 1995).

El operón *cadA* está formado por los genes *cadA* y *cadC* donde *cadA* codifica una ATPasa tipo P, inducible por exceso de Zn y Cd y *cadC* codifica una proteína reguladora. La primer ATPasa tipo P reportada en bacterias gram positivas fue del plásmido p1258 de *Staphylococcus* (Novik *et al.*, 1968), aunque ya se ha reportado su existencia en otras bacterias. El modelo básico de esta ATPasa incluye seis regiones transmembranales, una de las cuales (Cys-Pro-Cys) podría estar relacionada con la translocación del metal. Además contiene tres dominios citoplásmicos, uno de los cuales presenta la secuencia consenso Cys-Xaa-Xaa-Cys la cual posiblemente es la que se une al Cd. *cadC* codifica una proteína (DNA-binding transcriptional regulatory protein) que se une específicamente *in vitro* al

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

operador del operón *cad*. Los cationes divalentes alteran la unión de *cadC in vitro* y estimulan la actividad del operón *in vivo* (Ji y Silver, 1995; Nies y Silver, 1995; Silver y Phung, 1996; Nies, 1999).

El operón *Czc* codifica proteínas que funcionan como un antiportador catión/protón y que dan resistencia a Cd, Zn y Co. El operón mejor estudiado es el de *Alcaligenes eutrophus*. Este operón del plásmido pMOL30 consiste en tres genes estructurales: *czcA*, *czcB* y *czcC*. *CzcA* es el transportador de la membrana interna, *CzcC* el transportador de la membrana externa y *CzcB* uno que atraviesa las dos membranas. Otro gene descubierto posteriormente es *czcD* el cual codifica una proteína membranal que es un sensor de cationes. También se ha propuesto la existencia de un gene regulador llamado *czcR* que podría funcionar como un activador transcripcional. Mutaciones en *czcABC* provocan la pérdida de resistencia al Cd (Ji y Silver, 1995; Silver y Phung, 1996; Nies, 1999).

b) Unión a compuestos celulares

Una vez que el Cd ha entrado a las células por medio de alguno de los sistemas de entrada de metales esenciales como Zn, Fe, Mn, puede ser quelado por moléculas como metalotioninas, fitoquelatinas (FQ) o ácidos orgánicos (Trevors *et al.*, 1986; Nies, 1999; Clemens, 2001).

Las metalotioninas son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína (Cys) que pueden unir Cd y otros metales como Zn, Cu, As. Pueden encontrarse en plantas, animales, hongos y bacterias y su síntesis se induce a nivel transcripcional por la presencia de metales pesados (Steffens, 1990; Liao y Freedman, 1998; Cobbett y Goldsbrough, 2002).

Las metalotioninas están clasificadas de acuerdo al arreglo de los residuos de cisteína. Las metalotioninas tipo I contienen 20 residuos de Cys conservados y están ampliamente distribuidas en vertebrados. Las metalotioninas clase II no tienen un arreglo estricto de Cys e incluyen a las metalotioninas de plantas, hongos y animales invertebrados. Algunas veces dentro de esta clasificación se ha incluido a las FQ como metalotioninas de tipo III, aunque esto ha generado confusiones, pues a diferencia de las metalotioninas, las FQ no son producto de la traducción de un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

mRNA sino de una actividad enzimática (Grill *et al.*, 1989, Cobbett y Goldsbrough, 2002). La función de las metalotioninas no se limita a proteger a los organismos contra Cd, también se han asociado con la homeostasis de metales como el cobre (Kägi y Schaffer, 1988).

Las síntesis de FQ constituye uno de los mecanismos más importantes de respuesta a Cd. Involucra a la vía de asimilación de azufre, especialmente a la síntesis de glutatión (GSH), el cual es un tripéptido (γ -Glu-Cys-Gly) que se encuentra en todos los organismos y es sintetizado por medio de dos reacciones dependientes de ATP catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS) y glutatión sintetasa (GS) (Fig. 2).

Las FQ son sintetizadas a partir de glutatión (GSH), por la fitoquelatina sintetasa (FS) en una reacción de transpeptidación (Grill *et al.*, 1989). Tienen la forma general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ donde $n=2-11$ y pueden encontrarse en plantas, animales, algas, levaduras y protistas (Grill *et al.*, 1989; Gekeler *et al.*, 1988; Mutoh y Hayashi, 1988; Clemens *et al.*, 2001). La FS es una enzima constitutiva activada en presencia de metales pesados como Cu, Hg, Ag, Zn, Ni, siendo el Cd el mejor activador (Zenk, 1996). En general la FS no se regula transcripcionalmente por Cd, aunque existen excepciones en plántulas de *Triticum aestivum* y *Arabidopsis thaliana* lo que sugiere que puede estar regulada de diferente manera o que su regulación depende de la etapa de desarrollo de los organismos (Clemens *et al.*, 1999; Lee y Korban, 2002).

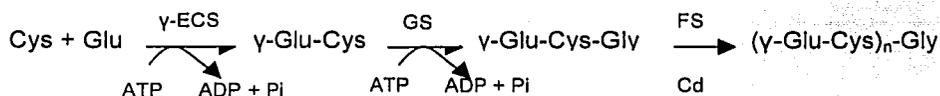


Figura 2. Síntesis de GSH y FQ. La síntesis de FQ ocurre en presencia de metales pesados como Cd.

Dada la reactividad del Cd (y otros metales) con S, N y O, los ácidos carboxílicos como citrato, malato y oxalato así como los aminoácidos, son buenos ligandos. Wagner (1993) propuso al ácido cítrico como un ligando de Cd a bajas

concentraciones del metal. También se ha observado que en *E. gracilis* heterótrofa existen incrementos en el contenido de citrato en mitocondrias, aunque no es uno de los principales mecanismo de resistencia (Avilés *et al.*, 2003).

c) Compartimentalización

Uno de los mecanismos de compartimentalización mejor estudiados está estrechamente ligado a la síntesis de GSH y FQ. Un claro ejemplo de compartimentalización se encuentra en las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En *S. pombe* el Cd induce la síntesis de FQ, las cuales pueden formar dos tipos de complejos, uno de bajo peso molecular o LMW (3-4 kDa) y otro de alto peso molecular o HMW (6-9 kDa) que contiene sulfuro, el cual proporciona mayor capacidad de unir Cd y da estabilidad al complejo (Reese y Winge, 1988). Los complejos de bajo peso molecular son transportados al interior de la vacuola por el transportador HMT1, miembro de la familia de transportadores ABC (ATP Binding Cassette) (Ortiz *et al.*, 1992, 1995). En la vacuola, se adiciona sulfuro y Cd libre formándose los complejos de alto peso molecular. El Cd adicional parece que entra como ion por un antiportador Cd/H⁺ (Ortiz *et al.*, 1995). Un sistema de transporte semejante se ha encontrado en el tonoplasto de raíces de avena (Salt y Rauser, 1995).

En *S. cerevisiae*, el Cd también es compartimentalizado en la vacuola. Sin embargo, en este caso el metal se une a GSH, formando bisglutinationato de Cd (Cd-2GSH) que es transportado por YCF1, otro transportador tipo ABC cuya transcripción además es incrementada por Cd (Li *et al.*, 1996, 1997).

Estos mecanismos no son exclusivos de levaduras, por ejemplo en la planta *Silene vulgaris* el Cd puede compartimentalizarse en vacuola (Chardonnens *et al.*, 1998), en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* se va al cloroplasto (Nagel *et al.*, 1996) mientras que en *E. gracilis*, organismo con vacuolas atípicas, se compartimentaliza tanto en cloroplasto en células fotoheterótrofas, como en mitocondrias en células heterótrofas (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002; Avilés *et al.*, 2003).

Otros mecanismos de respuesta a Cadmio. Regulación transcripcional y traduccional.

En años recientes, con ayuda de técnicas de biología molecular y proteómica ha sido posible descubrir una gran cantidad de genes y proteínas que responden a Cd. Éstos se han clasificado de acuerdo a las propiedades o funciones que desempeñan las proteínas. En la Tabla 1 se presentan los genes cuya expresión se ve afectada por exposición de las células a Cd, mientras que en la Tabla 2 se presentan los estudios en los que se observaron cambios en los niveles de proteína, aunque no siempre se determinó si existían cambios en los RNAs mensajeros. En general, encontramos grupos de genes y proteínas de la vía de asimilación de azufre (asociados con la síntesis de GSH y FQ), de respuesta a estrés oxidativo, desnaturalización de proteínas, daño a DNA y metabolismo del carbono.

Sólo en pocos casos se conocen los mecanismos mediante los cuales el Cd modifica la expresión de los genes y proteínas citados. En levadura, el factor de transcripción Yap1p juega un papel importante en la regulación de la expresión de la enzima γ -ECS, del transportador YCF1 y de algunas proteínas con propiedades antioxidantes tales como tioredoxina reductasa, tioperoxidasa, Cu/Zn superóxido dismutasa y Mn superóxido dismutasa. Las levaduras mutantes en Yap1 son sensibles a Cd y tienen niveles bajos de las proteínas mencionadas (Wu y Moye-Rowley, 1994; Lee *et al.*, 1999; Vido *et al.*, 2001).

La regulación de la expresión genética de las proteínas de estrés por calor (HSP) en respuesta a Cd, está relacionado con un factor de transcripción llamado "heat shock factor 1" o HSF1 el cual puede unirse a una secuencia consenso "heat shock element" o HSE presente en los promotores de los genes *hsp* de diversos organismos. Además se ha visto que en células de mamífero, HSF debe ser regulado por fosforilaciones y unión a otras proteínas. Sin embargo, no queda claro el papel del Cd en esta respuesta (Lindquist, 1986; Morimoto, 1993; Hung *et al.*, 1998a, 1998b).

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Algunos genes cuya expresión se modifica por exposición a Cd.

Gen	Proteína	Organismo	Referencia
<i>mtl-1</i>	Metalotioninas	<i>C. elegans</i>	Liao y Freedman, 1998
Vía de asimilación de azufre			
<i>APS3</i> <i>ATPS3</i> <i>MET3</i>	ATP sulfurilasa (ATPS)	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i> <i>S. cerevisiae</i>	Harada <i>et al.</i> , 2002 Heiss <i>et al.</i> , 1999 Fauchon <i>et al.</i> , 2002
<i>PRH19</i> <i>PRH43</i> <i>APSR2</i>	Adenosin 5' fosfosulfato reductasa (APSR)	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i>	Harada <i>et al.</i> , 2002 Heiss <i>et al.</i> , 1999
<i>Atcys-3</i>	O-acetylserine (thiol)lyase	<i>A. thaliana</i>	Domínguez-Solis <i>et al.</i> , 1999
<i>gsh1</i>	γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS)	<i>A. thaliana</i> <i>B. juncea</i> <i>S. cerevisiae</i>	Xiang y Oliver, 1988 Schäffer <i>et al.</i> , 1998. Vido <i>et al.</i> , 2001
<i>gsh2</i>	Glutatión sintetasa (GS)	<i>A. thaliana</i>	Xiang y Oliver, 1988
Antioxidantes			
<i>TRXm TRXh</i>	Tiorredoxina	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Lemaire <i>et al.</i> , 1999
<i>TRX2</i>			
<i>TSA</i>	Tiorredoxina peroxidasa	<i>S. cerevisiae</i>	Fauchon <i>et al.</i> , 2002
<i>TTR1</i>	Glutarredoxina		
<i>AHP1</i>	Alquil hidroperóxido reductasa		
<i>CTT1</i>	Catalasa T		
Estrés			
<i>HSP12, HSP26, HSP30, HSP104, SSA4 HSP70</i>	Proteínas de estrés por calor (HSP)	<i>S. cerevisiae</i> Humano <i>Chiondraco hamatus</i> <i>C. elegans</i>	Fauchon <i>et al.</i> , 2002 Abe <i>et al.</i> , 1994 Carginale <i>et al.</i> , 2002 Liao y Freedman, 1998
<i>DDR2</i>	Reparación de DNA	<i>S. cerevisiae</i>	Fauchon <i>et al.</i> , 2002
Metabolismo del carbono			
<i>ALD3, ALD2</i>	Aldehído deshidrogenasa	<i>S. cerevisiae</i>	Fauchon <i>et al.</i> , 2002
<i>PGM2</i>	Fosfoglucomutasa		
<i>PDC6</i>	Piruvato descarboxilasa		
Proteasas			
<i>UBC5, UBC8</i>	Ubiquitin conjugating enzyme	<i>S. cerevisiae</i>	Fauchon <i>et al.</i> , 2002
<i>PRB1</i>	Proteasa B		
-	Ubiquitina	<i>Dictyostelium discoideum</i>	Muller-Taubenberger <i>et al.</i> , 1988
Factores de transcripción			
<i>MET32, MET30</i>	Factores del metabolismo de metionina	<i>S. cerevisiae</i>	Fauchon <i>et al.</i> , 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Algunas proteínas cuyos niveles se modifican por exposición a Cd.

Proteína	Gen	Organismo	Referencia
Vía de asimilación de azufre			
3'-Fosfo-5-adenosin fosfosulfato reductasa (PAPSR)	<i>MET16</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Vido <i>et al.</i> , 2001
γ -ECS	<i>GSH1</i>		
ATPS	<i>MET3</i>		
Propiedades antioxidantes			
Tiorredoxina	<i>TRXm TRXh</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Lemaire <i>et al.</i> , 1999
	<i>TRX2</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Vido <i>et al.</i> , 2001
Tiorredoxina reductasa	<i>TRR1</i>		
Catalasa T	<i>CTT1</i>		
Tiorredoxina peroxidasa	<i>TSA</i>		
Alquil hidroperóxido reductasa	<i>AHP1</i>		
Cu/Zn superóxido dismutasa	<i>SOD1</i>		
Estrés			
Proteínas de estrés por calor (HSP)	<i>HSP12, HSP26, HSP82, HSP42, HSP104, SSA4</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Vido <i>et al.</i> , 2001
	?	<i>E. gracilis</i>	Barque <i>et al.</i> , 1994,1996,2000
Metabolismo del carbono			
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	<i>ZWF1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Vido <i>et al.</i> , 2001
Hexosa cinasa	<i>HXK1</i>		
Enolasa	<i>ENO1</i>		
Transaldolasa	<i>TAL1</i>		
Proteasas			
Subunidades del proteosoma	<i>PRE1, PUP2, MPR1</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Vido <i>et al.</i> , 2001
Enzima activadora de ubiquitina	<i>UBA1</i>		

El análisis proteómico de *S. cerevisiae* permitió conocer proteínas que responden al estrés por Cd. Pero en muchos casos no se conoce la importancia de la síntesis o desaparición de una proteína determinada. En un análisis reciente del transcriptoma y del proteoma de levadura, se descubrió que en presencia de Cd *S. cerevisiae* disminuye la transcripción y síntesis de isoformas ricas en metionina (Met) y Cys. Por otra parte se incrementa la síntesis de las isoformas con menor cantidad de azufre, lo cual permite un ahorro de hasta 30% del azufre proteico. Esta respuesta parece estar dirigida a que haya azufre disponible para la síntesis de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GSH. Se observó también que existe una correlación entre la transcripción y las proteínas expresadas por lo que en ese trabajo se propuso que en *S. cerevisiae* la respuesta a Cd está regulada principalmente a nivel transcripcional (Fauchon *et al.*, 2002).

***Euglena gracilis* como modelo para el estudio de los mecanismos de resistencia a Cd**

Euglena gracilis es un protista unicelular fotoheterótrofo capaz de crecer en aguas contaminadas con metales pesados, de hecho, es una de las especies más abundantes en hábitats dulceacuicolas contaminados por metales pesados (Fernández-Leborans y Novillo, 1995).

En condiciones de laboratorio, se ha observado que *E. gracilis* Klebs Z puede resistir diversas concentraciones de Pb, Cd y en menor grado Hg dependiendo de las condiciones de cultivo. (Navarro *et al.*, 1997). Se sabe que el Cd ocasiona la disminución del crecimiento, motilidad, fotosíntesis y respiración (De Filippis *et al.*, 1981; Navarro *et al.*, 1997). Por otra parte, la exposición a Cd por tiempos mayores a 24 h ocasiona el incremento de los niveles de GSH, FQ, y Cys (Coppellotti, 1989). Esto indica que al igual que en organismos como plantas y levaduras *E. gracilis* incrementa la síntesis de estos metabolitos para quelar al Cd. Otro tipo de respuesta a Cd en *E. gracilis* es el incremento en la cantidad de proteínas de estrés por calor (HSP) (Barque *et al.*, 1996).

Navarro *et al.* (1997) encontraron que cultivos autótrofos de *E. gracilis* son capaces de remover hasta un 30.6% de Cd de un medio de cultivo con 100 μ M de CdCl₂. Sin embargo, los mecanismos de captación de Cd que utiliza *E. gracilis* son aún desconocidos, pero se ha propuesto que es a través del sistema de transporte de iones esenciales como el Zn (Falchuk, *et al.*, 1975). Una vez dentro de las células, el Cd es compartimentalizado en cloroplastos (Mendoza-Cózatl, *et al.*, 2002) o en mitocondrias en el caso de cultivos heterótrofos (Avilés *et al.*, 2003).

Si bien existen diversos trabajos en los que se han estudiado los daños y respuesta a Cd en *E. gracilis*, la mayoría de ellos están enfocados al estudio de la vía de asimilación de azufre y ninguno de ellos es a nivel genético.

cDNA-AFLP

En este trabajo se hizo la comparación de la expresión genética de *E. gracilis* control y tratada con Cd con la finalidad de identificar genes expresados diferencialmente en una u otra condición, esperando que dichos genes pudieran estar asociados con la respuesta a Cd.

Existen diversos métodos para hacer análisis de expresión genética diferencial tales como "RNA-fingerprinting by arbitrarily primed PCR" o RAP-PCR y "differential display". Sin embargo, estos métodos tienen problemas de reproducibilidad, dificultad para el aislamiento de mensajes de baja expresión y generación de falsos positivos. Estos problemas surgen principalmente por el uso de oligonucleótidos al azar y por las bajas temperaturas utilizadas para la amplificación de cDNA (Bachem *et al.*, 1998).

El AFLP (por las siglas Amplified Fragment Length Polymorphysm) es una técnica que permite comparar cDNAs realizando amplificaciones por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos que permiten controlar los inconvenientes de los otros métodos (Bachem *et al.*, 1998; Liscum, 1999).

