

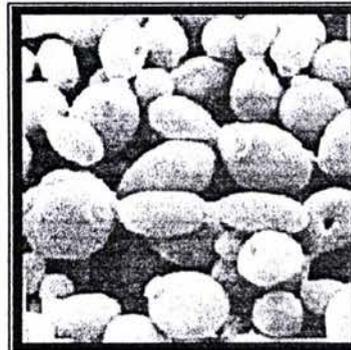
00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

“La actividad de los genes de
respuesta al estrés en las mutantes
hsr de *Saccharomyces cerevisiae*”



TESIS

DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
QUE PRESENTA:

Q.B.B. LARISSA EMMA VENTURA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JORGE NIETO SOTELO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



CUERNAVACA, MOR.

JUNIO DEL 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*Dedico esta tesis a mi madre, María de Lourdes García Morales,
por su incondicional apoyo, por su amor y comprensión
A mi padre, Moisés Ventura Moreno, quien siempre estará en mi corazón*

*Con especial cariño a Abraham Martínez, por apoyarme y confiar en mí,
por todo lo que hemos compartido y por muchas otras cosas más...*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Nieto Sotelo por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y su apoyo para el logro de este trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Luis Folch Mallol y especialmente a la Q.I. Luz María Martínez por sus valiosos consejos y su asesoría durante el desarrollo de la parte experimental.

A mis revisores, Dr. Jorge Luis Folch, Dr. Wilhelm Hansberg, Dr. Francisco Campos y Dra. Alicia González, por su paciencia y sus consejos para la corrección de este manuscrito.

Deseo agradecer

A mis compañeros y amigos, que me asesoraron, apoyaron y ayudaron a sobrevivir las largas jornadas en el laboratorio. A Sergio, LuzMa, Jordi, Marina, Abig, Elia y Teresa..

A Florencia, Lizpa, Alicia, Gladys y Zulema por su amistad y todos los momentos que alguna vez compartimos. A todos aquellos que me han acompañado a lo largo de estos años.

A Alejandra, Aurora y Carlitos por todo lo que compartimos y por haberme recibido en su casa.

A Georgina Ponce, Marco Villanueva y Oscar Mascorro, por su apoyo y su amistad.

Al Dr. Jesús León y a Elizabeth por sus valiosos consejos. A mis amigos y compañeros del circlet por las largas horas de discusión que han mantenido inquieto mi espíritu.

A todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de éste trabajo

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. JORGE NIETO SOTELO. DURANTE LA REALIZACIÓN DE ÉSTE PROYECTO SE CONTÓ CON EL APOYO FINANCIERO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) CON EL DONATIVO 25303-N. EL AUTOR DE ESTE TRABAJO TUVO EL APOYO DE LA BECA CONACyT 338262 Y DGAPA-UNAM IN209599.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. El estrés por calor en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	3
1.1 Las proteínas de estrés por calor.....	5
1.2 El disacárido trehalosa.....	6
1.3 Otros factores que afectan la tolerancia al estrés por calor en <i>S. cerevisiae</i>	7
2. La regulación de la expresión de los genes de estrés en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a nivel transcripcional.....	8
2.1 Los genes inducibles por calor	8
2.2 Los genes de estrés por calor también son regulados por los elementos de respuesta al estrés (STRE).....	9
2.3 La regulación transcripcional a través de los elementos Yap1	11
3. La vía de transducción de señales Ras/AMPC	11
3.1 El gen <i>CDC25</i>	13
ANTECEDENTES	15
OBJETIVO	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Determinación cuantitativa de los niveles de termotolerancia intrínseca de las cepas <i>hsr</i>	17
Aislamiento de las cepas que revirtieron el tamaño de la colonia de chico a grande.....	18
Determinación del porcentaje de reversión del tamaño de la colonia	18
Cinéticas de crecimiento continuo a temperaturas supraóptimas.....	18
Transformación de la levadura <i>S. cerevisiae</i> por el método del acetato de litio	19
Transformación de la levadura por el método de la electroporación	19
Determinación de las eficiencias de transformación y complementación.....	20
Determinación de la actividad específica de la β -galactosidasa	20
Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford	21
RESULTADOS.....	22
1. La regulación de la expresión del gen <i>lacZ</i> en las mutantes <i>hsr</i> debida a los elementos de respuesta al estrés en condiciones de estrés	22
1.1 Actividad de β -galactosidasa en cepas que tienen una construcción quimérica entre un promotor de genes de <i>heat shock</i> y el gen <i>lacZ</i> ($p\beta 11$ - <i>lacZ</i>)	22
1.2 Actividad de β -galactosidasa en cepas con una construcción quimérica entre el elemento de respuesta al estrés y el gen <i>lacZ</i> (<i>STRE</i> - <i>lacZ</i>)	25
1.3 Actividad de la β -galactosidasa en las cepas que tienen una construcción quimérica entre el elemento que responde a AP-1 y el gen <i>lacZ</i> (<i>ARE</i> - <i>lacZ</i>).....	27
1.3.1 En diferentes estadios de la curva de crecimiento	27
1.3.2 En respuesta a la adición de H ₂ O ₂ y de CdSO ₄	27
1.3.2.1 En las cepas mutantes <i>hsr</i>	27
1.3.2.2 En la doble mutante <i>hsr2-1</i> Δ <i>yap-1</i>	30
1.3.2.3 En diferentes cepas mutantes termosensibles <i>cdc25^{ts}</i>	31

2. La termotolerancia intrínseca en las cepas mutantes dobles <i>hsr Δhsp104</i> a lo largo de la curva de crecimiento	32
3. Caracterización fisiológica y molecular de la reversión del tamaño de la colonia en las mutantes <i>hsr</i>	37
3.1 Efecto del crecimiento continuo a temperatura subletal en las mutantes <i>hsr2-2</i> y <i>hsr3-1</i>	37
4. Complementación molecular mediante la transformación con un banco de ADN genómico silvestre	40
4.1 Transformación de las mutantes <i>hsr2</i>	40
 DISCUSIÓN	 42
La expresión debida a los elementos de respuesta al estrés en las mutantes <i>hsr</i> se encuentra alterada	42
Efecto de Hsp104 en el incremento de la termotolerancia intrínseca durante las distintas fases del crecimiento en medio líquido	46
¿La termotolerancia y la velocidad de crecimiento son funciones que se regulan de manera independiente?	48
La elevada frecuencia de reversión espontánea no se elimina por un tratamiento desnaturalizante	49
 CONCLUSIONES	 52
 PERSPECTIVAS	 53
 BIBLIOGRAFÍA	 54
 ANEXO 1	 62
 ANEXO 2	 66
 ANEXO 3	 68
 ANEXO 4	 69
 ANEXO 5	 69

INTRODUCCIÓN

En términos biológicos, el estrés es todo aquel factor biótico o abiótico que provoca una disminución en el crecimiento y/o la viabilidad celular. La sobrevivencia del organismo a los cambios constantes en la disponibilidad de nutrientes, en el pH del medio, en la temperatura y otros factores ambientales, depende de la respuesta rápida al estrés (Atkinson y Walden, 1985). Un organismo es capaz de crecer a temperaturas elevadas o sobrevivir a una breve exposición a temperaturas extremas, debido a la respuesta celular al estrés por calor.

Se le denomina termotolerancia intrínseca a la habilidad del organismo para sobrevivir a la exposición al calor a temperaturas letales por períodos cortos de tiempo (en la levadura *S. cerevisiae* 50°C durante 20 min.). Por otro lado, la exposición a choques de calor moderados (p. ejem., 39°C durante 30 min.) promueve el incremento transitorio de la tolerancia al calor extremo (p. ejem., 50°C durante 20 min.), un fenómeno conocido como termotolerancia inducida (Sánchez *et al.*, 1992). Este pretratamiento confiere a la célula una resistencia a otros tipos de estrés y, a la inversa, la exposición a otros tipos de estrés conduce a un aumento en la termotolerancia (Parsell y Lindquist, 1993).

Algunas de las mutantes en levadura que presentan una alta termotolerancia intrínseca son la del gen *hsp1* (*heat shock response*) que codifica para la adenilato ciclasa (Iida y Yahara, 1984) y la mutación *hsf-301* en el gen que codifica para el factor de transcripción de los genes inducibles durante el estrés por calor (Sewell *et al.*, 1995).

1. El estrés por calor en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

En general, el calor ocasiona daño a diversas estructuras celulares y procesos biológicos y puede incluso ocasionar la muerte celular (Nover, 1991). El calor ocasiona la fragmentación del aparato de Golgi, un incremento en el número de lisosomas y la reducción del número de mitocondrias con la consecuente disminución de la respiración y la fosforilación oxidativa (Patriarca y Maresca, 1990). También induce un incremento en la fluidez de la bicapa lipídica y la agregación de las proteínas integrales de la membrana (Parsell y Lindquist, 1993), produce daño al citoesqueleto (Falkner *et al.*, 1981) y al huso mitótico (Debec y Marcaillou, 1997). Además, promueve la desaparición de los polisomas (Nover, 1991) y la inhibición del procesamiento de los ARNs inmaduros (*splicing*) (Yost y Lindquist, 1986). Esto quizá favorece la síntesis de algunas proteínas de choque por calor (Hsp) [*heat shock proteins*] ya que sus

ARNm no contienen intrones. En *Drosophila melanogaster* el procesamiento de los ARNr se ve alterado y se aborta la transcripción realizada por la ARN polimerasa I y II (Bell *et al.*, 1988).

Aún cuando se ha estudiado en diversos organismos la respuesta al choque térmico, este fenómeno no ha sido totalmente esclarecido. ¿Qué mecanismos participan en la percepción y en la transducción de la señal para activar la rápida respuesta celular al estrés por calor?. ¿Cuál es la señal primaria que inicia esta respuesta?.

Desde el punto de vista clásico, se propone que la desnaturalización parcial de las proteínas podría constituir la señal primaria para la activación de esta respuesta, pues la acumulación de las proteínas anómalas durante la exposición a una temperatura supraóptima correlaciona con la inducción de la expresión de las Hsp (Lazlo, 1992), mientras que se reduce la expresión de otras proteínas (Lindquist y Craig, 1988; Iida y Yahara, 1984; Parsell y Lindquist, 1993; Craig y Gross, 1991). Se podría esperar que la exposición continua al calor daría lugar a la desnaturalización permanente de las proteínas y, en consecuencia, a la activación continua de los genes que codifican para las Hsp. Sin embargo, esta respuesta es transitoria en todos los seres vivos. Después de una hora de exposición a una temperatura subletal, disminuye la expresión de las Hsp a los niveles normales de la síntesis de estas proteínas (Miller *et al.*, 1979; Slater y Craig, 1987; Sorger, 1990, 1991).

Si las variaciones en la temperatura son percibidas a nivel de la membrana plasmática, se podría suponer que cualquier modificación en las propiedades físicas de ésta, ocasionaría cambios en el nivel de expresión de los genes *HSP*. Algunas observaciones apoyan esta hipótesis. Kamada y cols. (1995) proponen que la activación de la cinasa de proteína tipo C (Pkc1) inducida por calor, responde a un debilitamiento en la pared celular debido al incremento en la fluidez de la membrana. En las cianobacterias, después de un incremento en la temperatura, se suprime la reacción de instauración de los lípidos y se acelera la síntesis de los ácidos grasos saturados, reduciéndose así el porcentaje de insaturación de los lípidos de la membrana (Sato y Murata, 1980).

También se especula que la acumulación de las especies reactivas del oxígeno (Jacquier-Sarlin y Polla, 1996) y los cambios en la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática (Panaretou y Piper, 1990; Coote *et al.*, 1994) pueden activar la respuesta al choque térmico. A su vez, Weitzel y cols. (1987) encontraron que la exposición a temperaturas subletales en *S. cerevisiae* correlaciona con un incremento en la acidificación del pH intracelular y la inducción de la expresión de las Hsp, particularmente de la Hsp70. Esta misma correlación se observa con otros inductores de la respuesta al choque térmico.

1.1 Las proteínas de estrés por calor

En la célula, las proteínas se encuentran expuestas a eventos que causan la pérdida de la conformación nativa y promueven su agregación bajo condiciones normales y de estrés. Aunque algunas proteínas son capaces de recuperar su estado nativo *in vitro*, este proceso es lento y los intermediarios parcialmente plegados tienden a agregarse. Por lo tanto, el desarrollo de un sistema que facilite la recuperación de las formas nativas y la degradación de las proteínas anormales proporciona a los organismos ventajas adaptativas (Miernyk y Hayman, 1996). Esta es la función que cumplen un grupo de proteínas denominadas, chaperonas moleculares.

Las chaperonas reconocen la superficie hidrofóbica de las proteínas parcialmente desnaturalizadas y estabilizan la conformación inestable de éstas evitando su agregación. A través de un ciclo de pegado y liberación, las chaperonas facilitan el plegamiento generalmente con hidrólisis de ATP (Miernyk y Hayman, 1996; Hartl, 1996; Bukau y Horwich, 1998; Parsell y Lindquist, 1993). Además de facilitar la degradación de las proteínas anormales, las chaperonas son requeridas para la oligomerización y localización subcelular de las proteínas (Nover, 1991).

Algunas de las Hsp que se inducen en la respuesta al estrés tienen función de chaperonas y se expresan además en condiciones normales de crecimiento (Mager y Moradas Ferreira, 1993).

Aunque muchas proteínas se inducen en respuesta al estrés por calor en *S. cerevisiae*, solamente la Hsp104 parece tener un papel importante en la termotolerancia inducida (Lindquist y Craig, 1988). La interrupción del gen que codifica para esta proteína, ocasiona una termotolerancia inducida deficiente (Sánchez y Lindquist, 1990). Esta proteína, promueve además la renaturalización de las proteínas agregadas (Parsell *et al.*, 1994) con la actividad de las proteínas Hsp40 y Hsp70 (Glover y Lindquist, 1998). La proteína Hsp104 también es necesaria para la viabilidad de las esporas y de las células en la fase de crecimiento estacionario y para la expresión de los niveles de termotolerancia en estos tipos celulares (Sánchez *et al.*, 1992). Los cultivos de la levadura, crecidos en fuentes de carbono no fermentables, presentan una mayor acumulación de la Hsp104 y una termotolerancia elevada con respecto a los crecidos en fuentes de carbono rápidamente fermentables (Sánchez *et al.*, 1992).

Otros estudios han sugerido el papel de Hsp104 en el mecanismo de propagación del prión [*PSI⁺*]. Este factor, es un producto de la expresión del gen *SUP35* (que codifica para un supresor omnipotente de la terminación de la traducción) (Chernoff *et al.*, 1995). En las células de levadura [*PSI⁺*] aumenta la frecuencia de supresión de las mutaciones sin sentido al reducir la fidelidad traduccional. Además este factor presenta un carácter dominante y la herencia ocurre de

manera citoplásmica, por lo que, las proteínas $[PSI^+]$ son capaces de inducir el cambio de $[PSI^-]$ a la conformación anómala $[PSI^+]$ sin alterar la secuencia del ADN (Wickner, 1994). Hsp104 participa en la conversión de $[PSI^-]$ a $[PSI^+]$.

Algunas de las Hsp descritas en la levadura *S. cerevisiae* se enlistan en la **Tabla 1**.

Proteína	Función	Referencia
Hsp12	Chaperona molecular	Varela <i>et al.</i> , 1995
Hsp26	Chaperona molecular durante el choque por calor	Haslbeck <i>et al.</i> , 1999
Hsp60	Chaperona mitocondrial	Cheng <i>et al.</i> , 1989
Hsp70	Chaperona molecular y en la regulación de la respuesta al choque por calor	James <i>et al.</i> , 1997
Hsp90	Chaperona, maduración de los componentes de la vía de transducción de señales de las feromonas	Nathan <i>et al.</i> , 1997; Louvion <i>et al.</i> , 1998
Hsp104	Chaperona, papel en la termotolerancia y propagación del prion $[PSI^-]$	Schirmer y Lindquist, 1997; Glover y Lindquist, 1998

Tabla 1. Relación de las Hsp que tienen un mayor nivel de inducción en *S. cerevisiae*.

Otras Hsp son algunas enzimas de la glucólisis, como la enolasa y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Además de la catalasa, que es una enzima antioxidante, y la ubiquitina, que es requerida para la degradación de proteínas (Mager y Moradas Ferreira, 1993).

1.2 El disacárido trehalosa

El disacárido trehalosa se acumula transitoriamente en la levadura, en respuesta al estrés por calor durante la fase de crecimiento exponencial (Hottiger *et al.*, 1987, 1989 y 1992; De Virgilio *et al.*, 1991). Esta acumulación constituye un elemento adicional de la respuesta adaptativa de la levadura que ocurre de manera independiente a la síntesis de proteínas (Ribeiro *et al.*, 1997). La trehalosa también se acumula en los cultivos en la fase de crecimiento estacionario y en las esporas, en donde parece tener un papel importante en la tolerancia al calor que presentan estos tipos celulares (Lillie y Pringle, 1980; Wiemken, 1990).

En condiciones de calor extremo, la trehalosa incrementa la estabilidad térmica de las proteínas y reduce la formación de los agregados protéicos inducidos por el calor. Por otro lado, en pruebas *in vitro* se observa que la adición de este disacárido a concentraciones similares a las fisiológicas, protege a varias proteínas contra la inactivación térmica (Hottiger *et al.*, 1994).

En *S. cerevisiae*, la síntesis de trehalosa se lleva a cabo por el complejo trehalosa-6-fosfato-sintasa fosfatasa, integrado por las subunidades Tre6P-sintasa (Tps1), Tre6P-fosfatasa (Tps2) y las subunidades regulatorias (Tps3 y Tsl1) (Singer y Lindquist, 1998). Los genes *TPS1*

y *TPS2* codifican proteínas inducibles por calor y contienen elementos de respuesta al estrés (*STRE*) en su región promotora (Bell *et al.*, 1992; De Virgilio *et al.*, 1993).

Los niveles de trehalosa en la levadura son regulados por la cinasa de proteínas tipo A (Pka), a través de la activación post-traducciona de la trehalasa neutral (responsable de la degradación de la trehalosa en el citosol) y por la represión transcripcional de los genes *TPS*, a través del elemento *STRE* (Winderickx *et al.*, 1996).

De Virgilio y cols. (1994) demostraron que en los mutantes $\Delta tps1$ ó $\Delta tps2$ no se produce la síntesis de la trehalosa en la fase estacionaria ni en respuesta al choque de calor. Esto correlaciona con una reducción significativa de la termotolerancia inducida por calor y la termotolerancia intrínseca de las células en la fase de crecimiento estacionario. En *Schizosaccharomyces pombe*, las mutantes *tps1* sólo adquieren termotolerancia si se exponen a temperaturas moderadas (en las cuales se sintetizan las Hsp), pero estos niveles de termotolerancia se reducen drásticamente a temperaturas altas a las cuales se inhibe la síntesis de estas proteínas. Estos resultados sugieren que la acumulación de trehalosa es importante para la inducción de la termotolerancia a altas temperaturas en ausencia de la síntesis de las Hsp, mientras que, en la inducción a temperaturas moderadas, parece tener un papel secundario (Ribeiro *et al.*, 1997).

1.3 Otros factores que afectan la tolerancia al estrés por calor en *S. cerevisiae*

Los cultivos de levadura que crecen en un medio líquido con glucosa como fuente de carbono, atraviesan varias fases de crecimiento: una fase de crecimiento exponencial, sostenida por un metabolismo de tipo fermentativo, una fase diáuxica, en la cual el metabolismo fermentativo se sustituye por uno de tipo respiratorio, posteriormente por la fase postdiáuxica en la cual la tasa de crecimiento va disminuyendo y se mantiene el metabolismo respiratorio y finalmente por una fase estacionaria en la cual las células dejan de replicarse y sufren cambios en su estado de diferenciación celular (Lillie y Pringle, 1980). En la fase de crecimiento exponencial las células son más sensibles al calor extremo (Schenberg-Frascino y Moustacchi 1972; Parry *et al.*, 1976) y son más resistentes a una temperatura letal cuando sufren una limitación de nutrientes (Paris y Pringle, 1983; Plesset *et al.*, 1987) por ejemplo, cuando se encuentran en la fase estacionaria (Werner-Washburne *et al.*, 1996).

Tanto la termotolerancia inducida como la termotolerancia intrínseca (típica de las células en la fase de crecimiento estacionario), se han correlacionado con la permanencia en la fase G_0 del

ciclo celular (Paris y Pringle, 1983; Plesset *et al.*, 1987), y también con la disminución en el nivel del AMPc y consecuentemente con la reducción en la actividad de la Pka (Shin, *et al.*, 1987).

No obstante, algunos autores han determinado, mediante el uso de inhibidores, que el arresto del ciclo celular mitótico no está relacionado estrictamente con la termotolerancia intrínseca (Barnes *et al.*, 1990). Las células detenidas en las diferentes fases del ciclo celular presentan la misma sensibilidad a calor extremo (52°C durante 5 min.). Por otro lado, Elliot y Futcher (1993) demostraron que los cultivos de levadura con tasas de crecimiento lento, causado por desrepresión catabólica, muestran una termotolerancia intrínseca muy elevada. La termotolerancia intrínseca se puede deber a un conjunto diverso de adaptaciones fisiológicas de la célula que no necesariamente son dependientes del ciclo celular.

Por otro lado, la inhibición de la síntesis de proteínas con cicloheximida no elimina la inducción de la termotolerancia (Hall, 1983; Widelitz *et al.*, 1986). Esto sugiere que la inducción de la termotolerancia resulta de la modificación post-traducciona l de algunos elementos pre-existent s que son activados durante la exposición al calor subletal.

De lo anterior se deduce que, la respuesta al estrés por calor es multigénica y compleja. Los mecanismos para percibir y transducir la señal de un cambio en la temperatura, están relacionados con la modificación de algunas proteínas celulares, con la inducción de la expresión de algunos genes y con la acumulación de osmolitos compatibles como la trehalosa.

2. La regulación de la expresión de los genes de estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a nivel transcripcional

En la levadura *S. cerevisiae* se han reportado tres elementos en los promotores de los genes que son activados en respuesta a diferentes condiciones de estrés, los cuales son necesarios para la transcripción: el *HSE* (*heat shock element*), el *STRE* (*stress response element*) y el *ARE* (*AP-1 responsive element*).

2.1 Los genes inducibles por calor

La inducibilidad por calor de los genes *HSP* se atribuye a la secuencia regulatoria UAS_{HSE} localizada en su región promotora (Slater y Craig, 1987), la cual es reconocida por el factor de transcripción Hsf1 (Sorger y Pelham, 1987; Wiederrech *et al.*, 1987; Sorger y Nelson, 1989).

En la levadura el gen que codifica para el Hsf1 (*HSF1*) es esencial para el crecimiento celular. La obliteración de este gen es letal para la célula ya que este factor es responsable del

nivel de transcripción basal de algunas Hsp en condiciones de crecimiento óptimo (Sorger *et al.*, 1987; Wiederrecht *et al.*, 1987). Por el contrario, las mutantes con una elevada actividad transcripcional de Hsf1 tienen una termotolerancia basal elevada de manera permanente (Sewell *et al.*, 1995).

En ausencia de estrés, durante el crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* y *S. pombe*, el Hsf1 se encuentra inactivo aunque está unido de manera constitutiva a la secuencia *HSE*. La activación de la transcripción, es debida a la conversión de la forma monomérica inactiva del Hsf1 (unida al ADN) a la forma trimérica transcripcionalmente activa, que tiene una mayor afinidad por la secuencia *HSE* (Mager y De Krujiff, 1995; Wu y Moye-Rowley, 1994; Jakobsen y Pelham, 1988).

