



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

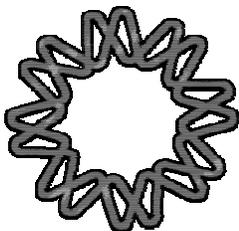
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE  
PLANTAS

**EL PAPEL DE HSF1 Y SKN7 EN LA REGULACIÓN DE LA  
RESPUESTA AL ESTRÉS EN *Saccharomyces cerevisiae*  
A TRAVÉS DE LA VÍA RAS-AMP<sub>c</sub>-PKA**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
SERGIO PÉREZ LANDERO**

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. CLAUDIA MARTÍNEZ ANAYA



CUERNAVACA, MORELOS

ENERO 2007



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Claudia Martínez Anaya. Durante la realización de éste proyecto se contó con el apoyo financiero, durante solamente año y medio, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y con el apoyo de los donativos de DGAPA IN-226506.

Dedico este trabajo a toda mi incontable familia, pero muy es especial a mis padres Oliva e Inocente y mis muy queridas hermanas Ana Ruth y Yos. Además, de todos mis casi hermanos, que enumerarlos seria muy dificil.

Un especial reconocimiento a quien leyó o lea esta tesis.

A la Dra. Claudia Martínez Anaya que me asesoro y enseñó mucho del trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Jorge Nieto, por su apoyo y confianza que ha mostrado en mí.

A Luzma, que el trabajo que ella realizó ha sido de gran importancia para esta tesis.

A todos los miembros que están o los que ya se fueron del laboratorio.

A tod@s mis amig@s de (excepto los casuales) El Jicarillo, Ayotoxco, Teziutlán, Xalapa, Irapuato y Cuernavaca (que han sido los lugares que he ocupado para llegar aquí).

<b>I.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1. EL ESTRÉS EN LA LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	8
1.1. <i>Estrés por calor</i> .....	8
1.2. <i>Estrés oxidativo</i> .....	9
2. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.....	11
3. LA VÍA DE LA PROTEÍNA CINASA DEL TIPO A DEPENDIENTE DE AMPC. ....	13
4. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ESTRÉS EN LA LEVADURA. ....	17
4.1. <i>ARE (Elementos de respuesta a AP-1)</i> : .....	17
4.2. <i>STRE (Elementos de respuesta al estrés)</i> : .....	18
4.3. <i>HSE (Elementos de choque por calor)</i> :.....	19
<b>II.- ANTECEDENTES .....</b>	<b>24</b>
<b>III.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>IV.- OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
1. OBJETIVO GENERAL: .....	26
2. OBJETIVOS PARTICULARES: .....	26
<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
1. CEPAS.....	28
2. PLÁSMIDOS.....	29
3. SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO PRY016.....	29
4. MEDIOS DE CULTIVO:.....	29
4.1. <i>Medio YPDA líquido</i> :.....	29
4.2. <i>Medio mínimo líquido (MM)</i> :.....	30
4.3. <i>Medio de esporulación</i> : .....	30
4.4. <i>Medio mínimo líquido de Acetato de potasio</i> :.....	30
4.5. <i>Medio mínimo líquido Galactosa</i> : .....	30
4.6. <i>Medios sólidos</i> : .....	30
5. CONDICIONES DE CRECIMIENTO: .....	30
6. ENSAYOS DE TOLERANCIA A DIFERENTES TIPOS DE ESTRÉS. ....	30
6.1. <i>Termotolerancia basal</i> :.....	31
6.2. <i>Termotolerancia inducida</i> .....	31
6.3. <i>Ensayo de resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> . ....	32
6.4. <i>Crecimiento en Higromicina</i> . ....	32
7. TRANSFORMACIÓN DE <i>S. CEREVISIAE</i> POR EL MÉTODO DE ACETATO DE LITIO. ..	32
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE $\beta$ -GALACTOSIDASA. ....	33
8.1. <i>Ensayo colorimétrico de <math>\beta</math>-galactosidasa</i> . ....	33
8.2. <i>Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford</i> ..	34
9. PCR A PARTIR DE COLONIA DE LEVADURAS. ....	35
10. INDUCCIÓN DE LA ESPORULACIÓN Y MICROMANIPULACIÓN. ....	35
<b>VI.- GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES DE LEVADURA.....</b>	<b>36</b>
1. OBTENCIÓN DE UNA CEPA SIN EL GEN <i>SKN7</i> : .....	36
2. DELECIÓN DEL CARBOXILO TERMINAL DE <i>HSF1</i> .....	40
3. GENERACIÓN DE DOBLES MUTANTES POR RECOMBINACIÓN MEIÓTICA. ....	43
4. GENERACIÓN DE UNA CEPA DOBLE MUTANTE $\Delta$ <i>SKN7</i> $\Delta$ <i>CDC25</i> , ISOGÉNICA A W303-6B.....	48
5. GENERACIÓN DE LA CEPA DOBLE MUTANTE $\Delta$ <i>CDC25</i> <i>HSF1</i> $\Delta$ <i>CTA</i> . ....	49
6. CAMBIO DEL MARCADOR DE SELECCIÓN NUTRICIONAL <i>URA3</i> POR <i>ADE2</i> .....	51
<b>VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>53</b>
1. ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL PLÁSMIDO PRY016 .....	53

2. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES EN GENES QUE PARTICIPAN EN LA VÍA RAS-PKA.	55
2.1. Termotolerancia basal e inducida de las cepas mutantes en la vía Ras-PKA.	55
2.2. Complementación del fenotipo de termotolerancia en el fondo $\Delta ras2$ .	56
2.3. Fenotipo de la delección de las subunidades de la PKA.	58
3. EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA VÍA RAS-PKA SOBRE ELEMENTOS HSE. ...	61
3.1. Efecto de <i>cdc25</i> en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos HSE.	61
3.2. Efecto de mutaciones río abajo de <i>Cdc25</i> en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos HSE.	63
3.3. Efecto de delecciones dobles de las subunidades catalíticas de la PKA en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos HSE.	65
3.4. Efecto de la eliminación de la subunidad regulatoria de la PKA en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos HSE.	66
4. ACTIVIDAD DE <i>TPK3</i> .	68
4.1. Efecto de <i>Tpk3</i> sobre la expresión dependiente de <i>STRE</i> .	68
4.2. Efecto de las delecciones sencillas en las subunidades catalíticas de la PKA.	70
5. PARTICIPACIÓN DE <i>SKN7</i> EN LA ALTA RESISTENCIA AL ESTRÉS QUE PRESENTA LA MUTANTE $\Delta CDC25$ .	72
5.1. Participación de <i>Skn7</i> en la regulación de la expresión dependiente de HSE.	74
6. PARTICIPACIÓN DE <i>Hsf1</i> EN LA ALTA RESISTENCIA A ESTRÉS EN LA MUTANTE $\Delta CDC25$ .	75
6.1. Participación de <i>Hsf1</i> en la regulación de la expresión dependiente de HSE.	77
<b>VIII.- CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>IX.- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>82</b>

## INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Diagrama de una curva de crecimiento típica en medio con glucosa.....	8
FIGURA 2: Modelo propuesto para el funcionamiento de la vía Ras-PKA .....	16
FIGURA 3. Representación de los dominios de Hsf1 .....	21
FIGURA 4: Comparación de las secuencias de <i>HSF1</i> y <i>SKN7</i> .....	23
FIGURA 5: Representación de la estrategia a seguir para la eliminación de genes .....	37
FIGURA 6: PCR con gradiente de temperaturas para obtener el fragmento con el cual reemplazar <i>SKN7</i> .....	38
FIGURA 7: Esquema de la estrategia a seguir para confirmar la correcta eliminación de <i>SKN7</i> .....	39
FIGURA 8. PCR de colonia para confirmar la eliminación del gen <i>SKN7</i> .....	40
FIGURA 9: PCR para obtener el fragmento con el cual se eliminara el dominio carboxilo terminal de Hsf1.....	41
FIGURA 10. PCR de colonia para confirmar la eliminación del carboxilo terminal de <i>HSF1</i> .....	42
FIGURA 11: Ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> :.....	44
FIGURA 12: PCR de colonia para confirmar la eliminación del gen <i>SKN</i> .....	47
FIGURA 13: Ensayo tipo <i>Southern</i> para <i>kanMX</i> de las .....	48
cepas: W303-6B (carril 2); SE100 $\Delta$ <i>skn7</i> (carril 3); .....	48
FIGURA 14: PCR de colonia para confirmar la eliminación del gen <i>SKN7</i> .....	49
FIGURA 15. Mapa de restricción del plásmido M3499 .....	51
FIGURA 16: Restricción de 10 $\mu$ g del plásmido M3499 con la enzima <i>PstI</i> .....	52
FIGURA 17: Análisis del plásmido pRY016. (A) Alineamiento entre la secuencia de pLG $\Delta$ BS (verde) y la de pRY016 (azul).....	54
FIGURA 18. La termotolerancia de <i>Aras2</i> (KT2249).....	57
FIGURA 19: Efecto de las mutaciones dobles de las subunidades de la PKA sobre el control de la resistencia al calor .....	60
FIGURA 20. Efecto de Cdc25 en la expresión del gen reportero dependiente de <i>HSE</i> en diferentes fondos genéticos.....	62
FIGURA 21: Efecto de mutaciones en Ras2 y AC en la actividad del gen reportero dependiente de <i>HSE</i> .....	64
FIGURA 22: Efecto de las dobles deleciones de las subunidades catalíticas de la PKA, sobre la actividad dependiente de <i>HSE</i> .....	66
FIGURA 23. Efecto de la actividad de $\beta$ -galactosidasa dependiente de <i>HSE</i> en mutantes <i>bcy1</i> . .....	67
FIGURA 24: Esquema de la regulación de la vía Ras-PKA sobre la expresión dependiente de <i>HSE</i> .....	68
FIGURA 25. Efecto de las deleciones dobles de las subunidades catalíticas de la PKA .....	69
FIGURA 26. Efecto de las mutantes sencillas de la PKA en la expresión mediada por elementos <i>HSE</i> . Promedio de tres experimentos. ....	71

FIGURA 27: Ensayo de sensibilidad en placa .....	73
FIGURA 28: Participación de Skn7 en la elevada actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por <i>HSE</i> , en el fondo $\Delta cdc25$ . Promedio de tres experimentos. ....	75
FIGURA 29: Actividad de $\beta$ -galactosidasa, para evaluar la participación de Hsf1 en la elevada expresión de <i>HSE-lacZ</i> . ....	78
FIGURA 30: Actividad de $\beta$ -galactosidasa medida durante el crecimiento en medio YPDA a diferentes DO a 600 nm .....	79

## **ABREVIATURAS.**

AMPc - Adenosinmonofosfato ciclico.

PKA – Proteina cinasa tipo A.

HSP – Proteinas de choque termico

DNA – Acido desoxirribonucleico.

RNA – Acido ribonucleico

ROS – Especies reactivas de oxigeno

UV – Ultravioleta

GDP – Guanidin difosfato

GTP – Guanidin trifosfato

AC – Adenilato ciclase

ARE - Elementos de respuesta a AP-1

STRE - Elementos de respuesta al estrés.

HSE - Elementos de choque por calor

CTA – Carboxilo Terminal

DBD - Dominio de unión a DNA.

ILR - Dominio rico en leucina implicado en la oligomerización

AA – Aminoácidos

MM – Medio mínimo

RPM – Revoluciones por minuto

ONPG – Ortonitrofenolgalactósido

pb – Pares de bases

GEF – Factor Intercambiador de Guanina

# I.- INTRODUCCIÓN

---

Todos los seres vivos crecen, se desarrollan y se reproducen de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales. Los organismos necesitan adaptarse a diferentes condiciones de humedad, calor, salinidad, disponibilidad de nutrientes, etcétera, pues de esto depende el mantenimiento de los procesos celulares vitales. A aquellas condiciones que amenazan la supervivencia de la célula o que le impiden su funcionamiento óptimo se les conocen como estrés. Para lograr crecer en situaciones adversas, se han seleccionado estrategias defensivas en las células que les permite adaptarse y sobrevivir a las condiciones cambiantes del ambiente. Estas estrategias las llevan a modificar su metabolismo y regular su velocidad de crecimiento, entre otros mecanismos. Una de las primeras líneas de defensa contra el estrés, son los componentes de bajo peso molecular (por ejemplo la trehalosa y metalotioneinas) y las proteínas de choque térmico (por ejemplo chaperonas) que actúan inmediatamente protegiendo contra varios tipos de estreses ambientales. La activación de la(s) cascada(s) de señalización del estrés en turno, permite transcribir genes que sirven como protección a otros tipos de estrés. Estos pueden incluir tanto a genes específicos del estrés (por ejemplo genes de estrés por calor, oxidativo, etc.), como a genes involucrados en la respuesta general a estrés.

Una gran variedad de condiciones ambientales y fisiológicas desencadenan rápidamente la síntesis de un conjunto de proteínas de respuesta al estrés (Hsp -*heat shock proteins*-, catalasas, peroxidasas, etc.) (Ruis and Schuller, 1995). En general estas proteínas sirven para reparar el daño causado y proteger de los efectos de futuras exposiciones al mismo o de otras diferentes formas de estrés (Estruch, 2000c).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto de vida saprofita en plantas o material animal. Ha sido utilizado como un organismo modelo para el estudio de la respuesta al estrés en células eucariontes. El genoma completo de esta levadura ha sido secuenciado y anotado en la base de datos de acceso al público (<http://www.yeastgenome.org/>). Esta levadura presenta cinco fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivada en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono (figura 1).

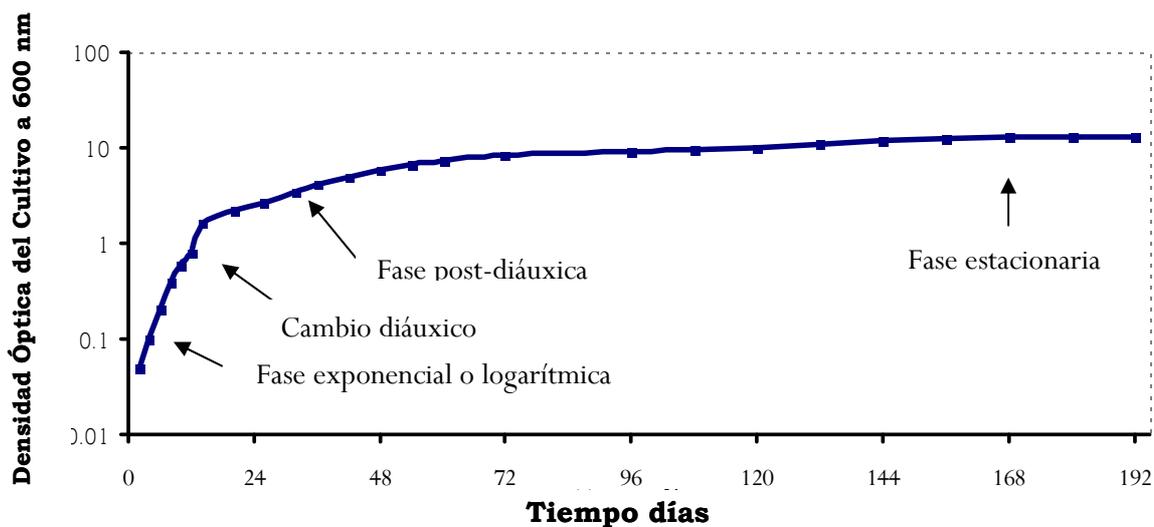
- Fase *lag*: es un periodo de adaptación en el cual la célula ajusta su metabolismo para el nuevo medio y se prepara para proliferar.

- Fase *logarítmica* ó *exponencial*; las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo en el que se produce etanol. Durante esta etapa presentan gran sensibilidad al estrés por calor y a otros tipos de estrés.

- *Cambio diáuxico*: es un período breve en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. Esto sucede cuando disminuye la concentración de glucosa y aumenta la de etanol.

- Fase *postdiáuxica*: las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase exponencial e incrementan su resistencia al estrés gradualmente.

- Fase *estacionaria*: esta fase se alcanza después de 7 días de crecimiento en medio rico, cuando los nutrientes se han agotado. La síntesis de proteínas disminuye dramáticamente a aproximadamente un 0.3 % del que se alcanza en la fase exponencial (Fuge *et al.*, 1994). Las células dejan de dividirse y acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan su máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por litocasa (Werner-Washburne *et al.*, 1993).



**FIGURA 1.** Diagrama de una curva de crecimiento típica en medio con glucosa, donde se muestran las cinco etapas de crecimiento bien establecidas de *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1.El Estrés en la Levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Estudios genómicos en *S. cerevisiae* han revelado un amplio solapamiento en la expresión de los genes de respuesta a una gran variedad de estreses ambientales incluyendo choque por calor, estrés osmótico, bajo pH, limitación de nutrientes (como glucosa y nitrógeno) y agentes que dañan el DNA (Moskvina *et al.*, 1998; Gasch *et al.*, 2000).

### 1.1.Estrés por calor.

La exposición a estrés cambia dramáticamente los patrones de expresión genética. La respuesta al calor en levaduras es de las mejores descritas: las elevadas temperaturas pueden ocasionar daño a diversas estructuras celulares y procesos fisiológicos que incluso pueden ocasionar la muerte. Entre los daños que ocasionan las elevadas temperaturas se encuentran la fragmentación del aparato de Golgi, un incremento en el número de lisosomas y la reducción del número de mitocondrias, dando como consecuencia una disminución de la respiración y la fosforilación oxidativa. También el calor induce un incremento en la fluidez de la bi-capa lipídica y la aglomeración de las proteínas integrales de la membrana

(Parsell *et al.*, 1994). Se afecta al citoesqueleto y el huso mitótico. También provoca una inhibición del procesamiento de los RNAs inmaduros (Yost and Lindquist, 1986).

Para la levadura, la exposición a condiciones moderadas de calor (preadaptación) provoca que ésta adquiera termotolerancia, y esto se relaciona con la actividad del factor de transcripción de choque por calor, *HSF1* (Parsell *et al.*, 1994;Morano *et al.*, 1998). Se ha establecido que las vías reguladoras de la síntesis de HSPs, son los principales factores involucrados en la adquisición de la termotolerancia. Lindquist ha reportado que la proteína Hsp104 es esencial para la adquisición de la termotolerancia en *S. cerevisiae* (Sanchez and Lindquist, 1990c).

### **1.2.Estrés oxidativo**

Todos los organismos vivos utilizan el dioxígeno ( $O_2$ ) para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula se forman durante la respiración moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS). Entre las ROS se incluyen el anión súperoxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), que son consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno del agua durante la respiración. También las ROS se generan de otros procesos metabólicos como la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos o al exponer a las células a fuentes de radiación ionizante (incluyendo radiación UV), o a químicos de reciclaje redox o a metales pesados. Los radicales libres generados por estos procesos causan daño severo a las macromoléculas celulares, como a los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos (Halliwell and Gutteridge, 1984). Por ejemplo, el daño oxidativo al DNA afecta a las bases purinas y pirimidinas, provocando que estas se unan por enlace fosfodiéster (Jackson and Loeb, 2001). El daño oxidativo en las proteínas es a causa de la oxidación de los residuos ácidos de la cadena de aminoácidos hacia derivados hidroxilo o carbonilo, y también se debe a la ruptura de la cadena de polipéptidos, llevando así al incremento de la susceptibilidad proteolítica y la disminución de la actividad biológica de la proteína afectada (Stadtman, 1993).

Los organismos que crecen de manera aeróbica han desarrollado múltiples maneras de descomponer las ROS. Han desarrollado la producción de enzimas destoxicantes (por ejemplo, catalasas, superóxido dismutasa y peroxidases) y moléculas que atrapan a las ROS (por ejemplo glutatión y tiorredoxinas) (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). Así, los organismos son capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, cuando las concentraciones de ROS sobrepasan la capacidad celular de eliminarlos se produce un estado de “estrés oxidativo”.

En la levadura *S. cerevisiae*, la adaptación al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correlaciona con la rápida estimulación de 71 proteínas y la represión de otras 44 (Godon *et al.*, 1998). Las funciones celulares afectadas son:

- *Defensa antioxidante.* Hay inducción de los genes que codifican para la proteína citocromo C peroxidasa (*CCP1*), la catalasa citosólica (*CCT1*), la superóxido dismutasa (*SOD1*), la tioperoxidasa (*TPS1*), la tiorredoxina 1 y 2 (*TRR1* y *2*), la tiorredoxina peroxidasa dependiente de NADPH y la glutatión reductasa dependiente de NADPH.

- *Proteínas de choque térmico y proteasas.* Doce proteínas de choque por calor son estimuladas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Muchas HSP's son chaperonas moleculares que asisten durante la acumulación anormal de proteínas bajo condiciones de estrés.

- *Proteínas relacionadas con el metabolismo del carbono.* La respuesta al peróxido afecta drásticamente el metabolismo del carbono, principalmente en la generación de NADPH, que es el más importante poder reductor de la célula (Godon *et al.*, 1998).

En el control de la respuesta adaptativa al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> están involucrados los reguladores transcripcionales Hsf1, Yap1, Skn7 y Msn2/4 (Kuge and Jones, 1994;Krems *et al.*, 1996;Hasan *et al.*, 2002). Más adelante se describirá en detalle el papel de estos factores transcripcionales.

Una de las proteínas importantes en eucariontes en la respuesta al estrés son las metalotioneínas (MTs): son pequeñas proteínas de unión a metales, ricas en cisteínas. Estas se sintetizan en una gran variedad de estreses ambientales ó fisiológicos. Juegan un papel importante en la detoxificación de metales, también protegen a las células de una serie de xenobióticos, incluyendo agentes quimioterapéuticos alcalinos, protegen del deterioro producido por la generación de radicales libres producidos por la radiación o agentes químicos (Thiele, 1992). En *Saccharomyces cerevisiae*, sólo un gen codifica para MTs, *CUP1* que es inducido por Hsf1 cuando las células son ayunadas de glucosa y cuando la respiración se encuentra exacerbada (Tamai *et al.*, 1994).

## **2. Proteínas de Choque Térmico**

En condiciones ambientales óptimas existe un estado termodinámico estable. La prolongada exposición al estrés calórico interfiere con la eficiente operación de las células con consecuencias negativas en las propiedades bioquímicas de las proteínas, ya sea provocando que éstas se agreguen o se plieguen de una manera incorrecta.

El aumento de la temperatura tiene como consecuencia la síntesis de proteínas de choque por calor (HSP). La mayoría de estas proteínas (proteasas y chaperonas moleculares) mantienen la homeostasis de las proteínas plegadas defectuosamente y aglomeradas, que son acumuladas durante el estrés. Ya sea protegiendo a las que han sido desnaturalizadas, o previniendo la agregación de otras (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Las chaperonas son ubicuas; altamente conservadas entre los distintos reinos; utilizan la energía del ATP para cambiar de la conformación desplegada a plegada de sus blancos; clásicamente se han clasificado por su peso molecular. Las HSP's han sido implicadas en varios procesos relacionados con el crecimiento normal de las células tales como la división celular, la

síntesis de DNA, la transcripción, la traducción, el plegado de proteínas y el transporte (Mager and Ferreira, 1993).

<b>Familia</b>	<b>Miembros</b>	<b>Funciones generales</b>
Hsp100	<b>Hsp104</b>	Desagregación de proteínas y tolerancia al estrés
Hsp90	Hsc81, Hsp82	Plegado de proteínas y tolerancia al estrés. Muchos de sus sustratos parecen estar involucrados en la transducción de señales.
Hsp70	<b>Ssa1-4, Ssb1-2, Sse1-2, Ssz1</b>	Plegado de proteínas y tolerancia al estrés.
Hsp40	<b>Ydj1, Sis1</b>	Estimulación de la actividad de ATPasa de Hsp70. Sis1 esta involucrada en el inicio de la transcripción.
Cofactores Hsp70/90	<b>Sti1, Cpr6, Cpr7, Cns1</b>	Hsp70-Hsp90 ayudan al ciclo del plegado de proteínas. Sti1 conecta a Hsp70 con Hsp90 y regula la actividad de ATPasa de ambas proteínas.
HSP's pequeñas	Hsp26, Hsp12, Hsp42	Forman oligómeros complejos con proteínas desplegadas y previenen la agregación de éstas.

**TABLA 1.** Familia de chaperonas y co-chaperonas de la levadura. Las proteínas marcadas en negritas son aquellas que han sido mejor caracterizadas.