Antes de iniciar el AFLP, se sintetiza cDNA de doble cadena a partir de RNA polIA⁺. Partiendo del cDNA, la técnica puede dividirse en cuatro partes (Fig. 3):

- I. Corte de cDNA. El cDNA de interés es cortado con dos enzimas de restricción, una con un sitio de reconocimiento de cuatro pares de bases, en este caso *MseI* (mayor frecuencia de corte) y otra con un sitio de reconocimiento de seis pares de bases, en este caso *EcoRI* (menor frecuencia de corte).
- II. Pegado de adaptadores. Por medio de una ligasa se pegan adaptadores de secuencia conocida a los fragmentos cortados. El ligado debe hacerse en presencia de las enzimas de restricción activas para evitar que los extremos cohesivos de los fragmentos de cDNA se ligen entre ellos. Los adaptadores deben ser complementarios a los fragmentos cortados. Sin embargo, dado que la reacción de ligado se hace en presencia de las enzimas de restricción, los adaptadores llevan una base modificada en el

sitio de corte, por lo tanto los adaptadores unidos no podrán ser cortados nuevamente.

- III. PCRs. Los fragmentos con adaptadores conforman una población heterogénea en la que pueden existir fragmentos con dos adaptadores *EcoR1*, con dos *MseI* o bien con uno *EcoR1* y otro *MseI*. Por lo tanto debe homogeneizarse por medio de una reacción de PCR que se denomina preamplificación. En esta reacción se utilizan oligonucleótidos llamados *MseI* y *EcoR1* con secuencias complementarias a los adaptadores. En esta reacción se amplifica preferentemente la población flanqueada por *MseI* y *EcoR1*. Los motivos de esto son que la población *EcoR1-EcoR1* es muy baja, que los oligos *MseI* tienen una temperatura de unión al molde más baja que *EcoR1* y que los fragmentos flanqueados por *MseI* tienen secuencias invertidas repetidas en los extremos por lo que puede formar estructuras tallo-asa que impiden la unión de los oligonucleótidos (Vos *et al.*, 1995). Después de la preamplificación, se hace la llamada amplificación AFLP que consiste en una segunda reacción de PCR en la que se utilizan cebadores que tienen una secuencia complementaria a la de los adaptadores y además tienen dos bases adicionales en el 3' que deberán ser complementarias al mensaje que se va a amplificar, de otra forma, la *Taq* polimerasa, que carece de actividad exonucleasa 3'-5' no podrá iniciar la síntesis de la cadena. Uno de los cebadores se marca con ³³P, en este caso el *EcoR1*.
- IV. Electroforesis. Los productos de PCR marcados se corren en un gel de poliacrilamida que posteriormente se revela por autorradiografía. A partir de ésta se seleccionan las bandas expresadas diferencialmente, se cortan del gel seco, se eluyen, se vuelven a amplificar y se clonan.

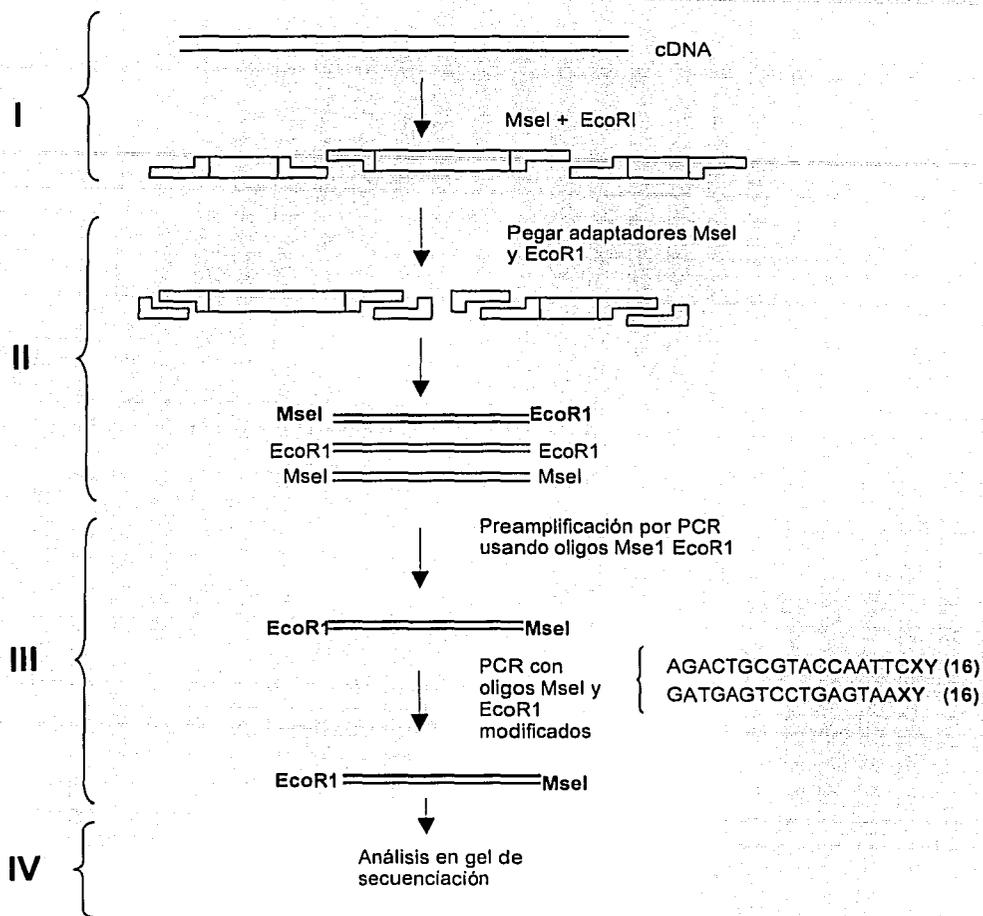


Figura 3. Pasos del cDNA-AFLP. Ver descripción en el texto.

HIPÓTESIS

En organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Caenorhabditis elegans* se han descrito genes relacionados con estrés oxidativo, daño a DNA, degradación y reparación de proteínas, que modifican su expresión en respuesta a Cd. En *Euglena gracilis* se espera que al igual que en otros organismos, existan genes regulados a nivel transcripcional, además de los de la vía de asimilación de azufre, que le ayuden a contender contra el Cd.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar genes expresados en respuesta a Cd en *Euglena gracilis*.

Objetivos particulares

- I. Establecer y caracterizar las condiciones de estudio determinando los siguientes puntos
 - a) Crecimiento y viabilidad de *E. gracilis* a diferentes concentraciones de Cd.
 - b) Captación de Cd.
 - c) Contenido de GSH, Cys y FQ.

- II. Analizar los cambios en la expresión genética de *E. gracilis* ocasionados por la exposición a Cd
 - a) Comparar los cambios de expresión genética de células control y expuestas a Cd empleando la técnica de cDNA-AFLP.
 - b) Aislar, clonar, secuenciar y corroborar los cDNAs provenientes de la expresión diferencial en respuesta a Cd.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

I. Establecimiento y caracterización de las condiciones de estudio

Cultivo y cosecha de las células sin tratamiento y tratadas con Cd a diferentes tiempos (3, 6 y 9 h)



Determinación de la viabilidad y la división celular



Determinación del contenido intracelular de Cd, GSH, Cys y FQ por HPLC

II. Cambios en la expresión genética de *E. gracilis* ocasionados por la exposición a cadmio

Cultivar y cosechar células control y tratadas con Cd por 3, 6 y 9 h



Purificar RNA poliA⁺



Síntesis de cDNA



Comparación de patrones de expresión por medio de cDNA-AFLP



Clonación de los fragmentos con supuesta expresión diferencial



Verificación de la expresión diferencial por medio de Northern blot



Identificación y comparación de las secuencias de los cDNAs expresados en respuesta a Cd

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo y cosecha de células

a) Cultivo fresco

Se sembraron 0.2×10^6 células/mL en un medio de cultivo con glutamato y malato como fuente de carbono (ver apéndice). Se cultivaron durante 4 días (fase exponencial) con ciclos de 12 h luz ($60-70 \mu\text{mol quanta/m}^2\text{s}$) y 12 h oscuridad.

b) Cultivos utilizados para la extracción de RNA

1. Cuatro L de medio de cultivo fresco fueron sembrados y cultivados como se describió en el apartado anterior. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm, 5 min a 15°C , en un rotor de ángulo fijo empleando una centrifuga Sorvall RB-X.
2. Las células se lavaron con medio fresco, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en aproximadamente 100 mL de medio fresco.
3. Las células se contaron haciendo una dilución 1:1000.
4. Se resembraron en 8 matraces con 1 L de medio de cultivo cada uno, a una concentración de 1.5×10^6 células/mL.
5. A 4 de los 8 L de medio de cultivo se les añadió CdCl_2 a la concentración requerida a partir de un stock 50 mM.
6. Luego de 3, 6 y 9 h de haber sembrado, se recolectaron aproximadamente 1.3 L de células centrifugando en frascos limpios (no necesariamente estériles) a 5000 rpm. Se lavaron con medio KME (ver apéndice). Se pasaron a tubos de plástico de 50 mL y se volvieron a centrifugar en una centrifuga de mesa con rotor de columpio a 3000 rpm, 5 min. El paquete celular se congeló inmediatamente con N_2 líquido.

Para la obtención de células a las que se midió Cd, GSH, Cys y FQ se siguió el mismo procedimiento pero se cosecharon únicamente de 15 a 25 mL de cultivo y se incluyó el análisis del tiempo inicial.

Determinación de viabilidad

1. Se tomaron 100 μL del cultivo y se hizo una dilución 1:10. Se añadió azul de tripano a una concentración final de 0.05% y se dejó incubando 10 minutos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. Pasado este tiempo, se inmovilizaron las células con 10 μL de HCl concentrado. Se tomó una alícuota de 10 μL de células y se colocó en un hemocitómetro.
3. Se contó el número de células totales y de células rojas (células muertas a las que entró el colorante) para determinar el porcentaje de viabilidad.

Captación de cadmio

1. 1×10^7 células (de 0.3 a 1 mL) fueron digeridas con 0.5 mL de H_2SO_4 al 99% v/v y 2.5 mL de HNO_3 al 70% (v/v) durante 3 horas.
2. Esta mezcla se llevó a un volumen final de 10 mL.
3. Se determinó el contenido de Cd por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica (SpectrAA 640, Varian) a 228.8 nm con una flama apoyada por aire y acetileno.

Determinación de cisteína, glutatión y fitoquelatinas

1. Se hicieron extractos ácidos mezclando 200 μL de ácido perclórico al 30%, 15×10^6 células y el volumen necesario de medio KME para aforar a 2 mL, se agitó con vortex por 45 s.
2. El extracto se centrifugó a 1000 g durante 5 min y el sobrenadante se filtró con filtros de 40 μm .
Se empleó una columna analítica Waters C-18 Spherisorb S5 ODS2 de 4.6 mm x 150 mm de fase reversa (Waters PSS 831913). La columna fue equilibrada con H_3PO_4 0.05% (v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. La presión total a la que se realizó la cromatografía fue de aproximadamente 3600 PSI.
3. Se inyectó una alícuota de 50 μL del extracto ácido y se analizó en un gradiente lineal 1-20% de acetonitrilo en H_3PO_4 0.065 (v/v) durante 50 min. Los compuestos con grupos tiol se detectaron a 412 nm en una derivatización post-columna con DTNB 0.1 mM (Grill *et al.*, 1987) usando un detector de absorbancia Waters 2487. Como estándar se usaron 5 nmol de GSH.
4. Los picos obtenidos fueron integrados manualmente utilizando el software PW Reporter 2 proporcionado por Waters.

Purificación de RNA total (Chomczynski y Sacchi, 1987)

1. Se cosecharon células de *E. gracilis* como se describió previamente.
2. Se tomaron 1.5 g (peso fresco) de células y se trituraron con N₂ líquido en un mortero previamente enfriado hasta obtener un polvo fino.
3. Se prepararon 15 mL de solución D con β-mercaptoetanol (ver apéndice).
4. Se añadieron 5 mL sobre las células congeladas en el mortero y se mezcló bien con ayuda del pistilo.
5. La pasta que se formó, se pasó a un tubo de vidrio estéril (Corex) con tapa y se adicionó el resto de la solución D, mezclando perfectamente.
6. La mezcla se separó en dos partes iguales.
7. Se adicionó secuencialmente 1 mL de acetato de sodio 2 M, pH 4.0, 10 mL de fenol y 2 mL de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1, mezclando perfectamente por inversión después de adicionar cada reactivo. La suspensión final se agitó vigorosamente por 10 s y fue incubada en hielo por 15 min.
8. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4°C en un rotor de ángulo fijo en una centrifuga Sorvall RB-X.
9. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Se repitieron de dos a tres veces los pasos 6 y 7 cuando después de la centrifugación aún se veía una capa blanca en la interfase (proteína precipitada).
10. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se mezcló con 10 mL de isopropanol helado, se incubó a -20°C por 1 h.
11. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 min, a 4°C.
12. La pastilla de RNA se resuspendió en 3 mL de solución D y se precipitó con un volumen de isopropanol helado incubando a -20°C por 1 h.
13. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 min, a 4°C.
14. La pastilla se lavó dos veces con 10 mL de etanol al 75% y se centrifugó 15 min después de cada lavado.
15. La muestra se resuspendió en 1 a 2 mL de agua-DEPC y se conservó a -70°C hasta su uso.

Nota: El RNA debe resuspenderse fácilmente en agua de lo contrario es muy probable que tenga polisacáridos lo cual dificulta su manejo posterior. En este caso deberá

utilizarse un protocolo alternativo (Cheng y Seeman, 1998). Los cultivos de E. gracilis de más de tres días contienen muchos polisacáridos

Purificación de RNA poliA⁺

Se hizo de acuerdo a las indicaciones descritas en el kit PolyA tract de Promega. El RNA poliA⁺ recién purificado se guardó precipitado en ¼ de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol y 2 µl de glucógeno 2 mg/mL a -70°C. Al momento de utilizarlo, se centrifugó a 14,000 rpm, 15 min a 4°C en una microcentrífuga. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 15 µL de agua estéril libre de RNasas.

Síntesis de cDNA

Primera cadena

1. Se mezclaron cantidades iguales (2 µg) de RNA poliA⁺ de células control cosechadas después de 3, 6 y 9 h de cultivo o de células tratadas con Cd durante el mismo tiempo. Se añadió 1 µL de oligo dT-(12-18) y se llevó a 12 µL con agua. Se incubó a 70°C durante 5 min y se pasó inmediatamente a hielo.
2. A la mezcla anterior se añadieron:
 - 4 µL buffer para la primera cadena de cDNA (Invitrogen)
 - 2 µL DTT 0.1 M
 - 1 µL dNTPs 10 mM
3. Las reacciones se incubaron a 42°C por 2 minutos, se añadió 1 µL de transcriptasa reversa (200 U/µL, Invitrogen) y se incubó 2 h a 42°C. El volumen final de reacción fue 20 µL.

Segunda cadena

Para sintetizar la segunda cadena se utilizó DNA polimerasa I. También se añadió RNasa H, una endonucleasa que deja fragmentos de RNA que la DNA polimerasa I utiliza como cebadores para síntesis de la nueva cadena.

1. Al finalizar la síntesis de la primer cadena de cDNA, se incubó a 95°C para desnaturalizar a la enzima y se añadió:
 - 30.0 µL buffer 5x para segunda cadena (ver apéndice)

- 1.0 μL dNTPs 25 mM
- 3.5 μL DNA polimerasa I
- 1.5 μL RNasa H
- 94.0 μL H_2O

2. Se incubó a 16°C , durante 2 h. El volumen final de reacción fue $150 \mu\text{L}$, el cual se guardó precipitado en $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M, 2 volúmenes de etanol y $2 \mu\text{l}$ de glucógeno 2 mg/mL a -70°C . Al momento de utilizarlo se centrifugo a 14,000 rpm, 15 min a 4°C en una microcentrífuga y se resuspendió en $15 \mu\text{L}$ de agua.

cDNA-AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism) (Liscum, 1999)

Digestión-Ligación de adaptadores

Para $40 \mu\text{L}$ de reacción se mezclaron:

- 6 μL cDNA de cadena doble (de la reacción anterior)
- 8 μL buffer de digestión-ligado (ver apéndice)
- 1 μL *MseI* (1 U/ μL) (Invitrogen)
- 1 μL *EcoRI* (1 U/ μL) (Invitrogen)
- 24 μL H_2O

Se incubó durante 3 h a 37°C .

A la reacción anterior se añadió:

- 1 μL adaptadores *MseI* (ML 33 y 34) (ver apéndice)
- 1 μL adaptadores *EcoRI* (ML 35 y 36)
- 4 μL Buffer de digestión-ligado
- 2 μL ATP 10 mM
- 1 μL T4 DNA Ligasa (1U) (Invitrogen)
- 1 μL H_2O

Se dejó incubando durante 12 h a 16°C. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

Preamplificación

Para 20 µL de reacción se tomaron:

0.5 µL	oligo <i>MseI</i> core + adapter (ML 37)
0.5 µL	oligo <i>EcoRI</i> core + adapter (ML 38)
0.8 µL	dNTPs 10 mM
0.6 mL	MgCl ₂
2.0 µL	buffer de reacción 10 X (Invitrogen)
10 µL	cDNA con adaptadores
1.0 µL	<i>Taq</i> polimerasa (1 U/µL) (dilución 1:5 de <i>Taq</i> a 5 U/µL, Invitrogen)
4.6 µL	H ₂ O

Se hizo la siguiente reacción de PCR

Desnaturalización	2 min 94°C	}	1 ciclo
Desnaturalización	30 s 95°C		
Unión de oligos al molde	1 min 56°C	}	40 ciclos
Alargamiento	1 min 72°C		
Alargamiento	5min 72°C		1 ciclo

De los 20 µL de reacción, 10 µL se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% para ver los productos y el resto se diluyó 1:10 para usarse en la amplificación AFLP.

Marcaje de oligonucleótidos

Se marcó el oligo *Eco* para lo cual se mezclaron

10 µL	oligo <i>Eco</i> (cualquiera de las opciones ML42 a ML61, ver apéndice) *
5 µL	Buffer de reacción 5 X (Gibco)
5 µL	γATP- ³³ P (10 µCi/mmol)
1 µL	T4 polinucleótido cinasa 1U/µL (Gibco)
4 µL	H ₂ O

La mezcla se incubó a 37°C durante 1h y se guardó a -20°C hasta su uso.

