

69
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



TESIS

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

MARCOS ABIERTOS DE LECTURA DE LOS
CROMOSOMAS VII Y XVI DE *Saccharomyces cerevisiae*
PARTICIPAN EN LA TOLERANCIA AL ESTRES
OSMOTICO.
CLONACION, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ANA ALEJANDRA ROMERO ARENAS



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

280575



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

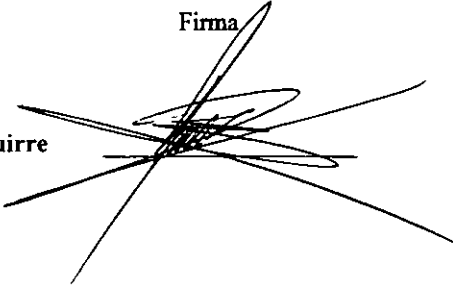

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Vocal	Prof. Eduardo Bonilla Espinosa
Secretario	Prof. Raquel Ortega Muñoz
1er. Suplente	Prof. Luciano Hernández Gómez
2do. Suplente	Prof. Teresa de Jesús Olivera Flores

Sitio donde se desarrolló el tema Laboratorio 105, edificio E, Facultad de Química,
Ciudad Universitaria
Avenida Universidad 3000 Delegación Coyoacán

	Nombre	Firma
Asesor del tema:	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre	
Sustentante:	Ana Alejandra Romero Arenas	

AGRADECIMIENTOS:

A mi asesor de tesis, Dr. Fernando Montiel, por compartir sus conocimientos, además de brindarme su valiosa amistad.

Al M. en C. Carlos Luna, por haber sido un guía importante en la elaboración de esta tesis.

Al jurado, por los consejos prestados que enriquecieron este trabajo.

DEDICATORIAS:

A mis padres Ana María y Miguel por impulsarme a lograr todos mis objetivos en la vida.

A mi novio Carlos G. por estar conmigo y esperando compartir todos los momentos de felicidad futuros.

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	v
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
1. ¿Qué es el estrés?	3
1.1. Adaptabilidad y homeostasis	3
1.2. Estrés	4
1.3. Resistencia y tolerancia al estrés	4
1.4. Tipos de estrés y agentes estresantes	4
2. Las sales como agentes estresantes. -	
¿Qué ocasiona la presencia de sales en el suelo?	5
2.1. Sal y suelo	5
2.2. Soluciones agrícolas adoptadas	6
3. ¿Estrés salino o estrés osmótico?	7
3.1. Estrés salino	7
3.2. Estrés osmótico	8
3.2.1. Osmosis y presión osmótica	8
3.2.2. Estrés osmótico	9
3.3. Efectos del estrés salino y osmótico	10
3.4. Tolerancia a estrés salino	10
4. ¿Qué es la osmorregulación?	11
4.1. Respuesta al estrés: osmorregulación	11
4.2. Importancia de los iones y el H ₂ O	12
4.3. Osmolitos y osmoprotectores	14
4.4. Otras formas de osmorregulación	18
5. ¿Por qué <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental?	18
5.1. Descripción de la levadura	18
5.2. Uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental	20

6. ¿Cómo se manifiesta el estrés en la levadura?	21
6.1. Generalidades	21
6.2. Objetivos, niveles de acción y jerarquía de - los efectos del estrés en levadura	23
6.3. Sensores de estrés	26
6.4. Genes de respuesta general al estrés	26
6.4.1. Factores de transcripción activados por estrés y - los elementos de ADN relacionados a ellos	27
6.4.2. Regulación negativa de la transcripción de - los genes de respuesta al estrés	28
6.5. Mecanismos generales de señalización	29
7. ¿Cuáles son los efectos del estrés osmótico y salino en la levadura?	32
7.1 Efectos causados por estrés osmótico	32
7.2. Características del estrés salino	34
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	36
V. MATERIALES Y METODOS	37
1. Material biológico	37
2. Medios y soluciones empleadas	37
3. Cosecha de células	39
4. Transformación de la cepa de levadura RS16(a) con ADN del banco genómico	39
5. Curvas de crecimiento	39
6. Rescate del plásmido. Extracción de ADN genómico y - plasmídico de clonas tolerantes a LiCl(250 mM)	40
7. Rescate del plásmido. Transformación genética de <i>Escherichia coli</i> - con ADN de clonas tolerantes	40
8. Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	41
9. Electroforesis en geles de agarosa	42
10. Restricción enzimática de ADN	43
11. Determinación del peso molecular del inserto en el plásmido aislado	44
12. Reverificación de fenotipo halotolerante.	44

13. Purificación de ADN plasmídico por medio de un gradiente de cloruro de cesio	44
14. Estudios de secuenciación del inserto plasmídico	45
15. Análisis estructurales y funcionales mediante el empleo de – bases de datos vía Internet	45
VI. RESULTADOS	46
1. Selección de transformantes auxotróficas en Medio Min/Leu	46
2. Resiembra de transformantes a Medio Min/Leu/LiCl (250 nM)	48
3. Selección de transformantes por su relativa rapidez de - crecimiento en un medio con LiCl (250 mM)	48
4. Estudios fisiológicos de las clonas tolerantes a la sal de - litio por medio de curvas de crecimiento	49
5. Extracción de ADN de levadura y su análisis por electroforesis	50
6. Rescate de los plásmidos mediante transformación – genética de <i>E. coli</i> con el ADN extraído de levadura	50
7. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> y su verificación por electroforesis	50
8. Caracterización inicial del ADN plasmídico por medio de restricción enzimática	50
9. Retransformación genética de levadura para verificación de fenotipo halotolerante	51
10. Caracterización estructural de los insertos de ADN por medio de - restricciones enzimáticas	51
11. Elaboración del mapa de restricción de las secuencias aisladas.	53
12. Estudio de la secuencia del ADN aislado	59
12.1. Secuenciación	59
12.2. Empleo de la base de datos - Saccharomyces Genome DataBase (SGDB)	59
12.3. Análisis de los marcos abiertos de lectura	63
VII. DISCUSIÓN	81
VIII. CONCLUSIONES	87
IX. REFERENCIAS	88
APÉNDICE I Formas de Osmorregulación	93

APÉNDICE II	Aspectos importantes de la secuencia STRE	96
AII.1.	Regulación positiva de la activación transcripcional mediada por STRE	96
AII.2.	Factores que actúan a nivel <i>trans</i> en la respuesta general al estrés	96
APÉNDICE III	Fenómenos que ocurren en la levadura durante el estrés osmótico	98
AIII.1.	Metabolismo de glicerol	98
AIII.2.	Transducción de señales bajo estrés osmótico	100
AIII.2.1.	Ruta MAP-cinasa	100
AIII.2.2.	Ruta HOG	102
AIII.2.3.	Ruta PKC	102
AIII.3.	Expresión génica bajo estrés osmótico	104
APÉNDICE IV	Fenómenos que ocurren en la levadura durante el estrés salino	105
AIV.1.	Genes que actúan en la tolerancia a estrés salino en levadura	105
AIV.2.	Sistemas de captación y salida de iones	106
AIV.3.	Integración de la regulación y señales de transducción en el estrés salino	107

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No.1	Efectos nocivos de la salinidad	10
Cuadro No.2	Características de algunos osmolitos	17
Cuadro No.3	Ejemplos de genes de respuesta al estrés en <i>S. cerevisiae</i> .	27
Cuadro AI-1	Proteínas de transporte de iones	93
Cuadro AI-2	Función de vacuolas	94
Cuadro AI-3	Transducción de señales y síntesis de proteínas	95
Cuadro AIII-1	Genes involucrados en la respuesta al estrés osmótico.	104
Figura 1	Ciclo de vida de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Figura 2	Diferentes tipos de estrés	21
Figura 3	Principales sitios de acción de la presencia de estrés en levadura	24
Figura 4	Jerarquía de las respuestas al estrés.	25
Figura 5	El control del crecimiento y del estrés son procesos - que se contrarrestan a un nivel molecular	29
Figura 6	Modelo hipotético de la acción de la PK-A como un - regulador de la respuesta general al estrés	31
Figura 7	Impacto del estrés hiperosmótico sobre células de - levadura y el mecanismo básico de respuesta.	32
Figura 8	Diferentes circuitos quimiosmóticos en animales, - plantas y microorganismos	34
Figura 9	Mapa de restricción del plásmido YCp50 y algunas - de sus características genéticas	47
Figura 10	Transformación y selección de transformantes en - <i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i> por YCp50	48
Figura 11	Curva de crecimiento de clonas transformantes de - levadura con un banco genómico	49
Figura 12	Verificación del fenotipo halotolerante a LiCl (250mM)	52
Figura 13	Verificación del fenotipo halotolerante a NaCl (1.2 M)	53
Figura 14	Análisis de restricción de los plásmidos aislados de levadura	54
Figura 15	Fragmentos de restricción del inserto aislado de - la levadura portadora de pXU300	55

Figura 16	Fragmentos de restricción del inserto aislado de - la levadura portadora de pXU400	56
Figura 17	Mapa de restricción de pXU300	57
Figura 18	Mapa de restricción de pXU400	58
Figura 19	Estudio inicial de la secuencia del fragmento de ADN de - la levadura portadora de pXU300	60
Figura 20	Estudio inicial de la secuencia del fragmento de ADN de - la levadura portadora de pXU400	61
Figura 21	Lista de similitud generada por el - National Center for Biotechnology Information	62
Figura 22	Secuencia completa del fragmento de ADN aislado (pXU300)	64
Figura 23	Secuencia completa del fragmento de ADN aislado (pXU400)	66
Figura 24	Mapa genético de la región clonada y vecinas del cromosoma VII	68
Figura 25	Mapa genético de la región clonada y vecina del cromosoma XVI	69
Figura 26	Secuencia y posible plegamiento secundario de - la proteína hipotética codificada por YGL037c	70
Figura 27	Secuencia de la hipotética proteína codificada por YGL036w	71
Figura 28	Gráfica donde se muestra el patrón de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las - proteínas hipotéticas codificadas por YGL037c (I) y YGL036w (II)	75
Figura 29	Secuencia y posible plegamiento secundario de - la putativa proteína codificada por YPL0146c	78
Figura 30	Gráfica donde se muestra el patrón de hidrofiliidad e hidrofobicidad de la - proteína hipotética codificadas por YPL146c	79
Figura 31	Resumen de las vías de señalización	97
Figura 32	Metabolismo del glicerol en levadura	98
Figura 33	Expresión de los genes GPD1 y GPD2	99
Figura 34	Vías de señalización MAP-cinasa en levadura	101
Figura 35	Modelo de la ruta-HOG en <i>S. cerevisiae</i>	102
Figura 36	La vía PKC en <i>S. cerevisiae</i>	103
Figura 37	Sistemas de transporte en levadura relevantes en - la tolerancia a la sal	106
Figura 38	Múltiples vía controlan la expresión génica en - <i>S. cerevisiae</i> bajo estrés salino	108

I. RESUMEN

Todo organismo viviente es capaz de soportar, hasta cierto nivel, una gran variedad de condiciones de estrés, tales como temperaturas extremas, falta de agua, falta de nutrientes, presencia de altas concentraciones de sal, etcétera. Bajo estas condiciones los organismos modifican su actividad metabólica de tal forma que tienden a contrarrestar los efectos dañinos de tales agentes denominados estresantes. Todo esto constituye una respuesta al estrés y abarca tanto la modulación de actividades enzimáticas como cambios en la expresión de genes.

Uno de los mayores problemas que existen dentro de la agricultura se debe al estrés que sufren las plantas por la presencia de altas concentraciones de sales en el suelo (especialmente NaCl) producto de la evaporación del agua de riego, estrés que trae como consecuencia una disminución en la productividad agrícola, problema de gran importancia en México ya que genera grandes pérdidas económicas.

La aplicación de técnicas de ADN recombinante y biología molecular como contribución a la solución de este problema puede llegar a tener un gran impacto sobre el mismo. Desgraciadamente, el conocimiento que se tiene sobre el estrés osmótico y sus señales de transducción aún es relativamente escaso y esto limita la aplicación de estas metodologías.

Un modelo experimental conveniente para los estudios de salinidad, es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La adaptación al estrés salino de esta célula eucariótica, es inducida por muchos genes, algunos de los cuales ya han sido identificados, pero quedan muchos más por ser descubiertos.

Para la identificación de nuevos genes que participan en la tolerancia al estrés por sal, recientemente se ha diseñado una nueva estrategia. Dicho procedimiento consiste en transformar genéticamente a la levadura con una biblioteca genómica del mismo microorganismo, seleccionando a las transformantes en un medio con sal (250 mM de LiCl o 1.5 M de NaCl).

Por medio de la selección de cepas de levadura tolerantes al estrés salino y su posterior extracción y aislamiento de ADN total (el cual contendría plásmidos recombinantes portadores de secuencias involucradas en la tolerancia al estrés salino) y uso de técnicas de biología molecular se lograría conseguir la identificación de esas nuevas secuencias de ADN que participan en la tolerancia al estrés por sal, para en un futuro lograr manipular estos genes de tal forma que se puedan clonar en plantas de interés agronómico e intentar hacerlas tolerantes al estrés salino.

Por medio de esta estrategia, se logró clonar a dos secuencias de ADN de *Saccharomyces cerevisiae* que le confieren tolerancia a las sales LiCl (250 mM) y NaCl (1.2 M). Estas secuencias portan marcos abiertos de lectura, uno del cromosoma VII y otro del cromosoma XVI, los cuales parecen codificar para polipéptidos con una serie de características estructurales que los podrían involucrar dentro del fenómeno de tolerancia al estrés salino.

II. INTRODUCCIÓN

1. ¿Qué es el estrés?

"Todo mundo sabe qué es el estrés, pero al mismo tiempo nadie sabe su significado preciso".
(Selye, 1973)

1.1. Adaptabilidad y homeostasis.

La adaptación es el conjunto de modificaciones estructurales y funcionales que a lo largo de la evolución han sufrido los organismos vivos para encontrar alimento, librarse de sus agresores, proteger su descendencia y, en pocas palabras, ajustarse al medio ambiente y a los cambios de éste.

En el transcurso de los millones de años de historia de la vida en la tierra, los ambientes en que viven los organismos han cambiado profundamente. La adaptación de una especie a estos nuevos ambientes se debe a la acción conjunta de las mutaciones genéticas y la selección natural. Por mutación aparecen, de vez en cuando, caracteres hereditarios nuevos, distintos a los existentes hasta entonces en los individuos de esa especie. Por selección natural, es decir, por la acción del ambiente sobre los diferentes individuos con caracteres distintos, sobreviven en mayor número los hijos de los individuos mejor adaptados, cuyos caracteres representan una ventaja para la supervivencia en el nuevo ambiente (Brow, 1992).

Por lo anterior podemos decir que la **adaptabilidad** es una característica particular de todos los organismos vivos y su base está presente desde la propia célula y su interacción con el medio que la rodea. Además, puesto que las funciones normales de ella dependen de la constancia de ese medio, no es de sorprender que la propia célula y todos los organismos hayan evolucionado hasta obtener diversos mecanismos de regulación para conservarse y adaptarse.

Ahora bien, W. B. Cannon en 1932 acuñó el término **homeostasis**, palabra del griego *homos*: similar y *stasis*: estado, para describir "las diferentes disposiciones bioquímicas y fisiológicas que sirven para restaurar el estado normal, una vez que este fue trastornado", es decir, el conjunto de fenómenos de autorregulación conducentes al mantenimiento de una relativa constancia en la composición y las propiedades del medio interno de un organismo; por lo tanto, autorregulación de la constancia de las propiedades de ciertos otros sistemas influidos por otros agentes exteriores (Ganon, 1994).

1.2. Estrés

Dentro del ámbito biológico podemos decir que todos los organismos están expuestos continuamente a diversos factores (físicoquímicos, biológicos o psicológicos) que representan agresiones y los hace generar una respuesta de adaptación conocida como **estrés**.

Como una respuesta de adaptación, el estrés genera una serie de modificaciones con el objetivo de identificar, alertar a otros sistemas e inclusive suprimir los cambios bioquímicos que han introducido en el organismo las agresiones que provienen del medio ambiente para finalmente lograr superarlos o sobrellevarlos.

1.3. Resistencia y tolerancia al estrés

La capacidad que presenta un organismo para sobrevivir a un factor desfavorable y crecer en su presencia es lo que se conoce como **resistencia** al estrés (Levitt, 1984).

Según Levitt, la resistencia al estrés presenta dos componentes: primero son las propiedades innatas, internas del organismo, las cuales se oponen (o resisten) a la producción de la alteración producida por el estrés específico y, segundo, el sistema de reparación que revierte la alteración.

Con base a lo anterior, los tipos de resistencia que señala Levitt son:

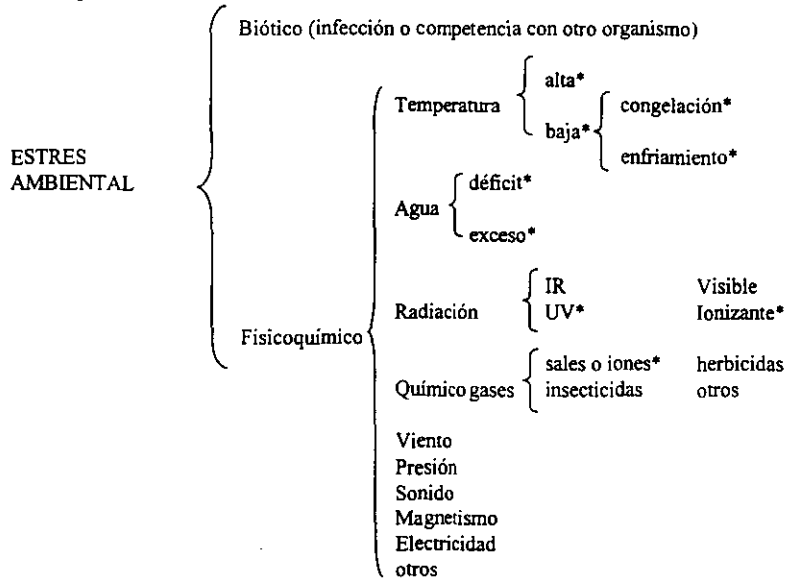
- 1) Disminuir el estrés presente que produce la alteración (por ejemplo, el organismo podrá sobrevivir a una disminución en la concentración de sal exterior). A esto se le llamó **evasión** del estrés, y lo que realiza es la prevención o disminución de la penetración del estrés. Esto, excluyendo al estrés completa o parcialmente, ya sea con barreras físicas (que aíslan a las células del estrés) o por un estado constante de exclusión del estrés (barrera química o metabólica).
- 2) Disminuir la alteración producida por el estrés (por ejemplo, el organismo logrará sobrevivir a un aumento en la concentración de sal exterior). Lo realiza permitiendo la interacción del agente estresante con el fin de que éste disminuya o respondiendo a la alteración, es decir, **tolerándolo**.

Por lo anterior, la tolerancia al estrés es una clase de resistencia a dicha situación caracterizada por la habilidad de llegar a un equilibrio termodinámico entre el estrés exterior y sus propias funciones internas sin sufrir daño. Un organismo tolerante al estrés es capaz de prevenir, disminuir o reparar el daño producido por la tensión ejercida por dicho estrés.

1.4. Tipos de estrés y agentes estresantes

Cualquier factor del medio potencialmente desfavorable para los organismos es potencialmente estresante (Levitt, 1984).

Los tipos de estrés ambiental y los agentes estresantes a los cuales un organismo puede estar sujeto se muestran a continuación:



* se conoce un tipo de resistencia contra estas formas de estrés.

2. Las sales como agentes estresantes. ¿Qué ocasiona la presencia de sales en el suelo?

"La aparición de NaCl como un factor de estrés es un evento reciente en la evolución de los sistemas vivos".
 (Hohmann, 1997).

2.1. Sal y suelo

Dentro de las más fuertes de las presiones selectivas que existen destacan aquellas que los organismos experimentan en forma de estrés hídrico-ambiental, es decir, por fluctuaciones en salinidad, desecación o congelación, variaciones de temperatura, etc. (Yancey, 1982). Es de suponer que la selección en la evolución vegetal se ha dado más fuertemente por la carencia de agua, de tal forma que la capacidad para competir con esta insuficiencia hídrica es determinante en la distribución natural de las plantas en general, así como de las especies económicamente útiles en particular (Hanson, 1982).

Sabemos bien que desde hace siglos se ha adicionado agua al suelo (riego artificial) para sostener la producción agrícola del mismo. Por desgracia, las tierras cultivables por riego están frecuentemente asociadas a un nivel de evaporación elevado en regiones áridas y semiáridas.

Además, el agua de riego contiene sales disueltas las cuales después de la evaporación del agua llegan a concentrarse más y más en el suelo, lo que provoca la acumulación de grandes cantidades de sales en la superficie del terreno irrigado. En general, los cultivos son sensibles a altas concentraciones de sales, particularmente NaCl. Esta sal inhibe el crecimiento vegetal y es la que se encuentra en mayor proporción en este tipo de tierras. Ello ocasiona la consecuente disminución en el rendimiento agrícola del mismo (Fitzpatrick, 1984; Evans *et al.*, 1983).

Con la excepción de especies halofíticas, las cuales toleran el agua de mar, lo cual probablemente se deba a adaptaciones secundarias, la mayoría de las plantas no toleran una salinidad mayor del 10-20% de agua de mar, aproximadamente 50-100 mM NaCl (Downton, 1984 citado por Serrano, 1996).

2.2. Soluciones agrícolas adoptadas

Existen básicamente tres estrategias generales para enfrentar la salinización de los suelos.

Una de ellas es la aplicación de la ingeniería agrícola, por medio de la desalinización (lavado de dichos suelos), pero ésta es de un elevado costo e impráctica en países en vías de desarrollo.

La segunda metodología empleada es el uso de la genética clásica, la cual no requiere de conocimientos básicos de los mecanismos del fenómeno que se considera. sólo necesita plantas de la misma familia que tengan el fenotipo y genotipo deseado, los cuales posteriormente serán transferidos por cruza.

Se han identificado genes halotolerantes en plantas superiores por medio de análisis genético clásico: cruza y selección. Sin embargo, la clonación de genes por complementación del fenotipo deseado es aún una tarea laboriosa en estos organismos (por lo complejo de sus genomas). Por lo tanto estos genes halotolerantes sólo pueden ser usados para cruza entre especies relacionadas de plantas, así que esta segunda estrategia es poderosa y eficiente, pero necesita de la inversión de una gran cantidad de tiempo.

En estos casos, para la aplicación de la ingeniería genética y la manipulación directa de genes involucrados en el fenómeno de adaptación, es esencial un conocimiento básico del fenómeno (Serrano, 1996).

El análisis genético de un fenómeno tan complejo como la tolerancia a la sal requiere del aislamiento de mutantes que presenten ya sea un incremento o una disminución de la tolerancia a la sal. Los genes responsables de las mutaciones necesitan ser aislados, mientras que el estudio de las proteínas codificadas por dichos genes identifican pasos cruciales en la tolerancia a la sal. Este

análisis mutacional es posible sólo en pocos modelos experimentales donde las mutantes pueden ser fácilmente seleccionadas y los genes afectados aislados. Las plantas agrícolas no pertenecen a estos sistemas. Las bases moleculares de estos sistemas necesitan ser investigadas en los organismos modelo y la información obtenida necesita ser transferida a las plantas de interés (Serrano, 1996).

Como tercera y más reciente metodología se han aplicado, de manera complementaria, las técnicas de biología molecular al mejoramiento genético de diversos organismos. Pensando en lo anterior, se podrían generar plantas transgénicas, ya que se cuenta con la metodología necesaria. Sin embargo, existe un factor limitante que es el aislamiento de genes con la capacidad de incrementar la tolerancia a la sal: genes halotolerantes (Gaxiola *et al.*, 1992).

Se han seguido dos diferentes metodologías para aislar genes halotolerantes. Una de ellas, basada en la clonación de genes de función desconocida inducidos por estrés salino, y la otra basada en el estudio de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos que funcionan como osmoprotectores u osmolitos compatibles (ver más adelante) en procariotes y eucariotes. Sin embargo, es posible que algunos de los genes estén involucrados en respuestas no específicas del estrés. Además la acumulación de estos osmolitos no siempre se correlaciona con la tolerancia a sales (Gaxiola *et al.*, 1992).

La búsqueda de genes susceptibles de ser modificados (sobre-expresión, sobre-activación por mutaciones puntuales, etc.) para incrementar la tolerancia a la sal ha resultado una estrategia satisfactoria para el aislamiento de dichos genes, además de que se podrían identificar procesos críticos del fenómeno de tolerancia.

Entre las especies sensibles a la sal y las tolerantes existe una gran diversidad. Esta variabilidad genética sugiere que la ingeniería genética tiene el potencial necesario para mejorar la tolerancia a las sales en los cultivos. (Rains *et al.*, 1980 citados por Gaxiola *et al.*, 1992)

3. ¿Estrés salino o estrés osmótico?

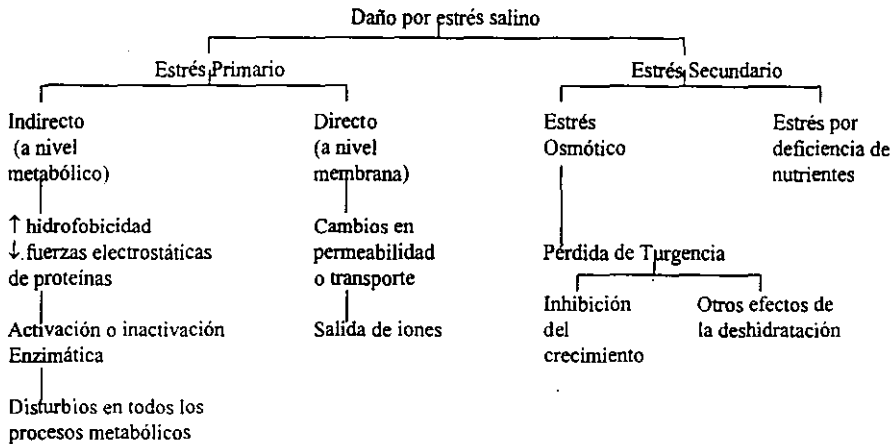
"Existe una relación directa e inseparable entre el estrés hídrico y el estrés causado por la presencia de sales". (Levitt, 1984)

3.1. Estrés salino

Un cambio en la concentración de sales en el medio externo produce la entrada o salida de agua en la célula para promover un equilibrio entre las concentraciones interna y externa de solutos, lo que produce un cambio inicial en el volumen celular (Csonka, 1991).

El estrés salino es producto de la presencia de sal en un medio con un menor potencial osmótico (agua), lo cual induce un efecto secundario nocivo (estrés osmótico) al generar una deshidratación osmótica, disminución en el volumen celular, así como en el potencial acuoso y osmótico; también se producirá una deficiencia en la toma de nutrientes por la competencia entre las sales e iones importantes para la célula. Pero el efecto primario es la toxicidad de la sal, ya sea a nivel de membrana o a nivel metabólico (Levitt, 1984).

En el siguiente esquema se muestran los posibles efectos dañinos causados por un estrés salino (tomado de Levitt, 1984).



3.2. Estrés osmótico

3.2.1. Ósmosis y presión osmótica

Cuando se disuelve una sustancia en agua, la concentración de las moléculas de agua en solución es menor que la del agua sin solutos disueltos, ya que al añadir un soluto al agua da por resultado una solución que ocupa un volumen mayor que el agua por sí sola.

Si la solución se coloca a un lado de una membrana que sea permeable al agua, pero no al soluto, y se coloca un volumen igual de agua en el otro lado, las moléculas de agua se difundirán por el gradiente de concentración hacia la solución. Este proceso, la difusión de moléculas de solvente hacia la región en la que hay concentraciones elevadas de un soluto al cual es impermeable la membrana, se llama **ósmosis**.

En los sistemas vivos el solvente fundamental es el agua. Es posible impedir la tendencia de las moléculas de solvente a desplazarse hacia las regiones de mayor concentración de soluto

aplicando una presión a la solución más concentrada. La presión necesaria para impedir la emigración del solvente es la **presión osmótica**.

Una célula puede ser sometida a tres tipos de soluciones osmóticas:

isotónica, (*iso*:igual), donde la concentración total de solutos es la misma a ambos lados de la membrana.

hipotónica, (*hipos*:menor o por debajo), se trata de un medio con una concentración de soluto menor que la que hay en el interior de la célula, por lo tanto penetra agua al interior de la célula por ósmosis y la célula incrementa su volumen e inclusive puede reventar.

hipertónica, (*hiper*:por encima), es un medio con una concentración de solutos superior a la de la célula. La mayoría de las células, al ser colocadas en este medio se colapsan porque el agua abandona por ósmosis a la célula.

Las partículas osmóticamente activas son aquellas que por sus características fisicoquímicas funcionan como solutos para dar el fenómeno de ósmosis; entre ellas se encuentran la glucosa, sales, etc..

3.2.2. Estrés osmótico

El estrés osmótico es el producto de la presencia de organismos no adaptados en un medio en el que varía la concentración de partículas osmóticamente activas, como las sales, de tal forma que, al aumentar su concentración en el medio externo (el medio se volverá una solución hipertónica) se pierde la osmolaridad, así que se pierde la turgencia celular (Evans *et al.*, 1983). Lo anterior provoca una contracción del volumen citoplásmico de tal forma que se observará aumentada la concentración de metabolitos intracelulares y disminuirá la actividad de agua citoplásmica.

En términos fisiológicos el estrés osmótico se define como un decremento en la actividad de agua (termodinámicamente disponible) o del potencial acuoso del medio. Una consecuencia de un decremento en el potencial externo del agua es la salida rápida de moléculas de agua de la célula hacia el medio. Si la deshidratación celular es severa (después de un cambio a un medio con alta concentración de sal), la célula exhibe un colapso dramático, paro del crecimiento y muerte celular. Un cambio no tan severo afectará fuertemente funciones celulares esenciales, como toma de nutrientes, biosíntesis de proteínas y la actividad de varias enzimas. Además de la poca disponibilidad de moléculas de agua, habrá un aumento en la concentración de solutos internos, así como entrada de solutos tóxicos (por ejemplo, Na^+) y pérdida de componentes del citoesqueleto, etc. (Levitt, 1984).

3.3. Efectos del estrés salino y osmótico

La salinidad tiene dos posibles efectos tóxicos en las células: el efecto osmótico no específico y la toxicidad específica de los iones sobre sistemas celulares definidos. Para controlar esta amenaza, los organismos desarrollan defensas basadas en ajuste osmótico, sistemas de transporte de iones y proteínas de defensa al estrés (Serrano, 1996). En el siguiente cuadro se muestran algunos de los efectos tóxicos ion-específicos y osmóticos provocados por la salinidad.

Cuadro No.1 Efectos nocivos de la salinidad

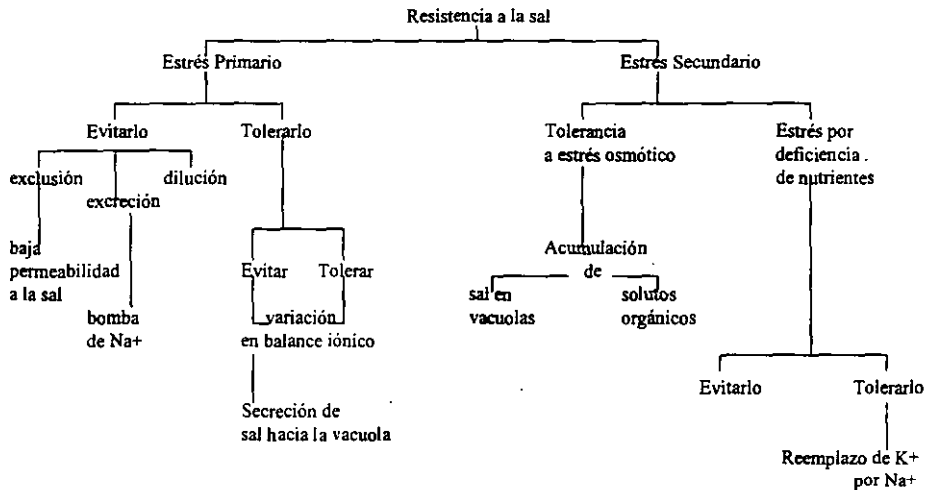
ORGANISMO	OBSERVACIONES
<i>E. coli</i>	Presenta sobre todo un efecto osmótico por NaCl. Bajo condiciones normales el ajuste osmótico limita la tolerancia a la sal, pero a veces la capacidad de ajuste osmótico es relativamente menos potente que la capacidad para sacar Na^+ . Además un sistema antiporte $\text{Na}^+\text{-H}^+$ mantiene la concentración de sodio intracelular lo suficientemente baja para evitar un efecto tóxico.
<i>S. cerevisiae</i>	La toxicidad por Na^+ es el mayor problema causado por salinidad en un medio con glucosa como fuente de carbono. Esto como resultado de un ajuste osmótico activo con una salida de Na^+ no muy eficaz. Tal vez se deba a que un metabolismo elevado de glucosa da por resultado una síntesis óptima del osmolito glicerol. En un medio con una fuente de carbono diferente a la glucosa sucede lo contrario y el Na^+ , K^+ y sorbitol presentan un efecto tóxico similar, lo que indica que se trata de un daño por efecto osmótico. La toxicidad por el ion Cl^- no ha sido observada
Plantas	El efecto no es muy claro, pero se reportan fases alternadas de toxicidad y ajuste osmótico, diferentes para cada especie de planta. Lo que resulta en que para mejorar la tolerancia a la sal en plantas de interés agrícola será necesario manipular simultáneamente el ajuste osmótico y el transporte de iones.

3.4. Tolerancia a estrés salino

Como la membrana celular es permeable al agua, no es posible, para las células creciendo en un medio acuoso, evitar el posible estrés osmótico ocasionado por la solución que las rodea. Así que la primera respuesta a la elevada salinidad es la pérdida de turgor y si ésta es severa, de la habilidad para crecer (Levitt, 1984).

La célula puede tolerar la deshidratación (permitiendo la supervivencia de la célula pero sin un crecimiento y manteniendo la pérdida de turgor), o evitar la deshidratación (permitiendo una rehidratación, restableciendo el turgor y el crecimiento)

El siguiente esquema muestra los posibles diferentes tipos de resistencia al estrés (tomado de Levitt, 1984):



4. ¿Qué es la osmorregulación?

"La supervivencia de las células depende de la habilidad que presenten para percibir las alteraciones de su ambiente y de la capacidad de responder a esa situación".

(Hohmann, 1997)

4.1. Respuesta al estrés: osmorregulación

Los mecanismos de respuesta al estrés tienen por objetivo proteger a las células contra los efectos potencialmente nocivos provocados por el estrés y reparar cualquier daño molecular. Es así como la respuesta al estrés permite el ajuste del metabolismo y otros procesos celulares hacia un nuevo estado. De acuerdo con el significado biológico de la respuesta al estrés, ésta no solo tiene por resultado la reparación del daño ocurrido sino que también permite la adquisición de la tolerancia al mismo y por lo tanto el establecimiento de mecanismos que previenen el daño que posteriormente podría ocurrir. La exposición previa a un estrés moderado genera un incremento en la respuesta contra un estrés severo. Como resultado de la respuesta al estrés, la célula sintetiza un número de proteínas a diferentes niveles y/o con actividades diferentes que antes del estrés se encontraban presentes en bajos niveles (Hohmann, 1997).