El principal papel de las proteínas chaperonas es catalizar el plegado de las proteínas y lograr interacciones no-covalentes con la cadena del péptido nascente. De esta manera previenen reacciones no productivas y el plegado incorrecto de su estructura (Walter and Buchner, 2002). Una clase inusual de proteínas en mamíferos y hongos es capaz de explotar la maquinaria molecular de las chaperonas para remodelar la conformación de formas infecciosas propensas a la agregación, estas proteínas se llaman priones (Shyu *et al.*, 2002).

Los niveles basales de expresión adecuados de las chaperonas son importantes bajo condiciones de crecimiento normal. Durante la exposición al estrés las células requieren un incremento de las chaperonas. La chaperona Hsp104 tiene un amplio espectro protector contra diversas condiciones de estrés. A diferencia de las chaperonas constitutivas, Hsp104 no tiene un papel esencial en el crecimiento bajo condiciones normales. Pero las células *Δhsp104* que son expuestas al estrés, presentan una dramática reducción en su capacidad de sobrevivencia (Sanchez and Lindquist, 1990b).

La tolerancia inducida por calor en *Saccharomyces cerevisiae* depende de varios factores entre los que se encuentran las proteínas cinasa del tipo A dependiente de AMPc (PKA), la proteína de choque por calor de 104 kDa (Hsp104) (Sanchez and Lindquist, 1990a), las enzimas que sintetizan trehalosa (de Virgilio *et al.*, 1994) y la ATPasa de membrana plasmática (Coote *et al.*, 1991).

### **3.La Vía de la Proteína Cinasa del tipo A Dependiente de AMPc.**

La vía Ras-PKA en la levadura juega un papel muy importante en el control de diferentes procesos celulares: el metabolismo de carbohidratos y del nitrógeno; la proliferación (particularmente en base a la disponibilidad de nutrientes y el crecimiento en diversas fuentes de carbono); la resistencia al estrés; la esporulación (Thevelein and de Winde, 1999); la resistencia de la pared celular a la digestión con liticasa (Van *et al.*, 2000) y la biogénesis ribosomal (Klein and Struhl, 1994).

La vía PKA también está involucrada en el control de la progresión del ciclo celular de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a la fase G<sub>2</sub> (Anghileri *et al.*, 1999), a través de la transcripción de la ciclina de G<sub>1</sub>, Cln3 (Hall *et al.*, 1998).

La regulación de la concentración de AMPc es un punto de control importante en la respuesta al estrés; ya que se ha observado que cuando sus niveles son bajos, se incrementa la expresión de las proteínas de choque térmico, tales como Hsp70, Hsp26 y Hsp12; y de otras proteínas como la ubiquitina (un mediador de la proteólisis) (Estruch, 2000b). Se ha demostrado que esta vía reprime la actividad de los factores transcripcionales Msn2, Msn4 (Gorner *et al.*, 1998b) y Yap1, al controlar su localización intracelular (Fernandes *et al.*, 1997).

Esta vía se compone de varios elementos que interactúan para regular la actividad de la PKA (figura 2) (Thevelein and de Winde, 1999). Río

arriba de la PKA, la vía es activada por el producto del gen *CDC25*, que es un intercambiador de nucleótidos, de GDP a GTP (GEF), que activa a las proteínas Ras (Damak *et al.*, 1991), codificadas por los genes *RAS1* y *RAS2*. Se conoce un segundo intercambiador de nucleótidos de guanina de Ras, Sdc25. Se ha reportado (Boy-Marcotte *et al.*, 1996) que Sdc25 se expresa durante el cambio diáuxico, cuando los nutrientes han disminuido, pero no durante el crecimiento en fase exponencial. Sin embargo, mediante ensayos mas sensibles de RT-PCR, se ha demostrado que este gen también se expresa en fase exponencial en un fondo genético W303a a niveles tan bajos que no pueden detectarse por Northern (Boy-Marcotte *et al.*, 1996)(comunicación personal con Martínez-Anaya C.).

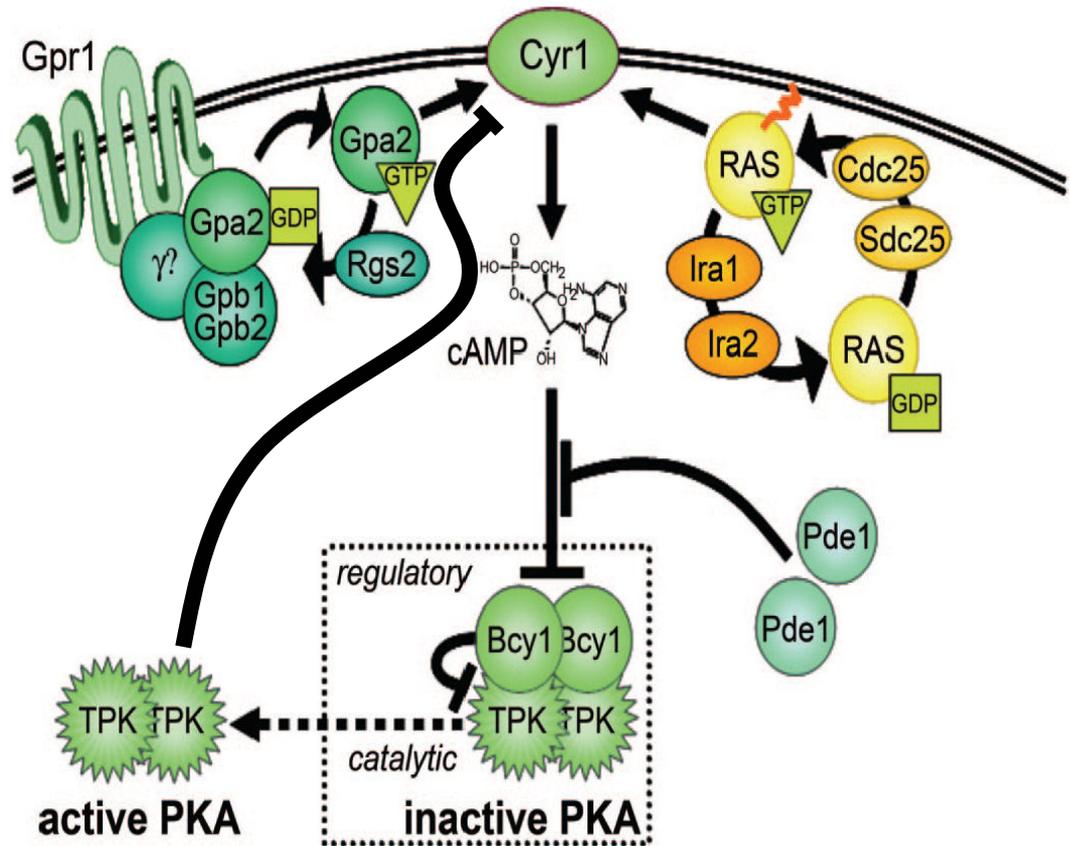
La regulación negativa de Ras es dependiente del incremento de su actividad de GTPasa a través de Ira1 e Ira2 (Tanaka *et al.*, 1991). El blanco conocido de Ras en levaduras es la proteína adenilato ciclasa (AC), codificada por el gen *CYR1*, que cataliza la síntesis de AMPc. La AC es regulada la proteína asociada a la adenilato ciclasa (CAP) (Fedor-Chaiken *et al.*, 1990).

Además de Ras, la proteína AC también puede ser activada por el sistema del receptor de glucosa acoplado a la proteína G (figura 2). La proteína Gpa2 está fuertemente unida al receptor extracelular Gpr1. Al parecer este sistema está involucrado en el incremento rápido de los niveles de AMPc, justo después de que se adicionan altas concentraciones de glucosa (100 mM) a células ayunadas de este carbohidrato (Colombo *et al.*, 1998).

El aumento de la concentración de AMPc, por la acción de la AC, activa a la PKA a través de la unión de dos moléculas de AMPc a cada una de las subunidades regulatorias negativas, Bcy1, provocando su disociación y, como consecuencia, la liberación/activación de las dos subunidades catalíticas codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* (Werner-Washburne *et al.*, 1991). Estas subunidades catalíticas tienen como blanco a residuos

de serina o treonina en sus sustratos, cuyas secuencias consenso son: R-R/K-X-S\*/T\* > R-X2-S\*/T\*=R-X-S\*/T\* (Kennelly and Krebs, 1991;Shabb, 2001). Recientemente, utilizando microarreglos se han podido establecer diferencias entre las actividades de las tres subunidades de la PKA (Robertson *et al.*, 2000). Se ha demostrado que estas subunidades no tienen funciones redundantes a pesar de su alto nivel de identidad de secuencia, de su parecido en el contenido de aminoácidos ácidos y de su traslape en la regulación de la viabilidad. Mientras, Tpk2 es responsable de regular distintos procesos, tales como el crecimiento pseudohifal, la regulación de genes involucrados en la degradación de trehalosa, y de genes involucrados en la asimilación de fierro y el estado hídrico de la célula. Tpk1 regula principalmente a genes involucrados en la respiración, y participa en la des-represión de la biosíntesis de aminoácidos con cadena ramificadas (Robertson *et al.*, 2000). Finalmente, Tpk3 está especialmente involucrada en la regulación del contenido enzimático mitocondrial durante el crecimiento (Chevtzoff *et al.*, 2005) y en la hiperfosforilación de Rgt1 (factor de transcripción involucrado en la represión del gen *HXK2* -hexocinasa 2) en respuesta a la alta concentración de glucosa (Palomino *et al.*, 2006).

La concentración intracelular del AMPc también es contrarrestada por las fosfodiesterasas de baja y de alta afinidad, Pde1 y Pde2, respectivamente. La fosfodiesterasa de baja afinidad es uno de los blancos de las PKA, y se sabe que es activada por ésta; de esta manera, la acumulación de AMPc es regulada negativamente mediante un mecanismo de retroalimentación (Ma *et al.*, 1999).



**FIGURA 2:** Modelo propuesto para el funcionamiento de la vía Ras-PKA (modificado de Santangelo *et al.* 2006).

Uno de los puntos clave en la regulación de la actividad de la vía Ras-PKA es la localización de las subunidades que la conforman. Se ha demostrado que la localización de Bcy1 es mayoritariamente nuclear cuando las células son crecidas en glucosa (Ras-PKA activada), permitiendo así la acción de la TPK's en el citoplasma. En cambio cuando disminuye la concentración de glucosa se observa un aumento de Bcy1 en el citoplasma. Esta rélocalización citoplasmática de Bcy1 es importante para inhibir la actividad de la PKA sobre sus sustratos blancos, por ejemplo, a las enzimas metabólicas (Griffioen and Thevelein, 2002).

Se ha sugerido que la función de las proteínas Ras puede estar relacionada con la percepción y la transmisión de las señales de estrés mediada por Cdc25. La actividad de Cdc25 es regulada positivamente a través de una interacción directa con la proteína citosólica Ssa1 (un miembro de la familia Hsp70p) (Geymonat *et al.*, 1998). También se ha

demostrado que los niveles celulares de Cdc25 se ven reducidos cuando las células están bajo estrés, tales como la presencia de etanol, el estrés oxidativo y por calor. Este efecto posiblemente se deba a que bajo condiciones de estrés existe un aumento de proteínas desnaturalizadas reclutando así a la chaperona Ssa1 (Hsp70) (Wang *et al.*, 2004). Recientemente, se ha sugerido que el dominio N-terminal de Cdc25 es controlado negativamente por la actividad catalítica de esta chaperona (Ssa1) (Belotti *et al.*, 2006).

#### **4.Regulación Transcripcional de la Expresión de los Genes de Estrés en la Levadura.**

Hasta el momento se ha demostrado en los promotores de la levadura la existencia de tres elementos-*cis*, necesarios para la transcripción de los genes que son activados en respuesta a diferentes condiciones de estrés: *ARE* (*AP-1 responsive element*), *STRE* (*stress response elements*) y *HSE* (*heat shock elements*), siendo los elementos *HSE* y *STRE* los que regulan la expresión de genes de respuesta al calor principalmente.

##### **4.1.ARE (Elementos de respuesta a AP-1):**

El factor transcripcional Yap1 presenta una similitud a nivel de secuencia con la familia de c-Jun de los mamíferos. Contiene un dominio de unión a DNA del tipo cierre de leucinas (bZIP) en su región N-terminal. Yap1 es homólogo al factor de transcripción de mamíferos AP-1, tiene la capacidad de unirse a elementos *ARE* (5'-TTACTAA-3') de SV40 y de activar la transcripción de un gen reportero que contiene estos elementos (Moye-Rowley *et al.*, 1988).

Mutantes  $\Delta yap1$  presentan un fenotipo de sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schnell *et al.*, 1992). En condiciones fisiológicas, la actividad de Yap1 se induce por estrés oxidativo, mientras que en una condición sin inducción la transcripción no se detecta. La actividad de Yap1 está regulada por su

localización intracelular. Son necesarios tres residuos de cisteína en la región carboxilo terminal para mantener a la proteína en el citoplasma. Bajo condiciones normales la proteína se mantiene en el citoplasma y en respuesta a estrés oxidativo es translocada al núcleo (Wiatrowski and Carlson, 2003).

Los genes importantes en la respuesta oxidativa que son regulados por Yap1 son; *GSH1* ( $\gamma$ -glutamyl-cisteína-sintetasa), *TRX2* (tioredoxina), *YCF1* (transportador de conjugados de glutatión-S con un sitio de unión para ATP) y *GLR1* (glutatión reductasa).

#### **4.2.STRE (Elementos de respuesta al estrés):**

Existen dos factores transcripcionales, Msn2 y Msn4, que solo se encuentran en levaduras. Se sabe que no son requeridos para la viabilidad de la levadura. Msn2 y Msn4 contienen dominios de unión a DNA del tipo dedos de zinc  $C_2H_2$  en su extremo C-terminal que reconocen y se unen específicamente a los elementos *STRE*. Estos elementos están formados por las secuencias palindrómicas 5'-CCCCT-3' ó 5'-AGGGG-3' y están implicados en el aumento del nivel de expresión de aproximadamente 200 genes (Boy-Marcotte *et al.*, 1999a). Se ha demostrado que estos factores transcripcionales participan en la respuesta a diferentes condiciones ambientales, como en la inducción de genes de respuesta al choque térmico (Hasan *et al.*, 2002), y también están implicados en la regulación del cambio metabólico que ocurre cuando las levaduras son crecidas en glucosa (Lai *et al.*, 2005). Msn2 y Msn4 son proteínas homólogas con funciones redundantes que en ausencia de estímulo se localizan en el citoplasma, lo cual impide que activen a sus genes blanco. Sin embargo, después de un estrés moderado o intenso son relocalizadas en el núcleo, donde actúan aumentando la expresión de sus blanco (Gorner *et al.*, 1998a). La translocación de estos factores transcripcionales es controlada por su estado de fosforilación, que determina su interacción con las proteínas ancladas al citosol, Bmh2 y Bmh1 (Beck and Hall, 1999).

Los genes regulados por Msn2/4 incluyen a algunos que también son inducidos por Hsf1 (e.g. *HSP104*), y otros involucrados en la respuesta antioxidante y el metabolismo del carbono. Algunas enzimas involucradas en el metabolismo de trehalosa son inducidas por Msn2/4 (por ejemplo: Pgm2- fosfoglucomutasa, Ugp1-UDP-glucosa pirofosforilasa, Tps1-Trehalosa 6-fosfato sintetasa, etc.) (Morano *et al.*, 1998)

Las mutantes que carecen de ambos genes  $\Delta msn2 \Delta msn4$ , presentan hipersensibilidad a diferentes tipos de estrés (choque térmico, osmótico y oxidativo), debido a que se requieren para la inducción de genes tales como *CTT1* (catalasa T), *DDR2* (proteína de respuesta a daño del DNA) y *HSP12* (Hsp pequeña). Los factores Msn2 y Msn4 son regulados negativamente por la actividad de la vía Ras-PKA. Esto se demostró utilizando mutantes con una PKA hiperactiva (como *Abcy1* o *Ras<sup>val19</sup>*), los resultados muestran una baja expresión de los genes regulados por elementos *STRE*. Por el contrario, en fuentes de carbono no fermentables, durante la fase diáuxica o estacionaria en donde la actividad de PKA es baja, y en mutantes con actividad de PKA atenuada (*Δras2*) la expresión mediada por elementos *STRE* es elevada (Garreau *et al.*, 2000).

Así mismo, se sabe que la tolerancia inducida es independiente de la actividad de Msn2/Msn4, ya que las cepas mutantes dobles  $\Delta msn2 \Delta msn4$  pueden resistir un choque a 50°C si previamente han sido incubadas a 38°C durante 30 min (Garreau *et al.*, 2000). Como se mencionó antes, se sabe que en respuesta al estrés la actividad de Msn2 es transitoria y se encuentra regulada por: la translocación reversible del núcleo hacia el citoplasma, bajo el control de las vías PKA y Tor; y la degradación inducida por calor a través del proteosoma 26S. Esta degradación ocurre en el núcleo cuando Msn2 está en estado activo (Lallet *et al.*, 2004).

#### **4.3.HSE (Elementos de choque por calor):**

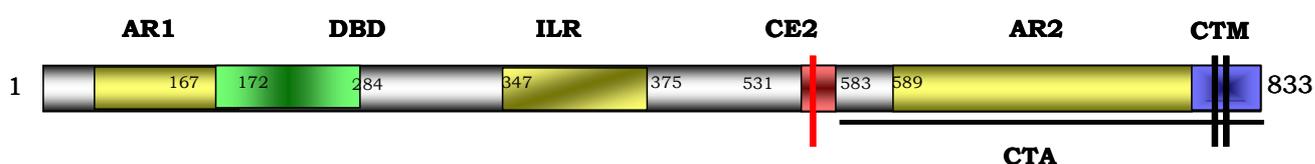
El factor de transcripción de respuesta al choque por calor *HSF* es el principal regulador de la respuesta al calor en eucariontes. En metazoarios,

existen múltiples isóformas de Hsf1 que regulan la tolerancia a diferentes tipos de estrés, y están involucrados en programas de desarrollo, como la gametogénesis. La levadura *S. cerevisiae* posee un gen esencial (*HSF1*) que codifica para un factor de transcripción de respuesta al choque por calor que responde a varios tipos de estrés. Hsf1 es requerido para la activación de genes que participan en el crecimiento normal de estas células, en la viabilidad y la protección, como los genes que codifican las Hsp's. El factor Hsf1 se une en forma de homotrímero en condiciones de no estrés a elementos consenso conocidos como *HSE*. Estos elementos están formados de cinco pares de bases de DNA (tres secuencias repetidas 5'-nGAAn-3' arregladas en orientaciones alternadas, presentes en los promotores de Hsp's) (Tamai *et al.*, 1994; Kroeger and Morimoto, 1994). El tipo *HSE* perfecto consiste en tres o más unidades repetidas, continuas e invertidas (nTTCnnGAAnnTTCn). El tipo *gap-HSE* consiste en dos unidades invertidas, separadas de una tercera unidad por 5 pb (nTTCnnGAAn(5pb)nGAAn). El tipo *step-HSE* consiste en dos unidades repetidas directas, ya sean los motivos nGAAn o nTTCn, separadas por 5 pb (nGAAnn(5pb)nGAAn (5pb)nGAAn) (Hashikawa *et al.*, 2006).

Una baja actividad de Hsf1 es esencial para mantener la expresión constitutiva de HSP's necesarias para procesos celulares normales. Hsf1 es expresado constitutivamente y se localiza en el núcleo (Singh *et al.*, 2006). Su actividad se encuentra regulada tanto positiva como negativamente por fosforilación en residuos de serina y treonina en su extremo carboxilo terminal en respuesta al estrés por calor y oxidativo. Hasta donde se conoce, el incremento de la actividad transcripcional de Hsf1 no ha sido relacionado a un incremento en la capacidad de unirse a elementos *HSE* sino a otras modificaciones postraduccionales de la proteína Hsf1.

El Hsf1 en varios organismos presenta dos dominios altamente conservados: un dominio de unión a DNA, compuesto por motivos hélice-vuelta-hélice y un dominio de trimerización hidrofóbico de forma helicoidal *colied-coil* (Sorger, 1991). Las comparaciones con otras proteínas no

muestran conservación entre los dominios de activación de Hsf1. Se han logrado identificar tres dominios de activación en Hsf1 de levadura: el dominio AI (residuos 1-172), que permite la viabilidad de las células en condiciones control; el dominio CE2 (residuos 531-583) que es esencial tanto para la activación en respuesta al choque por calor y para el crecimiento a temperaturas óptimas; y el dominio CTA-carboxilo terminal (residuos 583-833) que es responsable de su actividad en respuesta a altas temperaturas (figura 3).



**FIGURA 3.** Representación de los dominios de Hsf1. Se indican con números los aminoácidos correspondientes a cada dominio. DBD: dominio de unión a DNA. ILR: dominio rico en leucina implicado en la oligomerización. La barra en rojo indica los sitios de fosforilación que inactivan la actividad de Hsf1, mientras que las barras en negro indican los sitios de fosforilación que aumentan la actividad de este factor.

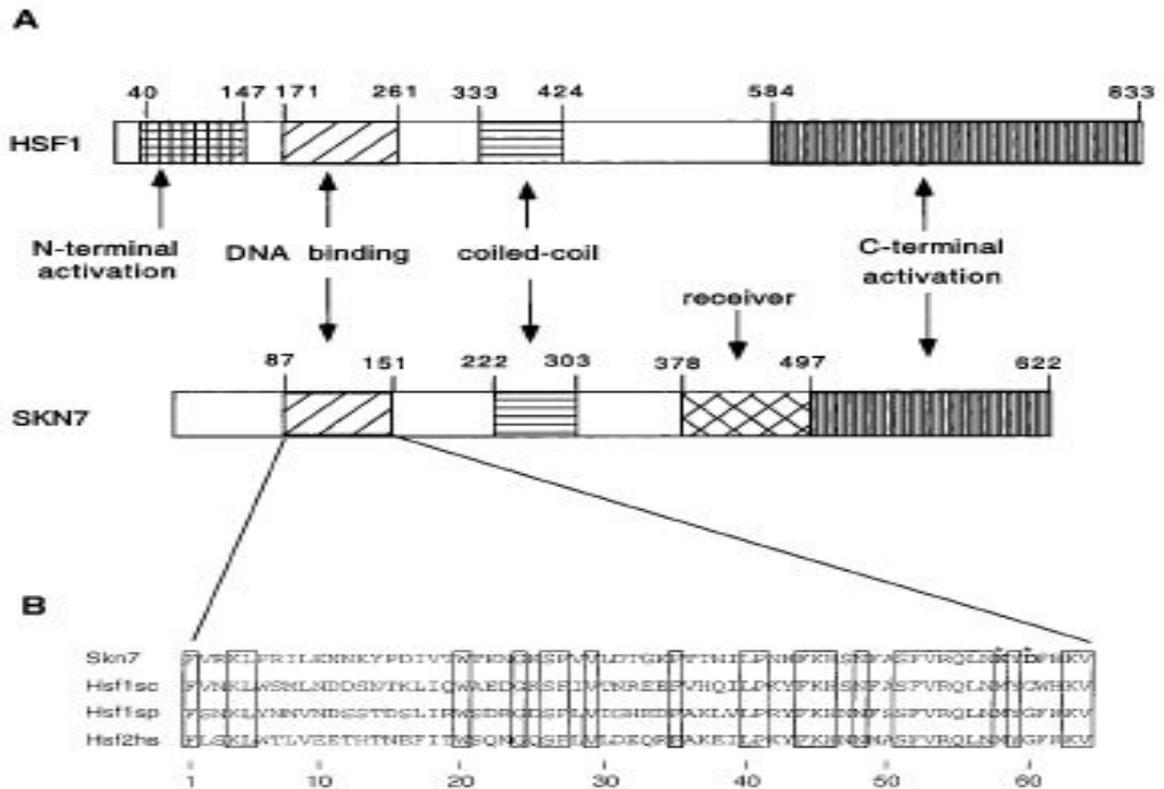
Hahn *et al.* (1996), en un análisis completo del genoma de levadura, establecieron que el Hsf1 dirige la transcripción del 3% de los genes de levadura a temperatura control. Estos genes codifican para proteínas con funciones biológicas muy diversas incluyendo el plegado y degradación de proteínas, la generación de energía, el tráfico de proteínas, el mantenimiento de la integridad de la célula, el transporte de pequeñas moléculas, la señalización intracelular y la transcripción. Mientras que Msn2/Msn4 controlan la expresión de la mayoría de las enzimas del metabolismo del carbono y a las proteínas de defensa antioxidante también en respuesta a los choques calóricos (Martinez-Pastor *et al.*, 1996).