*Los oligonucleótidos tienen una o dos bases variables en el extremo 3', en este trabajo se utilizaron indistintamente estas opciones.

Amplificación AFLP

Se mezclaron:

0.15 μ L	Oligo <i>EcoR1</i> - ³³ P
0.3 μ L	Oligo <i>Mse1</i> (cualquiera de las 20 opciones, ver apéndice)
0.4 μ L	dNTPs 10 mM
0.4 μ L	MgCl ₂ 50 mM
1.0 μ L	Buffer de reacción 10 X (Invitrogen)
1.0 μ L	DNA (de la reacción de preamplificación)
0.3 μ L	<i>Taq</i> polimerasa (1 U/ μ L) (Invitrogen)
6.55 μ L	H ₂ O

Mezclar bien los componentes (esto es importante para que la reacción se lleve a cabo correctamente).

La reacción de PCR se hizo bajando gradualmente la temperatura con la finalidad de que todos los oligos pudieran unirse al cDNA, pues la temperatura de desnaturalización y unión al molde es diferente para cada uno (Touchdown PCR).

El PCR se hizo en las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min 95°C	
Desnaturalización	30 s 95°C	} 12 ciclos
Unión de oligos al molde	30 s 65°C a 57°C (bajando 0.7°C en cada ciclo)	
Alargamiento	1 min 72°C	
Desnaturalización	30 s 95°C	} 30 ciclos
Unión de oligos al molde	30 s 56°C	
Alargamiento	1 min 72°C	
Alargamiento	2 min 72°C	

Electroforesis para productos del PCR-AFLP

1. Se hizo un gel de poliacrilamida al 5% utilizando vidrios de 35 x 45 cm y separadores de 0.3 mm.

Para el gel se mezclaron:

60 mL	Urea / Acrilamida/ Bisacrilamida previamente preparada (ver apéndice)
35 μ L	Temed
150 μ L	Persulfato de amonio al 20%

2. A los productos de PCR se les añadió 8 μ L de buffer de carga desnaturante 2 X (ver apéndice) y se calentaron a 95°C, 10 min. Se cargaron en el gel y se corrieron aproximadamente 2.5 h a 60 W en una cámara modelo S2 de Life Technologies™.
3. El gel se colocó en papel filtro Whatman, se cubrió con plástico adherente y se secó a 80°C con vacío en un secador de geles modelo 583 de Bio Rad. Se marcó con un crayón fluorescente en las esquinas del papel filtro y se expuso en una película Kodak MS de 2 a 5 días.

Purificación de cDNAs del gel de poliacrilamida

1. Se quitó la cubierta de plástico del gel seco y éste se alineó con la película revelada.
2. Se cortaron las bandas de gel seco/papel filtro que contenían los fragmentos expresados diferencialmente y se pasaron a un tubo de microcentrifuga al que se añadió 100 μ L de agua estéril.
3. Se incubaron 10 min y después se hirvieron a baño María durante 15 min. Se centrifugaron 30 s a 12,000 x g. Los sobrenadantes se pasaron a tubos limpios y estériles y para precipitar el DNA se añadió:
 - 1/4 volumen de acetato de amonio 10 M
 - 2 volúmenes de etanol absoluto helado
 - 2 μ L de glucógeno 2 mg/mL
4. Se incubó 12 h a -70°C y se centrifugó a 12,000 rpm, 15 min.
5. Se tiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 15 μ L de agua estéril

Amplificación de cDNAs recuperados del gel de poliacrilamida

Se tomaron 2 μL del sobrenadante del paso anterior para amplificar por PCR y se añadió

1 μL	oligo universal <i>EcoR1</i> que contiene un sitio de corte para <i>EcoR1</i> (ML 39) (ver apéndice)
1 μL	oligo universal <i>MseI</i> que contiene un sitio de corte para <i>Pst1</i> (ML 40)
1.6 μL	dNTPs 5 mM
1.2 μL	MgCl_2 50 mM
4.0 μL	buffer de reacción 10 X (Invitrogen)
0.3 μL	<i>Taq</i> polimerasa (1 U/ μL) (Invitrogen)
4.0 μL	DNA recuperado
26.9 μL	H_2O

Se amplificó con las siguientes condiciones:

Desnaturalización	2 min 95°C	} 12 ciclos
Desnaturalización	30 s 95°C	
Unión de oligos al molde	30 s 65°C a 57°C (bajando 0.7°C en cada ciclo)	
Alargamiento	1 min 72°C	
Desnaturalización	30 s 95°C	} 35 ciclos
Unión de oligos al molde	30 s 56°C	
Alargamiento	1 min 72°C	
Alargamiento	2 min 72°C	

A pesar de que sólo se utilizó un par de oligonucleótidos para esta amplificación, y que la técnica recomienda usar una temperatura de 56°C, no se logró la obtención de bandas sino hasta que se utilizaron las mismas condiciones que para la síntesis del cDNA-AFLP.

Amplificación y clonación de los cDNAs recuperados

Los productos del PCR anterior se corrieron en un gel de agarosa al 1.2%, se cortaron las bandas amplificadas y se purificaron con el kit "Concert Rapid Gel Extraction System" de Life Technologies™ y se clonaron en el vector pGEM-T de Promega (ver apéndice) mezclando:

- *150 ng DNA purificado
- 1 µL (50 ng) de pGEM
- 1 µL ligasa
- 5 µL buffer de ligación 2X
- H₂O para un volumen final de 10 µL

*La cantidad de DNA se midió comparando con marcadores de peso molecular cuantificados.

El volumen de reacción era variable, pero siempre se respetó la concentración del amortiguador, la cantidad de DNA y de enzima. Se incubó a 4°C, 12 h.

Se tomaron alícuotas de 5 a 10 µL de la reacción de ligación y se emplearon para transformar células competentes de *Escherichia coli*.

Transformación genética (Hanahan, 1983)

a) Células competentes

1. Una colonia aislada de células de *E. coli* DH5α se sembró en 50 mL de medio LB y se dejó incubando con agitación durante 12 h a 37°C.
2. De este cultivo se tomó 1 mL y se resembró en 49 mL de medio LB. Se dejó incubando a 37°C con agitación hasta que alcanzó una D.O. de 0.6 (Abs 600 nm).
3. Se centrifugaron las células a 3,000 rpm en tubos estériles y se resuspendieron en 25 mL de CaCl₂ 0.05 M estéril helado. Se dejaron incubando 5 min en hielo.
4. Las células se centrifugaron a 3,000 rpm y se resuspendieron nuevamente en 1 mL de CaCl₂ 0.05 M.
5. Se hicieron alícuotas de 100 µL con glicerol al 15% y se congelaron inmediatamente con N₂ líquido. Se guardaron a -70°C hasta su uso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) Transformación

1. A 100 μL de células competentes de *E. coli* DH5 α se añadieron de 5 a 10 μL de la reacción de ligación y se incubó en hielo 30 min.
2. Los tubos se sacaron del hielo y se incubaron a 42°C durante 3 minutos e inmediatamente se pasaron a hielo por 1 min.
3. Se añadieron 4 volúmenes (400 μL) de medio SOC (ver apéndice) a las células y se incubaron a 37°C durante 2 h.
4. Se centrifugaron a 12,000 rpm, 30 s, se tiró el sobrenadante y se añadieron 100 μL de medio LB. Las células se resuspendieron y se sembraron en cajas con agar LB que contenían ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleccionar colonias con el plásmido pGEM. También se añadió IPTG a una concentración final de 0.1 mM para inducir la transcripción del promotor del operón de lactosa y Xgal a una concentración final 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que daría coloración azul al reaccionar con las colonias que expresaran a la β -galactosidasa y que muy probablemente no contendrían inserto clonado en pGEM.
5. Se incubaron a 37°C, 12 h.

Purificación de DNA plasmídico

Para verificar de forma rápida la presencia de inserto en las colonias seleccionadas se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en la caja con ampicilina, IPTG y Xgal, (cuando las colonias blancas eran muy pocas, también se seleccionaron algunas colonias azules) y se resembraron en 1 mL de medio líquido LB.
2. Se incubaron 12 h a 37°C con agitación.
3. Se tomaron 100 μL del cultivo anterior y se centrifugaron a 12,000 rpm 30 s.
4. La pastilla de células se resuspendió en 50 μL de agua con RNasa 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
5. Se añadieron 300 μL de amortiguador TENS (ver apéndice) y se mezcló por inversión hasta que la solución se tornó viscosa.
6. Se agregaron 100 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló por inversión.
7. Se centrifugo 2 min a 12,000 rpm.

8. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se añadió 0.9 μL de etanol absoluto a -20°C .
9. Se centrifugó a 12,000 rpm, 2 min.
10. Se eliminó el sobrenadante y se enjuagó la pastilla de DNA dos veces con 0.9 μL de etanol 70%. Se centrifugó una tercera vez para concentrar y luego eliminar bien los residuos de etanol.
11. El DNA se resuspendió en 40 μL de agua.

Reacciones de digestión de los plásmidos con los cDNAs clonados

Para verificar la presencia de insertos clonados, el pGEM purificado se digirió con *EcoRI* y *PstI*.

Para 20 μL de digestión se estableció una reacción con lo siguiente:

17.7 μL	DNA del plásmido
2.0 μL	Amortiguador 10 X (React 3 de Invitrogen)
0.15 μL	<i>EcoRI</i> (1U/ μL) (Invitrogen)
0.15 μL	<i>PstI</i> (1U/ μL) (Fermentas)

Se incubó 1 h a 37°C y una alícuota de 10 μL fue resuelta en un gel de agarosa al 1.2%, para verificar la presencia de insertos.

Secuenciación y análisis de cDNAs

Una vez que se verificó la presencia de insertos de cDNA, se hicieron minipreparaciones con el "DNA purification Kit" (Marligen, Life TechnologiesTM) para mandar secuenciar. El DNA se llevó a una concentración de 300 ng/ μL . La secuenciación se hizo utilizando el oligo T7 y fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

La edición de las secuencias para ser analizadas se llevó a cabo por medio del programa "Vector NTT 5.1". Las secuencias editadas se compararon con una base de datos por medio del programa BLASTX en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> y en el caso de la secuencia de 100 pb se utilizó Nucleotide BLAST para comparación de secuencias pequeñas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las secuencias de proteína se alinearon utilizando el algoritmo Clustal W y el porcentaje de identidad se determinó utilizando el algoritmo LAlign, ambos disponibles en la página <http://workbench.sdsc.edu>.

Con el objeto de corroborar si las bandas aisladas e identificadas realmente se expresaban diferencialmente, se realizaron ensayos de Northern blot con RNA de células cultivadas sin y con Cd.

Purificación de insertos de cDNAs para usarse como sondas

1. Las diferentes minipreparaciones de cDNAs fueron digeridas con *EcoR1* y *Pst1* como se describió previamente. Las digestiones de DNA se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% y las bandas liberadas por la restricción se cortaron del gel y se purificaron de acuerdo a las indicaciones descritas en el kit "Concert Rapid Gel Extraction System" de Life Technologies_{TM}
2. Después de la purificación se añadieron 2 volúmenes de etanol y ¼ de volumen de acetato de amonio 10 M al DNA para precipitarlo. Se incubó a -70°C, 1 h.
3. Se centrifugó a 12,000 rpm 10 min, se tiró el sobrenadante y se resuspendió en 5 a 10 µL de agua.
4. Se corrió una alícuota del DNA en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para ver la cantidad de DNA después de la purificación respecto a un DNA previamente cuantificado.
5. Los insertos purificados se marcaron y utilizaron como sonda (ver adelante)

Transferencia de RNA a membrana de nylon

1. Se corrieron de 0.2 a 1 µg de RNA poliA⁺ de cada una de las condiciones estudiadas en un gel desnaturizante de agarosa al 2% (ver apéndice).
2. Se transfirió a una membrana de nylon por capilaridad utilizando una solución de SSC 10 X durante 12 h (Sambrook *et al.*, 1989).
3. Las membranas se secaron y se les dio un pulso de luz UV para fijar el mRNA.

Marcaje y purificación de sondas

El marcaje se hizo por medio del kit de "Random primer" de Invitrogen como sigue:

1. Se desnaturalizaron aproximadamente 50 ng de DNA disuelto en 5 a 20 μL de agua a 92°C durante 5 min e inmediatamente después se colocó en hielo.
2. Se añadió lo siguiente al DNA:
 - 1 μL dATP 500 mM
 - 1 μL dGTP 500 mM
 - 1 μL dTTP 200 mM
 - 15 μL solución de "random primers"
 - 5 μL α ^{32}P dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$)
 - H₂O para un volumen de 49 μL
3. Se mezcló bien y se añadió 1 μL de fragmento Klenow. Se dio un pulso de centrifugación a 10,000 rpm.
4. Se incubó a 37°C 1 h.
5. Para purificar las sondas, éstas se hicieron pasar a través de una columna con fibra de vidrio y sefrosa centrifugando a 3,500 rpm, 5 min en una microcentrífuga. La sonda queda aproximadamente en un volumen de 50 μL .
6. Las sondas marcadas se mezclaron con 10 mL de solución de hibridación (misma que para prehibridar, ver apéndice), se calentaron a baño María durante 3 min y quedaron listas para adicionarse inmediatamente sobre las membranas.
7. La solución de hibridación con la sonda podía ser reutilizada calentándola nuevamente a Baño María por 3 min antes de adicinarla a otra membrana.

Northern blot

Sonda de la triosa fosfato isomerasa (TPI)

1. La membrana con RNA poliA⁺ se colocó en un tubo de plástico de 50 mL conteniendo 20 mL de solución de prehibridación (ver apéndice), dentro de un tubo de hibridación y se incubó 2 h a 60°C.
2. Se quitó la solución de prehibridación y se le añadió la sonda recién desnaturalizada. Se hibridó a 58°C durante aproximadamente 12 h (una noche).

3. Se lavó con:

- a. SSC 4 X y SDS 0.1% a 58°C 10 min
- b. SSC 4 X y SDS 0.1% a 56°C por 5 min
- c. SSC 3 X y SDS 0.1% a 56°C 10 min

4. Después de cada lavado, la membrana se exponía en la pantalla del equipo "Personal Molecular Imager FX" de Bio-Rad Los tiempos de exposición variaban entre 30 min y 4 h dependiendo de la intensidad de la señal.

Sonda PolíA Binding Protein (PABP).

1. La membrana se trató igual que la anterior excepto que se lavó con:

- a. SSC 4 X y SDS 0.1% a 58°C 10 min
- b. SSC 4 X y SDS 0.1% a 56°C por 5 min
- c. SSC 3 X y SDS 0.1% a 56°C 10 min
- d. SSC 2 X y SDS 0.1% a 56°C 5 min

2. Después de cada lavado la membrana se puso a exponer. En este caso los tiempos fueron de 30 min.

Sonda HSP70

1. La membrana se trató igual que las anteriores excepto que solamente se hizo un lavado con SSC 4 X y SDS 0.1% a 52°C 5 min.

2. No se observó señal específica después de este lavado, un lavado más a esta misma astringencia ocasionaba pérdida de casi toda la señal.

Despegado de sondas de membranas, para analizarlas nuevamente (Sambrook *et al.*, 1989)

Las membranas fueron reutilizadas para repetir algunas hibridaciones, para lo cual fue necesario no dejarlas secar para que la sonda radiactiva pudiera despegarse.

1. Una solución de 250 mL de SSC 0.05 X y EDTA 0.01 M se dejó hervir por 1 min.
2. Después se añadió SDS 0.1%.
3. En esta mezcla se sumergieron las membranas (por separado) durante 15 min.
4. Se repitió esta operación dos veces usando solución fresca cada vez.

RESULTADOS

1. Establecimiento y caracterización de las condiciones de estudio

Como punto de partida para iniciar el análisis de la expresión genética, fue necesario establecer las condiciones de cultivo adecuadas para el estudio.

a) Crecimiento y viabilidad de *E. gracilis* a diferentes concentraciones de cadmio

Como primer paso se hizo una curva de crecimiento a diferentes concentraciones de CdCl_2 para saber cuándo se empezaba a hacer evidente su efecto. En la Figura 4 se observa que en el cultivo sin metal las células duplican su número después de un día y la fase logarítmica es evidente al segundo día. En los cultivos con Cd sólo algunas células se duplican y la fase logarítmica no es tan clara, sobre todo con $200 \mu\text{M}$ de CdCl_2 . Es decir, la duplicación de las células tratadas es dependiente de la concentración. Las células control alcanzaron la fase estacionaria entre el tercer y cuarto día, mientras que las células con Cd aún no la alcanzaban al sexto. En este último punto cabía la posibilidad de que la menor duplicación celular se debiera a muerte celular, por lo que se determinó la viabilidad de los cultivos. En todos los casos, ésta fue mayor al 91%. Es decir, que el retraso en el crecimiento no fue debido muerte celular sino a que las células no se estaban dividiendo.

Por lo anterior y con el fin de que la expresión genética diferencial en respuesta a Cd que pretendíamos estudiar, no se debiera a que las células control y las tratadas con Cd estuvieran en diferentes fases de desarrollo, se decidió trabajar con células que aún no se hubieran duplicado. Para esto se utilizaron cultivos expuestos a ciclos de 12 h de luz y 12 de obscuridad, pues de acuerdo a Edmunds y Funch (1969) este ciclo es adecuado para sincronizar los cultivos de *E. gracilis*, con la ventaja de que la división celular en estas condiciones se lleva a cabo durante la obscuridad.

Para corroborar que las células no se estuvieran duplicando durante el día, se contaron después de 3, 6, 9 y 12 h de haber sido sembradas en medio con o sin Cd. De acuerdo a lo reportado por Edmunds y Funch (1969) no se encontró

división celular en los tiempos analizados en las células control y tratadas con 170 μM de Cd (Tabla 3), en las células tratadas con 50 μM de Cd hubo división celular hacia las 12 h. Se trabajó entonces con células expuestas a Cd por 3, 6 y 9 h.