La exposición de las células a determinado agente estresante provoca la activación de mecanismos moleculares que en un estado normal actúan en procesos homeostáticos.

Según Evans, la **osmorregulación** es la regulación del potencial osmótico interno de una célula por adición o eliminación de solutos en solución para evitar la deshidratación hasta un punto en el que el potencial osmótico intracelular sea aproximadamente igual al potencial osmótico del medio que rodea a la célula (Evans *et al.*, 1983).

Una de las formas de restablecer un equilibrio entre el potencial osmótico interno y externo es el resultado de un aumento en el contenido de los solutos celulares. Este aumento debe de ser lo suficientemente elevado como para disminuir el potencial osmótico (el basal), por debajo del de su ambiente acuoso, sin la interrupción de procesos celulares basales (Evans *et al.*, 1983).

Con base a lo anterior, el proceso por el que se mantiene el turgor celular por medio de un aumento suficiente en solutos celulares para compensar un estrés osmótico externo es llamado osmorregulación (Levitt, 1984). Es uno de los aspectos mejor estudiados de la respuesta al estrés osmótico que implica desde la activación de genes, pasando por la síntesis de proteínas específicas de respuesta al estrés y otras no tan específicas, hasta la formación de solutos. Todos estos procesos participan como una respuesta conjunta de osmorregulación.

4.2. Importancia de los iones y del H₂O

Todos los organismos vivos son absolutamente dependientes del agua para su existencia. La importancia del agua para las células vivas refleja tanto sus propiedades químicas como las físicas. El agua es el disolvente omnipresente en las células. Es un disolvente excelente para sustancias polares o iónicas y es el medio en el cual tienen lugar la mayor parte de las reacciones metabólicas. El fenómeno de ionización o disociación del agua y su participación en reacciones ácido-base es fundamental para las funciones de las proteínas y de los ácidos nucleicos. Además, las formas mismas de las proteínas y de los ácidos nucleicos, así como la estructura de las membranas biológicas, son consecuencia directa de su interacción con el agua (Rawn, 1991). Finalmente, el agua contenida en las células determina el turgor y, más allá, el tamaño y la forma de la misma y por consiguiente de un organismo entero. Gracias a estas funciones las células necesitan mantener y controlar su contenido de agua entre ciertos límites (Hohmann, 1997).

Debido a su polaridad y a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno, el agua interacciona rápidamente con los solutos polares, disminuyendo las interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno entre las moléculas de solutos.

Los iones en disolución alteran la estructura del agua líquida mediante dos formas posibles. Los iones desestructurantes (CNS^-) disminuyen el orden interno del agua, aumenta su entropía y movilidad: por el contrario, los iones estructurantes (PO_4^{3-} , hidrocarburos) aumentan el orden interno del agua, disminuyendo su entropía y movilidad (Rawn, 1989).

Los compuestos iónicos son solubles en agua porque la atracción entre los iones positivos y negativos y las moléculas de agua es superior a la atracción mutua entre los iones de carga contraria.

Las moléculas de bajo peso molecular, ya sea iones inorgánicos o moléculas orgánicas pequeñas presentes en todas las células forman parte del medio interno en donde se llevan a cabo las reacciones bioquímicas de los sistemas vivos. Por lo tanto es posible que la composición de solutos en las células haya sido sujeta a una severa selección (Yancey, 1982).

A pesar de que muchas funciones bioquímicas necesitan de iones inorgánicos específicos, un incremento en la concentración de estos iones por arriba de su concentración intracelular basal provoca un daño en dichas funciones. Las sales afectan la velocidad catalítica y la constante de Michaelis, K_M . Lo anterior sugiere fuertemente que, un aumento en la concentración intracelular de sales durante un estrés osmótico puede afectar seriamente las funciones metabólicas, así como el mantenimiento de un potencial transmembranal adecuado, por un cambio en las proteínas de membrana. Por lo anterior, estos osmolitos primarios, que aparecen durante el estrés salino o hídrico parecen ser una adaptación subóptima (Yancey, 1982), si los comparamos con otros osmolitos que se consideran posteriormente.

A continuación se muestra la serie de Hofmeister para iones (Yancey, 1982) la cual indica qué iones presentan capacidades estabilizantes o desestabilizantes en los sistemas biológicos:

	ESTABILIZANTES	DESESTABILIZANTES
ANIONES	F^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^-	Cl^- , Br^- , I^- , CNS^-
CATIONES	$(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$, $(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2^+$ NH_4^+	K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}

También podemos señalar que un aumento en la concentración de sal (NaCl 50-150 mM) tiene efectos positivos en muchas enzimas por sus efectos electrostáticos sobre la estructura proteica. Estos efectos corresponden a la fuerza iónica del citoplasma, así que las enzimas están adaptadas para funcionar de forma óptima bajo estas condiciones, donde la hidratación es aumentada y la capa eléctrica sobre la superficie de las proteínas es suprimida. Un aumento en la concentración de sal (más de 0.3-0.5 M de NaCl) inhibe a la mayoría de las enzimas al perturbar el

balance hidrofóbico electrostático que existe, y que es una de las fuerzas que mantiene la estructura proteica. Algunos sistemas enzimáticos pueden ser sensibles a más bajas concentraciones de sales, reflejando interacciones específicas entre sitios de unión e iones (Wyn Jones y Pollard, 1983, citado por Serrano, 1996).

Una elevada fuerza iónica aumenta la fuerza hidrofóbica (fenómeno de salting-out) y disminuye la fuerza electrostática (fenómeno de screening). Una alta concentración de alguno de los iones que mencionamos anteriormente como desestabilizante rompe la estructura acuosa y provoca un decremento de las interacciones hidrofóbicas (fenómeno de salting-in). En sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NaCl, el efecto predominante es el de salting-out (Wyn Jones y Pollard, 1983, citado por Serrano, 1996).

Cabe señalar que un incremento en la captación de K^+ es beneficiosa para la tolerancia a la sal, porque el K^+ contrarresta los efectos inhibitorios de Na^+ en los sistemas enzimáticos (Serrano, 1996).

4.3. Osmolitos y osmoprotectores

Una de las formas en que la célula responde a un estrés osmótico es incrementando la concentración de un número limitado de moléculas de bajo peso molecular para restaurar alguna de las condiciones en las que se encontraba antes de sufrir el estrés. Estas moléculas parecen no inhibir los procesos celulares, además de mantener el volumen celular normal sin un incremento destructivo en la concentración intracelular de iones inorgánicos (Burg, 1995). Se han denominado **osmolitos o solutos compatibles** (Levitt, 1984).

Los osmolitos que pueden ser tomados del medio externo, en lugar de ser sintetizados por la célula estresada, son denominados **osmoprotectores** (Le Rudelier *et al.*, 1984).

Se ha encontrado una extraordinaria evolución convergente en las propiedades de los sistemas de los osmolitos, tanto en bacterias, plantas y animales. Esto refleja las restricciones fundamentales de los tipos de solutos que son compatibles con las macromoléculas. La halobacteria es la excepción en las estrategias osmóticas encontradas en los otros organismos contemporáneos (Yancey, 1982).

Por medio de dos teorías complementarias se explica por qué se realiza la acumulación de los osmolitos celulares bajo un estrés osmótico (Burg, 1995):

1) Principio de los osmolitos compatibles, en el cual se presupone que los osmolitos compatibles son, al menos en parte, seleccionados porque ellos tienen efectos estabilizantes o no perturbadores en las funciones de las macromoléculas, bajo un amplio rango de concentración, lo cual no sucede

con los solutos no compatibles como KCl o NaCl, de tal forma que las células pueden adaptarse en forma segura a la hipertonidad. Además, se cree que la concentración total de osmolitos es lo que importa y no las propiedades específicas de cada uno de ellos, así que debe de existir una coordinación para la acumulación de los diferentes osmolitos.

2) Principio de los osmolitos neutralizadores, el cual predice que las células expuestas a una alta concentración de algún osmolito no compatible o tóxico, provoca la acumulación de otro osmolito que lo contrarresta, caso que se ha observado con la urea vs. metilamina.

Algunas de las principales características que presentan los osmolitos compatibles se enlistan a continuación:

Los osmolitos intracelulares son completamente diferentes a los osmolitos extracelulares.

En eucariotes, las concentraciones de K^+ intracelular varían poco a pesar de grandes variaciones en la presión osmótica.

La mayoría de los osmolitos en eucariotes están restringidos a pocas clases de productos metabólicos de bajo peso molecular.

El alto grado de evolución convergente que ha ocurrido, ocasionó que cada categoría de osmolito está contenida en especies que pertenecen a un solo *phylum*.

No sólo son sintetizados bajo estrés osmótico sino también bajo otros tipos de estrés.

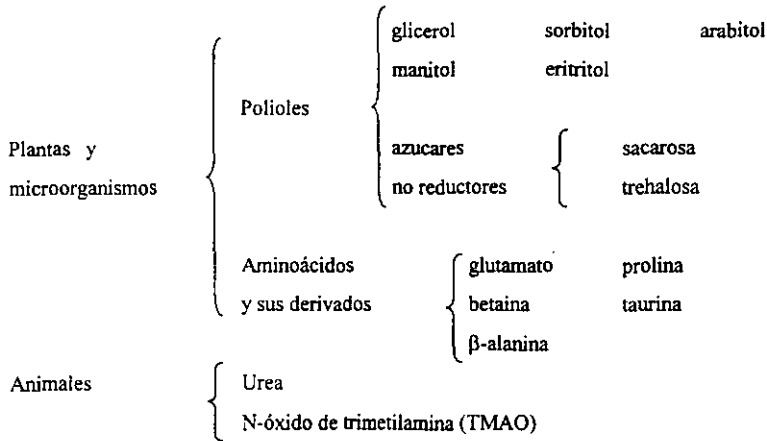
Ayudan a mantener el estado nativo de las proteínas (estabilización) al ser excluidos de su superficie y así interactúan con las moléculas de agua, manteniendo la poca exposición al agua de la superficie proteica. Pueden afectar grupos cargados, polares o no polares de una proteína de tal forma que disminuye o aumenta su afinidad por el solvente y alteran algún punto intra o intermolecular. También existe evidencia de que ciertos osmolitos actúan cambiando las propiedades del agua, e incluso en el movimiento translacional de las moléculas de agua. Pueden también interactuar directamente con las macromoléculas.

En las membranas, interaccionan con la cabeza polar de los fosfolípidos y mantienen a la membrana en un estado líquido-cristalino durante la deshidratación.

Ninguno contiene una carga positiva, así que no pueden formar complejos con los metabolitos cargados negativamente.

Por las características anteriores es de esperarse que pocas clases de osmolitos, encontrados en la naturaleza como osmolitos compatibles, compartan la habilidad de proveer de ambientes compatibles con estructuras y funciones macromoleculares (Yancey, 1982).

A continuación se muestran los principales osmolitos que existen:



- POLIOLES.- Brown y colegas introdujeron por vez primera el término de solutos compatibles (los cuales no son necesarios para el metabolismo) con las observaciones basadas en sus experiencias con la acumulación de glicerol en presencia de sal en el alga *Dunaliella viridis*. Los polioles son osmolitos celulares comunes, ayudan en la retención de agua, permaneciendo compatibles con las funciones de las macromoléculas (Yancey, 1982).
- AMINOÁCIDOS Y SUS DERIVADOS: Son los solutos predominantes en bacterias tolerantes a la sal (excepto las halófilas extremas), plantas halófitas, invertebrados y otros animales. No todos los aminoácidos son solutos compatibles, pero los que sí lo son, presentan una alta compatibilidad con las funciones proteicas (Yancey, 1982).
- UREA Y METILAMINAS.- La urea aparece en varios organismos, donde es un producto importante del metabolismo nitrogenado y es acumulado por algunas especies como el osmolito intracelular predominante, a pesar de que, a bajas concentraciones presenta efectos fuertemente perturbadores sobre las macromoléculas. Las metilaminas (TMAO, betaina y sarcosina) son osmolitos que actúan como potentes neutralizadores de los daños que la urea produce sobre las proteínas. La adopción de este sistema osmótico evita la necesidad de desarrollar proteínas modificadas especialmente para funcionar en presencia de una alta concentración de urea y metilaminas. Se ha encontrado también que las metilaminas pueden contrarrestar los efectos de las sales. El grado de metilación del átomo de nitrógeno determina la efectividad de la metilamina (Yancey, 1982).

Finalmente, por medio de la acumulación de solutos compatibles o solutos neutralizadores, los organismos sometidos a un estrés osmótico pueden adquirir simultáneamente un mecanismo adaptativo más "simple" genéticamente y, temporalmente, más flexible. Además, el hecho de existir una evolución convergente de los sistemas de osmolitos, puede reflejar dos factores. Uno es el hecho de que las interacciones fisicoquímicas entre los solutos, el agua y las macromoléculas presenta ubicuidad, lo cual establece los tipos de solutos que son compatibles con la estructura y función de las macromoléculas. El segundo factor es que el uso de solutos compatibles permite que las proteínas realicen sus funciones en presencia de altas o variables concentraciones de solutos y así se evita la modificación de un gran número de proteínas.

El siguiente cuadro muestra algunos osmolitos que han sido estudiados:

Cuadro No. 2 Características de algunos osmolitos

ORGANISMO	OSMOLITO	OBSERVACIONES
<i>E. coli</i>	glutamato	Contribución pequeña al ajuste osmótico y sin papel fisiológico demostrado. Parece ser sintetizado cuando la enzima glutamato deshidrogenasa es activada en un medio intracelular fuertemente iónico.
	trehalosa	Presenta un operón, inducido por estrés osmótico y fase estacionaria y contribuye a desarrollar termotolerancia, que regula la expresión de dos enzimas de su vía biosintética.
	betaina prolina	Son osmoprotectores. Su acumulación es inducida por estrés osmótico, con la participación del operón proU que codifica para un transportador de alta afinidad para betaina y menos afinidad por prolina.
<i>S. cerevisiae</i>	glicerol	Su acumulación es la responsable de la mayor parte de los ajustes osmóticos de la célula.
	trehalosa	Un estrés calórico induce la formación de un complejo enzimático provocando la síntesis de trehalosa, así que se considera un termoprotector, pero no se ha descubierto su participación en la tolerancia osmótica.
Plantas superiores	sacarosa	Se ha observado su presencia en la tolerancia a la desecación en polen y en el ajuste osmótico del tabaco.
	prolina trehalosa	Son parte de la respuesta general de la mayoría de las plantas bajo estrés osmótico, su síntesis aumenta bajo dicho estrés y participan también como osmoprotectores en algunas plantas.

4.4. Otras formas de osmorregulación

La respuesta al estrés es muy variada e implica la aparición de muchos procesos bioquímicos, fisiológicos y moleculares diferentes para cada organismo. En el Apéndice I se muestran los cuadros que resumen algunos de los conocimientos que existen sobre otras formas de osmorregulación en bacterias, levadura, y plantas (Serrano, 1996).

5. ¿Por que *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental?

5.1. Descripción de la levadura

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un eucariote unicelular perteneciente al reino Fungi, presenta una forma oval y su tamaño es mayor que el de una bacteria. Su núcleo, que contiene el material genético, está rodeado por una membrana nuclear y es pequeño, a pesar de que su número haploide de cromosomas es de 16. En promedio, los cromosomas son menores en comparación con el cromosoma de *E. coli*. Presenta esteroides en la membrana celular. Su pared celular está compuesta de los polisacáridos glucanos y mananos; no presenta quitina. Tiene generalmente una vacuola prominente. Sus mitocondrias varían en número y forma, pero algunas están presentes con una forma más larga y extendida que el resto. Es un organismo quimioheterótrofo anaerobio facultativo (Tortora *et al.*, 1992; Carlile y Watkinson, 1997).

Respecto a su metabolismo sus células son capaces de crecer en condiciones anaeróbicas, usan oxígeno o compuestos inorgánicos como aceptores finales de electrones. *Saccharomyces cerevisiae* (cuyo significado es "hongo de azúcar"), metaboliza glucosa vía el ciclo glicolítico (Embden-Meyerhof) a piruvato. Si el oxígeno está presente, las levaduras llevarán a cabo una respiración aerobia y el piruvato puede ser oxidado vía ciclo del ácido tricarbóxico a CO₂ y H₂O. En ausencia de oxígeno o una elevada concentración de azúcar, ocurre una fermentación alcohólica de los carbohidratos, con etanol y CO₂ como productos (Carlile y Watkinson, 1997).

Debido a que la mayoría de las levaduras son colonias de organismos unicelulares, ellas no se reproducen como una unidad. En su lugar las colonias crecen conforme aumenta el número de células. Este incremento ocurre por gemación, en la cual la célula madre forma una protuberancia (gema) sobre su superficie. Conforme la gema se elonga, la célula madre divide su núcleo y uno de ellos migra hacia la gema. El material de la pared celular es después restablecido entre la gema y la célula madre, y la gema se libera. Una célula puede producir a la vez más de 24 gemas. Una gema al inicio es pequeña pero rápidamente crece hasta alcanzar el mismo tamaño que la célula madre.

Existen dos tipos de células que se aparean y son designadas como α y a .

En *S. cerevisiae* la reproducción asexual, en la cual las células diploides o haploides se dividen por mitosis pueden permanecer por varias generaciones. En la levadura los periodos de reproducción asexual se alternan con los de reproducción sexual en la cual dos células haploides se unen para formar un cigoto. Una representación del ciclo vital de *S. cerevisiae* la podemos observar en la figura No.1.

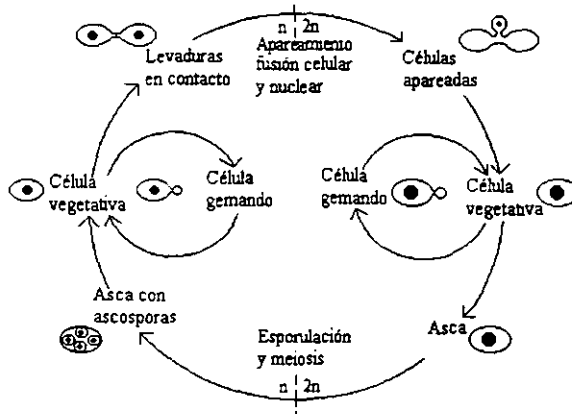


Fig. 1. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (tomada de Tortora *et al.*, 1992).

La superficie de las plantas es el hábitat más común de las levaduras. En este lugar las levaduras tienen que competir con las bacterias, cuyo crecimiento es más rápido. Aunado a esto, gotas o películas de líquido en la superficie de las plantas y animales presentan una rápida evaporación, provocando una elevación en la concentración de solutos y, más aún, desecación. Adicionalmente la lluvia o el rocío, pueden provocar una dilución de solutos. Por lo anterior los microorganismos que se encuentran sobre la superficie de las plantas y animales se encuentran en una constante lucha para lograr sobrevivir y son propensos a sufrir fluctuaciones violentas en el potencial del agua ambiental (Carlile y Watkinson, 1997).

Con base a lo anterior es de suponer que cuando las levaduras han tenido que sobrevivir a largos periodos en ausencia de un ambiente acuoso lo hacen en forma de esporas. La levadura sólo se multiplicará en presencia de una solución con azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, iones y otros nutrientes. Si la célula es sometida a variaciones drásticas de disponibilidad de agua, necesita mecanismos que respondan rápidamente para mantener a la célula con vida y regresar a un estado normal de productividad lo más pronto que sea posible. Así que no sólo debe poseer mecanismos

que capten y responden a alteraciones en la osmolaridad externa, sino que también debe de ser capaz de mantenerse con vida ante sus propias actividades metabólicas (como durante su metabolismo fermentativo) (Hohmann, 1997).

5.2. Uso de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental

Tomando como base la descripción de la levadura, podemos decir que ésta posee todos los mecanismos que una célula eucariótica requiere para responder y adaptarse a cambios en la osmolaridad de su ambiente.

Saccharomyces cerevisiae tiene un genoma de sólo 15 000 Kb de tamaño (cuatro veces mayor que el de *E. coli*), presenta técnicas de transformación genética sencillas, se han aislado sus orígenes de replicación cromosomal y ahora el conocimiento de su genoma ya es completo, además de que sus genes pueden ser aislados en muchas formas, fácilmente retirados o mutados específicamente así como expresados a altos o bajos niveles o condicionadamente. Estas son algunas de las cualidades únicas que la hacen ser uno de los microorganismos más útiles y preferidos en las técnicas de ADN recombinante aplicados a campos de investigación muy diversos (Rose, 1987 y Hohmann, 1997).

No existe otro eucariote el cual presente detalladamente características tan claras de su biología molecular, celular e inclusive de su ciclo de vida, transducción de señales, expresión génica, transporte y desnaturalización de proteínas, biogénesis de organelos y muchos otros aspectos, como *S. cerevisiae*. Adicional y probablemente una de las características más importantes y representativas del alcance en el uso de esta levadura como modelo experimental, es el hecho de que los genes de eucariotes superiores pueden ser expresados funcionalmente en levadura. Este hecho ha abierto la posibilidad de una nueva era en la genética de levadura que es el análisis genético de sistemas eucariotes superiores empleando un eucariote más sencillo y de fácil manejo: la levadura misma. Ya que los mecanismos que operan en la levadura ocurren en eucariotes más complejos, levaduras mutadas en mecanismos de respuesta al estrés pueden ser complementadas por genes de eucariotes superiores o de ella misma, sugiriendo una evolución conservada tanto funcional como estructural (Hohmann, 1997).

Con base en lo anterior, la levadura puede servir como un modelo conveniente para aislar genes halotolerantes y para descubrir los pasos limitantes del crecimiento celular bajo estrés salino. Esta levadura muestra mecanismos de transporte básico de iones similares a los de plantas y sus genes pueden ser fácilmente aislados, como ya se mencionó, por complementación, ya sea utilizando tanto plásmidos multicopia como unicopia (Gaxiola *et al.*, 1992).

Las herramientas poderosas de la genética y biología molecular de levadura han sido aplicadas en los últimos años para poder revelar los mecanismos moleculares involucradas en este proceso adaptativo y, como muchos otros procesos de biología celular, es de esperarse que los mecanismos de osmorregulación de la levadura podrían servir como modelo para plantas y animales.

6. ¿Cómo se manifiesta el estrés en la levadura?

6.1. Generalidades

Como ya se había descrito anteriormente, para mantener un alto grado de proliferación *S. cerevisiae* ha tenido que adaptarse a un ambiente que cambia constantemente. Debe adaptarse continuamente a un ambiente externo ya que el ambiente natural de los organismos unicelulares no es constante o no provee de condiciones óptimas para el crecimiento. Las células requieren captar

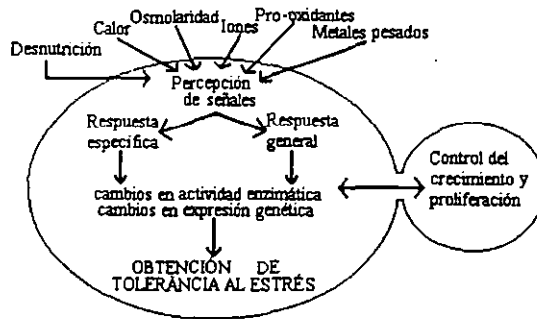


Fig. 2. Diferentes tipos de estrés son captados por la levadura y generan respuestas moleculares específicas y generales. La respuesta al estrés produce cambios en la actividad enzimática y expresión genética y permite la adquisición de tolerancia al estrés ejerciendo un papel importante en la regulación del crecimiento celular (tomado de Hohmann, 1997).

las alteraciones en las condiciones físicas o químicas de su ambiente que provocan un efecto negativo sobre el crecimiento, responder a ellas e integrar esa información dentro de los mecanismos que determinan el potencial de crecimiento celular. Sin estos procesos la célula no sobreviviría.

Los mecanismos moleculares (mostrados en la figura 2) inducidos después de una exposición de las células a esas condiciones adversas es lo que se designa como respuesta al estrés (Hohmann, 1997).

La respuesta al estrés mejor caracterizada es la producida por un choque calórico. Transfiriendo las células de levadura de 23°C a 36 °C se provoca la inducción de la expresión de una serie de genes llamados genes de choque calórico. Estos genes se transcriben después de la activación del factor de transcripción-choque-calórico-específico (Hsf1p) el cual promueve la transcripción por medio de los elementos de choque calórico (heat shock elements, HSEs) presentes en los promotores de los genes involucrados. Una sobreexpresión de los genes provoca una acumulación de las proteínas de choque calórico (heat shock proteins, HSP) cuyo papel podría ser el de proteger a otras proteínas contra la desnaturalización térmica y restarurar su actividad biológica. Estas proteínas también llevan a cabo un proceso similar en condiciones normales, así que en condiciones basales muchas de ellas sirven como chaperonas moleculares que intervienen en el ensamblaje y transporte de nuevas proteínas.

Otros ejemplos de este tipo de respuesta, implicados también en procesos que se llevan a cabo en la célula en condiciones normales, son los que se presentan bajo otras condiciones de estrés.

Bajo un estrés hiperosmótico, se eleva la síntesis y retención de glicerol (único soluto compatible en levadura). Esta respuesta utiliza la maquinaria de osmorregulación que funciona en el mantenimiento del turgor celular y en los procesos de crecimiento (Hohmann, 1997). Células de levadura bajo estrés salino (elevada concentración de NaCl) además de proveer de una respuesta al osmoestrés, también generan una respuesta específica inducida por Na^+ (una sobreexpresión del gen ENA1) el cual tal vez también estimula otros procesos de transporte de iones (Hohmann, 1997). Estos mecanismos están involucrados normalmente en la homeostasis iónica y/o en la generación de gradientes que manejan los procesos de transporte activo. La levadura también presenta mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos contra los efectos dañinos de los derivados reactivos del oxígeno. Estos genes codifican para componentes de su sistema defensivo (como los involucrados en la biosíntesis de glutatión o tioredoxina) y su expresión se incrementa después de un cambio oxidativo. Glutatión y tioredoxina están involucrados normalmente en las reacciones celulares redox, sobre todo en las relacionadas en el establecimiento y mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas. Además, los metales redox participan en la generación de las especies reactivas del oxígeno, por lo tanto existe una conexión fuerte entre la regulación homeostática de estos metales y la presencia de eventos de estrés oxidativo (Mager y Hohmann, 1997).

Un aspecto de la respuesta al estrés en levadura es el fenómeno de adquisición de resistencia o tolerancia al estrés, donde las células pueden soportar un estrés severo más fácilmente cuando son expuestas, previamente, al mismo tipo de estrés pero de forma más ligera (Siderius y Mager, 1997).

La exposición de células de levadura a una alta concentración de sal, no sólo resulta en la activación de los mecanismos osmorregulatorios sino también en la síntesis de al menos algunas de las proteínas de choque calórico (Mager y Hohmann, 1997). Este traslape entre las diversas respuestas al estrés puede ser en parte atribuido al fenómeno de protección cruzada. Este hallazgo es considerado la primera evidencia de la existencia de una respuesta generalizada al estrés, pero lo anterior es verdadero sólo en parte ya que en algunos casos esta protección cruzada no se presenta (p. ej., un choque osmótico ligero confiere resistencia a un choque calórico, pero lo contrario no sucede), lo cual podría interpretarse como un sistema general de alarma, que informan a la célula de posibles problemas posteriores (Siderius y Mager, 1997). Es así como se cree que partes de la respuesta al estrés en levadura parecen ser compartidas y permiten cierto grado de protección cruzada, y las respuestas específicas a estrés apuntan a complementar la respuesta a dicho estrés. Ambas son necesarias para sobrevivir bajo condiciones adversas.

Parecer ser que la base molecular común de la expresión génica en la respuesta al estrés reside en la presencia de un gran número de secuencias regulatorias en los genes que responden al estrés, los cuales han sido denominados elementos-cis de respuesta al estrés (stress-responsive elements, STRE) (Mager y Hohmann, 1997).

La respuesta en común al estrés y a la falta de nutrientes ejemplifica el lazo entre la adaptación al estrés y el control del crecimiento celular. La tolerancia de *S. cerevisiae* a una variedad de condiciones dañinas parece estar correlacionada con las condiciones de crecimiento. Las células en fase estacionaria acumulan trehalosa, disminuyen parte de su metabolismo e inducen la expresión de genes de respuesta al estrés; algo análogo sucede ante la falta de nutrientes. Esto es sugestivo de que los eventos de estrés están controlados por mecanismos que también participan en la regulación del crecimiento. Sin embargo, no todas las condiciones de estrés tienen el mismo efecto en el crecimiento celular (Siderius y Mager, 1997; Ruis, 1997).

6.2. Objetivos, niveles de acción y jerarquía de los efectos del estrés en levadura

Por la amplia definición del fenómeno de estrés, es lógico pensar que existen varios objetivos, niveles de acción y orden en la aparición de los fenómenos que provoca. En la figura 3 se representan, de forma incompleta, los blancos contra los que el estrés actúa.

Las moléculas que podrían ser dañadas por el estrés y que por su importancia exigen de una respuesta que las proteja son: el ADN, proteínas y lípidos de membrana.

En el caso del ADN, los procesos de reparación parecen ser de gran importancia en la respuesta al estrés, ya que sólo una o unas pocas moléculas que podrían estar inactivadas por estrés se encuentran presentes por célula.

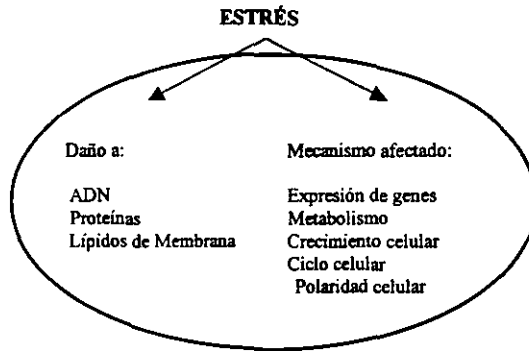


Fig. 3. Principales sitios de acción del estrés en levadura

La expresión génica está influenciada en forma compleja. Algunas condiciones de estrés reducen la expresión de la mayoría de los genes y parece contradictorio cómo no es afectada la transcripción de los genes que intervienen en la respuesta al estrés, en los cuales incluso la expresión es inducida por el estrés. Lo anterior podría explicarse con la forma de interacción entre los factores de transcripción estrés-activados con la maquinaria de transcripción general, la cual presenta un componente, estrés-sensible que hace que en condiciones de estrés la transcripción general disminuya (Ruis, 1997).

Otros fenómenos afectados por el estrés son algunos aspectos del metabolismo, crecimiento celular, división celular, polaridad celular, etcétera. Los efectos metabólicos podrían estar mecanísticamente basados en efectos en la actividad o en el nivel de enzimas. Los transportadores (dentro o fuera de las células o en las vacuolas) podrían estar también dañados y esto tendría también consecuencias sobre el metabolismo. Las alteraciones en enzimas y transportadores podrían ser indirectos (cambios en la expresión de genes) o directos. Los eventos bioquímicos afectados por estrés incluirán una alteración de la actividad enzimática, de transportadores y de otras moléculas proteicas y, en un período más largo, podría variar el nivel de varias proteínas. Todo lo anterior también afectaría a nivel de macromoléculas catalíticas, transporte, biosíntesis y degradación de sustratos, lo que provocaría que el nivel de moléculas pequeñas sufriera un cambio y un nuevo estado celular sería alcanzado (Ruis, 1997).

Cuando se exponen a diferentes tipos de estrés, las células reaccionan con una cascada de respuestas las cuales podrían ser clasificadas como respuesta temprana (primaria o inmediata) y tardía (secundaria) (ver la figura 4).

La respuesta temprana sucedería de forma independiente de la síntesis de proteínas y serán los eventos que ocurren entre un ciclo de mitosis; algunas de las respuestas tempranas pasaran a

nivel del metabolismo y podrían involucrar la modulación de enzimas preexistentes. La función biológica de éste proceso será alcanzar la protección inmediata contra el estrés, la cual será efectiva sólo en caso de un estrés ligero (en el cual todavía se permite el crecimiento celular). También, entre los eventos tempranos se encuentra la inducción de la transcripción de genes y un ajuste del crecimiento celular. Todo esto bajo el supuesto de que el estrés ligero podría convertirse en severo o durar un largo período de tiempo. Adicionalmente, permitiría preparar a la célula para procesos que requirieran de la síntesis de nuevas proteínas. En este sentido dos estrategias diferentes podrían ser seguidas: crecer más lentamente en condiciones de estrés ligero, y no crecer del todo pero si sobrevivir bajo condiciones de estrés severo (Ruis, 1997).

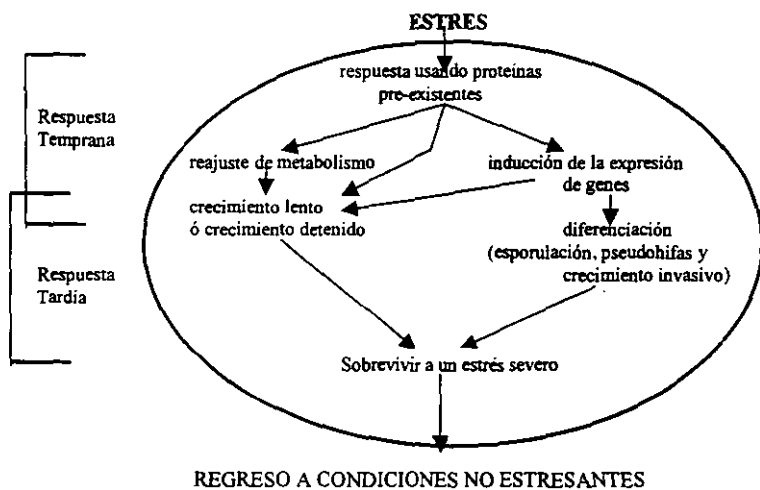


Fig. 4. Jerarquía de las respuestas al estrés. La respuesta temprana es independiente de la síntesis de proteínas. El traslape entre respuesta temprana y tardía indica, principalmente, que las respuestas en esta región pueden ocurrir de forma temprana o tardía o, en algunos casos, en ambas etapas.

La respuesta tardía, la cual haría a las células más resistentes a un estrés severo y las ayudaría a sobrevivir bajo dichas circunstancias puede ocurrir en células creciendo lentamente o en células que han cambiado a un patrón diferente de crecimiento, es decir, más económico. Lo anterior dependerá de la naturaleza y del grado del estrés. En algunos otros casos las células pueden al menos detener su crecimiento y reiniciarlo después de la respuesta temprana o entrar a una fase estacionaria. Bajo ciertas condiciones metabólicas podrían esporular, en función de su naturaleza diploide. Podría ser ventajoso para la célula utilizar diferentes estrategias a la vez, sobre todo porque las células no pueden anticipar que tanto se desarrollarán las condiciones estresantes. Otro punto de vital importancia para las células es el lograr regresar a su estado no estresado en las

mejores condiciones celulares posibles, es decir, de una manera rápida y ordenada. Así que la capacidad de cambiar rápidamente entre un estado estresado a otro no estresado y viceversa confiere una ventaja selectiva enorme a aquellas células que viven en condiciones naturales (Ruis, 1997).