Nieto-Sotelo y cols. (1990) determinaron que el factor Hsf1 contiene un dominio de activación de la transcripción a cada lado del dominio de unión al ADN, que a su vez forma parte de un represor de la transcripción. Uno de los dominios de activación es requerido para el crecimiento en calor moderado y el otro para el crecimiento a temperaturas óptimas (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990). Se han propuesto dos posibles mecanismos reguladores de la actividad del Hsf1 en respuesta al estrés por calor: la regulación negativa de la actividad de Hsf1 por interacción directa con la proteína Hsp70 y la fosforilación del Hsf1 después de una exposición a temperaturas elevadas (Nieto-Sotelo *et al.*, 1990; Sorger, 1990).

Marchler y cols. (1993) analizaron la inducción con calor de la construcción *HSE* fusionada al gen reportero *lacZ* y observaron que la actividad de la Pka no afecta los niveles de expresión de este vector de manera significativa. Entonces, la vía de la Pka no parece estar involucrada en la respuesta al estrés por el elemento *HSE*.

Aunque algunos genes *HSP* en la levadura se transcriben por calor y otros tipos de estrés, parece que esta respuesta no está exclusivamente regulada por el *HSE* (Varela *et al.*, 1995; Seymour y Piper, 1999; Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schüller *et al.*, 1994). Esto sugiere la existencia de otros elementos capaces de regular esta respuesta.

2.2 Los genes de estrés por calor también son regulados por los elementos de respuesta al estrés (STRE)

La caracterización de una secuencia capaz de inducir la expresión de un gen reportero ante condiciones diversas de estrés, sugirió la existencia de un posible elemento integrador de la respuesta al estrés en *S. cerevisiae* (Ruis y Schüller, 1995). Además, la inducción de genes debida a diferentes tipos de estrés a través de este elemento sugiere que posiblemente estos genes

realizan funciones protectoras más generales (Winderickx *et al.*, 1996). Este elemento, definido por las secuencias C₄T ó AG₄ no es regulado por el factor Hsf1 y se le denominó elemento de respuesta al estrés ó *STRE* (*Stress Response Element*) (Wieser *et al.*, 1991; Kobayashi y McEntee, 1993). Una sola copia de la secuencia *STRE* es capaz de incrementar ligeramente la actividad de un gen reportero después de un choque por calor; dos o más copias producen un efecto aditivo sobre la expresión génica inducida por estrés (Kobayashi y McEntee, 1993).

Aunque Msn2 y Msn4 son dos activadores transcripcionales que se unen específicamente a los elementos *STRE* e incrementan el nivel de expresión de los genes que contienen esta secuencia (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Ruis y Schüller, 1995), en respuesta a estrés osmótico, la activación de los genes *GPD1*, *GPP2*, *CTT1* y *HSP12* se debe a la actividad de los factores Hot1 y Msn1. Esta activación es independiente de Msn2 y Msn4 (Rep *et al.*, 1999).

La regulación de la respuesta al estrés a través de Msn2 y Msn4 está determinada por la localización subcelular de estas proteínas y la actividad de la vía de la Pka. Las cepas mutantes *ras2* (con una baja actividad de la Pka) muestran un elevado nivel, tanto en la transcripción basal como la inducida de los genes dependientes de la vía *STRE*. Por el contrario, en las mutantes *bcy1* (con una alta actividad de la Pka) estos niveles son severamente reducidos. La inducción de la transcripción durante el estrés involucra la translocación nuclear, rápida y reversible de los factores Msn2 y Msn4, la cual es independiente de la síntesis de proteínas (Görner *et al.*, 1998).

En la región promotora del gen *SSA3* se identificó un elemento similar en secuencia al regulador *STRE*, capaz de competir con la secuencia *STRE* en geles de retardamiento, que se denominó *PDS* (*Post Diauxic Shift*) (Marchler *et al.*, 1993; Boorstein y Craig, 1990). El elemento *PDS* se activa durante la fase de crecimiento diáuxico y estacionario y es regulado negativamente por la Pka, produce un incremento marginal en la respuesta al calor (Boorstein y Craig, 1990) pero a diferencia de *STRE*, no se induce por estrés osmótico (Winderickx *et al.*, 1996) y no es afectado por las mutaciones en los factores de transcripción Msn2 y Msn4 (Martínez-Pastor *et al.*, 1996).

Entre los genes descritos en *S. cerevisiae* que presentan un patrón de respuesta multiestrés se encuentra el gen de respuesta al daño en el ADN, *DDR2* (Kobayashi y McEntee, 1993) y el gen que codifica para la catalasa citosólica *CTT1* (Wieser *et al.*, 1991; Marchler *et al.*, 1993). Lo mismo ocurre con los genes *GSY2* y *TPS2*, que codifican para la glucógeno sintasa y la trehalosa fosfato fosfatasa respectivamente, así como con los genes *HSP12* y *HSP104* (Gounalaki y Thireos, 1994).

2.3 La regulación transcripcional a través de los elementos Yap1

En *S. cerevisiae*, el factor transcripcional Yap1 presenta una similitud a nivel de secuencia con la familia c-Jun de los mamíferos y contiene un dominio de unión al ADN llamado bZip (Moye-Rowley *et al.*, 1989). El gen que codifica para Yap1 parece tener una función importante en la protección al estrés oxidativo y a la tolerancia a los metales pesados. En condiciones fisiológicas, la actividad de Yap1 se induce por el peróxido de hidrógeno, mientras que en una condición sin inducción la transcripción no se detecta (Fernandes *et al.*, 1997).

La actividad de Yap1 está regulada por su localización intracelular. Bajo condiciones normales, la proteína se mantiene en el citoplasma y, en respuesta al estrés oxidativo, es translocada al núcleo (Kuge *et al.*, 1997). Tres residuos de cisteína en la región carboxilo terminal de Yap1 son necesarios para mantener la proteína en el citoplasma.

Fernández y cols. (1997) demostraron que la transcripción de un gen reportero dependiente de Yap1 está regulada por la vía de Ras/AMPC. Una actividad alta de la Pka en las cepas *bcy1* inhibe la función y reduce los niveles de la proteína Yap1. Curiosamente la Pka y la Yap1 inhiben la transcripción que se induce por el estrés a través del elemento *STRE*, aunque Yap1 no se une al elemento *STRE* (Gounalaki y Thireos, 1994).

Algunos genes que son regulados por Yap1 en la respuesta oxidativa son: *GSH1* (glutamil-cisteína sintetasa), *TRX2* (thioredoxina), *YCF1* (transportador con un sitio de unión para ATP) y *GLR1* (glutatión reductasa) (Wu y Moye-Rowley, 1994; Kuge y Jones, 1994; Wemmie *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1996). La obliteración de *YAP1* ocasiona una hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno (Schnell y Entian, 1991), a la cicloheximida (Hertle *et al.*, 1991) y al cadmio (Hirata *et al.*, 1994). En cambio *YCF1* parece ser importante sólo para la tolerancia al cadmio ya que, una vez delecto de la célula, aumenta la hipersensibilidad debida a la exposición a este metal (Wemmie *et al.*, 1994).

3. La vía de transducción de señales Ras/AMPC

La cinasa de proteínas tipo A, dependiente de AMPC (Pka), está compuesta por dos subunidades regulatorias, codificadas por *BCY1* y dos subunidades catalíticas, codificada por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. La activación de la Pka ocurre por la unión del AMPC a la subunidad regulatoria Bcy1 permitiendo la liberación de la Tpk (Toda *et al.*, 1987) (**Figura 1**).

Los niveles de AMPc son regulados por dos procesos opuestos: la síntesis dependiente de la actividad de la adenilato ciclasa, codificada por el gen *CYR1/CDC35* (Matsumoto *et al.*, 1982) y la hidrólisis, regulada por la fosfodiesterasa de AMPc. *Cyr1* a su vez está regulada por la *Ras1p* y la *Ras2p* (proteínas G-monoméricas). *Ras* es regulada por la actividad intercambiadora GDP/GTP de *Cdc25* (Jones *et al.*, 1991) y las proteínas *Ira1* e *Ira2* que estimulan la actividad de GTPasa intrínseca de *Ras*, convirtiendo la forma activa *Ras-GTP* a la forma inactiva *Ras-GDP*. En la forma *Ras-GDP* se reduce la actividad de *Cyr1* y en consecuencia los niveles intracelulares de AMPc, lo inverso ocurre cuando se activan las proteínas *Ras* (Tanaka *et al.*, 1990).

Se ha propuesto que el mecanismo que inicia la señal e induce el incremento de los niveles de AMPc durante el crecimiento en glucosa puede ser activado por la despolarización de la membrana y/o la acidificación intracelular (Thevelein, 1991). Además, varias evidencias sugieren que la *Pka* está involucrada en la respuesta al estrés por calor.

En condiciones de limitación de nutrientes se disminuyen los niveles intracelulares de AMPc y en consecuencia se inactiva la *Pka*. Esto resulta en la adquisición de la termotolerancia y la resistencia a otros tipos de estrés, la acumulación del glucógeno y de la trehalosa, el arresto transitorio en la fase G_0 del ciclo celular y la inducción de los genes como *UBI4* y *SSA3* (Shin, *et al.*, 1987; Werner-Washburne *et al.*, 1996). En las cepas que contienen mutaciones en la vía *Ras/AMPc* de *S. cerevisiae*, la actividad de la *Pka* guarda una relación inversa con la expresión de las *Hsp*, con el nivel de la termotolerancia y con la síntesis de la trehalosa aún en ausencia de estrés. Por ejemplo, una actividad alta de la *Pka* reduce la termotolerancia, la síntesis de la trehalosa y la expresión de las *Hsp*, aún en condiciones que inducen la termotolerancia (Hottiger *et al.*, 1989; Shin *et al.*, 1987).

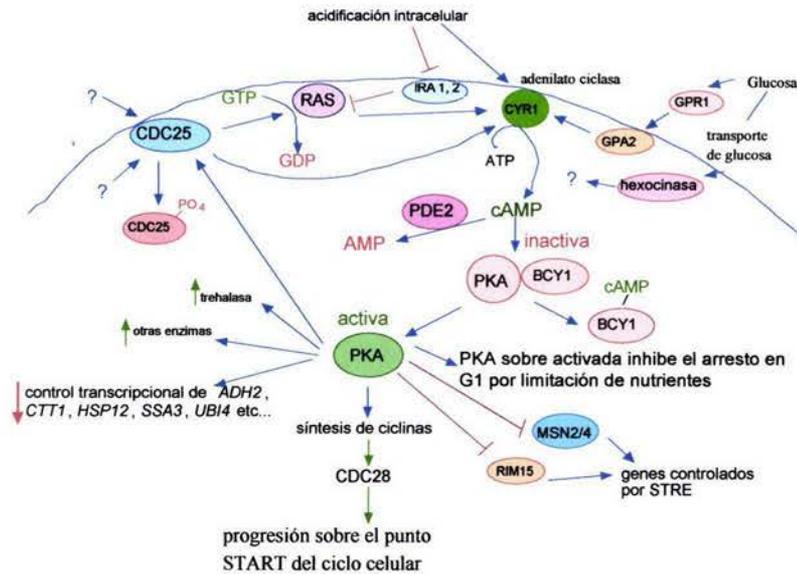


Figura 1. Vía de transducción de señales de la proteína cinasa dependiente de AMPc.

Las mutantes termosensibles *cdc25*, *cdc33* (factor iniciador de la traducción, eIF-4E) y *cdc35* se detienen en la fase G₁ del ciclo celular por una exposición prolongada a 37°C y presentan un alto nivel de tolerancia a temperaturas extremas (Plesset *et al.*, 1987). Mientras que mutantes *bcy1* expuestas a una temperatura supraóptima subletal son incapaces de adquirir termotolerancia, no obstante que expresan algunas Hsp: Hsp72a, Hsp72b y Hsp41 (Shin *et al.*, 1987). En contraste, mutantes *hsr1* (*cyr1*) presentan termotolerancia constitutiva (Iida y Yahara, 1984; Shin *et al.*, 1987).

3.1 El gen *CDC25*

La proteína intercambiadora de GDP/GTP, Cdc25, actúa sobre la proteína Ras y es requerida para su estimulación y para su actividad basal (Broek *et al.*, 1987; Robinson *et al.*, 1987). La porción carboxilo terminal de Cdc25 contiene la actividad catalítica (Lai *et al.*, 1993; Van Aelst *et al.*, 1990), y muestra un grado de identidad con el dominio catalítico de los factores intercambiadores de guanina de Ras (Ras-GEFs) de todos los organismos (Quilliam *et al.*, 1995). La porción N-terminal de Cdc25 contiene un dominio tipo SH3 mediante el cual se pega a la adenilato ciclasa, lo cual pareciera aumentar su respuesta a la activación por Ras (Mintzer y Field, 1999).

En *S. cerevisiae*, *CDC25* se requiere para el funcionamiento de *RAS*, sin embargo todavía se desconoce la señal que activa a Cdc25. Si a un cultivo de células de levadura ayunadas se les

adiciona glucosa u otro azúcar fermentable, o si se induce la acidificación intracelular, se incrementa la actividad de la adenilato ciclasa y se observa un aumento rápido y transitorio en los niveles de AMPc (Broach 1991; Thevelein, de Winde, 1999). Los primeros estudios sugerían que tanto Cdc25 como Ras se requieren para estimular la síntesis del AMPc que se observa poco después de agregar glucosa al medio de cultivo o en respuesta a la acidificación intracelular (Thevelein, 1991). Sin embargo, experimentos más recientes han demostrado que Ras no se activa al adicionar glucosa (GTP-Ras), pero sí en respuesta a la acidificación intracelular (Colombo *et al.*, 1998). La activación de Ras en respuesta a la acidificación intracelular no depende de la activación de Cdc25 (Goldberg *et al.*, 1994; Colombo *et al.*, 1998). El aumento en los niveles del complejo GTP-Ras en respuesta a la acidificación intracelular se debe a la inhibición de la actividad de las proteínas Ira1 e Ira2 (Colombo *et al.*, 1998). No obstante, es claro que la actividad de Cdc25 es importante para el mantenimiento de la actividad basal de la adenilato ciclasa. La estimulación de la adenilato ciclasa en respuesta a la adición de glucosa a las células ayunadas depende de la actividad de un sistema de proteína G acoplada a un receptor (sistema GPCR, *G-protein-coupled-receptor*), el cual consiste del receptor Gpr1 y de su proteína G α asociada Gpa2 (Colombo *et al.*, 1998; Thevelein and de Winde, 1999).

Las funciones fisiológicas de Cdc25 se han inferido a partir del análisis de distintos mutantes. A 25°C, las mutantes sensibles a temperatura (*cdc25^{ts}*) tienen una tasa de crecimiento normal, la actividad de la adenilato ciclasa en sus membranas es baja, el contenido de glucógeno durante la fase de crecimiento logarítmico es elevado, no muestran el incremento de los niveles de AMPc en respuesta a la adición de glucosa cuando se les ayuna de ella, muestran una baja esporulación y en fuentes de carbono como glicerol, etanol o acetato crecen lentamente o no crecen del todo (Munder *et al.*, 1988; Petitjean *et al.*, 1990; Van Aelst *et al.*, 1990). Cuando las mutantes *cdc25^{ts}* se cultivan de manera continua a 36°C, se detienen en la fase G₁ y, en contraste con las células silvestres, permanecen termotolerantes (Hartwell 1974; Plesset *et al.*, 1987). Una mutante que produce Cdc25 carente de los 532 aminoácidos de la región amino terminal crece normalmente en glucosa, pero no en acetato y su esporulación es deficiente. Así mismo, la obliteración de los 38 amino ácidos carboxilo terminales de Cdc25 demostró que son necesarios para la esporulación, pero no para el crecimiento en glucosa o en acetato (Munder *et al.*, 1988).

La activación permanente de la enzima adenilato ciclasa a través del alelo *RAS2^{Val19}* suprime el fenotipo producido por la deficiencia de Cdc25 (DeFeo-Jones *et al.*, 1985) y también es eliminada por *RAS2^{Ile152}* (Camonis y Jacquet, 1988) que tiene una afinidad por GDP reducida e intercambia GDP por GTP a una tasa mayor que el producto silvestre (Créchet *et al.*, 1990).

ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio nos ha interesado elucidar el mecanismo que permite el desarrollo de la termotolerancia intrínseca durante la fase del crecimiento logarítmico de *S. cerevisiae* por medio del análisis genético-molecular. Para este propósito se mutagenizó la cepa silvestre W303a con etil metano sulfonato (EMS). Después de cinco ciclos de exposición a 50°C durante 20 minutos, se aislaron 13 cepas mutantes (ScIBT) que presentaron una termotolerancia intrínseca alta. Las cepas ScIBT forman colonias de diferente tamaño: muy chicas, chicas, casi silvestres y silvestres. Se observó que las mutantes que forman colonias chicas revierten con una frecuencia muy elevada a tamaños mayores, e incluso al tamaño de la silvestre, perdiendo en la mayoría de los casos su nivel de termotolerancia. En casos, la reversión del tamaño de la colonia redujo sólo parcialmente el nivel de termotolerancia (Casas, 1998; Corkidi *et al.*, 1998). Esto permitió aislar tres cepas que revirtieron el tamaño de la colonia de muy chico a chico o de chico a grande, pero que permanecieron termotolerantes. En total se obtuvieron 16 mutantes termotolerantes constitutivas [ScIBT1 a ScIBT16] (Casas, 1998). Las reversiones del tamaño de la colonia dieron lugar a ScIBT4 a partir de ScIBT1, a ScIBT10 a partir de ScIBT2 y a ScIBT11 a partir de ScIBT13. Se observó que el tamaño de la colonia de las mutantes cosegrega con el nivel de termotolerancia, indicando que la misma mutación controla ambos fenotipos. Estas mutantes presentan diferentes grados de termotolerancia constitutiva, que varía de 10 a varios miles de veces en comparación con la cepa silvestre. Las mutantes con los mayores niveles de termotolerancia constitutiva muestran un tamaño de colonia chico. Se observó una correlación positiva entre el tiempo de duplicación en medio líquido y el nivel de termotolerancia. Es decir, las mutantes más termotolerantes presentan mayores tiempos de duplicación. Varias de las mutantes no crecen a 40°C (Folch y Ochoa, datos no publicados). El análisis genético de las mutantes demostró que 14 de las mutaciones son recesivas y sólo dos son codominantes. Se definieron 6 grupos de complementación (Casas, 1998), que se denominaron *hsr* (*heat-shock-response*), de los cuales solamente *hsr4* es codominante. Se denominó *sgr* (*suppressor of growth rate*) al alelo presente en las mutantes originadas a partir de eventos de reversión del tamaño de la colonia. El análisis de alelismo de estas mutantes demostró que ScIBT5 es alélica a la mutante *hsr1* (*cyr1*), que también presenta una termotolerancia constitutiva alta (Iida y Yahara, 1984). Algunas de las mutantes no crecen en glicerol ni en acetato (fuentes no fermentables de carbono). Este fenotipo cosegrega con una termotolerancia intrínseca alta y el tamaño chico de la colonia. El

análisis de termotolerancia por el método de goteo de diluciones en caja sugirió que las mutaciones podían ser nucleares y monogénicas

Para comprender cuáles son los mecanismos que confieren la termotolerancia intrínseca en las diferentes mutantes, es necesaria la caracterización fisiológica, genética y molecular de estas cepas.

OBJETIVO

El objetivo principal de este proyecto de investigación comprendió el análisis fisiológico, genético y molecular de los mecanismos que regulan a la termotolerancia intrínseca en las mutantes *hsr* de *S. cerevisiae*.

Objetivos particulares

1. La clonación molecular de los genes responsables del fenotipo de alta termotolerancia intrínseca en las mutantes *hsr*, mediante complementación con un banco genómico silvestre.
2. La elucidación del papel de la proteína Hsp104 en el nivel de termotolerancia intrínseca a lo largo de la curva de crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes dobles $\Delta hsp104::LEU2 hsr4-1$, $\Delta hsp104::LEU2 hsr2-1$, $\Delta hsp104::LEU2 hsr3-1$ y $\Delta hsp104::LEU2 hsr2-3$.
3. La estimación de la expresión del gen reportero *lacZ* regulada por elementos de respuesta al estrés en las cepas silvestre y en las mutantes en condiciones de estrés. Esto nos permitirá determinar si la actividad de los factores de transcripción que actúan en *trans* sobre este tipo de elementos se encuentra alterada con respecto a la cepa silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa silvestre W303a-LEU+ de *S. cerevisiae* fue obsequiada por la Dra. Susan Lindquist. Otras cepas de levadura y los plásmidos utilizados se presentan en la Tabla A (Anexo 1).

MEDIOS DE CULTIVO

YPDA: Extracto de levadura al 1%, bacto-peptona al 2%, dextrosa al 2% y 40 mg/l de sulfato de adenina.

Medio mínimo: Base nitrogenada para levadura al 0.67% sin aminoácidos, dextrosa al 2% más los requerimientos de aminoácidos de acuerdo a las auxotrofías de las cepas.*

Medio para inducir la preesporulación: Extracto de levadura al 0.8%, bacto-peptona al 0.3%, dextrosa al 10% y agar bacteriológico al 2%.

Medio para inducir la esporulación: Acetato de potasio al 1%, dextrosa al 0.05%, extracto de levadura al 0.1%, agar bacteriológico al 2% y los requerimientos nutricionales al 25% de la concentración requerida para el medio mínimo completo.*

Medio LB: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y NaCl al 1%.

Determinación cuantitativa de los niveles de termotolerancia intrínseca de las cepas *hsr*

Se inoculan cultivos líquidos en YPDA a partir de una colonia fresca y se incuban a 25°C durante 24 horas con agitación constante (250 r.p.m.). Con estos precultivos se inoculan 4 mililitros de medio de cultivo fresco a una D.O._{600 nm} de 0.05 y se incuban hasta una D.O._{600 nm} entre 0.4 - 0.5. Para calcular el número de UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro) antes del tratamiento, se inocula por duplicado 50 µl de una dilución 1/1000 en una caja Petri. El cultivo se dispersa con perlas de vidrio estériles y las cajas se incuban a 25°C hasta la aparición de las colonias. El resto del cultivo se expone a 50°C por 20 minutos y después se mantienen 5 minutos en hielo. Dependiendo del nivel de termotolerancia se inoculan en cada caja de Petri, 50 µl de las diluciones adecuadas y se incuban a 25°C. El porcentaje de sobrevivencia se calcula

-
- Requerimientos de auxotrofia: Sulfato de adenina 40 mg/l, L-histidina-HCl 20 mg/l, L-triptofano 20 mg/l, L-leucina 30 mg/l y Uracilo 20 mg/l.

Notas: Para los medios de cultivo sólidos, se adicionó agar bacteriológico Difco ó Fluka al 2%. La esterilización de los medios de cultivo se realizó a 110°C durante 20 minutos.

multiplicando las UFC/ml presentes después del tratamiento por cien y dividiendo entre el número de UFC/ml a 25°C. Las UFC/ml se calculan a partir de las cajas que contienen entre 30 y 300 colonias. (Nicolet y Craig, 1991). El conteo de las colonias se hizo utilizando el sistema COVASIAM (Corkidi *et al.*, 1998).

Aislamiento de las cepas que revirtieron el tamaño de la colonia de chico a grande

Se incuban a 25°C hasta saturación, cultivos líquidos en 4 ml de YPDA a partir de colonias pequeñas aisladas de las cepas de interés. Se hacen diluciones 1/10,000 ó 1/100,000 y se siembra 50 µl del cultivo en YPDA. Como control de tamaño se siembran en medio sólido, diluciones similares de un cultivo de la cepa silvestre. Las cajas se incuban a 25°C hasta la aparición de las colonias y se escoge una colonia grande. Posteriormente se corrobora el tamaño de la misma por comparación con la mutante original y la silvestre creciéndolas como colonias aisladas en YPDA sólido.