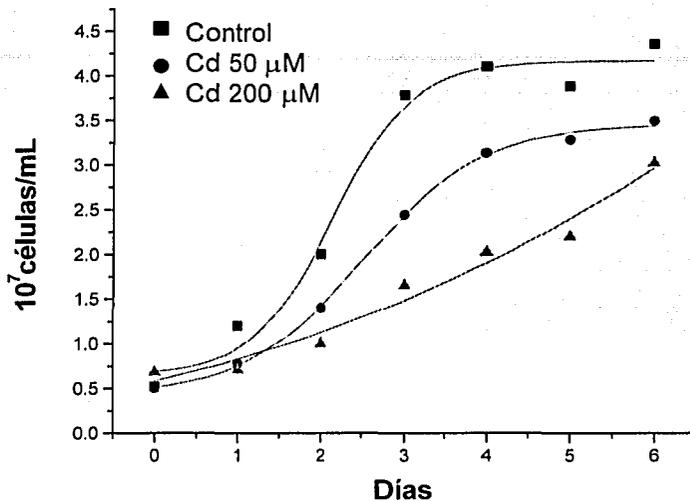


Figura 4. Crecimiento de *E. gracilis* a diferentes concentraciones de Cd. Las células sin tratamiento se duplicaron después de un día y las tratadas con CdCl_2 lo hicieron entre el segundo y tercer día, dependiendo de la concentración de CdCl_2 a que fueron sometidas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Crecimiento* de *E. gracilis* durante las primeras horas de cultivo.

Tiempo (h)	Control (10 ⁶ células/mL)	CdCl ₂ 50 μM (10 ⁶ células/mL)	CdCl ₂ 170 μM (10 ⁶ células/mL)
0	1.66 ± 0.3 (3)	2.82 (2)	1.73 ± 0.3 (3)
3	1.52 ± 0.5 (3)	-	1.37 ± 0.2 (3)
6	1.54 ± 0.1 (3)	2.66 (2)	1.41 ± 0.1 (3)
9	1.48 ± 0.3 (3)	3.05 (2)	1.40 ± 0.1 (3)
12	1.645 (2)	3.39 (2)	1.42 (2)

*La viabilidad en todos los casos fue mayor al 91% (el número entre paréntesis corresponde al número de repeticiones)

b) Contenido intracelular de cadmio

El contenido intracelular de Cd se determinó por espectrofotometría de absorción atómica durante las primeras 12 h de exposición al metal. Desde las tres primeras horas de exposición se observa que el Cd se acumula en las células y que la cantidad se incrementa gradualmente. En células expuestas a 50 μM de CdCl₂, la cantidad intracelular del metal disminuye a las 12 h. Esto podría explicarse considerando que las células de este tratamiento presentaron división celular. Entonces, en este tiempo podríamos estar observando la redistribución del Cd en las células hijas. En cambio en las células expuestas a 170 μM de CdCl₂ no se observó la redistribución del Cd aún a 12 h de exposición (Figura 5) ya que éstas no se habían dividido. Se trabajó con *E. gracilis* tratadas con CdCl₂ 170 μM por presentar más Cd acumulado en esta condición.

Aunque en los tiempos analizados la cantidad de Cd captada fue poca (de 4 a 12 nmol Cd/10⁷ células) en comparación con los 190 y 250 nmol/10⁷ células que *E. gracilis* puede captar a los 3 y 8 días de tratamiento (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002), esta cantidad probablemente podía ser suficiente para desencadenar una respuesta metabólica como ocurre en *A. thaliana* y levadura, en donde 1 h de tratamiento con 50 μM y 1 mM de CdCl₂ respectivamente, fue suficiente para

desencadenar cambios a nivel transcripcional, correlacionados con cambios en los niveles de GSH y FQ en ambas especies (Xiang y Oliver, 1998; Domínguez-Solis *et al.*, 2001; Fauchon *et al.*, 2002). Por lo tanto se midió el contenido de Cys, GSH y FQ como indicadores de que, a los tiempos analizados, *E. gracilis* presenta una respuesta metabólica al Cd.

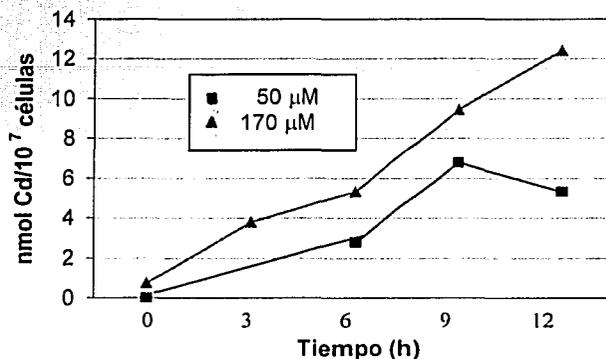


Figura 5. Contenido intracelular de Cd. Las células fueron cosechadas y lavadas con EGTA 2 mM para eliminar la posibilidad de medir el Cd pegado por fuera de las células. En todos los casos, n=2.

c) Contenido de cisteína, glutatión y fitoquelatinas

El contenido de Cys no se modificó significativamente por el tratamiento con Cd en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 6). El contenido de GSH se incrementó de manera natural en el transcurso del día en ambos cultivos, no existiendo diferencias entre ellos. Sin embargo, a las 9 h de tratamiento las células tratadas con Cd presentaron mayor contenido que las no tratadas mostrando diferencias estadísticamente significativas en una prueba t de Student para muestras apareadas (figura 7 y tabla 4).

Las FQ se observan desde las 6 horas de exposición a Cd, presentándose un incremento con el paso del tiempo (Figura 8). Esto indica que la síntesis de FQ es un mecanismo de respuesta temprana a la exposición a Cd. El hecho de no haberlas encontrado a las 3 h podría indicar que se requiere una cantidad mínima de Cd en la célula para inducir la síntesis y que ésta no se alcanzó a las 3 h o bien que las cantidades sintetizadas son bajas y que el método de detección (HPLC) no

fue lo suficientemente sensible para detectarlas. En las células control de 9 h también se observó la aparición de FQ, lo cual podría deberse a la presencia de minerales traza como Zn y Cu en el medio de cultivo, los cuales también son activadores de la FS (Grill *et al.*, 1987).

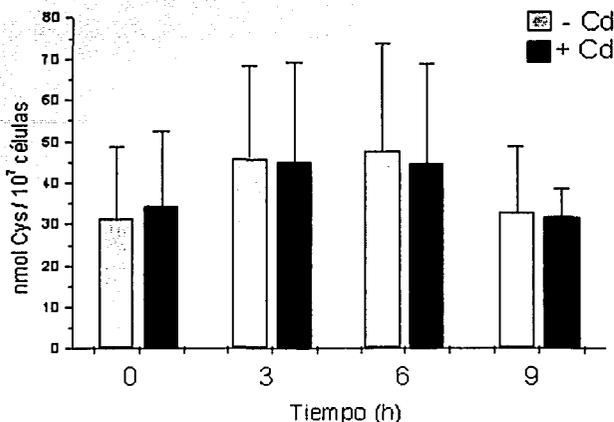


Figura 6. Contenido de Cys. Los niveles de cisteína fueron medidos en extractos ácidos de cultivos de *E. gracilis* control y tratadas con 170 μ M de CdCl₂. Los resultados muestran el promedio y error estándar de 5 diferentes experimentos, excepto a las 3 h donde n=3. ($p < 0.05$; t-Student para pruebas apareadas)

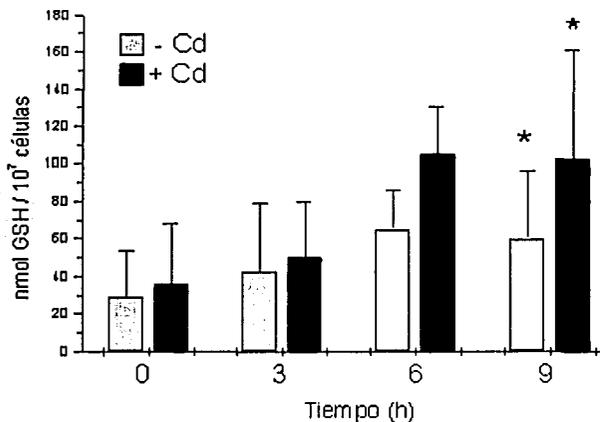


Figura 7. Contenido de GSH. Los niveles de glutatión fueron medidos en extractos ácidos de cultivos de *E. gracilis* control y tratadas con 170 μ M de CdCl₂. Los resultados muestran el promedio y error estándar de 5 diferentes experimentos, excepto a las 3 h donde n=3. ($p < 0.05$; t-Student para pruebas apareadas).

Tabla 4. Contenido de GSH.

Tiempo (h)	- Cd	+ Cd
0	29.03 ±24.72 (5)	35.8 ± 32.38 (5)
3	42.19 ±36.54 (3)	50.32 ±29.74 (3)
6	65.1 ±20.93 (5)	104.51± 26.02 (5)
9	*59.9 ±36.47 (5)	*102.14± 59.06 (5)

* Las células tratadas por 9 h presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GSH.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

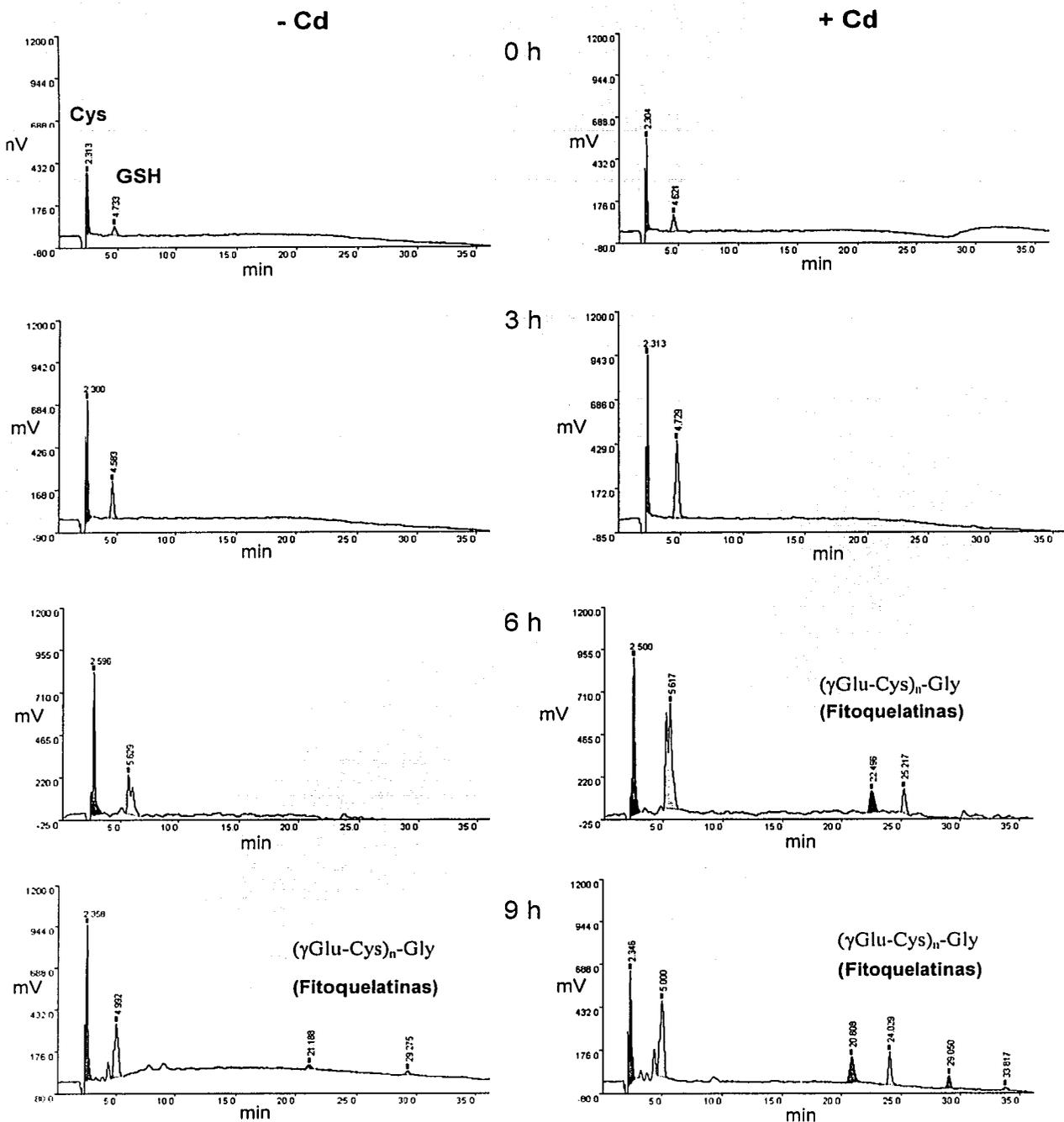


Figura 8. Cromatogramas mostrando los picos de Cys, GSH y FQ. Hay aparición de FQ desde las 6 h de tratamiento con Cd. Se observan varios picos de fitoquelatinas correspondientes a las diferentes subunidades de (γ -Glu Cys) incorporadas a la molécula.

El análisis anterior mostró que la respuesta entre las células control y expuestas a Cd era diferente sólo a las 9 h de tratamiento. Sin embargo, debido a que la entrada de Cd fue detectada desde las 3 primeras horas, se consideró que podrían existir cambios en la expresión genética desde esos momentos, por lo que se decidió realizar el análisis a estos tres tiempos.

2. Cambios en la expresión genética de *E. gracilis* ocasionados por la exposición a cadmio

a) Aislamiento de RNA total y poliA⁺

Se hizo la purificación de RNA total y poliA⁺ de células control y expuestas a Cd (Figura 9). Luego de cuantificarlo se hizo una mezcla 2 µg de RNA poliA⁺ de las células de 3, 6 y 9 h con Cd y otra mezcla de RNA poliA⁺ de las células de 3, 6 y 9 h sin Cd. A partir de estas mezclas se sintetizó cDNA de cadena sencilla y doble.

La purificación de RNA poliA⁺ no es totalmente eficiente y siempre copurifica algo de RNA ribosomal (rRNA). En el RNA total además de los rRNAs 28S y 18S siempre aparece una banda de bajo peso molecular que podría ser RNA de transferencia (Figura 9 A) y que es eliminado cuando se purifica el RNA poliA⁺ (Figura 9 B). La presencia de rRNA en los experimentos de cDNA-AFLP podría acarrear errores en los patrones de expresión. Sin embargo, estos resultados deben corroborarse por Northern blot con lo que se pueden eliminar dichos errores.

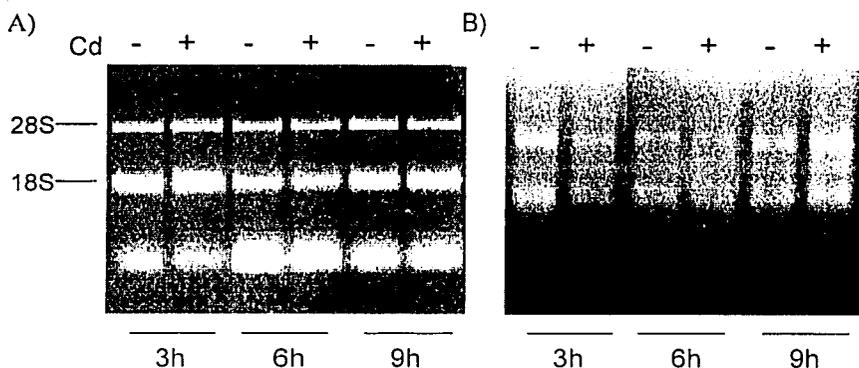


Figura 9. RNA de *E. gracilis*. Este RNA fue utilizado para los experimentos de cDNA-AFLP. (A) RNA total, (B) El barrido brillante representa al RNA poliA⁺, aún con restos de rRNA.



b) cDNA-AFLP

El cDNA fue digerido con las enzimas de restricción *MseI* y *EcoRI* y posteriormente se le ligaron los adaptadores correspondientes (ML 33/34 y ML 35/36). Con este cDNA se hizo un PCR para enriquecer la población de cDNA flanqueada por los adaptadores *EcoRI* y *MseI*. Para verificar que la reacción de amplificación fue exitosa, se corrió una alícuota del PCR (10 μ L) en un gel de agarosa en el cual se observó un barrido por debajo de 0.6 Kpb, correspondiente a la población de cDNA deseada (Figura 10).

El tamaño de los fragmentos de cDNA amplificados en esta reacción se encuentra en el intervalo entre los de alto peso molecular correspondientes al cDNA flanqueado por *EcoRI-EcoRI* y los de bajo peso molecular correspondientes al cDNA flanqueado por *MseI-MseI*.

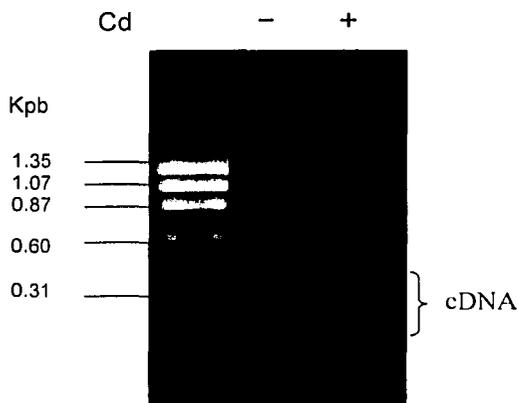


Figura 10. Preamplificación de la mezcla de cDNAs de *E. gracilis* control y expuestas 3, 6 y 9 h a Cd. En el gel de agarosa se observa un barrido por debajo de 0.6 Kpb correspondiente a los fragmentos de cDNA flanqueados por los adaptadores *EcoRI-MseI*, que es la población que se amplifica preferentemente.

El cDNA amplificado se diluyó 1:10 y se empleó como molde para hacer los PCR-AFLP y entonces hacer la comparación de la expresión genética de las células con y sin Cd. Los productos de PCR se corrieron en geles de poliacrilamida. Estos geles se usaron para hacer autorradiografías. En la Figura 11 se muestra un resultado representativo de las autorradiografías.

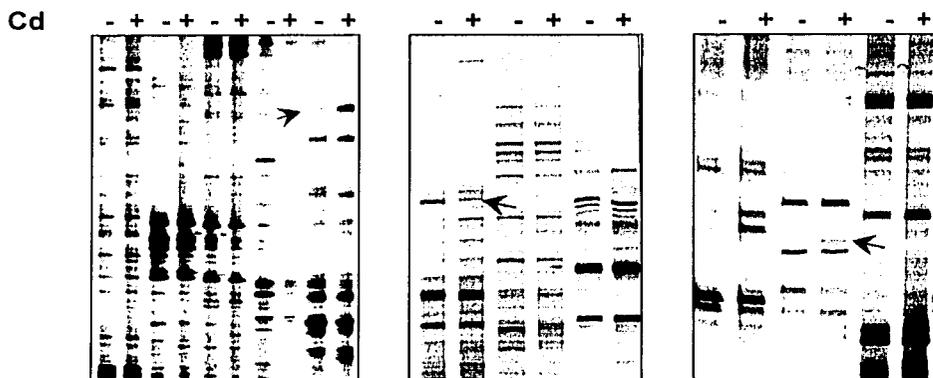


Figura 11. Autorradiografía del cDNA-AFLP. En las placas se observan 11 combinaciones de oligos. Se señalan algunas diferencias entre los carriles que contienen el cDNA de *E. gracilis* tratadas y no tratadas con Cd.