El Hsf1 se encuentra constitutivamente fosforilado y, en condiciones de estrés tanto por calor como oxidativo, ocurre una hiperfosforilación que se detecta como un retraso de su migración al analizarlo en geles de poli-acrilamida (fosfo-shift) (Spencer *et al.*, 1996). La hiperfosforilación del Hsf1 durante el estrés le confiere una fuerte habilidad de activador, aunque hasta ahora se desconoce la cinasa (o cinasas) responsable de esta modificación.

El calor induce la hiperfosforilación de Hsf1 en sus dos dominios reguladores intramoleculares, el CE2 y el CTM (Hashikawa and Sakurai, 2004). Se ha sugerido que la función de la región CE2 es restringir la actividad del Hsf1 a bajas temperaturas y/o interconvertirlo de su estado activo a inactivo (Hoj and Jakobsen, 1994). La región CTA fue originalmente identificada como un dominio esencial para la inducción de *CUP1* en respuesta al choque de calor y estrés oxidativo (Sakurai and Fukasawa, 2001). Un estudio posterior reveló que la región CTA regula la activación de Hsf1 durante un choque calórico y también que afecta el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Sakurai *et al.*, 2003).

Otro factor de transcripción involucrado en respuestas a estrés es el Skn7. El gen *SKN7* fue inicialmente identificado como un supresor de mutantes que afectan a la pared celular (Krems *et al.*, 1996). Sin embargo, en trabajos recientes se han dado a conocer los diferentes procesos en los cuales este factor de transcripción participa, tales como en la respuesta al estrés oxidativo, al estrés por calor y en la regulación del ciclo celular. El Skn7 es homólogo a las proteínas de los sistemas de transducción de dos componentes de bacterias.

La homología de Skn7 con el factor Hsf1 en su dominio de unión a DNA llevo a establecer que Skn7 se une a las regiones regulatorias de *TRX2*, *SSA1* y *OCH* que contienen *HSE*, bajo condiciones de estrés oxidativo. También tiene un dominio *coiled-coil*, que es necesario para las interacciones proteína-proteína que se indican adelante (figura 4). El Skn7 interacciona con varias proteínas, incluyendo factores de respuesta a estrés, como Hsf1 y Yap1 (Lee *et al.*, 1999; Raitt *et al.*, 2000); con factores de transcripción que regulan el ciclo celular (como Mbd1); y con factores de transcripción involucrados en la respuesta a calcio (Crz1). También se ha reportado que interactúa con la GTPasa Rho1 (Li *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2005).



**FIGURA 4:** Comparación de las secuencias de *HSF1* y *SKN7*. Tomado de Lee *et al.* 1999.

Skn7 presenta dos tipos de actividad, una dependiente de la fosforilación de su aspartato conservado (D427), y una independiente de ésta. Skn7 fosforilado en D427, induce genes de respuesta al estrés osmótico (como *OCH1* que codifica a la  $\alpha$ -1,6 manosiltransferasa). Su actividad independiente de la fosforilación en D427 permite la inducción de genes de respuesta al estrés oxidativo a través de elementos *HSE* (como en *TRX2* que codifica para tierrodoxina o en *SSA1* que codifica para una Hsp70) (Raitt *et al.*, 2000).

## II.- ANTECEDENTES

---

El interés general de este proyecto es la elucidación del mecanismo y la caracterización de los genes que confieren termotolerancia intrínseca durante la fase de crecimiento exponencial (entre 0.4 y 0.6 de OD<sub>600</sub>) de *Saccharomyces cerevisiae*. Para este propósito se mutagenizó la cepa silvestre W303-a de donde se aislaron mutantes con una termotolerancia intrínseca (20 minutos a 50°C) elevada. La caracterización de dos mutantes (SciBT2 y SciBT3), reveló que en ambos casos el gen *CDC25* está afectado y como se mencionó antes, codifica al factor intercambiador de nucleótidos de guanina de las proteínas Ras.

A las nuevas mutantes en las cepas SciBT2 y SciBT3 se les ha designado *cdc25-21* y *cdc25-22*, respectivamente. El alelo *cdc25-22* se creó por una mutación puntual en la posición 4088 del dominio catalítico, en donde un cambio de adenina por citosina codifica para prolina en lugar de histidina. El alelo *cdc25-21* presenta una delección de adenina en la posición 2926 resultando en el cambio del marco de lectura de la proteína con la formación de un codón de paro; el resultado es una proteína truncada de sólo 977 aa fusionada a 12 aminoácidos no nativos en su extremo carboxilo terminal. La termotolerancia intrínseca de las mutantes *cdc25-1* y *cdc25-22* es de entre el 60 y el 90%, que es miles de veces mas alta que en las cepas silvestres, donde sobrevive aproximadamente un 0.01% de la población. Se ha confirmado que ésto se debe a la expresión constitutiva de genes de estrés (como *HSP104*, *CTT1*), entre otras características (Folch-Mallol *et al.*, 2004). También se ha determinado que estas mutantes tienen un tiempo de duplicación dos veces mayor (5 horas), con respecto a la cepa silvestre, debido a una fase G1 muy extendida, dando como resultado la formación de colonias muy pequeñas.

La alta termotolerancia de ambas las mutantes *cdc25-21* y *cdc25-22* y de la cepa carente de  $\Delta cdc25$  se debe, parcialmente, a una actividad elevada

de los factores de transcripción responsables de la respuesta al calor (Msn2/Msn4, y Yap1), debido a la baja actividad de la vía Ras-PKA (datos no publicados).

Engelberg *et al.* (2004), han propuesto que la actividad de Hsf1 en respuesta a los choques calóricos es independiente de la actividad de la vía Ras-PKA, ya que observaron que el nivel de fosforilación de Hsf1 y su capacidad de unión a elementos *HSE* no se ven afectados en mutantes que aumentan (tales como *RAS2<sup>val19</sup>* y *bcy1*) o reducen (como *cyr1*) la actividad de la vía. Tampoco la expresión del gen reportero *HSE-CYC1-lacZ* que se usó en ese trabajo se afectó en las mutantes *RAS2<sup>val19</sup>* y *bcy1* que hiperactivan la vía. En contraste, nosotros hemos observado que la expresión genética mediada por *HSE* se encuentra elevada en las células con los alelos *cdc25-21* y *cdc25-22*, a 25°C y que aumenta 3.2 veces a 39°C en una hora, con respecto a la cepa silvestre (datos no publicados). Esto se observó en ensayos en los que se midió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, a partir de una construcción en la que el gen reportero *CYC-lacZ* está fusionado a elementos *HSE* en tándem localizados inmediatamente río arriba de *CYC1-LacZ*.

### III.- HIPÓTESIS

---

La expresión constitutiva de genes dependientes de *HSE* es regulada negativamente por Cdc25, posiblemente a través de la vía de Ras-PKA.

### IV.- OBJETIVOS

---

#### 1.Objetivo General:

Determinar si el papel de *CDC25*, en la regulación de la tolerancia al estrés mediada por elementos *HSE*, es dependiente de los factores de transcripción Hsf1 y/o Skn7.

#### 2.Objetivos Particulares:

- Para determinar la participación de los factores transcripcionales Skn7 y/o Hsf1 en la alta tolerancia a calor de las mutantes que carecen de Cdc25, se generaran cepas dobles mutantes  $\Delta skn7 \Delta cdc25$  y  $hsf1\Delta CTA \Delta cdc25$ .
- Una vez obtenida las dobles mutantes de interés, se determinarán algunas de sus características fenotípicas como: el tiempo de duplicación y tolerancia al estrés por calor y estrés oxidativo de estas cepas.
- Para determinar la contribución de cada uno de los factores transcripción Skn7 o Hsf1 en la expresión mediada por *HSE*, se medira en las dobles mutantes arriba mencionadas, que contienen la construcción *HSE-lacZ*, los niveles de actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

- Determinar si la regulación por estos dos factores de transcripción ocurre a través de la vía Cdc25/Ras-PKA, utilizando cepas mutantes en otros componentes de esta cascada (por ejemplo *RAS2*, *CYR1*, *TPK1*, *TPK2*, *TPK3*, *BCY1*).

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Cepas

Cepa	Genotipo	Referencia
W303-6B	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1</i>	R. Gaxiola
W303-1A	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1</i>	
SE1000	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 Δskn7::KanMX6</i>	Este estudio
JF3005	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 Δcdc25::loxP-kanMX-loxP</i>	Folch-Mallol
SL5001	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 Δcdc25::loxP-kanMX-loxP</i>	Este estudio
CM033	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 Δsdc25::KanMX6</i>	Este estudio
LM020	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 hsf1-ΔCTA::KanMX6</i>	Este estudio
SL6001	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δcdc25::loxP-loxP hsfΔCTA::KanMX6</i>	Estruch F.
YMR60	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk1::URA3</i>	Thevelein J
YMR62	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk2::HIS3</i>	Thevelein J
YMR64	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk3::TRP1</i>	Thevelein J
YMR68	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk2::HIS3, Δtpk3::TRP1</i>	Thevelein J
YMR70	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk1::URA3 Δtpk2::HIS3</i>	Thevelein J
YMR71	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk1::URA3 Δtpk3::TRP1</i>	Thevelein J
YMR60a	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk1::ura3::ADE2</i>	Este estudio
YMR70a	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk1::ura3::ADE2 Δtpk2::HIS3</i>	Este estudio
YMR71a	<i>MAT a can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 Δtpk1::ura3::ADE2 Δtpk3::TRP1</i>	Este estudio
AF002	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 ura3-1 Δskn7::KanMX6 Δcdc25::loxP-kanMX-loxP</i>	
SL4001	<i>MAT α can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3, 112 ura3-1 Δskn7::KanMX6 Δcdc25::loxP-kanMX-loxP</i>	Este estudio
AW3/RAS+	<i>MAT α leu2 arg1 ura3 trp1 HSE-LEU2-LacZ</i>	Nierlich H.
AW3/ras2-	<i>MAT α leu2 arg1 ura3 trp1 Δras2::LEU2 HSE-LEU2-lacZ</i>	Nierlich H.
HE61-6C	<i>MAT a his3-d1 leu2-3, 112 trp1-289 ura3-52 gal</i>	Iida H.
HE61-4B	<i>MAT a his3-d1 leu2-3, 112 trp1-289 ura3-52 gal hsr1</i>	Iida H.
KT1112	<i>MAT a leu2 his3 ura3-32</i>	Tatchell K
KT2249	<i>MAT a leu2 his3 ura3-32 Δras2 ::LEU2</i>	Tatchell K

**TABLA 1.** Cepas utilizadas en este estudio

## 2.Plásmidos.

Se uso la cepa DH5- $\alpha$  de *Escherichia coli* para propagar los plásmidos utilizados y enlistados en la siguiente tabla.

Plásmido	Función	Fuente
pRY016	Permite medir la actividad de $\beta$ -galactosidasa dependiente de <i>HSE</i>	Este estudio
MR499	Permite cambiar el marcador de selección nutricional <i>URA3</i> por <i>ADE2</i> .	Voth <i>et al.</i> 2003
p18/7	Permite medir la actividad de $\beta$ -galactosidasa dependiente de <i>STRE</i> (plásmido integrativo)	Marchler <i>et al.</i> 1997
pFA6a-KanMX	Permite remover los genes con el marcador de selección para resistencia a derivados de la kanamicina (geneticina)	Longtine, <i>et al.</i> 1998

**TABLA 3:** Plásmidos utilizados en este estudio.

## 3.Secuenciación del Plásmido pRY016

Cuando se construyó el plásmido pRY016 no se determinó la cantidad de elementos *HSE* ni el arreglo en el cual éstos se encontraban alineados dentro del promotor del gen reportero *lacZ*, por lo que se secuenciaron tanto el plásmido pRY016 como el pLG $\Delta$ BS (del cual deriva pRY016). La secuencia se obtuvo en la Unidad de Síntesis del IBT utilizando los oligos PHF01 y PHR02 (10 pmol/100  $\mu$ l de reacción).

Para los ensayos *in vivo* se transformaron las distintas cepas de levadura (500 ng) con el plásmido pRY016. Las células fueron seleccionadas por su crecimiento en MM sin uracilo.

## 4.Medios de Cultivo:

### 4.1.Medio YPDA líquido:

Extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2%, glucosa 0.2% y sulfato de adenina 40 mg/l.

#### **4.2. Medio mínimo líquido (MM):**

Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos 0.67%, dextrosa 2%, más requerimientos de auxotrofias: aminoácidos (L-triptofano 2 mg/l, L-histidina 20 mg/l, L-leucina 3 mg/l) y nucleótidos (sulfato de adenina 40 mg/l, uracilo 20 mg/l).

#### **4.3. Medio de esporulación:**

Acetato de potasio 1% y agar 2%.

#### **4.4. Medio mínimo líquido de Acetato de potasio:**

Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos 0.67%, acetato de potasio 1%, más requerimientos de auxotrofias.

#### **4.5. Medio mínimo líquido Galactosa:**

Base nitrogenada para levadura sin aminoácidos 0.67%, galactosa 2%, más requerimientos de auxotrofias.

#### **4.6. Medios sólidos:**

Cuando fue necesario tanto al MM como al medio YPDA se les agregó como sustancia solidificante agar bacteriológico Difco 2%, (Guthrie et al., 1991; Casas 1998).

### **5. Condiciones de Crecimiento:**

Todos los cultivos se incubaron a 25°C. En el caso de los cultivos líquidos se mantuvieron en agitación a 250 rpm.

### **6. Ensayos de Tolerancia a Diferentes Tipos de Estrés.**

Se obtuvieron cultivos en fase exponencial para analizar la tolerancia de las distintas cepas de levadura a diferentes condiciones de estrés. Se prepararon pre-cultivos líquidos en MM con los requerimientos auxotróficos

específicos de cada cepa a partir de una colonia fresca (no más de una semana desde la última resiembra) y, se incubaron durante 12 h en las condiciones de crecimiento arriba establecidas. A partir de estos cultivos se inocularon 25 ml de medio de cultivo fresco a una  $DO_{600nm}$  de 0.05 y se incubaron hasta una  $D.O_{600nm}$  entre 0.4 - 0.5. Los cultivos en fase logarítmica de todos los ensayos fueron obtenidos de esta manera, a menos que se indique lo contrario.

### **6.1. Termotolerancia basal:**

Para calcular el número de UFC/ml antes del tratamiento, se sembraron por duplicado 100  $\mu$ l de una dilución  $10^{-4}$  de células en medio YPDA y se incubaron a 25°C hasta la aparición de las colonias (entre 30 y 300 colonias, durante 2 a 4 días, dependiendo de la cepa). Para el tratamiento de choque térmico se tomaron 4 ml del mismo cultivo, y se incubaron a 50°C por 20 minutos. Dependiendo del nivel de termotolerancia se sembraron en medio YPDA 100  $\mu$ l de las diluciones adecuadas (desde  $10^0$  hasta  $10^{-4}$ ) de suspensión celular y se incubaron a 25°C hasta la aparición de las colonias. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia después del choque térmico con respecto a las UFC/ml del control no tratado (Nicolet and Craig, 1991).

### **6.2. Termotolerancia inducida.**

Se calculó el número de UFC/ml del control no tratado como se mencionó antes. Para la inducción de la tolerancia al choque calórico se tomaron 4 ml del mismo cultivo, y se incubaron a 39°C durante 1 h. Al cabo de este tiempo se expusieron los cultivos a 50°C por 20 min. Dependiendo del nivel de termotolerancia se plaquearon 100  $\mu$ l de las diluciones adecuadas en YPDA y se incubaron a 25°C hasta la aparición de las colonias. El porcentaje de sobrevivencia se calcula como se indicó arriba (Nicolet and Craig, 1991).

### **6.3. Ensayo de resistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Se calculó el número de UFC/ml antes del tratamiento como se explicó. Para el tratamiento, a 4 ml del mismo cultivo se le agregó 4µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10M (quedando a una concentración de 10 mM) y se incubó a 25°C durante 1 h. Dependiendo del nivel de resistencia se sembraron 100 µl de las diluciones adecuadas en YPDA y se incubó a 25°C hasta la aparición de las colonias.

Para el ensayo de goteo en cajas, las células se crecieron hasta alcanzar la fase exponencial media ( $2 \times 10^6$  células por ml ó 0.4 UDO<sub>600 nm</sub>); entonces, las células se diluyeron a 0.2 UDO y, posteriormente se sembraron diluciones seriadas (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ ) en cajas con medio YPDA que contenían distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (20 y 30 mM final). Se incubaron durante 72 h a 25 °C.

### **6.4. Crecimiento en Higromicina.**

Para el ensayo en caja, las células se crecieron hasta alcanzar la fase exponencial media ( $2 \times 10^6$  células por ml ó 0.4 UDO<sub>600 nm</sub>), en ese punto se diluyeron a 0.2 UDO y, posteriormente se sembraron diluciones seriadas (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$ ) en cajas con medio YPDA que contenían higromicina (70 µg/ml). Se incubaron durante 72 horas a 25 °C.

### **7. Transformación de *S. cerevisiae* Por el Método de Acetato de Litio.**

Se obtuvieron cultivos en fase exponencial, en esta fase los cultivos se centrifugaron a 2,000 rpm en tubos “falcon” y se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó una vez con 1 ml de solución TE-LiAc 1X (recién preparada, a partir de TE 10X (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.01 M pH 7.5) y LiAc 10X (LiAc 1 M a pH 7.5 ajustado con ácido acético)) y se centrifugó a 13,000 r.p.m. Las células se resuspendieron en un volumen de TE-LiAc 1X (aproximadamente 100 µl). Se tomaron 50 µl de la suspensión celular, se agregaron 10 ng/µl de DNA de esperma de salmón desnaturalizado, 1–2 µg

del producto de PCR ó 100 a 500 ng del plásmido a transformar, 300 µl de PEG 3,350 40% en TE-LiAc 1X (preparado al instante). Se mezcló y se incubó durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente esta mezcla se incubó a 42°C por 15 minutos, se centrifugó a 13,000 r.p.m., se lavó una vez con TE 1X y se resuspendió en 100 µl de agua. Las células se siembran en el medio de selección para las transformantes y se incubaron a 25°C hasta la aparición de colonias. En el caso de que la transformación fuera integrativa en el cromosoma de la levadura, se sembraron las células primero en YPDA y, después de 24 h se replicaron en el medio de selección (Schiestl and Gietz, 1989;Gietz and Schiestl, 1991).

### **8.Determinación de la Actividad Específica de $\beta$ -Galactosidasa.**

Se obtuvieron cultivos en fase exponencial. A un cultivo de 5 ml se le sometió a un choque de 39°C por una hora. Al cabo de este tiempo se incubó nuevamente a 25°C, durante una hora más para permitir la producción de la enzima. El resto del cultivo (que sirvió como control no tratado) se conservó a 25°C por 2 h. Al cabo de este tiempo, se colectaron 5 ml y se centrifugaron a 2,500 rpm por 3 minutos a 4°C, posteriormente, las células obtenidas fueron resuspendidas en 100 µl de buffer de lisis (ditiotretitol 1 mM, glicerol 20%, Tris-HCl 100 mM pH 8). Esta suspensión se congeló a -70°C hasta el momento de analizar las muestras (Rose and Botstein, 1983).

#### **8.1.Ensayo colorimétrico de $\beta$ -galactosidasa.**

Para realizar el ensayo colorimétrico, las células obtenidas en el punto anterior se descongelaron en hielo y se les agregaron perlas de vidrio (0.45 a 0.5 mm de diámetro) justo debajo del menisco formado por el líquido. Como inhibidor de proteasas se usaron 12.5 µl de PMSF (40 mM en isopropanol al 100%). Las muestras se lisaron agitando vigorosamente durante intervalos de 15 s hasta completar 5 min, enfriándolas en hielo. Inmediatamente después de la ruptura de las células se adicionaron 100 µl de buffer de lisis. Para cada muestra obtenida se utilizaron 25 µl del extracto y se ajustaron a 1 ml con buffer Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 40 mM, KCl 10 mM,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, pH 7.0). Se dejaron reposar las muestras 5 min a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se inició por la adición de 200 µl de ONPG (orto-nitro-fenol-galactósido, 4 mg/ml en buffer Z pH 7.0) a cada tubo y una vez desarrollado el color, se finalizó agregando 500 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M. Se registraron los tiempos en los que las reacciones fueron iniciadas y concluidas. Para clarificar las muestras de restos celulares, éstas se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 min. La absorbancia de los sobrenadantes se determinó a 420 nm, y la actividad específica se reporta como ng de ONPG oxidado por minuto por mg de proteína de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{(D.O_{420 \text{ nm}}) (1.7)}{(0.0045) (\text{concentración de proteína}) (\text{volumen del extracto}) (\text{tiempo})}$$

En donde:

D.O.<sub>420 nm</sub> es la densidad óptica del producto *o*-nitrofenol a esta longitud de onda,

1.7 es el factor de corrección del volumen de reacción,

0.0045 es la densidad óptica de 1 nmol/ml de solución *o*-nitrofenol, la concentración de proteína se expresa en mg/ml y el tiempo en minutos.

### ***8.2.Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford:***

Para cuantificar con mayor precisión la actividad de β-galactosidasa fue necesario determinar la concentración de proteínas en cada muestra. La curva estándar se preparó a partir de una solución de proteína, BSA (albúmina sérica bovina) 0.5 mg/ml, utilizando muestras por duplicado de diluciones conteniendo 2.5, 5 y 10 µg de BSA, las cuales se aforaron a 100 µl con NaCl (0.15N). El rango lineal del ensayo para BSA está entre 1 a 10 µg/ml. Se agregó a cada tubo 1 ml del reactivo Bradford Reagent (AMRESCO. No. Catalogo E530) concentrado, se agitó vigorosamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de la proteína en las muestras, se

diluyeron alícuotas de entre 2 y 10  $\mu\text{l}$  hasta 100  $\mu\text{l}$  con NaCl, se agregó el reactivo de Bradford y se determinó la absorbancia a 595 nm. Usando la curva estándar como referencia se determinó la concentración de cada muestra desconocida.

### **9.PCR a partir de Colonia de Levaduras.**

Se tomó una pequeña muestra de la colonia para analizar, depositándola directamente en el tubo para PCR. Posteriormente se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de Zimoliasa<sup>R</sup> (10 mg/ml) para degradar la pared celular, y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 30 seg a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se hirvió el botón de células durante 5 min a 95°C. Este extracto se mantuvo en hielo hasta la adición de la mezcla de reacción de PCR (25  $\mu\text{l}$ ).

### **10.Inducción de la esporulación y micromanipulación.**

Para inducir la esporulación, las células diploides se sembraron en parche en una caja con YPDA. Al transcurrir 24 h de crecimiento a 25°C, este parche se replicó en medio para esporulación (KAc). Se incubó la caja durante varios días (entre 3 y 7) a 25°C, dependiendo de la producción de tétradas por cada cepa. Al observarse al menos 50% de tétradas, se tomó una asada del parche y se incubó con 50  $\mu\text{g}$  de Zymoliasa durante 10 min a temperatura ambiente. Esta suspensión fue después diluida con 1 ml de H<sub>2</sub>O estéril para inocularse en una caja de YPDA para la disección de tétradas. Se utilizó un equipo de micromanipulación Nikon Eclipse E400 para disectar las cuatro esporas hermanas de la tétrada. Para los análisis de segregación de los marcadores de resistencia a G418 y auxotróficos se replicaron las colonias formadas por las esporas disectadas en los medios correspondientes.