Determinación del porcentaje de reversión del tamaño de la colonia

Los cultivos se inician a partir de una colonia chica, aislada y fresca y se incuban en YPDA líquido hasta una D.O._{600 nm} de 0.4. Se siembran en YPDA por duplicado 50 µl de diferentes diluciones (1/10, 1/100, 1/1000) de las cepas mutante y silvestre (control para tamaño de colonia). Las cajas se incuban a 25°C hasta la aparición de las colonias. Para el conteo de las colonias que revirtieron el tamaño de la colonia, se eligen las cajas que presentan densidades poblacionales moderadas (que nos permita observar su tamaño). El porcentaje de reversión se obtiene al multiplicar por cien el número de UFC/ml que revirtieron y dividiendo entre el número de UFC/ml totales.

Cinéticas de crecimiento continuo a temperaturas supraóptimas

Se preparan precultivos líquidos a 25°C, a partir de una colonia chica y fresca. A partir de estos se inoculan 50 ml de medio mínimo-glucosa más aminoácidos a una D.O._{600nm} de 0.05 y se mantienen en agitación a 38 ó 40°C. Durante el tratamiento, se determina la absorbancia de cada uno de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm. La viabilidad de los cultivos se cuantifica por el método de siembra en caja en YPDA, a partir de alícuotas de diluciones de las muestras antes del tratamiento y después de ser sometidas a calor subletal durante 12, 24, 36 y 48 horas.

Transformación de la levadura *S. cerevisiae* por el método del acetato de litio

A partir de cultivos preparados con colonias chicas, aisladas y frescas, se inoculan 50 ml de YPDA, a una D.O._{600nm} de 0.05 y se dejan crecer a 25°C hasta una D.O._{600nm} de 0.8 con agitación constante. El cultivo se centrifuga a 2,000 r.p.m. en tubos falcon y se decanta el sobrenadante. La pastilla se lava dos veces con 25 ml de solución TELiOAc 1X preparada a partir de TE 10X (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.01 M a pH 7.5) y LiOAc 10X (LiOAc 1 M a pH 7.5 ajustado con ácido acético) y se centrifuga a 2,000 r.p.m. Las células se resuspenden en el líquido residual y se agregan 25 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) en TE pH 7.5, 2.5-10 µg de ADN plásmido o banco genómico, 5 ml de PEG 4,000 al 50% en TELiOAc 1X filtrado y almacenado a 4°C. Se mezcla y se mantiene durante 30 minutos a 25°C. Se incuba a 40°C por 20 minutos*, se centrifuga a 2,000 r.p.m., se lava dos veces y se resuspenden en medio mínimo sin aminoácidos. Se siembran alícuotas de la mezcla de transformación en el medio de selección para las transformantes y se incuba a 25°C hasta la aparición de colonias [Modificado de Schiestl y Gietz, (1989) y de Gietz y cols., (1992)]. Una modificación de este protocolo consistió en incubar durante 48 hrs a 40°C a las células transformadas previo a su siembra en medio de selección en medio sólido.

Transformación de la levadura por el método de la electroporación

Se inician cultivos a partir de una colonia fresca a 25°C en YPDA hasta una densidad de 2×10^7 cel/ml. Se centrifuga 5 minutos a 4°C. La pastilla se resuspende en DTT (Dithiothreitol) ($\approx 2 \times 10^9$ cel/ml) y se incuba 10 minutos a 30°C. Las células se lavan dos veces con EB (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, sacarosa 270 mM y MgCl₂ 1 mM) y se resuspenden en 50 µl de EB a una concentración de 2×10^9 cel/ml con 2 µl de ADN (10 - 100 µg). Se incuban 5 minutos en hielo en una cubeta de electroporación estéril (0.2 cm) y se aplica un pulso eléctrico de 0.54 kV y 25 µF. Se añade 1 ml de medio de cultivo fresco precalentado a 30°C y se incuban 1 hora. Las células se resuspenden en medio fresco y se siembran en el medio de selección. Las cajas se incuban a 25°C hasta la aparición de las colonias. (BIO-RAD, Gene Pulser Electroprotocol; Meilhoc et al., 1990)

* En un ensayo alternativo, antes de exponer a 40°C se adicionó al cultivo 400 µl de DMSO.

Determinación de las eficiencias de transformación y complementación

La **eficiencia de transformación** se define como el cociente entre el número total de células transformadas y el número de células competentes viables. La **eficiencia de complementación** se define como el cociente entre el número de células complementadas y el número de células transformadas.

Determinación de la actividad específica de la β -galactosidasa

A. Obtención de las muestras

De cepas transformadas con los vectores p β 11 y p18/7. Se inoculan 70 ml de medio mínimo-glucosa a una D.O._{600nm} de 0.05, a partir de precultivos crecidos a 25°C, y se incuban a 25°C con agitación hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.4. De este cultivo se colectan 20 ml, se mantienen 5 minutos en hielo y se centrifugan a 250 rpm por 5 minutos a 4°C (*muestra cero*). Del resto del cultivo, 20 ml se conservan a 25°C por 1.5 hrs (*muestra uno*) y 20 ml se incuban a 39°C durante 1 hora y posteriormente a 25°C por 30 min. (*muestra dos*). Las células son colectadas por centrifugación a 2,500 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 250 μ l de buffer de lisis (Dithiothreitol 1 mM, Glicerol 20%, Tris-HCl 100 mM, pH 8). Se congelan a -20°C. (Rose y Botstein, 1983)

A partir de cepas transformadas con el vector pLG Δ BS (con y sin UAS). 1) Cinética de crecimiento: se inoculan precultivos de las cepas a estudiar en 70 ml de medio mínimo glucosa más requerimientos de aminoácidos a 0.05 D.O._{600nm} y se dejan crecer varios días a 25°C. Las alícuotas colectadas (15 ml), son enfriadas, centrifugadas, resuspendidas en buffer de lisis y congeladas a -20°C. 2) En cultivos expuestos a H₂O₂ ó CdSO₄: se inoculan 70 ml de medio mínimo glucosa más aminoácidos a 0.05 de D.O._{600nm} y se incuban con agitación a 25°C hasta una D.O._{600nm} de 0.4 Después se exponen los cultivos a CdSO₄ (20 μ M) o a H₂O₂ (1 mM) durante 20 minutos.

B. Realización del ensayo de β -galactosidasa

Las células se descongelan en hielo y se agregan perlas de vidrio (0.45 a 0.5 mm de diámetro) justo debajo del menisco formado por el líquido y 12.5 μ l de PMSF (40 mM en isopropanol al 100%). Las muestras se agitan vigorosamente seis veces, cada vez durante 20 segundos enfriándolas en hielo entre agitaciones. Se adicionan 250 μ l de buffer de lisis y se separa la parte líquida desde el fondo del tubo. El extracto se deposita en tubos eppendorf limpios de 1.5 ml. Por cada condición experimental se utilizan de 20 a 50 μ l del extracto y se ajusta a 1 ml con

buffer Z (Na₂HPO₄·7H₂O 60 mM, NaH₂PO₄·H₂O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, pH 7.0). Las muestras se dejan reposar 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se inicia por la adición de 200 µl de ONPG (ortonitrofenolgalactósido) (4 mg/ml en buffer Z a pH 7.0) a cada tubo y se finaliza agregando 500 µl de Na₂CO₃ 1 M. Se anota el tiempo en que la reacción es iniciada y concluida. Las muestras se centrifugan a 13,000 rpm por 3 minutos para eliminar restos celulares. Se determina la absorbancia a 420 nm y la actividad específica se reporta como ng de ONPG oxidado por minuto por mg de proteína de acuerdo a la siguiente formula:

$$\frac{D.O_{420 \text{ nm}} \times 1.7}{0.0045 \times \text{proteína} \times \text{volumen del extracto} \times \text{tiempo}}$$

En donde:

D.O_{420 nm} es la densidad óptica del producto o-nitrofenol a esta longitud de onda,

1.7 es el factor de corrección del volumen de reacción,

0.0045 es la densidad óptica de 1 nmol/ml de solución o-nitrofenol,

la concentración de proteína se expresa en mg/ml y el tiempo en minutos.

Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford

La curva estándar se prepara a partir de una solución de proteína, BSA 0.1 mg/ml. Se toman las muestras por duplicado de diluciones conteniendo 2, 4, 6, 8 y 10 µg de proteína y se diluyen hasta 800 µl con buffer de lisis (Dithiothreitol 1 mM, Glicerol 20%, Tris-HCl 100 mM, pH 8). El rango lineal del ensayo para BSA está entre 1.2 a 10 µg/ml. Se agrega a cada tubo 200 µl del reactivo concentrado *Bio-Rad*, se agita vigorosamente y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Se determina la absorbancia a 595 nm. Para la cuantificación de proteína en las muestras problema, se emplean alícuotas de entre 5 y 10 µl de cada uno de los extractos hasta 800 µl con buffer de lisis y se determina la absorbancia. (Bio-Rad^{MR} manual *Bio-Rad protein assay*).

RESULTADOS

1. La regulación de la expresión del gen *lacZ* en las mutantes *hsr* debida a los elementos de respuesta al estrés en condiciones de estrés

1.1 Actividad de β -galactosidasa en cepas que tienen una construcción quimérica entre un promotor de genes de *heat shock* y el gen *lacZ* (p β 11-*lacZ*)

Con la finalidad de explorar si las mutantes *hsr* están afectadas en alguna de las vías de respuesta al estrés, se utilizó el plásmido p β 11 (Susek and Lindquist, 1990). Este vector contiene al gen *lacZ* regulado con un promotor quimérico formado por un fragmento de la región promotora del gen *HSP26* seguido del elemento *HSE2* de *SSA1* (Hsp70) y el promotor mínimo del gen *CYC1*. Contiene 4 elementos *HSE* (*heat shock element*) y 3 *STRE* (*stress response element*) en la región correspondiente a *HSP26* además de 1 *HSE* y 1 *PDS* (*post diauxic shift element*) en la región de *SSA1*. Esta construcción es tipo transbordador levadura – *E. coli*, posee un origen de replicación multicopia (2μ) y el plásmido pBR322 para su replicación en *E. coli* (Susek and Lindquist, 1990; Slater and Craig, 1987) (Figura 2).

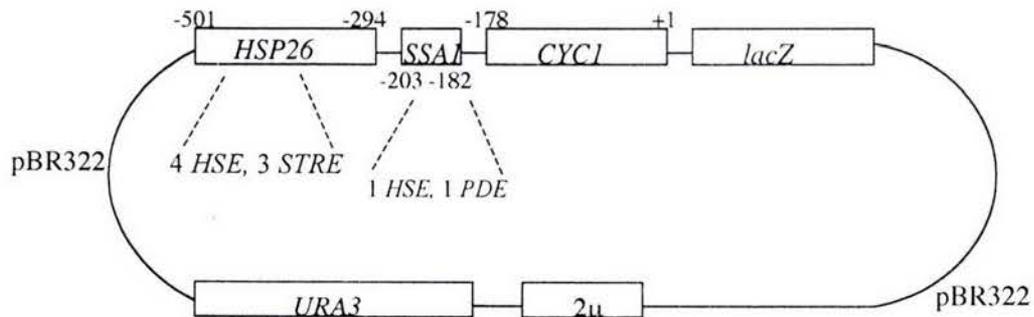


Figura 2. Plásmido p β 11 (Susek and Linquist, 1990). Construido a partir del plásmido pZJHSE2-26R (Slater and Craig, 1987).

Las cepas fueron crecidas a 25°C hasta alcanzar una D.O._{600 nm} de 0.4. Se tomaron dos muestras controles a 25°C: la primera (tiempo cero) al momento de alcanzar la D.O._{600 nm} de 0.4 y la segunda, 90 minutos después (tiempo uno). Los cultivos inducidos con calor permanecieron durante 1 hora a 39°C después de haber alcanzado la D.O._{600 nm} de 0.4 y se recuperaron a 25°C durante otros 30 minutos antes de ser analizados.

Debido a que el análisis de varianza para muestras dependientes, demostró que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la actividad para β -galactosidasa de las cepas

analizadas, entre el “tiempo cero” y el “tiempo uno” a 25°C (Anexo 2), se decidió comparar únicamente la actividad de las cepas después de la inducción y a 25°C (tiempo uno).

A 25°C la cepa W303 presentó una actividad de β -galactosidasa de 127.13 nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína y se indujo aproximadamente doce veces después de la exposición a 39°C (**Figura 3**). En las mutantes *hsr2-1* (JF099), *hsr2-3* (LV0724) y *hsr4-1* (LV0092) la actividad a 25°C es 13.7, 9.7 y 10.6 veces respectivamente mayor que la cepa silvestre aunque sólo se inducen 1.69, 2.25 y 1.5 veces respectivamente después de la exposición a 39°C (**Figura 3**). Por otro lado, las cepas mutantes *hsr1* (*cyr1*), *hsr2-1 sgr1-1* (ScIBT10), *hsr3-1* (JF601) y *hsr6-1* (JF505) a 25°C expresaron una actividad de β -galactosidasa entre dos y tres veces mayor que la silvestre. Después de una exposición a 39°C se indujeron 6.3, 6.4, 7.6 y 7.6 veces respectivamente con relación a sus niveles basales a 25°C (**Figura 3**).

En este trabajo no se incluyó a la cepa progenitora del mutante *hsr1* (HE61-4B) (Iida y Yahara, 1984). Tampoco se incluyó a la cepa ScIBT5 (*hsr1*) debido a que no presenta una segregación 2:2 del fenotipo de termotolerancia y por otro lado, pierde el fenotipo mutante en subsecuentes cruces.

Observamos que todas las mutantes a 25°C presentan diferentes niveles de actividad que son capaces de incrementarse al exponerse al calor. Sin embargo, ya que el plásmido p β 11 lleva una construcción compleja, estos resultados son únicamente preliminares, ya que no nos permiten elucidar cuál o cuáles son los elementos de respuesta al estrés que se encuentran desregulados en nuestras mutantes.

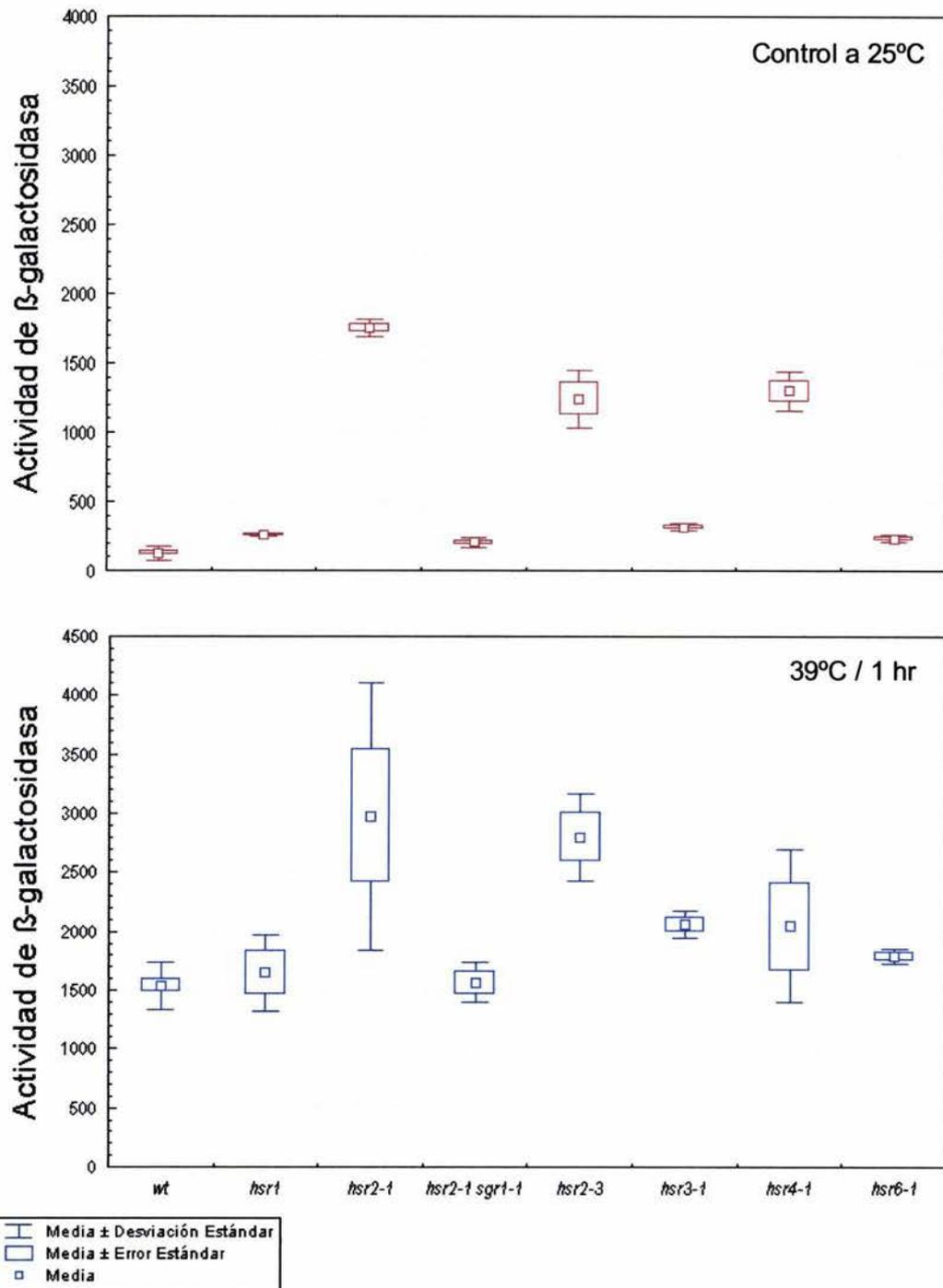


Figura 3. Actividad de β -galactosidasa (en nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) debida al promotor quimérico del vector p β 11 en varios fondos mutantes. Las muestras control (25°C) fueron obtenidas noventa minutos después de alcanzar una D.O._{600 nm} de 0.4. Las muestras a 39°C fueron inducidas a esa temperatura durante 1 hora y posteriormente recuperadas a 25°C durante 30 min. Se grafica el promedio de tres determinaciones independientes.

1.2 Actividad de β -galactosidasa en cepas con una construcción quimérica entre el elemento de respuesta al estrés y el gen *lacZ* (*STRE* - *lacZ*)

A fin de estudiar de manera más precisa la contribución de los distintos elementos de la respuesta al estrés, se determinó la actividad de β -galactosidasa debida a la secuencia *STRE*. Esta construcción, con siete elementos *STRE* en tandem está contenida en un vector integrativo en el gen *URA3* (p18/7) (Marchler *et al.*, 1993).

Para este propósito, se disectaron las tétradas de la cruce de las cepas mutantes *hsr* con la silvestre que contiene la fusión *STRE::lacZ* (proveniente de la transformación de W303 con el vector p18/7) (Folch, datos no publicados). La cepa W303/*STRE* se seleccionó en un ensayo tipo "Southern" que permitió analizar la integración adecuada de la construcción en el ADN genómico. Las cepas conteniendo la construcción se seleccionaron por prototrofia para uracilo y se corroboró su actividad por inducción con NaCl 0.5 M, ya que genes que poseen *STRE* en su región promotora se inducen por estrés osmótico (Winderickx *et al.*, 1996) (Datos no presentados).

La cepa silvestre presentó una actividad basal a 25°C de 43 nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína que aumentó 5 veces al aumentar la temperatura a 39°C (**Figura 4**). A 25°C los mutantes *hsr2-1* (LV0201), *hsr2-1 sgr1-2* (LV0202, una revertante termotolerante espontánea de LV0201), *hsr2-3* (LV0780), *hsr3-1* (LV0620) y *hsr4-1* (LV0143) presentaron actividades 10.7, 9.6, 17.8, 14.5 y 5.9 veces mayores que la cepa silvestre respectivamente.

Como se observa en la **Figura 4**, a 39°C los alelos *hsr2-1* (LV0201), *hsr2-1 sgr1-2* (LV0202), *hsr2-3* (LV0780), *hsr3-1* (LV0620) y *hsr4-1* (LV0143) presentaron actividades varias veces mayor que la cepa silvestre, siendo de 3.4, 2.8, 7.4, 5.5, y 2 respectivamente. No obstante en estos mutantes la inducción por calor a 39°C fue ligera con respecto a la actividad observada a 25°C.

A partir de estos resultados se observa que en estos fondos genéticos mutantes la actividad transcripcional dependiente de los elementos *STRE* se encuentra desregulada en condiciones normales de crecimiento, fenotipo que correlaciona con la alta termotolerancia intrínseca que presentan estas cepas. Por otro lado, a 25°C y a 39°C en los mutantes *hsr1* y *hsr6-1* (LV0506) la actividad transcripcional de esta construcción no parece estar desreprimida y por el contrario parece estar más apagada que en la cepa silvestre (**Figura 4**).

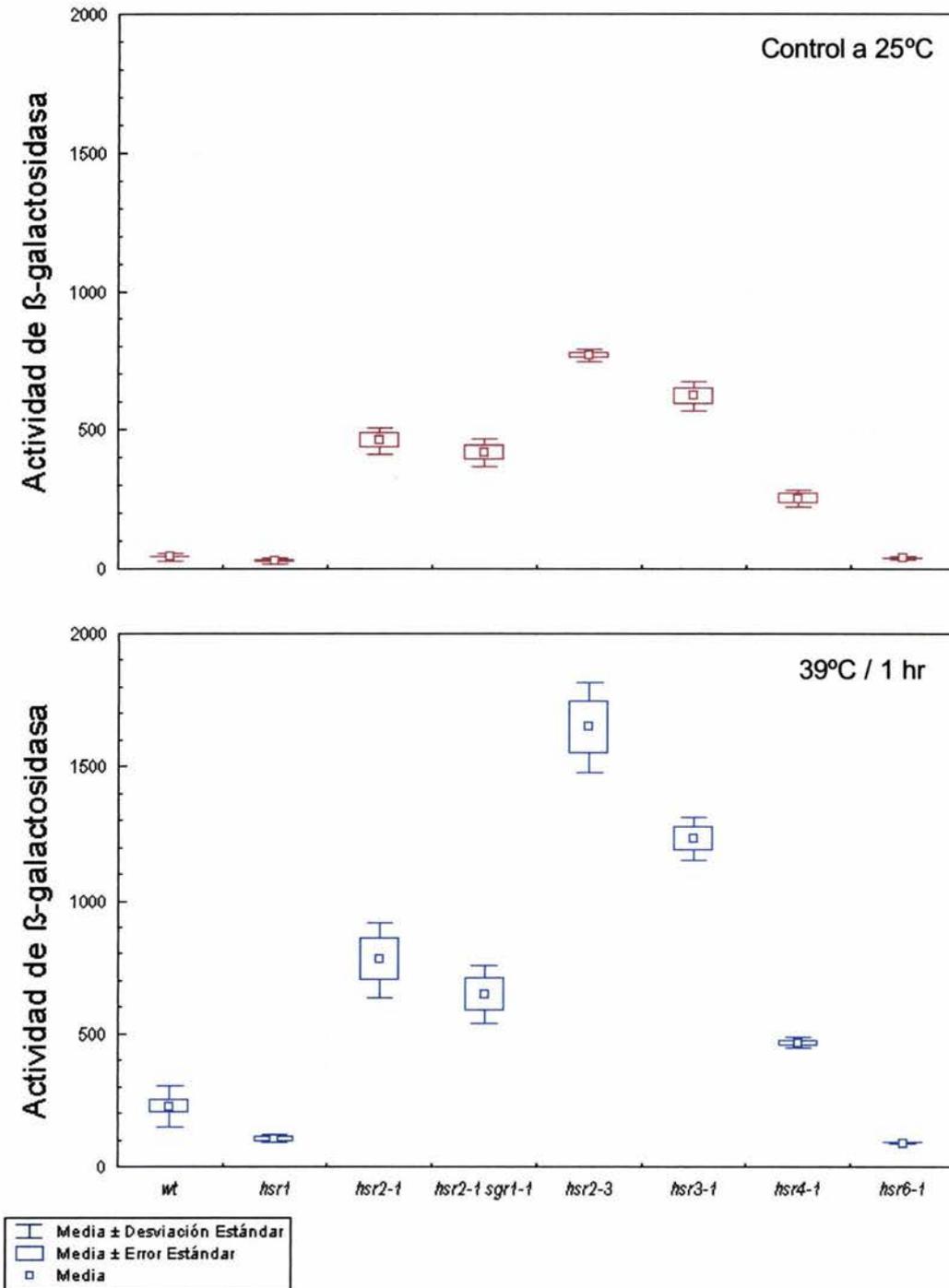


Figura 4. Actividad de β -galactosidasa (en nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) debida a la secuencia *STRE* en varios fondos mutantes. Control a 25°C noventa minutos después de alcanzar una D.O._{600 nm} de 0.4. Inducción a 39°C. Se grafica el promedio de tres determinaciones independientes.