Se hicieron 128 combinaciones de oligos *EcoR1* y *MseI*, enumerados en la Tabla 4, sin embargo únicamente las 49 combinaciones mostradas en la Tabla 5 pudieron ser analizadas adecuadamente por presentar un patrón de bandas confiable es decir, con cantidades de RNA semejantes y bandas nítidas. Con estas combinaciones de oligos se encontraron 52 cDNAs expresados diferencialmente entre las células no tratadas y tratadas con Cd.

Tabla 4. Combinaciones de oligonucleótidos utilizadas en los PCR-AFLP. Las reacciones se hicieron combinando los oligos *EcoR1* radiactivos con oligos *MseI* no marcados. Cada combinación se hizo para las células sin y con Cd.

<i>EcoR1</i> ³³ P	<i>MseI</i>
ML 44	ML 66 a 81
ML 45	ML 66 a 81
ML 46	ML 66 a 81
ML 47	ML 66 a 81
ML 48	ML 66 a 81
ML 49	ML 66 a 81
ML 54	ML 66 a 81
ML 55	ML 66 a 81

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5. Combinaciones de oligonucleótidos analizadas.

<i>EcoR1</i> ³³ P	<i>MseI</i>
ML 46	ML 66 -74, 76
ML 47	ML 66-69, 71-76
ML 48	ML 68-73, 78-81
ML 49	ML 66, 69-81

Con el propósito de obtener cantidad suficiente de cDNA con expresión genética diferencial para clonar, se repitieron los PCR-AFLP con las combinaciones de primers en las que se habían observado diferencias entre los tratamientos con y sin Cd. Al repetir los PCRs, sólo siete diferencias fueron reproducibles y correspondieron a las combinaciones presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Combinaciones de oligos que produjeron diferencias en la expresión genética de *E. gracilis* tratada y no tratada con Cd.

No. de clona	<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
1	ML 46	ML 71
2	ML 46	ML 72
3	ML 48	ML 68
4 y 5	ML 48	ML 79
6 y 7	ML 49	ML 71

Las siete diferencias en expresión genética que se encontraron, se muestran en la Figura 12. A excepción de un caso, los genes incrementaron su expresión con el tratamiento de Cd.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

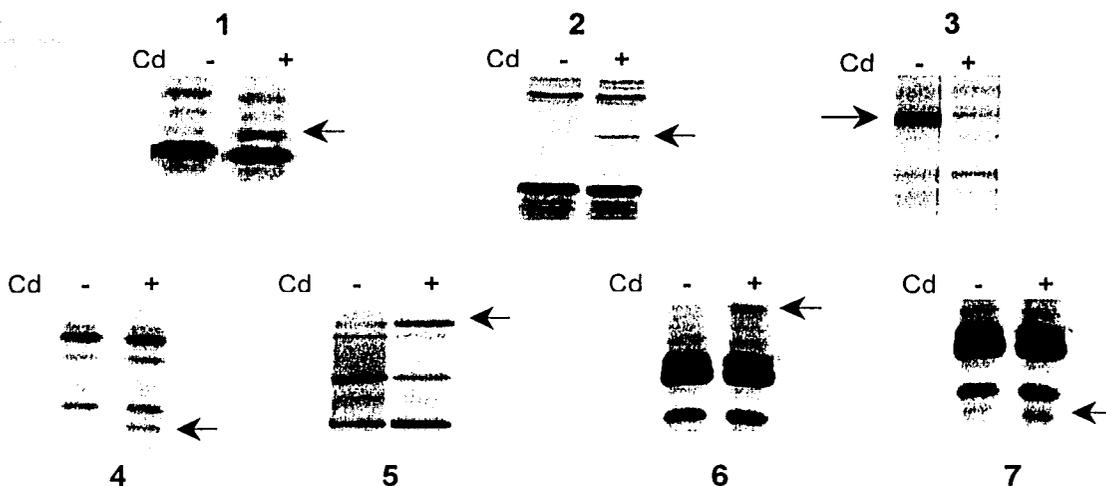


Figura 12. Diferencias en expresión genética. Al hacer los experimentos por duplicado se encontraron siete diferencias. Sólo en un caso (3) hubo disminución en la expresión. En general, el cargado de los geles es parejo entre los tratamientos con y sin Cd, lo cual puede observarse en las bandas no expresadas diferencialmente. En el caso en que no ocurrió así (5) se decidió utilizarlo porque el carril en donde se incrementó una banda fue el que contenía menor cantidad de cDNA.

c) Clonación de cDNAs expresados diferencialmente

Las bandas correspondientes a los cDNAs expresados diferencialmente se eluyeron del gel y se amplificaron por PCR. En la Figura 13, se observan las siete bandas amplificadas. Los barridos alrededor de las bandas pueden deberse a la presencia de cDNA contaminante acarreado al cortar las bandas del gel y/o a que el PCR se hizo bajando gradualmente la temperatura de unión de los oligos al molde. Sin embargo, ésta fue la única condición en la que la amplificación fue exitosa.

TESTES CON
FALLA DE ORIGEN

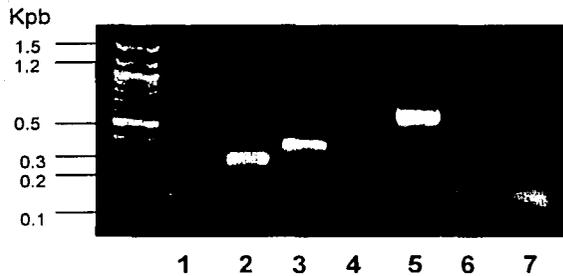


Figura 13. Amplificación por PCR de las secuencias aisladas del gel AFLP. Gel de agarosa en el que se observan las bandas correspondientes a las siete diferencias encontradas.

Como ya se ha mostrado, se lograron amplificar las siete bandas en un primer PCR (Figura 13). Sin embargo, luego de purificarlas de este gel, el ligado con el vector no funcionó, por lo que no fue posible clonarlas. Por lo tanto se repitió la amplificación por PCRs utilizando como molde el DNA eluido del gel del análisis AFLP. Después del PCR, sólo tres muestras dieron bandas definidas junto con un barrido, pero las otras cuatro no volvieron a dar bandas, únicamente el barrido (datos no mostrados). Las 3 muestras de cDNA amplificadas se purificaron y clonaron en el vector pGEM (Promega).

La reacción de ligado fue utilizada para transformar células de *E. coli*, las cuales se sembraron en un medio con ampicilina, IPTG y Xgal. Se seleccionaron las colonias blancas y se hizo extracción de DNA plasmídico a partir de ellas. Posteriormente se hicieron digestiones de los plásmidos con las enzimas de restricción *EcoR1* y *Pst1* para determinar qué colonias tenían inserto de cDNA. Al hacer la digestión de los plásmidos provenientes del cDNA 2 (Figura 13), se aislaron dos colonias con insertos de diferente tamaño (Figura 14). Se decidió mandar secuenciar ambos.

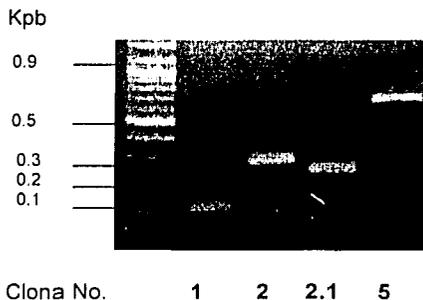


Figura 14. cDNAs con expresión diferencial amplificadas y clonadas. Los plásmidos con los insertos de cDNA fueron cortados con las enzimas *EcoR1* y *Pst1*. En el gel de agarosa se observan los fragmentos de cDNA liberados de los plásmidos. Los carriles 2 y 2.1 corresponden a las dos clonas obtenidas a partir del producto de PCR del cDNA 2.

d) Secuencias de los cDNAs aislados

Los insertos de cDNA clonados en pGEM fueron secuenciados (Figura 15). Los productos de traducción deducidos se compararon con secuencias registradas en el Banco de genes, encontrándose homología con una HSP70 (clona 2), una triosa fosfato isomerasa (TPI) (clona 2.1), una proteína que se une a poli-A (PABP) (clona 5) y una de las secuencias no tuvo homología con ninguna proteína reportada en el banco de genes (clona 1) por lo que también se comparó la secuencia a nivel de nucleótidos con el fin de ver si pudiera tratarse de alguna región no traducida. Sin embargo, en este último caso no se obtuvo ninguna homología con alguna secuencia en particular reportada en el Banco de Genes.

HSP70

```
      E V S K R E T S C L V S F G E K Q R N L
1 gaggtcagtaaaagagaacaagctgccttgtttcgtttggggaaaaaacaaggaatttg 60
  G E K A L D Q A V R N W K N T V G A L K
61 ggtgagaaggcgtggatcaggctgtacggaattggaaaaatactggttggtgcattgaag 120
  R L I G V K Y D S E A F R H E A K F M K
121 agattgattggtgtgaaatatgactccgaagctttcagacatgaagcgaagttcatgaag 180
  N K T R P D E R G Y V E L V R S L
181 aacaagaccgcggcgacgaaaggggatacgttgaaattggtacgcagctctacg      233
```

TPI

```
      N K G P S V A D A D V E V V I G C P F V
1 aacaaggtccttcgggtggccgatgctgacgttgagggttgaattggatgcccaatttgtt 60
  Y A D Y T R E K L R Q D W A L S V Q N C
61 tatgccgattacaccagagaaaagttgagacaagattgggcattgtctgttcaaaactgt 120
  W I G K G A F T G E I S A E M
121 tggatcgggaaggggtggtgccttcactggtgagatttcagcggagatgac      170
```

Clona 1

```
1 aatgaaatgcttcaagtcacagaggacgaaagtcagctggtgtgccgaaaaataaa 55
```

PABP

```
      E H A G S Y T N V Y I K Q V K T G I T E
1 gagcacgctggctcatacaccaacgtctacatcaagcaagtgaagacaggcatcactgag 60
  E E I S G F F G K I G P I E S H V L K H
61 gaagagatctctggtttcttcggcaagattggcccaatcgagagccatggtttgaagcat 120
  D R K E R P F A F V D F K N H D D A V K
121 gacagaaaaggaacgcccattcgcttttggatttcaagaaccatgatgatgcagtgaaag 180
  A V T E F H D K E I E G I T E E G Q K I
181 gctgtcacagagttccatgacaaagagattgaaggcatcactgaggaaggtcagaagatt 240
  Y I G R A Q K K G E R L E E Q R K R V S
241 tacattggccgtgcacaaaagaaagcgagcgtctcgaagagcagcggaaagagatgagc 300
  Q L R A R K M H E Y S G S N L Y V K N L
301 cagctgcagagctcgcaagatgcatgagtactctgggtccaatttgtatgcaagaatctg 360
  D D N D A G L D K A A F E K F G E I T
361 gatgacaacgttgatgacgcggggttgaaggctgcttttgagaagtttgagaaatcaca 420
  S A K V M M D D V N P G L S K G F G F V
421 tctgcaaaaggtgatgatggatgatgtcaatccgggactgtccaaaggttttggctttgtg 480
  C F K D A E S A N K A I S E M N G H L L
481 tgttcaagatgccgagagtgccaacaagccatcagtgagatgaatggccacctgctg 540
  G
541 ggag 545
```

Figura 15. Secuencias de nucleótidos de los cDNAs clonados y su traducción. Las secuencias se editaron con el programa Vector NTT 5.1. La posible identidad de estas secuencias se obtuvo mediante la comparación con secuencias del Banco de genes (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el programa BLASTX.

TESIS CON
FALLA DE JUREN

Para determinar que tan parecidas eran las secuencias de *E. gracilis* a nivel de aminoácidos de los genes identificados, con las de otros organismos, se hicieron alineamientos utilizando el programa ClustalW y se determinó el porcentaje de similitud utilizando el programa LALIGN (local align) (Tabla 7, Figuras 16, 17 y 18o). El porcentaje de similitud se determinó empleando únicamente los fragmentos de aminoácidos que se obtuvieron de *E. gracilis*.

Tabla 7. Porcentaje de similitud entre las secuencias de aminoácidos de los genes identificados en *E. gracilis* y las de otros organismos.

Organismo	% identidad con <i>E. gracilis</i>
PABP	
<i>Schizosaccharomyces.pombe</i>	52.8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46.2
<i>Arabidopsis thaliana</i>	43.6
<i>Caenorabditis elegans</i>	41.0
<i>L.major</i>	44.9
<i>Trypanosoma.brucei</i>	37.8
TPI	
Humano	46.2
<i>Spinacea. oleracea</i> (cloroplástica)	52.8
<i>Zea. mays</i> (citosólica)	43.6
<i>Gracilaria gracilis</i>	41.0
HSP70	
<i>S.pombe</i>	46.6
<i>S.cerevisiae</i>	45.2
<i>Drosophila melanogaster</i>	39.1
<i>Trypanosoma. cruzi</i>	35.8
<i>Phaseolus vulgaris</i>	38.0

Se compararon las secuencias de aminoácidos obtenidas de *E. gracilis* en este estudio, con fragmentos de aminoácidos de diversos organismos observándose que algunos, como la región de unión a RNA de la PABP, presentaron altos porcentajes de similitud. La secuencia de la TPI de *S. oleracea* fue la más parecida a la de *E. gracilis*, por lo que ésta podría tratarse de la TPI cloroplástica.

<i>S. cerevisiae</i>	ETKAHYTNLYVKNINSETTDEQFQELFAKFGPIVSASLEKADGKLK
<i>S. pombe</i>	ALKANFTNVYIKNLDTEITEQEFSDLFGQFGEITSLSLVKQDNKPR
<i>E. gracilis</i>	EHAGSYTNVYIKQVKTGITEEEISGFFGKIGPIESHVLKHDR--KER
<i>A. thaliana</i>	GAVPSFTNVYVKNLPKEITDDELKKTFGKYGDISSAVVMKDQSGNSR
<i>C. elegans</i>	ESGLKYTNVFNKNGEHLQEKLSAMFSKFGEITSAVVMTDAQGKPK
<i>L. major</i>	ALVANFTNVYIKQVLPVTNVDVIEKFFAKFGGITSAAACKDKSG--R
<i>T. brucei</i>	EQLKQYTNLYVKNLDPVDEKLKEVFSPFGEVTSAKVRDLAGRPTV
	* * * * *

<i>S. cerevisiae</i>	GFGFVNYEKHEDAVKAVEALNDSELN-----GEKLYVGRAQKKNERM
<i>S. pombe</i>	GFGFVNYANHECAQKAVDELNDKEYK-----GKKLYVGRAQKKHERE
<i>E. gracilis</i>	PFADFVDFKNHDDAVKAVTEFHDKEIEGITEEGQKIYIGRAQKKGERL
<i>A. thaliana</i>	SFGFVNFVSPAAAVAVEKMNIGISL-G----EDVLYVGRAQKKSORE
<i>C. elegans</i>	GFGFVAFADQDAAGQAVEKLNDSILEG---TDCKLSVCRAQKKSERS
<i>L. major</i>	VFAFCNFEEKHDDAVKAVEAMHDHHDGITAPGEKLYVQRAQPRSERL
<i>T. brucei</i>	GFGYVAYATHEAAAKAVEELDDKESP-LAKEGMKLSVCRFRSREERK
	* * **

<i>S. cerevisiae</i>	HVLKKQYEAYRLEKMAKYQGVNLFVKNLDDSVDDKLEEEFAPYGTI
<i>S. pombe</i>	EELRKRYEQMKLEKMNKYQGVNLFINKLQDEVDDERLKAEFSAFGTI
<i>E. gracilis</i>	EEQRKRVSQRLRARKMHEYSGSNLYVKNLDDNVDDAGLKAAFEKFGEI
<i>A. thaliana</i>	EELRRKFEQERISRFEKLQGSNLYLKNLDDSVNDEKLEKEMFSEYGNV
<i>C. elegans</i>	AELKRKYEALKQERVQRVYQGVNLYVKNIEEDLNDDGLRDHFSSFGTI
<i>L. major</i>	IALRQKYMQ-----HQA LGNNLYVRNFDPEFTGADLLELFKEYGEV
<i>T. brucei</i>	RE-RERLRRRERQQQHSKYP--NLYVKNFDDTVTTSERLKA LDFPFGET
	** * * * *

<i>S. cerevisiae</i>	TSAKVMRTEN--GSKSGFGFVCFSTPEEATKAITEKNQ-QIVA
<i>S. pombe</i>	TSAKIMTDEQ--GSKSGFGFVFCYTTPEEANKAVTEMNQ-RMLA
<i>E. gracilis</i>	TSAKVMMDDVNPGLSKGFGFVCFKDAESANKAISEMNG-HLLG
<i>A. thaliana</i>	TSCKVMMNSQ--GLSRGFGFVAYSNPPEEALLAMKEMNG-KMIG
<i>C. elegans</i>	TSAKVMVDEN--GRSKGFGFVCFEKPEEATAAVTDMNS-KMIG
<i>L. major</i>	KSCRVMVSES--GVS RGFVFSFSNADEANAALREMNG-RMLN
<i>T. brucei</i>	VSVSVMMDKAT-KVSRCFGFVVSFKEQSSAAQAIQELHGSTALG
	* * * *** * *

* aminoácidos conservados

Figura 16. Alineamiento de diferentes PABPs. La zona sombreada corresponde a las regiones que reconocen RNA (RNA recognition motifs o RRM), cuya estructura secundaria es una hoja β. Estos motivos además de estar en PABPs se encuentran en otras proteínas tales como las ribonucleoproteínas heteronucleares (hnRNPs) y ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) (Lorkovic y Barta, 2003).