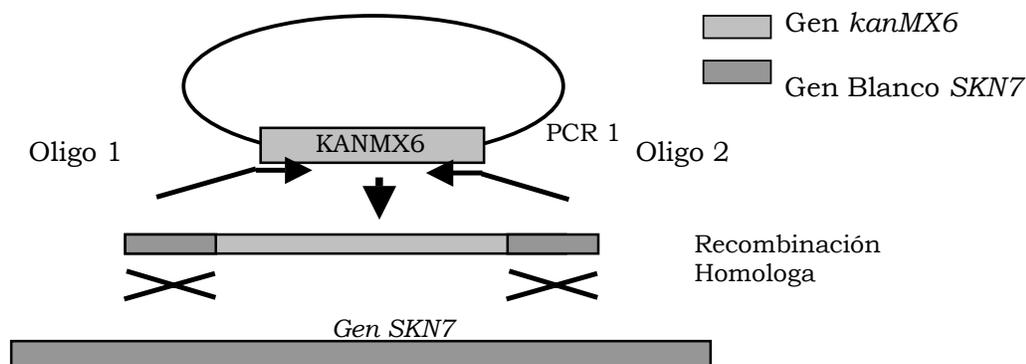
# VI.- GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES DE LEVADURA

---

---

## 1. Obtención de una cepa sin el Gen *SKN7*:

Está establecido que Skn7 participa en la regulación de distintos genes de respuesta al estrés. Algunos de estos coinciden en contener elementos-*cis* *HSE* en sus promotores. Por esta razón se decidió evaluar la participación de Skn7 en la elevada actividad del gen reportero controlado por *HSE*. Para este propósito se realizó la delección de gen *SKN7* mediante el protocolo descrito por Longtine *et al.* (1998), en el cual un segmento de DNA conteniendo el gen responsable de la resistencia a geneticina reemplaza al gen de interés (en este caso *SKN7*) mediante recombinación homóloga. De esta manera las modificaciones se realizan directamente en el genoma de la levadura generando una mutación estable. Para generar el fragmento para la transformación se realizó un PCR que amplifica el cassette de resistencia a partir del plásmido pFA6a-kanMX6, utilizando oligos que contienen además 40 pb de la secuencia correspondiente a las 3' y 5' *UTR* de *SKN7*. Estas secuencias homólogas permiten que la maquinaria celular se encargue de la recombinación del fragmento de manera dirigida al sitio de interés (figura 5). Las secuencias de los oligos utilizados para eliminar *SKN7* son: oligo sentido SPL01a (5'-CCACCATAAATAGCAACGTCAATAAAAACCACCGGCGATAGcggatccccgggtaattaa-3') y oligo reverso SPL02a (5'-TCTCTAGTGTTGAGATAGCTGAAAGACCGTCGCTGACAACgaattcagctcgtttaaac-3'), en las que las bases en minúsculas corresponden a la secuencia del plásmido pFA6a-kanMX6 y las bases en mayúsculas corresponden a la secuencia del gen *SKN7*. El producto de PCR que se espera es de 1559 pb.



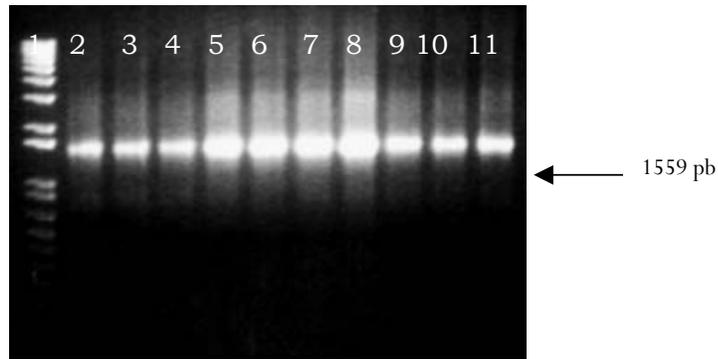
**FIGURA 5:** Representación de la estrategia a seguir para la eliminación de genes, por el método descrito por Longtine *et al.*, 1998.

Las condiciones de reacción de PCR fueron:

- 2  $\mu$ l Oligo SPL1a (10 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l Oligo SPL2a (10 pmol/ $\mu$ l)
- 20  $\mu$ l Buffer de reacción 10X
- 5  $\mu$ l dNTP's 10 mmol/ $\mu$ l (100 nM dNTP Set, PCR Grade. Invitrogen life Technologies. Cat. No. 10947-018)
- 1.25  $\mu$ l *Taq* DNA Polimerasa, Recombinate 5 U/ $\mu$ l (Invitrogen life Technologies. Cat No. 11615-010)
- H<sub>2</sub>O c.b.p. 200  $\mu$ l

La reacción anterior se llevó acabo a diferentes temperaturas, para encontrar la temperatura óptima de amplificación (figura 6). Se utilizó el siguiente programa de PCR para está reacción, que se repite durante 35 ciclos.

Temperatura (°C)	94	94	54.1-60	72	72	4
Tiempo (seg)	300	60	190	60	600	$\infty$

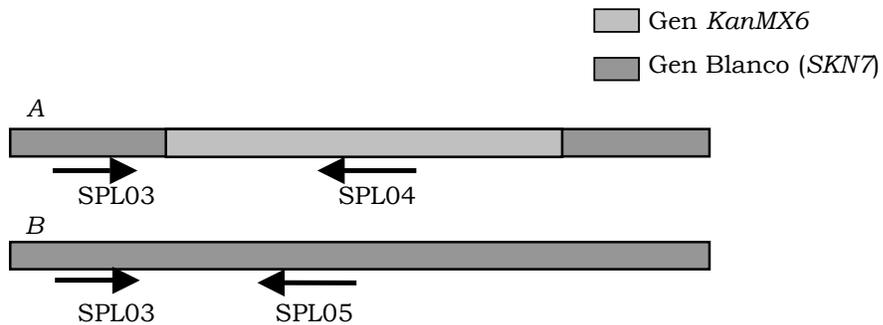


**FIGURA 6:** PCR con gradiente de temperaturas para obtener el fragmento con el cual reemplazar *SKN7*. Carriles: 1.- 1 Kb plus, 2.- 54.1 °C, 3.- 54.4 °C, 4.- 55 °C, 5.- 55.7 °C, 6.- 56.4 °C, 7.- 57.3 °C, 8.- 58.4 °C, 9.- 58.9 °C, 10.- 59.5 °C y 11.- 60 °C.

En todas las temperaturas de reacción analizadas se obtuvo el fragmento del tamaño esperado (1559 pb). Sin embargo, debido a que la integración de fragmentos de PCR en el cromosoma celular requiere de una alta concentración de producto de PCR, se decidió repetir la reacción a 58.4°C, de la cual, a pesar de producir un barrido, se obtiene una mayor cantidad de producto específico. Para purificar la banda de interés del barrido se utilizó un paquete comercial (*Kit High Pure PCR Product Purification* Roche cat. No. 1 732 668). Al menos, 1 µgr del producto de PCR fue transformado en la cepa W303-6b.

Las colonias en las que ocurrieron eventos de recombinación se seleccionaron por su resistencia a G418 (300 µg/ml –GENETICIN®. GIBCO, Invitrogen Corporation. Cat. No. 11811) dada por el cassette *kanMX6*. Para confirmar la eliminación del gen con *kanMX6* fuese la apropiada, se realizó una segunda reacción de PCR (figura 7). Esta reacción permitió identificar colonias falsas positivas, en las que a pesar de ser resistentes a la geneticina, la integración hubiese ocurrido en algún otro lugar del genoma, es decir (figura 7 y 8). Se utilizaron oligos específicos para el gen *SKN7* -- oligo sentido SPL03 (5'-GGTCACCTTACTATCTTCCA-3') y oligo reverso SPL04 (5'-ACTGCGTCATC TTCCACCAA-3')— que generaría un producto de 1381 pb cuando *SKN7* se encuentra en su forma silvestre (figura 7). Por el contrario, con los oligos sentido SPL03 y reverso SPL05 (5'-GATGGTCGG AGAGCATAA-3' --que es específico para el gen *kanMX6*--) se esperaba

amplificar un producto de 945 pb el cual confirmó en qué células *SKN7* fue eliminado correctamente.



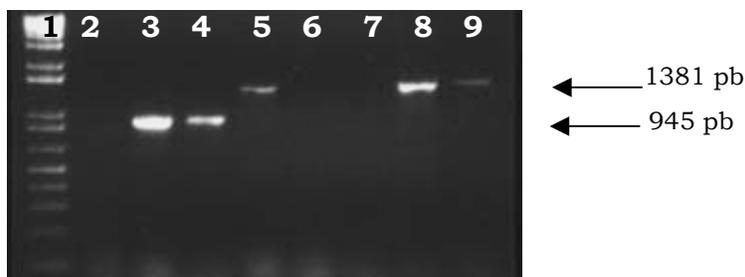
**FIGURA 7:** Esquema de la estrategia a seguir para confirmar la correcta eliminación de *SKN7*. **A)** Oligos utilizados para confirmar la eliminación de *SKN7*. **B)** Oligos utilizados que amplifican al gen *SKN7* silvestre.

Reacción general:

2  $\mu$ l Oligo SPL03 (10 pmol/ $\mu$ l)  
 2  $\mu$ l Oligo SPL04 (10 pmol/ $\mu$ l)  
 2  $\mu$ l Oligo SPL05 (10 pmol/ $\mu$ l)  
 20  $\mu$ l Buffer de reacción 10x sin  $Mg^{++}$   
 5  $\mu$ l dNTP'S 10 mmol/ $\mu$ l  
 1.25  $\mu$ l *Taq pol 2* U/ $\mu$ l  
 6  $\mu$ l  $MgCl_2$  (50 mM/ $\mu$ l)  
 H<sub>2</sub>O c.b.p. 200  $\mu$ l

Se adicionaron 20  $\mu$ l de la reacción anterior a cada colonia candidata (figura 8). Se utilizó el siguiente programa de PCR para la reacción, durante 30 ciclos.

Temperatura (°C)	94	94	52	72	72	4
Tiempo (seg)	300	60	60	60	600	$\infty$



**FIGURA 8.** PCR de colonia para confirmar la eliminación del gen *SKN7* (945 pb) y la presencia del gen silvestre (1381 pb). Carril 1 muestra el marcador de peso molecular 1 Kb plus; carriles 2-8 candidatas a mutantes; carril 9 control silvestre (W303-6B).

De la figura anterior se aisló la candidata del carril número 3, debido a que presenta el tamaño de 945 pb que indica el correcto reemplazo de *SKN7*. Mientras las candidatas mostradas en los carriles 5 y 8 dan un producto igual al tamaño del carril 9, el cual es la cepa silvestre W303-6b. Por lo tanto se seleccionó esa colonia y se le asignó el nombre de SE1000 (ver tabla 1).

## **2.Delección del Carboxilo Terminal de Hsf1.**

Se ha reportado que Hsf1 contiene diferentes dominios (figura 3), que regulan de formas distintas su activación o inactivación. Mientras que el dominio N-terminal regula la respuesta a choque de calor intenso (50°C), el dominio C-terminal regula el crecimiento sostenido a temperaturas moderadas (39°C). Por este motivo, para evaluar el papel de Hsf1, en la termotolerancia elevada de la cepa  $\Delta cdc25$  se decidió generar una cepa carente del dominio C-terminal, ya que obtener una cepa carente de Hsf1 no es posible (se detalla más adelante). Para la eliminación del extremo carboxilo terminal de Hsf1 se transformó la cepa W303-6B con el producto de PCR, específico para el dominio *CTA* (residuos 584 - 833), utilizando el método descrito arriba. Se usó como templado al plásmido pFA6a-kanMX6 y, los oligos específicos para el reemplazo fueron: oligo sentido FCDHSF1 (5'-GATGACGAAGAAGAAGAAGAAACGGATTTTAGGTAAGTAGcggatccccgggtaattaa-3' (las bases en minúsculas corresponden al plásmido pFA6a-kanMX6 y las bases en mayúsculas corresponde a la secuencia de *HSF1*) y oligo

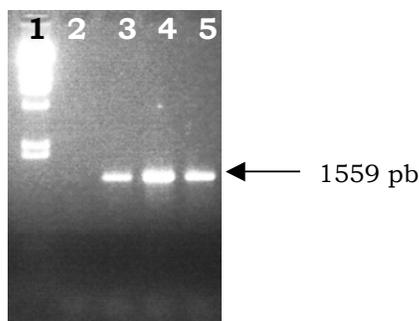
reverso RCDHSF1 (5´-ATGACCTTGCCCTGTGTACTATTTCTTAGCTCGTTTGG GCgaattcgagctcgtttaaac-3´).

Reacción general:

2.5 µl Oligo FDCHSF1 (10 pmol/µl)  
2.5 µl Oligo RDCHSF1 (10 pmol/µl)  
10 µl Buffer de reacción 10x sin Mg<sup>++</sup>  
2.5 µl dNTP's 10 mmol/µl  
0.32 µl *Taq pol 2* U/µl  
X µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM/µl)  
0.833 µl del plásmido pFA6a-KanMX6 40 ng/µl  
H<sub>2</sub>O c.b.p. 100 µl

Se tomaron 20 µl de la anterior mezcla de reacción y se analizaron 5 diferentes concentraciones de cloruro de magnesio (figura 9). Programa de reacción de PCR, durante 30 ciclos.

Temperatura (°C)	94	94	48	72	72	4
Tiempo (seg)	120	60	150	60	600	∞



**FIGURA 9:** PCR para obtener el fragmento con el cual se eliminara el dominio carboxilo terminal de Hsf1. Donde se analizaron 4 concentraciones de Mg<sup>++</sup>: 1.- λHind III 2.- 1.45, 3.- 1.9, 4.- 3.8 y 5.- 4.5 (en mM).

Esta reacción requirió de 3.8 mM de MgCl<sub>2</sub>. De este experimento se dedujo que para obtener mayor cantidad del producto se requería de 3.8 mM de MgCl<sub>2</sub>. Fue de esta condición que se obtuvo el producto de interés, el cual se purificó por GENE-CLEAN.

Una vez que las cepas de levadura fueron transformadas con este producto de PCR, se realizó un segundo PCR confirmatorio con las colonias que crecieron en presencia de geneticina. La obtención de un producto de

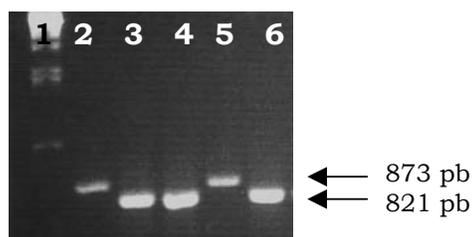
873 pb indicó la integración del gen *KanMX* en el extremo correspondiente al carboxilo terminal de *HSF1*, utilizando como oligo sentido FCDHSF1 (5'-GCCAACAATCTCAGCAATTACA-3') y como reverso SPL05. LA obtención de un producto de 821 pb indicó que había ocurrido una integración en algún otro sitio del cromosoma, utilizando el oligo sentido FCDHSF1 y el reverso RCDHSF1 (5'-GAATAACTGTGGTCATTAAAGC-3').

Reacción general:

10  $\mu$ l Oligo FCDHSF1 (10 pmol/ $\mu$ l)  
 10  $\mu$ l Oligo RCDHSF1 (10 pmol/ $\mu$ l)  
 10  $\mu$ l Oligo SPL05 (10 pmol/ $\mu$ l)  
 50  $\mu$ l Buffer de reacción 10x sin Mg<sup>++</sup>  
 12.5  $\mu$ l dNTP'S 10 mmol/ $\mu$ l  
 3  $\mu$ l *Taq pol* 5 U/ $\mu$ l  
 15  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM/ $\mu$ l)  
 H<sub>2</sub>O c.b.p. 500  $\mu$ l

Se adicionaron 25  $\mu$ l de mezcla de reacción de PCR para cada colonia candidata (figura 10). Se utilizó el siguiente programa de PCR para está reacción, durante 30 ciclos.

Temperatura (°C)	94	94	55	72	72	4
Tiempo (seg)	300	45	60	60	600	$\infty$



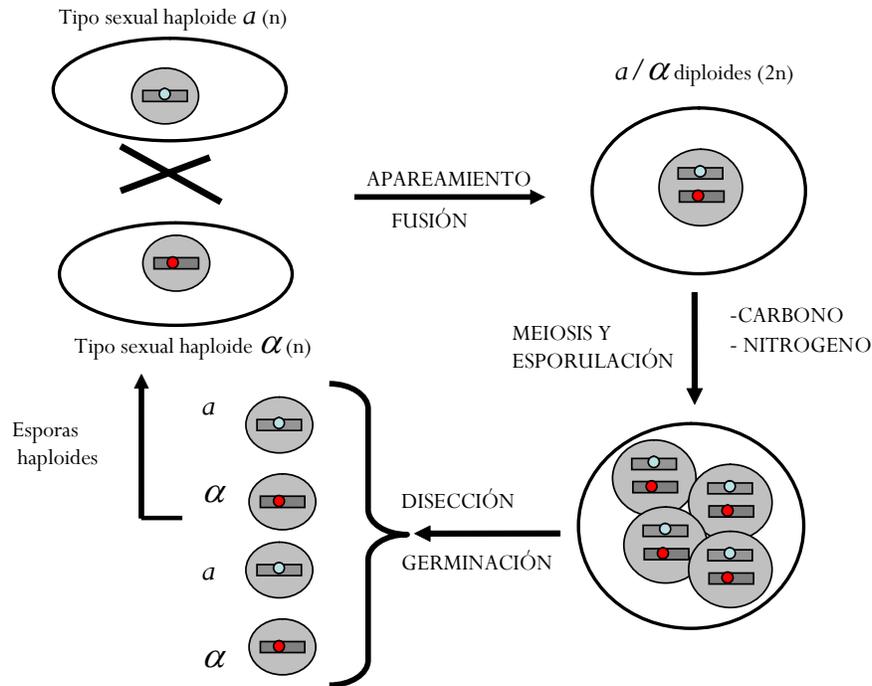
**FIGURA 10.** PCR de colonia para confirmar la eliminación del carboxilo terminal de *HSF1* (873pb). En algunas colonias no ocurrió este evento y, por tato presentan el producto silvestre de 821 pb.

En los carriles número 2 y 5 se observó una banda del tamaño esperado cuando el reemplazo del dominio carboxilo terminal de *HSF1* ocurrió correctamente. Mientras que en los carriles número 3 y 4 se observó una banda con el tamaño que indica que en esta colonia se llevó a cabo la

inserción del producto en otro lugar del genoma ya que se observa un producto correspondiente al gen silvestre. En el carril número 6 se observa el tamaño de 821 pb, que corresponde a una cepa silvestre. Por lo tanto se aisló la colonia del carril número 2 y se le asignó el nombre de LM020.

### **3. Generación de dobles mutantes por recombinación meiótica.**

*S. cerevisiae* posee dos tipos sexuales: **a** y **α**, determinados por un par de alelos heterocigotos: *MATa* y *MATα*. Si se cultiva una mezcla de dos cepas haploides en las que una de las dos cepas sea *MATa* y la otra *MATα*, se formarán células diploides *MATa/MATα*. La completa ausencia de nitrógeno y la presencia de fuentes de carbono no fermentables como acetato causan que las levaduras diploides salgan del ciclo mitótico, entren a meiosis y comiencen a esporular. Durante la esporulación (figura 11) la célula diploide se divide por meiosis, resultando en la formación de cuatro productos haploides que quedan incluidos dentro de una bolsa denominada asca. Aprovechando esta formación de esporas por parte de *S. cerevisiae* y, de que éstas quedan contenidas en el asca, es posible micromanipularlas y disectarlas en un medio sólido, en donde cada una formará una colonia que después puede analizarse por los métodos comunes.



**FIGURA 11:** Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*: Esporulación. Cuando se aparean células haploides de diferente tipo sexual, se obtienen células diploides. Estas pueden dividirse mitótica o meióticamente, en el último caso se obtienen cuatro esporas haploides. El gen que determina el tipo sexual (*MAT<sub>a</sub>* o *MAT<sub>α</sub>*) segrega 2:2, es decir se producen dos esporas a y dos esporas α.

A continuación se muestra como se obtuvo la cepa haploide correspondiente a la doble mutante  $\Delta skn7\Delta cdc25$ .

Haploides por cruzar: SE1001: *MAT<sub>a</sub> Δskn7::kanMX6* y SL5001: *MAT<sub>α</sub> Δcdc25::loxP::kanMX4-loxP*, de la cual se generó la cepa diploide: SE2002: *MAT<sub>a</sub>/MAT<sub>α</sub> SKN7/Δskn7::kanMX6 CDC25/Δcdc25::loxP-kanMX4-loxP*.

En las esporas hermanas que se formaron durante la meiosis, la segregación de los genes debida a la recombinación al azar, resulta en las siguientes combinaciones (tabla 4):

Caso	Genotipo	Resistencia a G418	Cepa	Tamaño colonia
A)	<i>CDC25 Δskn7::kanMX6</i>	+	ms	G
	<i>Δcdc25::kanMX4 SKN7</i>	+	ms	Ch
	<i>SKN7 Δcdc25::kanMX</i>	+	ms	Ch
	<i>Δskn7::kanMX CDC25</i>	+	ms	G
B)	<i>CDC25 SKN7</i>	-	wt	G
	<i>CDC25 Δskn7::kanMX</i>	+	ms	G
	<i>SKN7 Δcdc25::kanMX</i>	+	ms	Ch
	<i>Δskn7::kanMX</i>	+	Dm	?
	<i>Δcdc25::kanMX</i>			
C)	<i>CDC25 SKN7</i>	-	wt	G
	<i>CDC25 SKN7</i>	-	wt	G
	<i>Δskn7::kanMX</i>	+	dm	?
	<i>Δcdc25::kanMX</i>			
	<i>Δskn7::kanMX</i>	+	dm	?
	<i>Δcdc25::kanMX</i>			

**Tabla 4:** Posibles segregaciones del fenotipo y genotipo de la cepa diploide SE2002. Donde, ms = mutante sencilla; dm = doble mutante; ch = chica; g = grande; ¿ = tamaño desconocido.

De las posibles segregaciones mostradas en la tabla 4, nos interesan primordialmente el caso C ya que las tétradas al ser replicar en cajas de YPDA con G418 segregaran 2:2 (resistentes:sensibles), nos indicaría que dos esporas son silvestres y las otras dos dobles mutantes (tabla 4, caso C). Sin embargo, esta característica es menos común que la segregación 3:1 (tabla 4, caso B) en donde una espora es silvestre, dos son mutantes sencillas y una doble mutante. Además de la resistencia a G418, se determino el tamaño de la colonia, lo que en el caso A siempre segregó 2:2 (chicas:grande), indicando la recuperación de 4 mutantes sencillas. Se ha involucrado a *Skn7* en la regulación del ciclo celular, por lo que se desconoce el tamaño que pueda presentar la cepa doble mutante *Δskn7 Δcdc25*. Por estas razones, para obtener la doble mutante se analizaron todas las tétradas que segregaron 2:2 y 3:1 con respecto a la resistencia a G418.

Para comprobar que las esporas disectadas provinieran de una misma tétrada también se determinó el “*mating type*”, que debía segregar 2:2 (*MATa:MATα*), lo que indica que las 4 esporas eran hermanas. También se siguió la segregación de los marcadores auxotróficos (*TRP1*, *LEU2*, etc.) que

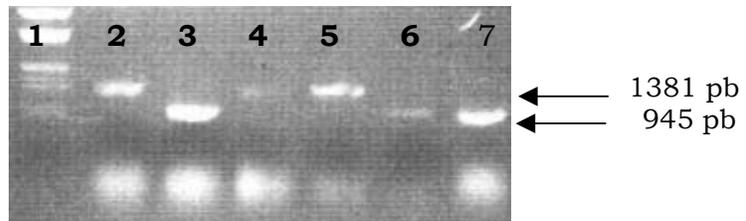
además de confirmar la identidad de una tétrada completa permitió obtener cepas dobles mutantes isogénicas a los controles silvestres, o en su caso seleccionar un juego de cepas isogénicas entre sí. También, se establece que la delección de *SKN7* no afecta el tiempo de duplicación de *Δcdc25*

La tabla 5 indica la segregación de la resistencia a G418, el tamaño de la colonia, los marcadores auxotróficos y el “*mating type*” de la tétrada candidata de la que se aisló la doble mutante.