6.3. Sensores de estrés

Los mecanismos de reconocimiento del estrés pertenecen al más intrigante y mal entendido de los aspectos de la respuesta al estrés. Además, poco se conoce acerca de estos "sensores" del estrés en cualquier sistema eucariótico.

El estrés calórico podría ser percibido a nivel de la desnaturalización de proteínas lo cual puede permitir la acumulación y activación de Hsf1p a partir del complejo inactivo con la proteína Hsp70, pero otros mecanismos también han sido propuestos. La osmolaridad externa es percibida en la levadura sobre todo por las proteínas de membrana plasmática similares a los dos componentes de percepción y señalización en bacterias, pero esto revela poco sobre su mecanismo exacto de acción. De igual forma, es completamente desconocido cómo las especies reactivas del oxígeno o la elevación de la concentración de sales evocan la respuesta específica correspondiente y cómo es detectada la falta de nutrientes (Mager y Hohmann, 1997).

Los sensores de agentes estresantes extracelulares podrían actuar a nivel de la superficie celular, estar localizados en la membrana plasmática o ser componentes intracelulares, ya que los sistemas de transporte en membrana plasmática y vacuolar funcionan en la homeostasis. Esto parece ser crucial en la captación y señalización de estrés, al menos en algunos casos.

Uno de los casos en los que ha sido identificado un sensor de estrés en levadura es en los componentes de la vía HOG (high osmolarity glycerol) Sln1p y Sho1p. Ellos son al menos adecuados para tener un papel de osmosensores pero no se conoce detalles moleculares de su forma de acción (Maeda *et al.*, 1994; Ruis, 1997).

La desnaturalización de proteínas, pH intracelular, fluidez de la membrana plasmática, H⁺-ATPasa de membrana plasmática, así como proteínas intracelulares responsables específicamente de un solo tipo de estrés, son posibles candidatos para funcionar como señales y/o sensores de estrés.

6.4. Genes de respuesta general al estrés

El estrés puede modificar la actividad enzimática a nivel genético, desde la expresión misma, la transcripción, traducción hasta niveles post-traduccionales. Parte de la respuesta de la levadura a efectos nocivos que provocan diferentes condiciones de estrés, parece ser causada por

mecanismos comunes como la desnaturalización de proteínas, desordenamiento de membranas, daño en ADN o disturbios metabólicos. Algunos de los genes de respuesta al estrés, que son parte de la respuesta general al estrés, codifican para proteínas que ejercen funciones, directa o indirectamente, necesarias para hacer frente a ese tipo de daño. En el cuadro 6 (recopilado de Siderius y Mager, 1997) se mencionan algunos de estos genes.

Cuadro 3. Ejemplos de genes de respuesta a diversos tipos de estrés en *S. cerevisiae*.

GEN	FUNCIÓN
HSP104	ATPasa que participa en el ensamblaje de proteínas, tal vez también con funciones de proteasa para retirar proteínas dañadas.
HSP26	Chaperona, otras funciones desconocidas.
HSP12	Chaperona, otras funciones desconocidas.
	Los genes HSP están entre los genes de respuesta mejor caracterizados.
UBI4	Poliubiquitina, involucrada en la proteólisis no lisosomal de proteínas. Por medio de la expresión de este gen, la levadura es capaz de deshacerse de proteínas dañadas que podrían ser tóxicas para la célula.
CTT1	Catalasa, su expresión es inducida después de un choque calórico, hiperosmótico y de estrés oxidativo. Parece que evita los efectos nocivos de intermediarios cis reactivos del oxígeno.
DDR2	Reparador de daño al ADN. Inducida por estrés calórico o daño al ADN, evita los efectos adversos del estrés sobre el ADN.
TPS2	Trehalosa fosfato fosfatasa. El incremento en la síntesis de trehalosa pertenece a una de las respuestas inmediatas a la mayoría pero no a todos los tipos de estrés. El incremento inicial en su concentración se debe a la activación enzimática post-traducciona. Además, la expresión de los genes involucrados en su biosíntesis son también el objetivo de la respuesta al estrés ya que la transcripción celular de los genes es incrementada después de la presencia de todos los tipos de estrés.
GAC1	Subunidad reguladora de una proteína fosfatasa tipo 1.
CYC7	iso-2-citocromo c.

La activación de estos genes y otros después de una condición de estrés parecería tener por objetivo ayudar a sobreponer a la célula al daño general sobre las proteínas, lípidos y ADN y las consecuencias de estos daños. Todos estos genes parecen tener en común la secuencia STRE en su región promotora. Los factores transcripcionales que se unen a esta secuencia podrían ser Msn2p y Msn4p (Siderius y Mager, 1997).

6.4.1. Factores de transcripción activados por estrés y los elementos de ADN relacionados a ellos

El control del inicio de la transcripción de genes específicos es uno de los eventos cruciales en la respuesta al estrés. La expresión génica podría ser afectada a varios niveles post-transcripcionales, pero poco se conoce sobre este punto. Más allá de efectos específicos, existen muchos elementos en el ADN y factores de transcripción que se unen a él, los cuales son de más importancia ya que actúan en la regulación de la transcripción de múltiples genes y son también

activados por más de un tipo de estrés. Existen tres tipos de elementos de ADN que parecen jugar un papel importante en la inducción de la transcripción por estrés (Ruis, 1997):

i. AREs (AP-1-responsive elements), activan la expresión de genes por su unión con factores de transcripción homólogos a los AP-1 de mamíferos (Yap1p, Yap2p). Ambos factores de transcripción unidos a ARE parecen estar superpuestos a pesar de que no presentan necesariamente funciones idénticas y participan en la adaptación de las células al estrés oxidativo.

ii. HSEs (heat shock elements) y el HSF (heat shock transcription factor) parece ser que aparecen en todos los tipos de células eucarióticas. La respuesta de levadura a un choque calórico es mediada predominantemente vía HSEs-HSF. El HSF es codificado por un solo gen, por lo tanto, es necesario también en ausencia de estrés, ya que HSF controla la expresión de los genes de las chaperonas; al menos algunas de estas proteínas requieren de regiones HSEs para su expresión basal. HSFs de levadura se une a HSEs constitutivamente y exhibe algo de actividad como un trans-activador transcripcional, también en células no estresadas. De lo anterior se deduce su participación en células normales o ligeramente estresadas, mientras que otros factores son requeridos sólo en casos de estrés severo.

iii. STREs. (general stress responsive element), es un pentanucleótido CCCCT capaz de mediar la respuesta al estrés. Existen pequeñas variaciones en la secuencia (CCCT ó TCCCT) lo cual podría deberse a variaciones de secuencias o a una función distinta (podría ser el objetivo de una serie de señales diferentes). Está regulado negativamente por la proteína cinasa A. La amplia especificidad de inducción de la transcripción STRE-dependiente y el patrón de genes que están bajo control por estos elementos, lo hacen el mejor candidato como un componente crucial en la respuesta general al estrés. Para mayores detalles consultar el Apéndice II.

6.4.2. Regulación negativa de la transcripción de los genes de respuesta al estrés

El término "respuesta general al estrés" se aplicaría si la expresión de este grupo de genes estuviera regulada en una forma coordinada, vía una ruta de respuesta a la presencia de estrés en general, y mediada por factores específicos que actúan en *trans* y secuencias promotoras que actúan en *cis* (Siderius y Mager, 1997).

La primera evidencia para una respuesta general llega del conocimiento de que los genes que responden a estrés muestran una regulación negativa por la ruta de señalización Ras-AMPc. La respuesta general al estrés en levadura a veces es referida como un tipo de estrés metabólico ya que diferentes condiciones de estrés tienen en común que todas ellas afectan el metabolismo celular. Así que la ruta Ras-AMPc (la cual se sabe que participa en el control del metabolismo) probablemente juegue un papel importante en la regulación de la respuesta general al estrés (Thevelein, 1994).

En la figura 5 (Siderius y Mager, 1997) observamos como bajo condiciones de crecimiento favorables, se activa la vía Ras-AMPc y por lo tanto estimula a la proteína-quinasa A (PK-A). Las condiciones adversas resultan en la inactivación de la vía Ras-AMPc, entonces la PK-A tiene efectos opuestos en la transcripción de estimuladores del crecimiento y genes de respuesta al estrés.

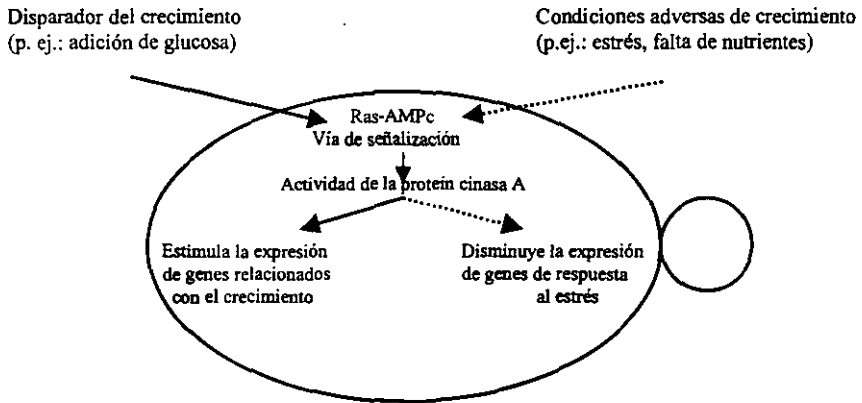


Fig. 5. El control del crecimiento y del estrés son procesos que se contrarrestan a un nivel molecular (la línea punteada representa el control negativo que ejercen las condiciones adversas sobre la vía).

También se sabe que los genes expresados en la respuesta general de estrés pueden estar modulados por otras rutas de señalización de estrés, para asegurar ambos tipos de respuesta, una al estrés en general y otra al estrés específico.

El elemento STRE, media la inducción tanto por un cambio súbito de temperatura, como por estrés osmótico y un bajo nivel de AMPc, así como en la aproximación a la fase estacionaria y, por lo tanto, representa el prototipo de elemento de respuesta general al estrés.

Las secuencias STRE están involucradas en la inducción transcripcional de varios genes de respuesta al estrés y media los efectos de la vía de señalización metabólica Ras-AMPc. Además, parecen mediar la expresión de genes HOG-inducidos. Los factores Msn2p y Msn4p son, hasta el momento, los únicos elementos conocidos que median la transcripción de todos los genes de respuesta al estrés que tienen la secuencia STRE en su promotor. El factor Yap1p podría regular la expresión de un grupo de genes los cuales también podrían ser regulados por Rox3p (factor nuclear).

6.5. Mecanismos generales de señalización

Los mecanismos de señalización de diversa complejidad transmiten las señales de estrés percibidas en diferentes formas a sus objetivos intracelulares. En algunos casos esto parece suceder de forma directa y en otros casos existen vías de señalización-transducción que transmiten las señales. Estas vías utilizan o no a segundos mensajeros (AMPc, calcio, iones metálicos y otros). A continuación se mencionan los mecanismos observados hasta el momento, así como algunas de sus características más importantes.

VIA

CARACTERÍSTICAS

HOG-MAP cinasa	Transmite los incrementos en la osmolaridad y probablemente los decrementos de pH. Es crucial en el estrés hiperosmótico y salino; los blancos de esta vía son las secuencias STREs y probablemente los factores que actúan a nivel trans.
Proteín-cinasa C (PK-C)	Activada por choque calórico, osmótico; tal vez es un sensor de nutrientes por sus funciones en el control del ensamblaje de la pared celular.
Proteín-cinasa Snf1p	Interviene en el estrés producido por la presencia de fuentes de carbono no fermentables.
Fosfatasa	En especial, la calcineurina está involucrada en la respuesta específica a sal, y es regulada por el ión calcio.
Trehalosa	La naturaleza protectora de la trehalosa, el incremento en su nivel después de aplicar condiciones de estrés y la expresión STRE-mediada de los genes de su biosíntesis, sugieren que podría ser un factor común en la respuesta general al estrés. No lo es, ya que no todas las condiciones de estrés conducen a un incremento de éste disacárido.
Ras-AMPC	Contiene la proteína Ras y la proteína-cinasa A AMPC-dependiente. Interviene en la respuesta a la falta de nutrientes y en la entrada a la fase estacionaria del crecimiento.
Proteín-cinasa A (PK-A)	Interviene en la señalización del estrés en general y une al estrés con el control del crecimiento. Es el único regulador compartido en la respuesta general al estrés. La concentración de trehalosa y la expresión STRE-mediada de los genes de respuesta al estrés se ve disminuida por una elevada actividad de la proteína. Como se trata de un indicador de condiciones óptimas de crecimiento, podría ser el interruptor para cambiar entre condiciones óptimas y la inducción de una respuesta general al estrés (situación adversa). La transición de la fase estacionaria y la interrupción de la fase G4 (acompañadas por una disminución en la actividad de la proteína) resultan en la inducción de los genes de respuesta al estrés. Un modelo para esta regulación se muestra en la figura 6.

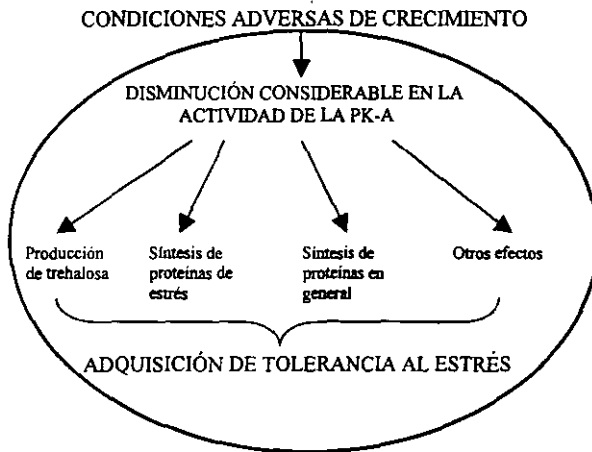


Fig. 6. Modelo hipotético de la acción de la PK-A como un regulador de la respuesta general al estrés.

En este modelo la adquisición de resistencia y protección cruzada se debe a los efectos combinados del incremento de trehalosa y al aumento de la expresión de genes de respuesta al estrés.

7. ¿Cuáles son los efectos del estrés osmótico y salino en la levadura?

Como ya se había mencionado, la presencia de sales puede provocar en las células de levadura dos tipos de estrés: uno osmótico y el otro causado por la toxicidad propia de la sal.

7.1 Efectos causados por estrés osmótico

Cuando las células de levadura son expuestas a una alta concentración osmolar, responden por medio de una serie de eventos moleculares, designados generalmente como respuesta al osmoestrés, la cual abarca a todos los procesos de osmorregulación que hemos definido anteriormente y que enseguida describiremos más a fondo.

Para lograr mantener la turgencia celular y su forma, la levadura requiere que su osmolaridad interna sea mayor que la del medio que la rodea. Se sabe que *S. cerevisiae* crece sólo en presencia de una osmolaridad externa moderadamente alta y que esta habilidad depende de la cepa (Hohmann, 1997).

A pesar de su pared celular rígida, las levaduras muestran cambios en su volumen después de un choque osmótico. Lo anterior queda esquematizado en la figura 7. Un choque hiperosmótico, provoca una pérdida rápida de agua y la contracción de la célula. Este proceso toma cerca de 1 minuto y el volumen que se mantiene es indirectamente proporcional con la concentración de solutos, es decir, conforme mayor sea la concentración de sales, menor es el tamaño al que la célula se contrae (pasos 1 al 2). Se sabe que después de un choque con NaCl al 7%, la célula se contrae cerca de un 30-35% de su volumen original. Durante su periodo de recuperación la célula incrementa su volumen otra vez, pero no recupera totalmente el volumen original (pasos 2 al 3).

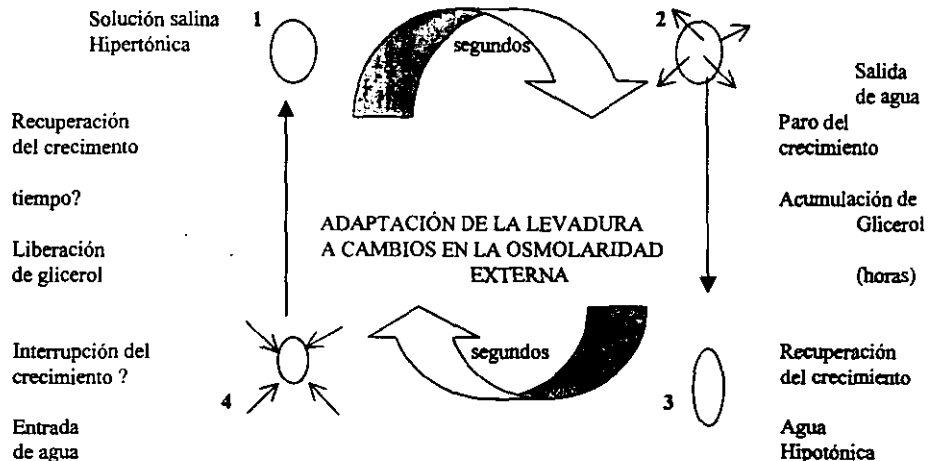


Fig. 7. Impacto del estrés hiperosmótico sobre células de levadura y el mecanismo básico de respuesta.

Una gran proporción de las células no sobrevive a un choque osmótico ligero (a pesar de que son capaces de crecer en presencia de concentraciones de sal arriba del 10%). Esta hipersensibilidad osmótica parece ser dependiente de la fase de crecimiento en la que se encuentre la célula, de forma que las células en la fase activa de crecimiento (fase de crecimiento exponencial) son particularmente más sensibles que las células en fase estacionaria (Mager, 1993). Esta observación es común para la respuesta al estrés de cualquier tipo. Además, la capacidad de sobrevivir a un choque osmótico y la habilidad de adaptarse y crecer en presencia de una elevada concentración de sal no presenta correlación y podría tener bases genéticas diferentes. Es probable que esa hipersensibilidad sea un sistema de rescate temprano y constitutivo de la célula (p. ej.: antes del choque osmótico), y no un prerequisite para los mecanismos de adaptación los cuales preparan a la célula a continuar con su crecimiento (Hohmann, 1997).

Otro mecanismo rápido de rescate parece ser la presencia de una vacuola funcional. La vacuola de levadura es grande y puede contener más del 50% del volumen celular. La membrana vacuolar (el tonoplasto) contiene una gran cantidad de canales de agua, los cuales parecen participar en el equilibrio del contenido de agua en el citosol ante un estrés de tipo hídrico (Chrispeels, 1994).

Muchos componentes celulares como la membrana plasmática y el citoesqueleto sufren un severo impacto proveniente de los cambios drásticos en el volumen celular causados por un choque osmótico. La existencia de canales iónicos en la membrana plasmática activados mecánicamente, transportan cationes y aniones, y parecen ser los únicos canales de calcio en la membrana plasmática. La función de estos canales es dependiente del voltaje membranar, pero su naturaleza molecular es desconocida.

El citoesqueleto de actina llega a desensamblarse dentro del primer minuto después de un choque hiperosmótico. La restauración del citoesqueleto de actina toma cerca de 2 horas bajo un choque ligero y este fenómeno coincide con la detención del crecimiento, lo que sugiere que el restablecimiento del citoesqueleto de actina pudiera ser el factor que determina el tiempo empleado para que el crecimiento pueda continuar. Una de las consecuencias del desensamblaje del citoesqueleto es la pérdida temporal de la polaridad celular (Chowdhury, 1992; Hohmann, 1997; Lew, 1995).

La acumulación de solutos compatibles es compartida probablemente por todos los tipos de células. Su propósito es incrementar la osmolaridad interna para que la célula recupere agua de su ambiente de una forma más eficiente. Algunos solutos compatibles pueden ser capaces de reemplazar a las moléculas de agua o incrementar su tensión superficial y por lo tanto estabilizar las moléculas de agua alrededor de las macromoléculas. Los solutos compatibles empleados son específicos de especie, tipo de célula, y fase de la misma.

Las levaduras emplean preferencialmente polioles; *S. cerevisiae* utiliza al glicerol como único soluto compatible y controla su acumulación a nivel de producción y permeabilidad de membrana (Hohmann, 1997). Una descripción más profunda sobre el metabolismo del glicerol y su influencia en el estrés salino, así como otros aspectos encontrados bajo un estrés osmótico se encuentran en el Apéndice III.

7.2. Características del estrés salino

Los efectos específicos catiónicos y aniónicos sobre los sitios de unión en proteínas son más importantes para la toxicidad salina que los efectos no específicos de la fuerza iónica que operan a elevadas concentraciones de sales.

La presencia de una pared celular rígida obvia la necesidad de la salida de sal para prevenir el estallamiento celular. Así que habiendo resuelto el problema osmótico, las células con pared celular mantuvieron la capacidad de sacar NaCl con el fin de evitar una acumulación a niveles tóxicos dentro de ellas.

Los circuitos quimiosmóticos descritos en la figura 8 podrían representar la situación que prevalece actualmente, después de la colonización de hábitats terrestres, en el transporte de iones en animales y plantas.

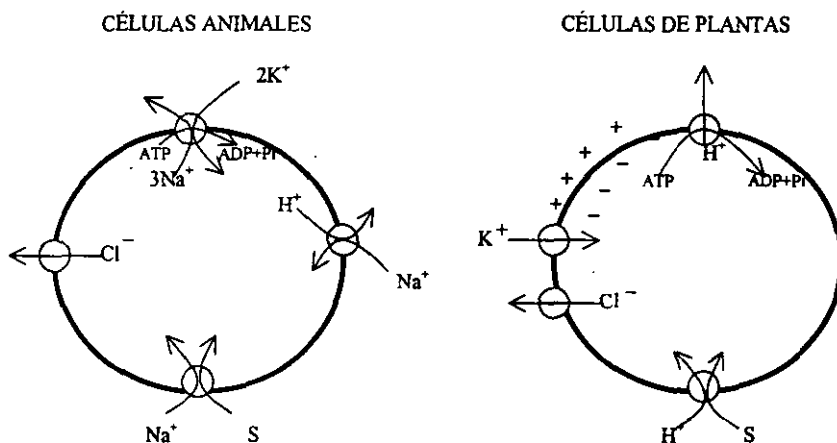


Fig. 8. Diferentes circuitos quimiosmóticos en animales y plantas. Las bombas principales la Na^+/K^+ -ATPasa y la H^+ -ATPasa se encuentran en la parte superior respectivamente. Los conductos iónicos están a la izquierda, un conducto de iones Cl^- en células animales y los conductos de K^+ y Cl^- en plantas y hongos. Finalmente en la parte inferior se encuentran los simportes de Na^+ para diferentes nutrientes (S) en células animales y el correspondiente simporte de protones de plantas.

La falta de transportadores de Na^+ en plantas es una sobre-simplificación que enfatiza las consecuencias plausibles de los muchos años de evolución en un medio sin una significativa concentración de sodio. Es en este escenario de "olvido" de salinidad marina por las plantas terrestres, donde el estrés salino adquiere significancia. La progresiva salinización de las tierras irrigadas enfrenta a los organismos (con casi ninguna defensa) contra la toxicidad del Na^+ y el Cl^- .

Otros factores involucrados en el estrés salino de la levadura son las vías de represión catabólica que se observan en la respuesta de este organismo a una fermentación rápida de azúcares (como la glucosa), las cuales reprimen a los genes *ENA1* y *HAL1* importantes en la tolerancia a la sal. Además, una vez que los niveles de sodio y potasio han sido ajustados por las actividades de los sistemas de captación y salida de estos iones, el factor final que determina la tolerancia a la sal es la sensibilidad de los sistemas intracelulares a la relación Na^+/K^+ . Uno de estos sistemas es la síntesis de proteínas ribosomales (Lubin, 1964 citado en Serrano, Márquez y Ríos, 1997). En el Apéndice IV se encuentran descritos algunas características más específicas del fenómeno de estrés salino en la levadura.

Basándonos en los puntos señalados en esta introducción, es de suma importancia proporcionar nuevos conocimientos sobre el estrés osmótico y salino en levadura. Este conocimiento podría, posteriormente, ser útil para ayudar en la resolución de los problemas agrícolas que provoca la salinización de suelos.

III. HIPÓTESIS

Existen secuencias de ADN todavía no identificadas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que, cuando se sobre-expresan en este organismo, contribuyen a la tolerancia al estrés salino u osmótico.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General:

Clonar secuencias de ADN eucariótico (de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) que le confieran tolerancia al estrés salino u osmótico causado por la presencia de LiCl (250 mM).

Objetivos particulares:

1. Transformación genética de la levadura con un banco genómico de *Saccharomyces cerevisiae* presente en un plásmido centromérico.
2. Selección de las células transformadas en un medio selectivo con sal (250 mM LiCl).
3. Clonación celular de las colonias transformantes con mayor velocidad de crecimiento en medio selectivo.
4. Rescate del plásmido recombinante mediante transformación genética de *Escherichia coli*.
5. Purificación del plásmido recombinante.
6. Aislamiento y caracterización, por medio de mapas de restricción, de las secuencias halotolerantes.
7. Determinación de la secuencia de ADN aislada (secuenciación).
8. Establecimiento de un estudio preliminar acerca de la posible participación de la secuencia aislada en el fenómeno de tolerancia al estrés salino y osmótico.

V. MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico

Cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* RS16(a), no transformada y transformada con el plásmido unicopia YCp50, las cuales se conservan en medio sólido YPD y Min/Leu respectivamente, a una temperatura de 4 °C y resemebrándose cada 60 días.

Cepas de la bacteria *Escherichia coli* HB101, no transformada y transformada con el plásmido multicopia YCp50, las cuales se conservan en medio sólido Luria y Luria/Amp respectivamente, a una temperatura de 4 °C y resemebrándose cada 90 días.

Clonas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* RS16(a) transformada con banco genómico de levadura en YCp50, las cuales se conservan por duplicado en medio Min/Leu y Min/Leu/LiCl (250mM), a 4 °C y resemebrándose cada 60 días.

2. Medios y soluciones empleadas

Medio Luria	NaCl	5 g
	triptona	10 g
	extracto de levadura	5 g
	H ₂ O	1000 mL
	agar (medio sólido)	20 g
	ampicilina (opcional)	100 mg/L
Medio YPD	extracto de levadura	10 g
	peptona	20 g
	glucosa	20 g
	H ₂ O	1000 mL
	agar(medio sólido)	20 g
Medio Mínimo/Leucina con o sin LiCl (250 mM) o NaCl (1.2 M)	Nitrógeno base	-7 g
	glucosa	20 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
	Leucina	50 mL/L
	(medio con sal) LiCl (250 mM)	10.05 g/L
	(medio con sal) NaCl (1.5 M)	70.13 g/L
	H ₂ O	1000 mL
agar (medio sólido)	20 g	
Solución stock	Ampicilina	50 mg/mL

Solución stock	Leucina	10 g/L
Solución 1	sacarosa Tris.HCl pH 7.5 EDTA	15% 25 mM 10 mM
Solución 2	NaOH SDS	0.2 N 1 %
Solución 3	acetato de potasio ácido acético glacial H ₂ O	5M 11.5 mL/100 mL 28.5 mL/100mL
Solución 4	acetato de sodio	3 M
Solución 5 (Buffer TE)	Tris-HCl pH 7.5 EDTA	0.01 M 0.001 M
Solución 6	CaCl	100 mM
Solución 7 (Buffer de lisis)	LiCl Tris-HCl (pH 8.0) Triton X-100 Na ₂ EDTA	2.5 M 50 mM 4 % 62.5 mM
Solución 8 (Buffer de corrida TBS (5X) pH 7.5-8.0)	Tris-base ácido bórico EDTA H ₂ O	54 g/L 27.5 g/L 3.72 g/L 1000 mL
Solución 9 (Buffer de carga (10X))	Sacarosa EDTA Azul de bromofenol SDS	37 % 50 mM 0.1 % 0.1 %
Solución 10 (Solución para revelar geles de agarosa)	Bromuro de etidio	1 µg/mL
Solución PLATE Para 1 mL	PEG 4000 45% acetato de litio 1M Tris-HCL 1M pH=7.5 EDTA 0.5 M	0.9 mL 0.1 mL 10 µL 2 µL

3. Cosecha de células

El cultivo celular, ya sea de levadura o de bacterias es centrifugado a 3500 rpm. Posteriormente, el botón celular es lavado con 1 mL de agua (destilada, deionizada y estéril), trasvasado a un tubo Eppendorff y nuevamente es sometido a centrifugación. Una vez terminado el período de centrifugación se procede a utilizar a las células según el proceso que se desee realizar.

4. Transformación de la cepa de levadura RS16(a) con ADN del banco genómico.

Se llevó a cabo la transformación genética de *Saccharomyces cerevisiae* cepa RS16(a) con el ADN de un banco genómico de la misma levadura en el plásmido unicopia YCp50, donado por el Dr. David Botstein, profesor de la Universidad de Stanford, U.S.A., vía la Dra. Alicia González del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M., México.

El método de transformación utilizado es el propuesto por Elble (1992), en donde, a partir de un cultivo de 24 horas de la cepa de levadura RS16(a) (en medio líquido YPD, temperatura de incubación 30°C, con agitación de 250 rpm), de 10 mL, se cosechan a las células y el botón celular es resuspendido en el agua remanente. A continuación se añade ADN de esperma de salmón (10 µL que equivale aproximadamente a 5µg de ADN) y se agita vigorosamente en un "vortex" por 20 segundos. Inmediatamente se añade 1 µg de ADN proveniente del banco genómico y se agita nuevamente en vortex durante 20 segundos. Posteriormente, se añade 0.5 mL de la solución PLATE. El tubo Eppendorff se incuba durante una noche a temperatura ambiente. Posteriormente se siembran 100 µL en 5 cajas con medio sólido Min/Leu, las cuales se someten a incubación a 30°C por 5 días.

5. Curvas de crecimiento

Se realizan curvas de crecimiento de las colonias seleccionadas por su tolerancia aparente a la sal (LiCl, 250 mM), usando como control a la cepa de levadura RS16(a) transformada con YCp50. La transformación de levadura con el plásmido se lleva a cabo por medio del mismo método que para la transformación con el banco genómico, solamente que se añaden 1-2 µg del plásmido en lugar de ADN de banco genómico, y las colonias transformantes son sembradas directamente en cajas con medio Min/Leu.

Para iniciar las curvas se requiere inocular a 20 mL de medio Min/Leu con la colonia de levadura requerida, y se incuba por 48 horas a 30 °C con agitación de 250 rpm. Pasado el período de incubación, las células son cosechadas; finalmente se transfiere el botón de células limpio a un tubo Eppendorff y se resuspende en 0.5 mL de agua estéril. Del tubo anterior se realiza una

dilución 1:100 a la cual se lee su absorbancia en una celda de plástico a una longitud de onda de 660 nm. La lectura obtenida es multiplicada por 100 para obtener la absorbancia real del cultivo, haciéndose la siguiente relación:

$$(\text{Absorbancia deseada} \times \text{volumen cultivo}=50\text{mL})/\text{Absorbancia real} = \text{Volumen a añadir}$$

Se añade el volumen resultante al matraz con el que se realizará la curva, en el cual previamente se depositaron 50 mL de medio Min/Leu/LiCl (250 mM). El matraz fue agitado manualmente y posteriormente se toma una muestra de 1 mL y se determina su absorbancia. Dependiendo de la lectura que se obtenga se añade medio o microlitros de células al matraz para que todos presenten una absorbancia inicial de 0.050. Una vez que se logra lo anterior se someten a incubación durante 72 horas tomando muestras cada 3 horas aproximadamente y determinando la absorbancia de ellas (en las mismas condiciones).

6. Rescate del plásmido. Extracción de ADN genómico y plasmídico de clonas tolerantes a LiCl(250 mM)

Se realizó la extracción de ADN de levadura por medio del método propuesto por Ward (1990), el cual se describe a continuación.

A partir de un cultivo de 24 horas de la levadura seleccionada (10 mL, en medio Min/Leu), se realiza la cosecha: el botón celular se trasvasa a un tubo Eppendorff el cual es nuevamente centrifugado en microfuga mediante un pulso. Una vez lavado el botón celular, se decanta el agua y el botón se resuspende en 100 μL de la solución 7, se añaden 0.2g de perlas de vidrio (previamente esterilizadas) y un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1, es decir, 100 μL /100 μL). El tubo Eppendorff es sometido a una vigorosa agitación en un vortex durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga durante 1 minuto, se extrae la fase acuosa y ésta es depositada en otro tubo Eppendorff al cual se añaden dos volúmenes de etanol y 1/10 de volumen de la solución 4. El tubo es colocado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos a 1 hora; transcurrido este tiempo se centrifuga durante 10 minutos. El botón es lavado con etanol al 70% (200 μL) y nuevamente centrifugado (mismas condiciones); posteriormente se seca al vacío durante 5 minutos. Una vez que el botón se encuentra seco se resuspende en 30 μL de solución 5 o agua estéril.

7. Rescate del plásmido. Transformación genética de *Escherichia coli* con ADN de clonas tolerantes

Se realizó la transformación genética de *E. coli* cepa HB101 por medio del método propuesto por Hanahan (1983), el cual se describe a continuación:

Apartir de un cultivo fresco de *E. coli* en medio sólido se inocula un matraz con 5 mL de medio Luria y este matraz es sometido a incubación durante una noche, a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se inoculan 10 mL de medio Luria con una alícuota del cultivo anterior de forma que se obtuviera una dilución 1:50 y este matraz se incubó a 37 °C con aeramiento vigoroso, 250 rpm, durante el tiempo suficiente para lograr llegar a la fase logarítmica del crecimiento bacteriano. Esto se determina al leer una alícuota de 1 mL del cultivo a una longitud de onda de 600 nm, donde se debe obtener una lectura de 0.5-0.6 unidades de absorbancia. Una vez obtenida esta lectura, el cultivo se transfiere a un tubo Falcon, y se incuba en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El botón obtenido fue resuspendido en 1/2 del volumen original de la solución 6 fría (es decir, 5 mL); nuevamente se incuba durante 5 minutos en hielo, y se centrifuga (mismas condiciones anteriores). El botón celular se resuspende finalmente en 1/15 del volumen del cultivo original con la solución 6 fría y el tubo se mantiene en refrigeración (4 °C) durante 24 a 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo una fracción de las células del tubo se volvieron competentes de tal forma que se toma una alícuota de 200 µL de estas células competentes, se transfieren a un tubo Eppendorff y se añade el ADN transformante en 100 µL de Tris 10 mM (pH 7.5). Se mezcla y este tubo es sometido a incubación en hielo durante 25 minutos. Posteriormente, las células son sometidas a una incubación a 37 °C por 2 minutos; después se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este periodo de tiempo se transfiere el contenido del tubo Eppendorff a un tubo de centrifuga Falcon con 3 mL de medio Luria, y se incuba el tubo durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y se resuspende a las células en el líquido remanente. Finalmente las células se transfieren a cajas selectivas (con medio Luria/Amp) y se incuban durante 24 horas a 37 °C.

8. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

La extracción de ADN plasmídico de *E. coli* se obtiene utilizando el método propuesto por Ausubel, *et al.* (1991), el cual es utilizado para preparaciones de 10 a 500 mL de cultivo inicial. Se describe a continuación con los volúmenes necesarios para 500 mL de cultivo.

A partir de un cultivo fresco de la colonia seleccionada, se realiza la cosecha de las células, y finalmente se resuspende el botón celular en 5 mL de la solución 1. Posteriormente se añade 2.5 mg de lisozima, se mezcla manualmente y se incuba 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añaden 10 mL de la solución 2 (fresca), se mezcla manualmente y se incuba 10 minutos en hielo. Por último, se añaden 7.5 mL de la solución 3, se mezcla manualmente y se

incuba 10 minutos en hielo. Se centrifuga el tubo a 10 000 rpm a 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante es salvado y transferido a otro tubo en el cual se añade 0.6 volúmenes de isopropanol y se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se centrifuga (mismas condiciones, pero a 4 °C) y el botón obtenido es lavado con 2 mL de etanol (70%). Se centrifuga (mismas condiciones a 4 °C) y posteriormente se deja secar. El botón obtenido es resuspendido en 1 mL de la **solución 1**, se añade enzima RNAasa para obtener una concentración final de 20 µg/mL y se incuba 20 minutos a 37 °C. Posteriormente se añaden 2 mL de la **solución 2**, se mezcla e incuba 10 minutos a temperatura ambiente, después se añade 1.5 mL de la **solución 3**, se mezcla y se vuelve a incubar (mismas condiciones). A continuación se centrifuga a 10 000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura, se rescata el sobrenadante y es transferido a otro tubo y se extrae con fenol y posteriormente con cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). A la fase acuosa obtenida de esta manera se le agrega 1/4 de volumen de **solución 3** y 2 volúmenes de etanol; se incuba a -70 °C durante 10 minutos, se centrifuga posteriormente a 10 000 rpm (mismas condiciones pero a 4 °C), el botón es lavado con etanol (70%) y finalmente se resuspende en el menor volumen posible de la **solución 5** o agua estéril.

9. Electroforesis en geles de agarosa

Para llevar a cabo la verificación de ADN plasmídico, ya sea proveniente de *E. coli* o *S. cerevisiae*, o bien para determinar si el ADN se encuentra íntegro o cortado (con enzimas de restricción) (Montiel, 1994), se lleva a cabo la electroforesis en geles de agarosa al 1%, lo que se realiza de la siguiente forma:

Se preparan 20 mL de gel de agarosa al 1% en la **solución 8** pero a una concentración 1X. La mezcla se lleva a ebullición (lo cual se realizó en horno de microondas). Una vez que la temperatura de la mezcla ha descendido a aproximadamente 60°C, se vacía la misma sobre el molde del gel. Cuando la agarosa haya gelificado (aproximadamente 20 minutos después), se retira cuidadosamente el peine formador de los pocillos, quedando el gel listo para ser cargado. Se realiza la mezcla de 1-2µL de ADN íntegro por cada 10 µL de agua estéril o, en caso de una restricción ya se tiene la mezcla de ADN digerido; en ambos casos se añade 1 µL de la **solución 9** y se mezcla perfectamente. Se coloca cuidadosamente cada mezcla de reacción en cada uno de los pocillos del gel (el volumen final puede variar de 10 a 15 µL, dependiendo de la reacción realizada y del peine que se quiera utilizar para el gel), y se inicia la corrida con un potencial de 80 V. La corrida termina cuando la banda de azul de bromofenol, que comigra con moléculas de ADN de aproximadamente 300 pares de bases de longitud, se localiza aproximadamente después de dos

tercios del tamaño del gel. Para visualizar las bandas de ADN se sumerge cuidadosamente el gel en la solución 10 por unos 10 minutos. El exceso de bromuro de etidio se elimina enjuagando el gel en una charola con agua destilada durante otros 10 minutos. Se coloca el gel teñido sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda media (302 nm) o corta (298 nm). De esta manera, en los pocillos cargados con ADN genómico se debe apreciar un barrido fluorescente que se extiende desde 1 o 2 centímetros por debajo del pocillo hasta unos dos centímetros antes del borde anódico del gel. Los fragmentos de ADN plasmídico y/o de restricción se presentaran en bandas fluorescentes discretas, dependiendo de su peso molecular. Siempre se utiliza un marcador de peso molecular al correr el gel, frecuentemente el ADN del fago lambda (48 502 pares de bases) cortado con las enzimas Hind III y Eco-RI. Es suficiente colocar 0.1 µg de ADN del fago en uno de los pocillos del gel (la mezcla a cargar del marcador de peso molecular se prepara de la misma forma que para las muestras).

10. Restricción enzimática de ADN

Para realizar una semi-caracterización del inserto del ADN aislado se lleva a cabo la producción de fragmentos del mismo por medio del empleo de enzimas de restricción, la cual se realiza siguiendo el esquema de restricción que se muestra a continuación, en el cual pueden ser utilizadas una sola enzima o varias de ellas.

VOLÚMENES (µL)	Bam-HI	Eco-RI	Hind-III	Bam-HI Eco-RI(1)	Bam-HI Hind-III(1)	Eco-RI Hind-III
	ADN	1	1	1	1	1
Enzima 1	1	1	1	1	1	1
Buffer 1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Enzima 2	-	-	-	1	1	1
Buffer 2	-	-	-	1.5	1.5	-
H2O	10.5	10.5	10.5	8	8	9.5
Vol. final	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0	14.0

Se lleva a cabo la digestión entre 30 minutos y 2 horas, a 37°C, empleando el buffer apropiado para la enzima utilizadas. Para Eco-RI y Hind-III se utiliza un buffer de mediana concentración de sales, y la enzima Bam-HI utiliza un buffer de alta concentración de sales, (buffer y enzimas de Gibco BRL). Cuando sea necesario llevar a cabo una doble digestión empleando soluciones de diferente concentración de sales, digerir el ADN durante 1 hora en la solución salina menos concentrada (es decir, la indicada con número 1) y después 1 hora más en la solución más concentrada (indicada con el número 2). Una vez terminado el periodo de incubación se incubaba a

una temperatura de 70°C durante 2 minutos y posteriormente se someten a una incubación en hielo por 15 minutos. Una vez terminado este tiempo el ADN digerido puede ser utilizado para su visualización por medio de electroforesis en geles de agarosa.

11. Determinación del peso molecular del inserto en el plásmido aislado

Una vez obtenido el gel de electroforesis y ser revelado, se toma una fotografía al mismo, y a partir de ésta se realiza la determinación del peso molecular de las bandas que aparecen de ADN, lo cual se realiza con la ayuda del marcador de peso molecular (fago lambda), cuyo pocillo presentará una serie de bandas. Este patrón electroforético es conocido y cada banda representa ya un peso bien determinado. En la foto se traza una línea (sobre el fondo de los pocillos) y de ésta hacia el final del gel se determina la distancia recorrida en milímetros de cada una de las bandas. Con los datos anteriores se traza una curva patrón (sin considerar la primera y última bandas) en la cual se graficarán de manera exponencial colocando en el eje de las "Y's" (eje exponencial) el peso molecular de cada banda y en el eje de las "X's" los milímetros recorridos por la banda en el gel. A partir de esta gráfica y aplicando una regresión lineal a la misma se interpola cada una de las distancias de las bandas obtenidas por la muestra de ADN y de esta forma se obtiene el peso molecular de las mismas.

12. Reverificación de fenotipo halotolerante.

Se realiza la transformación de levadura por medio de la misma técnica empleada para la transformación con el banco genómico, pero en este caso con el ADN plasmídico de la clona seleccionada originalmente y las células transformadas son sembradas directamente en una caja con medio Min/Leu/LiCl(250 mM). Posteriormente estas transformantes, ya crecidas, son propagadas en otra caja con el mismo medio para, a partir de ellas, realizar curvas de crecimiento de la forma antes mencionada.

13. Purificación de ADN plasmídico por medio de un gradiente de cloruro de cesio

Se realiza primero una maxipreparación del ADN deseado siguiendo la metodología empleada para la extracción de ADN plasmídico de *E. coli* (punto No. 10). Una vez que se obtiene ADN limpio (paso en el que se lava con etanol al 70 %), se añade: 4.5 mL de la solución 5, 4.85 g de CsCl, 250 µL de la solución 10. Se mezcla hasta conseguir que el botón de ADN se resuspenda y la sal se disuelva completamente. La solución es colocada en unos tubos de ultracentrifugación y se ultracentrifuga en el rotor VTi 65 a 65 000 r.p.m., a una temperatura de 20 °C, durante 18-20

horas. Una vez transcurrido este tiempo, se colecta la banda de ADN utilizando luz ultravioleta de onda media (302 nm) con ayuda de una jeringa insulínica (29x13 mm, 1/2", ultra-fine.Plastipack). La banda se trasvasa a un tubo Corex y se extrae el bromuro de etidio repetidamente con isopropanol saturado con agua/NaCl. A continuación, se agregan 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol frío, se incuba por 30 minutos a -70 °C. Posteriormente, se centrifuga a 10 000 r.p.m., durante 20 minutos a 4 °C, se resuspende el botón en la solución 5. se transfiere la solución a tubos Eppendorff y se reprecipita el ADN agregando 2 volúmenes de etanol y 1/10 de la solución 4. Se resuspende el botón, la mezcla es sometida a un temperatura de -70 °C durante 10 minutos, se centrifuga en microfuga durante 10 minutos a 4 °C y por último el botón es lavado nuevamente con etanol (70%) y recentrifugado (mismas condiciones). Finalmente el botón es resuspendido en 50 µL de solución 5. La concentración de ADN obtenido se determina visualmente en el gel.

14. Estudios de secuenciación del inserto plasmídico

Se llevó a cabo la secuenciación de aproximadamente 500 bases de cada una de los fragmentos de ADN de levadura aislados. La secuenciación fue realizada por el método automatizado de Sanger modificado por Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 1986), el cual consiste en una detección de la fluorescencia emitida por las bases que componen el ADN iniciador marcadas por diferentes fluorocromos. Las bandas resultantes son irradiadas con rayo laser para de esta forma excitar a los fluorocromos y que emitan una onda fluorescente la cual es capturada por un espectrofotómetro e interpretada por una computadora conectada.

La secuenciación fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular, con el empleo del espectrofluorómetro Perkin-Elmer MPP.

15. Análisis estructurales y funcionales mediante el empleo de bases de datos via Internet.

Se llevó a cabo un análisis de las secuencias obtenidas con el uso de diversas bases de datos. Las direcciones de acceso a las diferentes bases de datos empleadas para la interpretación de los fragmentos aislados se encuentran en el capítulo correspondiente a las referencias.

VI. RESULTADOS

1. Selección de transformantes auxotróficas en Medio Min/Leu

La cepa de levadura utilizada fue RS16(a), la cual presenta una doble mutación que la hace tener un genotipo LEU2⁻/URA3⁻, y por lo tanto presenta una auxotrofia a leucina y a uracilo.

Muchos bancos genómicos han sido construidos usando a vectores de levadura basados en el elemento ARS1 (autonomously replicating sequence) de un cromosoma de levadura que presenta las características de un origen de replicación cromosomal y por lo tanto se replicará autónomamente en levadura, o bien del plásmido 2 μ m. Estos bancos han tenido éxito pero presentan algunas limitaciones. La primera es que estos plásmidos están presentes en un elevado número de copias en levadura y esto puede evitar el aislamiento de genes que son tóxicos cuando se sobreexpresan (por el elevado número de copias del vector). Además a veces esa sobreexpresión es de otros genes y no del de interés y podría suprimir la mutación usada para la selección, produciendo ambigüedad en la identificación del gen. La segunda limitante es que estos vectores son inestables en levadura. Por último, el título de los factores de regulación en genes que se expresan en un alto número de copias podrían alterar el patrón de expresión en comparación con el mismo gen pero presente en una sola copia (Rose *et al.*, 1987).

La adición de un centrómero a un plásmido que contiene un sitio ARS produce el vector YCp (yeast centromere plasmid). Como se sabe, un centrómero es la región del cromosoma involucrada en la distribución correcta de los cromosomas a la célula hija durante la división, y su presencia presenta algunas ventajas: el número de copias del plásmido es reducido (1 a 2 copias por célula); además el plásmido adquiere una elevada estabilidad (mitóticamente estable, menos de 1% de pérdidas por célula por generación). Es así como un banco genómico usando este plásmido como vector limita los problemas asociados a vectores multicopia (Rose *et al.*, 1987).

El banco genómico de levadura empleado se encuentra contenido dentro del plásmido recombinante YCp50, cuyo mapa de restricción se muestra a en la figura 9.

Con base a lo mencionado anteriormente, es de suponer que la presencia del plásmido unicopia YCp50 (mismo en el que se encuentra el banco genómico utilizado), confiere a la cepa de levadura RS16(a) la capacidad de crecer en un medio mínimo sin la presencia de uracilo, porque el plásmido presenta el gen URA3 cuyo producto complementa la auxotrofia de la cepa mutada, pero aún requiere de la presencia de leucina en el medio. Además, este plásmido puede también ser - -

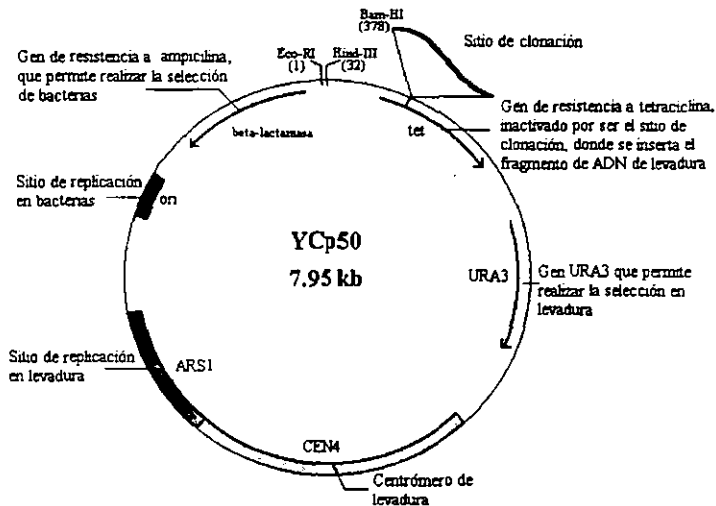


Fig. 9. Mapa de restricción del plásmido YCp50 y algunas de sus características genéticas.

utilizado en la transformación y selección de la bacteria *E. coli*. En la figura 10 se representa lo anterior.

Con fundamento en la anterior descripción del plásmido y levadura utilizada se realizó una primera selección de colonias de levadura transformadas con el banco genómico, las cuales se seleccionaron por presentar un crecimiento óptimo en el Medio Mínimo Leucina, (lo cual indicó que la auxotrofia a uracilo se vio complementada por la presencia del plásmido recombinantes en el cual está construida la biblioteca genómica y por lo tanto se supone la presencia del inserto de ADN de levadura), y se propagaron a otra caja con el mismo medio, las cuales fueron incubadas a 30 °C durante 3 días.

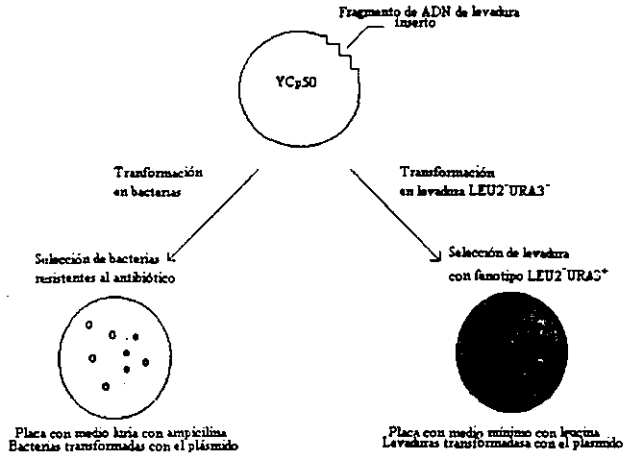


Fig 10. Transformación y selección de transformantes en *S. cerevisiae* y *E. coli* por YCp50. YCp50 es un vector que puede propagarse y ser seleccionado tanto en *E. coli* como en levaduras. Las recombinantes se seleccionan en *E. coli* por la capacidad que le confieren de crecer en presencia del antibiótico ampicilina. En la levadura LEU2/URA3⁺ se seleccionan por su capacidad de crecer cuando no se adiciona uracilo al medio. Los vectores de este tipo son introducidos en *E. coli* para obtener ADN que se emplea en estudios posteriores, y en levadura expresarán el gen eucariótico clonado con el fin de analizar el fenotipo.

2. Resiembra de transformantes a Medio Mín/Leu/LiCl (250 nM)

Se prosiguió con la resiembra de las colonias anteriores a cajas con el medio Min/Leu/LiCl (250 mM). Se resembraron 100 colonias transformantes, con una asada pequeña (utilizándose palillos de madera, esterilizados previamente) y se incubaron a 30 °C durante 5 días.

3. Selección de transformantes por su relativa rapidez de crecimiento en un medio con LiCl (250 mM)

A partir de la resiembra anterior, se observó que 2 de ellas (denominadas clonas pXU300 y pXU400) presentaban un crecimiento más rápido en el medio con LiCl (250 mM) en comparación a las otras colonias resembradas, así que estas colonias de levadura fueron nuevamente seleccionadas y propagadas en otra caja (mismo medio; iguales condiciones y tiempo de incubación) para realizar los estudios moleculares y fisiológicos con ellas.

4. Estudios fisiológicos de las clonas tolerantes a la sal de litio por medio de curvas de crecimiento

El crecimiento de la población de las clonas seleccionadas y de la levadura control (cepa RS16-a) crecidas en medio-mínimo-leucina adicionado de LiCl (250 mM) se siguió a través del tiempo. En la figura 11 se observa que las clonas seleccionadas presentan una velocidad de crecimiento mayor en comparación con el control y que este comportamiento continua así conforme avanza el tiempo.

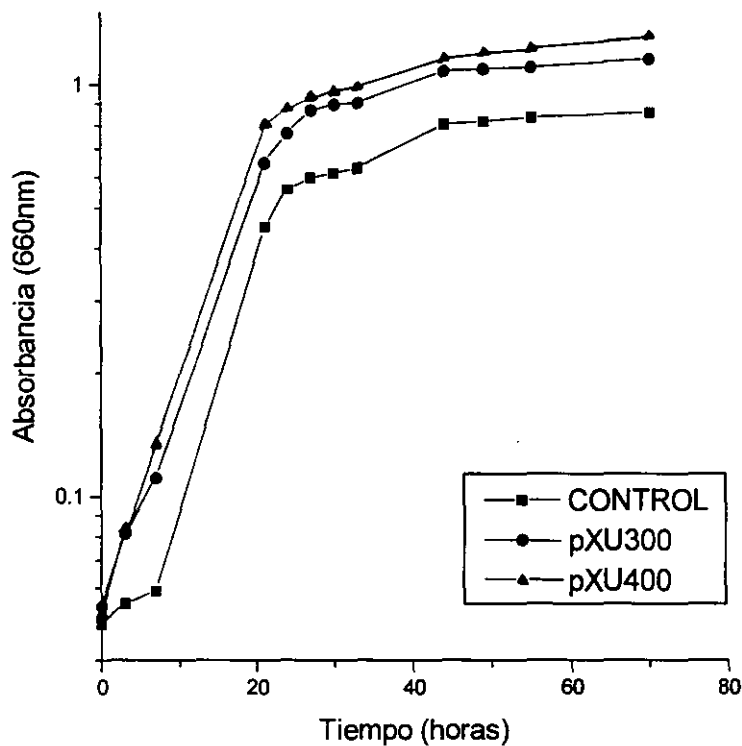


Fig. 11. Curva de crecimiento de clonas transformantes de levadura con un banco genómico y que presentan tolerancia a la presencia de LiCl (250mM) comparado contra una cepa de levadura control (RS16-a), transformada con el plásmido YCp50. Las curvas fueron realizadas por triplicado observándose el mismo comportamiento en cada ocasión.

5. Extracción de ADN de levadura y su análisis por electroforesis

A partir de las dos clonas seleccionadas por su tolerancia a la presencia de la sal de litio se decidió realizar una extracción de ADN total con el propósito de lograr observar la presencia del ADN plasmídico que supuestamente portaría. Esta suposición se confirmó por medio de una electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el gel se logró observar una banda con un tamaño aproximado de 8 Kb (tamaño que se obtuvo empleando como marcador de peso molecular el ADN del bacteriófago lambda cortado con las enzimas de restricción Eco-RI y Hind-III) (ver, p. ej. Figura 15).

6. Rescate de los plásmidos mediante transformación genética de *E. coli* con el ADN extraído de levadura

Con base a las curvas de crecimiento y a la presencia del plásmido con inserto, se realizó la transformación de *E. coli* con el ADN de las clonas de levadura para, de esta forma, obtener una mayor cantidad de ADN plasmídico y consecuentemente del inserto de ADN de levadura. Las transformantes de *E. coli* fueron seleccionadas por su crecimiento en medio Luria adicionado con ampicilina, capacidad conferida por la presencia del plásmido YCp50 en el que fue realizado el banco genómico.

7. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* y su verificación por electroforesis

Se eligió una colonia transformante de *E. coli* para cada una de las clonas halotolerantes y se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico de ellas. Una vez obtenido el ADN plasmídico, se realizó una revisión por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con lo que se confirmó la presencia del ADN al observar la banda característica de aproximadamente 8Kb en el gel (resultados no mostrados) y, al mismo tiempo, se estableció la concentración aproximada que presentaba (de forma visual), la cual fue de aproximadamente 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Uno de los plásmidos recombinantes fue denominado pXU300 y el otro pXU400.

8. Caracterización inicial del ADN plasmídico por medio de restricción enzimática

Se llevó a cabo una primera caracterización del ADN plasmídico portador del inserto de ADN de levadura en la cual se realizó una restricción enzimática con las enzimas Bam-HI, Eco-RI y Hind-III. La restricción fue analizada por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%, en los cuales se observó la liberación de más de un fragmento de ADN en los carriles correspondientes a la restricción con las enzimas Eco-RI y Hind-III. Curiosamente, ninguna banda

adicional fue producida con la restricción de la enzima Bam-HI; únicamente se observó la banda correspondiente al plásmido, (ver más adelante).

9. Retransformación genética de levadura para verificación del fenotipo halotolerante

Se realizó la retransformación de levadura con el ADN plasmídico rescatado en *E. coli* con el fin de verificar el fenotipo de tolerancia a la presencia de LiCl, ya que a partir de la caracterización inicial observamos la pérdida de uno de los sitios de restricción Bam-HI (debería de presentar dos sitios) pertenecientes al plásmido y en los cuales se realizó la inserción del ADN de levadura para la construcción del banco genómico. Por lo tanto, se pensó que tal vez durante la pérdida de ese sitio de restricción podría haberse perdido también parte del inserto de ADN de levadura que podría ser responsable del fenotipo de halotolerancia presente en los primeros estudios. Una vez obtenidas colonias transformantes de levadura se prosiguió a realizar nuevas curvas de crecimiento. La figura 12 muestra estos estudios, en los cuales se observa que la levadura continua mostrando tolerancia a la presencia de la sal de litio y su crecimiento es mayor que el del control. Simultáneamente, se decidió observar si la tolerancia observada era exclusivamente para el LiCl o si bien, otra sal como NaCl sería también tolerada. El experimento mostrado en la figura 13 indica que los plásmidos recombinantes aislados confieren, aparentemente, halotolerancia tanto a LiCl como a NaCl.

10. Caracterización estructural de los insertos de ADN por medio de restricciones enzimáticas.

Se realizó la restricción enzimática de los insertos de ADN aislados, con las enzimas Bam-HI, Eco-RI y Hind-III y combinaciones de estas: Bam-HI/Eco-RI, Bam-HI/Hind-III, Eco-RI/Hind-III. Los fragmentos de restricción generados fueron visualizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la figura 14 se muestran las fotografías de los geles de restricción. Cabe notar que no se observa liberación de inserto o alguna banda en el carril retringido con la enzima Bam-HI y por lo tanto cuando se usa la combinación de esta enzima con alguna otra, los fragmentos observados son consecuencia de la restricción de la otra enzima, de tal forma que las bandas generadas por los carriles 3 y 4 son las mismas que las generadas en los carriles 5 y 6, respectivamente. En las figuras 15 y 16 se representan las longitudes de cada una de las bandas generadas calculadas por interpolación de la gráfica log. longitud & mm recorridos en el gel.

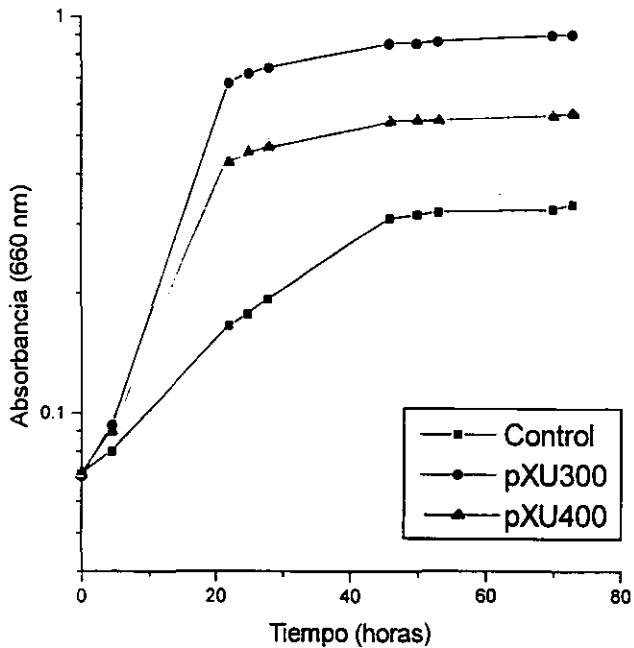


Fig. 12. Verificación del fenotipo halotolerante. Curva de crecimiento de clonas retransformantes de levadura con ADN plasmídico y que aún presentan tolerancia a la presencia de LiCl (250mM) comparado contra una cepa de levadura control (RS16-a) transformada con YCp50. Las curvas fueron realizadas por triplicado observándose un comportamiento similar en todas ellas.

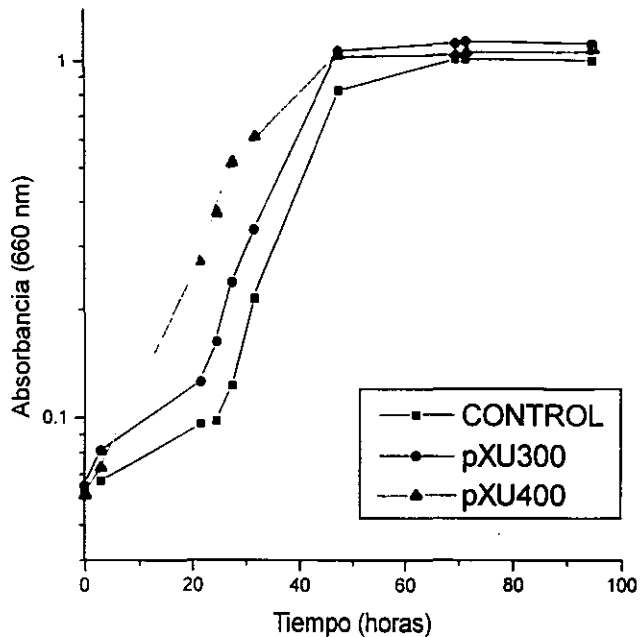


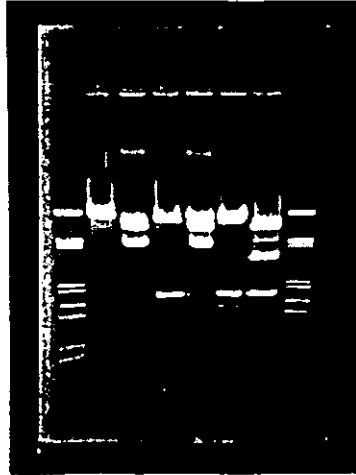
Fig. 13. Análisis funcional del fenotipo halotolerante. Curva de crecimiento de clones retransformantes de levadura con ADN plasmídico y que presentan tolerancia a la presencia de NaCl (1.2 M) comparado contra una cepa de levadura control (RS16-a) transformada con YCp50. Las curvas fueron realizadas por triplicado observándose un comportamiento similar en todas ellas.

11. Elaboración del mapa de restricción de las secuencias aisladas.

A partir de los geles de restricción obtenidos se realizó un mapa de restricción para cada uno de los fragmentos de ADN aislados, con el fin de lograr una mejor caracterización de los mismos y establecer el tamaño aproximado del inserto aislado. En las figuras 17 y 18 se muestran los mapas de restricción deducidos para pXU300 y pXU400, los cuales se establecieron tanto con la información obtenida de los geles de restricción como con la ayuda de la información obtenida de la base de datos *Saccharomyces Genome DataBase* (SGDB).

pXU300

1 2 3 4 5 6 7 8



pXU400

1 2 3 4 5 6 7 8

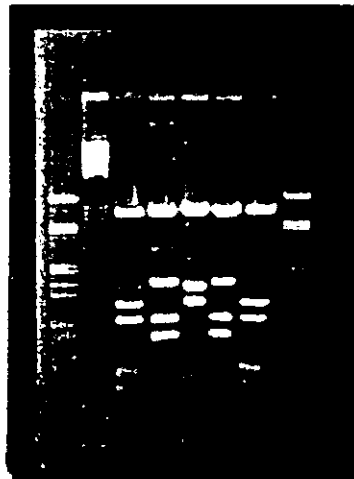


Fig. 14. Análisis de restricción de los plásmidos aislados de levadura. Orden de los carriles 1.-marcador de pesos moleculares; 2.-restricción con Bam-HI; 3.- restricción con Eco-RI; 4.- restricción con Hind-III; 5.- restricción con Bam-HI/Eco-RI; 6.- restricción con Bam-HI/Hind-III; 7.- restricción con Eco-RI/Hind-III; 8.- marcador de pesos moleculares.

FAGO λ (mm/PM)	Bam-HI	Eco-RI	Hind-III	Bam-HI/ Eco-RI	Bam-HI/ Hind-III	Eco-RI/ Hind-III
22/21.7	23/7.8					
		25/6.35	24/7.04	25/6.35	24/7.04	25/6.35
27/5.15						
28/5.0		28/4.7		28/4.7		
29/4.27						
31/3.48						30.5/3.61
35/1.98						
36/1.90						
38.5/1.59			37/1.85		37/1.85	37/1.85
41/1.37						
46/0.94						
48/0.83						
54/0.56						

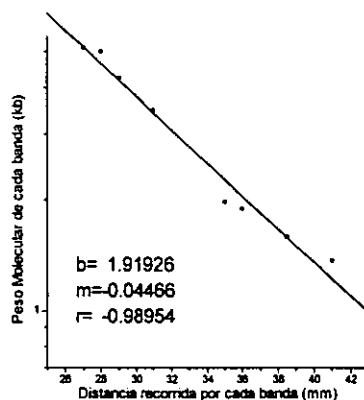


Fig. 15. Fragmentos de restricción del inserto aislado de la levadura portadora de pXU300. Se indica la longitud de los mismos así como los mm recorridos (mm/PM), y la gráfica en la cual se realizó la interpolación de los mm recorridos en el gel, para la obtención de su longitud y en la cual se graficaron todas las bandas excepto la primera (21.7 kb) y las tres últimas (0.94, 0.83 y 0.56 kb).

FAGO λ (mm/PM)	Bam-HI	Eco-RI	Hind-III	Bam-HI/ Eco-RI	Bam-HI/ Hind-III	Eco-RI/ Hind-III	
18/21.7	19.5/6.4	21/5.56	21/5.56	21/5.56	21/5.56	21/5.56	
22.5/5.15							
23.5/5.0							
24.5/4.27							
25.5/3.48							
30/1.98							
31/1.90							
33/1.59				33/1.75		33/1.75	
35/1.37			37/1.18		34/1.64	37/1.18	
40/0.94			40/0.88	40/0.88		40/0.88	40/0.88
42.5/0.83			43/0.68		42/0.74		
48/0.56		49/0.41		50/0.38		49/0.41	
		52/0.35				52/0.35	

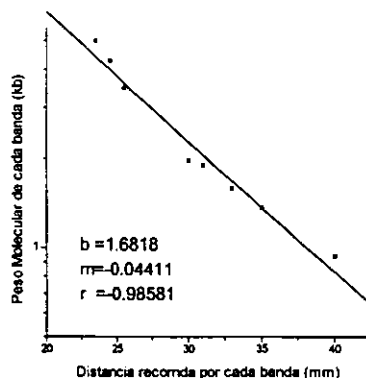


Fig. 16. Fragmentos de restricción del inserto aislado de la levadura portadora de pXU400. Se indica la longitud de los mismos así como los mm recorridos (mm/PM), y la gráfica en la cual se realizó la interpolación de los mm recorridos en el gel, para la obtención de su longitud y donde se graficaron todas las bandas excepto la primera (21.7 kb) y la última (0.56 kb).