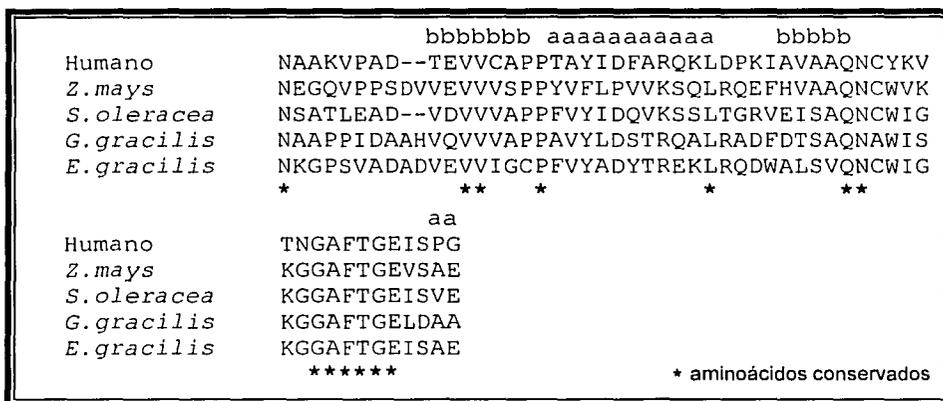


Figura 17. Alineamiento de diferentes TPI. El cDNA clonado de *E. gracilis* corresponde al extremo amino terminal de la TPI de otros organismos. Las regiones con a o b indican sitios cuya estructura secundaria son hélices α u hojas β respectivamente (Hentze *et al.*, 1994).

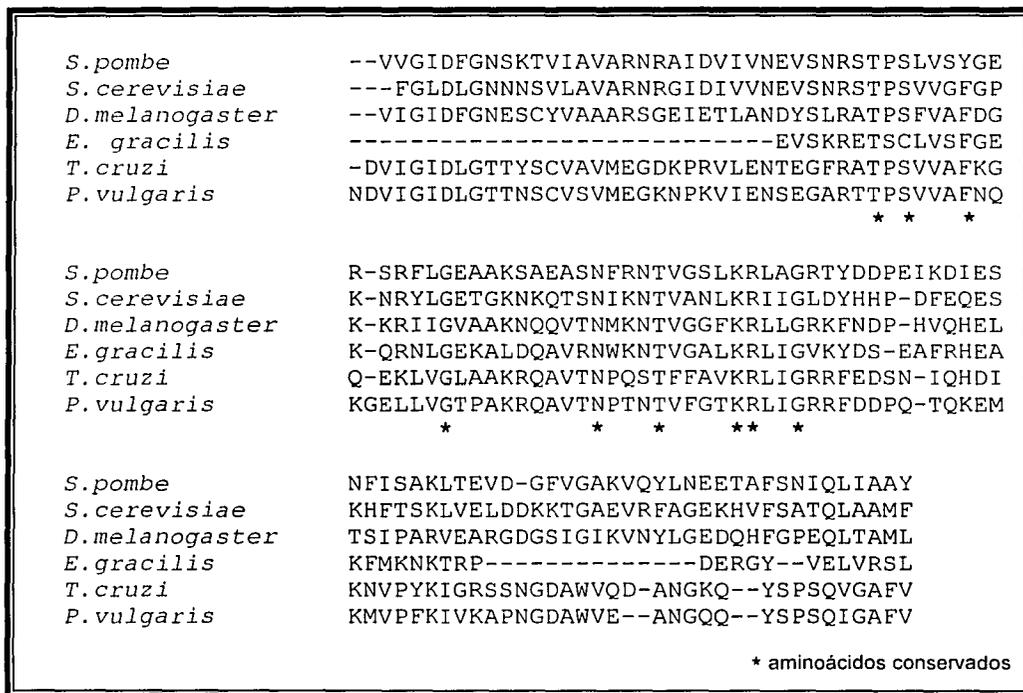


Figura 18. Alineamiento de diferentes HSP70. Esta región se encuentra hacia el extremo amino terminal de las HSP70.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

e) Expresión de los genes correspondientes a los cDNAs clonados

Se transfirieron aproximadamente 1 µg de RNA poliA⁺ de los tratamientos de 3 y 6 h y 200 ng del tratamiento de 9 h de las dos condiciones estudiadas, a membranas de nylon para hacer Northern blots (ver materiales y métodos). Las membranas se hibridaron con las sondas marcadas con ³²P por la técnica de "random primer". De las cuatro clonas analizadas, se logró observar la expresión diferencial de la triosa fosfato isomerasa (Figura 19). Si bien la cantidad de RNA correspondiente a las 9 h fue baja, es posible observar mayor expresión en los tratamientos obtenidos de las células cultivadas en presencia de Cd. A las 3 h hay una ligera diferencia en la señal del tratamiento expuesto a Cd respecto al control que puede atribuirse a las diferencias en la cantidad de RNA. Esta diferencia se hace evidente a las 6 h. Estos resultados pueden ser explicados ya sea porque la expresión de este gen se incrementa por la presencia de Cd o porque la expresión del gen en las células control disminuye. Esta última opción podría estar relacionada con una estabilidad alterada de los mensajes conduciendo a una mayor vida media y por lo tanto a una mayor acumulación, en el tratamiento con Cd.

Los otros mensajes no pudieron ser detectados en ninguna condición a pesar de que hibridación y los lavados fueron poco astringentes.

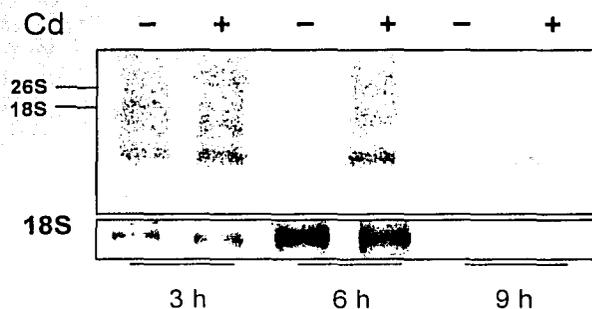


Figura 19. Northern blot utilizando la sonda de la TPI. RNA poli A⁺ de células tratadas (+) y no tratadas (-) con Cd fue resuelto en geles de agarosa desnaturante, transferido a membranas de nylon e hibridado con la sonda TPI marcada radiactivamente. Las membranas se expusieron a autorradiografía.

TRIPES CON
FALSA... EN

DISCUSIÓN

1. En *E. gracilis* expuesta a Cd por 9 h existen niveles más altos de GSH y FQs

La síntesis de FQ es uno de los mecanismos más conservados y mejor estudiados en respuesta a Cd en plantas (Grill *et al.*, 1987), algas (Gekeler *et al.*, 1988), levaduras (Mutoh y Hayashi, 1988), *C. elegans* (Clemens *et al.*, 2002; Cobbett y Goldsbrough, 2002), y en *Euglena gracilis*. Sin embargo, estudios recientes en levadura han mostrado que existen otros metabolitos involucrados en la respuesta a Cd y que, en muchos casos, los cambios observados a nivel de proteína pueden correlacionarse con cambios a nivel transcripcional (Vido *et al.*, 2001; Fauchon *et al.*, 2002).

En este trabajo, nos interesamos en estudiar la respuesta de *E. gracilis* a Cd a nivel transcripcional por medio de un análisis de expresión diferencial, el cDNA-AFLP.

Como punto de partida fue necesario determinar las condiciones de cultivo de *E. gracilis* en las que se llevaría a cabo el estudio, por lo que se hicieron curvas de crecimiento con diferentes concentraciones de Cd. Se encontró que el crecimiento del cultivo se afectaba dependiendo de la concentración de metal al que fueran expuestas las células y que en todos los casos la viabilidad era mayor al 91%, por lo que dedujimos que el retraso en el crecimiento podía deberse a un retraso en la división celular. De hecho, en un trabajo publicado por Falchuk y colaboradores (1975) en el que estudiaron la morfología de *E. gracilis* expuesta a Cd observaron la presencia de células y núcleos excepcionalmente grandes, en los cuales ocurría duplicación del DNA, pero no la citocinesis subsecuente. Con base en estas observaciones y con la idea de evitar la variación producida por las diferencias en la división celular entre células control y las cultivadas con Cd, empleamos cultivos sincronizados y realizamos este estudio en momentos tempranos de exposición al metal. La sincronización de los cultivos fue posible por el hecho de que fotoperíodos de 12 h luz y 12h oscuridad permiten sincronizar las células, ya que la división celular se lleva a cabo en la oscuridad (Edmunds y Funch, 1969). Resultados iniciales en este trabajo (datos no mostrados), obtenidos de células heterótrofas no sincronizadas, mostraron que la variación en la expresión entre células tratadas y no tratadas con Cd era muy grande. Estos resultados nos permitieron percatarnos de

este fenómeno y considerarlo en el diseño de los análisis realizados posteriormente con células fotoheterótrofas (este trabajo).

Por otra parte, en un estudio reciente de Watanabe y Suzuki (2002) se mostraron estudios preliminares en los que 1 h de exposición a 100 μM de CdCl_2 fue suficiente para causar ruptura en el DNA, por lo que en este trabajo al haberse utilizado una concentración mayor de Cd podría estar ocurriendo lo mismo. Esto podría tener repercusión en el desarrollo y en el patrón de expresión genética. Sin embargo, cuando se inició este trabajo existía únicamente la evidencia de que aún en presencia de Cd las células pueden replicar su DNA (Falchuk *et al.*, 1975) y que la síntesis de éste en cultivos sincronizados se lleva a cabo hacia la segunda mitad del ciclo de luz (Edmunds, 1982).

Posteriormente se determinó si a tiempos cortos de cultivo en Cd, esto es 3, 6 y 9 h de tratamiento, ocurría la entrada de Cd a las células. Para esto se determinó el contenido de Cd intracelular observándose que ya a las 3 h de cultivo había acumulación y que la cantidad de éste aumentó con el tiempo dependiendo de la concentración de metal en el medio. También se hizo el análisis a las 12 h de tratamiento, y se observó una disminución en el contenido del metal en las células expuestas a CdCl_2 50 μM . Esto coincidió con el aumento del número de células en el cultivo; es decir, que las células empezaban a dividirse y el Cd pudo haberse repartido entre las células hijas. Con el tratamiento de 170 μM de CdCl_2 las células se dividieron en una menor proporción, siendo esta la posible explicación de que encontramos más cadmio en ellas.

En organismos como *A. thaliana* y levadura, concentraciones de 50 μM y 1 mM de CdCl_2 respectivamente en el medio de cultivo, desencadenan una respuesta a nivel transcripcional en varios de los genes de la vía de asimilación de azufre, que involucra un incremento en los niveles de GSH y FQ, los cuales son producidos para contender con la toxicidad del metal (Xiang y Oliver, 1998; Domínguez-Solís *et al.*, 2001; Fauchon *et al.*, 2002). Por lo tanto, consideramos que el incremento en estos metabolitos en *E. gracilis* expuesta a Cd podría ser un buen indicador de una respuesta bioquímica del cultivo al Cd. Así que determinamos los niveles de cisteína, GSH y FQ a 3, 6 y 9 h de exposición a Cd y en el control. Los resultados mostraron que no existe diferencia en la cantidad de Cys en las condiciones y tiempos analizados. En *E. gracilis* expuestas a 44.5 μM de Cd, existen incrementos en la

cantidad de Cys respecto al control desde las 24 h (Coppellotti, 1998) sin embargo, no existen experimentos menores a este tiempo. En plantas de maíz expuestas 50 μM de CdCl_2 hubo incremento de Cys aunque a partir del segundo día de tratamiento (Rüegsegger y Brunold, 1992). En *A. thaliana*, la adición de cistina permitió mayor crecimiento de plantas expuestas a CdCl_2 250 μM respecto al control después de 15 días además, el gen *Atcys-3A* que codifica a la O-acetil serina tioliasa, enzima encargada de la síntesis de cisteína es regulado transcripcionalmente con el consecuente incremento en los niveles de GSH (Domínguez-Solís *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que la disponibilidad de Cys es importante en la respuesta a Cd y el hecho de no encontrar variaciones en los tiempos estudiados podría implicar que no hay cambios mesurables en el contenido de este metabolito por estarse utilizando en la síntesis de GSH. En *E. gracilis* expuestas a Cd por 3 y 8 días existe incremento de 4-7 veces en el contenido de Cys y de 17-19 veces en GSH (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2002).

Si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GSH entre las células expuestas y no expuestas a Cd a las 9 h de cultivo, presentándose acumulación de FQs a las 6 y 9 h, solamente en el cultivo expuesto a Cd. Esto es diferente a lo que ocurre en *Rauvolfia serpentina* y *A. thaliana*, en donde se encuentran FQs desde los primeros minutos y 1 h de exposición al metal, respectivamente (Grill, 1987; Xiang y Oliver, 1998). Por otro lado, un estudio comparativo entre diferentes algas y *E. gracilis*, mostro que ésta sintetiza la menor cantidad de FQs (Gekeler, 1988). La síntesis temprana de FQ encontrada en plantas y en mucho mayor cantidad de en algas, comparada con la menor síntesis y mas tardía en *E. gracilis* hace pensar que estos organismos podrían tener diferentes mecanismos para contender contra el Cd. Quizá inicialmente *E. gracilis* podría emplear compuestos como ácidos orgánicos para quelar el metal y no recurrir a la síntesis de FQs, incluso, considerando que se requieren 2 tioles para quelar 1 molécula de Cd^{2+} , la cantidad de Cys y GSH disponible en la célula es suficiente para quelarlo. Otra posibilidad podría ser que a las 3 h no se había alcanzado la cantidad mínima de metal intracelular (mayor a 3 $\text{nmol}/10^7$ células; Fig. 2) necesaria para desencadenar la síntesis de FQs. También cabría la posibilidad de que el tamaño de la muestra no fueran suficiente y/o el método de análisis (derivatización con DTNB) no fuera lo suficientemente sensible para detectar FQ en las primeras horas de tratamiento. Esto podría corroborarse haciendo la derivatización con

monobromobimano, que es un método que permite detectar pmoles de tioles a diferencia del método empleado en este trabajo que permite detectar nmoles (Sneller *et al.*, 2000).

En células de tomate, *C. reinhardtii* y *A. thaliana*, algunas horas de exposición a Cd ocasionan el incremento en tioles totales acompañado por la disminución en los niveles de GSH (Scheller *et al.*, 1987; Howe y Merchant, 1992; Xiang y Oliver, 1998), mientras que en el caso de *E. gracilis*, no se observa esta disminución, al contrario, se produce una acumulación de GSH. Una posible explicación es que en *E. gracilis* la síntesis de GSH o de γ -EC, el precursor de la Cys y cuya síntesis se ha propuesto como un punto de regulación importante en la respuesta al estrés por Cd (Zhu *et al.*, 1999a, 1999b), aumente en respuesta al Cd y sea más rápida que la síntesis de FQ y que por lo tanto, los niveles de GSH no se vean afectados, sino que incluso aumenten en presencia de Cd. Los estudios de la cinética de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de GSH de *E. gracilis* está siendo llevado a cabo en el Depto. de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología. Estos trabajos permitirán conocer cual es la participación de la actividad de estas enzimas en la respuesta a Cd en *E. gracilis*.

De manera interesante, a las 9 h de tratamiento se encontraron pequeñas cantidades de FQs en las células control. Grill *et al.* (1987) encontraron que metales como Cu, Cd, Zn, Hg, Ag, entre otros pueden inducir la síntesis de FQs, siendo el Cd el mejor inductor. Dado que en el medio de cultivo empleado en este trabajo contiene minerales traza como Cu (0.78 μ M) y Zn (339 μ M), éstos podrían estar induciendo la síntesis de FQs aunque en menor grado que el Cd.

2. Identificación de algunos genes que incrementan su expresión en respuesta a Cd

A partir de los resultados anteriores, se decidió realizar el análisis de expresión diferencial empleando una mezcla de RNA poliA⁺ de *E. gracilis* tratadas con 170 μ M de CdCl₂ por 3, 6 y 9 h. A pesar de que no se encontraron diferencias en los niveles de Cys, GSH y FCs entre las células control y las tratadas por 3 h con CdCl₂, se incluyó también ese RNA porque ya a ese tiempo, se encontró Cd dentro de las células, lo cual podría estar induciendo cambios en la expresión genética sin

que necesariamente se observaran cambios en los niveles de los metabolitos estudiados como indicadores.

Por medio de cDNA-AFLP se hizo la comparación de la expresión genética de células tratadas y no tratadas con Cd empleando 128 combinaciones de oligonucleótidos aunque solo 49 de ellas dieron un patrón de expresión confiable para ser analizado. Se encontraron 52 bandas con expresión diferencial de las cuales solamente siete repitieron la diferencia observada en un duplicado realizado posteriormente. Esto indica que a pesar de que se ha reportado al método de cDNA-AFLP como más reproducible que otros métodos de comparación de expresión genética por la especificidad de los oligonucleótidos y altas temperaturas empleadas en las reacciones de PCR (Bachem *et al.*, 1998), vimos que puede producir una gran cantidad de falsos positivos, por lo que es recomendable hacer siempre duplicados y comprobar la expresión diferencial por Northern blot.

De los siete cDNAs expresados diferencialmente, sólo fue posible clonar tres de ellos (clonas 1, 2 y 5). Para corroborar su expresión diferencial encontrada en los cDNA-AFLPs se hicieron Northern blots utilizando los cDNAs clonados como sondas. Sin embargo, a pesar de que se probaron varias membranas y varias condiciones de hibridación, sólo se logró obtener señal con la sonda del cDNA parecido a la TPI (clona 2.1). Probablemente exista una baja expresión de los genes que no pudimos detectar, por lo cual no se observaron señales en el Northern. Para verificar la expresión diferencial de los genes identificados, tendrán que probarse otras condiciones de hibridación, emplear más RNA en las membranas a hibridar o utilizar un RT-PCR cuantitativo o semicuantitativo.

Proteína de respuesta a estrés por calor

A partir del cDNA proveniente de la clona 2, se obtuvo una secuencia que al ser traducida presenta homología con un miembro de la familia de las proteínas de estrés por calor, la HSP70.

Estas proteínas forman parte de un sistema de chaperonas presentes en todos los organismos y muchas de ellas se expresan por calor, drogas, análogos de aminoácidos o metales pesados, incluido el Cd (Lindquist, 1986; Abe *et al.*, 1994; Liao y Freedman, 1998; Carginale, *et al.*, 2002; Vido *et al.*, 2001).

En *E. gracilis* ya se había reportado que la incubación con 500 μ M de CdCl₂ o calor induce la expresión de proteínas de pesos moleculares alrededor de 40, 50, 70

y 90 kDa (Barque *et al.*, 1994, 1998). Además, por inmunodetección utilizando anticuerpos anti-HSC73 y anti-HSP72 (miembros de la familia de las HSP70) se determinó que células de *E. gracilis* adaptadas a Cd por varios años o expuestas momentáneamente a calor expresaron cantidades elevadas de una proteína relacionada con HSC73 y no HSP72 (Barque *et al.*, 2000).