<b>Espora</b>	<b>Tamaño</b>	<b>G418</b>	<b>TRP1</b>	<b>LEU2</b>	<b>Mat</b>
11 <sup>a</sup>	Gr	S	-	-	α
11b	Ch	R	-	+	a
11c	Ch	R	+	+	α
11d	Gr	R	+	-	a

**TABLA 5:** Tétrada seleccionada de la cual se obtuvo la doble mutante *Δskn7 Δcdc25*

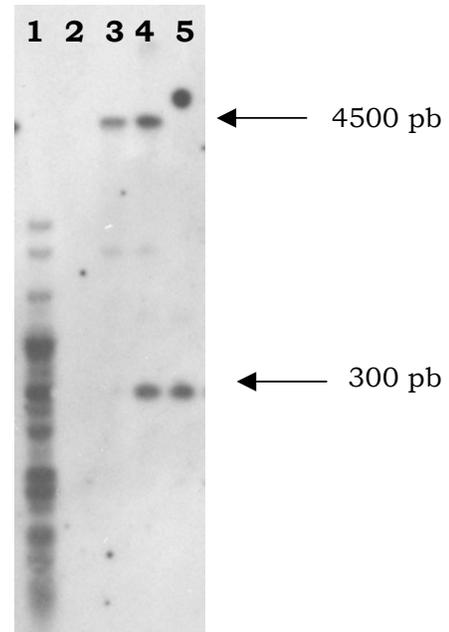
Se observó que el tamaño chico:grande segregó siempre 2:2, lo que indica que la delección de *Δskn7* no revierte el lento crecimiento de *Δcdc25*. Por esta razón para seguir la mutación *Δcdc25* se analizaron colonias pequeñas. Dado que las delecciones de los dos genes fueron hechas con el marcador para la resistencia a G418, mediante una reacción de PCR de colonia (con las condiciones establecidas para la delección de *SKN7*), se determinó la delección de *SKN7* en una colonia chica (lo cual indicó la presencia de la delección de *CDC25*). En la figura 12 el carril 6 presenta un producto de 945 pb que confirmó la delección de *Δskn7*. Los demás marcadores auxotróficos y el locus *MAT* que se analizaron, segregaron 2:2 lo que indicó que las esporas analizadas provenían de una sola tétrada.



**FIGURA 12:** PCR de colonia para confirmar la eliminación del gen *SKN7* (945 pb) y la presencia de el gen silvestre (1381 pb). Carril 1, marcador de peso molecular (1 Kb plus); carril 2, W303-6b (control silvestre); carril 3, SE100 (control  $\Delta skn7$ ); carriles 4, 5, 6, 7 candidatas a dobles mutantes.

Para confirmar que la eliminación de los genes *SKN7* y *CDC25* se encontraba en la misma espora, se realizó además un ensayo tipo *Southern*, utilizando como sonda el producto de PCR obtenido con los oligos SPL03 y SPL05, que amplifican una región del marcador *KanMX6*. Para ello, se extrajo DNA de las cepas W303-6b (*CDC25 SKN7*), SE1000 ( $\Delta skn7$ ), AF002 ( $\Delta skn7 \Delta cdc25$ ) y SL5001 ( $\Delta cdc25$ ). Un  $\mu$ g de DNA de cada muestra, se cortó independientemente con *HindIII* (figura 13) y *EcoRV* (datos no mostrados). Tal y como se esperaba, se observó la presencia de dos copias de *KanMX* en la cepa AF002 (carril 4) y una copia del gen en las cepas SE1000 (carril 3) y SL5001 (carril 5), mientras que en la cepa W303-6b no se observa señal (carril 2). Los tamaños de las bandas en la cepa doble mutante fueron los mismos que se generaron al digerir el DNA de las cepas mutantes sencillas (figura 13), lo que indicaba la presencia de las dos mutaciones en la misma célula.

**FIGURA 13:** Ensayo tipo *Southern* para *kanMX* de las cepas: W303-6B (carril 2); SE100  $\Delta$ *skn7* (carril 3); AF002  $\Delta$ *skn7*  $\Delta$ *cdc25* (carril 4); SL5001  $\Delta$ *cdc25* (carril 4) y DNA de  $\Phi$ X174 RF (carril 1)



#### 4. Generación de una Cepa doble Mutante $\Delta$ *skn7 $\Delta$ *cdc25*, Isogénica a W303-6b.*

La cepa doble mutante  $\Delta$ *skn7 $\Delta$ *cdc25* (AF002) obtenida anteriormente no es isogénica a la silvestre W303-6B, ya que tiene la capacidad de crecer en medio sin leucina y esto provoca un aumento en el tiempo de crecimiento, con respecto a la mutante  $\Delta$ *cdc25*. Se decidió generar una cepa doble mutante con auxotrofias similares a las demás cepas. Nuevamente se indujo la esporulación de la cepa diploide *SKN7*/ $\Delta$ *skn7* *CDC25*/ $\Delta$ *cdc25* (SE2001) y, posteriormente se disectaron las esporas obtenidas. Se seleccionaron las tétradas candidatas y se analizó la segregación de los marcadores mencionados anteriormente (tabla 6).*

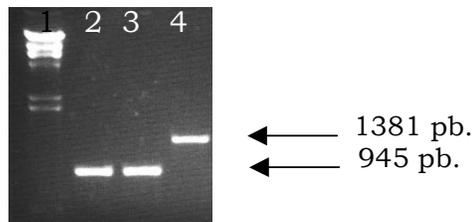
<b>Espora</b>	<b>Tamaño</b>	<b>G418</b>	<b>TRP1</b>	<b>LEU2</b>	<b>MAT</b>
1a	Ch	R	+	-	$\alpha$
b	Gr	R	-	+	$\alpha$
c	Ch	R	+	-	a
d	Gr	S	-	+	a



**TABLA 6:** Tétrada seleccionada de la cual se obtuvo la doble mutante  $\Delta$ *skn7*  $\Delta$ *cdc25*. También, se muestra la foto de la tétrada analizada, donde se observa los tamaños de las colonias y su segregación 2:2.

En el análisis de la tabla 6 se observa que existe una espora sensible a geneticina (segregación 3:1, como en el caso B de la tabla 4) lo que indica que en esta tétrada una de las esporas es silvestre y la otra contiene la doble mutación. Para confirmar esto se llevó a cabo un ensayo de PCR a partir de las esporas pequeñas (1a y 1c -tabla 6, que por el tamaño chico de colonia nos indica la eliminación de *CDC25*)(figura 15).

Se observa en la figura 14, carril 3, la presencia de un producto de 945 pb (espora 1a) que es similar al producto del carril 2, el cual es el control positivo (cepa mutante sencilla  $\Delta skn7$ ). Mientras que en el carril 4 (espora 1c) se observa un producto de 1381 pb, lo cual indica que en esta espora no existe la eliminación de *SKN7*.



**FIGURA 14:** PCR de colonia para confirmar la eliminación del gen *SKN7* (945 pb) de la espora 1C de la tabla 4, y la presencia del gen silvestre (1381 pb). Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III.

Se seleccionó la espora 1a, debido a que ésta contenía las dos mutaciones: comprobadas por PCR ( $\Delta skn7$ ) y por el tamaño pequeño de colonia ( $\Delta cdc25$ ); además de tener los marcadores de auxotrofia (*TRP1*) isogénicos a la cepa silvestre W303-6b (tabla 6).

### **5. Generación de la Cepa Doble Mutante $\Delta cdc25$ *hsf1* $\Delta$ CTA.**

Está reportado que *Hsf1* es un gen esencial para el crecimiento normal de la levadura. *Hsf1* regula la expresión de proteínas involucradas en procesos celulares vitales tales como el plegamiento de proteínas, las principales rutas metabólicas, la síntesis de componentes de la pared celular y la expresión constitutiva de Hsp's. Se ha determinado que al eliminar

Hsf1, la célula sufre un arresto en la fase G2 del ciclo celular. Una estrategia para poder evaluar la participación de Hsf1 en los fenotipos de la cepa *Δcdc25* fue quitar su dominio carboxilo terminal, ya que este dominio participa en la regulación de la respuesta sostenida a temperaturas moderadas (ver introducción).

Para generar la cepa doble mutante que careciera de Cdc25 y de un Hsf1 funcional, se cruzaron las cepas haploides: LMO20: *MAT α hsf1ΔCTA::kanMX6* y 7B: *MAT α Δcdc25::loxP*, para obtener la cepa diploide: SE2012 *MAT α/MAT α HSF1/hsf1ΔCTA::kanMX6 CDC25/Δcdc25::loxP*

Posteriormente se indujo la esporulación y se disectaron las tétradas producidas. Se identificó la espora que contenía ambas mutaciones y marcadores auxotróficos isogénicos a los controles silvestres mediante la misma estrategia mencionada en el punto 3 de esta misma sección (tabla 4). En este caso únicamente la cepa *hsf1ΔCTA::kanMX6* fue resistente a G418, ya que la cepa *Δcdc25* fue sensible por haber perdido el gen *kanMX4*. En este caso *CDC25* se eliminó con el cassette *kanMX4* flanqueado por secuencias *loxP*, las cuales son reconocidas por la recombinasa CRE, la cual produce la escisión del gen *kanMX4*. Por esta razón, la mutación en el carboxilo terminal de *HSF1* en las esporas candidatas (tabla 7) se detectó por su resistencia a geneticina (tétrada 5 a y d); mientras que el tamaño pequeño de la colonia fue indicativo de la eliminación de *CDC25* (tétrada 5 d y c) (tabla 7).

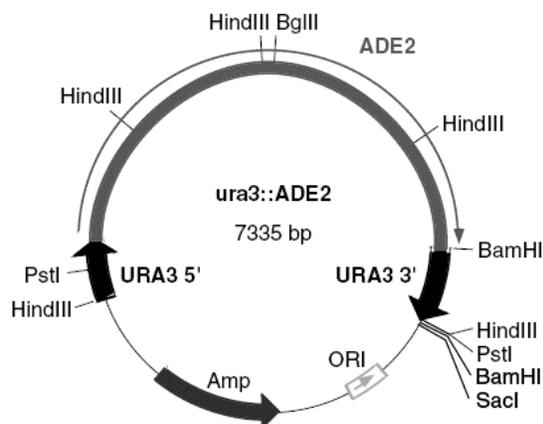
<b>Espora</b>	<b>Tamaño</b>	<b>G418</b>	<b>TRP1</b>	<b>LEU2</b>	<b>Mat</b>
5a	Gr	R	+	-	$\alpha$
5b	Ch	S	-	-	a
5c	Gr	S	-	-	a
5d	Ch	R	+	-	$\alpha$

**TABLA 7:** Tétrada seleccionada de la cual se obtuvo la doble mutante *Δcdc25 hsf1ΔCTA*.

Una vez identificada se aisló la espora 5d, la cual es isogénica a la cepa silvestre W303-6b y a las mutantes sencillas  $\Delta cdc25$  (SL5001) y  $hsf1\Delta CT A$  (LMO20).

### **6. Cambio del Marcador de Selección Nutricional URA3 por ADE2**

Debido a que originalmente la eliminación del gen *TPK1* fue reemplazada por el marcador *URA3* y la selección del plásmido pRY016 está basada también en *URA3*. Por este motivo, para poder transformar la cepa mutante YMR70 con pRY016 se llevó a cabo el cambio del marcador de selección de *URA3* a *ADE2*. El cambio se realizó siguiendo el método descrito por Voth *et al.* (2003), en el que mediante recombinación homóloga de un fragmento liberado del plásmido M3499 (figura 20) permite el cambio de *ADE2* en el sitio de inserción de *URA3* de las cepas mutantes (Voth *et al.*, 2003). Para este propósito el plásmido pM3499 fue digerido con *PstI*, y el producto de 4.46 kb obtenido se transformó en las cepas de interés.

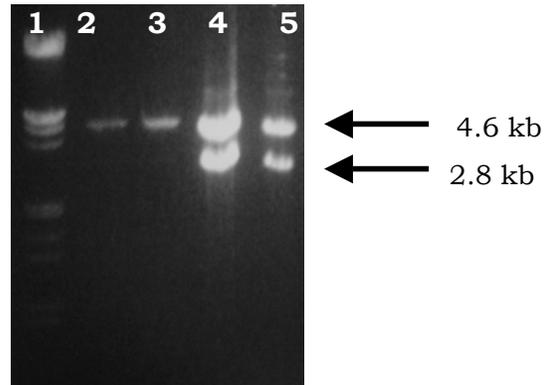


**FIGURA 15.** Mapa de restricción del plásmido M3499 usado para cambiar el marcador de selección auxotrófica.

De la siguiente reacción de digestión se tomaron 5  $\mu$ l para analizar en gel (figura 16).

20  $\mu$ l plásmido M3499 (500 ng/ $\mu$ l)  
1  $\mu$ l enzima *Pst*I (10 U/ $\mu$ l Boeringer Mannheim No. Cat 621625)  
3  $\mu$ l Buffer H  
7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Se incubó por 2 h a 37°C. El fragmento de 4.46 kb se purificó con GEAN CLEAN.



**FIGURA 16:** Restricción de 10  $\mu$ g del plásmido M3499 con la enzima *Pst*I. Se observan dos bandas una de 4.46 y 2.88 kb. 1.-  $\lambda$  Hind III- EcoR V, 2 y 3.- Fragmento de 4.46 kb purificada de la restricción de M3499 con *Pst*I, con el cual se cambiara el marcador auxotrófico, 4 y 5.- M3499 + *Pst*I.

Se transformaron las cepas YMR60 ( $\Delta$ *tpk1::URA3*), YMR70 ( $\Delta$ *tpk1::URA3*  $\Delta$ *tpk2::HIS3*) y YMR71 ( $\Delta$ *tpk1::URA3*  $\Delta$ *tpk3::TRP1*), con 1  $\mu$ g del fragmento de 4.46 kb proveniente de la digestión con *Pst*I del plásmido M3499. Posteriormente, se seleccionó en MM sin adenina y, se aislaron las colonias que crecieron en este medio. Se confirmó que las colonias seleccionadas hubieran perdido la capacidad de crecer sin uracilo.

## VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

---

### 1. Análisis del Promotor del Plásmido pRY016

Hsf1 se une y activa la transcripción a través de elementos *HSE* del tipo “perfecto” y del tipo discontinuo que contiene una separación (tipo *gap*) o dos separaciones (tipo *step*) (Yamamoto *et al.*, 2005). El plásmido pRY016 se construyó para analizar la expresión de un gen reportero mediada solamente por los elementos *HSE*. Sin embargo, antes de ser utilizado en este análisis, fue importante conocer el arreglo de los elementos *HSE* en el promotor del reportero, ya que la arquitectura de éste está relacionada con el nivel de inducción de la transcripción (ver introducción).

El análisis de la secuencia del promotor del gen reportero *lacZ* contenido en el plásmido pRY016 mostró 9 elementos *HSE* en tándem río arriba del sitio de inicio de la transcripción (figura 17). Como se esperaba, el plásmido parental pLGΔBS carece de los *HSEs*; mientras que en el plásmido pRY016 se encontraron tres repeticiones invertidas de *HSE* del tipo perfecto (5'-tTTCcaGAActTTCc-3') (observar la dirección de las flechas) y tres repeticiones que no son repeticiones invertidas perfectas (5'-tTTCcaGAAcgGAAa-3'). Estos arreglos conservan el pentámero clásico *HSE* (5'-nTTCn-3'), mientras que existen otro tres elementos que no conservan el espaciamiento mínimo entre ellos, pero sí la secuencia consenso (ver figura 17B).



## 2. Caracterización de Mutantes en genes que participan en la Vía Ras-PKA.

### 2.1. Termotolerancia basal e inducida de las cepas mutantes en la vía Ras-PKA.

Sabemos que las cepas mutantes en *cdc25* son muy resistentes al calor y que presentan un tiempo largo de duplicación debido a una fase G1 extendida. Con la finalidad de conocer si otros miembros de la vía de la PKA afectan la resistencia al calor y/o el tiempo de duplicación, se analizó el fenotipo de las mutantes en la vía PKA que atenúan su actividad. Además, se decidió analizar estas mutaciones en cepas con distintos fondos genéticos debido a que se sabe que éstos pueden influir en los fenotipos analizados. Se determinó el tiempo de duplicación y la termotolerancia basal de las cepas mostradas en la tabla 8.

<b>Cepa (fondo genético)</b>	<b>Termotolerancia Basal (% sobrevivencia)</b>	<b>Tiempo de Duplicación (h)</b>
<b>WT</b> (W303-6b)	0.02 +/- 0.004	2.28 +/-0.02
<b><math>\Delta</math>sdc25</b> (CM033)	0.024 +/- 0.002	2.29 +/- 0.04
<b><math>\Delta</math>cdc25</b> (SL5001)	75.51 +/- 18.58	5.28 +/-0.13
<b>WT</b> (KT1112)	0.02 +/- 0.01	2.58 +/- 0.41
<b><math>\Delta</math>ras2</b> (KT2249)	4.01 +/- 1.55	2.48 +/- 0.21
<b>WT</b> (AW3)	0.90 +/-0.08	2.38 +/-0.03
<b><math>\Delta</math>ras2</b> (AW3)	3.97 +/- 0.95	2.08 +/- 0.01
<b>RAS2</b> (BY4741)	0.03 +/- 0.02	2.4 +/- 0.1
<b>ras2</b> (YO2978)	0.08 +/- 0.05	2.5 +/- 0.2
<b>WT</b> (HE61-6C)	0.09 +/-0.04	2.67 +/- 0.06
<b>hsr1</b> (HE61-4B)	13.58 +/-3.65	2.73 +/- 0.01

**TABLA 8:** Fenotipo de crecimiento y termotolerancia basal de mutantes que atenúan la vía Ras-PKA. Promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes.

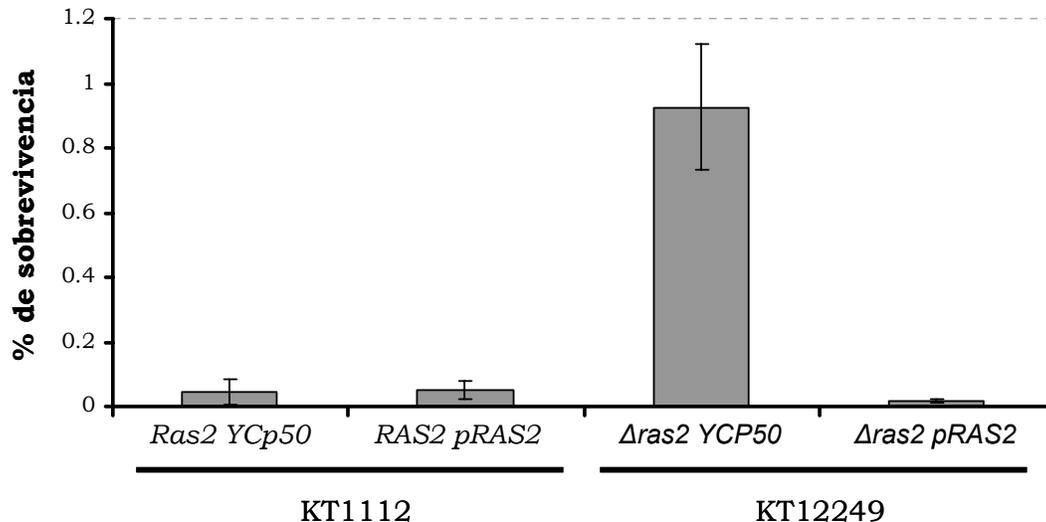
En la tabla 8 se observa que la falta de *SDC25* (el segundo intercambiador de nucleótidos de Ras), no afecta la termotolerancia ni el tiempo de duplicación al comparar su fenotipo con la cepa silvestre. Este resultado no fue sorprendente dado que este intercambiador de nucleótidos se expresa en niveles muy bajos en la fase logarítmica de crecimiento, mientras que su participación más activa ocurre en la fase estacionaria (Boy-Marcotte *et al.*, 1996).

Puesto que, la doble mutación  $\Delta ras1 \Delta ras2$  no permite la viabilidad de la levadura, se decidió analizar el efecto de la falta de *RAS2*, dado que se ha reportado como la proteína G pequeña más importante entre *Ras1* y *Ras2*. Se observó que la carencia del gen *RAS2*, en distintos fondos genéticos (KT1112, AW3 o BY4741), resulta en la adquisición de diferentes niveles de termotolerancia. En los fondos AW3 y KT1112 ocurrió un aumento significativo de la sobrevivencia al choque calórico ( $P = 0.002$  y  $P = 0.02$ , respectivamente). En contraste, en el fondo BY4741 no se apreció un cambio al comparar con la cepa silvestre ( $P = 0.24$ ) (tabla 8). Estas diferencias sugieren que en el fondo BY4741, *Ras1* u intercambiador de nucleótidos (*Rho1*, *GPr1*, etc.) es capaz de complementar la falta de *Ras2*, mientras que en AW3 y KT1112 no. Con respecto al tiempo de duplicación, ninguna de las mutaciones en *Ras* provoca que éste se afecte. Esto nos indica que la velocidad de crecimiento tiene un control que no es a través de *Ras*.

En seguida se analizaron mutantes en el gen *CYR1*, que codifica para la adenilato ciclasa, que actúa río abajo de *CDC25* y *RAS2* (ver figura 2). Para este propósito se utilizó el alelo *hsr1*, que genera una AC con baja actividad enzimática (Iida, 1988). Los resultados obtenidos mostraron que el alelo *hsr1* no afecta el tiempo de duplicación (tabla 8), pero sí la termotolerancia la cual aumentó 150 veces con respecto a su control silvestre isogénico (HE61). Esto indica que los mecanismos que controlan el progreso del ciclo celular y la resistencia al choque por calor controlados por *Cyr1* son distintos y pueden actuar independientemente.

## **2.2. Complementación del fenotipo de termotolerancia en el fondo $\Delta ras2$ .**

Para confirmar si la termotolerancia que resulta con la ausencia de *RAS2* en el fondo KT1112, se debe realmente a la falta de este gen, se complementó la cepa KT2249 ( $\Delta ras2$ ) con el gen *RAS2* silvestre contenido en el plásmido *YCp50-RAS2* (*pRAS2*). La presencia de *pRAS2* en la cepa  $\Delta ras2$  provoca que esta cepa disminuya el porcentaje de sobrevivencia en respuesta al choque letal de calor (figura 18).



**FIGURA 18.** La termotolerancia de  $\Delta$ *ras2* (KT2249), es revertida con la expresión de p*RAS2*. Promedio de tres experimentos.

Se ha descrito en la literatura que cuando se atenúa la vía Ras-PKA se obtienen fenotipos de alta termotolerancia y lento crecimiento (Thevelein and de Winde, 1999; Estruch, 2000a); pero lo que observamos cuando se afecta a miembros de la vía PKA (que atenúan la actividad de ésta) es que, sólo en las mutaciones en *cdc25*, se ve afectado el crecimiento de la célula (el tiempo de duplicación aumenta a aproximadamente el doble con respecto al control silvestre – ver tabla 8 columna de tiempo de duplicación). Mientras, que en las mutaciones y/o deleciones de *ras2* y AC no se observa que el crecimiento se afecte, comparando con las cepas silvestres. Ahora, con respecto a la termotolerancia: se observa que las mutantes (*cdc25*, *ras2* y AC) tienen diferentes efectos sobre la regulación de la respuesta a estrés por calor. Mientras la carencia de *cdc25* provoca un 75% de sobrevivencia al choque por calor, las mutaciones en *ras2* no presentaron estos mismos niveles de resistencia (ver tabla 8). Además, se observó que la termotolerancia de estas mutantes es dependiente del fondo genético en el que se encuentra. Esto debido a que la falta de Ras2 en el fondo BY4741 es igual de sensible que su control silvestre (ver tabla 8, columna de termotolerancia basal), mientras que la mutación de *ras2* en los fondos AW3 y KT1112 sí resultó en un aumento de la sobrevivencia de las células, entre 4 y 3 %. Así pues es importante hacer notar que el fondo genético a utilizar es una característica

que se debe considerar en los estudios relacionados con la resistencia a estrés por calor.

### **2.3.Fenotipo de la delección de las subunidades de la PKA.**

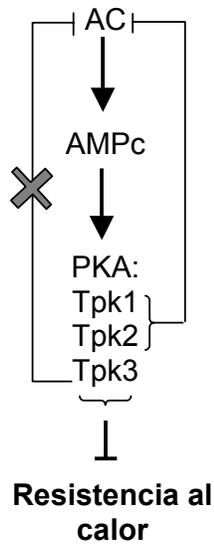
La actividad de PKA está dada por tres subunidades catalíticas; Tpk1, Tpk2 y Tpk3. Recientemente se determinó que estas cinasas actúan sobre diferentes blancos (Feliciello *et al.*, 2005). Debido a que la falta de las tres subunidades es letal para la levadura se decidió utilizar combinaciones de dobles mutantes para caracterizar su fenotipo (Thevelein and de Winde, 1999), bajo la hipótesis de que la disminución de la actividad total de las cinasas disminuiría la actividad de la vía Ras-PKA. Entonces, caracterizamos su fenotipo de crecimiento y la termotolerancia basal en el fondo W303 de las cepas dobles mutantes (tabla 9).