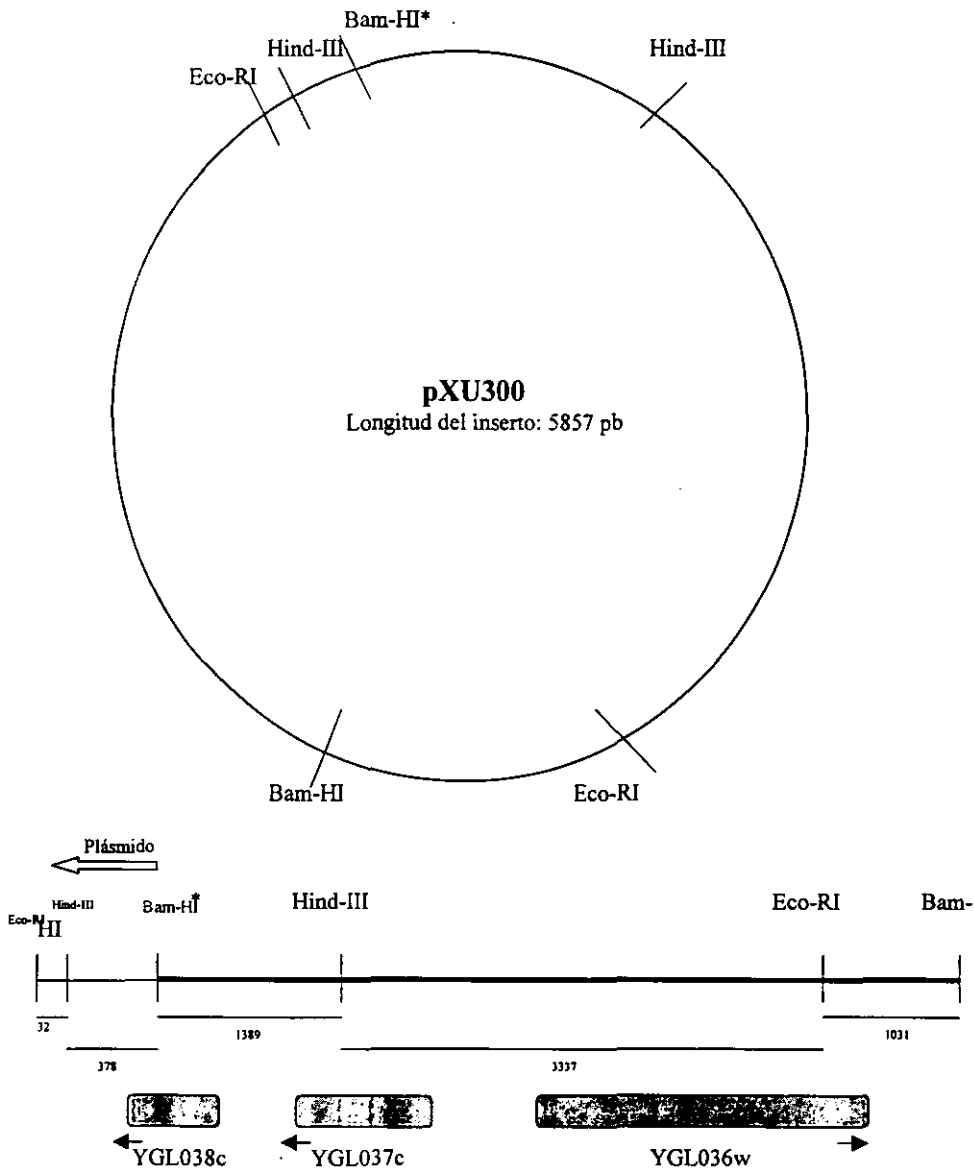


Fig. 17. Mapa de restricción de pXU300. El mapa muestra en forma circular tanto al plásmido como al inserto, y en forma lineal se muestra el inserto así como los sitios de restricción y el tamaño de los fragmentos generados. Además, en gris se muestra la ubicación de los marcos abiertos de lectura localizados en este fragmento, (*sitio Bam-HI perdido).

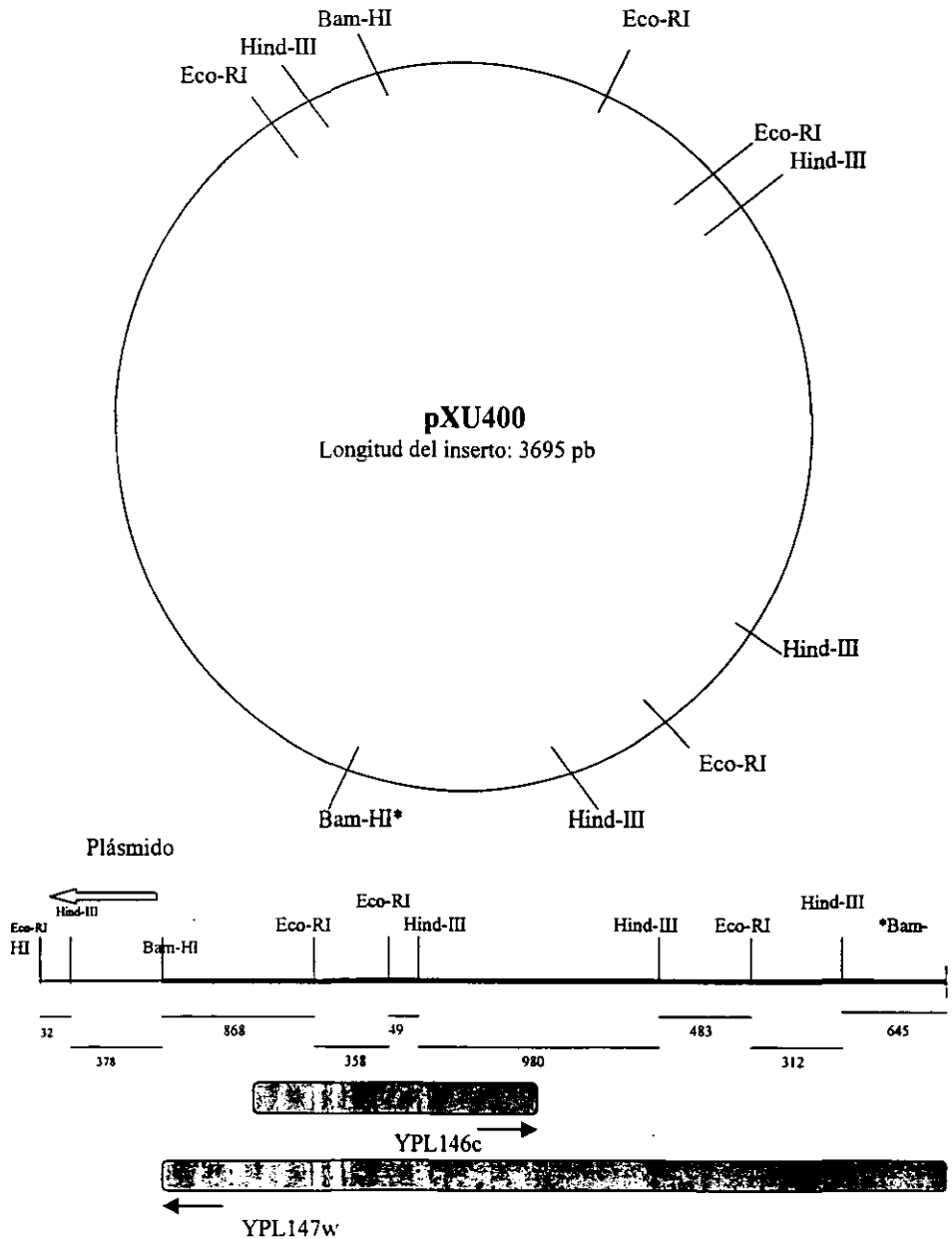


Fig. 18. Mapa de restricción de pXU400. El mapa muestra en forma circular tanto al plásmido como al inserto, y en forma lineal se muestra el inserto así como los sitios de restricción y el tamaño de los fragmentos generados. Además, en gris se muestra la ubicación de los marcos abiertos de lectura localizados en este fragmento. (*sitio Bam-HI perdido).

12. Estudio de la secuencia del ADN aislado

12.1. Secuenciación

Se obtuvo la secuencia de aproximadamente 500 pb de cada uno de los fragmentos de ADN aislados, mismas que pueden ser observadas en las figuras 19 y 20.

Aproximadamente 20 bases de cada secuencia fueron analizadas por el programa BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI) el cual llevó a cabo una búsqueda comparando la secuencia introducida contra todas las secuencias de ADN identificadas hasta el momento y proporcionó una lista de las secuencias conocidas que presentan cierto grado de similitud con la secuencia bajo estudio. En la figura 21 se muestran las listas proporcionada por el programa.

12.2. Empleo de la base de datos Saccharomyces Genome DataBase (SGDB)

Una vez localizada la secuencia de ADN con similitud a los fragmentos aislados, confirmamos que en ambos casos la secuencia con mayor similitud pertenecía al genoma de levadura. Así que iniciamos el empleo de la base de datos Saccharomyces Genome DataBase (SGDB), dentro de la cual solicitamos nuevamente la búsqueda de la secuencia homóloga (proporcionando nuevamente un fragmento de la secuencia para cada inserto aislado), de tal forma que la base de datos nos proporcionó la ubicación de las secuencias dentro del genoma de la levadura. Así, solicitamos a la base de datos la siguiente información: la secuencia de aproximadamente 6000 bases hacia la dirección correspondiente, el mapa genético de esta región y finalmente los sitios de restricción dentro de esa secuencia para las enzimas empleadas en nuestros ensayos de restricción.

Con la información anterior se establecieron los siguientes parámetros:

Verificación de la secuencia total de 400 bases obtenida experimentalmente con la secuencia obtenida del SGDB, para asegurar que se trata de la secuencia y ubicación correcta.

Localización, en la secuencia proporcionada por el SGDB, de los sitios de restricción de las enzimas Bam-HI, Sau-3a, Eco-RI y Hind-III

En las figuras 22 y 23 se muestran las secuencias obtenidas y la ubicación del inserto dentro de ellas, así como el lugar de inicio y fin de los marcos abiertos de lectura (ORF 's por sus siglas en inglés) ubicados dentro del inserto.

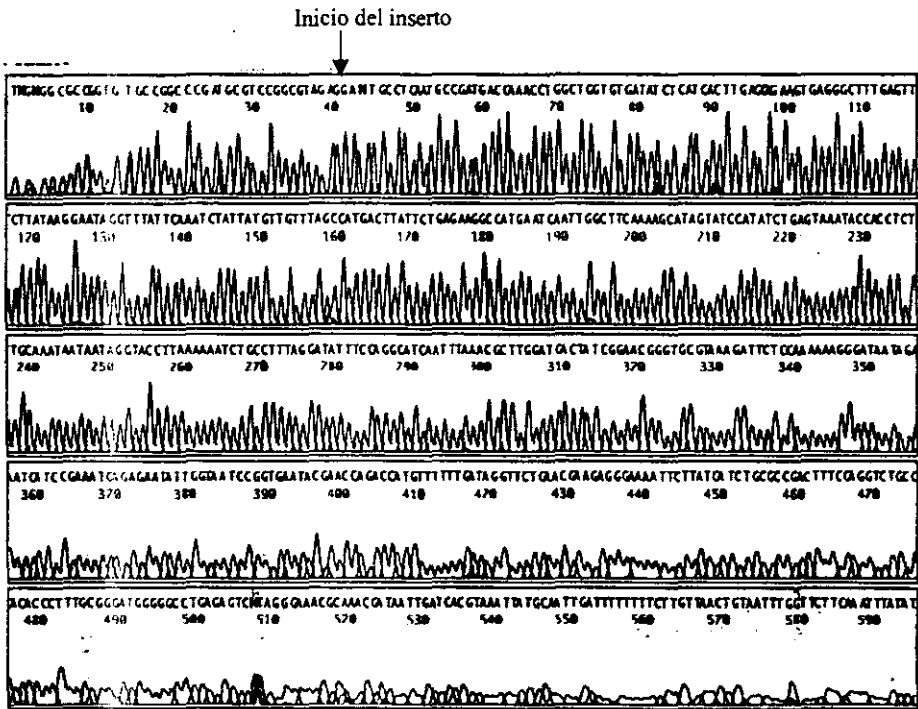


Fig. 19. Estudio inicial de la secuencia del fragmento de ADN de la levadura portadora de pXU300.

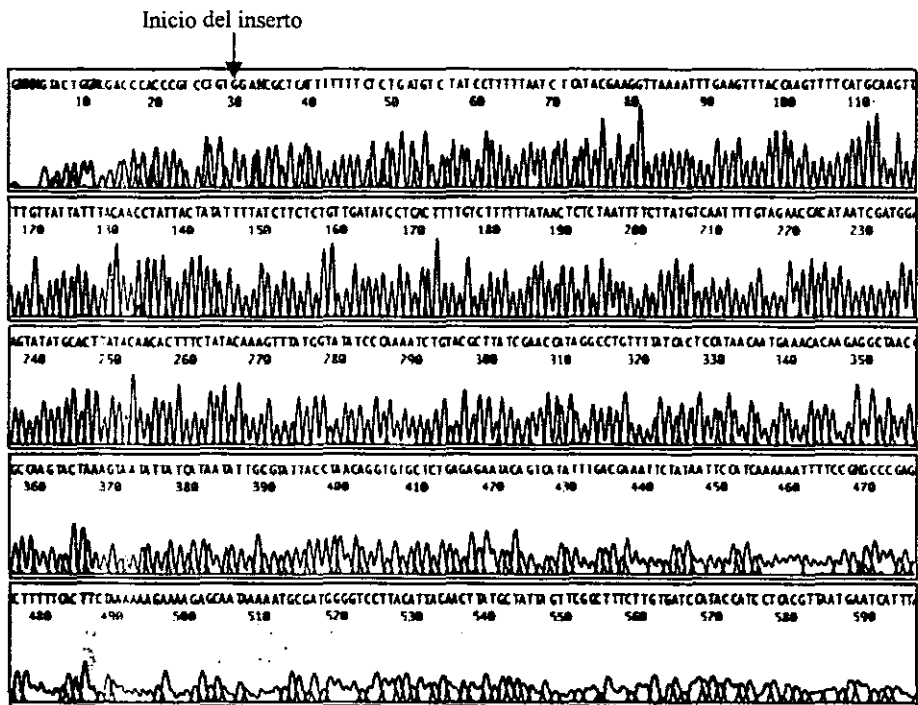
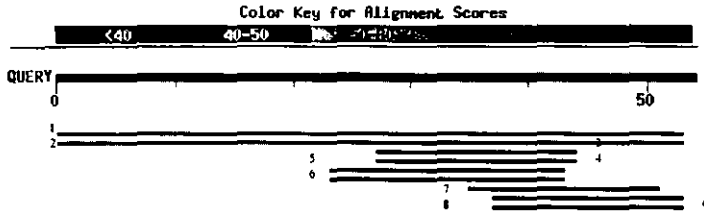


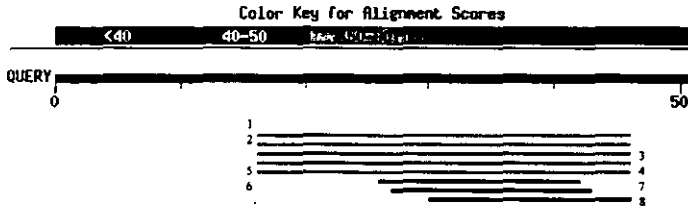
Fig. 20. Estudio inicial de la secuencia del fragmento de ADN de la levadura portadora de pXU400.

pXU300



Sequences producing significant alignments:	Score	Value (bits)
1dbj D11095 YSCOCH1	S. cerevisiae OCH1 gene for mannosyltransfer	107 2e-22
2emb Z72560 SCYGL038C	S.cerevisiae chromosome VII reading frame 107	2e-22
3gb AC004228 AC004228	Homo sapiens Chromosome 11q12.2 PAC clone	36 0.46
4gb AC003025 AC003025	Human Chromosome 11p12.2 PAC clone pDJ466a	36 0.46
5gb AC005245 AC005245	Homo sapiens chromosome 17, clone hRPK.642	34 1.8
6dbj D63920 D63920	Xenopus laevis xCDC46 mRNA, partial cds	34 1.8
7gb AC002458 AC002458	Human BAC clone RG098M04 from 7q21-q22, co.	34 1.8
8gb AC002089 HSAC002089	Human BAC clone RG308B22 from 7q22-q31.	34 1.8
9gb U44048 XLU44048	Xenopus laevis MCM5/CDC46 mRNA, complete cds	34 1.8

pXU400



Sequences producing significant alignments:	Score	Value (bits)
1emb Z73501 SCYPL145C	S.cerevisiae chromosome XVI reading frame	62 7e-09
2emb X96770 SCLACHXVI	S.cerevisiae chromosome XVI, left arm DNA	62 7e-09
3gb U43703 SCU43703	S.cerevisiae chromosome XVI cosm	62 7e-09
4emb Z73502 SCYPL146C	S.cerevisiae chromosome XVI reading frame	62 7e-09
5gb U03913 SCU03913	Saccharomyces cerevisiae Kes1p (KES1) gene,	62 7e-09
6gb AC005285 AC005285	Drosophila melanogaster DNA sequence (PIs	34 1.7
7gb AF002696 AF002696	Homo sapiens antiquitin (ATQ1) gene, parti 34	1.7
8emb Z97344 ATFCA9	Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, ESSA I	34 1.7

Fig. 21. Lista de similitud generada por el National Center for Biotechnology Information, de secuencias con cierto grado de similitud con los fragmentos clonados. Las líneas debajo de la línea QUERY (que es la secuencia a comparar) representan el porcentaje de similitud con la secuencia proporcionada y están ordenadas en forma descendente.

Con ayuda de los datos obtenidos se logró identificar la longitud exacta de los insertos, ya que los mismos iniciaban en un sitio Bam-HI (sitio del cual inicia la secuenciación) que es proporcionado por la restricción del plásmido con esta enzima al realizar la construcción del banco genómico. De este punto en adelante (dirección 5' a 3', cadena Watson para pXU400 y 3' a 5' cadena Crick para pXU300) la búsqueda de un sitio Sau-3a proporcionado por la restricción del ADN de levadura con esta enzima durante la construcción del banco genómico proporcionó el otro extremo probable del inserto. Además, se verificaron los sitios de restricción que deben coincidir (en cuanto a número de bandas) con los observados en los geles de restricción. Es en este punto donde fue posible establecer con certeza la longitud del inserto y el mapa de restricción del mismo, los cuales ya fueron mostrados en las figuras 17 y 18.

Además fue posible establecer la ubicación de cada uno de los insertos dentro del mapa genético proporcionado por el SGDB, el cual se observa en las figuras 24 y 25.

Observando lo anterior notamos que las secuencias presentan uno o más marcos abiertos de lectura (ORF, open reading frame).

12.3. Análisis de los marcos abiertos de lectura

A partir de lo anterior la investigación se enfocó en recabar y analizar la información existente sobre estos marcos abiertos de lectura y las características de las proteínas posiblemente codificadas por estas regiones.

pXU300 (cromosoma VII)

ORF YGL037c

ORF YGL036w

pXU400 (cromosoma XVI)

ORF YPL146c

Cromosoma VII Secuencia de la base 426000 a la 432000

1 CTTGGATAGT CCATTGACAA AACTGGATCC TACGAGCATA CCATTCACTC
51 CAATCATCTC TGTCCG***■**GTAC TGCCTCAATG CCGATGACCA AACCTGGCTG
 inicio de secuencia * y del inserto **■**
101 GTGTGATATC TCATCACTTG AGAGAAGTGA GGGCTTTGAG TTCTTATAAG
151 GAATAUGTTT ATTCAAATCT ATTATGTTGT TTAGCCATGA CTTATTCTGA
201 GAAGGCCATG AATCAATTTG CTTCAAAGC ATAGTATCCA TATCTGAGTA
251 AATACCACCT CTTGCAAATA ATAATAGGTA CCTTAAAAAA TCTGCCTTAA
301 GGAATTTTCC AGGCATCAAT TAAACGCTT GGATGACTAT CGGAACGGGT
351 GCGTAAAGAT TCTCCAAAAA AGGGATAATA GAATCATCCG AAATCAGAGA
401 ATATTGGTAA TCCGGTGAAT ACGAACCAGA CCATGTTTTT TGATAGGTTT
451 TGAACGAAGA GGGAAAAATC TTATCATCTG CGCCGACTTT CCAGGTCTGC
501 CACACCTTTT GCGGGATGGG GGCCTGAGAG TCGTAGGGAA ACGCAAACGA
551 TAATTGATCA CGTAAATTTA GCAATTGATT TTTTTCTTTG TTAACGTAA
601 TTTGTTTTCT CAAATTTATA TCTTGTGAAT GAGAAGTCTG AGGGAGAAGA
651 GTTTGCTTGA AATCATCTTT GCTAGGGTAA AACTGAGAAA GCACGCTTTT
701 GTTTGACAAG TGA AATGTCA A * CAAAGAATA AATAAGAAGT ACGTTTACGA
 fin de secuencia
751 CTATTGTTTT TGATTTCTT GTAGCGATCA GGTGGGACAA CTTCCTAGAC
801 ATGATCTCTT CTTTCTTTTA CTTGCTTTCT TTTTCCAAAT TGCTATTATT
851 GCCTTTGAAA TGAAAAACGG AATCAAGAAC TAAAAACAAC TATCCCTATT
901 AAATAFAAAA GGATGCAGAT GGGGAGAGAG AATGTGGATT GCGGAGAAAT
951 AATGTCGGTA TTCAAGAAG GCAGAAATAC TAAAGTGGCT ACCAAGCTAC
1001 CAAACACTCT TAATGCAGAA GTTTTGACGT TGCTGTCCCT GCAACGTGAA
1051 AAGTCCAAAA AGGCGCGTTT AGTTGAGGCC CAGCCAAAATC TTTTCGGCTG
1101 GGGCCGCGCA AATAGTTTAA GCAATTTACC CAAAAAGAA TAAAGAGAGG
1151 CGTAAAGACG TTAGTTAATA TTTTATTATT CTTCTCCAT ATGTCGGAAT
1201 TCGGTGTACA TACATATATA TAGATATTGT TATATAGATT TGTCATTGG
1251 CAAGCCACCC TAGTTCATCA GTTTGAAGAA GTATTATTCA GCT CTT **◆**ATTT
 inicio de YGL038c y final de YGL037c **◆**
1301 ATCCACGACA TTGATGTTGT GGGCCTTCAA CTCTTCCTTA ACCTTATTGA
1351 TGACTTCCGG ATCATCGCTG ATGGGCTTTG TGTAATCCAG CAGGCAGTGT
1401 GTCTTATAAC CTAGTCTGC AGCGAAATG GCGGTGGCTT TGACACAATA
1451 CTTCAAGACT ACACCGACAA TGTAACCTC GTCTGTATGA TGCTTTTCTA
1501 AGTACTTGTG CATGTCCGTC TTATGGAAGT TCCAGATGTC GTGGAAGGGC
1551 GAGTGTATT CACGGTCAGT CAAGAAACCC TTGTCGACAA TCTTAAATATG
1601 CTTAGTGACC ACTTGGTCCA TTATTTGGTC AACCAATTGA CTACCCCAGG
1651 TGTTTTTAC ACAGTGATCG GGCCACAAAA TACCCTCTTG CGTGGAAATC
1701 TCGCTGGCC TTGGAGAGTG GTAGGTGAT GTTGAATAGG GTTCTTATC
1751 TTTATGGTTC TTGCGAAGC AAATATGTCT GGAAGGGTGC CAATCTCTGG
1801 TGACCACAAT CCTGTGCCAG TCTCTATCAG CATCTTGAT CAAATCCGAG
1851 ATAGGATTGA TTAATCTCT ACCTTTTGA ACAGTCAAGG AACCTAAAGG
1901 TGAATAAAAA TCATTTGCA TATCAACAC AATTAAGATC TTCAT**◆**TTTTG
 inicio de YGL037c
1951 TACTGTATTT TATTCTTTCT AACAAAGATA TAGATAATCG TAAAGAAAG
2001 TTTGTTTGA AGGTTTCCTC ACCTATTGCA TCCAACCAGG TACCAGTTAA
2051 GAGTACATTG TATATGAAAA TATATATATG AGTAAATAT ATATATATAG
2101 TTTTATTAAT AACATTAGC ACATCATAAT CGTATCTGGA GACACATACA
2151 TAGTGGGCCA AACGGAAA**CC CCTGCCCC**TT GAAGAACTTT TTTTTCATA
 Secuencias STRE
2201 TTCACTTTTC CAGTACGTA ACCACGCGG **CGCCCCT**TTG TGGGCTG**CC**
 Secuencias STRE
2251 **CC**TTTTTTTT TTTCTTTCT TTTTTTCGA AACATTCCGC GAGATTCCG
2301 CAGCTCCAA ATGATATCGA GCTAACAGT ATAAAGCGAT AACGATATA
2351 ACGACGTATG ATTTAGCAA CCGAAGACGT TAACAATGAC ATATGGATAT
2401 TTATTATAT ATATAATATA AAAATTTCT TACCTGTGT GCCACCTGA
2451 TCCCTGACTT AATATATTT TTTCTGTGT GATCTCGGC GCAGTTTTTT
2501 CTGTTTCATA TAAGGAGGAT CGTAGGGAAA GAGGAAAAACA AAAGGCATAA
2551 TTAACCAATA GCAACAATAT AAGCAGTACA GAACCTCAC CACCAGAA**AA**TG
 inicio de YGL036w **▲**
2601 CAGAAGTGTG CTGGCCATGC ACCACTGGT ACTGCAGCCT CGCGGGTCTC
2651 CCAAGACACC GTAGACGCTC TTTTGAAGC TATTTAAAG GCCTACCATA

Fig. 22. Secuencia completa del fragmento pXU300 de ADN aislado y ubicación de los marcos abiertos de lectura dentro de él, así como de otras secuencias importantes (regulatorias, consenso, etc.).

2701 AATTGGCTTC GATCGACAGT CACATTAATG ATCCTGTTGA AATAGCCTTC
2751 AAGLTCATAA ACTCTTTTAA GTATCTGCCA ATTTACAGGCT CTCTGTAAA
2801 AGATFTTGAG TCGGAAGTGC GGGAGTTAGA CGTTTTTCT CCCCTTTTGC
2851 AGTACGCCGT TACTGCTGCT AATAATAGCA ATATCATATG GGACCTTATA
2901 CCGGFIGITAT TTGCATACAT TTCCATCCAT AAACAGCTCC ATCCTTTTGT
2951 CCTGCACAAT CTGAACATAT GGAAGGATTT TATGGCAGAT AATGACGAAG
3001 AAAAGGGAC AACACGGAC GGGGACTCAA TGAATTTCCG CGTACTGTCC
3051 CTTCCTTCCA TTGTTCAAAA TTTTGAAGAA ATAAACCCAA ATCTATTTTGA
3101 GTTCTAAAG CTCGGTTTGA GATCCACTTT ACTCAAAGATA TGGGTAGCAC
3151 AATGGCAAAG ATACGATCCT TCGGCAACGA ACTTAATCAA CGGTGATGAG
3201 AAAATTTCTA GCTGGATAAC AAAGGATTAC CAGGTGGATT TTTTATCAT
3251 CACITTCATTA GCATCAACGT CCTCATTAGA AGTTTTGCCA TCTCATTATT
3301 TTGTGTACAA GATCTCTAAA AGGATCTCTC ACTTCCCAA TTAATTTGAT
3351 CCTA AACTAT ATCGATCTGC AATTTCTACA ATAATGGAAA ATGGGATTTT
3401 AGAL AATGGT GGTGGTGAGA ACTCCAGCGA CAAAATTTGAT CCGAGTATT
3451 TGTCTTTCA CTTACAAGTT TTAATGGAAG TTATTGACCA TCTCTAGTGT
3501 AATTATTTG AGGAAAATCG ATTAATTTTG TTGCTCGACA TTGCATTAFA
3551 TTATTAATC CTGGTTCTA CTCACTGTTT ACATTCAAAC TTTGGTGAAT
3601 TGGGCTCTAC TCAAAGTTTA GCATCCACTT TAAATATCAT TCAGTTCCTT
3651 CTATCGAAAT TCTTAATCAA CATGGGCAGT ATTTGCAAT TAATTAATCA
3701 ATAC AACAGG AAATGCATCA CTACTAATA CATCAATAA AACAACATTA
3751 ACANCAATGG CGTTATTAAT GGTAGTACTA ACACCCTAG TACTACTACT
3801 ACTGCCATCA CTAATAACAA TAATAATAGC AATAATAGCA GTATTAGTAA
3851 TAATACAGA AAAATAGACT GGACGCAATC ATATCAAACG AGGTACCAA
3901 TTCTATCTG GTTTGAGGAC TCAATTTTGC CACCAATTCG GCCTATTTGC
3951 AAAICGCTTT TCACTTTTGA CAAGAACCTA GACCATGAGT CGGATTCAT
4001 TATGATTGTA AATGATGAT TACGCTGTTT GAATTAACC ATTCITTTAA
4051 TTTCTAAACT TCTAAGGGAT TATGATGACC TGAAGATTA CCCCAATTT
4101 CAACATCAG ATGATCACAG TAATGAAGAC AATCATGTGA TAATAGAAC
4151 ATACATGAG CTTTATCTCG TTCCATTATT TACTTCATTA TTATTGGCCC
4201 AACATTTAA AGACCGAGGC CAAGAACGAG ATGAAGGACA TAAAGAGAAA
4251 GAGGAAAATA TAAATCTCAT CGGGTCTTCC TCAGTCAAGA AATTATTTTC
4301 TCACTAATTT TTTTTAGCT CTTTGAAATT GTGTGAAAAA TTGGTCATAA
4351 AGGAAAAAAA TTTAGCACTA TATCATTGTA TCAAATTCG GACAAGGTT
4401 TCTGTTGATG ATTTGATTTT AAAAAAATA TCCATAAACT TATTGAATCA
4451 TTTGTTCTC CATCAAATTA GGGATGGAAG TGATGATGAT AATTTAATTA
4501 AAAAGTTATG TTTAAAAAAT CAACTTTCTT TCCAAGCTTT GAAAGATTAC
4551 ATCATTGTT GGAATGACCG TTCTGAAGTT TATAATGCAT TTTATAAGGA
4601 GCTTTCTAT GAAGAGCAAC CAAAGATTA GCCAATAAAA CTAACCAACAT
4651 CTGCTTCTGCT GAAATTTATC CTGAGGGATG TTCAATTTGT GATATCCACT
4701 CCAACAAATA CAATAACTTC AGCATCAACA AGCGATAATT GTACATCATC
4751 ACATCAGCT GCGCAGAAAA ATATTGAAAA CTTTACTACG TTATCGAAGT
4801 ACGTGTCTA CTCGTCCACA TCTTTCATAC CGTCCACGTC GAAAAACACT
4851 AACACTAACG TTAGTAAGCA GCAGCAGCAG CCTCAAAACT CTACTCCATG
4901 TTTCCAAC AGGTTTTTGT TCAACAAAAG CAGCCTAATT TCTCAGGAAA
4951 GTAATGGTAG CAACAATAAC AGCGGCACAC AAGGACCTGG TTCATGTAAT
5001 GAGGTTTATT CTCTTGACAA TTCATTCAAC ACAACCAATA CCAATATGAC
5051 GAGCAACCA ACCACCTTAA CTAGAGCAAC CGATGCTATG ACTACGGCAC
5101 CTAAGACACC AATTCATAC AAGAACACTA GTGGAAGCAG CAATAACAAT
5151 CTAATGGATT AATCGCCCAT GACAAAATTT AAGGGTTCCA CCATCAGTAA
5201 AAGTACTAAT AAGAGCAAAA TGGTTAATAC TGGTAAAAAT TATATTTTGA
5251 GGGGCCACAA TAAAGTTAAA AACAACAGTA GAGCTCAATC AATACATATA
5301 GATACCTTTG AAAATGAGAA CAATTA TAATTA TCTCTGCCGA AGACTAAGAC

Inicio de YGL036w

5351 AATGAAAATA TGTATTCTTA CTATCATAA TAAATATTTT TATCGTTATT
5401 AATATTTATT ATTATTACTA TTATTATTAT TATTATTATT ATTATTATTA
5451 TTATTTATTA TTTATTAATTT ATTAATTTGT AATATTATTA ATCTTGTCT
5501 ATTACTTTT GATTATCTG CACCGCCAAA AACTTGTACG CGTATCAGTC
5551 CATATGTGGG AAGGGCAACG GTAACITCTT TATGGGTGGT AATGTTTCCA
5601 GTTATGTAAC TTGTGAATCC GACTGAGAAA TGGGGGTTTG TTGGGTGGAT
5651 ATACAGTAT TAATCATATT CACCCTTGGT GACAATAATA ACGGGGTTGT
5701 ACTAACGAA CTACTGGAAG CCATCATTGG ATTTTGATTT TGATTTTGC
5751 TTTGTTTGA CGTATTTTGT GATTGCAGTA GGGTATGTTG CTCTTGTCTC
5801 TGTATTTGAA CGTTCAGTAA TCTGTGTTTC AACTCTTTT GGAAATCAGG
5851 AGATGATGAG GAGAAAATGCA AGTGATTTTG GTTCATTACA TACCCCAAAG
5901 TGTACAAATT CGTACCACTA GTGGATC ■ TAC TTAGCATTGT CGTGGCGGTG

fin del inserto

Fig. 22. Continuación

Cromosoma XVI Secuencia de la base 273100 a la 278110

1 GTT:CGTTAC CCTTTTTTAC CCCAATTTTT AATTCGGCG GTTATTTTCA
 51 GCC:TTTTAG AGTCAAGATA TATAAGAATG CTCTCTAAG AAGTGAGACT
 101 AAC:ATGAAA CCCGTTTCAG ACAATCTGGA AGTCTTAGAA CGCATAACAC
 151 AGA:ATGTCA ACAACATTAG CAGCACCAGC GAAACTAAAG AGTTTGCTCC
 201 TGA:CTTACA TACTCACTGT ATTGGGCTAC ACGTTAACGA TGTCACACT
 251 AAA:ATATAIT TCAAGTTATT GATACGGCAT CTCTACAGA TATCTAGCT
 301 AAA:GCTGCT CATCCTAAGC TAA ◆GAAGAAG GGCCAGATT TTATTGGTAT
 inicio de YPL147w ◆
 351 CGC:TTTCTT ATCTGGTGC ACACTTTTTT CTGGTGAAC ATATAGTACT
 401 TTC:AAAATTA TTCTAAAATG TTATAAATTT TACAAGTTTC CATGGAAGAG
 451 AAG:AAATAGG AGACCTTTAA TAAGAAGAAC AAGATCTCAA ATGCAATTAG
 501 ACA:TTGGTC AAGAATAATG TATATTCCTG AAGTGAATT AGTCGACCGC
 551 CAG:AGTCCCG ATGACAACAA ATTTATGAAT GCTACAGATA AAAAAAAAAAG
 601 GAA:VAGGATA TTTATTTCCAC CAAAGGATAA CGATGTATAT GAACACGATA
 651 AGT:CTTTTT TAAAAATGTA GAACCTGGAA GAGCCAAGAA TTCCGAGTTA
 701 TTC:ACTCAA AATTTTTAAA CCAATGAAC GTCTTGCTA AAATTTAAT
 751 TCC:ACAGTT TTTGACAAAA ACTTCTTCT TTTAACTGCT CAAATTTTTT
 801 TCC:GGTGAT GAGAACCTGG CTCTCTTTG TTGTAGCCAA GCTGGATGGA
 851 CAA:VATGTA AAAATATAAT TGCTGGTAGA GGAAGAAGCT TTCTGTGGGA
 901 CTT:GGGTGT TGGTTTTTAA TTGCTGTCCC TGCTTCTAT ACTAATAGTG
 951 CTA:TAAGCT ACTTCAAAGG AAGTTGAGTT TAAACTTTAG GTTAAATTTG
 1001 ACA:GTTACA TCCATGACAT GTATTTGGAT AAAAGACTAA CATTTTACAA
 1051 ATT:ATTTTT GATGCAAAGG CGTCCAATTC GGTATCAAG AATATCGACA
 1101 ACT:CATTAC TAATGATGTT GCAAATTTTT GCGATGCGAC ATGCTCCGTT
 1151 TTT:CAAACA TTGCAAAGCC AGTTATTGAT TTAATATTCT TTTCCGGTTA
 1201 TTT:CGTAT AATTGGGAA CTGTGGGAGT AGCAGGTATA TTTGTTAAT
 1251 ATT:CATTAC TGGGTTTATT TTGAGGAAAT ACACGCCACC ATTAGTAAA
 1301 TTG:CAAGCG AGA ◆GATCTCG TTCAGACGGC GATTACTACA ATTATCATCT
 inicio del inserto ■
 1351 AAA:ATGATA AATAATAGCG AAGAGATCGC ATTTTACCAA GGAACAGCAG
 1401 TGG:AAAGGAC GAAAGTTAAA GAGTTGTATG ATGTGCTGAT GGAAAAATGT
 1451 CTG:TTGGTT ATAAAGTCAA GTTTGGTTAC AATATGTTGG AAGACTATGT
 1501 TTT:AAATAT ACATGGTCCG GTTTGGGTTA TGTTTTGCCC TCAATCCCTA
 1551 TCG:ATGTGC TACCTTAGCG ACAGGCATCA ATTCAGAGGA AAAAAATATG
 1601 AAG:AAATTTA TAGTCAACAA AAGGTTGATG TTGTCCGCTG CAGATGCAAG
 1651 CTC:AGATTG ATGCATTGGA TAAAGGACAT CTCACAATTG ACCCGCTACA
 1701 CTA:TAGGAT ATTTACTCTG CTTTCCGTCT TACACAGGAT TCACCTCTG
 1751 AAC:TTAATT ACGGCGCTGT TCCTTCAAT CTGTCAATAC GTACAGGAAG
 1801 CGC:TCCAGA AATCCAACCT TATTACCCAC CACGGATAAT TCGCAAGATG
 1851 CTA:TCGTGG TACTATTCAA CGCAATTTTA ACGGTATTCC GTTAGAAAA
 1901 ATA:ACGTAA TCATTCCATC AGTAAGGGCG AGCGAAGGCA TAAAGCTGAT
 1951 TAA:AACTT ACATTTCAA TTCTTTTGA TATTGACCCA ATAACTTCAA
 2001 AGT:CAATTC TATACAAGAC TTATCGAAGG CAAATGATAT AAAGTTACCA
 2051 TTT:GCAAG GTTCTGGCTC CAGCCTGTTA ATATTAGGGC CAAATGGTTG
 2101 CGG:AAAAGT TCAATTTCAA GCATTATAGC TGAATATAGG CCAGTGTATA
 2151 ACA:AAATGG ATTATTGTCG ATTCCTTCCAG AAAATAATAT TTTTTTATT
 2201 CCT:AGAALC CATATTTTAG TAGAGGTGGA ACTTTAAGAG ACCAAATTAT
 2251 ATA:CCCATG TCCTCGGATG AATCTTTGA TAGGGGGTTT AGAGATAAAG
 2301 AGC:AGTACA GATATTAGTC GAAAGTGAAC TAGATTATCT TTTAAAAAGA
 2351 GGC:TTGGCT TAACTTACCT AGATGCCATT GCCGATTGGA AGGACTTATT
 2401 AAG:GGTGGT GAAAAAGCAA GAGTAAATTT TGCTAGAATC ATGTTTCAATA
 2451 AAC:ACTATA CGTAGTATTA GATGAGGCTA CAAACGCAAT TAGTGTGTAG
 2501 ATG:AAAGACT ATCTGTTCAA TCTTTTAAA CGATACAGAT TCAATTTTAT
 2551 TTCT:ATATCA CAAAGACCA CATTAATCAA ATATCATGAA ATGTTACTAG
 2601 AGA:TCGGTA AAATCGAGAT GGCAAATGGC AATTACAGGC AGTTGTGACC
 2651 GAT:AAAGCAA TCACGTCCAT TGACAACGAG ATTTAGGAAAT TGGAGAGAAA
 2701 ACT:GAAAGA GTAAAAGGTT GGAAGATGA GAGGACGAAG CTACGGGAAA
 2751 AGCT:GAAAT TATTTGAAAA CACCCTAGAA AGGGAGAGAT TTTATTTAGC
 2801 GAA:ATAATT TATATATTAT TTCCGTAAC GAATTTGTAC TTTTGAATGT
 2851 TTA:CTGATA TCTAGAGATA TCGACATGGG AATGCCCTCT CAAACTAGAA
 2901 AAG:GCAGAG AACGAAAAGA AAATGAAACA ATTTGTACC TACTATACAG
 2951 TTG:TTGTTCT TGCCAACACA AATATGAACA TATATATATA TATCTCACT
 3001 GAT:AAATCCA CGTATCAAGG ACAACCTTTT CATGGAACA TATACTGTA

Fig. 23. Secuencia completa del fragmento de ADN aislado (pXU400) y ubicación de los marcos abiertos de lectura dentro de él, así como de otras secuencias importantes (consenso, reguladoras, etc.).