En condiciones normales, las proteínas HSC70 son constitutivas y su expresión se modifica sólo ligeramente en situaciones de estrés. Ya que en este trabajo sólo se aisló un fragmento del cDNA y que las proteínas HSC y las HSP tienen un 90% de identidad (Hung *et al.*, 1998a), no sabemos si pudiera tratarse del cDNA de *hsc73* o de otro miembro de las HSP70.

La regulación de la expresión genética de la familia de las HSP70 durante la respuesta a estrés por Cd ha sido más estudiada en células de mamífero. En estas células, la activación de los genes de heat shock (*hsp*) durante la respuesta a estrés está mediada principalmente por un factor de transcripción llamado HSF1. Este factor se une a la región promotora de los genes *hsp70* y *hsc70* en un sitio llamado "heat shock element" (HSE) con la consecuente activación de la transcripción (Morimoto, 1993). En levadura, el HSE juega un papel importante en la respuesta al estrés por calor, sin embargo no se ha estudiado su implicación en el estrés por Cd. El hecho de que las HSP70 se expresen en células expuestas a Cd (Vido *et al.*, 2001) sugiere que un mecanismo semejante al de estrés por calor pudiera estar involucrado.

La regulación mediada por HSF1 es un mecanismo complejo y aunque es parecido entre organismos, existen diferencias importantes. En *S. cerevisiae* HSF1 se encuentra en forma de trímero interaccionando todo el tiempo con HSE. En situaciones de estrés, un mayor número de HSF1 se unen a sitios HSE no tan conservados probablemente como una consecuencia de cambios en la estructura de la cromatina (Giardina y Lis, 1995; Estruch, 2000). En mamíferos la regulación involucra varios pasos que son la localización nuclear, la trimerización de monómeros de HSF1 para que pueda unirse a DNA y una fosforilación inducida por estrés que hace a HSF1 activo, la cual es distinta de la fosforilación constitutiva que reprime la capacidad de HSF1 para activar la transcripción de genes *hsp70* (Cotto *et al.*, 1996; Kline y Morimoto, 1997).

A pesar de que la vía de activación transcripcional de *hsp70* en estrés es cada vez más clara, no se sabe cuál es el papel del Cd dentro de la cascada de

transducción de señales. Probablemente la respuesta esté relacionada con la generación de proteínas dañadas. Incluso, se ha observado que la transcripción de los genes de las HSPs se correlaciona con niveles altos de proteínas desnaturalizadas o mal plegadas, por lo que se ha especulado que las proteínas desnaturalizadas secuestran a las HSP70 y que la disminución en los niveles de proteína ocasiona la activación de la transcripción de su gene (Morimoto, 1993, Estruch, 2000). Sin embargo, estudios recientes en *S. cerevisiae* mostraron que la sobre-expresión de HSP70 no inhibe la respuesta al estrés por calor, sugiriendo que los niveles de HSP70 no son el único elemento que desencadena la respuesta (Hjorth-Sorensen, 2001).

Triosa fosfato isomerasa

Otro de los cDNAs que se expresan diferencialmente en respuesta a Cd, proveniente de la clona 2.1, codifica una proteína que tiene homología con la triosa fosfato isomerasa (TPI). Ésta es la enzima que cataliza la formación de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en la glucólisis. En este trabajo se encontró que *E. gracilis* tratada con Cd por 3, 6, y 9 h incrementa la expresión de un gen semejante a la TPI, posiblemente la isoforma cloroplástica, pues al comparar la secuencia de aminoácidos de *E. gracilis* con la de otros organismos, el porcentaje de identidad más alto fue con la TPI cloroplástica de *S. oleracea*. Además está reportado que en *E. gracilis* existen dos isoformas de la TPI, una cloroplástica que predomina en células fotoautótrofas y otra citosólica que predomina en los cultivos heterotróficos (Mo *et al.*, 1973).

En un estudio del efecto del Cd sobre la fotosíntesis de *E. gracilis* se reportó que la exposición a 0.1 μM de CdCl_2 ocasiona una disminución en el contenido de triosas fosfato: gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato (De Filippis y Ziegler, 1993), pero no se analizó el efecto sobre la actividad o la expresión de las enzimas que sintetizan estos metabolitos por lo que no puede descartarse una regulación a nivel transcripcional.

No existen reportes de la regulación de la expresión genética de la TPI por Cd en otros organismos. Sin embargo, se ha reportado que puede ser regulada a nivel transcripcional en levadura, bacterias y plantas ante diferentes tipos de estrés, tales como frío, calor, deficiencia de nitrógeno, deficiencia de glucosa y estrés osmótico (Umeda *et al.*, 1994; Minhas y Grover, 1999; Rodríguez-Vargas *et al.*, 2002, Prasad

et al., 2003). Además, en algunas ocasiones, el incremento de su expresión coincide con el incremento de la expresión de otras enzimas de la glucólisis tales como glucosa fosfato isomerasa, fosfofructocinasa-1, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, enolasa y aldolasa. Y la respuesta puede depender del tiempo de estrés al que se sometan las células (Umeda *et al.*, 1994; Minhas y Grover, 1999).

No se sabe el mecanismo mediante el cual se regula la expresión de estas enzimas bajo estrés. Pero el hecho de que su expresión cambie en diferentes situaciones sugiere que se trata de una respuesta general de adaptación, tal vez relacionada con cambios en los niveles energéticos (ATP) (Plaxton, 1996).

Apoyando esta idea, un análisis de la expresión genética de *S. cerevisiae* expuesta a calor, estrés oxidativo, estrés osmótico, deficiencia de aminoácidos entre otros, mostró que existen cambios en la transcripción, específicos para cada estrés y otros cambios generales que son comunes en todos los estreses. Entre el grupo de genes comunes se encuentran algunos de la glucólisis (Gasch *et al.*, 2000).

Por otra parte, Krieger y Ernst (1994) reportaron que el mRNA de la TPI de *S. cerevisiae* es estabilizado por Fe. Aunque no se estudió el mecanismo implicado, el Cd^{2+} , podría ocupar el lugar del Fe^{2+} en este proceso por el hecho de ser ambos metales divalentes. Sin embargo, por el panorama descrito anteriormente, es más probable que el cambio en la expresión de la posible TPI sea una respuesta de adaptación general, como ocurre en otros organismos.

Proteína de unión a poli-A

Se clonó también un cDNA que al ser traducido codifica una posible proteína que une poli-A (PABP, por sus siglas en inglés). Esta proteína es importante para la formación de la cola de poli-A en el mRNA y para la iniciación de la traducción (Zhao *et al.*, 1999). El cDNA de la posible PABP de *E. gracilis* presenta dos regiones que podrían unir RNA (RRMs).

La síntesis de mRNA funcional en eucariontes requiere de modificaciones postranscripcionales entre las que se encuentran el corte del extremo 3' y su poliadenilación. El corte del mRNA se lleva a cabo en sitios específicos reconocidos por diversos factores de transcripción tales como CPSF (cleavage/polyadenylation specificity factor) en mamíferos y CF1 (cleavage factor 1) en levadura, entre muchos

otros. Una vez que el DNA ha sido cortado, se recluta una poli-A polimerasa (PAP) que adiciona la cola de poli-A. Se ha observado que en mamíferos, la síntesis de la cola de poli-A es más eficiente en presencia de una PABP (Zhao *et al.*, 1999). En levadura esta proteína está involucrada en la regulación de la longitud de la cola de poli-A pero no se sabe el mecanismo de regulación, aunque mutaciones en esta proteína ocasionan la formación de colas de poli-A anormalmente largas (Vo *et al.*, 2001).

Por otra parte, en experimentos *in vitro* se ha observado que la cola de poli-A es necesaria para una eficiente traducción de mRNA, ya que ésta interacciona con una PABP estimulando la unión de la subunidad ribosomal 40S al extremo 5' del mRNA favoreciendo la traducción (Tarun y Sachs, 1995). Este paso de iniciación de la traducción también se estimula por una asociación del factor de iniciación de la traducción eIF4E, que está en el extremo 5' cap, con el factor eIF4G. La cola de poli-A unida a PABP también interacciona con eIF4G, de ahí que el modelo propone que el cap del 5' y la cola de poli-A en 3' actúan en conjunto para unir a eIF4G y reclutar al 40S en el extremo 5' del mRNA (Sachs *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998).

Poco se sabe de la regulación de la expresión genética de las PABPs en situaciones de estrés. Recientemente, estudios en las diferentes fases de desarrollo de *C. elegans* demostraron que en las larvas que se forman cuando disminuye la fuente de alimentación o hay sobrepoblación, se incrementa la expresión de una PABP (Cherkasova *et al.*, 2000). En levadura se observó el incremento de un mensaje de PABP asociado con defectos en el ciclo celular, aunque no se sabe su papel en este proceso. Se sugiere que la sobre-expresión de esta proteína podría interferir con la traducción de mRNAs involucrados en el ciclo celular (Tallada *et al.*, 2002).

No existe información acerca de cambios en la expresión de PABP ocasionados por metales pesados, incluso en este trabajo no fue posible corroborar, por Northern blot, la aparición de este mensaje en células tratadas con Cd. Si verdaderamente este mensaje aumentara en respuesta a Cd, y que la PABP que codifica también se incrementara, una posibilidad es que la actividad de esta proteína pudiera estar correlacionada con el defecto en la división celular observada en éste trabajo, como ha sido descrito para levadura. Otra posibilidad sería que la actividad de esta proteína fuera la de madurar o participar en la traducción de mensajeros específicamente necesarios durante el estrés por Cd.

Fragmento de cDNA no identificado

Además de los cDNAs mencionados, se clonó un fragmento de aproximadamente 100 pb que al ser traducido y comparado con el banco de proteínas, no mostró homología con ninguna secuencia. Se hizo una comparación de su secuencia de nucleótidos utilizando BLAST en la modalidad de comparación de secuencias pequeñas. Inicialmente se pensó que podría tratarse de una secuencia regulatoria que pudiera estar presente en alguna región no traducida del mensaje y que pudiera correlacionarse con alguna señal para estabilidad o degradación de mensajeros en respuesta a estrés. El análisis produjo al menos treinta secuencias semejantes en diferentes genes, la mayoría de ellos sin una identificación con ningún gen conocido. No se pudo identificar una región específica en donde estuvieran estas clonas, por lo tanto, no podemos sugerir que correspondan a ninguna región reguladora en particular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

En *Euglena gracilis*:

- 1) Existen cambios en la expresión genética por el tratamiento con CdCl_2 170 μM a tiempos cortos.
- 2) Un gen semejante a la triosa fosfato isomerasa aumenta su expresión por la exposición a Cd.
- 3) Se encontró evidencia de que genes semejantes a una HSP70 y a una PABP inducen su expresión en respuesta a Cd.
- 4) Hay acumulación de Cd dentro de las células a tiempos cortos (3, 6 y 9 h) de exposición. La acumulación es dependiente de la concentración de Cd en el medio.
- 5) La exposición a 170 μM CdCl_2 a tiempos cortos no modifica el contenido de Cys. Sólo se observan diferencias en el contenido de GSH entre las células con y sin Cd hasta las 9 h de cultivo.
- 6) Se observa síntesis de FQ en los cultivos tratados con 170 μM de CdCl_2 a partir de 6 h

PERSPECTIVAS

- 1) Corroborar la expresión diferencial de la HSP70, PABP y de la secuencia de 100 pb.
- 2) Ya que se ha visto que la TPI aumenta su expresión con la exposición a Cd, podría analizarse su actividad enzimática en estas mismas condiciones para establecer si existe un incremento en la cantidad de enzima.
- 3) En este trabajo se comparó el patrón de expresión de *E. gracilis* con y sin Cd utilizando 49 combinaciones de oligonucleótidos sin embargo sería posible hacer hasta 400 combinaciones que permitirían tener un panorama más amplio de la respuesta a Cd en *E. gracilis*. Aunque debido a que las células empleadas en este trabajo no fueron seleccionadas por resistencia a Cd, la expresión diferencial encontrada pudiera no estar correlacionada con mecanismos de resistencia sino solo de respuesta general al estrés; por lo tanto, sería interesante realizar estudios de expresión genética con células seleccionadas para resistencia a Cd.
- 4) De los genes que se confirme la expresión diferencial y que resulten de interés, será importante aislar los cDNAs completos a partir de una biblioteca y analizar su expresión a lo largo de las diferentes fases de desarrollo del cultivo, con la finalidad de determinar si únicamente son genes de respuesta temprana a Cd o si su expresión es regulada diferencialmente con Cd a través del desarrollo. Con los genes completos se podrán hacer experimentos de expresión de proteína recombinante en sistemas heterólogos como bacterias o levaduras que permitirán analizar su función y actividad.
- 5) Dado que se tiene bien caracterizada la respuesta bioquímica de la vía de asimilación de azufre y que ésta juega un papel importante en la respuesta de *E. gracilis* a Cd, sería importante complementarla con estudios de expresión genética de las enzimas involucradas tales como la γ -glutamylcisteína sintetasa, glutatión sintetasa y fitoquelatina sintetasa.

APÉNDICE

Medio de cultivo glutamato/malato (Schiff *et al.*, 1971)

Minerales traza

M	MgSO ₄	5 g en 20 mL
N	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g en 10 mL
K	KH ₂ PO ₄	2 g en 10 mL

A

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.2 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.0 g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.5 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.040 g
Disolver en HCl y aforar a 50 mL	

B (1X)

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.078 g
H ₃ BO ₃	0.057 g
NaI	0.023 g

Aforar a 100 mL

Vitaminas (100mL)

Tiamina (B1)	0.1 g
Vitamina B12	2 x 10 ⁻⁶ g (a partir de un stock 0.02%)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.05 g

Disolver en 10 mL de agua y esterilizar por filtración, aforar a 100 mL con agua estéril.

Para 4 L de medio glutamato/malato:

glutamato	22.2 g
malato	8.8 g
CaCO ₃	0.88 g

Disolver y añadir los siguientes minerales traza:

A	8.88 mL
B (5x)	1.0 mL
M	8.88 mL
N	8.88 mL
K	17.7 mL

Ajustar pH a 3.5 y aforar a 4 L. Esterilizar 45 min a 15 lb y 121°C

Medio KME pH 7.2

KCl	120 mM
MOPS	20 mM
EGTA	2 mM

Glutación

Preparar un stock 100 mM de glutatión. Guardar en alícuotas a -70°C.

Tomar una alícuota de 10 μ L y llevar a 10 mL de agua. Tomar 50 μ l para hacer HPLC.

Agua tratada con DEPC	0.8 mL DEPC/ L de agua
Acetato de sodio pH 4.0	2 M

Solución D para extracción de RNA

Tiocianato de Guanidina	4 M
Citrato de sodio pH 7.0	25 mM
Sarcosyl	0.5 %
β -mercaptoetanol	0.1 M

Para preparar esta solución, pesar **250 g de Tiocianato de guanidina** y disolver en **293 mL de agua con DEPC**, añadir **17.6 mL de una solución stock de citrato de sodio 0.75 M** y **26.4 mL de una solución stock de Sarcosyl 10%**. Esta solución puede ser almacenada por tres meses a temperatura ambiente. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 lb durante 20 min. Antes de utilizar, añadir **0.36 mL de β -mercaptoetanol por cada 50 mL de sol. D**. Una vez que se ha añadido el β -mercaptoetanol, la solución se puede guardar un mes.

Buffer para síntesis de segunda cadena de cDNA 5X

Tris-HCl pH 7.4	175 mM
MgCl ₂	20 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 mM
DTT	15 mM

Buffer para digestión-ligación de adaptadores (AFLP)

Tris acetato pH 7.5	50 mM
Acetato de Mg	50 mM
Acetato de K	250 mM

Buffer de carga desnaturizante 2X

Formamida	98 %
EDTA	100 mM
Xilen cianol	0.025 %
Azul de bromofenol	0.05 %

TBE 10X

Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
Stock de EDTA 0.5 M pH 8	40 mL

Gel de agarosa 1.2%

Disolver 0.3 g de agarosa en 25 mL de TBE, añadir 1 μ L de una solución de bromuro de etidio y vaciar.

Solución de prehibridación (40 mL)

Buffer de fosfato de Na 1M pH 7	26 mL
SDS 20%	7 mL
EDTA 0.5 M pH 8	40 µL
H ₂ O	7 mL

SSC 20 X

NaCl	3 M
Citrato de Na	0.3 M

Medio LB

Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Disolver en 500 mL de agua y aforar a 1 L. Esterilizar a 121°C 15 lb durante 15 min. Si se requiere preparar medio sólido, al medio líquido se le añaden 15 g de agar antes de esterilizar. NO intentar disolver en frío. Agitar al sacar de la autoclave.