<b>Cepa (Fondo Genético)</b>	<b>Tiempo de Duplicación (h)</b>	<b>Termotolerancia Basal (% sobrevivencia)</b>	<b>Termotolerancia Inducida (% sobrevivencia)</b>
<b>WT</b> (W303-1 <sup>a</sup> )	2.57 +/- 0.14	0.025 +/- 0.018	75.71 +/- 5
<b><math>\Delta</math>tpk1<math>\Delta</math>tpk2TPK3</b> (YMR70a)	2.64 +/- 0.15	0.005 +/- 0.001	55.5 +/- 4.74
<b><math>\Delta</math>tpk1TPK2<math>\Delta</math>tpk3</b> (YMR71a)	2.47 +/- 0.04	0.03 +/- 0.01	76.65 +/- 0.77
<b>TPK1<math>\Delta</math>tpk2<math>\Delta</math>tpk3</b> (YMR68)	4.29 +/- 0.47	0.04 +/- 0.01	77.15 +/- 10.2

**TABLA 9:** Efecto en la termotolerancia y el tiempo de duplicación en mutantes dobles de las subunidades catalíticas de la PKA. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes con su desviación estándar.

Los resultados obtenidos mostraron que el tiempo de duplicación de la cepa *TPK1  $\Delta$ tpk2  $\Delta$ tpk3* aumento con respecto a las cepa; silvestre *TPK1 TPK2 TPK3* y a las mutantes  *$\Delta$ tpk1 TPK2  $\Delta$ tpk3* y  *$\Delta$ tpk1  $\Delta$ tpk2 TPK3* (ver tabla 9). Esto sugiere que la subunidad Tpk1 actúa sobre el crecimiento, controlando negativamente el tiempo en el cual la célula se divide. Por otro lado, la termotolerancia basal (tabla 9) de la cepa  *$\Delta$ tpk1  $\Delta$ tpk2 TPK3* es significativamente ( $p=0.02$  veces) menor a la de las mutantes *TPK1  $\Delta$ tpk2  $\Delta$ tpk3* y  *$\Delta$ tpk1 TPK2  $\Delta$ tpk3*, y del control silvestre (tabla 9). Contrario a la hipótesis de que una menor actividad total de cinasa resultaría en la

adquisición de termotolerancia, este resultado muestra que Tpk1 y Tpk2 son suficientemente capaces, cada una por sí misma, de regular la respuesta al calor de forma similar al control silvestre. Sin embargo, la sola actividad de Tpk3 resulta en una mayor sensibilidad con respecto al control, lo que indica que esta subunidad inhibe la respuesta al calor. El hecho de que la cepa  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  sea mas sensible al choque directo de calor sugiere que Tpk3 promueve una actividad mas alta de PKA y que los factores de transcripción que activan la respuesta al calor están siendo inhibidos (figura 2 y 19. Este efecto podría explicarse de la siguiente forma: se sabe que la PKA no está activa constantemente una vez que el estímulo ha llegado; ya que, mediante el mecanismo de retroalimentación (explicado en la introducción) disminuye las concentraciones de AMPc resultando en su inactivación. Debido a estas concentraciones fluctuantes de AMPc, la actividad de PKA oscila entre encendida y apagada, ya que la única presencia de Tpk1 o Tpk2 resulta en fenotipos silvestres, esto indica que cada una de estas subunidades por sí mismas pueden llevar a cabo eficientemente la retroalimentación; por el contrario, sólo Tpk3 es incapaz de esta retroalimentación, por lo tanto, las oscilaciones de actividad se perderían resultando en una PKA constantemente activa, que inhibiría a Msn2 y Msn4, y posiblemente también a Hsf1, provocando que las células sean sensibles al choque de calor directo. El análisis de la adquisición de la termotolerancia de esta cepa podría también indicar que la carencia de retroinhibición por parte de TPK3 es real. Se puede concluir, por lo tanto, que cada subunidad participa de forma diferente en la regulación de los mecanismos de control del ciclo celular y respuesta al calor.



**FIGURA 19:** Efecto de las mutaciones dobles de las subunidades de la PKA sobre el control de la resistencia al calor.

Como se mencionó arriba, para comprobar que el modelo de la figura 19 es correcto, se decidió analizar la adquisición de termotolerancia de las cepas dobles mutantes en las subunidades de la PKA. Se sabe que la vía PKA controla negativamente a los factores transcripcionales Msn2 y Msn4, que son parcialmente responsables de la termotolerancia inducida en levadura (Boy-Marcotte *et al.*, 1999b). Los resultados obtenidos muestran que la mutante *Δtpk1 Δtpk2 TPK3* presenta una termotolerancia inducida significativamente disminuida con respecto al control silvestre (tabla 9); mientras que, las mutantes *TPK1 Δtpk2 Δtpk3* y *Δtpk1 TPK2 Δtpk3* mantienen los niveles de termotolerancia inducida similares a la del control silvestre. Una vez más, estos resultados indican que la sola presencia de la subunidad Tpk3 en la célula, es capaz de impedir la actividad de los factores de transcripción (Msn2/4 y/o de Hsf1) implicados en la adquisición de termotolerancia, apoyando el modelo propuesto (figura19).

Si la inactivación de la PKA en general resulta en un aumento de la termotolerancia y una disminución de la velocidad en la división celular, entonces su hiperactivación (mediante la eliminación de la regulación negativa *BCY1*) debería presentar fenotipos contrarios a los mencionados (es

decir, las células  $\Delta bcy1$  deberían ser termosensibles y dividirse a mayor velocidad con respecto a una cepa silvestre). Según los resultados de la tabla 10 (columna de tiempo de duplicación), parecería que la participación de Bcy1 en el crecimiento y la termotolerancia basal es pequeña o nula, debido a que las mutantes *bcy1-16* y  $\Delta bcy1$  presentaron fenotipos indistintos a los de sus cepas silvestres. Por lo tanto se decidió medir la adquisición de termotolerancia (tabla 10). Después de someter a una cepa silvestre a un estrés moderado (39°C, durante una hora) seguido de un choque letal (50°C) fue evidente como su tolerancia al calor aumentó a casi 100% (tabla 10). Este efecto no se detectó en el caso de la falta de *BCY1*. El hecho de que la cepa  $\Delta bcy1$  fuera 422 veces más sensibles que la cepa silvestre, coincide con lo esperado de que Bcy1 participa positivamente en la regulación de la adquisición de la termotolerancia, al impedir que la PKA inhiba a los factores responsables de ésta.

<b>Cepa</b>	<b>Tiempo de Duplicación (h)</b>	<b>Termotolerancia Basal (% sobrevivencia)</b>	<b>Termotolerancia Inducida (% sobrevivencia)</b>
<i>BCY1</i> (KT1112)	2.5 +/- 0.3	0.05 +/- 0.05	S/D
<i>bcy1-16</i> (KT1567)	2.5 +/- 0.4	0.04 +/- 0.06	S/D
<i>BCY1</i> (W303-1a)	2.6 +/- 0.4	0.02 +/- 0.02	92.98 +/- 0.04
$\Delta bcy1$ (CM0095)	2.5 +/- 0.02	0.03 +/- 0.02	0.22 +/- 0.04

**Tabla 10:** Fenotipos de mutantes con la subunidad reguladora de la PKA. S/D: sin determinar.

### **3.Efecto de las Mutaciones en la Vía *Ras*-PKA Sobre Elementos *HSE*.**

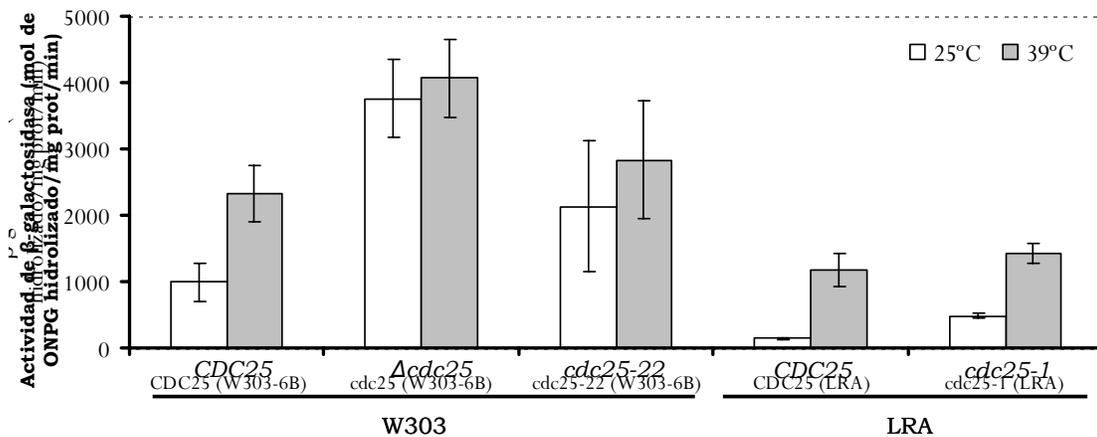
#### **3.1.Efecto de *cdc25* en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos *HSE*.**

Las cepas mutantes en *cdc25* tienen una elevada expresión de los genes con elementos *HSE* y *STRE* en sus promotores, tales como *HSP04*, *CTT1*, etc. (Folch-Mallol *et al.*, 2004). Para evitar el estudio de la expresión de genes con promotores complejos, decidimos analizar la expresión dependiente de cada tipo de elemento (*HSE* o *STRE*) de manera aislada. Para

este propósito se transformaron células *cdc25* con construcciones que permiten la expresión del gen reportero *lacZ* dependiente sólo de *STRE* o de *HSE*.

Se midió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos *HSE*, mediante la utilización del gen reportero *HSE-lacZ*, tanto en las mutantes *cdc25-21* y  $\Delta$ *cdc25* en el fondo genético W303, como en la mutante *cdc25-1* en el fondo genético LRA transformada con pRY016. Los resultados muestran que las mutantes en *CDC25* en ambos fondos genéticos, tienen mayor actividad tanto basal a 25°C (3.8 y 2 veces más, respectivamente) como inducida 39°C (1.75 y 1.22 veces más, respectivamente) del gen reportero, con respecto a sus controles silvestres (figura 20). Aunque, el alelo *cdc25-1* del fondo LRA el aumento de actividad es pequeño, comparado con la cepa silvestre, este incremento fue estadísticamente significativo (P=0.005).

Este resultado indica que *CDC25* controla negativamente la producción de enzima  $\beta$ -galactosidasa, que es mediada por elementos *HSE*, posiblemente a través de la actividad de los factores de transcripción Hsf1 y/o Skn7 durante el crecimiento exponencial. Esto sugeriría también que *CDC25*, posiblemente, a través de la vía Ras-PKA se encuentra reprimiendo la expresión de genes dependientes de los elementos *HSE*, en condiciones normales de crecimiento.

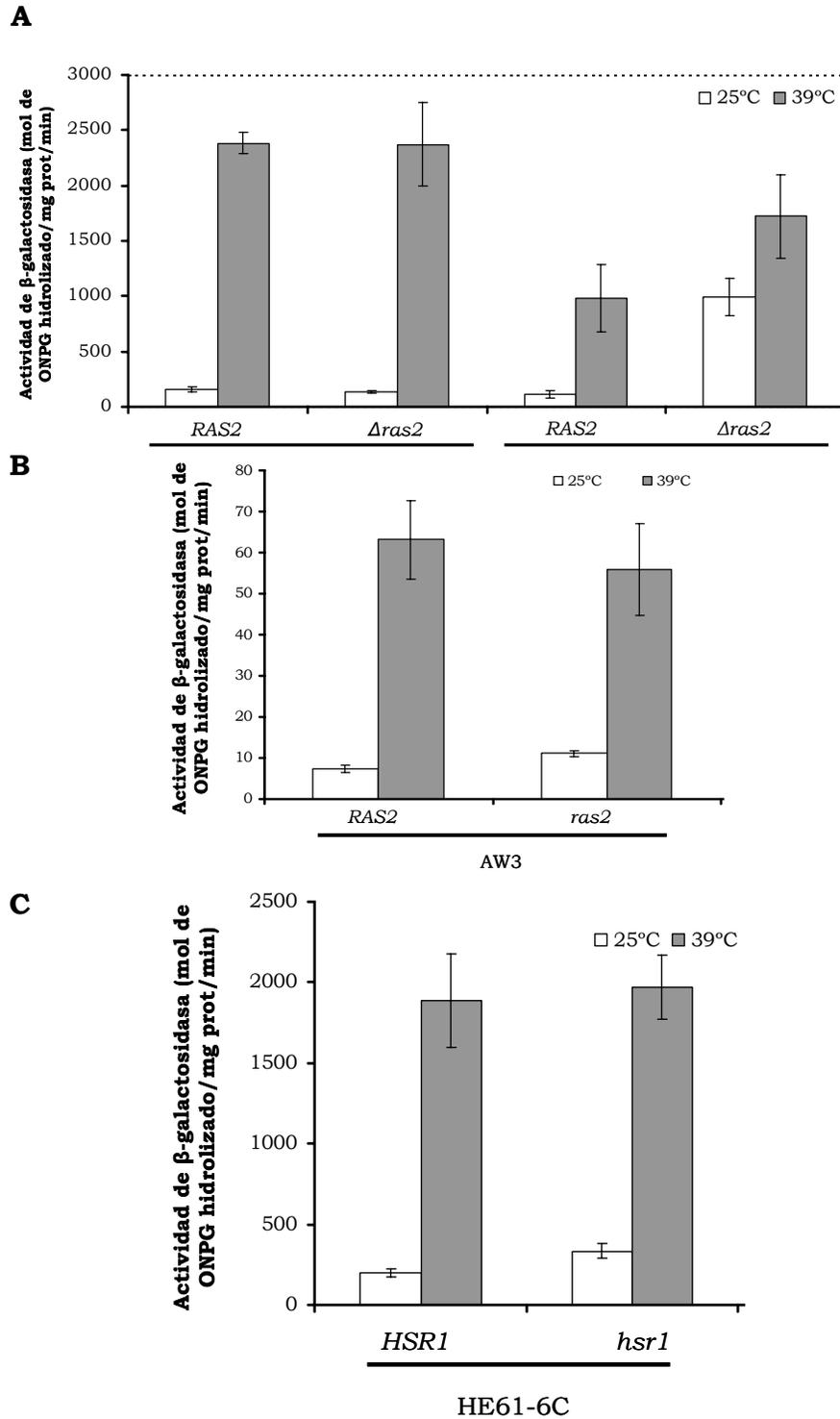


**FIGURA 20.** Efecto de Cdc25 en la expresión del gen reportero dependiente de *HSE* en diferentes fondos genéticos. Promedio de 3 experimentos.

### **3.2.Efecto de mutaciones río abajo de Cdc25 en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos HSE.**

Como se mencionó, Cdc25 actúa arriba en la cascada de señalización de la PKA, por lo que determinamos si otros miembros río abajo de la vía Ras-PKA presentan el mismo efecto sobre el gen reportero *HSE-lacZ*.

Como se esperaba (debido a los fenotipos de termotolerancia basal observados antes –tabla 8-) la actividad de  $\beta$ -galactosidasa dependiente de *HSE* en mutantes *ras2* del fondo BY4741 no se afectó a 25°C ni a 39°C con respecto a su silvestre (figura 21A), lo cual esto sugiere que en este fondo genético la sola presencia de Ras1 es suficiente para inhibir la expresión dependiente *HSE* en ausencia de Ras2 a la temperatura control de 25°C. A diferencia de este resultado, las mutaciones en *ras2*, de los fondos genéticos KT1112 y AW3, presentaron un aumento de 6.2 y 1.57 veces a 25°C de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. En estos fondos genéticos (especialmente en KT1112), la carencia de *RAS2* no puede ser completamente sustituida por *RAS1*, por lo que entonces existe una des-represión parcial de los elementos *HSE*. Los bajos niveles de  $\beta$ -galactosidasa que se obtuvieron en las cepas AW3-*RAS2*<sup>+</sup> y AW3-*ras2*<sup>-</sup> (Figura 21B) se deben a que se utilizó una construcción *HSE-lacZ* diferente a pRY016, la cual es integrativa en el genoma y contiene menor números y diferente arreglos de *HSE* (Marchler *et al.*, 1993).



**FIGURA 21:** Efecto de mutaciones en Ras2 y AC en la actividad del gen reportero dependiente de *HSE*. **A)** Eliminación del gen *RAS2*, de los fondos genéticos BY4741 y KT1112. **B)** Mutación en el gen *RAS2* del fondo genético AW3. **C)** Mutación en la AC en el fondo genético HE61-6C.

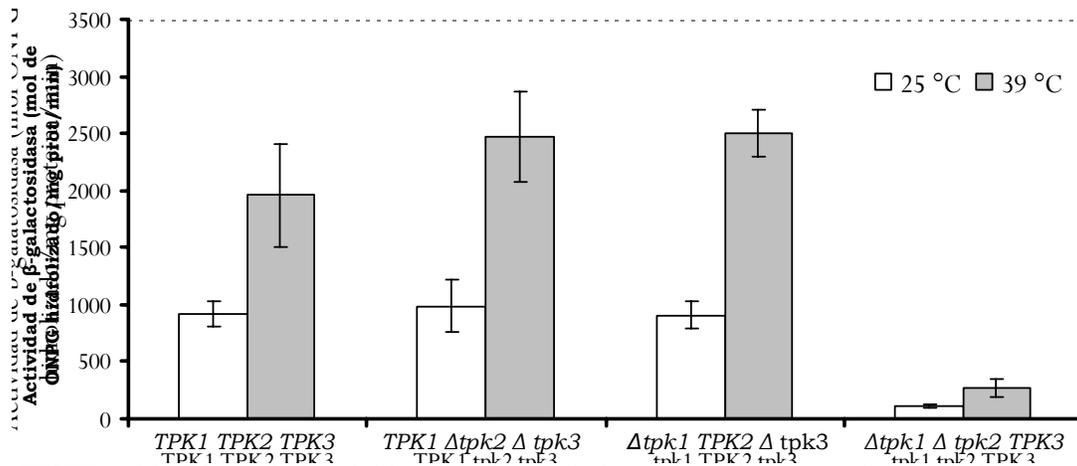
Los datos mostraron que al disminuir la expresión de la AC se aumentó 68% la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a 25°C con respecto a la cepa isogénica silvestre; mientras que, los niveles de inducción por calor (39°C) son similares a la silvestre (figura 21C). Este resultado sugiere que, al igual que Cdc25, la adenilato ciclasa se encuentra controlando negativamente la expresión dependiente de *HSE* durante el crecimiento exponencial de la célula a 25°C.

Los resultados mostrados, en donde mutaciones de miembros río abajo de Cdc25 también presentaron un aumento de la actividad basal (i.e. a 25°C) de  $\beta$ -galactosidasa mediada por *HSE*, permiten concluir que la vía Cdc25-Ras-PKA controla negativamente la expresión del gen *lacZ* dependiente de *HSE*. Esto sugiere que también existe regulación *in vivo* en los genes que contienen elementos *HSE* en sus promotores.

### **3.3.Efecto de deleciones dobles de las subunidades catalíticas de la PKA en la actividad de $\beta$ -galactosidasa mediada por elementos HSE.**

Como se determinó que la mutante  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  presenta un fenotipo de resistencia al calor que sugiere una elevada actividad de PKA, y que las cepas  $\Delta tpk1 TPK2 \Delta tpk3$  y  $TPK1 \Delta tpk2 \Delta tpk3$  dan respuestas similares a la cepa silvestre, se decidió analizar el efecto de la ausencia de estas subunidades en la regulación de la expresión del gen reportero *HSE-lacZ* (figura 22).

Se observó que solamente Tpk1 o bien Tpk2 en la célula basta para mantener un nivel de actividad similar al de la cepa silvestre tanto a 25°C como a 39°C (figura 22). De manera sorprendente, los datos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  donde sólo se tiene la actividad de la cinasa Tpk3, presentan una menor actividad basal (25°C), que además no es capaz de inducirse durante el tratamiento a 39°C, con respecto a la cepa silvestre (figura 22).



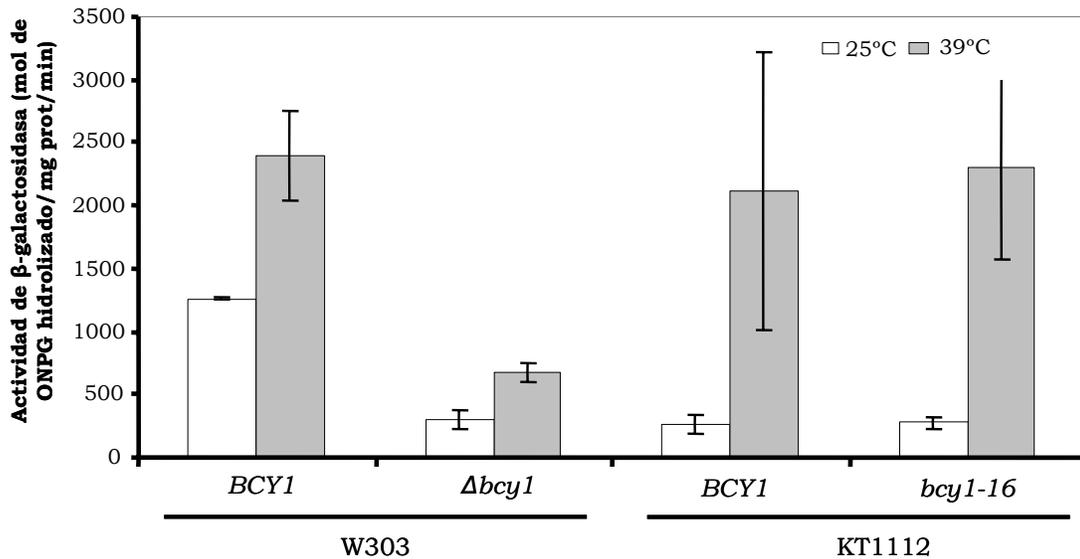
**FIGURA 22:** Efecto de las dobles deleciones de las subunidades catalíticas de la PKA, sobre la actividad dependiente de *HSE*. Promedio de tres experimentos.

Estos datos son muy interesantes, ya que indican que la actividad de la cinasa Tpk3, en ausencia de Tpk1 y Tpk2, hiper-inhibe la expresión dependiente de *HSE* a cualquier temperatura o que esta subunidad es menos afín a Bcy1. Este efecto podría deberse a la inhibición de los factores de transcripción Hsf1 y/o Skn7. Aunque estos experimentos no permiten determinar si TPK3 actúa directamente sobre Hsf1 y Skn7 o los afecta a través de intermediarios.

### **3.4. Efecto de la eliminación de la subunidad regulatoria de la PKA en la actividad de β-galactosidasa mediada por elementos HSE.**

Como se observa en la figura anterior una sobreactivación de la vía de PKA ( $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$ ) resulta en la inhibición del gen reportero mediado por elementos *HSE*. Entonces, la sobreactivación de la PKA causada por la carencia de *BCY1* provocaría bajos niveles de β-galactosidasa. Esto se comprobó cuando se analizaron mutantes *bcy1* transformadas con pRY016 (figura 23). Se observó que en el fondo W303 la carencia de *BCY1* provocó una disminución de la actividad de β-galactosidasa de 4.3 veces, con respecto a la cepa BCY1, a 25°C y una disminución de 3.6 veces cuando al termo-inducir a 39°C. Sin embargo, esta tendencia no se repitió en el fondo KT1112 donde la expresión dependiente de *HSE* fue similar tanto a 25°C como a 39°C en la cepa silvestre y en la mutante *bcy1-16* (KT1567). Este

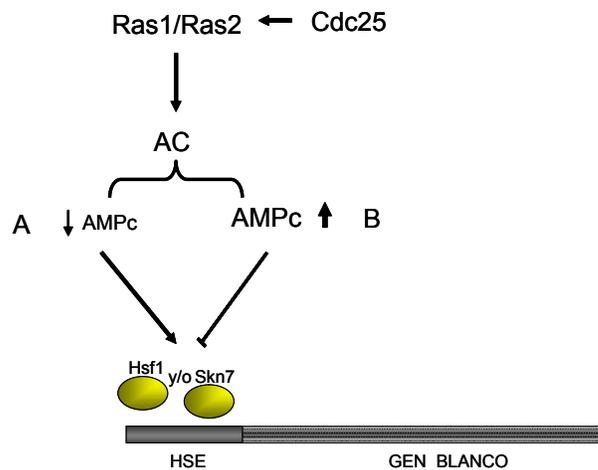
efecto posiblemente se deba a que esta es una mutación puntual en *bcy1* y no es la carencia total de la proteína como en el caso del fondo W303. Entonces, es posible establecer que la sobreactivación de la PKA (en las cepas  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  y  $\Delta bcy1$ ) inhibe la expresión del gen reportero mediado por elementos *HSE*. Estos datos contrastan con lo reportado por Engelberg, *et al.* (2004), que concluyó que en mutantes con la vía PKA sobreactivada (*bcy1* y *ras<sup>Val19</sup>*) no se afecta la expresión medida por *HSE* (Engelberg *et al.*, 1994). Sin embargo, y apoyando los datos mostrados en esta tesis, Ferguson *et al.* recientemente demostraron que la expresión de los genes de las proteínas de choque térmico pequeñas, *HSP12* y *HSP24*, es mediada por la actividad de Hsf1 regulada a través de la vía PKA.