3051 AAC AAAAAC T ▲CTATTTGAA GTCCTTATGT GTCCACTTTT CAGTGATTTT
 final de YPL146c▲

3101 CTG: TTATAC TTTCTACCTT TCCTAACGGG CACTCTTGTT TCGACCTTAC
 3151 CAG: ACTTTG TAGTTTTCTC ACAGTATCAT ATAGCAGATT TCCTTCAGGT
 3201 TTC: TTTTTC TCAATGAGTC AGATAATTCG TCAGAAAAAT TAATCTCCAA
 3251 TCT: TCATCA ATCACAGAGT ATTTCTGCCC TAACTTGTGT TTCTTATTTT
 3301 TCT: TCTTTT TTTAACCTTG TTGCTATCTG ACTCTATGGC TGAAGATATC
 3351 TCA: TCTCTT CAGAATTGAT AACTTCTTCT AAATCTTTAA CACGTTGTCT
 3401 CAA: TCTTTC AACCTCTGTT GCAATTTTAC TTTCTCTTCA TGCTCTTTTG
 3451 CCT: TTTTCT TTGATATTTT GTTTTCTTTT TATCTTCCAC AGGCCTATTT
 3501 ATT: ATAGTT TTATTTCCIT ATCAGATCCA CTACATTGGG TACTTTACCT
 3551 TTC: TTTTCA TTTTCTTCTT CTCTTCTTC TTCTTCTCG TTTGATGAAG
 3601 ACT: TTCTC TTCATTGTCA TCTAAAGTTT CCATTAATG TCTAATCTT
 3651 TCT: GTACT TTCCAAGGC GATCTTTCA TCTTCTCTG CCTTTCTCT
 3701 TTT: ACTCT TTGTTTATCA ATTCTGACCA AGCTTTATTG TTGGGATTGT
 3751 AGG: TTACC AGCATGTGGA ATTTCTGTGA ATTCTTTTAC TGCAATTGGC
 3801 TCT: TATCTA AAGTACTTGG TCTGACTGAA CGAGTAGACC AACTTGTCTG
 3851 GGA: TTTTTC AATAGTTCTT CAGGTATCTG GTCCTTTTTT TCCACATCAA
 3901 GTT: TATACC GGAAGGTAAT TTGACCTTCT GTTCTTTGA ATTGGATTCT
 3951 TCA: TCCATA AGTCGCCAGC CGTTGTTTTA ACTAGACCGT CTTTGGCAAC
 4001 TCT: TCTTG ATCTTCGATT CGCCGTGTAC TCTGCCAGCC AAAGCCATTA
 4051 ATT: TTTAA TTCGTGTTTA GAAACACCTT GAATCTTATT AGGATTTCCA
 4101 CTA: TATTCT TATGGTGATT TAGTGCTGCA ATTTTTGAAT TCGTTTTAAC
 4151 GGC: TCTAAA ATCTCTTTAC TTTTAGAAC CTCTTAATT TGTTCCTTT
 4201 TAA: TAATTT ATTTTCAAT ATCTCATCAC CCTCAACATC AACATGAAAA
 4251 AGA: CATCAT TTTGCAAAGA GGTATATCA CTGGTACCAT GCGTAATTTT
 4301 ATG: TCAATT TTCTTTTCCA TATATTGTTT TACGTACAGT AAATCGATAT
 4351 TTT: TCTCA TGCTTTCTTA CCCTTCTTG AAGACTGTTT GTATTGAGAT
 4401 GGT: CTTGG TTAGATTAGT TGGAGCCAT▲ T TTTAAA *TAAA TGATTCATTA
 inicio de YPL146c▲ final de la secuencia*

4451 ACG: TGGAT GGTATGGATC ACAAGAAAGC CGAACTAATA GCATAAGTTG
 4501 TAA: TTAAGG ACCCCATCGC ATTTTATTG CTCTTTTCTT TTTTAGAAGT
 4551 GAA: TAGCTC GGGCACGGAA AATTTTTTGA TGGAATTATA GAATTTCGTC
 Secuencia PRE: CGTN;DYGKR

4601 AA: TATGACT GTATTCTCTC AGAGCACACC TGTTAGGTAA TACGCAATAT
 Caja TATA

4651 TAT: TATAATA TTACTTTAGT ACTTGGCGTT AGCCCTCTTG GTTTCATTGT
 Secuencia consenso para la unión de Abf1p/Gfp: TGTTTCAR

4701 TAT: TACTGA TAAAACAGGC CTATGGTTCC ATAAGCGTAC AGATTTTGGG
 4751 ATA: TCCATA AACTTTGTAT AGAAAAGTGT GTATAAGTGC ATATACTCCA
 4801 TCG: TATGT GGTCTACAA AATTGACATA AGAAAAATTG AGAGTTATAA
 4851 AAA: TACAAA AGTGAGGATA TCAACAGAGA AGATAAAAATA TAGTAATAGG
 4901 TTG: TAAATA TAACAAAAC TGCAATGAAA CTGGTAAAC TTCAAATTTT
 4951 AAC: TTCGTA TGATGATTA AAAGGATATG ACATCATGAG AAAAAAATGA
 5001 GCG: TCT* ■ TGTC T
 Inicio de secuencia* y final del inserto ■

Fig. 23. Continuación

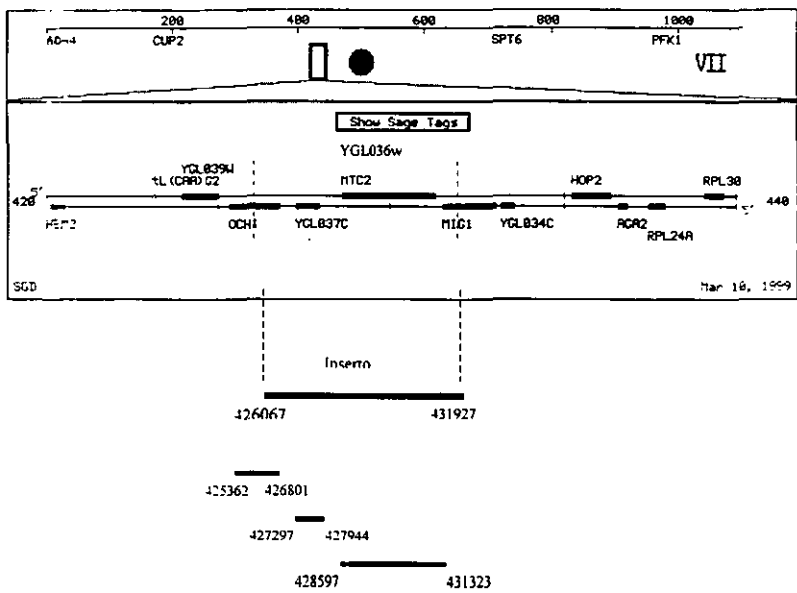


Fig. 24. Mapa genético de la región clonada y vecina del cromosoma VII y ubicación del fragmento de ADN clonado (pXU300) entre líneas punteadas, así como de los marcos abiertos presentes en dicho fragmento

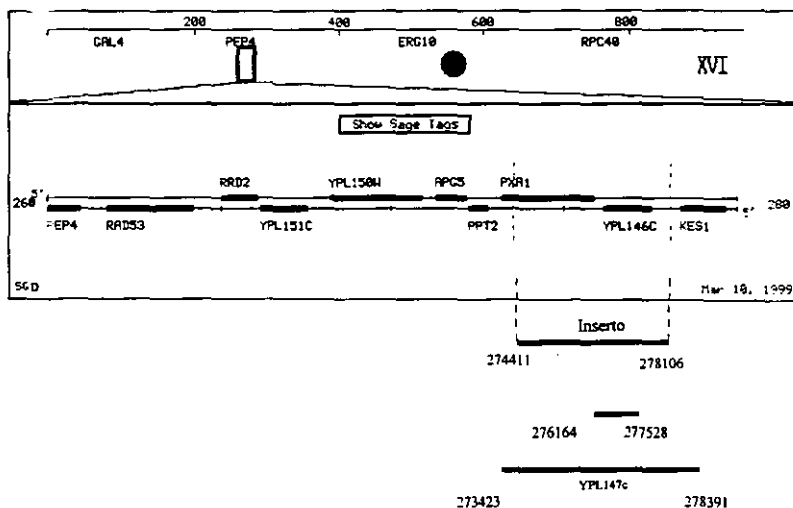


Fig. 25. Mapa genético de la región clonada y vecina del cromosoma XVI y ubicación del fragmento de ADN aislado (pXU400) entre líneas punteadas, así como de los marcos abiertos de lectura presentes en dicho fragmento.

YGL037c podría ser una proteína globular alfa/beta

```
1 MKTLI VVDMQNDFI SP LGS LTVPKGEELI NP I SDLMQDADRDWHRI VVTR 50
  CCCEEE CC CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEHHHHHHHHHCCC C EEEE EEC

51 DWHP S RHI SFAKNHKDKPEYSTYTYHSPRPGDDSTQEG ILWPVHCVKNTW 100
  C CCCCCCCCCCCCCCCCCCEEE ECCCCCCCCCCCCCEEC CE EECC C

101 GSQL VDQI MDQVVTKHIKIVDKGFLT DREYY SAFHD I WNFHK TDMNKYL E 150
  CCHHHHHHHHHHHHHHEEEEECCCCCHHHHHHHHHHC CCCCCCHHH HHH

151 KHHTDEVYIVGVALEY CVKATA I SAA ELGYKTTVLLDYTRP I SDDPEV I N 200
  HHCC EE EEEHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCEEE ECCCCCCCCCHHH

201 KVKEEL KAHNI NVVDK 216
  HHHHHHHHHHEEE CCC
```

Código de la predicción de la estructura secundaria de la proteína:

- H= helice alfa
- E= Beta- plegada (extendida)
- C= vuelta

Fig. 26. Secuencia y posible plegamiento secundario de la proteína hipotética codificada por YGL037c, obtenida de MIP'S.

MIPS

YGL036w

MQKCAGHAPL VTAASRVSQD TVDALLQAIL KAYHKLASID SHINDPVEIA
FKLNSFKYLPISGSSVKDF ESELRELDVF SPLLSAVTA ANNSNIIWDL IAVLFAYISI
HKQLHPLILHNLNIWKDFMA DNDEETATTT DGDSMNFGVL SLLSIVQNF EITPNLFEFL
KLGLRSTLLKIWVAQWQRYD PSATNLINGD EKISSWITKD YQVDFFIITS LASTSSLEVL
PSHYFVYKISKRISHFPNLI DPKLYRSAIS TIMENGISDN GGGENSSDKI DPTDLSFHLO
VLMEVIDHPELNYLQENRLI LLLDIALNYL ILVPTHCLHS NFGELGSTQS LASTLNIQF
LLSKFLINMGSIQLNQYN RKCITTNIN NNNINNGVI NGSTNTTSTT TTTITNNNNN
SNNSSISNNNRKIDWTQSYQ TRYQIPYWE DSILPPIPPI SKSLFTFDKN LDHESDSIMI
VNDVLRCLNLTILLISKLLR DYDDLKINPL IQSSDDHSNE DNHVIEQYM QLYLVLFTS
LLLAQQLKDRGQERDEGHKE KEENINLIGS SSVKKLFSQL IFFSSLKICE NLVIKEKNLA
LYHLIKFATKVSLLDLILQK ISINLLHLF FHQIRDSDD DNLIKKLCLK NQLSFQALKD
YITLWNDGSEVYNFYKELF YEEQPKIKPI KLTTSDLLKL FPEDVQFVIS TPNNTITSAS
TSDNCTSSQSAAQKNIENFT TLSKYDVYSS TSFIPSTSKN TNTNVSKQQQ QPQNSTPCSS
NRFLFNKSSLISQESNGSNN NSGTQGGSM NESYSLDNSF NTTNTNMTRQ PTTLTRATDA
MTTAPTPIPYKNTSGSSNN NLWIESPMTN FKGSTISKST NKSKMVNTGK NYILGGHNKV
KNNSRAQSIHIDDFENENN*

Fig. 27. Secuencia de la hipotética proteína codificada por YGL036w, obtenida de MIPS.

Para el fragmento pXU300, la traducción del marco abierto de lectura YGL037c se muestra en la figura 26, donde también se muestra el posible plegamiento secundario de la proteína y, en la figura 27 la traducción del marco abierto de lectura YGL036w. Las posibles características de las proteínas hipotéticas fueron calculadas también con las bases de datos SGDB, MIPS, YPD, Motif-searching, NPS-A y WISGB y se muestran a continuación.

Search chromosome VII contig for YGL037C

ORF: YGL037c

Brief-ID: similarity to E.coli hypothetical 23K protein

Position:427297-427944 (C) (graphical view)

Length: 216 aa

Working nomenclature: G3629 MIPS code: DSD216

DESCRIPTION similarity to E.coli hypothetical 23K protein

GENETICS

FEATURES cai 0.32

CLASSIFICATION similar to unknown protein

FUNCTIONAL_CATEGORIES

UNCLASSIFIED PROTEINS (2593 ORFs)

SIMILARITY similarity to E.coli hypothetical 23K protein

PRECURSOR WEIGHT 25.0 kD

PREDICTED ISOELECTRIC POINT 6.23

FUNCTION

ACTIVITY

YPD Protein Report for YGL037C

This report is from the Yeast Proteome Database, maintained by Proteome, Inc. YPD is updated daily and can be searched by gene name, keywords, and protein properties.

PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION

YPD Name	YGL037C		
Swiss-Prot Name			
SGD Name	YGL037C (Saccharomyces Genome Database)		
Synonym List	YGL037C/G3629		
GenBank #	1322518	Chromosome	VII
PIR #		Introns	no
Swiss-Prot #		Knockout	
PI	6.04	Subcellular Localization	
Molecular Weight	24984	Molecular Environment	
Codon Bias	0.40	Function Category	unk
CAI	0.32		
Length	216		
N-term Modif.		CDC28 Sites, potential	1
C-term Modif.		CKII Sites, potential	0
Phosphorylation	unknown	PKA Sites, potential	0
Glycosylation	unknown	N-glc Sites, potential	0
Pre-peptide Length		TM Domains, potential	0

N-term Seq. (precursor)	mktlivv	Interactions	
N-term Seq. (mature)	mktlivv	Regulations	more...
C-term Seq. (mature)	ninvvdk	Modifications	
Full Sequence	view...		
Related Genes	more...		

Related to

has similarity to E. coli 23K protein of unknown function in ansA 3' region

Regulation

induction by high salt is defective in msn2 msn4 double mutants and partially defective in hog1 single mutants

protein level is increased by hydrogen peroxide treatment

induction by sorbic acid (low pH) and ethanol is defective in msn2 msn4 double mutants

four stress response elements (STRE) are present in the promoter

Abundance

has about 9 mRNA copies per

Gel mobility

mapped and quantitated by 2-D gel electrophoresis

MOTIF-SEARCHING PROTEIN SEQUENCES

Number of found motifs: 3

PROSITE PATTERN

Found Motif	Position	Description	Related Sequences	Related Structures
CK2_PHOSPHO_SITE	84..87 126..129 174..177	Casein kinase II phosphorylation site		
PKC_PHOSPHO_SITE	77..79 126..128	Protein kinase C phosphorylation site		
TYR_PHOSPHO_SITE	62..70 151..158	Tyrosine kinase phosphorylation site		

Search chromosome VII contig for YGL036W

ORF: YGL036w

Gene name: MTC2
 Brief-ID: Mtf1 Two hybrid Clone 2
 Position:428597-431323 (W) (graphical view)
 Length: 909 aa
 Working nomenclature: G3632 MIPS code: DSB909

DESCRIPTION Mtf1 Two hybrid Clone 2

GENETICS gene_disruption viable
 gene MTC2

FEATURES cai 0.15
 transmembrane 94-110(94-112)
 status predicted
 score 2.0E-01
 transmembrane 309-325(307-326)
 status predicted
 score 1.0E-02
 transmembrane 469-485(468-486)
 status predicted
 score 2.4E-01

CLASSIFICATION known protein

FUNCTIONAL_CATEGORIES

UNCLASSIFIED PROTEINS (2593 ORFs)

PRECURSOR WEIGHT 102.4 kD
 PREDICTED ISOELECTRIC POINT 6.00
 FUNCTION
 ACTIVITY

YPD Protein Report for MTC2

This report is from the Yeast Proteome Database, maintained by Proteome, Inc. YPD is updated daily and can be searched by gene name, keywords, and protein properties.

PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION

YPD Name	MTC2		
Swiss-Prot Name			
SGD Name	MTC2 (Saccharomyces Genome Database)		
Synonym List	MTC2/G3632/YGL036W		
GenBank #	1322516	Chromosome	VII
PIR #		Introns	0
Swiss-Prot #		Knockout	viable
PI	5.89	Subcellular Localization	
Molecular Weight	102350	Molecular Environment	
Codon Bias	0.07	Function Category	unk
CAI	0.15		
Length	909		
N-term Modif.		CDC28 Sites, potential	0
C-term Modif.		CKII Sites, potential	0
Phosphorylation	unknown	PKA Sites, potential	1
Glycosylation	unknown	N-glc Sites, potential	20
Pre-peptide Length		TM Domains, potential	2
N-term Seq. (precursor)	mqqcagh	Interactions	
N-term Seq. (mature)	mqqcagh	Regulations	more...
C-term Seq. (mature)	dfenenn	Modifications	
Full Sequence	view...		
Related Genes	more...		

Name

"Mtf1 Two Hybrid Clone"

Regulation

induction by high salt is defective in *msn2 msn4* double mutants and in *hog1* single mutants.
 induction by sorbic acid (low pH) is defective in *msn2 msn4* double mutants.

MOTIF-SEARCHING PROTEIN SEQUENCES

Number of found motifs: 5

PROSITE PATTERN

Found Motif	Position	Description	Related Sequences	Related Structures
CAMP PHOSPHO SITE	241..244	cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site		
CK2 PHOSPHO SITE	66..69	Casein kinase II phosphorylation site		
	138..141	602..605		
	140..143	628..631		
	225..228	683..686		
	261..264	710..713		
	503..506	733..736		
	508..511	799..802		

PKC_PHOSPHO_SITE	56..58	Protein kinase C phosphorylation site
	66..68 747..749	
	240..242 770..772	
	277..279 870..872	
	562..564 878..880	
575..577		
MYRISTYL	173..178	N-myristoylation site
	266..271 392..397	
	271..276 787..792	
	272..277 846..851	
	336..341 863..868	
388..393		
ASN_GLYCOSYLATION	92..95	N-glycosylation site
	275..278 776..779	
	391..394 786..789	
	395..398 790..793	
	409..412 801..804	
	412..415 811..814	
	413..416 816..819	
	479..482 843..846	
	714..717 871..874	
	728..731 892..895	
754..757		

A continuación se presentan las gráficas donde se muestra el patrón de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las proteínas hipotéticas codificadas por YGL037c y YGL036w, así como la lista de proteínas que parecen tener un patrón hidrofílico similar al de la proteína hipotética, obtenido de NPS-a, y WISGB.

Pole Bio-Informatique Lyonnais. Network Protein Sequence Analysis

YGL037c



YGL036w

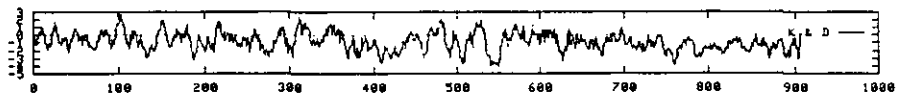


Fig. 28. Patrón de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las proteínas hipotéticas codificadas por YGL037c y YGL036w

YGL037c

Result of Protein Hydropathic Profile Search

Using the Kyte-Doolittle method of calculating hydrophilicity over a window length of 17.

- Comparison of query sequence with sw:SOPB_ECOLI
protein information: P08867 escherichia coli. sopb protein (protein b).
score information: Smith-Waterman score: 851; **28.241%** identity in 216 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:CB33_YEAST
protein information: P35203 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). centromere dna-binding protein complex cbf3 subunit c (kinetochoreprotein ctf13).
score information: Smith-Waterman score: 856; **23.611%** identity in 216 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:DNL1_YEAST
protein information: P04819 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). dna ligase i (ec 6.5.1.1) (polydeoxyribonucleotide synthase (atp)).
score information: Smith-Waterman score: 853; **25.472%** identity in 212 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:RN12_YEAST
protein information: P32843 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). ma12 protein.
score information: Smith-Waterman score: 843; **28.704%** identity in 216 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:ROM2_YEAST
protein information: P51862 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). rho1 gdp-gtp exchange protein 2.
score information: Smith-Waterman score: 853; **26.636%** identity in 214 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:YAV5_XANCV
protein information: P19520 xanthomonas campestris (pv. vesicatoria). hypothetical 50 kd avirulence protein in avrbs1 region.
score information: Smith-Waterman score: 835; **28.230%** identity in 209 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:RHS_A_ECOLI
protein information: P16916 escherichia coli. rhsa protein precursor.
score information: Smith-Waterman score: 856; **27.363%** identity in 201 aa overlap

YGL036w

Result of Protein Hydropathic Profile Search

Using the Kyte-Doolittle method of calculating hydrophilicity over a window length of 17.

- Comparison of query sequence with sw:NDVB_RHIME
protein information: P20471 rhizobium meliloti. 319 kd protein.
score information: Smith-Waterman score: 2507; **16.062%** identity in 909 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:BGL1_SACFI
protein information: P22506 saccharomycopsis fibuligera (yeast). beta-glucosidase 1 precursor (ec 3.2.1.21) (gentiobiase)(cellobiase)(beta-d-glucoside glucohydrolase).
score information: Smith-Waterman score: 2411; **16.854%** identity in 801 aa overlap

Para el fragmento de ADN pXU400 la traducción del marco abierto de lectura YPL146c se muestra en la figura 29 donde también se muestra el posible plegamiento secundario de dicha proteína. Las posibles características de la proteína hipotética fueron calculadas también con las bases de datos SGDB, MIPS, YPD, Motif-searching, NPS-A y WISGB, y se muestran a continuación.

Search chromosome XVI contig for YPL146C

ORF: YPL146c

Brief-ID: weak similarity to myosin heavy chain proteins

Position: 276164-277528 (C) (graphical view)

Length: 455 aa
Working nomenclature: P2610 MIPS code: FYE455

DESCRIPTION weak similarity to myosin heavy chain proteins
GENETICS
FEATURES cai 0.21
CLASSIFICATION similarity to known protein (lower than one third of FASTA self-score)
FUNCTIONAL_CATEGORIES UNCLASSIFIED PROTEINS (2593 ORFs)
SIMILARITY weak similarity to myosin heavy chain proteins
PRECURSOR WEIGHT 52.6 kD
PREDICTED ISOELECTRIC POINT 10.14
FUNCTION
ACTIVITY interaction
with PRP9
note physical
interaction_note two-hybrid

YPD Protein Report for YPL146C

This report is from the Yeast Proteome Database, maintained by Proteome, Inc. YPD is updated daily and can be searched by gene name, keywords, and protein properties.

PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION

YPD Name	YPL146C		
SGD Name	YPL146C (Saccharomyces Genome Database)		
Synonym List	YPL146C/P2610		
GenBank #	1370312	Chromosome	XVI
PIR #		Introns	no
Swiss-Prot #		Knockout	
PI	9.52		
Molecular Weight	52573		
Codon Bias	0.14	Subcellular Localization	
CAI	0.21	Molecular Environment	
Length	454	Function Category	unk
N-term Modif.	Acetyl	CDC28 Sites, potential	0
C-term Modif.		CKII Sites, potential	3
Phosphorylation	unknown	PKA Sites, potential	3
Glycosylation	unknown	N-glc Sites, potential	3
Pre-peptide Length	1	TM Domains, potential	0
N-term Seq. (precursor)	maptnlt	Interactions	
N-term Seq. (mature)	aptnltk	Regulations	more...
C-term Seq. (mature)	wthkdfk	Modifications	more...
Full Sequence	view...		
Related Genes	more...		

Related to
has weak similarity to myosins
Domains
sequence contains heptad repeats of the leucine zipper pattern (28300)
Motif(s)
sequence contains KKKTK potential nuclear targeting sequence (see 28300)
Other
sequence (28300)

YPL146c podría ser una proteína globular alfa

```
1 MAPTNLTKKPSQYKQSSRKGKKAWRKNI DLS DVEQYMEKK IDHE ITHGTS 50
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC EE ECCCCCHHHHHHHHHHHHHHEEECCCC

51 DIT SLQNDALFHVDVEGDEI LKN KLI KRK QI KKV LKS KEI L DAV KTN SK I 100
CCCCCCCCCEEE ECCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHCCCH

101 AALNHHKNSS GNPNKIQGV SKHEL KKL MALA GRVHGES KI KNRV AKDG LV 150
HHHHHCCCCCCCCC CEEEECHHHHHHH HHHHHHCCCCCHHHHHHHHCC CC E

151 KTTAGDLWGEESNS KKQKVKLPSG IKLDVEKKDQI PEE LL KKSTTSWSTA 200
E ECCCC CCCCCCCE EEE ECCCCCEE ECCCCCCHHHHHHHHCCCC EEE

201 SVRPSTLD I EP I AVKEFTE I PHAGKSYNPNNAWSEL I NKEYKEEKARED 250
ECCCCCCCCCEEEEEEECCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

251 ER I ALE KYKER I RH LMET LDDNEEEES SS NEE EEE EE EE NENENES TQCS 300
HHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHCC CCCCCCCHHHHHHHHHH CCCCC CCC

TARGETING SECUENCE
301 GSDKE I KL S I NKPVKNKKKKT KYQRNKAKRHEE KVKLQQE LKE LRQRVK DL
350
CCCH HHHHCC CCCCCCH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH

351 EEV I NS EE TE I L S A I ESDSNKVKKSKNKKHKLGTKYSV ID ER LE I KFS D 400
HHHHHHHH HHHHH HHCCCCCCEEECCC CCCCCCC CCHHHHHHHHHHCC

CIERRE DE LEUCINA: L-X6-L-X6-L-X6-L
401 ELS DS LRKLPENLLYDTRK LQSSGKVETRV PVRKGRKYKQK ITEKWT 450
CCC CCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHCCCEEEEECCCCCCHHHHHHHHCC

451 HKDFK 455
CCCC
```

Código de la predicción de la estructura secundaria de la proteína:

- H= helice alfa
- E= Beta- plegada (extendida)
- C= vuelta

Fig. 29. Secuencia y posible plegamiento secundario de la putativa proteína codificada por YPL0146c, así como las características importantes de la misma: secuencia blanco y un cierre de leucina.

MOTIF-SEARCHING PROTEIN SEQUENCES

Number of found motifs: 6

PROSITE PATTERN

Found Motif	Position	Description	Related Sequences	Related Structures
AMIDATION	19..22	Amidation site		
CAMP_PHOSPHO_SITE	8..11 191..194 317..320	cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site.		
CK2_PHOSPHO_SITE	31..34 120..123 279..282 153..156 300..303 205..208 302..305 268..271 363..366 278..281 388..391	Casein kinase II phosphorylation site.		
PKC_PHOSPHO_SITE	7..9 16..18 302..304 17..19 369..371 164..166 375..377 201..203	Protein kinase C phosphorylation site.		
MYRISTYL	148..153 384..389	N-myristoylation site.		
ASN_GLYCOSYLATION	5..8 108..111 294..297	N-glycosylation site.		

La figura siguiente muestra la gráfica donde se representa el patrón de hidrofiliicidad e hidrofobicidad de la proteína hipotética codificadas por YPL146c, y a continuación se muestra la lista de proteínas que parecen tener un patrón hidrofílico similar al de la proteína hipotética, obtenido de NPS-a, y WISGB.

Pole Bio-Informatique Lyonnais. Network Protein Sequence Analysis

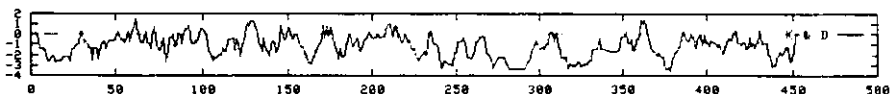


Fig. 30. Gráfica Patrón de hidrofiliicidad e hidrofobicidad de la proteína hipotética codificadas por YPL146c.

Result of Protein Hydropathic Profile Search

Using the Kyte-Doolittle method of calculating hydrophility over a window length of 17.

- Comparison of query sequence with sw:YIO4_YEAST
protein information: P40460 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). hypothetical 80.5 kd protein in sln1-rad25 intergenic region.
score information: Smith-Waterman score: 1492; 17.143% identity in 455 aa overlap

- Comparison of query sequence with sw:TFC5_YEAST
protein information: P46678 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). transcription factor tfiib b" component (tfiib90).
score information: Smith-Waterman score: 1441; **18.345%** identity in 447 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:CC68_YEAST
protein information: P32558 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). cell division control protein 68.
score information: Smith-Waterman score: 1416; **19.426%** identity in 453 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:YJ9C_YEAST
protein information: P47166 saccharomyces cerevisiae (baker's yeast). hypothetical 81.2 kd^mprotein in nmd5-hom6 intergenic region.
score information: Smith-Waterman score: 1402; **19.341%** identity in 455 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:MYSC_CAEL
protein information: P12845 caenorhabditis elegans. myosin heavy chain c (mhc c).
score information: Smith-Waterman score: 1489; **16.044%** identity in 455 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:MOES_PIG
protein information: P26042 sus scrofa (pig). moesin (membrane-organizing extension spike protein).
score information: Smith-Waterman score: 1425; **20.925%** identity in 454 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:MOES_MOUSE
protein information: P26041 mus musculus (mouse). moesin (membrane-organizing extension spike protein).
score information: Smith-Waterman score: 1417; **18.943%** identity in 454 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:CENC_MOUSE
protein information: P49452 mus musculus (mouse). centromere protein c (cenp-c) (centromere autoantigen c).
score information: Smith-Waterman score: 1432; **19.780%** identity in 455 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:MYSA_DROME
protein information: P05661 drosophila melanogaster (fruit fly). myosin heavy chain. muscle.
score information: Smith-Waterman score: 1461; **17.143%** identity in 455 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:MYSC_CHICK
protein information: P29616 gallus gallus (chicken). myosin heavy chain. cardiac muscle isoform(fragment).
score information: Smith-Waterman score: 1417; **18.584%** identity in 452 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:MY52_DICDI
protein information: P08799 dictyostelium discoideum (slime mold). myosin ii heavy chain. non muscle.
score information: Smith-Waterman score: 1436; **21.854%** identity in 453 aa overlap
- Comparison of query sequence with sw:HSF_KLULA
protein information: P22121-kluyveromyces lactis (yeast). heat shock factor protein (hsf) (heat shock transcription factor)(hstf).
Score- information: Smith-Waterman score: 1396; **18.059%** identity in 443 aa overlap

VII. DISCUSIÓN

Una de las formas en que se logrará mejorar la tolerancia a la sal de las plantas de interés agrícola es mediante la utilización de las herramientas que proporciona la biología molecular y la ingeniería genética.