1.3 Actividad de la β -galactosidasa en las cepas que tienen una construcción quimérica entre el elemento que responde a AP-1 y el gen *lacZ* (*ARE* – *lacZ*)

1.3.1 En diferentes estadios de la curva de crecimiento

Se analizó si la actividad de β -galactosidasa determinada por el elemento *ARE* en las mutantes *hsr* está regulada durante las distintas fases del crecimiento. Las cepas transformadas con el plásmido pLG Δ BS, que contiene esta quimera, se incubaron a 25°C con agitación constante por varios días. En este experimento sólo se evaluó la frecuencia de reversión al principio del cultivo. Se observó que la actividad en la cepa silvestre fué aproximadamente de 1.0 nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína, la cual no se incrementó de manera significativa a lo largo de la cinética de crecimiento. Las mutantes *hsr2-1* (JF099), *hsr2-3* (LV0724), *hsr3-1* (JF601), *hsr4-1* (LV0092) y *hsr6-1* (JF505) presentaron una fuerte actividad constitutiva: 64.25, 11.0, 27.1, 29.6 y 10.9 respectivamente, mientras que la *hsr1* (*cyr1*) alcanzó una actividad de 2.8. Esta actividad se conservó de manera relativamente constante a lo largo de toda la curva de crecimiento (**Figura 5**).

1.3.2 En respuesta a la adición de H₂O₂ y de CdSO₄

1.3.2.1 En las cepas mutantes *hsr*

En la **Figura 6** se observa que la cepa silvestre presenta una leve inducción después de una exposición durante 20 minutos a CdSO₄ 20 μ M y a H₂O₂ 1 mM, aproximadamente dos veces con respecto a la condición control. Este comportamiento fue similar al de la mutante *hsr1* (*cyr1*), excepto que en la condición con cadmio se indujo tres veces.

En general todas las mutantes *hsr* presentaron una importante desregulación de la actividad de β -galactosidasa en condiciones control y este efecto fue más dramático en los mutantes *hsr2-1* (JF099) y *hsr4-1* (LV0092). En estos últimos, la actividad debida al elemento *ARE* se encuentra muy elevada en condiciones sin estrés, sugiriendo que, además de la resistencia al calor, los mutantes *hsr* pudieran estar confiriendo niveles de tolerancia a estrés oxidativo y/o a metales pesados. Estos resultados (**Figura 6-A**), coinciden con los datos reportados en la **Figura 5**.

Adicionalmente, se determinó la actividad del gen reportero en una construcción que carece de la secuencia consenso *ARE*. En condiciones sin estrés, ya hay un nivel de expresión de la actividad del gen reportero (este trabajo, datos no presentados). Esto sugiere que posiblemente

exista un nivel de transcripción basal regulada por alguna secuencia diferente del elemento *ARE*. Cabe señalar que se observó que en todas las mutantes estudiadas, a excepción de la cepa *hsr1* (*cyr1*), la actividad de β -galactosidasa regulada por el elemento *ARE* es mayor de una manera estadísticamente significativa a la observada en ausencia de *ARE* (**Figura 6**).

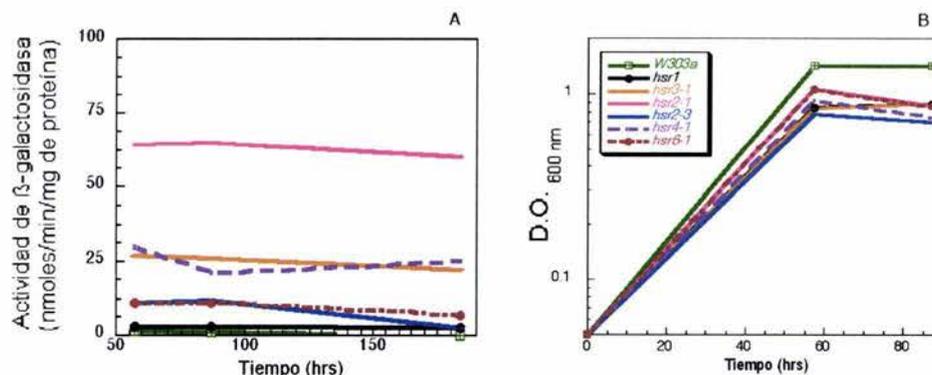


Figura 5. A) Actividad de β -galactosidasa (en nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) y B) cinética de crecimiento (D.O._{600 nm}) en diferentes estadios del crecimiento de las cepas silvestre W303 y mutantes *hsr* reguladas por el elemento ARE.

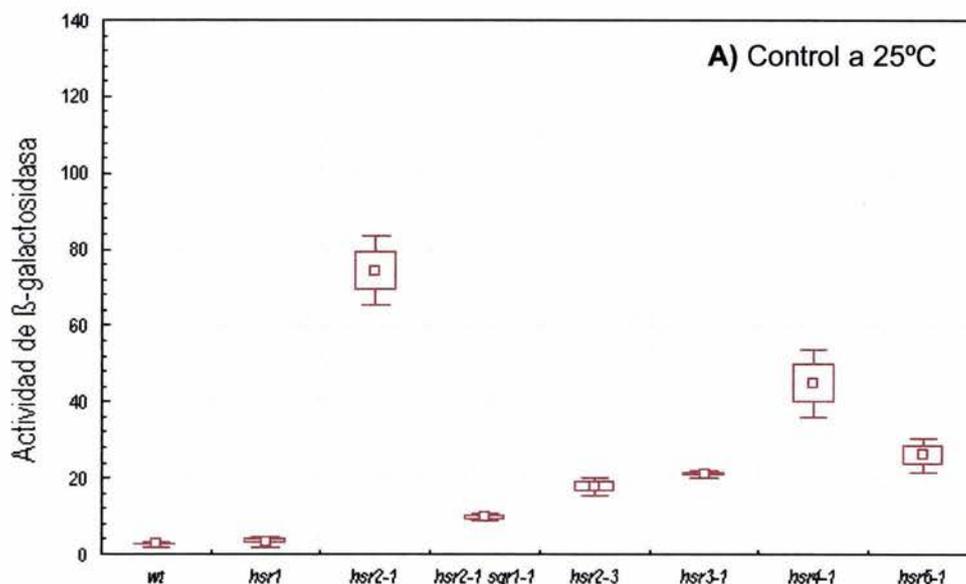


Figura 6. A) Actividad de β -galactosidasa (en nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) debida a la secuencia *ARE* en la cepa silvestre W303-Leu⁺ y en varios fondos mutantes. Control a 25°C sin adición de peróxido o de CdSO₄.

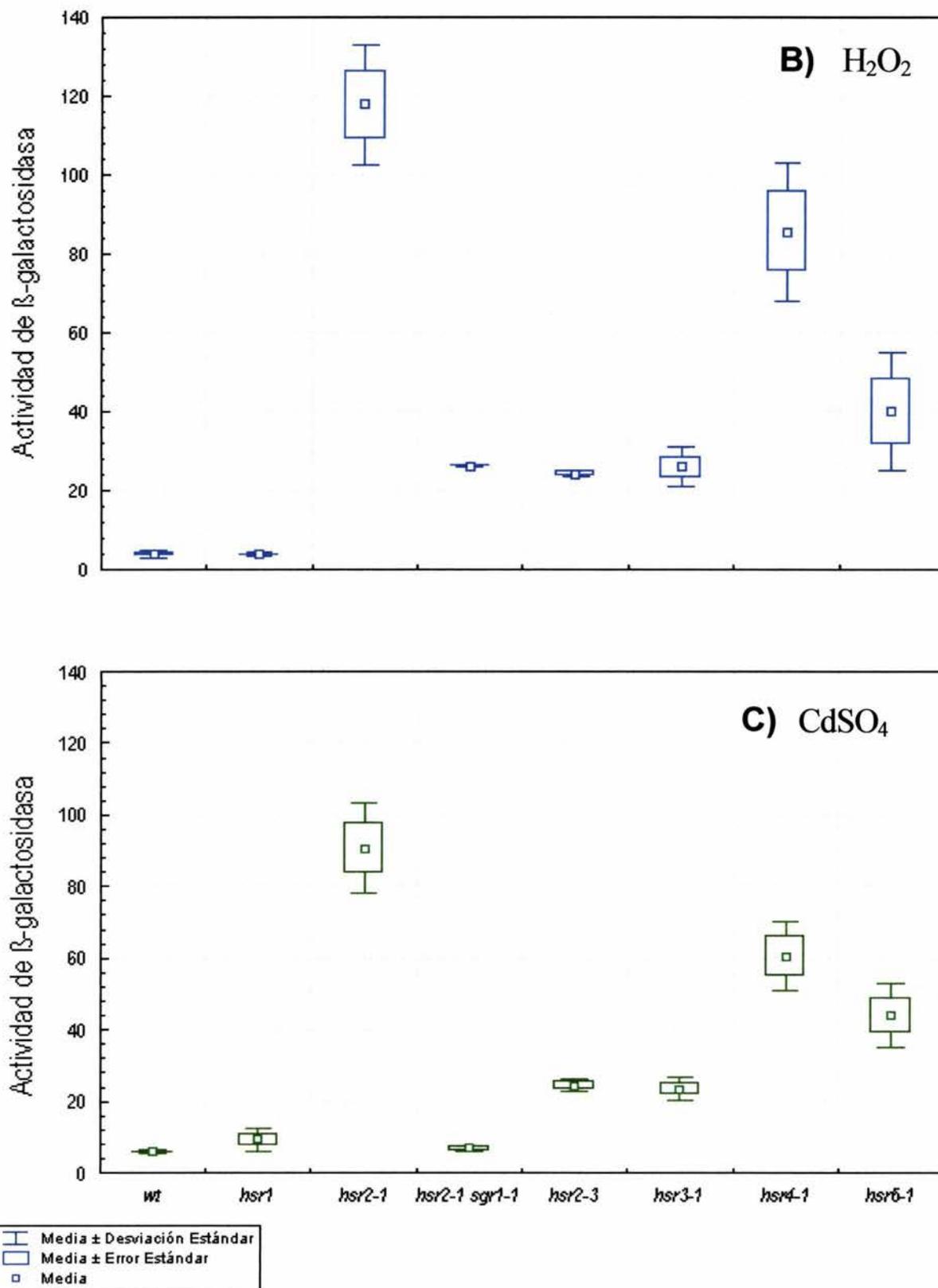


Figura 6 (continuación). Actividad de β -galactosidasa (en nmol de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) en mutantes *hsr* regulados por el elemento *ARE* en condiciones de estrés. **B)** Inducción con H₂O₂ 1 mM durante 20 minutos (panel superior). **C)** Inducción con CdSO₄ 20 μ M durante 20 minutos (panel inferior).

1.3.2.2 En la doble mutante *hsr2-1 Δyap-1*

Con el propósito de estudiar, si la expresión del gen quimérico *ARE-lacZ* es dependiente de *yAP1* o de otros factores de transcripción, se decidió deletar el gen *YAP1* en las cepas mutantes *hsr2-1* (JF099). Para deletar *YAP1* se utilizó la construcción pSM27 que contiene a la secuencia de *YAP1* interrumpida por el gen *HIS3*. Las mutantes fueron seleccionadas por su habilidad para crecer en ausencia de este aminoácido.

Para medir la expresión de β-galactosidasa bajo el control de *ARE*, las cepas mutantes *Δyap1* y *hsr2-1 Δyap1*, habían sido transformadas previamente con el vector integrativo pTEP9 que contiene a la construcción *ARE::lacZ* y cuya recombinación es dirigida al locus *LEU2* (Moye y Zalkin, 1985). A partir de estas cepas se prepararon cultivos para inducir con peróxido de hidrógeno y sulfato de cadmio, como en el experimento anterior.

En la mutante sencilla *Δyap1* no hay inducción de la actividad de β-galactosidasa ni por H_2O_2 ni por $CdSO_4$. Mientras que en la cepa silvestre la adición de $CdSO_4$ indujo al menos dos veces esta actividad (Figura 7).

Por otro lado, en la doble mutante *hsr2-1 Δyap1* se observó una ligera reducción de la actividad de β-galactosidasa por la delección del gen *YAP1* con respecto a la que presenta *hsr2-1* (JF099) en condiciones control (Figura 7). Adicionalmente la actividad del doble mutante *hsr2-1 Δyap1* no se indujo por la adición de H_2O_2 ó $CdSO_4$.

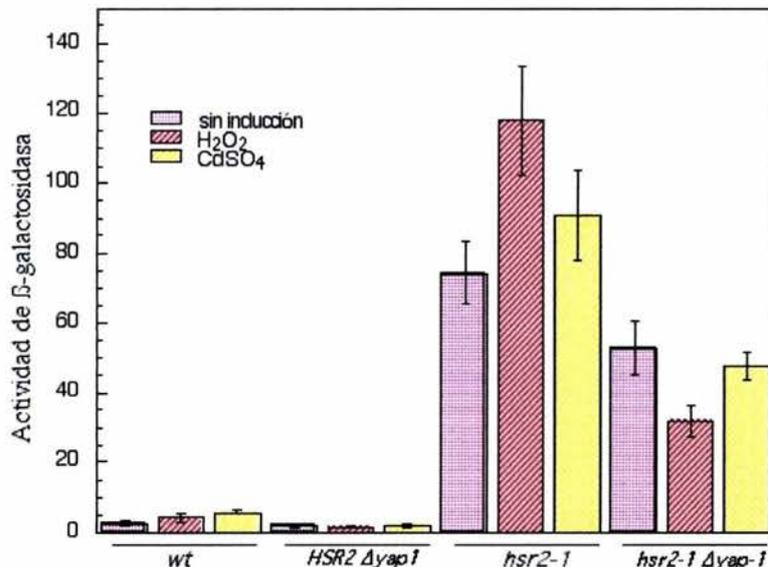


Figura 7. Actividad de β-galactosidasa (en nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) en mutantes *Δyap-1* y dobles mutantes *hsr2-1 Δyap-1* reguladas por el elemento *ARE* en condiciones de estrés oxidativo. Inducción con H_2O_2 1 mM e inducción con $CdSO_4$ 20 μ M por 20 minutos.

1.3.2.3 En diferentes cepas mutantes termosensibles *cdc25^{ts}*

Folch y cols. (datos no publicados) complementaron la cepa *hsr2-1* (JF099) demostrando que esta mutación corresponde al gen *CDC25*. Este alelo es diferente a los descritos en la literatura que presentan un fenotipo sólo a la temperatura restrictiva (Petitjean *et al.*, 1990).

Se determinó la actividad de β -galactosidasa regulada por el elemento *ARE* en los alelos mutantes *cdc25^{ts}* previamente reportados: *cdc25-1*, *cdc25-5* y *cdc25-10* (Petitjean *et al.*, 1990), con o sin el elemento *ARE* fusionado a *lacZ*.

A partir de la actividad basal de β -galactosidasa de las mutantes *cdc25^{ts}* se observó una correlación positiva entre el nivel de actividad de β -galactosidasa y el porcentaje de sobrevivencia a un choque térmico letal (Folch, datos no publicados). La cepa silvestre (LRA88) con un porcentaje de sobrevivencia del 0.0002% presentó un 1.09 de actividad específica de β -galactosidasa y las mutantes *cdc25-10* (LRA24) y *cdc25-5* (LRA26) con una actividad de 2.19 y 3.26 mostraron una termotolerancia intrínseca de 0.0036 y 0.065% respectivamente. La mutante *cdc25-1* (LRA25) presentó el mayor porcentaje de sobrevivencia en calor extremo (1.87%) y los mayores niveles de actividad (5.3). Este comportamiento también se observó en la actividad específica de las mutantes después del estrés con cadmio ó con peróxido y la inducción ascendió hasta al doble del valor obtenido en la condición control. En la cepa silvestre (LRA88) no se observó inducción de la actividad (**Figura 8**).

En ausencia de *ARE*, sólo se encuentra una diferencia significativa en el nivel de actividad de β -galactosidasa en condiciones control en la cepa *cdc25-5* (LRA26) (datos no presentados). Estos resultados sugieren que la expresión constitutiva de β -galactosidasa, en las mutantes *cdc25^{ts}*, es dependiente de secuencias diferentes de *ARE*.

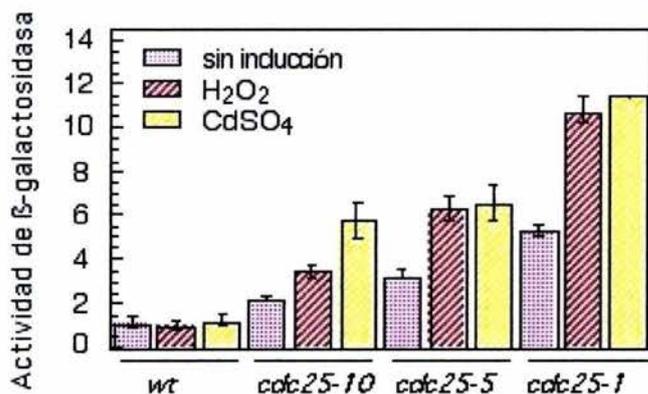


Figura 8. Actividad de β -galactosidasa (en nmoles de ONPG oxidado/minuto/mg de proteína) en mutantes termosensibles del gen *CDC25* reguladas por el elemento *ARE* en condiciones de estrés.

2. La termotolerancia intrínseca en las cepas mutantes dobles *hsr Δhsp104* a lo largo de la curva de crecimiento

Se ha demostrado que la proteína Hsp104 es necesaria para mantener un nivel alto de termotolerancia en la fase de crecimiento estacionario. Las cepas mutantes *Δhsp104* no alcanzan los niveles de termotolerancia que tiene la cepa silvestre en la fase estacionaria (Sánchez *et al.*, 1992).

Para determinar el efecto de la proteína Hsp104 en la termotolerancia intrínseca en las diferentes etapas del crecimiento de las mutantes *hsr*, se obtuvieron las cepas LV0208 (*hsr2-1 Δhsp104*), LV0771 (*hsr2-3 Δhsp104*), LV0606 (*hsr3-1 Δhsp104*) y LV0123 (*hsr4-1 Δhsp104*) que tienen una segunda mutación en *HSP104*. Para este propósito, se disectaron tétradas de los diploides *hsr/HSR Δhsp104::LEU2/HSP104*. Las mutantes en *Δhsp104* se seleccionaron por prototrofia para el aminoácido leucina. Se iniciaron cultivos en 80 ml de YPDA a una D.O._{600nm} de 0.05 y se mantuvieron en crecimiento a 25°C hasta la fase de crecimiento estacionario (202 horas).

A lo largo de los diferentes estadios del crecimiento, el nivel de termotolerancia varió de manera drástica. Tanto la cepa silvestre W303 como la mutante *Δhsp104* presentaron una sobrevivencia del 0.01% al iniciarse el cultivo (0.05 de D.O._{600nm}). Durante la fase de crecimiento logarítmico, ambas cepas presentaron una alta sensibilidad al choque térmico letal (0.01-0.4% y 0.01-0.1% de sobrevivencia respectivamente). Conforme se acercaban al cambio diáxico, los cultivos incrementaron su termotolerancia de manera paulatina (**Figura 9**). La cepa silvestre W303 Leu⁺ alcanzó una termotolerancia de 1 al 6% durante el cambio diáxico (entre las 24 y 36 horas después de iniciado el cultivo) y el porcentaje de sobrevivencia se elevó al 11% en el tercer y cuarto días. En la fase del crecimiento estacionario (entre el día 6 y 8), alcanzó el 100% de sobrevivencia (**Figura 9**). La mutante *Δhsp104* presentó una sobrevivencia del 0.2-0.7% (≈ 10 veces menor que la W303 Leu⁺) durante el cambio diáxico (entre las 24 y 36 horas de crecimiento) (**Figura 9**). Entre el tercer y el cuarto días elevó su termotolerancia al 8%. Al entrar en la fase de crecimiento estacionario, la sobrevivencia disminuyó y se mantuvo entre un 5 y 7% (**Figura 9**). En un segundo experimento ambas cepas presentaron una respuesta similar en cuanto a las tendencias, mas no en sus valores absolutos (**Figura 10**). La cepa silvestre alcanzó el 100% de termotolerancia durante la fase estacionaria mientras que la *Δhsp104* no pasó del 1%.

Al inicio de la fase de crecimiento logarítmico, las mutantes *hsr3-1* (LV0605), *hsr2-3* (LV0772), *hsr2-1* (LV0210) y *hsr4-1* (LV0125) presentaron un nivel de termotolerancia que

incrementó rápidamente a partir del inicio del cultivo y alcanzó un 40% de sobrevivencia entre las primeras 10 y 20 horas de crecimiento (**Figuras 9 y 10**). Este resultado confirma el fenotipo de termotolerancia intrínseca durante la fase de crecimiento exponencial de las mutantes originales. En esta fase, los mutantes *hsr3-1*, *hsr2-3* son cientos de veces más tolerantes que la cepa silvestre y los mutantes *hsr2-1* y *hsr4-1* son miles de veces más termotolerantes.

En la **Figura 9** se observa la cinética de sobrevivencia a un choque térmico letal para la cepa *hsr3-1* (LV0605). Este cultivo presentó una sobrevivencia del 8% (a una D.O._{600 nm} de 0.05) que se incrementó hasta un 47% entre las 12 y las 22 horas. A las 35 horas de iniciado el cultivo, el porcentaje de sobrevivencia se redujo ligeramente a 30% y posteriormente continuó incrementándose hasta alcanzar entre un 60 y un 70% durante la fase postdiáuxica. Conforme el cultivo entra a un crecimiento estacionario se observa un aumento paulatino de la sobrevivencia hasta alcanzar niveles cercanos al 100%.