**FIGURA 23.** Efecto de la actividad de β-galactosidasa dependiente de *HSE* en mutantes *bcy1*. Promedio de tres experimentos.

Con los datos mostrados es posible concluir que la vía Ras-PKA controla negativamente la actividad del gen reportero dependiente de *HSE* a 25°C. El efecto a 39°C, sin embargo, es más difícil de interpretar ya que en algunas mutantes (*ras2*- fondo genético BY4741 y *bc1-16* fondo genético KT1112) no se observa una clara diferencia con respecto a los controles silvestres. Debido a que los elementos *HSE* son reconocidos por los factores Hsf1 y/o Skn7, entonces se puede pensar que esta cascada se encuentra normalmente inhibiendo la transcripción de los genes blanco de Hsf1 y/o

Skn7 en células creciendo exponencialmente. Cuando ocurre la inactivación de la vía (por ejemplo en las cepas mutantes  $\Delta cdc25$ ,  $\Delta ras2$  y  $hsr1$ ) y disminuyen las concentraciones de AMPc la expresión dependiente de *HSE* aumenta, posiblemente través de los factores de transcripción Hsf1 y/o Skn7 (figura 23B). Por el contrario cuando la PKA se encuentra sobreactivada y las concentraciones de AMPc no oscilan (como posiblemente esté ocurriendo en la cepa  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$ ), o no responden a la regulación de este segundo mensajero (como en  $\Delta bcy1$ ), la expresión dependiente de *HSE* se ve abatida (figura 24, opción de menor AMPc).



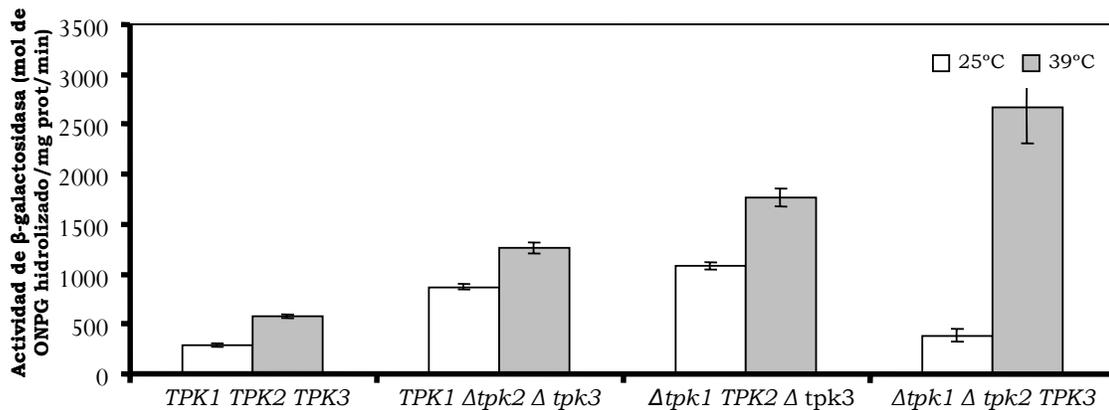
**FIGURA 24:** Esquema de la regulación de la vía Ras-PKA sobre la expresión dependiente de *HSE*, a través de los factores de transcripción Hsf1 y/o Skn7.

#### 4. Actividad de *Tpk3*.

##### 4.1. Efecto de *Tpk3* sobre la expresión dependiente de *STRE*.

Los datos mostrados anteriormente indican que la doble mutante  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  aumenta la actividad de la vía PKA. Entonces, debido a que esta mutante disminuye la expresión dependiente de *HSE*, también fue importante estudiar la expresión que es dependiente de *STRE*. Para lo cual se transformaron las combinaciones de dobles mutantes de la PKA con el gen reportero *lacZ* dependiente de elementos *STRE*.

En primer lugar se observó que en este caso las cepas mutantes *TPK1 Δtpk2 Δtpk3* y *Δtpk1 TPK2 Δtpk3* sí presentaron un aumento de 3 y 4 veces, respectivamente, con respecto al control silvestre en la actividad basal del gen reportero a 25°C, efecto que no se observó cuando la expresión del reportero fue mediada por *HSE* (figura 25). A 39°C se observó una termoinducción de 2.19 y 3.1 veces después de una hora de someter a las levaduras a calor moderado. En cambio en la mutante *Δtpk1 Δtpk2 TPK3* se mantuvieron los mismos niveles de actividad que los de la cepa silvestre a 25°C. Pero, durante la termoinducción a 39°C aumentó 6.8 veces la actividad de β-galactosidasa, siendo incluso mayor que en las otras dobles mutantes (figura 25).



**FIGURA 25.** Efecto de las deleciones dobles de las subunidades catalíticas de la PKA en la expresión regulada por elementos *STRE*

Se ha reportado que tanto *Msn2* como *Msn4* son responsables de activar los genes que contienen elementos *STRE* en su promotor, y a la vez estos factores son controlados negativamente por la vía PKA (Smith *et al.*, 1998). Con estos datos se observa que, al contrario de lo que ocurre con la actividad dependiente de *HSE*, *TPK1* o *TPK2* por sí solas no son capaces de reprimir los elementos *STRE* al nivel de la cepa silvestre. Es decir, en este caso si se detecto un efecto de la carencia de la actividad total de PKA. Por otro lado, fue evidente que la sola presencia de la subunidad *Tpk3* no permite una mayor expresión dependiente de *STRE* a 25°C (figura 25), ya que los niveles de actividad fueron similares a los obtenidos en la cepa silvestre. En cambio, a 39°C, *Tpk3* no inhibió la expresión del gen reportero

*STRE-lacZ*, como se esperaba. Por esta razón se obtuvo una mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa, con respecto a la demás dobles mutantes y al control silvestre. Estos resultados sugieren que la regulación de los elementos *HSE* y *STRE* por la vía de la PKA es diferente para cada uno. Mientras, que cuando se analiza la actividad de  $\beta$ -galactosidasa bajo *HSE* se presenta inhibición del gen reportero en la mutante  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  (figura 22), esto no se detecta cuando se analizó la actividad controlada por *STRE* (figura 24). Este resultado no se puede interpretar fácilmente, ya que, se tiene bien establecido que cuando hay alta actividad de PKA (como la que se cree ocurre en la mutante  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$ ) se presenta inhibición de los factores de transcripción Msn2/4.

#### **4.2.Efecto de las deleciones sencillas en las subunidades catalíticas de la PKA.**

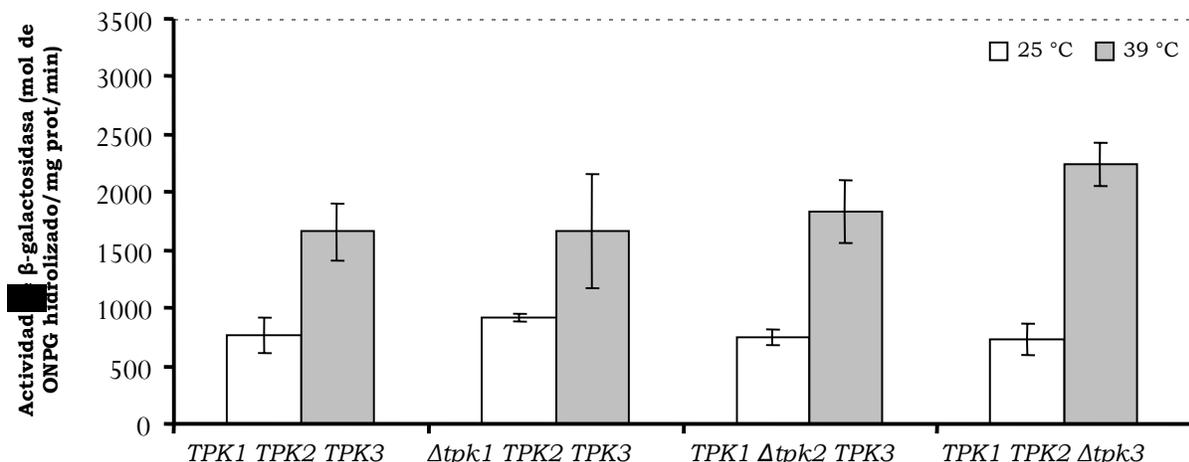
Para saber si el fenotipo de inhibición de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en la cepa  $\Delta tpk1 \Delta tpk2 TPK3$  es dominante sobre las subunidades TPK1 y TPK2, se analizaron las mutantes sencillas de las tres subunidades. Se caracterizó el fenotipo de crecimiento y termotolerancia basal de cada una (tabla 11). Se observó que la cepa  $TPK1 TPK2 \Delta tpk3$  presenta un mayor tiempo de duplicación, lo que apoya el hecho de que la subunidad Tpk3 parece tener un efecto activador de la vía. Entonces, la ausencia de Tpk3 provoca la atenuación de la actividad de las restantes subunidades Tpk1 y Tpk2. Por otro lado, la termotolerancia basal de la mutante  $\Delta tpk3$  fue similar a la de la cepa silvestre. Estos resultados permiten sugerir que los dos fenotipos (tiempo de duplicación y termotolerancia basal) en esta cepa son controlados de manera independiente. Las demás cepas mutantes sencillas presentaron fenotipos indistintos a los de la cepa silvestre, lo que indica que las subunidades restantes son capaces de suplir la falta de la subunidad mutada.

Cepa	Tiempo de Duplicación (h)	Termotolerancia Basal (% sobrevivencia)
<i>TPK1TPK2TPK3</i>	2.39 +/- 0.2	0.055 +/- 0.057
<i>Δtpk1TPK2TPK3</i>	2.34 +/- 0.9	0.023 +/- 0.024
<i>TPK1Δtpk2 TPK3</i>	2.38 +/- 0.05	0.047 +/- 0.046
<i>TPK1 TPK2Δtpk3</i>	3.44 +/- 0.03	0.065 +/- 0.007

**TABLA 11:** Efecto en la termotolerancia basal y el tiempo de duplicación de las mutantes sencillas de las subunidades catalíticas de la PKA. Los resultados son el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

#### 4.1.1 Efecto de las mutantes sencillas en las subunidades catalíticas de la PKA, sobre la actividad de β-galactosidasa dependiente de *HSE*.

En cuanto a la actividad de β-galactosidasa mediada por *HSE* en las mutantes arriba descritas, en ningún caso se observó un fenotipo distinto al que presenta la cepa silvestre (W303-1a). Para el caso de las cepas en las que *TPK3* se expresaba además con cualquiera de las otras dos: *Δtpk1 TPK2 TPK3* y *TPK1 Δtpk2 TPK3* los resultados muestran que se complementó el fenotipo de baja actividad de β-galactosidasa que presenta la cepa *Δtpk1 Δtpk2 TPK3* (figura 25).



**FIGURA 26.** Efecto de las mutantes sencillas de la PKA en la expresión mediada por elementos *HSE*. Promedio de tres experimentos.

## 5.Participación de Skn7 en la Alta Resistencia al Estrés que Presenta la Mutante $\Delta cdc25$

Se ha determinado que la principal participación del factor de transcripción Skn7 ocurre en respuesta al estrés oxidativo, donde junto con Yap1, regula la tolerancia a este tipo de estrés. El Skn7 también participa en la regulación positiva de la resistencia al choque térmico (Raitt *et al.*, 2000).

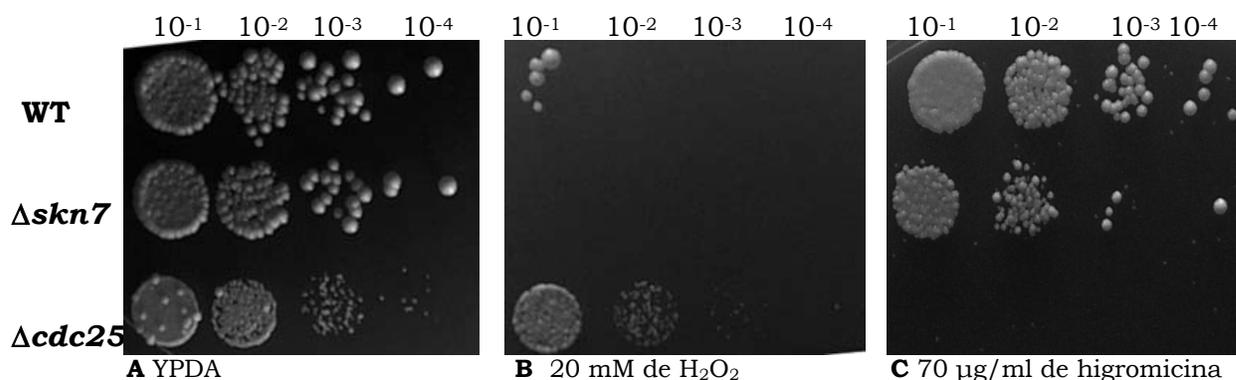
Entonces, nos dimos a la tarea de evaluar la participación de Skn7 en el crecimiento y termotolerancia de la cepa  $\Delta cdc25$ . Los resultados mostraron que este factor no resultó ser esencial para el crecimiento, tanto en el fondo silvestre como en  $\Delta cdc25$ , como se aprecia en la tabla 12. Se observó que la ausencia de  $\Delta skn7$  no afecta el tiempo de duplicación en ninguno de los fondos genéticos mencionados (tabla 12). Sin embargo, aunque la doble mutante  $\Delta skn7 \Delta cdc25$  es miles de veces mas tolerante al choque térmico letal con respecto a la cepa silvestre, la ausencia de *SKN7* en el fondo  $\Delta cdc25$  provocó niveles menores de termotolerancia (2.5 veces), con respecto a la mutante sencilla  $\Delta cdc25$ . Lo que sugiere que la termotolerancia de la cepa  $\Delta cdc25$  es parcialmente dependiente de la actividad de *SKN7*, y que existen otros factores de transcripción en la mutante  $\Delta cdc25$  que están también implicados en su alta resistencia a estrés.

Cepa	Termotolerancia basal (% sobrevivencia)	Tiempo de duplicación (h)
W303-6B	2.4 +/- 0.03	0.013 +/- 0.004
$\Delta skn7$	2.2 +/- 0.05	0.04 +/- 0.008
$\Delta skn7 \Delta cdc25$	4.75 +/- 0.07	30.48 +/- 3.98
$\Delta cdc25$	4.86 +/- 0.03	75.95 +/- 27.55

**TABLA 12:** Tiempo de duplicación y termotolerancia basal. Los resultados son el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Debido a la amplia participación de *SKN7* en múltiples procesos celulares se analizó también su respuesta al estrés oxidativo (figura 26B y

tabla 13). De acuerdo a lo esperado, se observó una mayor sensibilidad de la cepa  $\Delta skn7$  con respecto a la silvestre cuando fueron crecidas en presencia de  $H_2O_2$ .



**FIGURA 27:** Ensayo de sensibilidad en placa **A)** control YPDA **B)** Estrés oxidativo; YPDA +20 mM de  $H_2O_2$ . **C)** Deficiencia en la pared celular; YPDA + 70 µg/ml de higromicina

Debido a que el ensayo de goteo en agar (figura 26B) no permitió apreciar la sensibilidad ante la presencia de  $H_2O_2$  de la cepa carente de *skn7* con respecto a la cepa silvestre, se decidió realizar el experimento en medio líquido (tabla 13). Los resultados mostraron que la sola falta de *SKN7* provoca una mayor sensibilidad al estrés oxidativo y, que también causa el mismo efecto en el fondo  $\Delta cdc25$ . Entonces se confirmó la participación de *SKN7* en la regulación de la respuesta al estrés oxidativo. También, se estableció que este factor de transcripción es importante en la regulación de la sobrevivencia en presencia de  $H_2O_2$  de la cepa  $\Delta cdc25$ , sugiriendo su actividad en condiciones de baja actividad de PKA.

Cepa (Fondo Genético)	% de Sobrevivencia
<b>WT</b> (AF005)	0.48 +/- 0.02
$\Delta skn7$ (SE1000)	0.22 +/- 0.02
$\Delta skn7 \Delta cdc25$ (AF002)	30.77 +/- 10.55
$\Delta cdc25$ (SL5001)	82.35 +/- 14.73

**TABLA 13:** Sobrevivencia a 10 mM de  $H_2O_2$  durante 20 minutos en medio mínimo líquido.

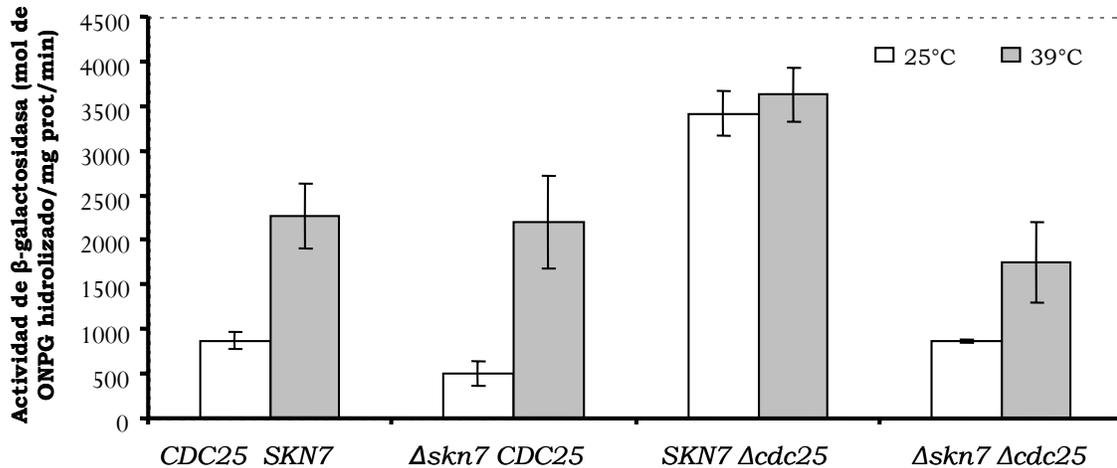
Uno de los mecanismos que controlan la actividad de Skn7 involucra al sistema de dos componentes: Sln1-Ssk1, que principalmente regula el

metabolismo de la pared celular (Yamamoto and Jigami, 2002) y la respuesta al estrés oxidativo. Entonces, las mutantes  $\Delta skn7$  deberían ser sensibles a la presencia de higromicina que afecta a las células defectuosas en la síntesis de la pared celular. La figura 26C muestra la participación de Skn7 en la capacidad de la célula de resistir a la presencia de higromicina. Interesantemente la mutación  $\Delta cdc25$  por sí misma fue incapaz de crecer en medio con higromicina, esto es de notar dado que esta mutante presenta una pared celular gruesa (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

### **5.1. Participación de Skn7 en la regulación de la expresión dependiente de HSE.**

Como se mencionó anteriormente además de Hsf1, Skn7 también reconoce elementos *HSE* (Raitt *et al.*, 2000). Entonces, para determinar si *SKN7* participa en la regulación dependiente de *HSE*, se transformaron las cepas de la tabla 12 con el gen reportero *HSE-lacZ* (figura 27). Mediante esta estrategia se logró apreciar la participación de Skn7 en un fondo silvestre, ya que la ausencia de éste provocó una disminución de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a 25°C comparando con la cepa silvestre. Aunque, en condiciones de calor moderado a 39°C ocurrió una termoinducción de  $\beta$ -galactosidasa a los mismos niveles que presentó la cepa silvestre. Este resultado no es extraño debido a que Hsf1 debe ser el responsable del aumento, ya que es el principal factor de transcripción que regula la expresión dependiente de *HSE*.

Con la finalidad de conocer a la participación de Skn7 en condiciones de baja actividad de PKA, se obtuvo que la cepa doble mutante  $\Delta skn7 \Delta cdc25$ . Los datos mostraron que esta cepa presenta entre 4 y 2 veces menor actividad de  $\beta$ -galactosidasa a 25°C y 39°C respectivamente, al comparar con la mutante sencilla  $\Delta cdc25$ , tanto a la temperatura control como en condiciones de choque térmico (figura 27).



**FIGURA 28:** Participación de Skn7 en la elevada actividad de  $\beta$ -galactosidasa mediada por *HSE*, en el fondo  $\Delta cdc25$ . Promedio de tres experimentos.

Con los datos obtenidos es indudable la participación de Skn7 en la regulación de la respuesta a estrés en condiciones de baja actividad de PKA ( $\Delta cdc25$ ) y en la regulación de la expresión del gen reportero dependiente de *HSE*, bajo estas mismas condiciones.

### **6. Participación de *Hsf1* en la Alta Resistencia a Estrés en la Mutante $\Delta cdc25$ .**

*Hsf1* en *S. cerevisiae* es el principal factor de transcripción que regula la expresión de genes que contienen elementos *HSE* en su promotor. También se sabe que *HSF1* es un gen esencial para el crecimiento normal de la levadura, pues la ausencia de este factor las células sufren un arresto en la fase G2 del ciclo celular. Por esta razón, no es posible generar una cepa carente de *HSF1*, así que se decidió crear una cepa mutante que permitiera analizar la participación de este factor de transcripción en la expresión del gen reportero *HSE-lacZ*. Para ésto se optó por eliminar el carboxilo terminal de *Hsf1*, ya que se ha reportado que este dominio es necesario para la respuesta sostenida a elevadas temperaturas (Nieto-Sotelo et al., 1990).

Una vez generada la cepa  $\Delta cdc25$  *hsf1* $\Delta$ CTA (ver la sección de generación de cepas) y sus controles isogénicos, se caracterizaron sus

fenotipos de termotolerancia y el tiempo de duplicación (tabla 14). Los resultados mostraron que la falta del carboxilo terminal, por sí mismo (cepa mutante sencilla *hsf1ΔCTA*) provocó un aumento moderado en el tiempo de duplicación (significativo de 0.4 hrs) con respecto a la cepa silvestre. También, la carencia de este dominio en el fondo  $\Delta cd25$  provocó que las células crecieran aún mas lentamente (ver tiempo de duplicación), con respecto a la mutante sencilla  $\Delta cd25$ . Entonces, el carboxilo terminal de Hsf1 no sólo es necesario para el crecimiento sostenido a elevadas temperaturas, sino que también parece participar en condiciones normales de crecimiento (25°C); ya que su remoción provoca un aumento significativo de la tasa de crecimiento. Cuando se evaluó la participación del CTA de Hsf1 en el fondo  $\Delta cdc25$ , se detectó un aumento de 0.54 h en el tiempo de duplicación, con respecto a la mutante sencilla en *cdc25*. Estos datos sugieren que este dominio se encuentra interaccionando con la maquinaria general de transcripción (Hashikawa *et al.*, 2006) (RNA pol II, etc), y cuando éste no se encuentra se da una menor eficiencia en la transcripción de genes.

De manera muy interesante, y en apoyo a la hipótesis planteada, se observó que en un fondo  $\Delta cdc25$  la falta del dominio CTA de *HSF1* provocó una disminución de 5 veces en la termotolerancia, cambio que resultó estadísticamente significativo (tabla 14).