Medio SOC

Medio LB más glucosa esterilizada por filtración a una concentración final de 20 mM

Buffer TENS

Tris pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM
NaOH	0.1 N
SDS	0.5 %

Buffer MOPS 20 X

MOPS	0.4 M
Acetato Na (pH 7)	0.1 M
EDTA	0.02 M

Gel desnaturalizante para RNA

3% formaldehído

Buffer MOPS 1 X

Agarosa 2% (1.4 g)

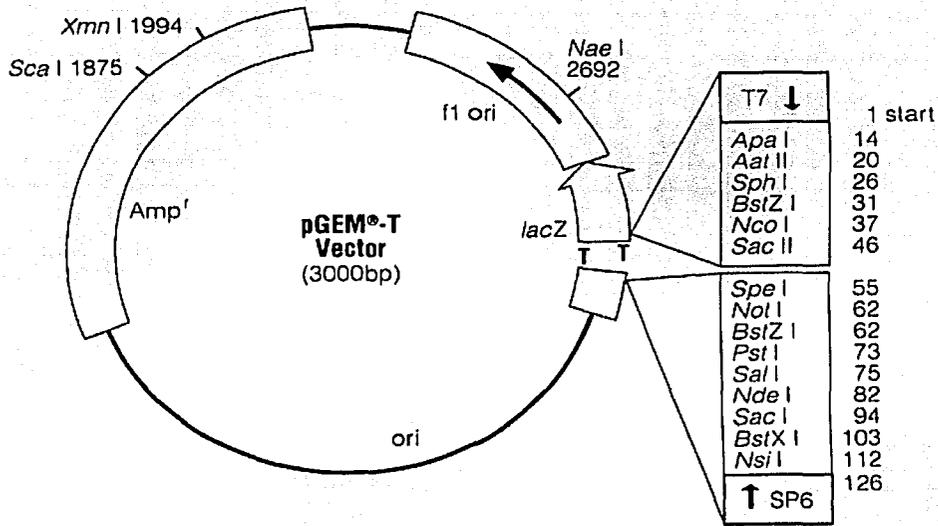
Disolver la agarosa en 64.4 mL de agua estéril, después añadir 2.1 mL de formaldehído (37%) y 3.5 mL de MOPS 20 X

Acrilamida (5%) para geles de secuenciación

	100 mL	200 mL
Acrilamida	4.75 g	9.55 g
Bis acrilamida	0.25 g	0.5 g
Urea 7.5 M	45 g	90 g
TBE 10 X	10 mL	20 mL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Vector pGEM (Promega)



Vector utilizado para clonar las secuencias aisladas de los AFLPs

Oligos disponibles para AFLP

Clave	Nombre	Secuencia
ML33	MseI adapter.1	GACGATGAGTCCTGAG
ML34	MseI adapter.2	TACTCAGGACTCAT
ML35	EcoRI adapter.1	CTCGTAGACTGCGTACC
ML36	EcoRI adapter.2	AATTGGTACGCAGTC
ML37	MseI Core + adapter	GACGATGAGTCCTGAGTAA
ML38	EcoRI Core + adapter	CTCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML39	U-EcoRI (EcoRI)	GCGGAATTCCGTAGACTGCGTACCAATTC
ML40	U-Mse.1(PstI)	GCGCTGCAGGACGATGAGTCCTGAGTAA
ML41	U-Mse.2 (SacI)	GCGCCGCGGGACGATGAGTCCTGAGTAA
ML42	Eco+1.1	AGACTGCGTACCAATTCA
ML43	Eco+1.2	AGACTGCGTACCAATTCT
ML44	Eco+1.3	AGACTGCGTACCAATTCTG
ML45	Eco+1.4	AGACTGCGTACCAATTC
ML46	Eco+2.1	AGACTGCGTACCAATTCAA
ML47	Eco+2.2	AGACTGCGTACCAATTCAT
ML48	Eco+2.3	AGACTGCGTACCAATTCAG
ML49	Eco+2.4	AGACTGCGTACCAATTCAC
ML50	Eco+2.5	AGACTGCGTACCAATTCTA
ML51	Eco+2.6	AGACTGCGTACCAATTCTT
ML52	Eco+2.7	AGACTGCGTACCAATTCTG
ML53	Eco+2.8	AGACTGCGTACCAATTC
ML54	Eco+2.9	AGACTGCGTACCAATTCGA
ML55	Eco+2.10	AGACTGCGTACCAATTCGT
ML56	Eco+2.11	AGACTGCGTACCAATTCGG
ML57	Eco+2.12	AGACTGCGTACCAATTCGC
ML58	Eco+2.13	AGACTGCGTACCAATTC
ML59	Eco+2.14	AGACTGCGTACCAATTCCT
ML60	Eco+2.15	AGACTGCGTACCAATTC
ML61	Eco+2.16	AGACTGCGTACCAATTC
ML62	Mse+1.1	GATGAGTCCTGAGTAAA
ML63	Mse+1.2	GATGAGTCCTGAGTAAT
ML64	Mse+1.3	GATGAGTCCTGAGTAAG
ML65	Mse+1.4	GATGAGTCCTGAGTAAC
ML66	Mse+2.1	GATGAGTCCTGAGTAAAA
ML67	Mse+2.2	GATGAGTCCTGAGTAAAT
ML68	Mse+2.3	GATGAGTCCTGAGTAAAG
ML69	Mse+2.4	GATGAGTCCTGAGTAAAC
ML70	Mse+2.5	GATGAGTCCTGAGTAATA
ML71	Mse+2.6	GATGAGTCCTGAGTAATT
ML72	Mse+2.7	GATGAGTCCTGAGTAATG
ML73	Mse+2.8	GATGAGTCCTGAGTAATC
ML74	Mse+2.9	GATGAGTCCTGAGTAAGA
ML75	Mse+2.10	GATGAGTCCTGAGTAAGT
ML76	Mse+2.11	GATGAGTCCTGAGTAAGG
ML77	Mse+2.12	GATGAGTCCTGAGTAAGC
ML78	Mse+2.13	GATGAGTCCTGAGTAACA
ML79	Mse+2.14	GATGAGTCCTGAGTAACT
ML80	Mse+2.15	GATGAGTCCTGAGTAACG
ML81	Mse+2.16	GATGAGTCCTGAGTAACC

BIBLIOGRAFÍA

- Abe T., Konishi T., Kathoh T., Hirano H., Matsukuma K., Kashimura M., Higashi K. (1994) Induction of heat shock 70 mRNA by cadmium is mediated by glutathione suppressive and non-suppressive triggers. *Biochim. Biophys. Acta* 1201:29-36.
- Avilés-Rodríguez C., Loza-Tavera H., Terry N., Moreno-Sánchez R. (2003) Mercury pretreatment selects an enhanced cadmium-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 180:1-10.
- Avilés-Rodríguez C. (2001) Mecanismos de resistencia a cadmio en *Euglena gracilis* heterótrofa. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bachem C.W.B., Oomen R.J.F.J., Visser R.G.F. (1998) Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16:157-173.
- Barque J.P., Chacun H., Marouby S., Bonaly J. (1994) Cadmium resistance of achlorophyllous *Euglena gracilis* cells : constitutive overexpression of two heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:540-544.
- Barque J.P., Abahamid A., Chacun H., Bonaly J. (1996) Different heat-shock proteins are constitutively overexpressed in cadmium an pentachlorophenol adapted *Euglena gracilis* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223:7-11.
- Barque J.P., Schedler P., Floch E., Bonaly J. (2000) In *Euglena gracilis*, a heat shock protein related to hsc73 is constitutive and stress inducible. *Arch. Biochem. Biophys.* 378:1-5.
- Carginale V., Capasso C., Scudiero R., Parisi E. (2002) Identification of cadmium-sensitive genes in the antarctic fish *Chiondraco hamatus* by messenger RNA differential display. *Gene.* 299:117-124.
- Chardonnens A.N., Koevoets P.L., Kuijper L.D.J., Verkleij J.A.C. (1998) Distribution of Cd in leaves of Cd tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 104:75-80.
- Cheng S.H., Seeman J.R. (1998) Extraction and purification of RNA from plant tissue enriched in polysaccharides. En: Repley R., Manning D.L. (Editores) *Methods in molecular biology*. Vol 86 RNA isolation and characterization protocols. p 27-32. Humana Press Inc. Totowa N.J.
- Cherkasova V., Ayyadevara S., Egilmez N., Reis R.S. (2000) Diverse *Caenorhabditis elegans* genes that are upregulated in dauer larvae also show elevated transcript levels in long-lived, aged or starved adults. *J. Mol. Biol.* 300:433-448.
- Chomczynski P., Sacchi, N., (1987) Single Step Method of RNA Isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162. 156-159.
- Clemens S., Kim E.J., Neuman D., Schroeder J. (1999) Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J.* 18:3325-3333.
- Clemens S. (2001) Molecular mechanism of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta.* 21:475-486.
- Clemens S., Schroeder J.I., Degenkolb T (2001) *Caenorhabditis* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.* 268:3640-3643.

- Cobbett C., Goldsbrough P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 :159-182.
- Coppeloti O. (1989) Glutathione, cysteine and acid-soluble thiol levels in *Euglena gracilis* cells exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.* 94:35-40.
- Cotto J.J., Kline M., Morimoto R.I. (1996) Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress induced serine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 271:3355-3358.
- De Filippis L.F., Hampf R., Ziegler, H. (1981) The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Respiration, photosynthesis and photochemical activities. *Arch. Microbiol.* 128:407-411
- De Filippis L.F. Ziegler H. (1993) Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *J. Plant Physiol.* 142:167-172.
- Díaz-Barriga F. (1991) Principios de la toxicidad del cadmio. *Ciencia y Desarrollo* 17:61-68.
- Domínguez-Solis J.R., Gutiérrez-Alcalá G., Romero L.C., Gotor C. (2001) The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* 276:9297-9302.
- Edmunds L.N. (1982) Circadian and infradian rhythms. En: Buetow D.E (Editor) *The biology of Euglena...* Vol III. Cap 3 p. 53-142 Academic Press. USA.
- Edmunds L.N., Funch R.R. (1969) Circadian rhythm of cell division in *Euglena*: effects of a random illumination regimen. *Science.* 165:500-503.
- Estruch F. (2000) Stress controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 24:469-486.
- Falchuk K.H., Fawcett D.W., Vallee B.L. (1975) Competitive antagonism of cadmium and zinc in the morphology and cell division of *Euglena gracilis*. *J. Submicr. Cytol.* 7 :139-152.
- Fernández-Leborans y Novillo (1995) The effects of cadmium on the successional stages of a freshwater protozoa community. *Ecotoxicol Environ Saf.* 31:29-36.
- Fauchon M., Lagniel G., Aude J., Lombardia L., Soularue P., Petat C., Marguerie G., Sentenac A., Werner M., Labarre J. (2002) Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol. Cell.* 9:713-723.
- Galvao A.C., Corey G. (1987) Cadmio, serie vigilancia No. 4. Centro panamericano de ecología humana y salud, OPS, OMS. Metepec, México p. 1-5,
- Gekeler W., Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1988) Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150:197-202.
- 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. *Mol. Biol. Cell* 11: 4241-4257.
- Giardina C., Lis J.T. (1995) Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter *Mol. Cell. Biol.*, 15: 2737-2744.

- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1987) Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothionein. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:439-443.
- Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6828-6842.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Harada E., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. (2002) Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. J. Plant Physiol. 159:445-448.
- Heiss S., Schäfer A., Haag-Kerwer A., Raush T. (1999) Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. Plant Mol Biol 39:847-857.
- Hentze K., Schnarrenberger C., Kellermann J., Martin W. (1994) Chloroplast and cytosolic triosephosphate isomerases from spinach: purification, microsequencing and cDNA cloning of the chloroplast enzyme. Plant Mol. Biol. 26:1961-1973.
- Hjorth-Sorensen B., Hoffmann E.R., Lissin N.M., Sewell A.K., Jakobsen B.K. (2001) Activation of heat shock transcription factor in yeast is not influenced by the levels of expression of heat shock proteins. Mol Microbiol. 39:914-923.
- Howe G., Merchant S. (1992) Heavy-metal activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 98:127-136
- Hung J.-J., Cheng T.-J., Chang D.-T. M., Chen K.-D., Huang H.-L., Lai Y.-K. (1998a) Involvement of heat shock elements and basal transcription elements in the differential induction of the 70-kda heat shock protein and its cognate by cadmium chloride in 9L rat brain tumor cells. J. Cell. Biochem. 71:21-35.
- Hung J.-J., Cheng T.-J., Lai Y.-K, Chang D.-T. M (1998b) Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells. J. Biol. Chem. 273:31924-31931.
- Ji G., Silver S. (1995) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. J. Indust. Microbiol. 14:61-75.
- Kägi J.H.R. Schäfer A. (1988) Biochemistry of metallothionein. Biochemical J. 27:8509-8515.
- Kline M., Morimoto R. (1997) Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. Mol Cell. Biol. 17:2107-2115.
- Krieger K., Ernst J.F. (1994) Iron regulation of triosephosphate isomerase transcript stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. 140:1079-1084.
- Lee J., Gordon C., Lagniel G., Spector D., Garin J., Labarre J., Toledano M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. J. Biol. Chem. 274:16040-16046.

- Lee S., Korban S. (2002) Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase (AtPCS1) by cadmium during early stages of plant development. *Planta* 215:689-693.
- Lemaire S., Keryer E., Stein M., Schepens I.I., Issakidis-Bourguet E., Gerard-Hirne C, Miginiac-Maslow M., Jacquot J.P. (1999) Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 120:773-778.
- Li Z.S., Szczyzka M., Lu Y.P., Thiele D.J., Rea P.A. (1996) the yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271:6509-6517.
- Li Z.S., Lu Y.P., Zhen R.G., Szczyzka M., Thiele D.J., Rea P.A (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:42-47.
- Liao V. H.-C, Freedman J.H. (1998) Cadmium-regulated genes from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 273:31962-31970.
- Lindquist S. (1986) The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55:1151-1191.
- Liscum E. (1999) Amplified Fragment Length Polymorphism : Studies on plant development. En: PCR Applications.. p. 505-519. Academic Press USA.
- Lorkovic Z.J., Barta A. (2003) Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.
- Mendoza-Cózatl D., Devars S., Loza-Tavera H., Moreno-Sánchez R. (2002) Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant* 115:276-283.
- Minhas D., Grover A. (1999) Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. *Plant Sci.* 146:41-51.
- Mo Y., Harris B.G., Gracy R.W. (1973) Triosephosphate isomerases and aldolases for light- and dark-grown *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 157:580-587.
- Moreno-Sánchez R., Díaz-Barriga F., Devars S. (1999) Mecanismos de toxicidad y de tolerancia a los metales pesados. En: Cervantes C., Moreno-Sánchez R. (Editores) Contaminación ambiental por metales pesados. Impacto en los seres vivos. Cap. 2 p. 24. AGT editor. Primera edición. México.
- Morimoto R.I. (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science.* 259:1409-1410.
- Muller-Taubenberger A., Hagmann J., Noegel A., Gerisch G. (1988) Ubiquitin gene expression in *Dictyostelium* is induced by heat and cold shock, cadmium, and inhibitors of protein synthesis. *J. Cell Sci.* 90:51-58.
- Mutoh H., Hayashi Y. (1988) Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small cadmium-binding peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161:32-39.
- Nagel K., Adelmeir U., Voigt J. (1996) Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Plant Physiol.* 149:86-90.
- Navarro L., Torres-Márquez M.E., González-Moreno S., Devars S., Hernández R., Moreno-Sánchez R. (1997) Comparison of physiological changes in

- Euglena gracilis* during exposure to heavy metals of heterotrophic and autotrophic cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C:265-272.
- Nieboer E., Richardson D.H.S. (1980) The replacement of the non descript term "heavy metal" by biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1:3-8.
- Nies D.H., Silver S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Indust. Microbiol.* 14:186-199.
- Nies D.H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-750.
- Novik R.P., Roth C. (1968) Plasmid resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 95:1335-1342.
- Nriagu J.O., Pacyna J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature.* 333:134-139.
- Ortiz D.F., Kreppel L., Speiser D.M., Scheel G., Mc Donald G., Ow D.W. (1992) Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.* 11:3491-3499.
- Ortiz D.F., Ruscitti, R., McCue K.F., Ow D.W. (1995) Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270:4721-4728.
- Plaxton W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185-214.
- Prasad J., McJarrow P., Gopal P. (2003) Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:917-925.
- Rai L.C., Gauer J.P., Kumar H.D. (1981) Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev. Cambridge Philos Soc.* 56:99-151.
- Reese R.N., Winge D.R. (1988) Sulfide stabilization of the cadmium-gamma-glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263:12832-12835.
- Rodríguez-Vargas, S., Estruch F., Randez-Gil F. (2002) Gene expression analysis of cold and freeze stress in baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3024-3030.
- Rüegsegger A., Brunold C. (1992) Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedlings. *Plant Physiol.* 99:428-433.
- Sachs A.B., Sarnow P., Hentze M.W. (1997) Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89:831-838.
- Salt D.E., Rauser W.E. (1995) MgATP dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* 107:1293-1301.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silver S., Phung L.T. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:753-789.
- Schäfer H., Haag-Kerwer A., Rausch T. (1998) cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy-metal accumulation *Brassica juncea* L.: evidence for Cd-induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. *Plant. Mol. Biol.* 37:87-97.

- Scheller H.V., Hang B., Hatch E. Goldsbrough P.B.(1987) Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* 85:1031-1035.
- Schiff J.A, Lyman H., Russel G. (1971) Isolation of mutants from *Euglena gracilis*. *Meth. Enzymol.* 23:143-162.
- Sneller F.E.C., van Heerwaarden L.M., Koevoets P.L.M., Vooijs R., Schat H., Verkleij J.A. (2000) Derivatization of phytochelatin from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *J. Agric. Food Chem.* 48:4014-4019
- Souza V., Bucio O. (1996) El cadmio: mecanismos básicos de toxicidad. *Ciencia y desarrollo.* Enero/febrero 39-43.
- Steffens J.C. (1990) The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41:553-575.
- Strasdeit, H. (2001) The first cadmium-specific enzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40:707-709.
- Tallada V.A., Daga R.R., Palomeque C., Garzón A., Jiménez J. (2002) Genome-wide search of *Schizosaccharomyces pombe* genes causing overexpression-mediated cell cycle defects. *Yeast.* 19:1139-1151.
- Tarun S.Z., Sachs A.B. (1995) A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* 9:2997-3007.
- Trevors J.T., Stratton G.W., Gadd, G.M. (1986) Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-464.
- Umeda M., Hara C., Matsubayashi Y., Li H.H., Liu Q., Tadokoro F., Aotsuka S., Uchimiya H. (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Mol. Biol.* 25:469-478.
- Vallee B.L., Ulmer D.D. (1972) Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41:91-128.
- Vido K., Spector D., Lagniel G., Lopez S., Toledano M.B., Labarre J. (2001) A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276:8469-8474.
- Vo L.T.A., Minet M., Schmitter J.M., Lacroute F., Wyers F. (2001) Mpe1, a zinc knuckle protein, is an essential component of yeast cleavage and polyadenylation factor required for the cleavage and polyadenylation of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 21:8346-8356.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Wagner (1993)
- Watanabe M., Suzuki T. (2002) Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 131:491-500.
- Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2:135-140.
- Wu A.L., Moye-Rowley W.S. (1994) *GSH1*, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.* 14:5832-5839.

- Xiang C., Oliver D. (1998) Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1539-1550.
- Zhao J., Hyman L., Moore C. (1999) Formation of mRNA 3' ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationship with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:405-445.
- Zenk M.H. (1996) Heavy metal detoxification in higher plants. A review. *Gene* 179:21-30.
- Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Tarun A.S., Jouanin L., Terry N. (1999a) Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.* 119:73-79.
- Zhu Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Tarun A.S., Weber S.U., Jouanin L., Terry N. (1999b) Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiol.* 121:1169-1177.