El alelo mutante *hsr2-3* (cepa LV0772) presentó un 50% de sobrevivencia a una D.O._{600 nm} de 0.05, que se incrementó de manera rápida. A las 24 horas alcanzó un 96% de tolerancia al choque térmico letal, manteniendo un nivel de sobrevivencia próximos al 100% durante todo su crecimiento posterior (**Figura 9**). En las mutantes dobles *hsr3-1 Δhsp104* (LV0606) y *hsr2-3 Δhsp104* (LV0771), el nivel de termotolerancia intrínseca fué mucho menor que el presentado por las mutantes sencillas *hsr3-1* y *hsr2-3*. Sin embargo ambas cepas, LV0606 y LV0771, alcanzaron niveles de tolerancia mayor durante la fase de crecimiento exponencial y el cambio diáuxico (las primeras 36 hrs) en comparación con la mutante sencilla *Δhsp104*. Estos resultados sugieren que la ausencia de Hsp104 ocasionó la disminución de la termotolerancia intrínseca en la doble mutante *hsr3-1 Δhsp104* (LV0606). Esto es notorio en todas las fases, incluso en la fase estacionaria (del día quinto al noveno) en donde alcanzó un máximo de 12% de sobrevivencia (**Figura 9**).

En el doble mutante *hsr2-3 Δhsp104* (LV0771) también se redujo la termotolerancia intrínseca en la fase exponencial por la disrupción de *HSP104*. Al inicio del crecimiento logarítmico, presentó niveles de sobrevivencia entre el 3 y el 8% y al sexto día alcanzó una sobrevivencia máxima de 37%, el cual ya no se incrementó más (**Figura 9**).

Las mutantes sencillas *hsr2-1* y *hsr4-1* mostraron una elevada termotolerancia desde la fase de crecimiento exponencial, alcanzando cerca del 100% de sobrevivencia durante las primeras 24 hrs. de cultivo. Este nivel se mantuvo al máximo en ambas mutantes, tanto en la fase postdiáuxica como en la estacionaria (**Figura 10**).

La cepa mutante doble *hsr2-1 Δhsp104* (LV0208) presentó una ligera disminución en el porcentaje de sobrevivencia al choque a 50°C. Durante la fase logarítmica del crecimiento esta disminución fue aproximadamente del 50% de la presentada por la mutante sencilla *hsr2-1* y alcanzó el 100% de sobrevivencia después de tres días de iniciado el cultivo (**Figura 10**).

Finalmente la cepa *hsr4-1 Δhsp104* (LV0123) no pareció afectada significativamente por la ausencia de la proteína Hsp104, ya que en este mutante se observó una cinética de termotolerancia similar al de la mutante sencilla *hsr4-1* (LV0125) En ambas mutantes se observó un incremento en la termotolerancia durante el crecimiento logarítmico (**Figura 10**).

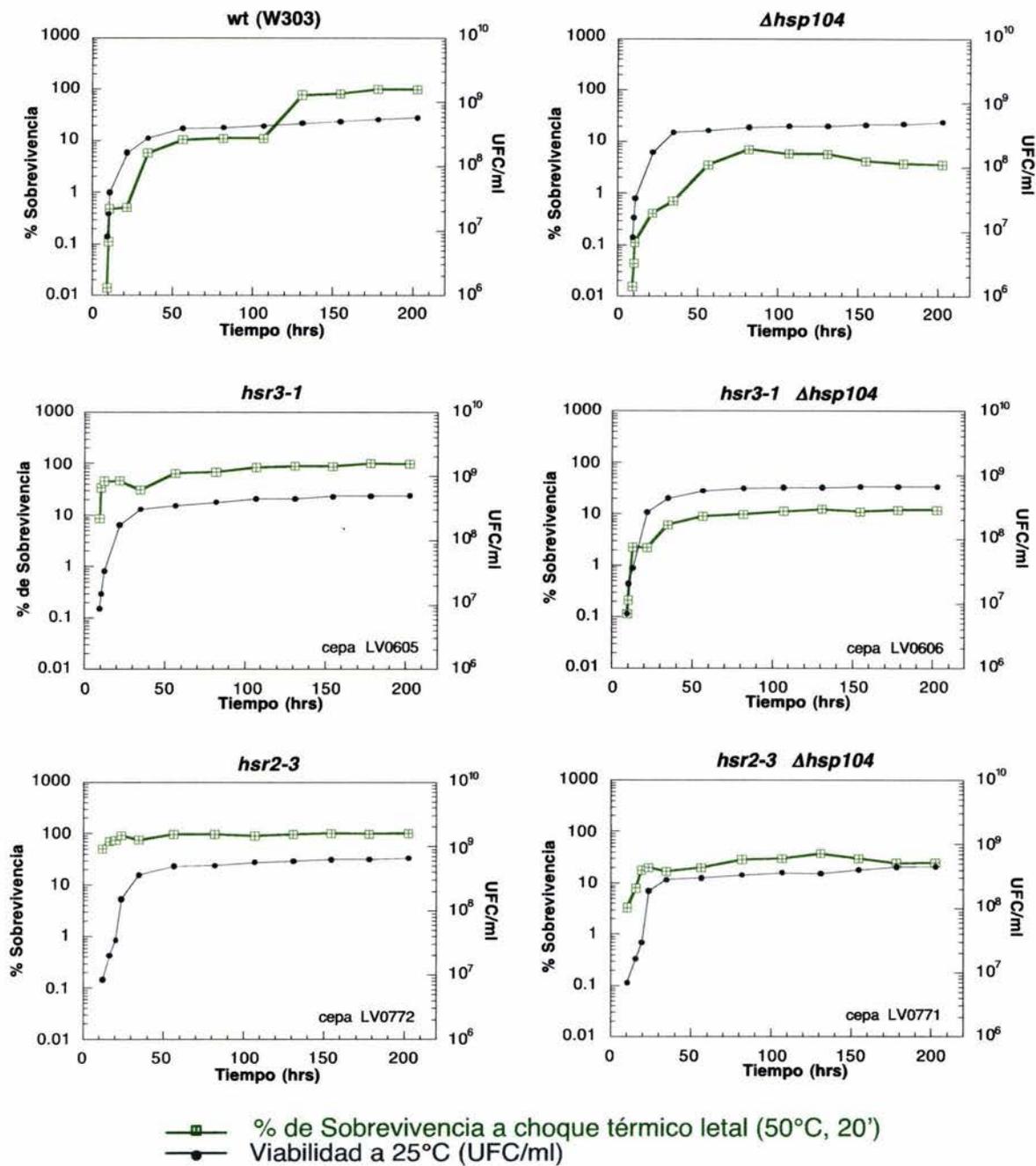


Figura 9. Termotolerancia intrínseca en diferentes estadios del crecimiento en las cepas silvestre W303 y mutantes $\Delta hsp104$, $hsr3-1$, $hsr2-3$, $hsr3-1 \Delta hsp104$ y $hsr2-3 \Delta hsp104$. El genotipo relevante de las mutantes utilizadas se localiza en la parte superior de cada una de las gráficas.

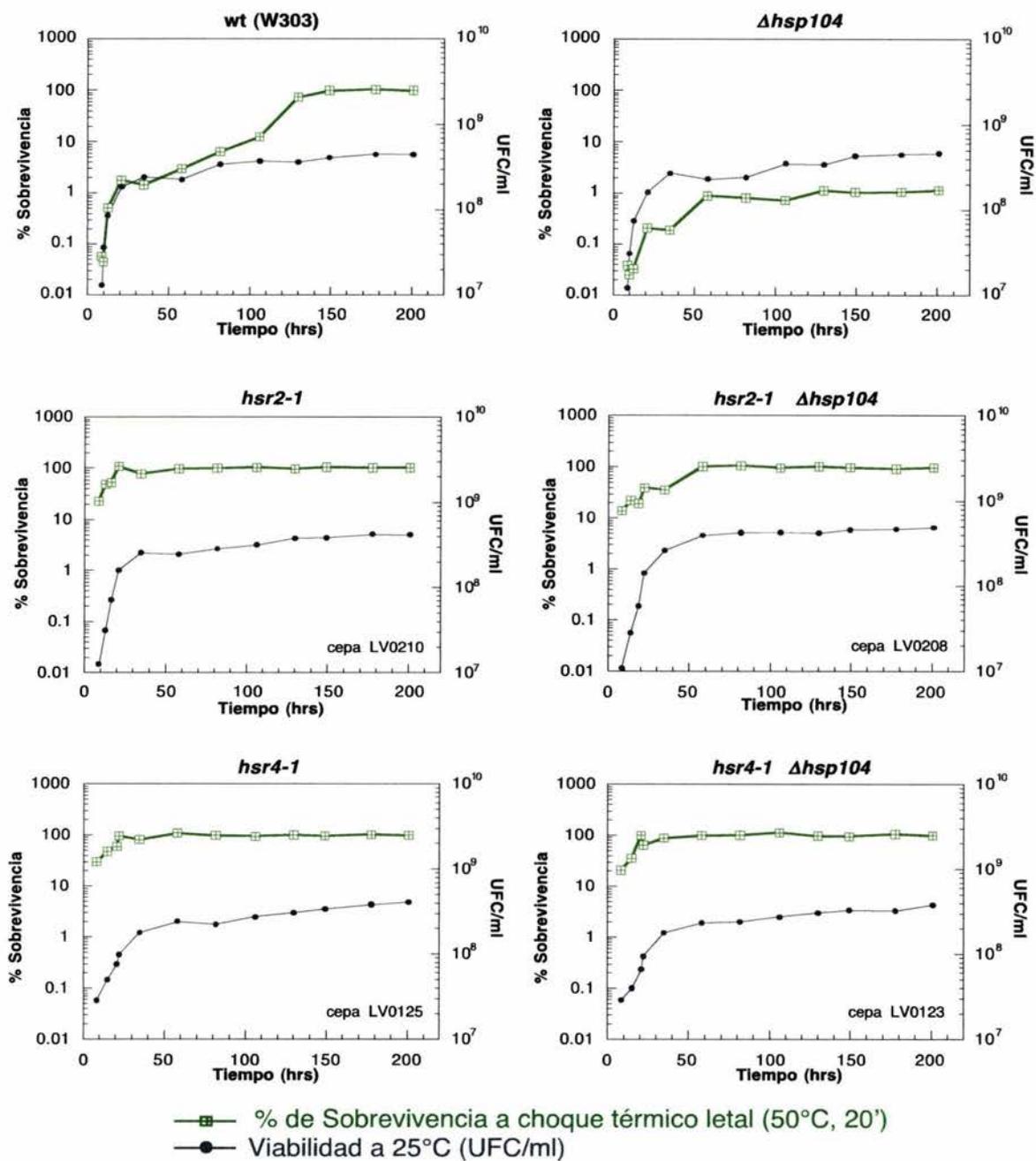


Figura 10. Termotolerancia intrínseca en diferentes estadios del crecimiento en las cepas silvestre W303 y mutantes $\Delta hsp104$, *hsr2-1*, *hsr4-1*, *hsr2-1* $\Delta hsp104$ y *hsr4-1* $\Delta hsp104$. El genotipo relevante de las mutantes utilizadas se localiza en la parte superior de cada una de las gráficas.

3. Caracterización fisiológica y molecular de la reversión del tamaño de la colonia en las mutantes *hsr*

Algunos estudios previos indicaron que en algunos mutantes *hsr* (Anexo 1, Tabla A.1) ocurría una frecuencia de reversión del tamaño de la colonia del orden de 8×10^{-4} a 7×10^{-3} en la fase de crecimiento logarítmico a 25°C y que ésta correlacionaba con la pérdida de los niveles de la termotolerancia (Casas, 1998). Decidimos analizar la frecuencia de reversión espontánea para tratar de comprender este fenómeno ya que en los experimentos de transformación se encontró un alto porcentaje de reversión. ¿Esta elevada frecuencia de reversión se debe a un mecanismo de supresión extragenética o es debida a un factor epigenético de tipo prión?, ¿depende de un factor protéico que se desnaturaliza con calor?, ¿es posible curar las cepas de este fenotipo?

3.1 Efecto del crecimiento continuo a temperatura subletal en las mutantes *hsr2-2* y *hsr3-1*

Los estudios realizados por Folch y Ochoa (datos no publicados) utilizando cultivos de los mutantes *hsr* indican que la incubación continua a 40°C reduce significativamente o imposibilita el crecimiento. De acuerdo a su crecimiento a 40°C, las mutantes se clasificaron en tres grupos: a) *hsr3-1* (ScIBT6) y *hs6-1* (ScIBT14), que presentaron un crecimiento continuo durante 24 horas, aunque siempre menor al silvestre; b) *hsr2-1* (ScIBT2), *hsr2-2* (ScIBT3) y *hsr2-3* (ScIBT7), que no crecen en estas condiciones; c) todas las demás mutantes, que sólo crecen un poco durante las primeras horas de incubación.

Decidimos analizar si el crecimiento a temperaturas subletales en los cultivos de los alelos *hsr2-2* (ScIBT3) y *hsr3-1* (ScIBT6) en medio mínimo glucosa, se podría utilizar para seleccionar las células que hubieran sido complementadas con la transformación, reduciendo al mismo tiempo la frecuencia de reversión y la tasa de crecimiento.

A 38°C las mutantes *hsr2-2* y las células que revirtieron presentaron un período de adaptación a las condiciones del cultivo, que fue más largo que para las cepas silvestre y el diploide heterocigoto (*hsr2-2/HSR2*) ya que comenzaron su crecimiento después de 12 horas de iniciado el tratamiento, sin que hubiera pérdida de la viabilidad después de 35 horas (este trabajo, datos no presentados). Por esta razón decidimos repetir el estudio, incrementando la temperatura a 40°C en medio mínimo-glucosa. A 40°C, la cepa silvestre, el diploide heterocigoto *hsr2-2/HSR2* (LV0786) y el control de transformación (W303 6BUL) presentaron una fase de duplicación

rápida y se mantuvieron viables aún después de 40 horas de iniciado el tratamiento. Por el contrario, las mutantes derivadas de *hsr2-2* (ScIBT3) y la cepa revertante *hsr2-2 sgr4* (LV0790) no proliferaron y presentaron una pérdida rápida de la viabilidad entre las 12 y las 20 horas. Las colonias revertantes que se encontraban en el inóculo inicial redujeron su número de manera paulatina durante el tratamiento (**Figura 11**). A partir de estos resultados, dedujimos que el crecimiento continuo a 40°C en medio mínimo con glucosa se podría utilizar como criterio de selección de las células que han sido complementadas en *hsr2-2*.

Hemos observado que las células que revirtieron presentan tiempos de duplicación más cortos que las mutantes. Esto podría explicar el alto número de colonias revertantes en los cultivos (Folch y cols., datos no publicados; éste trabajo, datos no presentados).

Del mismo modo analizamos el crecimiento a 40°C en las cepas derivadas de la mutante *hsr3-1* (ScIBT6). Las mutantes *hsr3-1* presentan un tamaño de colonia casi silvestre, por lo que las células que se complementen con el banco silvestre no pueden ser seleccionadas por el criterio del tamaño de la colonia.

Observamos que las cepas silvestre y el heterocigoto *hsr3-1/HSR3* (LV0622) presentaron una velocidad rápida de crecimiento durante las primeras 12 hrs. de crecimiento, alcanzando valores cercanos a las 10^7 UFC/ml a las 24 horas. Las cepas mutantes *hsr3-1* (ScIBT6, JF601 y JF612) presentaron un crecimiento más lento, alcanzando a las 36 horas 2×10^6 UFC/ml. En este caso, a diferencia de los resultados obtenidos con las mutantes *hsr2-2*, no se produjo pérdida de la viabilidad a 40°C en el alelo *hsr3-1* y los cultivos presentaron tasas de crecimiento similares a las observadas durante el crecimiento a 25°C, por lo que este criterio no es adecuado para la selección de las cepas complementadas con el banco genómico silvestre. (**Figura 12**).

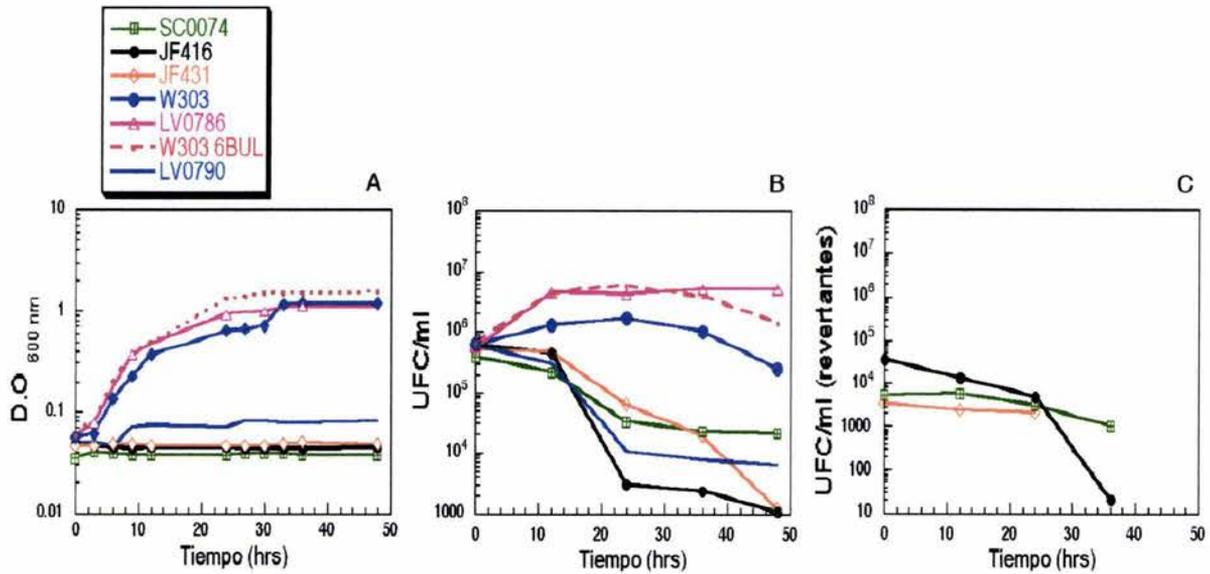


Figura 11. A) Cinética de crecimiento continuo en medio mínimo con glucosa de las cepas haploides *hsr2-2*, silvestre y heterocigotas *hsr2-2/HSR2* (LV0786) a 40°C. Las cepas SC0074, JF416 y JF431 son *hsr2-2*. LV0790 es una cepa revertante para el tamaño de la colonia de la mutante JF416. B) Cuentas viables a lo largo de la curva de crecimiento a 40°C. C) Número total de colonias revertantes en los cultivos.

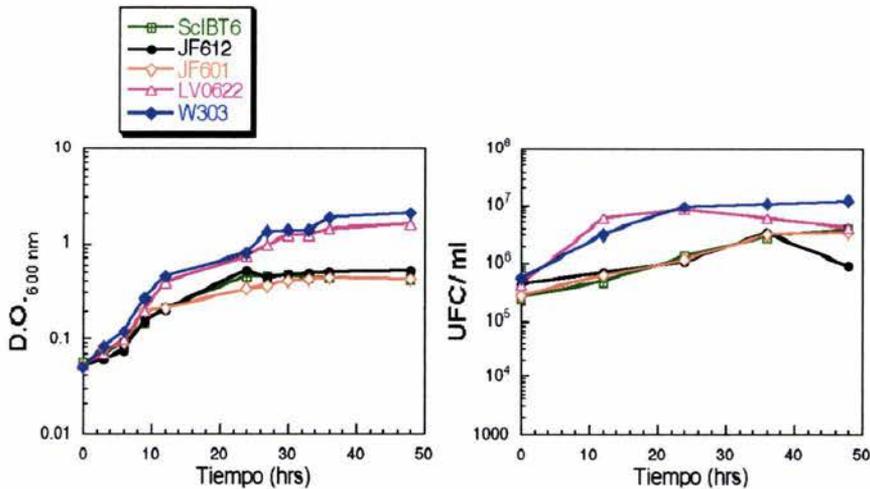


Figura 12. A) Cinética de crecimiento continuo en medio mínimo glucosa de cepas haploides *hsr3-1*, silvestre y diploide heterocigoto *hsr3-1/HSR3* (LV0622) a 40°C. Las cepas ScIBT6, JF601 y JF612 son *hsr3-1*. B) Cuentas viables a lo largo de la curva de crecimiento a 40°C.

4. Complementación molecular mediante la transformación con un banco de ADN genómico silvestre

Uno de los objetivos del presente trabajo fué intentar la complementación molecular de las mutantes *hsr* con un banco de genes de la cepa silvestre clonados en el vector YCp50. Para saber si el banco genómico de la levadura *S. cerevisiae*, en el vector YCp50, nos sirve para los experimentos de complementación génica de las mutantes, determinamos la eficiencia de transformación en la cepa W303 6B y se cuantificó la abundancia relativa de tres marcadores que se utilizarán para la complementación (*LEU2*, *HIS3* y *ADE2*). Utilizando el método de Gietz y cols. (1992), se determinó que la eficiencia de transformación en un cultivo de 6×10^8 células competentes viables fué de $8.23 \times 10^{-3}/\mu\text{g}$ de ADN del banco. Del número de colonias que presentó complementación de una auxotrofia se obtuvo la abundancia relativa para cada uno de los genes que complementaron se encontró dentro del margen de 1:3000 a 1:30,000 clonas del banco genómico utilizado (**Anexo 4, Tabla F**). Estos valores nos dan una idea del número de transformantes que debiéramos obtener para tener una buena probabilidad de complementar a las mutantes *hsr* con este banco genómico.

Se decidió complementar las cepas mutantes *hsr2-3* (LV0047) y *hsr2-2* (JF431) con el banco genómico. Debido a que la mutación en los alelos seleccionados es recesiva, se espera que las células que se complementen, presenten el fenotipo silvestre para el tamaño de la colonia y la tolerancia al choque térmico (**Anexo 1, Tabla A.1**).

4.1 Transformación de las mutantes *hsr2*

Ya que la mutante *hsr2-2* no crece a 40°C, después de la transformación, el cultivo se incubó a esta temperatura con el propósito de enriquecer las cepas complementadas (Ver Resultados, Sección 3.1). En las colonias que presentaron tamaño de colonia grande, al analizar si este fenotipo era dependiente del plásmido transformante, seleccionando las cepas con el ácido 5-fluoro-orótico para “curarlas” del plásmido (solo las células que pierden el plásmido crecen), se observó que todas eran “positivas-falsas” ya que no revirtieron al tamaño de colonia de la mutante original. Además, este mutante presentó una baja eficiencia de transformación en comparación con la cepa silvestre (**Anexo 4, Tablas F, G y H**). Tampoco se obtuvieron complementantes al transformar el mutante *hsr2-3*.

Por esta razón, se instrumentaron dos protocolos de transformación alternativos: uno mediante la adición de DMSO utilizando el método del acetato de litio de Gietz y cols. (1992) y

otro por electroporación. Con el primer método se obtuvo un número elevado de transformantes de la cepa LV0047 (*hsr2-3*) (**Anexo 4, Tabla H**), sin embargo se encontró un alto número de revertantes. Además se observó un fuerte efecto negativo sobre el porcentaje de sobrevivencia en las cepas *hsr2-2* (JF431) y *hsr2-3* (LV0047) así como en la cepa silvestre (18%) expuestas al DMSO; esta excesiva sensibilidad podría estar reduciendo la sobrevivencia de las candidatas complementadas.

Considerando que en una de cada 3,000 a 30,000 clonas se encuentra un determinado gen de la levadura en el banco genómico utilizado, es muy importante transformar las mutantes con una alta eficiencia. La reducida eficiencia de transformación observada en las mutantes *hsr*, aún utilizando metodologías para incrementar la eficiencia de transformación (Meilhoc *et al.*, 1990), quizá se pueda deber a un engrosamiento de la pared celular de las mutantes ya que se ha observado también una disminución a la digestión de la pared celular utilizando la enzima zimoliasa (Folch y cols., datos no publicados).