<b>Cepa</b>	<b>Tiempo de Duplicación (h)</b>	<b>Termotolerancia Basal (% de sobrevivencia)</b>
W303-6B	2.39 +/- 0.03	0.05 +/- 0.05
<i>Hsf1ΔCTA</i>	2.79 +/- 0.03	0.016 +/- 0.014
$\Delta cdc25$	4.87 +/- .04	75.95 +/- 27.55
$\Delta cdc25$ <i>hsf1ΔCTA</i>	5.41 +/- .14	14.78 +/- 11.27

**TABLA 14:** Tiempo de duplicación y termotolerancia basal. Los resultados son el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes

Como podría esperarse para que las cepas  $\Delta cd25$  presenten la alta termotolerancia que las caracteriza es necesario que el factor Hsf1 esté íntegro, ya que la carencia de su dominio carboxilo terminal provoca una

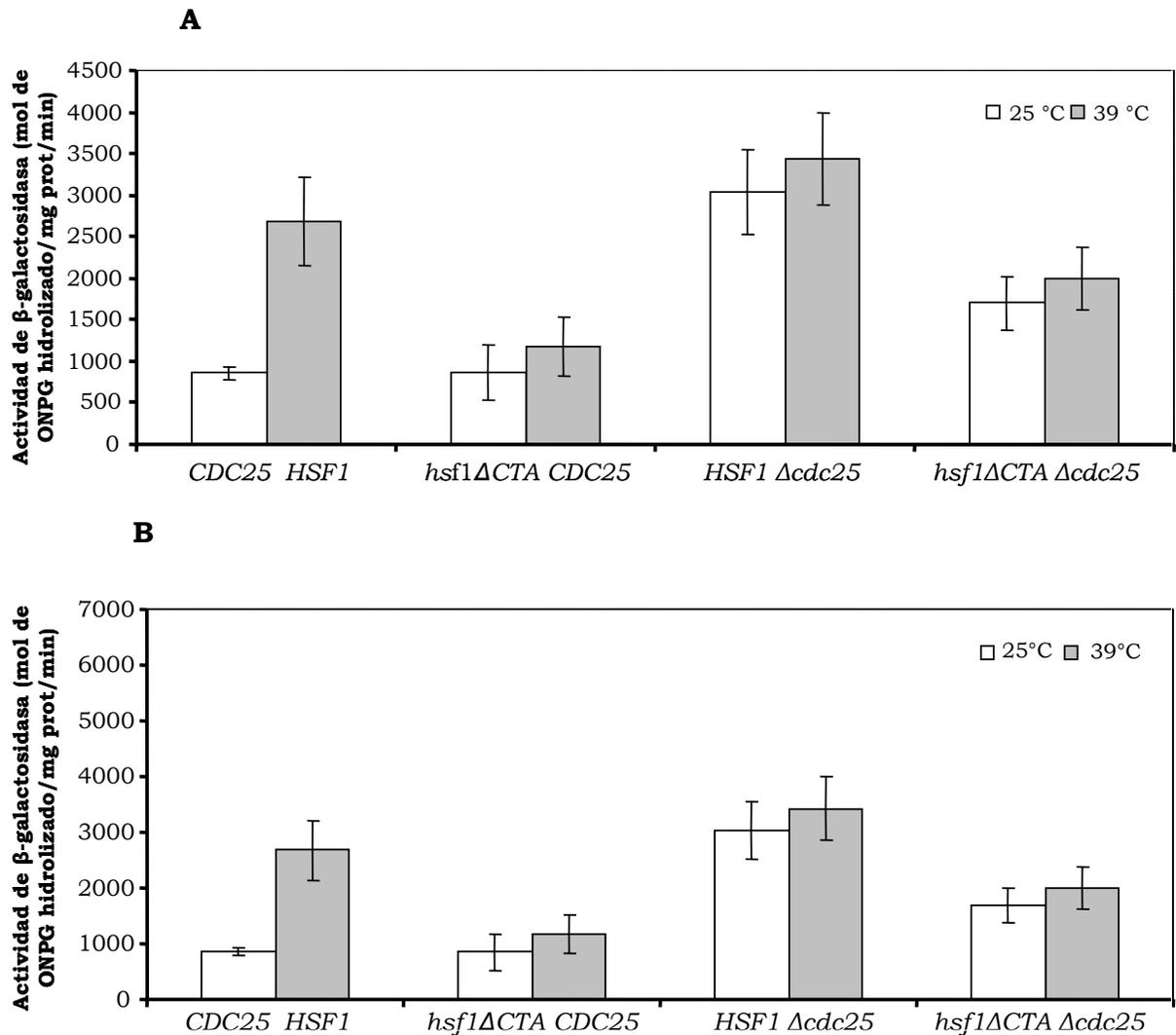
disminución en el porcentaje de sobrevivencia al choque de calor. Al igual que *Skn7*, también *Hsf1* juega un papel en la regulación de la resistencia al estrés en condiciones de baja actividad de PKA. Para confirmar la identidad de la mutante *hsf1ΔCTA* se realizaron diferentes ensayos. En primer lugar se determinó que la cepa *hsf1ΔCTA* no crece a 36°C, fenotipo que coincide con el reportado en la literatura. Por otro lado esta mutante fue capaz de sobrevivir (80%) a un choque letal de 50°C durante 20 min, cuando previamente fue incubada durante 1 hora a 39°C. Esto debido a que el dominio *CTA* de *Hsf1* es indispensable para el crecimiento sostenido a elevadas temperaturas, lo que una hora (la mitad de un tiempo de duplicación) de crecimiento a 39°C no permite revelar la participación de este dominio en la regulación de la respuesta inmediata al estrés.

### **6.1. Participación de *Hsf1* en la regulación de la expresión dependiente de HSE.**

Como se observó que bajo las condiciones estándar (una hora de crecimiento a 39°C y una hora más de recuperación a 25°C), la falta del dominio *CTA* de *Hsf1* no afectó la actividad de *HSE-CYC-lacZ* a 25°C, ni tampoco a 39°C, ya que los niveles de actividad de β-galactosidasa fueron del orden de los de la cepa silvestre (figura 28A). Debido a que una hora de incubación a 39°C no permite ver la actividad del dominio *CTA*, para el ensayo de β-galactosidasa con el plásmido reportero pRY016 se decidió incubar dos horas a 39°C en lugar de 1 h (que es el tiempo de inducción utilizado en el análisis de las otras cepas).

Al cabo de dos horas de termoinducción a 39°C la cepa *hsf1ΔCTA* no aumenta la actividad de β-galactosidasa con respecto a 25°C (figura 28B). Se puede entonces concluir que el carboxilo terminal de *Hsf1* es indispensable para el aumento en la expresión del gen reportero dependiente de *HSE* en condiciones de crecimiento sostenido a temperaturas no letales.

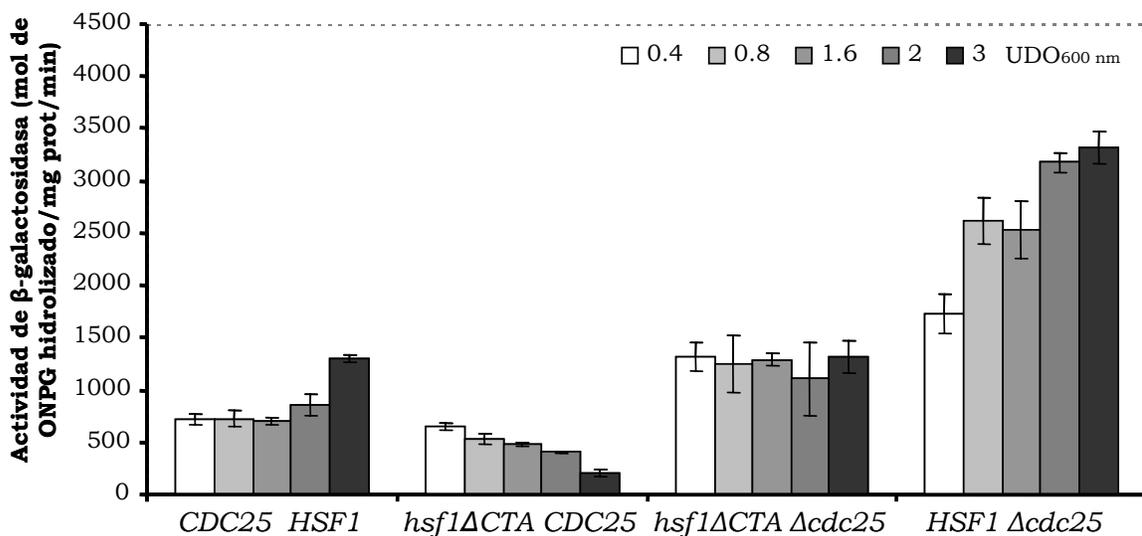
El hecho de que el alelo *Hsf1ΔCTA* en el fondo  $\Delta cdc25$  hubiese provocado una disminución de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa tanto a 25°C como cuando se sometió a 2 h de crecimiento a 39°C (figura 28B) sugirió que la alta actividad de  $\beta$ -galactosidasa de las células  $\Delta cdc25$  está dada por la presencia de un Hsf1 funcional, indicando que en condiciones de baja actividad de PKA Hsf1 es más activo.



**FIGURA 29:** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa, para evaluar la participación de Hsf1 en la elevada expresión de *HSE-lacZ*. **A)** Una hora de crecimiento a 39°C y posterior recuperación a 25°C durante una hora. **B)** Dos horas de crecimiento a 39°C y posterior recuperación a 25°C durante una hora.

Conforme transcurre el tiempo de crecimiento en medio rico la actividad de la vía Ras-PKA disminuye, disminuyendo su tiempo de duplicación y aumentando la resistencia a estrés (Thevelein *et al.*, 2005). Se

decidió entonces determinar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa mediada por *HSE*, a lo largo de la curva de crecimiento a 25°C. Los datos indican que conforme transcurre el crecimiento (medido en aumento de UDO a 600nm), en la mutante *hsf1 $\Delta$ CTA*, la expresión del gen reportero *HSE-lacZ* disminuye, haciéndose notar la importancia de este dominio de activación (figura 29). Esto dato apoya la hipótesis de que la actividad de Hsf1 es regulada a través de la vía de la PKA. Es importante mencionar que no tenemos datos para explicar el porque en la mutante *hsf1 $\Delta$ CTA*, va disminuyendo la expresión de *HSE-lacZ* conforme avanza el tiempo de crecimiento y no por lo menos se mantiene la expresión de este gen reportero, como se observa en la mutante *hsf1 $\Delta$ CTA  $\Delta$ cdc25*. En esta mutante la actividad de dependiente de *HSE* no se afecta conforme aumenta el tiempo de crecimiento en medio rico. Al contrario de cuando solo se tiene  $\Delta$ cdc25, la actividad de  $\beta$ -galactosidasa también aumenta cerca del cambio diauxico (figura 29). Este aumento nos muestra un segundo nivel de activación de Hsf1, en el fondo  $\Delta$ cdc25.



**FIGURA 30:** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa medida durante el crecimiento en medio YPDA a diferentes DO a 600 nm.

Como se observa en los resultados, la actividad del gen reportero *HSE-lacZ* aumenta cuando se disminuye la actividad de la vía PKA, ya sea mediante la delección de *CDC25* o cuando la disponibilidad de nutrientes disminuye (a lo largo de la curva de crecimiento) (ver figura 29 cepa

silvestre y cepa  $\Delta cd25$ ). Lo que implica que la atenuación de la vía regula la actividad de Hsf1 y/o Skn7.

## VIII.- CONCLUSIONES

---

- Las células de levadura con mutaciones que inhiben la vía de la PKA tienen la expresión dependiente de *STRE* elevada.
- La expresión de genes dependiente de *HSE* se encuentra constitutivamente elevada durante la fase exponencial a 25°C, en células *Δcdc25*, *Δras2* y *hsr1*.
- La expresión del gen reportero *HSE -lacZ* en la mutante *Δtpk1 Δtpk2 TPK3* se encuentra inhibida.
- La expresión constitutiva dependiente de *HSE* en las células *Δcdc25* es mediada tanto por Skn7 y Hsf1.
- Estos resultados implican que la PKA ejerce una regulación negativa sobre la función de los factores de transcripción Skn7 y a Hsf1 durante el crecimiento exponencial.

## IX.- BIBLIOGRAFIA

---

Anghileri,P., Branduardi,P., Sternieri,F., Monti,P., Visintin,R., Bevilacqua,A., Alberghina,L., Martegani,E., and Baroni,M.D. (1999). Chromosome separation and exit from mitosis in budding yeast: dependence on growth revealed by cAMP-mediated inhibition. *Exp. Cell Res.* 250, 510-523.

Beck,T. and Hall,M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689-692.

Belotti,F., Tisi,R., and Martegani,E. (2006). The N-terminal region of the *Saccharomyces cerevisiae* RasGEF Cdc25 is required for nutrient-dependent cell-size regulation. *Microbiology* 152, 1231-1242.

Boy-Marcotte,E., Ikonomi,P., and Jacquet,M. (1996). SDC25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation. *Mol. Biol. Cell* 7, 529-539.

Boy-Marcotte,E., Lagniel,G., Perrot,M., Bussereau,F., Boudsocq,A., Jacquet,M., and Labarre,J. (1999b). The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol. Microbiol.* 33, 274-283.

Boy-Marcotte,E., Lagniel,G., Perrot,M., Bussereau,F., Boudsocq,A., Jacquet,M., and Labarre,J. (1999a). The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol. Microbiol.* 33, 274-283.

Chevtzoff,C., Vallortigara,J., Averet,N., Rigoulet,M., and Devin,A. (2005). The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1706, 117-125.

Colombo,S. *et al.* (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 3326-3341.

Coote,P.J., Cole,M.B., and Jones,M.V. (1991). Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J. Gen. Microbiol.* 137 ( Pt 7), 1701-1708.

Costa,V. and Moradas-Ferreira,P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 22, 217-246.

Damak,F., Boy-Marcotte,E., Le Roscouet,D., Guilbaud,R., and Jacquet,M. (1991). SDC25, a CDC25-like gene which contains a RAS-activating domain and is a dispensable gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11, 202-212.

de Virgilio,C., Hottiger,T., Dominguez,J., Boller,T., and Wiemken,A. (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur. J. Biochem.* 219, 179-186.

Engelberg,D., Zandi,E., Parker,C.S., and Karin,M. (1994). The yeast and mammalian Ras pathways control transcription of heat shock genes independently of heat shock transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 14, 4929-4937.

- Estruch,F. (2000b). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 469-486.
- Estruch,F. (2000a). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 469-486.
- Estruch,F. (2000c). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 469-486.
- Fedor-Chaiken,M., Deschenes,R.J., and Broach,J.R. (1990). SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. *Cell* 61, 329-340.
- Feliciello,A., Gottesman,M.E., and Avvedimento,E.V. (2005). cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal.* 17, 279-287.
- Fernandes,L., Rodrigues-Pousada,C., and Struhl,K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell Biol.* 17, 6982-6993.
- Folch-Mallol,J.L., Martinez,L.M., Casas,S.J., Yang,R., Martinez-Anaya,C., Lopez,L., Hernandez,A., and Nieto-Sotelo,J. (2004). New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and cellular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 2865-2879.
- Fuge,E.K., Braun,E.L., and Werner-Washburne,M. (1994). Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176, 5802-5813.
- Garreau,H., Hasan,R.N., Renault,G., Estruch,F., Boy-Marcotte,E., and Jacquet,M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 146 ( Pt 9), 2113-2120.
- Gasch,A.P., Spellman,P.T., Kao,C.M., Carmel-Harel,O., Eisen,M.B., Storz,G., Botstein,D., and Brown,P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11, 4241-4257.
- Geymonat,M., Wang,L., Garreau,H., and Jacquet,M. (1998). Ssa1p chaperone interacts with the guanine nucleotide exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 30, 855-864.
- Gietz,R.D. and Schiestl,R.H. (1991). Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* 7, 253-263.
- Godon,C., Lagniel,G., Lee,J., Buhler,J.M., Kieffer,S., Perrot,M., Boucherie,H., Toledano,M.B., and Labarre,J. (1998). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 22480-22489.
- Gorner,W., Durchschlag,E., Martinez-Pastor,M.T., Estruch,F., Ammerer,G., Hamilton,B., Ruis,H., and Schuller,C. (1998b). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12, 586-597.
- Gorner,W., Durchschlag,E., Martinez-Pastor,M.T., Estruch,F., Ammerer,G., Hamilton,B., Ruis,H., and Schuller,C. (1998a). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12, 586-597.

- Griffioen,G. and Thevelein,J.M. (2002). Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr. Genet.* *41*, 199-207.
- Hall,D.D., Markwardt,D.D., Parviz,F., and Heideman,W. (1998). Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *17*, 4370-4378.
- Halliwell,B. and Gutteridge,J.M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* *219*, 1-14.
- Hartl,F.U. and Hayer-Hartl,M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* *295*, 1852-1858.
- Hasan,R., Leroy,C., Isnard,A.D., Labarre,J., Boy-Marcotte,E., and Toledano,M.B. (2002). The control of the yeast H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response by the Msn2/4 transcription factors. *Mol. Microbiol.* *45*, 233-241.
- Hashikawa,N., Mizukami,Y., Imazu,H., and Sakurai,H. (2006). Mutated yeast heat shock transcription factor activates transcription independently of hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* *281*, 3936-3942.
- Hashikawa,N. and Sakurai,H. (2004). Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. *Mol. Cell Biol.* *24*, 3648-3659.
- Hoj,A. and Jakobsen,B.K. (1994). A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J.* *13*, 2617-2624.
- Iida,H. (1988). Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene. *Mol. Cell Biol.* *8*, 5555-5560.
- Jackson,A.L. and Loeb,L.A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* *477*, 7-21.
- Kennelly,P.J. and Krebs,E.G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* *266*, 15555-15558.
- Klein,C. and Struhl,K. (1994). Protein kinase A mediates growth-regulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1 transcriptional activity. *Mol. Cell Biol.* *14*, 1920-1928.
- Krems,B., Charizanis,C., and Entian,K.D. (1996). The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in oxidative stress resistance. *Curr. Genet.* *29*, 327-334.
- Kroeger,P.E. and Morimoto,R.I. (1994). Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. *Mol. Cell Biol.* *14*, 7592-7603.
- Kuge,S. and Jones,N. (1994). YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* *13*, 655-664.
- Lai,L.C., Kosorukoff,A.L., Burke,P.V., and Kwast,K.E. (2005). Dynamical remodeling of the transcriptome during short-term anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: differential response and role of Msn2 and/or Msn4 and other factors in galactose and glucose media. *Mol. Cell Biol.* *25*, 4075-4091.

- Lallet,S., Garreau,H., Poisier,C., Boy-Marcotte,E., and Jacquet,M. (2004). Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. *Mol. Genet. Genomics* 272, 353-362.
- Lee,J., Godon,C., Lagniel,G., Spector,D., Garin,J., Labarre,J., and Toledano,M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040-16046.
- Li,S., Ault,A., Malone,C.L., Raitt,D., Dean,S., Johnston,L.H., Deschenes,R.J., and Fassler,J.S. (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17, 6952-6962.
- Ma,P., Wera,S., Van Dijck,P., and Thevelein,J.M. (1999). The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol. Biol. Cell* 10, 91-104.
- Mager,W.H. and Ferreira,P.M. (1993). Stress response of yeast. *Biochem. J.* 290 (Pt 1), 1-13.
- Marchler,G., Schuller,C., Adam,G., and Ruis,H. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* 12, 1997-2003.
- Martinez-Pastor,M.T., Marchler,G., Schuller,C., Marchler-Bauer,A., Ruis,H., and Estruch,F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* 15, 2227-2235.
- Morano,K.A., Liu,P.C., and Thiele,D.J. (1998). Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 197-203.
- Moskvina,E., Schuller,C., Maurer,C.T., Mager,W.H., and Ruis,H. (1998). A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* 14, 1041-1050.
- Moye-Rowley,W.S., Harshman,K.D., and Parker,C.S. (1988). YAP1 encodes a yeast homolog of mammalian transcription factor AP-1. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 53 Pt 2, 711-717.
- Nicolet,C.M. and Craig,E.A. (1991). Inducing and assaying heat-shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 194, 710-717.
- Palomino,A., Herrero,P., and Moreno,F. (2006). Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* HXK2 promoter. *Nucleic Acids Res.* 34, 1427-1438.
- Park,J.I., Collinson,E.J., Grant,C.M., and Dawes,I.W. (2005). Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 2529-2535.
- Parsell,D.A., Kowal,A.S., Singer,M.A., and Lindquist,S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* 372, 475-478.
- Raitt,D.C., Johnson,A.L., Erkine,A.M., Makino,K., Morgan,B., Gross,D.S., and Johnston,L.H. (2000). The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* 11, 2335-2347.

- Robertson,L.S., Causton,H.C., Young,R.A., and Fink,G.R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5984-5988.
- Rose,M. and Botstein,D. (1983). Construction and use of gene fusions to lacZ (beta-galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* 101, 167-180.
- Ruis,H. and Schuller,C. (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17, 959-965.
- Sakurai,H. and Fukasawa,T. (2001). A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 696-701.
- Sakurai,H., Hashikawa,N., Imazu,H., and Fukasawa,T. (2003). Carboxy-terminal region of the yeast heat shock factor contains two domains that make transcription independent of the TFIIH protein kinase. *Genes Cells* 8, 951-961.
- Sanchez,Y. and Lindquist,S.L. (1990). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115.
- Sanchez,Y. and Lindquist,S.L. (1990a). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115.
- Sanchez,Y. and Lindquist,S.L. (1990b). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115.
- Sanchez,Y. and Lindquist,S.L. (1990c). HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* 248, 1112-1115.
- Schiestl,R.H. and Gietz,R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339-346.
- Schnell,N., Krems,B., and Entian,K.D. (1992). The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr. Genet.* 21, 269-273.
- Shabb,J.B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.* 101, 2381-2411.
- Shyu,W.C., Harn,H.J., Saeki,K., Kubosaki,A., Matsumoto,Y., Onodera,T., Chen,C.J., Hsu,Y.D., and Chiang,Y.H. (2002). Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol. Neurobiol.* 26, 1-12.
- Singh,H., Erkine,A.M., Kremer,S.B., Duttweiler,H.M., Davis,D.A., Iqbal,J., Gross,R.R., and Gross,D.S. (2006). A functional module of yeast mediator that governs the dynamic range of heat-shock gene expression. *Genetics* 172, 2169-2184.
- Smith,A., Ward,M.P., and Garrett,S. (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17, 3556-3564.
- Sorger,P.K. (1991). Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65, 363-366.
- Spencer,J.P., Jenner,A., Aruoma,O.I., Cross,C.E., Wu,R., and Halliwell,B. (1996). Oxidative DNA damage in human respiratory tract epithelial cells. Time course in relation to DNA strand breakage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 17-22.
- Stadtman,E.R. (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797-821.

- Tamai,K.T., Liu,X., Silar,P., Sosinowski,T., and Thiele,D.J. (1994). Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol. Cell Biol.* 14, 8155-8165.
- Tanaka,K., Lin,B.K., Wood,D.R., and Tamanoi,F. (1991). IRA2, an upstream negative regulator of RAS in yeast, is a RAS GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 468-472.
- Thevelein,J.M. and de Winde,J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904-918.
- Thevelein,J.M. *et al.* (2005). Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 253-256.
- Thiele,D.J. (1992). Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 20, 1183-1191.
- Van,D.P., Ma,P., Versele,M., Gorwa,M.F., Colombo,S., Lemaire,K., Bossi,D., Loiez,A., and Thevelein,J.M. (2000). A baker's yeast mutant (fil1) with a specific, partially inactivating mutation in adenylate cyclase maintains a high stress resistance during active fermentation and growth. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 521-530.
- Voth,W.P., Jiang,Y.W., and Stillman,D.J. (2003). New 'marker swap' plasmids for converting selectable markers on budding yeast gene disruptions and plasmids. *Yeast* 20, 985-993.
- Walter,S. and Buchner,J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41, 1098-1113.
- Wang,L., Renault,G., Garreau,H., and Jacquet,M. (2004). Stress induces depletion of Cdc25p and decreases the cAMP producing capability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150, 3383-3391.
- Werner-Washburne,M., Braun,E., Johnston,G.C., and Singer,R.A. (1993). Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 57, 383-401.
- Werner-Washburne,M., Brown,D., and Braun,E. (1991). Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *J. Biol. Chem.* 266, 19704-19709.
- Wiatrowski,H.A. and Carlson,M. (2003). Yap1 accumulates in the nucleus in response to carbon stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 2, 19-26.
- Yamamoto,A., Mizukami,Y., and Sakurai,H. (2005). Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280, 11911-11919.
- Yamamoto,K. and Jigami,Y. (2002). Mutation of TRS130, which encodes a component of the TRAPP II complex, activates transcription of OCH1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 42, 85-93.
- Yost,H.J. and Lindquist,S. (1986). RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* 45, 185-193.