Se han identificado varios genes halotolerantes, e inclusive ya se tienen plantas transgénicas portadoras de algunos de ellos (Serrano, 1996). Estos genes son fundamentales en la inducción de la tolerancia a un estrés osmótico y salino y la metodología empleada en estos hallazgos es muy similar a la desarrollada en este trabajo de tesis, en la cual se utiliza a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental para lograr el aislamiento de genes que le confieran tolerancia por encontrarse sobre-expresados en cada célula. En su identificación se utilizaron las bases del método de complementación genética (Serrano y Gaxiola, 1994; Serrano, 1996).

Es así que se logró llegar al aislamiento de dos secuencias de ADN de levadura denominadas pXU300 y pXU400, las cuales confieren una tolerancia significativa a la misma levadura a estrés de tipo salino y osmótico provocado por la presencia de las sales (LiCl 250 mM y NaCl 1.2 M), lo cual se observa en las figuras 12 y 13, pags.: 52 y 53 respectivamente.

El siguiente paso fue realizar una restricción enzimática al ADN plasmídico para observar si presentaban algún inserto de ADN de levadura y, por consiguiente, comenzar a establecer parámetros importantes del mismo como lo son su longitud y mapa de restricción.

Con los conocimientos anteriores, se procedió a llevar a cabo el estudio de la secuencia de cada uno de los insertos de ADN y, con ayuda de la misma, se obtuvo la información necesaria para especular sobre la forma en que estos insertos mejoran el desarrollo de la levadura bajo condiciones de estrés salino al encontrarse presentes en más de una copia.

El estudio de la secuencia dentro de la base de datos SGDB arrojó que tanto el pasajero de pXU300 como el de pXU400 presentaban marcos abiertos de lectura cuyas respectivas proteínas no han sido todavía identificadas por lo que su presencia dentro de la célula es solamente hipotética.

Respecto a los marcos abiertos de lectura de la levadura, presentes dentro del inserto de ADN denominado pXU300, cabe señalar que uno de ellos, YGL037c, presenta similitud en su secuencia de ADN con la región 3' de una proteína hipotética de *E. coli* con un peso de 23 kD y que presenta sitios de unión de ribosomas y tal vez forme en este organismo un operón junto con el gen *ansA* que codifica para una L-asparaginasa (enzima citoplásmica de poca afinidad a la asparagina)

(Jerlstrom *et al.*, 1989). Además, se ha encontrado que el nivel de esta proteína hipotética se ve incrementado después de un tratamiento con peróxido de hidrógeno (Godon *et al.*, 1998).

El patrón de hidrofobicidad fue obtenido con la ayuda de un programa desarrollado por Kyte y Doolittle de la Universidad de California (Kyte y Doolittle, 1982) el cual evalúa la hidrofobicidad e hidrofobicidad de una proteína a lo largo de su secuencia de aminoácidos asignándoseles a éstos un valor determinado en base a estudios de su coeficiente de partición agua-etanol y su energía libre de transferencia agua-vapor, de tal forma que estos valores se graficaron desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo. En dicha gráfica la escala positiva indica un comportamiento hidrofóbico y la escala negativa representa el comportamiento hidrofílico.

Para YGL037c su patrón de hidrofobicidad muestra que se trata de una proteína más bien hidrofílica, con regiones entre ligeramente hidrofílicas a poco hidrofóbicas en su región amino terminal y a la altura de los aminoácidos 160 al 165 (figura 28, pag.: 75). De esta forma y tomando en cuenta que la predicción de su estructura secundaria nos indica que se podría tratar de una proteína alfa-beta globular, podríamos presuponer que se trata de una proteína no unida a membrana y cuyas partes hidrofóbicas probablemente son consecuencia de los aminoácidos que se encuentran hacia el interior de esta proteína. Al realizar una comparación en cuanto a ese patrón de hidrofobicidad-hidrofílicidad observamos que presenta similitud con diversas clases de proteínas ya identificadas como son las mencionadas a continuación:

- Proteína b, sopB de *E. coli*, la cual forma parte del mecanismo de partición del plásmido F de la misma bacteria (Mori *et al.*, 1986)..
- Proteína rna12 de *S. cerevisiae*, cuya mutación provoca una hipersensibilidad a la temperatura de 37 °C.
- Proteína precursora rha de *E. coli*, la cual es una proteína de unión de ligandos sobre la superficie celular.
- Proteína rho1 de unión a GTP de *S. cerevisiae*, que es activada por dos proteínas de intercambio GDP-GTP Rom1p y Rom2p, la cual es requerida para la formación de gemas y cuya mutación provoca sensibilidad a la temperatura e incluso letalidad (Ozaki *et al.*, 1996).
- Proteína ADN ligasa de *S. cerevisiae*, cuya sobreexpresión provoca una resistencia a formaldehído (Wehner *et al.*, 1993).
- Proteína centromérica de unión a ADN, complejo cbf3 subunidad c (cinetocoroproteína ctf13) en *S. cerevisiae*, la cual es esencial para la segregación de los cromosomas y el movimiento del centrómero a lo largo de los microtúbulos. Su gen CTF13 ha sido clonado por complementación de mutantes sensibles a temperatura que muestran una pérdida de cromosomas como resultado de su centrómero defectuoso (Lechner, 1994).

- Proteína hipotética de 50 kD de *Xanthomonas campestris* pv., codificada por el gen de avirulencia avrBs1 (Ronald y Staskawiez, 1988).

Analizando lo señalado anteriormente observamos que no existe relación directa conocida hasta el momento entre la secuencia nucleotídica de ORF YGL037c y el estrés. Además, respecto a su patrón de hidrofobicidad-hidrofilicidad observamos que presenta similitudes con algunas proteínas que intervienen en el crecimiento celular y formación de gemas e incluso es interesante notar que existe una proteína de avirulencia con un patrón de hidrofobicidad similar, lo cual podría señalar que presenta las características para ser una proteína que responda ante agresiones externas y cuya sobreexpresión incremente el crecimiento de la levadura. A pesar de lo anterior es necesario insistir en que no existe una relación clara hasta el momento entre las características antes mencionadas y su relación con el estrés. Sin embargo es claro que su presencia dentro de la levadura (aumentando su expresión) le confiere a la célula cierto grado de tolerancia a una considerable concentración de LiCl y NaCl, iones que provocan un estrés salino a la célula.

En el caso del marco abierto de lectura YGL036w, ubicado dentro del mismo fragmento de ADN aislado (pXU300) que también ha sido denominado MTC2, presenta cierto grado de similitud con la proteína Mtf1 la cual es un factor de transcripción específico para la ARN polimerasa mitocondrial, pero la proteína hipotética pertenece a las de función desconocida. Respecto a su patrón de hidrofobicidad-hidrofilicidad se observa que presenta una patrón hidrofóbico ligero y fuertemente hidrofílico en algunas regiones (figura 28, pag.: 75). Además, las regiones más hidrofóbicas coinciden con los sitios transmembrana que proporciona la base de datos MIPS. Desafortunadamente, aún no ha sido reportada la predicción de su estructura secundaria, pero podríamos, a pesar de ello, decir que se pudiera tratar de una proteína tal vez unida a membrana. Al realizar una comparación en cuanto a ese patrón de hidrofobicidad-hidrofilicidad observamos que presenta similitud con diversas clases de proteínas ya identificadas y, algunas de las que parecerían tener cierta relación con el estrés son las mencionadas a continuación:

- Proteína de 319kD de *Rhizobium meliloti*, la cual está implicada en la producción de beta-(1→2)-glucano que forma parte de la estructura de la pared celular.
- Proteína precursora de beta-glucosidasa 1 de *Saccharomyces fibuligera*, la cual presenta segmentos que tal vez actúen como secuencias de señalización de secreción (Machida *et al.*, 1988).

De igual forma que para el marco abierto de lectura YGL037c, no se cuentan con más datos para YGL036w que relacionen más directamente las características de la proteína hipotética con el fenómeno de estrés. Sin embargo, al presentar similitud en su patrón de hidrofobicidad con

proteínas involucradas en la formación de moléculas que se encuentran presentes en la estructura de la pared celular podría permitirnos suponer que pudiera tener alguna función dentro de la formación de la misma.

Por otra parte, realizando el estudio de la secuencia nucleotídica de ADN del inserto de pXU300 se encontró que presenta 4 secuencias STRE en la región promotora de ambos marcos abiertos de lectura. La presencia de estas secuencias STRE nos sugiere la participación de estos marcos abiertos de lectura dentro de la respuesta al estrés salino u osmótico provocado por la presencia de NaCl y LiCl. Como mencionamos en la introducción, la secuencia STRE es una secuencia consenso AG₄ o CT₄ la cual se encuentra en varios genes que responden a la inducción por diversas señales de estrés. La respuesta al estrés mediada por las secuencias STRE tiene la participación de los factores de transcripción homólogos Msn2p y Msn4p los cuales se unen específicamente a las secuencias STRE. Mutantes dobles (*msn2, msn4*) deficientes en estos factores de transcripción son hipersensibles a condiciones de estrés (Moskvina *et al.*, 1998). Al buscar información en este sentido se encontró que las secuencias STRE de estos marcos abiertos de lectura ya habían sido identificadas e inclusive se realizó un estudio sobre su expresión (Northern blot) en el cual se demostró la sobreexpresión del ARNm transcrito bajo condiciones de estrés salino y osmótico, así como bajo la presencia de etanol, el cual sólo favorece la sobreexpresión del ARNm transcrito de YGL037c, pero no de YGL036w. Con lo anterior queda reforzada la idea de que la presencia de este inserto con los marcos abiertos de lectura mencionados incrementa la tolerancia al estrés provocado por las sales de sodio y litio.

Respecto al fragmento de ADN de levadura denominado pXU400, su pasajero presenta el marco abierto de lectura YPL146c cuya secuencia nucleotídica es débilmente similar a la secuencia de la cadena pesada de la miosina. Sin embargo, la proteína hipotética pertenece a la categoría de proteínas de función desconocida. Dentro de su secuencia nucleotídica presenta, entre otras características, una secuencia que es potencialmente de traslocación nuclear (Purnelle *et al.*, 1996; Dingwall y Laskey, 1986), lo que podría indicar que la función que realiza esta proteína es a nivel nuclear, pero no existe más información en este sentido ni con su posible relación con el estrés. Además contiene un "cierre" de leucina el cual, como mencionamos en la introducción, está presente también en otras proteínas relacionadas con el estrés como son Yap 1 y 2 además de Hal6 y 7. La presencia de este cierre de leucina se relaciona con productos de oncogenes y también se encuentra en factores transcripcionales (Purnelle *et al.*, 1996; Landschultz *et al.*, 1988; Busch y Sassone-Corti, 1990). De esta forma, el marco abierto de lectura aislado podría ser algún factor de transcripción con actividad a nivel de núcleo que intervendría activando la transcripción de algunos genes de respuesta al estrés. Por lo tanto, su sobreexpresión podría conferir cierto grado de

tolerancia al estrés salino en la levadura. Aunado a lo anterior, en su región 5' no codificante, es decir, su región promotora, presenta varias secuencias de unión a proteínas así como una caja TATA (Purnelle *et al.*, 1996; Rhode *et al.*, 1992; Buchman *et al.*, 1988; Kronstad *et al.*, 1987), las cuales aparentemente podrían explicar una función de tipo regulatorio a nivel nuclear.

Analizando su patrón de hidrofobicidad-hidrofilicidad observamos que presenta una región carboxilo terminal altamente hidrofílica con un ligero patrón hidrofóbico en su región central (figura 30, pag.: 79), lo cual coincide con la predicción de su estructura secundaria la cual nos dice que se trata de una proteína globular alfa, por lo que las regiones de aminoácidos hidrofóbicos se encontrarían hacia el interior de la misma proteína.

Al realizar una comparación en cuanto a ese patrón de hidrofobicidad observamos que presenta similitud con diversas clases de proteínas. Las más interesantes son mencionadas a continuación:

- Proteínas de la cadena pesada de la miosina de diversos organismos, tales como *Caenorhabditis elegans*, pollo, *Drosophila melanogaster* y *Dictyostelium discoideum*.
- Proteínas MOESIN (membrane-organizing extention spike protein) tanto de cerdo como de ratón.
- Proteína hipotética de 123 kD en la región intergénica *spo16-rec104* de *S. cerevisiae*, la cual aparentemente participa en el silenciamiento de la cromatina.
- Proteína hipotética de 80.5 kD en la región intergénica *sln1-rad25* de *S. cerevisiae*, la cual interviene en la organización del centrosoma.
- Factor de transcripción de choque calórico (HSTF) de *Kluyveromyces lactis*, el cual regula la transcripción de los genes de choque calórico por medio de su unión al ADN bajo estrés de tipo calórico (Jakobsen y Pelham, 1991).

Con base a lo anterior podríamos presuponer que la proteína hipotética codificada por el marco abierto de lectura aislado podría tener funciones a nivel nuclear pero interviniendo en la regulación de la división celular, basándonos en su similitud de su patrón hidrofóbico-hidrofilico con otras proteínas que actúan en este nivel. Además, por su similitud con proteínas de miosina, y al presentar una estructura secundaria tipo alfa-hélice (la cual coincide con lo esperado por la presencia del "cierre" de leucina) podría suponerse que se trata de una proteína de tipo fibroso o que bajo cierto tipo de estrés podría tomar una estructura fibrosa e intervenir en el ciclo celular, el cual es severamente afectado bajo cualquier tipo de estrés. Por ello, su presencia podría incrementar la tolerancia al estrés provocado por las sales empleadas en estos experimentos.

Para lograr esclarecer más a fondo la función de los fragmentos de ADN aislados en este trabajo y sus respectivos marcos abiertos de lectura presentes en ellos, en el caso del fragmento

pXU300 sería necesario realizar una subclonación para separar a los dos marcos abiertos de lectura que contiene y así estudiarlos por separado. En este caso ya se encuentran reportados estudios de expresión génica (Northern blot) para ambos marcos abiertos de lectura, así que faltarían realizar estudios de tipo Western para lograr demostrar que el ARNm realmente se traduce en una proteína y que esta proteína está presente en mayor cantidad ante un estrés. Además, es necesario aclarar si dichas proteínas hipotéticas responden a un solo tipo de estrés o si se encuentran involucradas en la respuesta general de estrés. En el caso del inserto de pXU400 sería necesario realizar los estudios de Northern y Western blot que no están reportados hasta el momento, así como establecer si la tolerancia conferida es a uno o varios tipos de estrés. Se podrían realizar otro tipo de estudios bioquímicos dependiendo de las supuestas funciones atribuidas a las proteínas hipotéticas.

VIII. CONCLUSIONES

Se logró la clonación, aislamiento e identificación de dos secuencias de ADN de los cromosomas VII y XVI nombrados como pXU300 y pXU400, respectivamente, los cuales presentan tres marcos abiertos de lectura del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que le confieren tolerancia a la presencia de las sales de LiCl y NaCl al encontrarse sobreexpresados dentro de ella (se encuentran en una doble copia génica).

El inserto pXU300 presenta dos marcos abiertos de lectura (YGL037c y YGL036w) cuyas proteínas hipotéticas no han sido aún identificadas y, por lo tanto, su función es desconocida, pero podemos suponer que la proteína hipotética de YGL037c podría tratarse de una proteína citoplásmica que interviene en los procesos relacionados con el ciclo celular, mientras que la proteína codificada por YGL036w posiblemente interviene en procesos relacionados con la pared celular. Ambos marcos abiertos de lectura presentan las secuencias STRE que los involucran en la tolerancia al estrés, además de que probablemente la acción de YGL037c sea en respuesta a un estrés general y la de YGL036w en respuesta a un estrés de tipo salino y osmótico.

El inserto pXU400 tiene un marco abierto de lectura (YPL146c) y la proteína hipotética que codifica aún no ha sido clasificada y no existe ninguna información hasta el momento que la relacione con el estrés salino; podríamos suponer que interviene en los procesos de división celular o como un factor que actúa a nivel nuclear y por lo tanto en una respuesta general al estrés.

Es claro que las secuencias de ADN de levadura aisladas en este trabajo confieren tolerancia a la sal a la propia levadura. Sin embargo, hacen falta más estudios funcionales de estos fragmentos para lograr establecer con certeza la forma en que esta tolerancia es conferida para que en un futuro las mismas secuencias sean clonadas, por ejemplo, en alguna planta de interés agrícola y de esta forma se generen plantas transgénicas que posiblemente incrementen la productividad de las mismas dentro de los suelos que presenten un proceso de salinización.

IX. REFERENCIAS

- André L., Hemming A. y Adler L., (1991). Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺), *FEBS*, **286**: 13-17.
- Brow t., (1992), Genetics, a molecular approach, 2nd ed., Ed. Chapman Hall, New York. pp.: 650.
- Blomerg A., Adler L., (1992), Physiology of osmotolerance in fungi, *Adv. Microbial Phys.*, **33**:145-212.
- Buchman A., Kimmerly W., Rine J. y Kornberg R., (1988), Two DNA-binding factors recognize specific sequences at silencers, upstream activating sequences, autonomously replicating sequences, and telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*, **8**: 210-225.
- Burg M., (1995), Molecular basis of osmotic regulation. *American Physiological Society*, **363**: 983-996.
- Bush S., Sassone-Corti P., (1990). Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genetics*, **6**: 36-40.
- Carlile M. y Watkinson S., (1997), The Fungi. Academic Press limited, U.S.A., pags.: 64-67, 432-439.
- Chrispeels M., Maurel C., (1994), Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells?, *Plant Physiol.*, **105**: 9-13.
- Chowdhury S., Smith K. y Gustin M., (1992). Osmotic Stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation, *J. Cell Biol.*, **118**: 561-571.
- Csonka L., (1991), Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and Physiology, *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**: 569-606.
- Dingwall C. y Laskey R., (1986). Protein import into the cell nucleus. *Annual. Review of Cell Biology*, **2**: 367-390.
- Evans D., Sharp W., Ammirato P. y Yamada. (1983), Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1. Mc Millan Publishing, New York, 468 pp.
- Ferrando A., Kron S., Rios G., Fink G. y Serrano R., (1995), Regulation of Cation Transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the Salt Tolerance Gene *HAL3*. *Molecular and Cellular Biology*, **15**(10): 5470-5481.
- Fitzpatrick E., (1984), Suelos su formación, clasificación y distribución, Compañía Editorial Continental, México, 256 pp.
- Ganong W., (1994), Fisiología Médica, 14^ª ed., Manual Moderno, México, pag.:47.

- Gaxiola R., Larrinoa I., Villalba J. y Serrano R., (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *The EMBO Journal*, **11**: 3157-3164.
- Godon Ch., Lagniel G., Lee J., Buhler J., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M. y Labarre J., (1998), The H₂O₂ Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*, *The Journal of Biological Chemistry*, **273**: 22480-22489.
- Gultinan M., Marcotte W. y Quatrano R., (1990). A plant Leucine Zipper Protein That Recognizes an Abscisic Acid Response Element. *Science*. **250**: 267-271.
- Gustin M., Martinac B., Saimi Y., Culbertson M. y Kung C., (1986), Ion channels in yeast. *Science*, **233**: 1195-1197.
- Hanson A., (1982), Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **33**: 163-203.
- Haro R., Bañuelos M., Quintero F., Rubio F. y Rodríguez-Navarro A., (1993), Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiologia Plantarum*. **89**: 868-874.
- Hohmann S., *Shaping Up: The Responses of Yeast to Osmotic Stress*, capítulo 4 en Hohmann S. y Mager W., (1997), Yeast Stress Responses, Chapman & Hall, U.S.A., 480 pp.
- Hohmann S. y Mager W., (1997), Yeast Stress Responses. Chapman & Hall, U.S.A., 480 pp.
- Ketchum K., Joiner W., Seller A., Kaczmarek L. y Goldstein A., (1995), A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domain in tandem. *Nature*. **376**: 690-695.
- Kyte J. y Doolittle R., (1982), A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, *Journal of Molecular Biology*, **157**: 105-132.
- Jakobsen B. y Pelham H., (1991), A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor, *EMBO J.*, **10**: 369-375.
- Jerlstrom P., Bezjak D., Jennings M. y Beacham I. (1989), Structure and expression in *Escherichia coli* K-12 of the L-asparaginase I-encoding *ansA* gene and its flanking regions. *Gene*. **78**: 37-46.
- Kronstad J., Holly J. y MacKay V., (1987), A yeast operator overlaps an upstream activation site. *Cell*, **50**: 369-377.
- Landschultz W., Johnson P. y McKnight S., (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**: 1759-1764.
- Le Rudelier D., Strom A., Dandekar A., Smith L. y Valentine R., (1984), Molecular Biology of Osmoregulation. *Science*, **224**: 1064-1068.
- Lechner J., (1994), A zinc finger protein, essential for chromosome segregation, constitutes a putative DNA binding subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex. *Cbf3*. *EMBO J*, **13**: 5203,-5211.

- Levitt, J., (1984). Responses of Plants to Environmental Stress, Vol. I y II, Academic Press. New York, 497 pp. y 607 pp.
- Lew D. y Reed S., (1995), Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast, *Curr. Opin. Genet. Develop.*, **5**: 17-23.
- Luyten K., Albertyn J., Skibb W., Prior B., Ramos J., Thevelein J. y Hohmann S., (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.*, **14**: 1360-1371.
- Machida M., Ohtsuki I., Fukui S. y Yamashita I., (1988), Nucleotide sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.*, **54**: 3147-3155.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S. y Saito H., (1994), A two-component system that regulates an osmosensing cascade in yeast. *Nature*, **369**: 242-245.
- Mager W. y Moradas P., (1993). Stress response of yeast. *Biochemical Journal*, **290**: 1-13.
- Mager W. y Varela J., (1993). Osmostress response of the yeasts *Saccharomyces*. *Molecular Microbiology*, **10**(2):253-258.
- Mendizabal I., Rios G., Mulet J., Serrano R. y Larrinoa I., (1998). Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Letters* **425**: 323-328.
- Mori H., Kondo A., Ohshima A., Ogura T. y Hiraga S., (1986), Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *Journal of Molecular Biology*, **192**: 1-15.
- Moskvina E., Schüller C., Maurer C., Mager W. y Ruis H., (1998), A Search in the Genome of *Saccharomyces cerevisiae* for Genes Regulated via Stress Response Elements. *Yeast*, **14**: 1041-1050.
- Murgía R., Bellés J. y Serrano R., (1995), A Salt-Sensitive 3'(2'),5'-Bisphosphate Nucleotidase Involved in Sulfate Activation. *Science*, **267**: 232-234.
- Murgía R., Bellés J. y Serrano R., (1996), The Yeast *HAL2* Nucleotidase Is an *in Vivo* Target of Salt Toxicity. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(46): 29029-29033.
- Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y. y Takai Y., (1996), Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEP's) for the Rho1p small GTP binds protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **15**: 2196-2207.
- Pardo J., Reddy M., Yang S., Maggio A., Huh G., Matsumoto T., Coca M., D'Urzo M., Koiwa H., Yun D., Watad A., Bressan R. y Hasegawa P., (1998), Stress signaling through Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plant. *Plant Biology*, **95**: 9681-9686.
- Purnelle B., Coster F. y Goffeau A., (1996), The Sequence of 55 kb on the left Arm of Yeast Chromosome XVI Identifies a Small Nuclear RNA, A New Putative Protein Kinase and Two New Putative Regulators. *Yeast*, **12**: 1483-1492.
- Raw D., (1989), Bioquímica, Interamericana Mc-Graw-Hill, España, pags.:27-36

- Rhode P., Elsasser S. y Campbell J., (1992), Role of multifunctional autonomously replicating sequence binding factor 1 in the initiation of DNA replication and transcriptional control in *Saccharomyces cerevisia*, *Moleccular and Cell Biology*, **12**: 1064-1067.
- Ronald P. y Staskawicz B., (1988), The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50 kD protein. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **1**: 191-198.
- Rose M., (1987), Isolation of Genes by Complementation in Yeast. *Methods in Enzymology*, **152**: 481-504.
- Rose M., Novick P., Thomas J., Botstein D. y Fink G., (1987), A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene*, **60**: 237-243.
- Ruis H., *Yeast Stress Responses: Achievements, Goals and Look Beyond Yeast*, capítulo 8 en Hohmann S. y Mager W., (1997), *Yeast Stress Responses*, Chapman & Hall, U.S.A., pp.: 480.
- Selye H., (1973), The evolution of the Stress Concept. *Am. Sci.*, **61**: 692-699.
- Serrano R., (1996), Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and Defense Responses, *International Review of Cytology*, **165**: 1-54
- Serrano R. y Gaxiola R., (1994), Microbial Models and Salt Stress Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **13**(2): 121-138.
- Serrano R., Márquez J. y Ríos G., Crucial Factors in Salt Stress Tolerance. capítulo 5 en Hohmann S. y Mager W., (1997), *Yeast Stress Responses*, Chapman & Hall, U.S.A., 480 pp.
- Siderius M. y Mager W., General Stress Response: In Search of a Common Denominator, capítulo 7 en Hohmann S. y Mager W., (1997), *Yeast Stress Responses*, Chapman & Hall, U.S.A., 480 pp.
- Smith Ll., Sanders J., Kaiser R., Hughes P., Dodd Ch., Connell Ch., Kent S. y Hodd L., (1986), Fluorescence detection in automated DNA secuencia analysis. *Nature*, **321**: 674-679.
- Thevelein J., (1994), Signal transduction in yeast. *Yeast*, **10**: 1753-1790.
- Tortora G., Funke B. y Case Ch., (1992), *Microbiology an Introduction*, 4th ed., The Benjamin/Cummings Publishing Co., U.S.A., pags.: 219-220. 298-299.
- Varela J., Beekvelt C., Planta R y Mager W. (1992), Osmostress-induced changes in yeast gene expression. *Molecular Microbiology*, **6**(15): 2183-2190.
- Velculescu V., Zhang L., Zhou W., Vogelstein J., Basrai M., Bassett D., Hieter P., Vogelstein B. y Kinzler K., (1997), Characterization of the Yeast Transcriptome. *Cell*, **88**: 243-251.
- Wehner E., Rao E. y Brendel M., (1993), Molecular structure and genetic regulation of SFA, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Moleccular in General Genetics*, **237**:351-358.

Winicov I. (1998), New Molecular Approches to Improving Salt Tolerance in Crop Plants. *Annals of Botany*, **82**: 703-710.

Yancey P., Clark M., Hand S., Bowlus D. y Somero G., (1982). Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science*, **21**: 1214-1222.

Direcciones de Internet de las bases de datos empleadas:

NCBI National Center for Biothechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)

SGDB Saccharomyces Genome DataBase ([//genome.www2.stanford.edu/cgi.bi](http://genome.www2.stanford.edu/cgi.bi))

MIPS Munich Information Center for Protein Sequences (mips.biochem.mpg.de/proj/)

YPD Yeast Proteome DataBase (quest7.proteome.com/YPD)

Motif Searching Protein Sequences Motifs (motif.genome.ad.jp/)

NPS Physico-chemical-result ([//pbil.ibcp.fr/cgi-bin/MAIL_pcp](http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/MAIL_pcp))

WISGB Weizmann Institute of Science Genome and Bioinformatics Hydrophatic Profile Search ([//bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/hydroph.html/](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/hydroph/hydroph.html/))

APÉNDICE I

FORMAS DE OSMORREGULACIÓN

Cuadro AI-1 Proteínas de transporte de iones

ORGANISMO	OBSERVACIONES
<i>E. coli</i>	<p>La captación de K^+ ocurre mediante tres mecanismos diferentes. El transportador predominante, en condiciones normales, es el sistema Trk (se trata de un transportador de subunidades múltiples ATPasa de la familia ABC). Los otros sistemas de transporte son: un simporte H^+-K^+ similar al sistema Trk pero menos activo y más simple, y el sistema kdp que es un tipo de P-ATPasa de gran complejidad y es inducible a bajas concentraciones de K^+. Los genes <i>nhaA</i> y <i>nhaB</i> codifican para antiportes Na^+-H^+ homólogos, catalizando el intercambio de $2H^+$ por $1Na^+$. Son esenciales para la tolerancia a la sal. El gen <i>nhaA</i> también está involucrado en la homeostasis de pH ya que es inactivado a un pH menor a 7.6-7.8. Su expresión es inducida por Na^+ y Li^+ intracelular, lo cual es probablemente "percibido" por una proteína de unión a ADN codificada por el gen <i>nhaR</i>.</p>
<i>S. cerevisiae</i>	<p>El principal transporte es una $H^+-ATPasa$ (codificada por el gen PMA1). Genera un gradiente electroquímico de protones que regula el pH y maneja otros sistemas de transporte secundario catalizando la captación de nutrientes. Los genes TRK1 y TRK2 son los responsables de la mayoría de la captación de alta afinidad a K^+. La sobreexpresión de los genes HAL1 y HAL3 incrementan la discriminación K^+/Na^+ y la tolerancia a la sal y estimulan la captación de K^+ bajo estrés osmótico. El gen ENA1 codifica para una P-ATPasa que confiere tolerancia a Li^+ y Na^+ y aumenta la salida de estos cationes: su expresión es inducida por estrés osmótico, falta de nutrientes y un pH elevado, pero su nivel de expresión es dependiente de la proteína-fosfatasa calcineurina (calcio-activada) y de HAL3. Por complementación de la captación de K^+ en la levadura mutante <i>trk1</i>, se ha observado que los genes de levadura HXT1 y HXT3 (transportadores de azúcares) restauran la captación de K^+ en las células. Por lo tanto, existe una flexibilidad en los transportadores de membranas. Si la complementación se realiza con ADNc de ratón fueron encontrados, un regulador transcripcional HBPI, una ATPasa de fusión membranaral SKD2-SKD1, y una ATPasa, los cuales aumentan la expresión de los sistemas de captación de K^+ y mitigan los defectos en la fusión membranaral K^+-dependiente, responsable del bajo crecimiento bajo la falta de K^+.</p>
Plantas	<p>La expresión de los genes AKT1 y KAT1 aumenta la captación de K^+, codifican para proteínas similares y con homología a los canales de salida de K^+ en animales, activados por depolarización. Pero en levadura y oocitos funcionan como canales de captación de K^+ activados por hiperpolarización, con una alta discriminación entre Na^+ y K^+. El gen HKT1 codifica para una proteína de membrana sin homología a canales de K^+ en animales. Parece que es un simporte de H^+-K^+ de alta afinidad con una relativa discriminación entre K^+ y Na^+. Además se ha encontrado también un simporte de Na^+-K^+. No se han identificado mecanismos de salida de Na^+: se encontró que este proceso es estimulado a un pH bajo, así que probablemente existe un antiporte Na^+-H^+. Como la salida de Na^+ es electrogénica tal vez está mediada por una bomba-Na^+-ATPasa. En plantas superiores no hay evidencia bioquímica de una ATPasa-Na^+ pero existen genes para una Ca^{2+}-ATPasa inducidos por NaCl.</p>

Otras observaciones que podemos añadir son las siguientes:

No se ha encontrado un sistema de transporte de cationes en hongos y plantas, con homología a los sistemas bacterianos mencionados (Serrano, 1996).

Han sido identificados canales mecanosensitivos en levadura y plantas (Bert *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1992 citados por Serrano, 1996). Ellos presentan un bajo nivel de discriminación entre aniones y cationes y pueden contribuir al ajuste osmótico de los estados iniciales del estrés osmótico (Serrano, 1996).

Plantas y levaduras contienen sistemas de salida de K^+ activados por depolarización, los cuales podrían participar en el balanceo de cargas en movimiento durante un transporte activo secundario, sobre todo cuando las bombas para H^+ no son operativas. Además, transportan Na^+ , por lo que al aumentar la concentración de Na^+ se induce la despolarización y estos canales median la salida de K^+ y entrada de Na^+ .

Las vacuolas permiten la acumulación de Na^+ tóxico y Cl^- para el beneficio de enzimas sensibles citoplásmicas o de organelos. En el siguiente cuadro se mencionan algunas de las funciones de ellas dentro del estrés salino y osmótico.

Cuadro A1-2 Función de vacuolas

ORGANISMO	OBSERVACIONES
<i>S. cerevisiae</i>	Se cree que ciertas funciones necesarias para la biogénesis vacuolar también son requeridas para la osmorregulación: también elementos del citoesqueleto y proteínas que median la fusión y salida de vesículas son candidatas a ser requeridas. Las vacuolas podrían estar involucradas en osmorregulación como fuente de agua durante un estrés osmótico del citoplasma o como acumuladores de los iones de sodio y litio. El flujo de agua de la vacuola al citoplasma puede jugar un papel importante en la respuesta inicial al estrés osmótico.
Plantas	La actividad de H^+ -ATPasa vacuolar es incrementada bajo la presencia de NaCl y esto corresponde a un aumento en la expresión del gen y a un aumento en la actividad enzimática. El cambio realizado en respuesta al estrés salino es complementado por una activación por sal del antiporte Na^+-H^+ vacuolar, lo cual es independiente de la síntesis proteica y más bien corresponde a una modificación proteica. El gradiente vacuolar de H^+ que maneja la acumulación de Na^+ y la actividad del antiporte Na^+-H^+ son incrementados durante el estrés salino.

La transducción de señales y sus componentes podrían explicar el fenómeno de adaptación al estrés osmótico y salino específicamente, pero también al estrés en general. El siguiente cuadro señala algunas de las señales hasta el momento identificadas.

Cuadro AI-3 Transducción de señales y síntesis de proteínas

ORGANISMO	OBSERVACIONES
<i>E. coli</i>	Presenta diversos operones. Operón proU, codifica para un sistema de transporte de betaina; un aumento de osmolaridad extracelular incrementa su expresión. Operón kdpABC y operón ompF y ompC (genes de porinas), ambos mediados por un "sensor protein-kinase" que se autofosforila en respuesta a una determinada señal, y por un "regulador de respuesta" forforilado por transferencia de un grupo fosfato. Parece que el operón kdpABC es inducido por una falta de K ⁺ intracelular, señal que podría estar modulada por otras condiciones como un incremento en la concentración de NaCl o pH ácido, que inhiben la captación de K ⁺ .
<i>S. cerevisiae</i>	Presenta sistemas complejos de respuesta a estrés osmótico, desde la presencia de elementos de respuesta al estrés (STRE) los cuales inducen la transcripción de otros genes. Existen también varias rutas de señalización como son la MAP-cinasa, la ruta HOG y la ruta PKC. La complejidad de las señales de transducción durante las respuesta al osmoestrés en levadura incluyen otros elementos promotores adicionales a un STRE y otras rutas de señalamiento además de las ya mencionadas (por ejemplo genes YAPI que codifica para una proteína con un "cierre de leucina", y rutas Snf1 protein-cinasa y protein cinasa A)
Plantas	Su respuesta puede estar mediada, ya sea por la percepción del estrés o por una inducción local de hormonas de estrés (como el ácido abscísico: ABA, etileno y ácido jasmónico). Estas hormonas viajan a través de la planta y actúan sobre células sensibles, anticipándoles la llegada del estrés.