Recientemente, Folch y cols. (datos no publicados) lograron la clonación génica del mutante *hsr2-1* mediante una modificación del protocolo en el cual se expuso el cultivo a un choque térmico letal (50°C, 20 minutos) previo a la transformación. De esta manera logró reducir el número de revertantes y en consecuencia el número de posibles candidatas positivas-falsas. Estos resultados indican la importancia que tiene eliminar o disminuir la reversión espontánea del tamaño de la colonia en los experimentos de complementación. Por otro lado, el análisis exhaustivo de la segregación del fenotipo mutante en algunos de los alelos *hsr* reveló la presencia de más de una mutación. El análisis de tétradas de la cruce entre la cepa silvestre y las derivadas *hsr2-3* y *hsr4-1* dió una segregación 3:1 para el tamaño de la colonia y para la termotolerancia. Por esta razón, decidimos obtener mutantes monogénicas derivadas de *hsr2-3* y *hsr4-1*. Lo cual se logró mediante varias retrocruzas con las cepas silvestres W303a-LEU⁺ y a W303-6B.

DISCUSIÓN

La expresión debida a los elementos de respuesta al estrés en las mutantes *hsr* se encuentra alterada

Un punto de regulación génica importante, es el inicio de la transcripción. Este control está determinado en parte por los factores protéicos que actúan en *trans* y las secuencias del ADN a las que se unen y demás elementos regulatorios de la transcripción que actúan en *cis*. En la levadura *S. cerevisiae*, en respuesta a distintas condiciones estrés se activan los factores que actúan sobre los siguientes tres elementos *cis* de control transcripcional : los *HSE*, los *STRE* y los *ARE*.

Durante este estudio, en la determinación de la actividad de *lacZ* regulada bajo las distintas secuencias de respuesta al estrés, observamos que en casi todos los mutantes *hsr* estudiados, la actividad de β -galactosidasa se encuentra desreprimida en mayor o menor grado a 25°C en comparación con la cepa silvestre.

Utilizando la construcción p β 11, observamos que la actividad de β -galactosidasa correlaciona directamente con la alta termotolerancia intrínseca que presentan las cepas. Los mutantes *hsr2-1*, *hsr2-3* y *hsr4-1*, que presentan los mayores niveles de termotolerancia intrínseca, mostraron los mayores niveles de actividad de β -galactosidasa a 25°C (**Figura 3**). En esta condición, se observó en todas las mutantes una actividad de β -galactosidasa que es significativamente diferente a la de la cepa silvestre (P 0.05) aunque en la condición inducida, únicamente *hsr2-1*, *hsr2-3*, *hsr3-1* y *hsr4-1*, son significativamente diferentes a la silvestre expuesta a 39°C (P 0.05) (**Anexo 2, Tabla C**), por lo que esto nos podría sugerir que en estos mutantes se encuentran desregulados elementos adicionales que permiten un mayor nivel de actividad que el de la cepa silvestre. Únicamente *hsr2-1 sgr1-1*, *hsr4-1*, *hsr6-1* se comportan como la cepa parental. Adicionalmente observamos que nuestros resultados coinciden con las observaciones realizadas por Casas (1998) para la cepa *hsr2-1* (ScIBT2) y las cepas *wt* y *hsr1* (*cyr1*).

Para validar estos resultados, sería conveniente realizar un mayor número de valoraciones, ya que en el caso de las mutantes *hsr4-1* y *hsr2-1* y de acuerdo a los valores observados en la gráfica, es mayor la dispersión (**Anexo 2, Tabla B y C. Figura 3**).

Debido a que el promotor de p β 11 es muy complejo, es imposible deducir cómo se lleva a cabo la regulación a través de cada uno de los elementos de respuesta al estrés que lo

componen y si la contribución de cada uno de ellos es aditiva. Se sugiere que la expresión de los genes de estrés, en su contexto cromosómico natural podría ocurrir de manera similar, por lo que uno o varios activadores serían los responsables de esta respuesta.

En *hsr2-1 sgr1-2* (mutante tipo ScIBT10), tanto a 25°C como a 39°C, la actividad específica de β -galactosidasa bajo el control de $p\beta 11$, es menor a la que se observa en *hsr2-1* en ambas condiciones (**Fig. 3**). No obstante, bajo el control del elemento *STRE*, la actividad es mucho mayor a la de la cepa silvestre y comparable a *hsr2-1* a 25°C o después de choque a 39°C, lo cual explica que *hsr2-1 sgr1-2* tenga niveles de termotolerancia mayores que la cepa silvestre aunque menores que la mutante original (**Figura 4**). De igual manera, los niveles de actividad bajo el elemento *ARE* coinciden en sugerir que *hsr2-1 sgr1-2* presenta tolerancia al calor ligeramente mayor que la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la reversión que presenta *hsr2-1 sgr1-2* no es a un fenotipo totalmente silvestre, al menos en cuanto a los niveles de termotolerancia y la actividad regulada por la secuencias de respuesta al estrés, aun cuando presentan un fenotipo silvestre para el tamaño de la colonia y el crecimiento en fuentes no fermentables de carbono. Estas evidencias proponen además, que la termotolerancia de *hsr2-1 sgr1-2* está fuertemente influenciada por el elemento *STRE*, aunque no podemos descartar un papel del elemento *HSE* que no se ha estudiado. Adicionalmente, faltaría por determinar si esto también es cierto para las mutantes *hsr4-1 sgr2* y *hsr3-4 sgr3*.

Auxiliándonos del análisis estadístico observamos que las diferencias tanto a 25°C como a 39°C entre las cepas, fueron estadísticamente significativas (P 0.05), excepto en el caso del mutante *hsr2-1* (**Anexo 3, Tabla D**). En el laboratorio (datos no publicados), Ruying Yang demostró que la expresión dependiente de *HSE* es constitutiva en el caso del mutante *hsr2-1*. Es posible que en este mutante los factores requeridos para la inducción de la transcripción vía *STRE* y *HSE* en respuesta al calor estén permanentemente activados, por lo que la exposición al calor no es capaz de inducir una mayor actividad.

Por otro lado las diferencias en la actividad de β -galactosidasa debida al promotor *STRE* entre la cepa silvestre y mutante *hsr1* no son significativas en las dos condiciones estudiadas y en *hsr6-1* a 25°C. En ambas cepas mutantes, la actividad vía *STRE* no está desreprimida sino que por el contrario, parece más apagada que la actividad de la cepa silvestre aún después de exposición al calor. Esto nos sugiere que la actividad observada con el promotor quimérico $p\beta 11$ y los niveles de termotolerancia que presentan *hsr1* y en *hsr6-1* se encuentran activados por elementos diferentes a *STRE*, aunque se podría sugerir un papel para los elemento *HSE* y *PDS* que contiene la construcción $p\beta 11$. Al menos en el caso del mutante *hsr6-1* se observó una

elevada actividad basal a través del elemento *ARE*, inducible por peróxido de hidrógeno y sulfato de cadmio (CdSO_4).

El análisis de la actividad regulada por el elemento *ARE* en la cepa silvestre W303 y en los fondos mutantes *hsr* mostró que la regulación de este elemento no muestra cambios a lo largo de la curva de crecimiento (**Figura 5**). En la fase logarítmica a 25°C la mayoría de las mutantes muestran una elevada expresión, y algunas muestran la misma actividad en condiciones de no estrés (**Figura 6**). La cepa silvestre fue capaz de elevar los niveles de actividad de β -galactosidasa a través del elemento *ARE* después de una inducción con sulfato de cadmio, al igual que las mutantes *hsr1* y *hsr6-1* (JF505). Sin embargo, en respuesta a la inducción con peróxido de hidrógeno, las diferencias en actividad no fueron estadísticamente significativas en comparación con la condición control.

El resto de los mutantes mostró un comportamiento diferente cuando se comparó con la condición control. Las cepas *hsr2-1* y *hsr2-1 sgr1-1* presentan una diferencia significativa después de la inducción con peróxido de hidrógeno pero no con CdSO_4 , los mutantes *hsr2-3* y *hsr4-1* presentan esta característica en ambos tratamientos. Por último, la cepa *hsr3-1* que mostró niveles de actividad basal a través del elemento *ARE* pero que no es inducible por exposición a estrés oxidativo o por metales pesados. En la condición control, los alelos *hsr2-1* y *hsr4-1* mostraron los niveles más altos de desrepresión con relación a la cepa silvestre (**Figura 6**), por lo que estos resultados sugieren que esta elevada actividad pudiese conferir a estas mutantes una mayor tolerancia al estrés oxidativo y a la exposición a metales pesados. Esto ya ha sido parcialmente corroborado en el laboratorio (Folch, datos no publicados) al menos para el mutante *hsr2-1* que muestra una elevada tolerancia a peróxido de hidrógeno.

El mutante *hsr1* (Iida y Yahara, 1984) presentó en condiciones sin estrés, reducidos niveles de actividad de β -galactosidasa mediadas por los elementos *STRE* y *ARE* y esta actividad se indujo ligeramente en condiciones de estrés; este fenotipo resulta curioso dado que en este mutante se esperaría una alta actividad constitutiva del elemento *STRE* (**Figuras 4 y 6**). Por el contrario, con el promotor quimérico $p\beta 11$ el mutante *hsr1* presentó una alta actividad de β -galactosidasa en condiciones no estresantes que fue inducible por exposición al calor; esto podría deberse a la contribución de los elementos *HSE* ó *PDS* presentes en esta construcción (**Figura 2 y 3**). Es importante mencionar que en estos experimentos no se incluyó a la cepa progenitora de *hsr1*, por lo que no es conveniente comparar estrictamente a las cepas *wt* y *hsr1* ya que provienen de diferentes fondos genéticos. Los niveles de expresión de β -galactosidasa en *hsr1*, mediadas por las tres diferentes construcciones (**Figuras 3, 4, 5 y 6**), pudieran estar sugiriendo

que la elevada expresión del gen reportero en condiciones no estresantes en los mutantes *hsr* (*hsr2-1*, *hsr2-3*, *hsr3-1*, *hsr4-1* y *hsr2-1 sgr1*), no es dependiente de los bajos niveles de AMPc. La mutante *hsr1* (*cyr1*), produce bajos niveles de AMPc y este regula negativamente la expresión de genes dependientes de la secuencia *STRE* (Boy-Marcotte *et al.*, 1998). Por otro lado, *STRE* también es regulado a través de la vía MAPK HOG que es independiente de AMPc. Posiblemente este mismo control ocurre en el mutante *hsr6-1*. Alternativamente la elevada termotolerancia y la alta expresión del reportero *lacZ* contenido en p β 11 en los mutantes *hsr* caracterizados en este trabajo se deba a que sus niveles de AMPc son mucho menores que los de la cepa *hsr1*, con lo cual la termotolerancia y el crecimiento estarían más desregulados.

El análisis de las actividades de β -galactosidasa mediada por el elemento *ARE* en el fondo mutante *hsr2-1*, reveló que la actividad se encuentra desregulada en condiciones no estresantes y que esta elevada expresión es parcialmente afectada por la ausencia de la proteína Yap1 sólo en condiciones de estrés (**Figura 7**).

Por otro lado, al analizar la actividad de β -galactosidasa en otros alelos de *cdc25* (termosensibles), esta parece estar ligeramente desregulada y presenta una leve inducibilidad que es dependiente de *ARE* en *cdc25-5* (**Figura 8**). Estos niveles de actividad elevados correlacionan positivamente con el porcentaje de sobrevivencia al choque térmico (50°C) determinado por Folch y cols. (datos no publicados). Estos resultados sugieren un papel del producto génico *CDC25* en la vía de regulación de los factores de unión a *ARE* durante exposición a estrés, fenotipo que es más evidente en el mutante *hsr2-1*.

Se sabe que otros tipos diferentes de estrés además del calor, como el estrés osmótico, peróxido de hidrógeno y el etanol son capaces de inducir la expresión del gen *STRE-LEU2-lacZ* (Marchler *et al.*, 1997); por lo que diferentes factores transcripcionales pudieran estar involucrados en la expresión vía *STRE*. Por ejemplo, Yap1, Msn2, Msn4, Msn1, Hog1.

El análisis directo de la expresión del genoma de las mutantes *hsr*, ya sea mediante experimentos tipo *northern* o con el uso de microarreglos, permitirá hacer una correlación más precisa entre estos elementos de respuesta a estrés y las posibles vías de activación transcripcional que se encuentran desreguladas en ellas.

Efecto de Hsp104 en el incremento de la termotolerancia intrínseca durante las distintas fases del crecimiento en medio líquido

A través del ciclo biológico del individuo y en las distintas especies de organismos, la termotolerancia intrínseca muestra considerables variaciones. Así, se ha visto que la termotolerancia depende de los nutrientes del medio de cultivo, la tensión del oxígeno, el estadio de desarrollo, etc. (Nover, 1991).

Diversos estudios realizados en la levadura *S. cerevisiae* han demostrado que durante el estadio de crecimiento logarítmico, el cultivo presenta una alta sensibilidad a calor extremo, mientras que en la fase de crecimiento estacionario alcanza los niveles máximos de termotolerancia (Schenberg-Frascino y Moustacchi, 1972; Kurtz *et al.*, 1986; Werner-Washburne, *et al.*, 1996). Además, estos cambios correlacionan con variaciones en los niveles de expresión de varias proteínas de *choque térmico*.

En este trabajo, los resultados obtenidos en la sobrevivencia al choque térmico en las cepas silvestre y mutante $\Delta hsp104$ en diferentes etapas del crecimiento, concuerdan con lo reportado en la literatura. Las mutantes de levadura deletas en *HSP104* no alcanzan los altos niveles de termotolerancia en la fase estacionaria como la cepa silvestre (Sanchez *et al.*, 1992).

Sin embargo, nuestros resultados aparentemente se contraponen a lo reportado en la literatura. Se sabe que la proteína Hsp104 es inducida durante la transición a la fase estacionaria y es importante para conservar los elevados niveles de tolerancia al calor en esta etapa del cultivo, y que no se expresa durante el crecimiento en fase logarítmica ya que no es requerida para el crecimiento a temperatura óptima (25°C), aunque su expresión es importante para la termotolerancia inducida (Sánchez y Lindquist 1990).

En los mutantes *hsr3-1* y *hsr2-3*, parece que la expresión de la proteína Hsp104 tiene un papel importante en contribuir a la sobrevivencia a un tratamiento con calor extremo, desde la fase exponencial del crecimiento y hasta la fase estacionaria del cultivo. Ya que la delección de *HSP104* en los mutantes *hsr3-1* y *hsr2-3*, redujo los niveles de termotolerancia durante el crecimiento logarítmico en los dobles mutantes, además de que no se alcanzó una mayor tolerancia en la fase estacionaria. Además, la elevada expresión constitutiva a 25°C de los genes dependientes de la secuencia *STRE*, sugiere que la proteína Hsp104 se sobreexpresa en estos mutantes.

Adicionalmente se podría especular que una condición que reduce la termotolerancia en *hsr3-1* $\Delta hsp104$ y en *hsr2-3* $\Delta hsp104$ es la elevada frecuencia de reversión para el tamaño de la

colonia. Sin embargo, la frecuencia de reversión encontrada no es suficiente para explicar la disminución de la tolerancia al calor en los mutantes *hsr3-1* y *hsr2-3*. Sobre todo al inicio del cultivo donde el número de células que han revertido es bajo, no contribuirían de manera significativa a la termosensibilidad de estas cepas mutantes.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el mutante *hsr2-1 Δhsp104* (LV0208) sugieren que Hsp104 se expresa en el mutante *hsr2-1* durante la fase de crecimiento logarítmico ya que se observó una disminución en los niveles de tolerancia al calor extremo en esta etapa del crecimiento. Esto se ha confirmado en el laboratorio a través de un análisis tipo *Northern* en el cual se detectó la sobreexpresión de Hsp104 aún a la temperatura óptima de crecimiento en los mutantes *hsr2-1* y *hsr2-2* (Folch y col., datos no publicados). No obstante, en las fases tardías de la curva de crecimiento posiblemente la desregulación de otros factores permite la sobrevivencia al calor extremo en *hsr2-1*. Por el contrario, el mutante *hsr4-1 Δhsp104* (LV0123) no pareció verse afectado por la ausencia de Hsp104.

Se ha observado que en ausencia de la proteína Hsp104, la proteína Hsp70 juega un papel importante en la termotolerancia en las etapas tempranas del incremento de temperatura. Por otro lado, en cepas mutantes Hsp70, la proteína Hsp104 tiene un papel importante en el crecimiento vegetativo (Sánchez *et al.*, 1993).

A 50°C, donde la viabilidad se pierde rápidamente, la proteína Hsp104 incrementa la sobrevivencia al promover la resolubilización de las proteínas denaturadas. En ausencia de Hsp104, la proteína Ssa permite la sobrevivencia a calor extremo al evitar la formación de agregados proteicos ya que mantienen a las proteínas en una conformación relativamente extendida. También se podría sugerir un incremento en la actividad de la chaperona Hsp60 que interviene en el plegamiento de proteínas a su estado nativo (Parsell y Lindquist, 1993). Por otro lado, la trehalosa podría incrementar la termotolerancia al incrementar la estabilidad de las proteínas y proteger su actividad (Hottiger *et al.*, 1994). Estas características pueden ser debidas al fenotipo de células en fase estacionaria que presentan las mutantes *hsr*, que presentan acumulación del disacárido trehalosa, fuerte expresión de genes vía el elemento *STRE* y alta resistencia al estrés entre otras.

En los mutantes *hsr2-1* y *hsr4-1*, la elevada expresión constitutiva a 25°C de genes de respuesta a estrés dependiente de los elementos *STRE* y *ARE*, sugiere que diversas proteínas de respuesta al estrés mantienen la tolerancia a calor extremo posiblemente reduciendo la formación de agregados proteicos, facilitando el recambio de proteínas desnaturalizadas, e inclusive el control del balance redox al permitir la movilización de especies reactivas oxidantes.

Para validar estos resultados y corroborar la presencia de la proteína Hsp104, Hsp70 u otros factores que pudieran estar contribuyendo a la elevada termotolerancia durante el crecimiento logarítmico en estas mutantes, sería necesario realizar un análisis tipo *Northen* para determinar su nivel de expresión o un análisis tipo Western.

¿La termotolerancia y la velocidad de crecimiento son funciones que se regulan de manera independiente?

En los cultivos que se encuentran en la fase del crecimiento exponencial las células gemantes (fases S, G₂ y M) presentan una alta sensibilidad a una temperatura extrema (50-52°C) y las células que no están gemando (fase G₁) presentan termotolerancia (Schenberg-Frascino y Moustacchi, 1972). Estos resultados sugieren que las células que se encuentran en un estadio proliferativo son sensibles al estrés por calor a diferencia de las células arrestadas, que son termotolerantes.

Durante la entrada a la fase de crecimiento estacionario se detiene la división celular y las células se arrestan en la fase G₀ / G₁. Cuando las mutantes *cdc25*, *cdc33* y *cdc35* se exponen a una condición que induce el arresto del ciclo celular, éstas presentan una termotolerancia constitutiva. Se detienen en G₀ cuando se exponen a 37°C por períodos de tiempo largos y se mantienen resistentes a un tratamiento con calor letal (50°C) (Plesset *et al.*, 1987). Si las cepas mutantes *hsr* presentan tiempos de duplicación más largos en comparación con la cepa silvestre y esto correlaciona con los niveles de termotolerancia, entonces esta característica podría estar asociada a los mecanismos que regulan el ciclo celular.

Folch y cols. (manuscrito en preparación) demostraron que *hsr2-1* es un alelo del gen *CDC25*, que codifica para el factor intercambiador de nucleótidos de guanina de las proteínas Ras. Este es un alelo diferente a los reportados anteriormente (Petitjean *et al.*, 1990) y presenta características similares a las células en fase estacionaria: elevada resistencia al choque térmico (50°C), paredes celulares engrosadas e hiperacumulación del glucógeno.

Por otro lado, A. Hernández (datos no publicados) ha observado que durante la fase de crecimiento exponencial, un 80% de las células del mutante *hsr2-1* no están gemando; mientras que en la cepa silvestre la relación de células que geman y células que no lo hacen es 50:50. Estos

datos son consistentes con la idea de que la velocidad del ciclo celular guarda una relación inversa con el nivel de termotolerancia basal.

La elevada frecuencia de reversión espontánea no se elimina por un tratamiento desnaturalizante

La elevada frecuencia de reversión del tamaño de colonia que presentan nuestras mutantes durante el crecimiento en 25°C (Casas, 1998) (**Anexo 1, Tabla A.1**) es superior a la tasa de mutación espontánea reportada por Marini y cols. (1999) en las cepas de levadura auxótrofas *his⁻* y *trp⁻* durante el crecimiento exponencial, 2.2×10^{-7} y 1.7×10^{-7} respectivamente.

En el laboratorio se realizaron estudios en cepas no-hermanas que provenían de distintos eventos de reversión del tamaño de la colonia en el mutante *hsr2-1* (ScIBT2) (Casas, 1998) y del alelo *hsr4-1* (este trabajo). En estas cepas se determinó la sobrevivencia a estrés térmico letal y los resultados indicaron la existencia de dos formas diferentes de reversión: uno en el cual el fenotipo de reversión del tamaño de colonia chico correlaciona con la pérdida del nivel de termotolerancia y otro en el que la reversión de tamaño de la colonia ocurre sin pérdida de la termotolerancia. Por ejemplo, de 10 colonias revertantes obtenidas de la cepa *hsr4-1*, se encontró que todas redujeron dramáticamente los niveles de termotolerancia y aunque algunas fueron hasta 11 veces más tolerantes al tratamiento con relación a la cepa W303, presentaron una tolerancia entre 1000 a 100 veces menor al de la cepa parental mutante.

La literatura reporta que la sobreexpresión de la proteína Hsp104 en las cepas [*PSI⁺*] provoca reversión del fenotipo [*PSI⁺*] a [*psi⁻*], mientras que la delección del gen *HSP104*, ocasiona un fenotipo *PSNM* ([*PSI⁺*]- *no more*), aún sobreexpresando la proteína Sup35. Estas evidencias sugieren que la persistencia del fenotipo [*PSI⁺*] depende de la chaperona Hsp104 (Chernoff *et al.*, 1995) cuya función parece ser necesaria para que [*PSI⁺*] adopte y mantenga su conformación infectiva (Tuite y Lindquist, 1996).

Si la frecuencia de reversión en nuestras mutantes depende de un fenómeno epigenético mediado por Hsp104, ésta se debería de reducir en los mutantes dobles *hsr Δhsp104* ó se debería eliminar en los mutantes sencillos *hsr* por la expresión elevada de Hsp104 debido a la inducción por calor.

En este trabajo observamos que el tratamiento a 40°C era capaz de reducir la viabilidad en el mutante *hsr2-2* y en las revertantes espontáneas del inóculo inicial. Sin embargo cuando se regresa a 25°C esta mutante recupera el fenotipo de reversión. Estos resultados sugieren que el factor que promueve esta elevada reversión no depende de un factor desnaturalizable por calor dependiente de la actividad de Hsp104 ya que no es curable por inducción de la expresión de Hsp104 durante el crecimiento a temperaturas subletales ni por delección de *HSP104*.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en el laboratorio sugieren que la alta frecuencia de reversión del tamaño de la colonia del mutante *hsr2-1* (ScIBT2) y del mutante *hsr4-1*, no está asociada a un factor epigenético dependiente de Hsp104 ya que su ausencia, no “cura” a las células del fenotipo (Casas, 1998; este trabajo, datos no presentados).

Si la naturaleza de este fenotipo no es de tipo proteico, ¿es determinado por un mecanismo a nivel génico?

Para elucidar si esta característica es de tipo nuclear, analizamos la segregación de el tamaño de la colonia en tétradas provenientes de *hsr2-1 sgr1-1/HSR2* (diploide de la cruce de las cepas ScIBT10 y la silvestre) (**Anexo 3, Tabla E**). Observamos que el fenotipo en el mutante ScIBT10 es debido a un mecanismo de supresión extragénica que se encuentra en un locus distinto y no se encuentra ligado al de la termotolerancia ya que son separables.

Otras evidencias sugieren que la supresión en el alelo *hsr2-1* se trata de un mecanismo de supresión extragénica. Cuando el mutante *hsr2-1* (ScIBT2) fue cruzado con el mutante *hsr2-1 sgr1* (ScIBT10, una revertante de ScIBT2), el diploide manifestó un fenotipo silvestre para el tamaño de la colonia y mutante para el nivel de termotolerancia. Las esporas de este diploide, segregan en una proporción 2:2 para tamaño de colonia, sugiriendo que la frecuencia de supresión se debe a un mecanismo mendeliano dominante (Folch, datos no publicados). Es relevante hacer hincapié en que los resultados obtenidos en el laboratorio sugieren que el mecanismo de reversión más frecuente es el evento que resulta en células con tamaño de colonia grande que son sensibles al calor extremo. Casas (1998) aisló 20 cepas provenientes de eventos independientes de reversión en el tamaño de la colonia de *hsr2-1* (ScIBT2) y obtuvo 19 cepas sensibles y sólo una termotolerante (tipo *hsr2-1 sgr1-1*), mientras que en este trabajo se obtuvieron 10 cepas revertantes de *hsr4-1* (1(19b)) sensibles a calor.

Por otro lado, se sugiere que los elementos genéticos móviles (como el transposón Ty) son capaces de conferir una elevada frecuencia de mutación en el genoma, ya que su frecuencia de transposición varía entre 1×10^{-7} a 1×10^{-8} y ésta se incrementa durante la exposición a estrés. Un mecanismo similar se observa en el cambio del factor de apareamiento en cultivos de levadura

que tiene un mismo factor. Los cambios producidos por este tipo de mecanismos generan rearrreglos en las secuencias de algunos genes que destruyen un gen o alteran la regulación de los genes cercanos al lugar de la transposición, lo que pudiera explicar el fenotipo de alta reversión (Lewin, 1994).

Otros estudios sugieren que algunos agentes químicos como el dimetilsulfóxido (DMSO), el óxido de *N*-trimetilamina (TMAO) y el glicerol interfieren con la formación de las estructuras proteicas anómalas posiblemente estabilizando la conformación nativa (Tatzelt *et al.*, 1996). Sería conveniente realizar estudios en nuestras mutantes para determinar si estos agentes químicos protegen nuestras cepas de la reversión del fenotipo para tamaño de colonia.

Los resultados obtenidos en la **Figura 11** indican que, aunque la mutación en el alelo *hsr2-2* confiere una alta termotolerancia intrínseca por una exposición breve a temperatura extrema, estas cepas presentan una disminución dramática de la viabilidad durante la incubación continua a 40°C, tanto de las colonias mutantes como de las revertantes presentes en el cultivo, no así a 38°C. Esto sugiere que en este mutante existe un antagonismo entre ambos fenotipos. Por el contrario, en el alelo *hsr3-1* no disminuyó la viabilidad por el tratamiento a 40°C y no fue posible determinar la presencia de revertantes dado que este alelo presenta un tamaño de colonia similar al de la cepa silvestre (**Figura 12**).

Esto nos indica que los factores que contribuyen a conferir una alta termotolerancia intrínseca al mutante *hsr2-1* dependen de la pérdida de alguna función de *HSR2*, la cual es requerida para el crecimiento continuo a 40°C. Esto sugiere que el producto de *HSR2* regula ambas funciones. Sin embargo el fenotipo de la mutante *hsr3-1* sugiere que la regulación de ambas respuestas, el crecimiento continuo a 40°C y la tolerancia a un choque breve a 50°C, está bifurcada y, por lo tanto, el producto de *HSR3* sólo regula la termotolerancia basal.

CONCLUSIONES.

1. En los casos estudiados, la frecuencia de reversión espontánea para el tamaño de la colonia en los mutantes *hsr* parece ser independiente de un prión. Para el mutante *hsr2-1* se observan dos fenotipos diferentes de reversión espontánea. Hasta el momento se ha determinado mediante el análisis genético que la cepa ScIBT10 (*hsr2-1 sgr1-1*) proviene de un mecanismo de supresión extragénica.
2. La correlación observada entre la sobrevivencia al calor extremo y el tiempo de duplicación de los mutantes *hsr* sugiere que posiblemente se encuentren afectados en estos mutantes algunos factores involucrados tanto en el control de la vía de regulación y/o señalización para la progresión del ciclo celular como en la termotolerancia.
3. El fenotipo que tiene la mutantes *hsr2-2*, sugiere que los factores involucrados en la protección de las células en respuesta a una exposición breve a una temperatura extrema (50°C) son diferentes a los involucrados en la tolerancia a una incubación a temperatura moderadamente alta (40°C) durante períodos de tiempo largos.
4. En la mutante *hsr4-1*, la termotolerancia es independiente de la presencia o ausencia de la proteína Hsp104 en todos los estadios de la curva de crecimiento, mientras que en las mutantes *hrs3-1*, *hsr2-1* y *hr2-3* su ausencia reduce la sobrevivencia a exposición a choque térmico letal durante la fase logarítmica. La contribución de otros factores en las fases tardías podría suplir la ausencia de Hsp104 en el mutante *hsr2-1*.
5. La actividad de β -galactosidasa regulada por diferentes elementos promotores de respuesta a estrés es constitutiva en la mayoría de los mutantes *hsr* a temperatura ambiente y este fenotipo correlaciona con su alta termotolerancia intrínseca. Podemos suponer que en las cepas *hsr*, durante la fase de crecimiento logarítmico la actividad de los distintos factores que regulan en *trans* a los genes de estrés se desreprime. Entre estos podemos mencionar a la familia Yap1, a los Msn2, Msn4 a Hsf y a Skn7.
6. El análisis de la actividad del gen reportero regulado por el elemento *STRE* en *hsr2-1 sgr1-1*, sugiere que Cdc25 tiene un papel importante en la regulación de la termotolerancia a través de

una vía independiente a Ras/PKA o que los umbrales de actividad de la PKA para mantener un control negativo de la actividad de los factores que actúan en *trans* a través de *STRE*, *HSE* y *ARE* son diferentes.

PERSPECTIVAS

1. En el futuro, la determinación de la actividad de β -galactosidasa regulada por el elemento *HSE* en los diferentes fondos genéticos mutantes permitirá elucidar si en estas cepas existe una desregulación en esta vía de respuesta a estrés.
2. El análisis de la actividad de la β -galactosidasa regulada con diferentes elementos de respuesta al estrés en las cepas que contienen mutaciones en el gen *CDC25* revelará detalles más precisos de los efectos y la regulación de este gen.
3. La clonación molecular de los genes que confieren termotolerancia en los mutantes *hsr* permitirá un análisis más detallado de los mecanismos que intervienen en conferir este fenotipo.
4. El estudio sistemático del fenómeno de reversión permitirá elucidar los mecanismos que promueven este fenotipo en las mutantes *hsr*.

BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, B. G. and Walden, D. B. 1985. Changes in eucaryotic gene expression in response to environmental stress. Academic Press Inc., London. 339 pp.
- Barnes, C. A., Johnston, G. C. and Singer, R. A. 1990. "Thermotolerance is independent of induction of the full spectrum of heat shock proteins and of cell cycle blockage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **172**: 4352-4358.
- Bell, J., Neilson, L. and Pellegrini, M. 1988. "Effect of heat shock on ribosome synthesis in *Drosophila melanogaster*". *Mol. Cell. Biol.* **8**: 91-95.
- Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., van der Zee, P. and Wiemken, A. 1992. "Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation". *Eur. J. Biochem.* **209**: 951-959.
- Boorstein, W. R. and Craig, E. A. 1990. "Transcriptional regulation of *SSA3*, an *HSP70* gene from *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **10**: 3262-3267.
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H. and Jacquet, m. 1998. "Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **180**: 1044-1052.
- Broach, J.R. 1991. "RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway". *Trends Genet.* **7**: 28-33.
- Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S. and Wigler, M. 1987. "The *S. cerevisiae CDC25* gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway". *Cell* **48**: 789-799.
- Bukau, B. and Horwich, A. 1998. "The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines". *Cell* **92**: 351-366.
- Camonis, J. and Jacquet, M. 1988. "A new RAS mutation that suppresses the *CDC25* gene requirement for growth of *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2980-2903.
- Casas, S. 1998. Caracterización genética y molecular de mutantes con una termotolerancia intrínseca elevada de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología-UNAM. Cuernavaca, Mor.
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. and Horwich, A. L. 1989. "Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria". *Nature* **337**: 620-625.
- Chernoff, Y. O., Lindquist, S., Ono, B., Inge-Vechtomov, S. G. and Liebman, S. W. 1995. "Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi+*]"'. *Science* **268**: 880-884.
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauweks, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.-F., Colavizza, D., and J.M. Thevelein. 1998. "Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *EMBO J.* **17**: 3326-3341.
- Coote, P. J., Jones, M. V., Seymour, I. J., Rowe, D. L., Ferdinando, D. P., McArthur, A. J. and Cole, M. B. 1994. "Activity of plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol.* **140**: 1881-1890.
- Corkidi, G., Diaz-Urbe, R., Folch-Mallol, J.L., and J. Nieto-Sotelo. 1998. "COVASIAM: an image analysis method that allows detection of confluent microbial colonies and colonies of various sizes for automated counting". *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1400-1404.

- Craig, E. and Gross, C. A. 1991. "Is hsp70 the cellular thermometer?". *Trends Biochem. Sci.* **16**: 135-139.
- Créchet, J., Pouillet, P., Camonis, J., Jacquet, M. and Parmeggiani, A. 1990. "Different kinetic properties of the two mutants, *RAS2^{Ile152}* and *RAS2^{Val19}*, that suppress the *CDC25* requirement in RAS/adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **265**: 1563-1588.
- De Virgilio, C., Piper, P., Boller, T. and Wiemken, A. 1991. "Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp104 and in the absence of protein synthesis". *FEBS Lett.* **288**: 86-90.
- De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Boller, T. and Wiemken, A. 1993. "Disruption of *TPS2*, the gene encoding 100 kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase-phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity". *Eur. J. Biochem.* **212**: 315-323.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. and Wiemken, A. 1994. "The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant". *Eur. J. Biochem.* **219**: 179-186.
- Debec A, Marcaillou C. 1997. "Structural alterations of the mitotic apparatus induced by the heat shock response in *Drosophila* cells". *Biol. Cell.* **89**:67-78.
- DeFeo-Jones, D., Tatchell, K., Robinson, L. C., Sigal, I., Vass, W., Lowy, D. and Scolnick, E. 1985. "Mammalian and yeast *ras* gene products: biological function in their heterologous systems". *Science* **228**: 179-184.
- Elliott, B. and Futcher, B. 1993. "Stress resistance of yeast cells is largely independent of cell cycle phase". *Yeast* **9**: 33-42.
- Falkner, F. G., Saumweber, H. and Biessman, H. 1981. "Two *Drosophila melanogaster* proteins related to intermediate filament proteins of vertebrate cells". *J. Cell. Biol.* **91**: 175-183.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. and Struhl, K. 1997. "Yap, a novel family of eight bzip proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions". *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6982-6993.
- Gietz, D., St.Jean, A., Woods, R. A. and Schiestl, R. H. 1992. "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells". *Nucleic Acids Res.* **20**: 1425.
- Glover, J. R. and Lindquist, S. 1998. "Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins". *Cell* **94**: 73-82.
- Goldberg, D., Segal, M., Levitzki, A. 1994. "Cdc25 is not the signal receiver for glucose induced cAMP response in *S. cerevisiae*". *FEBS Lett.* **356**: 249-254.
- Gounalaki, N. and Thireos, G. 1994. "Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response". *EMBO J.* **13**: 4036-4041.
- Görner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M. T., F., E., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. and Schüller, C. 1998. "Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity". *Genes Dev.* **12**: 586-597.
- Grant, C. M., Collinson, L. P., Roe, J. H. and Dawes, I. W. 1996. "Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for Yap-1 transcriptional regulation". *Mol. Microbiol.* **21**: 171-179.
- Gross, E., Goldberg, D., and A. Levitski, 1992. "Phosphorylation of the *S. cerevisiae* Cdc25 in response to glucose results in its dissociation from Ras". *Nature* **360**: 762-765.
- Guarente, L. and Ptashne, M. 1981. "Fusion of *Escherichia coli lacZ* to the cytochrome c gene of *Saccharomices cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 2199-2203.

- Hall, B. G. 1983. "Yeast thermotolerance does not require protein synthesis". *J. Bacteriol.* **156**: 1363-1365.
- Harshman K. D., Moye-Rowley W. S., Parker C. S. 1988. "Transcriptional activation by the SV40 AP-1 recognition element in yeast is mediated by a factor similar to AP-1 that is distinct from GCN4". *Cell* **53**: 321-30.
- Hartl, F. U. 1996. "Molecular chaperones in cellular protein folding". *Nature* **381**: 571-580.
- Hartwell, L. H. 1974. "*Saccharomyces cerevisiae* cell cycle". *Bacteriol. Rev.* **38**: 164-198.
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. and Buchner, I. 1999. "Hsp26: a temperature-regulated chaperone". *EMBO J.* **18**: 6744-6751.
- Hertle, K., Haase, E. and Brendel, M. 1991. "The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals". *Curr. Genet.* **19**: 429-433.
- Hirata, D., Yano, K. and Miyakawa, T. 1994. "Stress-induced transcriptional activation mediated by *YAP1* and *YAP2* genes that encode the Jun family of transcriptional activators in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **242**: 250-256.
- Hottiger, T., Schmutz, P. and Wiemken, A. 1987. "Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **169**: 5518-5522.
- Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken, A. 1987. "Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts". *FEBS Lett.* **220**: 113-115.
- Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken, A. 1989. "Correlation between trehalose content and heat resistance in yeast mutants altered in the Ras/adenylate cyclase pathway: is trehalose a thermoprotectant?". *FEBS Lett.* **255**: 431-434.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Bell, W., Boller, T. and Wiemken, A. 1992. "The 70-kilodalton heat-shock proteins of the SSA subfamily negatively modulate heat-shock induced accumulation of trehalose and promote recovery from thermal stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Eur. J. Biochem.* **210**: 125-132.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M. N., Boller, T. and Wiemken, A. 1994. "The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro." *Eu. J. Biochem.* **219**: 187-193.
- Iida, H. and Yahara, I. 1984. "A heat shock resistance mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth". *J. Cell Biol.* **99**: 1441-1450.
- Jacquier-Sarlin, M. R. and Polla, B. S. 1996. "Dual regulation of heat-shock transcription factor (*HSF*) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: role of thioredoxin". *Biochem. J.* **1996**: 187-193.
- Jakobsen, B. K. and Pelham, H. R. 1988. "Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo". *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5040-5042.
- James, P., Pfund, C. and Craig, E. A. 1997. "Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones". *Science* **275**: 387-389.
- Jones, S., Vignais, M. and Broach, J. R. 1991. "The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to Ras". *Mol. Cell Biol.* **11**: 2641-2646.
- Kamada, Y., Sung-Jung, U., Piotrowski, J. and Levin, D. 1995. "The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response". *Genes Dev.* **9**: 1559-1571.
- Kobayashi, N. and McEntee, K. 1993. "Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell Biol.* **13**: 248-256.

- Kuge, S. and Jones, N. 1994. "YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides". *EMBO J.* **13**: 655-664.
- Kuge, S., Jones, N. and Nomoto, A. 1997. "Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress". *EMBO J.* **16**: 1710-1720.
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L. and Lindquist, S. 1986. "An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis". *Science* **231**: 1154-1157.
- Lai, C.-C., Boguski, M., Broek, D., and S. Powers. 1993. "Influence of guanine nucleotides on complex formation between Ras and Cdc25 proteins". *Mol. Cell Biol.* **13**: 1345-1352.
- Lazlo, A. 1992. "The effects of hyperthermia on mammalian cells structure and function". *Cell. Prolif.* **25**: 59-87.
- Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press Inc. New York, USA. 990 p.
- Lillie, S. H. and Pringle, J. R. 1980. "Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: response to nutrient limitation". *J. Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
- Lindquist, S. and Craig, E. A. 1988. "The heat-shock proteins". *Annu. Rev. Genet.* **22**: 631-677.
- Louvion, J. F., Abbas-Terki, T. and Picard, D. 1998. "Hsp90 is required for pheromone signaling in yeast". *Mol. Biol. Cell.* **9**: 3071-3083.
- Mager, W. H. and De Krujiff, A. I. 1995. "Stress-induced transcriptional activation". *Microbiol. Rev.* **59**: 506-531.
- Marchler, G., Schüller, C., Adam, G. and Ruis, H. 1993. "A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions". *EMBO J.* **12**: 1997-2003.
- Marini, A., Matmati, N. and Morpurgo, G. 1999. "Starvation in yeast increases non-adaptative mutation". *Curr. Genet.* **33**: 77-81.
- Martinez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F. 1996. "The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (*STRE*)". *EMBO J.* **15**: 2227-2235.
- Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y. and Ishikawa, T. 1982. "Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase". *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **79**: 2355-2359.
- Meilhoc, E., Masson, J-M. and Teissié, J. 1990. "High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses". *Biotechnol.* **8**: 223-227.
- Miernyk, J. A. and Hayman, T. G. 1996. "ATPase activity and molecular chaperone function of the stress70 proteins". *Plant Physiol.* **110**: 419-424.
- Miller, M. J., Xuong, N. and Geiduschek, E. P. 1979. "A response of protein synthesis to temperature shift in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5222-5225.
- Mintzer K. A., Field J. 1999. "The SH3 domain of the *S. cerevisiae* Cdc25p binds adenylyl cyclase and facilitates Ras regulation of cAMP signalling". *Cell Signal* **11**:127-35.
- Moye, W. S. and Zalkin, H. 1985. "Deletion mapping the yeast TRP5 control region". *J. Biol. Chem.* **260**: 4718-4723.
- Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D. and Parker, C. S. 1989. "Yeast YAP1 encodes a novel form of the jun family of transcriptional activator proteins". *Genes Dev.* **3**: 283-292.

- Munder, T., Mink, M. and Käntzel, H. 1988. "Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene controlling mitosis and meiosis". *Mol. Gen. Genet.* **214**: 271-277.
- Nathan, D. F., Vos, M. H. and Lindquist, S. 1997. "In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 12949-12956.
- Nicolet, C. M. and Craig, E. A. 1991. "Inducing and assaying heat-response in *Saccharomyces cerevisiae*". *Methods Enzymol.* **194**: 710-717.
- Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A. and Parker, C. S. 1990. "The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions". *Cell* **62**: 807-817.
- Nover, L. 1991. Heat shock response. Ed. L. Nover. CRC press, Inc., Boca Raton, F.L. 409-452 pp.
- Pagano M, Gauvreau, K. 2001. 2^{da} Ed. Fundamentos de Bioestadística. International Thomson Editores. 525 p.
- Panaretou, B. and Piper, P. W. 1990. "Plasma-membrane ATPase action affects several stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as well as the extent and duration of the heat shock response". *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1763-1770.
- Paris, S. and Pringle, J. R. 1983. "*Saccharomyces cerevisiae*: heat and glucosylase sensitivities of starved cells". *Ann. Microbiol. (Paris)*. **134B**: 379-385.
- Parry, J. M., Davies, P. J. and Evans, W. E. 1976. "The effects of "cell age" upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Gen. Genet.* **146**: 27-35.
- Parsell, D. A. and Lindquist, S. 1993. "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damage proteins". *Ann. Rev. Genet.* **27**: 437-496.
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A. and Linquist, S. 1994. "Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hs104". *Nature* **372**: 475-478.
- Patriarca, E. J. and Maresca, B. 1990. "Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*". *Exp. Cell. Res.* **190**: 57-64.
- Petitjean, A., Hilger, F. and Tatchell, K. 1990. "Comparison of thermosensitive alleles of the CDC25 gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics* **124**: 729-806.
- Plesset, J., J.R., L., Cox, B. S. and McLaughlin, C. s. 1987. "Effect of cell cycle position on the thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.* **169**: 779-784.
- Quilliam, L. A., Khosravi-Far, R., Huff S. Y., and C. J. Der. 1995. "Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins". *BioEssays* **17**: 395-404.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H.. 1999. "Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p". *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5474-85.
- Ribeiro, M., Reinders, A., Boller, T., Wiemken, A. and De Virgilio, C. 1997. "Trehalose synthesis is important for the acquisition of thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*". *Mol. Microbiol.* **25**: 571-581.
- Robinson, L. C., Gibbs, J. B., Marshall, M. S., Sigal, I. S. and Tatchell, K. 1987. "cdc25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*". *Science* **235**: 1218-1221.
- Rose, M. and Botstein, D. 1983. "Construction and use of gene fusions to *lacZ* (beta-galactosidase) that are expressed in yeast". *Methods Enzymol.* **101**: 167-180.

- Rose, M. D., Novick, P., Thomas, J. H., Botstein, D., Fink, G. R. 1987. "A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector". *Gene* **60**: 237-43.
- Ruis, H. and Schüller, C. 1995. "Stress signaling in yeast". *Bioessays* **17**: 959-965.
- Sánchez, Y., Lindquist, S. L. 1990. "HSP104 required for induced thermotolerance". *Science* **248**:1112-1115.
- Sánchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A., Lindquist, S. 1993. "Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70". *J. Bacteriol.* **175**: 6484-6491.
- Sánchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A. and Lindquist, S. 1992. "Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress". *EMBO J.* **11**: 2357-2364.
- Sato, N. and Murata, N. 1980. "Temperature shift-induced responses in lipids in the blue-green alga *Anabaena variabilis*: the central role of diacylmonogalactosylglycerol in thermo-adaptation". *Biochim. Biophys. Acta* **619**: 353-366.
- Schenberg-Francino, A. and Moustacchi, E. 1972. "Lethal and mutagenic effects of elevated temperature on haploid yeast. I. Variations in sensitivity during the cell cycle". *Mol. Gen. Genet.* **115**: 243-257.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. 1989. "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier". *Curr. Genet.* **16**: 339-346.
- Schirmer, E. C. and Lindquist, S. 1997. "Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian Prp". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 13932-13937.
- Schnell, N. and Entian, K. D. 1991. "Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (*PAR1*) conferring resistance to iron chelators". *Eur. J. Biochem.* **200**: 487-493.
- Schüller, C., Brewster, J. L., Alexander, M. R., Gustin, M. C. and Ruis, H. 1994. "The *HOG* pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (*STRE*) of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene". *EMBO J.* **13**: 4382-4389.
- Sewell, A. K., Yokoya, F., Yu, W., Miyagama, T., Murayana, T. and Winge, D. R. 1995. "Mutated yeast heat shock transcription factor exhibits elevated basal transcriptional activation and confers metal resistance". *J. Biol. Chem.* **270**: 25079-25086.
- Seymour, I. J. and Piper, P. W. 1999. "Stress induction of *HSP30*, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors". *Microbiol.* **145**: 231-239.
- Shin, D. Y., Matsumoto, K., Iida, H., Uno, I. and Ishikawa, T. 1987. "Heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae* mutants altered in cyclic AMP-dependent protein phosphorylation". *Mol. Cell. Biol.* **7**: 244-250.
- Singer, M. and Lindquist, S. 1998. "Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Ying and Yang of trehalose". *Trends in Biotechnol.* **16**: 460-468.
- Slater, M. R. and Craig, E. A. 1987. "Transcriptional regulation of an *HSP70* heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1906-1916.
- Sorger, P. K., Lewis, M. J. and Pelham, H. R. 1987. "Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells". *Nature* **329**: 81-84.
- Sorger, P. K. and Pelham, H. R. 1987. "Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast". *EMBO J.* **6**: 3035-3041.
- Sorger, P. K. and Nelson, H. C. 1989. "Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif". *Cell* **59**: 807-813.