APÉNDICE II

ASPECTOS IMPORTANTES DE LA SECUENCIA STRE

AII.1. Regulación positiva de la activación transcripcional mediada por STRE

Considerando la regulación negativa de los genes de respuesta al estrés (por la vía Ras-AMPC), el disparo de la expresión genética vía STRE después de un estrés ocurre seguramente en conjunto con elementos promotores adicionales. Una de ellas es la vía HOG lo que es una indicación de la existencia de varias vías de señalización. Esta vía transduce la señal específica provocada por una alta osmolaridad para la expresión de los genes STRE dependientes necesarios. La estimulación de la vía HOG permite la inducción de genes involucrados en el metabolismo del glicerol y también de genes que son considerados como parte de una respuesta general de estrés (CTT1, HSP12 y CYC7). Por lo tanto parece ser que media sus efectos vía los elementos STRE en los promotores de esos genes (Siderius y Mager, 1997).

También se sabe que existen otras vías de señalización inducidas por estrés que regulan la inducción de la expresión vía STRE en una forma HOG-independiente. Además, la presencia de los elementos STRE solos no es suficiente para la inducción de la expresión por la vía HOG. Una explicación para esto podría ser que las diferentes vías de señalización que manejan la expresión de genes estrés-inducidos vía STRE pueden utilizar los elementos STRE cuando ellos actúan junto con otros elementos promotores regulatorios (todavía desconocidos). Por lo anterior, habría diferencias en la regulación de la transcripción entre elementos STRE individuales o múltiples. Además la proteína cinasa que compone la vía HOG (Pbs2p) podría, aparte de estimular a Hog1p, tener otros sustratos de importancia en la respuesta temprana al estrés. Junto con lo anterior, la actividad de la proteína-cinasa en la vía HOG podría estar sujeta a modulación por otras vías, para "afinar" la respuesta al estrés que se desea contrarrestar (Siderius y Mager, 1997).

AII.2. Factores que actúan a nivel *trans*, en la respuesta general al estrés

Los factores que actúan a nivel *trans*, se unen a los promotores de diferentes genes de respuesta al estrés. Existe además la posibilidad de que varias vías de señalización generen variadas respuestas de expresión génica mediadas por STREs, los cuales responderán dependiendo de las secuencias que flanquean a sus promotores. Los factores que actúan en *trans* son indicativos de que diversas señales son usadas para incrementar la "afinación" de la respuesta (Siderius y Mager, 1997).

Los efectos en el estado metabólico de las células (en primer lugar reflejados por la actividad de la vía Ras-AMPC) tienen influencia sobre la red de inducción de la expresión de genes de respuesta al estrés y podrían también convergir en estos factores que actúan a nivel *trans*.

Por lo tanto, podría decirse que la respuesta general al estrés puede servir para vigilar y reaccionar ante los disturbios metabólicos globales.

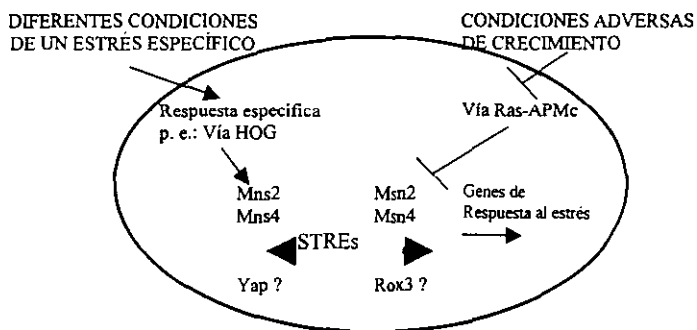


Fig. 31. Resumen de las vías de señalización

En la figura 31 se esquematiza un resumen de las posibles rutas de señalización, elementos que actúan a nivel *cis*, y factores que actúan a nivel *trans*, todos implicados en la respuesta general al estrés.

APÉNDICE III

FENÓMENOS QUE OCURREN EN LA LEVADURA DURANTE EL ESTRÉS OSMÓTICO

AIII.1. Metabolismo de glicerol

El glicerol es producido por las células de levadura y puede ser utilizado como fuente de carbono. Las rutas para la producción y degradación de glicerol se muestran en la figura 9.

Ambas vías comparten al glicerol-3-fosfato como intermediario. Las enzimas que convierten el glicerol-3-fosfato y dihidroxiacetona-fosfato están localizadas en diferentes compartimentos y emplean diferentes cofactores. El equilibrio de ambas reacciones de deshidrogenasas favorece fuertemente la reacción requerida dentro de la vía correspondiente. Las vías para la producción y utilización de glicerol utilizan a la dihidroxiacetona fosfato (intermediario glicolítico) como enlace entre la glicólisis y la gluconeogénesis (Blomerg *et al.*, 1992).

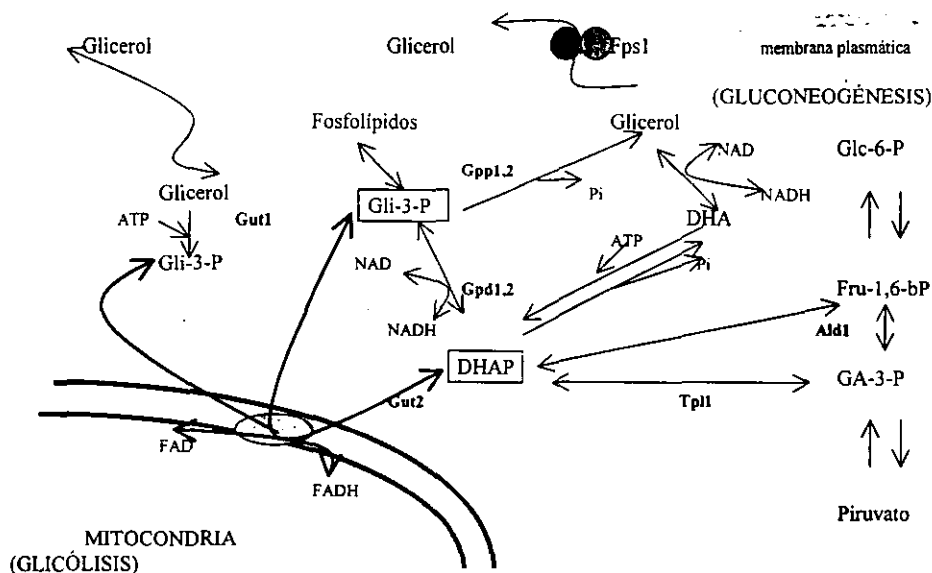


Fig. 32. Metabolismo del glicerol en levadura. *Gut1p*=glicerol cinasa; *Gut2p*=glicerol-3-fosfato deshidrogenasa FAD-dependiente; *Gpd1p,2p*=glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente; *Gpp1p,2p*=glicerol-3-fosfatasa; *Fps1p*=transportador de glicerol; *Tpi1p*=triosafosfato isomerasa; *Ald1p*=fructosa-1,6-bifosfato aldolasa; *DHA*=dihidroxiacetona; *DHAP*=dihidroxiacetona-fosfato. La importancia de las vías de producción de glicerol y utilización vía DHA (dihidroxiacetona) es desconocida en *S. cerevisiae*, pero sí existen los genes que codifican para las enzimas de degradación de glicerol (Tomado de Hohmann, 1997).

Ningún sistema de captación de glicerol hacia el interior de la célula ha sido identificado, por lo tanto, se asume que es captado por difusión pasiva.

El glicerol es fosforilado por una cinasa (gen GUT1) y oxidado a dihidroxiacetona fosfato por una glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa FAD⁺-dependiente mitocondrial (gen GUT2). Esta ruta es la única para la utilización del glicerol en *S. cerevisiae*. Recientemente, se ha encontrado la existencia de genes que codifican para una glicerol deshidrogenasa y dihidroxiacetocinasa que podrían estar implicadas en la degradación del glicerol producido bajo una condición de estrés osmótico.

El primer paso en la producción de glicerol es la reducción de la dihidroxiacetona-fosfato a glicerol-3-fosfato catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ citosólica (isoenzimas codificadas por los genes GPD1 y GPD2). Los productos de estos dos genes son las únicas glicerol-3-fosfato deshidrogenasas y ésta es, probablemente, la única vía de producción de glicerol en *S. cerevisiae* (Hohmann, 1997).

El glicerol-3-fosfato es desfosforilado por una glicerol-3-fosfatasa (codificada por los genes GPP1 y GPP2), pero no se sabe si existen otras fosfatasas que puedan intervenir en este punto.

El glicerol es exportado de la célula a través de dos diferentes vías, por difusión pasiva (parece ser la única vía de entrada del glicerol), y por difusión facilitada con ayuda del canal proteico Fsp1p; esta es la forma en la que gran parte del glicerol abandona la célula (Luyten *et al.*, 1995; Hohmann, 1997).

Las funciones del metabolismo del glicerol son la osmoregulación y el balanceo redox. La primera función ya ha sido explicada (tanto en el punto de osmoregulación como al inicio de este apartado). Respecto a la segunda función, se ha propuesto que la producción de glicerol recicla NAD⁺ ya que su estado reducido (NADH⁺/H⁺) es producido en exceso bajo condiciones anaeróbicas, así que bajo estas condiciones son producidos elevados niveles de glicerol (Hohmann, 1997).

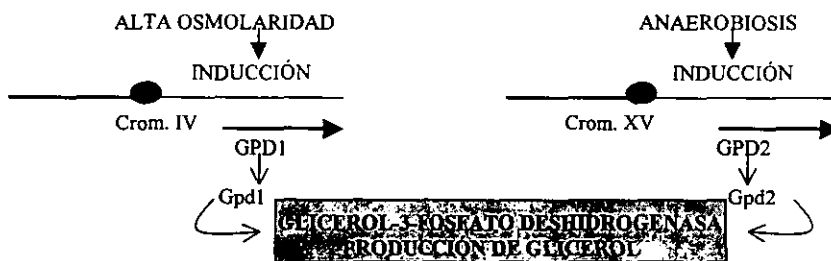


Fig. 33. Expresión de los genes GPD1 y GPD2 que codifican para las isoenzimas NAD-dependientes glicerol-3-fosfato deshidrogenasas, controladas bajo diferentes estímulos: por estrés osmótico y por crecimiento anaeróbico respectivamente. A pesar de esto, parece ser que las dos isoenzimas contribuyen a la misma poza de actividad enzimática y que son funcionalmente intercambiables para la producción de glicerol.

Esta doble función es atribuida a las isoenzimas **Gpd1p** y **Gpd2p** las cuales presentan la misma función pero bajo condiciones diferentes, es decir, su expresión es específica de ciertas condiciones. La expresión de **GPD1** es estimulada por estrés hiperosmótico pero no en condiciones anaeróbicas. La expresión de **GPD2** es estimulada en anaerobiosis pero no bajo un estrés hiperosmótico. Lo anterior se encuentra representado en la figura 33.

A pesar de lo anterior, otros mecanismos como el control del flujo glicolítico, deben de existir para regular la producción de glicerol bajo estas dos condiciones. También la expresión de **GPP2** es estimulada por una elevada osmolaridad externa y no sucede lo mismo con la expresión de **GPP1**, el cual puede que se exprese a nivel constitutivo al no existir una relación con la regulación redox.

Es importante señalar que la inducción normal de la expresión por estrés hiperosmótico de los genes **GPD1** y **GPP2** depende de una vía **HOG** activada.

AIII.2. Transducción de señales bajo estrés osmótico

Las vías de transducción de señales estimuladas por estrés osmótico están entre las vías de señalización estrés inducidas mejor comprendidas en levadura, y son:

HOG (high osmolarity glicerol)

PK-C (protein-cinasa C)

Ambas utilizan como señal de transducción central una cascada de proteincinasas, conocida como:

vía MAP (mitogen activated protein- cinasa)

AIII.2.1. Ruta MAP-cinasa

Esta vía es una cascada constituida de tres proteín-cinasas:

MAP-cinasa (MAPK)

MAP-cinasa-cinasa (MAPKK)

MAP-cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK)

Existen probablemente 5 vías MAP-cinasa en *S. cerevisiae*; todas presentan en común la cascada anterior. La figura 34 muestra los conocimientos actuales que se tiene sobre estas cinco vías de señalización hasta ahora identificadas (Hohmann, 1997).

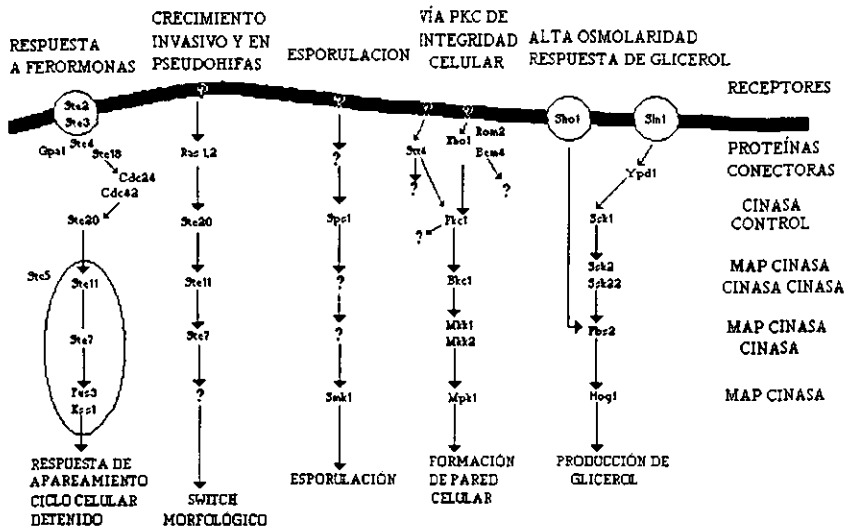


Fig. 34. Vías de señalización MAP-cinasa en levadura (para mayores detalles ver texto).

Para la mayoría de ellas se han identificado las fosfatasa que controlarían negativamente a la vía. La topología general de las rutas predice la existencia de un módulo de tres cinasas controladas a un nivel superior por otra cinasa, la cual parece estar ligada a receptores diferentes según la vía. Proteínas-G (y proteínas que regulan su actividad vía unión de GTP/GDP e hidrólisis de GTP) están involucradas en la señalización primaria como se observa en la vía que responde a ferromonas, desarrollo de pseudohifas o en la vía PKC-. Ste5p es una proteína de andamiaje que une a varios componentes de la vía de respuesta a ferromonas. Ste4p no es una proteína-G sino una fofatidilinositol-4-cinasa, sugiriendo que más proteínas involucradas en el metabolismo del fofatidilinositol intervienen en esta vía. El fenotipo de mutantes defectuosas en diferentes componentes de la vía PKC sugiere que existen diferentes rutas bifurcándose a partir de los primeros componentes de esta vía (Hohmann, 1997).

Cabe señalar que los únicos receptores identificados hasta el momento son los de las vías de respuesta a ferromonas de apareamiento y la vía HOG.

AIII.2.2. Ruta HOG

Los componentes hasta ahora identificados y su modo de acción se muestran en la figura 35 en la cual observamos la existencia de dos osmosensores (Sho1 y Sln1) los cuales estimulan a diferentes niveles y mediante diferentes mecanismos a la cascada MAP-cinasa, la cual es controlada por al menos tres fosfatasa.

El sensor Sln1 parece controlar la ruta de una forma negativa y su ausencia causa la muerte por una sobreactividad de la misma, lo cual sugiere que bajo condiciones normales de crecimiento la proteína cinasa Sln1p es activa y modifica al dominio activo de Ssk1p a un estado silencioso.

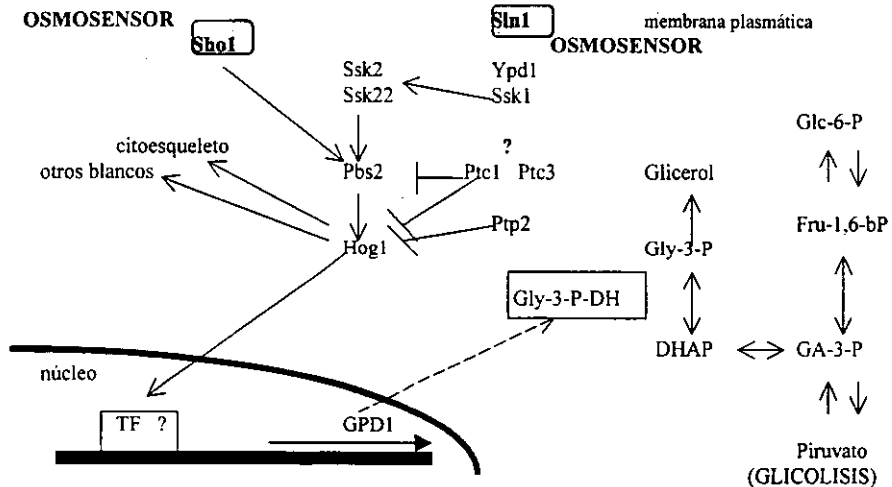


Fig. 35. Modelo de la ruta-HOG en *S. cerevisiae*, para mayores detalles ver texto (tomado de Hohmann, 1997).

La vía Sln1p/Ypd1p/Ssk1p/Ssk2p/Pbs2p responde a una baja osmolaridad (saturado a 100mM de NaCl) y es más rápida (entre 1 minuto) que la vía Sho1p/Pbs2p (saturada a 300 mM de NaCl y actúa aproximadamente en 2 minutos). Esto sugiere que los dos sensores podrían estar involucrados en la modulación de la respuesta ante un amplio rango de cambios de osmolaridad y ante diferente extensión de tiempo.

A pesar de los grandes avances en la caracterización de los componentes de esta vía, aún no ha sido identificado ningún objetivo a nivel molecular, pero se supone que al menos un factor de transcripción es controlado por Hog1 (Hohmann, 1997).

AIII.2.3. Ruta PKC

Esta vía es estimulada por choque calórico, crecimiento celular polarizado y progresión del ciclo celular. También está involucrada como sensor de nutrientes.

En la figura 36 se muestran la forma de acción de la vía, la cual es estimulada por varias condiciones que parecen afectar la forma y tamaño de la célula. La función de la fosfatidilinositol-4-cinasa (Stt4p) y de Rho1p proteína-G en la estimulación de la proteína-cinasa C no se conoce, pero Rho1p interacciona directamente con Pkc1p. Además, Rho1p interacciona con otras proteínas. Pkc1p parece ser estimulada también por la proteína-cinasa Cdc28p la cual presenta una función central en el control del ciclo celular. Pkc1p estimula a la cascada MAP-cinasa la cual pudiera estar controlada por dos o más fosfatases. El efecto final de la vía a nivel molecular sobre la expresión de BGL2 está relacionado con lo ya conocido sobre que la vía PKC, la cual está involucrada en los procesos relacionados al remodelamiento de la pared celular y por lo tanto en la morfogénesis.

Una caída en la osmolaridad externa resulta en la toma de agua y en un incremento en el volumen celular. La expansión de la célula podría conducir en alguna forma a una señal para hidrolizar parcialmente y remodelar la pared celular a una de mayor tamaño o en apoyo al desarrollo de una gema. Tales procesos establecerían el lazo de unión entre el crecimiento y la morfogénesis con la osmorregulación.

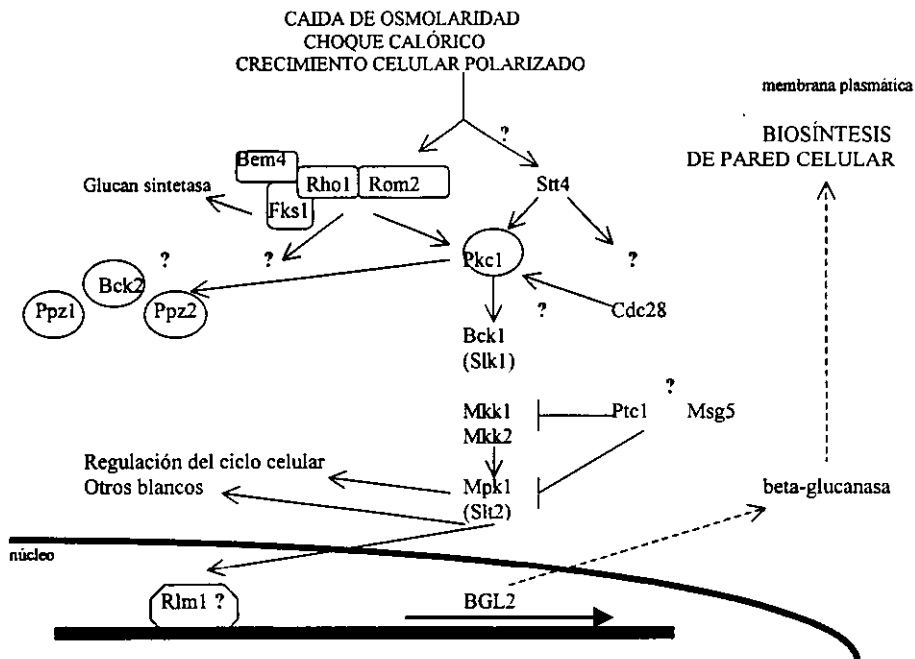


Fig. 36. La vía PKC en *S. cerevisiae* (para mayores detalles ver texto).

AIII.3. Expresión génica bajo estrés osmótico

Los niveles de aproximadamente 200 proteínas responden significativamente a la sal o al estrés osmótico. Otros análisis han encontrado que el grado de síntesis de varias proteínas se ve reducido después de una exposición de la levadura a 0.7 M de NaCl, mientras que la síntesis de otro grupo de proteínas, con un tamaño aproximado de 14-73 kDa, fue inducida. (Mager, 1993).

Los genes cuya expresión está bajo control osmótico pueden ser clasificados de acuerdo a dos parámetros principales: aquellos que son controlado bajo una respuesta general al estrés, y los que son controlados específicamente por estrés osmótico.

Algunos de los genes hasta el momento identificados se mencionan en el siguiente cuadro.

Cuadro AIII-1. Genes involucrados en la respuesta al estrés osmótico.

GEN	CARACTERÍSTICAS
GPD1	Codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Depende de la vía HOG pero sólo en cierta forma, no completamente. Es inducido bajo estrés hiperosmótico.
GPP2	Codifica para la enzima glicerol-3 fosfatasa, inducido bajo estrés hiperosmótico.
HXT1	Codifica para un transportador de glucosa, el cual es controlado específicamente por estrés osmótico en una forma HOG-dependiente.
GLK1	Codifica para una glucocinasa
HXK1	Codifica para una hexocinasa I La expresión de ambos está controlada por diferentes formas de estrés y por la proteína cinasa A y por lo tanto podrían pertenecer a la familia de genes regulados por STRE. Estos genes están involucrados en los primeros pasos de la glicólisis lo que apunta a una adaptación del flujo glicolítico para elevar la producción de glicerol.
ALD2	Codifica para una aldehído deshidrogenasa, la cual probablemente interviene en la regulación redox durante el incremento en la producción de glicerol bajo estrés osmótico.
PAI3	Codifica para un inhibidor de proteasa
SIP18	Codifica para una proteína de función desconocida
DDR48	La inducción de los tres genes anteriores depende de la vía HOG. Codifica para una proteína involucrada en la reparación de ADN. Su inducción no depende de la vía HOG: Los últimos cuatro genes presentan una inducción de su expresión por un incremento en la osmolaridad extracelular.

APÉNDICE IV

FENÓMENOS QUE OCURREN EN LA LEVADURA DURANTE EL ESTRÉS SALINO

AIV.1. Genes que actúan en la tolerancia a estrés salino en levadura

A continuación se enlistan varios de los genes aislados hasta ahora que proporcionan una tolerancia en levadura a los efectos tóxicos producidos por la presencia de sal.

GEN	CARACTERÍSTICAS
HAL1	Su sobreexpresión incrementa el crecimiento de levadura bajo estrés salino. Es específico para NaCl. Podría interactuar con los sistemas de transporte de K^+ ya que en células sobre-expresando HAL1, la toxicidad del Na^+ parece ser contrarrestada por un incremento en la acumulación de K^+ (Gaxiola <i>et al.</i> , 1992). Su expresión es reprimida por represión catabólica.
HAL2	Su sobre-expresión en levadura permite a la célula tolerar altas concentraciones de sal. Codifica para una 3'(2')5'-bifosfato nucleotidasa que permite la remoción de los productos finales de la transferencia de sulfatos durante el metabolismo celular. La enzima es inhibida por Li^+ y Na^+ y activada por K^+ . Por lo tanto, confiere tolerancia a Li^+ y Na^+ sin producir una alteración significativa en la cantidad de Na^+ o Li^+ intracelular, y es requerida para la biosíntesis de metionina (Murgia <i>et al.</i> , 1995 y Murgia <i>et al.</i> , 1996).
HAL3	Su sobre expresión incrementa el crecimiento de levadura bajo una elevada concentración de Li^+ y Na^+ . Suprime la sensibilidad a la sal conferida por una mutación en la función de la calcineurina fosfatasa Ca^{2+} -dependiente. Su actividad está directamente relacionada con el aumento de K^+ citoplásmico y disminución de Na^+ y Li^+ . Actuando junto con calcineurina, completa la activación de la expresión de ENA1 (Ferrando <i>et al.</i> , 1995).
HAL6 HAL7 HAL8 HAL9	Son 4 factores de transcripción que después de una sobre-expresión en plásmidos multicopia incrementan la tolerancia a Na^+ y Li^+ . Su efecto es mediado, en parte, por un aumento en la expresión de ENA1. HAL6 y HAL7 son proteínas que codifican para cierres de leucina (bZIP) y su alteración génica no afecta la tolerancia a la sal ni la expresión de ENA1. HAL8 y HAL9 aparentemente son dedos de zinc y su alteración disminuye la tolerancia a la sal y la expresión de ENA1. Por lo anterior, Hal8p y Hal9p califican como activadores transcripcionales de ENA1. Hal8p parece mediar la parte dependiente de calcineurina en la expresión de ENA1 (Mendizabal <i>et al.</i> , 1998).
YCK1 YCK2	Codifican para la proteína caseína cinasa I, cuya sobre-expresión incrementa la tolerancia a la sal. (Hohmman, 1997).
CMK1,2	Codifica para una proteína cinasa Ca^{2+} -calmodulina-dependiente. Su sobreexpresión incrementa la tolerancia a la sal (Hohmman, 1997).
ENA1	Sistema único relacionado con la salida de Na^+ , (E-P) ATPasa. Su expresión está regulada por la vía HOG ante un choque hiperosmótico e inducida específicamente por una elevada concentración de Na^+ a través de la vía mediada por calcineurina. Su expresión es reprimida por represión catabólica (Serrano, 1996).

PP2B

Calcineurina (CaN) proteína fosfatasa Ca^{2+} y calmodulina dependiente. es activada después de la unión de Ca^{2+} a la calmodulina y a su subunidad reguladora. La unión Ca^{2+} -calmodulina a su subunidad catalítica desplaza el dominio autoinhibitorio y promueve su actividad de fosfatasa. En levadura es un intermediario integral de la señal de trasducción en respuesta al estrés salino. Actúa en la tolerancia al NaCl a través de la regulación de la salida y entrada de Na^+ . Además de modular la homeostasis del Ca^{2+} interviene en otras funciones celulares (Pardo *et al.*, 1998 y Hohmann, 1997).

AIV.2. Sistemas de captación y salida de iones.

Los mecanismos de captación de cationes en levadura no están del todo comprendidos, y su importancia radica en que un incremento en la toma de sodio (provocado por la mutación de transportadores de cationes) provoca un decremento de la tolerancia salina. La concentración de K^+ requerida para el crecimiento de levadura es dependiente del nivel de otros cationes en el medio. tales como H^+ y NH_4^+ los cuales compiten con el K^+ para su toma (Serrano, Márquez y Ríos, 1997). La discriminación entre K^+ y Na^+ es conseguida a nivel de la salida de cationes y no por los sistemas de captación de K^+ (Haro, 1993). El estrés por NaCl puede inducir la ausencia de K^+ en la célula por la competencia entre Na^+ y K^+ para su captación. Así mismo, la salida de K^+ pudiera ser un factor importante en la determinación del nivel de K^+ intracelular y entonces indirectamente en la tolerancia a la sal. Sistemas intracelulares sensibles a una inhibición por sodio podrían ser reactivados por potasio y la relación Na^+/K^+ puede ser un parámetro importante en la toxicidad salina (Serrano, 1996 y Serrano y Gaxiola, 1994).

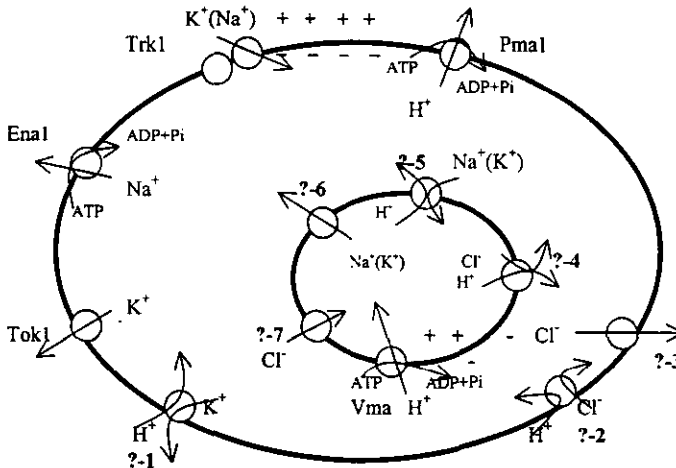


Fig. 37. Sistemas de transporte citoplasma vacuola en levadura relevantes en la tolerancia a la sal. Los signos de interrogación indican sistemas identificados fisiológica y electrofisiológicamente pero con bases moleculares desconocidas, para mayores detalles ver texto (tomado de Serrano, Márquez y Ríos, 1997).

En la figura 37 se esquematizan los posibles transportadores en levadura y algunas de sus características son las siguientes.

SISTEMA	CARACTERÍSTICAS
Pma1	Se trata de una H ⁺ -ATPasa y es el sistema quimiosmótico primario de la célula (Serrano, Márquez y Ríos, 1997).
Trk1	Proteína de membrana plasmática que probablemente modula un conducto catiónico para la toma de K ⁺ y Na ⁺ , que responde a un gradiente electroquímico de protones (producido por la Pma1), y la cual actuaría mediando el incremento de afinidad por K ⁺ y no por Na ⁺ cuando la célula experimenta una falta de K ⁺ (Haro <i>et al.</i> , 1993).
Ena1	Es una ATPasa y es la responsable de la mayor parte de la salida de Na ⁺ (Serrano, 1996).
Tok1	Es un canal de K ⁺ ; media su salida. Podría participar en los movimientos para balanceo de cargas durante el transporte activo en membrana plasmática (Gustin <i>et al.</i> , 1986 y Ketchum <i>et al.</i> , 1995).
Vma	Se refiere a una ATPasa-H ⁺ , la cual energiza a la membrana vacuolar y cuya ausencia en mutantes las hace sensibles a una inhibición del crecimiento por NaCl y LiCl, lo que señala la importancia de la compartimentalización en la tolerancia a sal (Haro <i>et al.</i> , 1993, Serrano, Márquez y Ríos, 1997).
?-1	Antiporte H ⁺ /K ⁺ involucrado en la salida de K ⁺ , y también podría ser de gran importancia en la regulación de los niveles de potasio intracelular (Serrano, 1997).
?-2 y 3	No se conoce nada sobre un transportador de Cl ⁻ , pero el movimiento de este ion a través de la membrana podría estar mediado por un simporte Cl ⁻ -H ⁺ para toma, y por un conducto de Cl ⁻ para su salida, manejado por un potencial de membrana negativo en su interior (Serrano, 1997). La ausencia de toxicidad por Cl ⁻ puede deberse a, ya sea una toma reducida o a una salida incrementada de este ión.
?-4 a 7	Estos transportadores de iones sólo han sido descritos a nivel fisiológico y electrofisiológico. Ellos incluyen antiporte y simporte de H ⁺ para la acumulación de protones en la vacuola y canales de salida (Serrano, 1997).

AIV.3. Integración de la regulación y señales de transducción en el estrés salino

Dentro de las señales de transducción observadas bajo un estrés salino se encuentran: (Figura 38), la vía HOG, ya mencionada, cuya actividad es una de las más importantes y regula la expresión del gen ENA1 bajo un estrés hiperosmótico. Otra vía que responde a altas

concentraciones de soluto, es modulada por el gen EHA1, cuyo producto regula la expresión de los genes HAL1 y DDR48. También se conoce la intervención de la vía dependiente de calcineurina que es sodio-específica y que, por lo tanto, actúa bajo estrés salino (Serrano, 1996 y Serrano, Marquéz y Ríos, 1997).

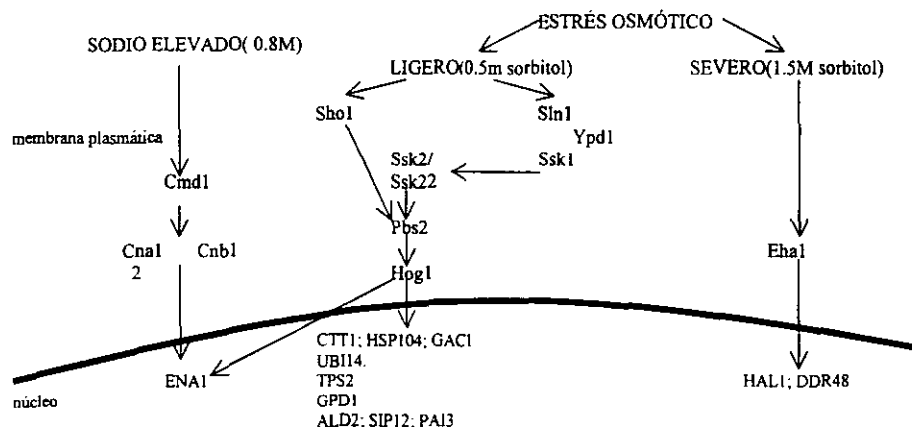


Fig. 38. Múltiples vías controlan la expresión génica en *S. cerevisiae* bajo estrés salino. Ambas, la vía HOG y la Eha1p, son activadas bajo estrés osmótico, pero con diferentes sensibilidades. La vía HOG es activada al máximo a 0.3 M de NaCl (equivalente a 0.5 M de sorbitol) mientras que la vía Eha1p requiere de mayores concentraciones de osmolitos (1 M de NaCl, equivalente a 1.5 M de sorbitol). Por otro lado, la expresión del gen ENA1 es controlada por dos diferentes vías, la vía HOG, responsable de la inducción de ENA1 a bajas concentraciones osmóticas y la vía de calcineurina, la cual es activada específicamente por altas concentraciones de sodio.

A pesar de esta primera aproximación a las señales de transducción que modulan la expresión de genes inducidos por sal no se conoce mucho sobre los sensores primarios de sodio o sobre factores de transcripción que actúen sobre estos genes y su regulación a nivel molecular.