- Sorger, P. K. 1990. "Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators". *Cell* **62**: 793-805.
- Sorger, P. K. 1991. "Heat shock factor and the heat shock response". *Cell* **65**: 363-366.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Tamanoi, F., Kaziro, Y., Matsumoto, K. and Toh-e, A. 1990. "IRA2, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian GTPase-activating protein". *Mol. Cell Biol.* **10**: 4303-4313.
- Tatzelt, J., Prusiner, S.B. and Welch W.J. 1996. "Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein". *EMBO J.* **15**: 6363-6373.
- Thevelein, J. M. 1991. "Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the Ras-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control". *Mol. Microbiol.* **5**: 1301-1307.
- Thevelein, J. M. and de Winde, J. H. 1999. "Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* **33**: 904-918.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. and Wingler, M. 1987. "Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase". *Cell* **50**: 277-287.
- Tuite, M. F. and Lindquist, S. L. 1996. "Maintenance and inheritance of yeast prions". *Trends Genet.* **12**: 467-471.
- Van Aelst, L., Boy-Marcotte, E., Camonis, J., Thevelein, J. and Jacquet, M. 1990. "The C-terminal part of the CDC25 gene product plays a key role in signal transduction in the glucose-induced modulation of cAMP level in *Saccharomyces cerevisiae*". *Eur. J. Biochem.* **193**: 675-680.
- Varela, J. C., Praekel, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J. and Mager, W. H. 1995. "The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A". *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6232-6245.
- Weitzel, G., Pilatus, U. and Rensing, L. 1987. "The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat shock inducing treatments in yeasts". *Exp. Cell Res.* **170**: 64-79.
- Wemmie, J. A., Szczyepka, M. S., Thiele, D. J. and Moye-Rowley, W. S. 1994. "Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1". *J. Biol. Chem.* **269**: 32592-32597.
- Werner-Washburne, M., Braun, E., Crawford, M. E. and Peck, V. M. 1996. "Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol. Microbiol.* **19**: 1159-1166.
- Wickner, R. B. 1994. "[URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*". *Science* **264**: 566-569.
- Widelitz, R. B., Magun, B. E. and Gerner, E. W. 1986. "Effects of cycloheximide on thermotolerance expression, heat shock protein synthesis, and heat shock protein mRNA accumulation in rat fibroblast". *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1088-1094.
- Wiederrecht, G., Shuey, D. J., Kibbe, W. A. and Parker, C. S. 1987. "The *Saccharomyces* and *Drosophila* heat shock transcription factors are identical in size and DNA binding properties". *Cell* **48**: 507-515.
- Wiemken, A. 1990. "Trehalose in yeast stress protectant rather than reserve carbohydrate". *Antonie van Leeuwenhoek* **58**: 209-217.
- Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schüller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiez, Z. and Bilinski, T. 1991. "Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Biol. Chem.* **266**: 12406-12411.

- Winderickx, J., de Winde, J. H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M. 1996. "Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of *STRE*-mediated transcription control?". *Mol. Gen. Genet.* **252**: 470-482.
- Wu, A. L. and Moye-Rowley, W. S. 1994. "*GSH1*, which encodes gamma-glutamylcysteine synthetase, is a target gene for *yAP-1* transcriptional regulation". *Mol. Cell. Biol.* **14**: 5832-5839.
- Yost, H. J. and Lindquist, S. 1986. "RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis". *Cell* **45**: 185-193.

ANEXO 1

Tabla A. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el presente trabajo

Cepa	Genotipo	Descripción	Fuente
W303a-Leu ⁺	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	cepa silvestre-Leu ⁺ (wr)	1
<i>Δhsp104</i>	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 Δhsp104::LEU2</i>	<i>Δhsp104</i> en W303	1
W303-6B	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	cepa silvestre (wr)	3
W303 6BUL	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1</i>	transformante W303-6B con YCp50: <i>CEN, URA3 LEU2</i>	7
W303/STRE	<i>MATa can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 rpl1-1 ?::LEU2 wra3-1:: URA3/STRE-lacZ</i>	W303-Leu ⁺ transformada con el vector integrativo p18/7 (STRE::lacZ)	5
ScIBT1	<i>MATa hsr+1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	mutagénesis de la W303-Leu ⁺ con EMS	5
ScIBT2	<i>MATa hsr-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	"	5
ScIBT3	<i>MATa hsr-2 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	"	5
ScIBT6	<i>MATa hsr-3 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	"	5
ScIBT7	<i>MATa hsr-3 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	"	5
ScIBT10	<i>MATa hsr-1 sgr1-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	"	5
ScIBT14	<i>MATa hsr-6 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	"	5
1(19b)	<i>MATa hsr+1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	Derivada de ScIBT1 y W303-6B	5
JF099	<i>MATa hsr-1 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	Derivada de ScIBT2 y W303-6B	5
JF416	<i>hsr-2 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	Derivada de SC0074 y W303-6B	5
JF431	<i>hsr-2 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	Derivada de SC0074 y W303-6B	5
JF505	<i>hsr-6 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	Derivada de ScIBT14 y W303-6B	5
JF601	<i>hsr-3 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	Derivada de ScIBT6 y W303-6B	5
JF612	<i>hsr-3 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	Derivada de ScIBT6 y W303-6B	5
SC0074	<i>MATa hsr-2 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1 rpl1-1 ?::LEU2</i>	Derivada de ScIBT3 y W303-6B	6
LV0025	<i>hsr-3 can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 wra3-1</i>	Derivada de ScIBT7 y W303-6B	7
LV0042	<i>MATa hsr-3 can1-100, ade2-1, his3-11,15, leu2-3,12 wra3-1, rpl1-1 ?::LEU2</i>	Derivada de LV0025 y W303-6B	

L V0047	MATa hsr2-3, can1-100, ade2-1, his3-11.15, leu2-3,12 wa3-1, np1-1?::LEU2	Derivada de L V0025 y W303-6B	7
L V0060	hsr4-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1 np1-1?::LEU2	Derivada de ScIBT1 y W303-6B	7
L V0092	MATa hsr4-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1	Derivada de L V0060 y W303-6B	7
L V0123	hsr4-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1 np1-1 Δhsp104::LEU2	Derivada de L V0092 y Δhsp104	7
L V0125	hsr4-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1	"	7
L V0143	hsr4-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 np1-1 wa3-1::URA3/STRE-lacZ	Derivada de L V0092 y W303/STRE	7
L V0201	hsr2-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1::URA3/STRE-lacZ	Derivada de JF099 y W303/STRE	7
L V0202	hsr2-1 sgr1-2 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1::URA3/STRE-lacZ	revertiente espontánea para tamaño de colonia de L V0201	7
L V0208	MATa hsr2-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1 np1-1 Δhsp104::LEU2	Derivada de JF099 y Δhsp104	7
L V0210	MATa hsr2-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1	"	7
L V0506	hsr6-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1::URA3/STRE-lacZ	Derivada de JF505 y W303/STRE	7
L V0605	hsr3-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1	Derivada de JF601 y Δhsp104	7
L V0606	hsr3-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1 np1-1 Δhsp104::LEU2	"	7
L V0620	hsr3-1 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 np1-1 wa3-1::URA3/STRE-lacZ	Derivada de JF601 y W303/STRE	7
L V0622	MATa hsr3-1/HSR3	Derivada de JF601 y W303	
L V0724	hsr2-3 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1	Derivada de L V0042 y W303-6B	7
L V0771	hsr2-3 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1 np1-1 Δhsp104::LEU2	Derivada de L V0724 y Δhsp104	7
L V0772	hsr2-3 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1	"	7
L V0780	hsr2-3 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 np1-1 wa3-1::URA3/STRE-lacZ	Derivada de L V0724 y W303/STRE	7
L V0786	MATa hsr2-2/HSR2	Derivada de SC0074 y W303-6B	7
L V0790	hsr2-2 sgr4 can1-100 ade2-1 his3-11.15 leu2-3,12 wa3-1 np1-1?::LEU2	Revertiente espontánea para tamaño de colonia de JF416	7
L RA88	MATa hsr4 leu2 wa3-52 CDC25	cepa silvestre [wt] CDC25	4
L RA24	MATa hsr4 leu2 wa3-52 cdc25-10	cdc25 ^{ts}	4
L RA25	MATa hsr4 leu2 wa3-52 cdc25-1	"	4
L RA26	MATa hsr4 leu2 wa3-52 cdc25-5	"	4
HE61-4A	MATa HSR1 his3-D1 leu2-3,112 np1-289 wa3-52 gal	cepa silvestre [wt] HSR1	2
HE61-4B	MATa hsr1 his3-D1 leu2-3,112 np1-289 wa3-52 gal	hsr1 (gyr1)	2

- Fuente:
 1. Sánchez y Lindquist, 1990
 2. Iida y Yahara, 1984.
 3. Proporcionada por el Dr. Roberto Gaxiola.
 4. Petitjean y col., 1990.
 5. Dr. Jorge Luis Folch.
 6. Casas, 1998.
 7. Este trabajo.

Plásmidos:

§	Vectores:	pf11	Construcción quimérica con origen de replicación multicopia del promotor de <i>HSP26</i> y el elemento HSE2 de <i>SSA1</i> (Hsp70) (Slater & Craig, 1987; Guarente & Plashne, 1981).
		p18/7	Plásmido integrativo que se dirige al locus <i>URA3</i> . Contiene siete elementos STRE en tandem (Marchler <i>et al.</i> , 1993).
		PLGABS	contiene cuatro elementos ARE en tandem (Harshman <i>et al.</i> , 1988)
		pTEP9	Plásmido integrativo que se dirige al locus <i>LEU2</i> . Contiene una quimera <i>ARE-TRP5-lacZ</i> (Moye and Zalkin, 1985).
		pSM27	Plásmido que permite deletar el gen <i>YAP1</i> mediante el cassette <i>yap1-Δ1::HIS3</i> . Obtenido a través del Dr. Scott Moye-Rowley.
		Ycp50	vector centromérico que contiene origen de replicación de <i>E. coli</i> y levadura (Rose <i>et al.</i> , 1987).
		Banco	de DNA genómico silvestre de la levadura <i>S. cerevisiae</i> en Ycp50 en la cepa de <i>E. coli</i> ED8767 (Rose <i>et al.</i> , 1987).

Mutante	Alelo	% Sobreviv ¹	Tamaño de colonia	Crecimiento en glicerol	Crecimiento en acetato	Caracter	Frecuencia reversión
ScIBT5	<i>hsr1</i>	15.1 ± 6.5	casi silvestre	-	+	r	< 3 x 10 ⁻³
ScIBT2	<i>hsr2-1</i>	56 ± 2.9	chica	-	+	r	7 x 10 ⁻³
ScIBT3	<i>hsr2-2</i>	34.3 ± 2.8	chica	+	-	r	4 x 10 ⁻³
ScIBT7	<i>hsr2-3</i>	3.1 ± 1.6	chica	-	-	r	< 1 x 10 ⁻³
ScIBT10	<i>hsr2-1 sgr1-1</i>	5	silvestre	+	+	r	n.d.
ScIBT6	<i>hsr3-1</i>	2.74 ± 1.6	silvestre	+	+	r	n.d.
ScIBT9	<i>hsr3-2</i>	4.0 ± 1.8	silvestre	+	+	r	n.d.
ScIBT11*	<i>hsr3-4 sgr3</i>	7	silvestre	+	-	r	n.d.
ScIBT12*	<i>hsr3-3</i>	1 ± 0.3	chica	-	-	r	< 8 x 10 ⁻⁴
ScIBT13*	<i>hsr3-4</i>	1.3 ± 0.4	chica	-	-	r	< 3 x 10 ⁻⁴
ScIBT15	<i>hsr3-5</i>	0.9 ± 1.0	casi silvestre	+	+	r	< 7 x 10 ⁻³
ScIBT16	<i>hsr3-6</i>	0.2 ± 0.07	Silvestre	+	+	r	n.d.
ScIBT1	<i>hsr4-1</i>	60.5 ± 15.5	chica	-	-	cd	1 x 10 ⁻³
ScIBT4	<i>hsr4-1 sgr2</i>	30.6 ± 4.1	chica	-	-	cd	6 x 10 ⁻³
ScIBT8	<i>hsr5-1</i>	5.5 ± 4.8	silvestre	+	+	r	n.d.
ScIBT14	<i>hsr6-1</i>	1.0 ± 0.9	silvestre	+	+	r	n.d.
W303a	<i>w1</i>	0.03	silvestre	+	+	-	-

¹% Sobrevivencia a 50°C por 20 minutos
n.d.= no determinado; r=recesivo; cd=codominante
* Contiene una auxotrofia adicional a la progenitora W303a, causada con EMS

Tabla A.1. Mutantes *hsr* que presentan niveles de termotolerancia intrínseca pertenecientes a 6 grupos de complementación de acuerdo a los ensayos de alelismo realizados en este trabajo (Modificación a la Tabla I publicada por Casas, 1998).

ANEXO 2

Cuando se requieren diferenciar tres o más medias se emplea un método de análisis que se conoce con el nombre de Análisis de Varianza (ANOVA). ANOVA es una prueba semejante a la prueba de *T student*, pero la comparación entre grupos es a través de la varianza de la variable numérica “y”, en cada grupo de la variable categórica “x” (Pagano *et al.*, 2001). El análisis de varianza solamente indica si existe una diferencia significativa o no entre las muestras, sin señalar cuáles son las muestras que difieren. En cambio en la prueba de Tukey HSD se puede determinar si existe una diferencia entre cada par de muestras comparadas, mostrando cuáles son las muestras que difieren entre sí.

Actividad de β -galactosidasa a través del plásmido p β 11.

Se planteó como Hipótesis Nula que no existen diferencias en la actividad de β -galactosidasa de la cepa en la condición control y después de la inducción por calor. Como Hipótesis Alternativa: se determina si un grupo es diferente del otro. La comparación de medias *post-hoc*, denominada prueba de **Tukey HSD**, se determinó con un intervalo de confianza de 0.05, para conocer cuáles eran las muestras que diferían entre sí.

Para determinar si existe una diferencia significativa en la actividad del gen reportero en un diferente estadio del desarrollo a 25°C ó después de inducción, comparamos los resultados obtenidos para las muestras en las tres etapas del estudio y observamos que en todas las cepas analizadas no existe diferencia entre ambas condiciones control. Por esta razón comparamos la actividad en las cepas que fueron expuestas a cada tratamiento durante el mismo lapso de tiempo.

La prueba *T* de variables independientes, es un método de análisis estadístico, que nos permitió comparar las medias de las diferentes cepas en la misma condición o tratamiento y determinar si existe una diferencia significativa entre ellas con un intervalo de confianza de 0.05 (Pagano *et al.*, 2001).

W303-p β 11					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
Control	100.73	77.92	137.02	21.43	6.18
25°C	127.13	83.61	267.48	53.86	15.55
39°C	1541.17	1247.42	1952.24	200.30	57.82

LV0724- p β 11 (<i>hsr2-3</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
Control	1236.975	979.614	1404.762	226.286	130.64
25°C	1242.377	1073.59	1477.311	209.831	121.14
39°C	2801.587	2377.40	3042.163	368.456	212.72

hsr1-p β 11					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
25°C	259.75	245.29	273.61	14.17	8.18
Control	291.75	207.69	397.16	96.52	55.73
39°C	1648.87	1298.21	1948.33	328.07	189.41

JF601- p β 11 (<i>hsr3-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
25°C	317.28	298.55	349.32	27.88	16.09
Control	377.70	338.25	420.69	41.33	23.86
39°C	2061.53	1983.20	2195.25	116.37	67.19

JF099-p β 11 (<i>hsr2-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
25°C	1752.15	1687.14	1836.83	63.704	31.852
Control	2052.74	1940.93	2194.13	110.63	55.320
39°C	2977.11	2077.29	4626.78	1134.1	567.06

LV0092- p β 11 (<i>hsr4-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
Control	1187.03	773.53	1469.81	366.08	211.36
25°C	1297.50	1212.21	1457.82	138.94	80.21
39°C	2043.95	1549.35	2781.91	651.32	376.04

ScIBT10- p β 11 (<i>hsr2-1 sgr1-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
Control	179.42	162.30	188.84	14.85	8.58
25°C	204.11	179.30	243.55	34.53	19.94
39°C	1567.7	1366.04	1674.84	174.81	100.93

JF505- p β 11 (<i>hsr6-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	Error
Control	224.52	209.96	244.48	17.88	10.32
25°C	234.20	200.78	252.49	28.98	16.73
39°C	1793.8	1728.03	1857.43	64.73	37.37

Tabla B. Análisis de Varianza para muestras dependientes*. Los resultados se ordenan de menor a mayor de acuerdo al promedio y las líneas a la derecha de la tabla indican los casos en que no existe diferencia significativa entre las muestras con un 0.05 de confianza.

* Programa STATISTICA versión 5.1, Ed 1998.

Cepa	Alelo	Control a 25°C*		Inducción a 39°C	
		sv	p	sv	p
hsr1	<i>hsr1</i>	13	1.21E-03	13	4.71E-01
JF099	<i>hsr2-1</i>	14	3.34E-17	14	5.11E-04
SCIBT10	<i>hsr2-1 sgr1-1</i>	13	3.71E-02	13	8.37E-01
LV0724	<i>hsr2-3</i>	13	1.44E-10	13	1.42E-06
JF601	<i>hsr3-1</i>	13	6.12E-05	13	9.53E-04
LV0092	<i>hsr4-1</i>	13	2.72E-12	13	2.80E-02
JF505	<i>hsr6-1</i>	13	6.18E-03	13	5.54E-02

Cuando:

p < 0.05 existe una diferencia significativa y los valores son marcados en negritas.

p > 0.05 no existe una diferencia significativa entre las muestras que se están comparando.

SV se refiere a los grados de libertad.

*1.5 horas después de alcanzar una D.O. de 0.4

Tabla C. Prueba de T para variables independientes*. Para determinar si existe diferencia entre la actividad de las mutantes con relación a la actividad de la cepa silvestre, se compararon los niveles de β -galactosidasa de la cepa silvestre con las mutantes regulada por p β 11. *Programa STATISTICA versión 5.1, Ed 1998.

ANEXO 3

Al efectuar el análisis de Varianza de la actividad de las cepas reguladas por el promotor *STRE*, observamos que en casi todas las cepas analizadas no existe diferencia entre ambas condiciones control (datos no presentados). Se presentan algunos resultados representativos.

W303- STRE						LV0201- STRE (<i>hsr2-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE		MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
Control	36.071	20.130	55.784	13.512	4.074	25°C.	462.205	411.18	505.47	47.625	27.49
25°C.	43.007	22.957	67.070	13.331	4.020	Control	632.393	624.32	639.42	7.606	4.391
39°C.	225.820	154.39	434.15	78.578	23.69	39°C.	776.895	656.65	929.29	139.13	80.32

<i>hsr1</i> -STRE						LV0506- STRE (<i>hsr6-1</i>)					
	MEDIA	MIN	MAX	SD	SE		MEDIA	MIN	MAX	SD	SE
Control	21.2982	20.615	21.981	0.9662	0.683	Control	35.1414	27.746	41.008	5.6678	2.833
25°C.	28.6252	21.224	36.026	10.466	7.401	25°C.	38.2684	30.647	41.572	5.1131	2.556
39°C.	103.907	93.409	114.40	14.846	10.49	39°C.	88.6695	82.828	93.070	4.9472	2.473

Tabla D. Análisis de Varianza para muestras dependientes*. Los resultados se ordenan de menor a mayor de acuerdo al promedio y las líneas a la derecha de la tabla indican los casos en que no existe diferencia significativa entre las muestras con un 0.05 de confianza. * Programa STATISTICA versión 5.1, Ed 1998.

Cepa	Alelo	Control a 25°C*		Inducción a 39°C	
		sv	p	sv	p
<i>hsr1</i>	<i>hsr1</i>	11	0.1809088	11	0.0582654
LV0201	<i>hsr2-1</i>	12	2.6E-12	12	8.289E-07
LV0202	<i>hsr2-1 sgr1-1</i>	12	1.416E-11	12	6.01E-06
LV0780	<i>hsr2-3</i>	12	2.754E-17	12	4.824E-11
LV0620	<i>hsr3-1</i>	12	1.156E-13	12	1.839E-10
LV0143	<i>hsr4-1</i>	12	4.742E-10	12	0.000262
LV0506	<i>hsr6-1</i>	13	0.5088393	13	0.0046845

Cuando:

$p < 0.05$ existe una diferencia significativa y los valores son marcados en negritas.

$p > 0.05$ no existe una diferencia significativa entre las muestras que se están comparando. SV se refiere a los grados de libertad.

*1.5 horas después de alcanzar una D.O. de 0.4

Tabla E. Prueba de T para variables independientes*. Para determinar si existe diferencia entre la actividad de las mutantes con relación a la actividad de la cepa silvestre, se compararon los niveles de β -galactosidasa de la cepa silvestre con las mutantes regulada por *STRE*. *Programa STATISTICA versión 5.1, Ed 1998.

ANEXO 4

Eficiencia de transformación/ μg de ADN	Eficiencia de complementación	Prototrofia
8.23×10^{-3}	3.69×10^{-4}	Leucina
	1.35×10^{-4}	Histidina
	3.53×10^{-5}	Adenina

Tabla F. Transformación de la cepa W303-6B con 20 μg de ADN genómico de levadura en YCp50 mediante el protocolo de acetato de litio de Gietz y cols. (1992).

Muestra	DNA (μg)	Transformantes totales	Eficiencia de transformación/ μg de DNA	Colonias grandes
1	15 μg banco	250	2.95×10^{-8}	109
2	2.5 μg vector	18	2.77×10^{-8}	10

Tabla G. Transformación de *hsr2-2* (JF431) por el método de acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992) y tratamiento para el enriquecimiento de las complementantes a 40°C por 48 horas.

Mutante	Total de células transformadas	Eficiencia de transformación/ μg de ADN	ADN	
W303	8.72×10^4	6.84×10^{-4}	2.5 μg del banco genómico	A
<i>hsr2-2</i>	164	1.52×10^{-6}	2.5 μg del banco genómico	
<i>hsr2-3</i>	1.116×10^5	7.144×10^{-4}	2.5 μg del banco genómico	
W303	8 880	1.5×10^{-3}	1 μg vector	B
<i>hsr2-2</i>	22	1.2×10^{-5}	1 μg vector	
<i>hsr2-3</i>	6 840	3.2×10^{-3}	1 μg vector	

Tabla H. Transformación de las cepas W303, (*hsr2-2*) JF431 y LV0047 (*hsr2-3*). A) Con el método de acetato de litio (Gietz *et al.*, 1992) y adición de DMSO. B) Electroporación.

ANEXO 5

Número de tétradas	Segregación	Tipo de segregantes por tamaño de colonia	Niveles de termotolerancia por tipo de colonia	Fenotipo en la termotolerancia
9	1:3	c : G	Chica: Alta termotolerancia	Similar a ScIBT2
1	2:2	c : G	Grande: Termotolerancia reducida	Similar a ScIBT10
2	4:0	G	Grande: sensible	Similar a la silvestre

Tabla I. Análisis de la segregación para el tamaño de colonia y nivel de termotolerancia a 50°C durante 20 minutos del diploide *hsr2-1 sgr1-1/HSR2* (proveniente de la cruce entre las cepas ScIBT10 y la silvestre)