

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA RESPUESTA  
AL ESTRÉS EN LA LEVADURA SACCHAROMYCES  
CEREVISIAE. PAPEL DE LOS FACTORES  
TRANSCRIPCIONALES MSN2P Y MSN4P

M<sup>a</sup> TERESA MARTÍNEZ PASTOR

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 de Novembre de 1997 davant un tribunal format per:

- D. Luis Franco Vera
- D. Enrique Herrero Perpiñá
- D<sup>a</sup>. Yolanda Sánchez Martín
- D. Juan Carlos Argüelles Ordóñez
- D. Juan Carlos Igual García

Va ser dirigida per:  
D. Francisco Estruch Ros

©Copyright: Servei de Publicacions  
M<sup>a</sup> Teresa Martínez Pastor

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6277-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**FACULTAT DE CIÈNCIES QUÍMIQUES**

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA RESPUESTA AL  
ESTRÉS EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*.  
PAPEL DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES Msn2p  
Y Msn4p**

Trabajo presentado por  
María Teresa Martínez Pastor  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Químicas



FRANCISCO ESTRUCH ROS, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Regulación transcripcional de la respuesta al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Papel de los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p” ha sido realizada por la Licenciada en Ciencias Químicas, Dña. María Teresa Martínez Pastor, bajo su dirección en este laboratorio.

Valencia, 22 de Septiembre de 1997

Fdo: Dr. Francisco Estruch Ros



Cuanto más de cerca mira uno estas actuaciones de la materia en los organismos vivos, más impresionante le parece la función. La célula viva más sencilla se convierte en una caja mágica de sorpresas llena de elaboradas y cambiantes moléculas, y supera de lejos a todos los laboratorios químicos del hombre en la capacidad de síntesis orgánica llevada a cabo con expedición y buen juicio de balance... Cualquier célula viva lleva consigo las experiencias de un billón de años de experimentación por sus ancestros. No puedes esperar explicar un pájaro tan viejo en unas pocas palabras.

MAX DELBRÜCK, Un Físico mira la Biología





Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que han tenido una influencia en este trabajo y que, de una manera u otra, han contribuido a que llegara a buen fin.

En especial a mi director, Paco Estruch, por el apoyo que siempre he recibido de él en estos cuatro años, y por saberme transmitir su entusiasmo por este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Paula, Espe, Agustín, Susana, Sergi, Jose, Emilia, Toni, José Enrique, Marce, Puri, Carmen, Tani, Mónica, Juan Carlos, Sari, Paqui, Sonia... no sé si me dejo a alguien, pero también debería estar ahí. A todos os tengo que agradecer muchas cosas, especialmente el haberme rodeado de un ambiente de amistad, alegría y buen humor, que ha hecho que el trabajo fuera más ligero.

A todos los miembros del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, con quienes he pasado tantos buenos momentos.

A los miembros del Departamento de Biotecnología del IATA, que nos han hecho sentirnos “en casa “ a los de la universidad.

A Helmut Ruis, Christoph Schüller y a mis compañeros vieneses, que me permitieron realizar una agradable estancia en su laboratorio. En especial a Gerard y Lara, por las cenas y tertulias que compartimos.

A mi familia, que siempre me ha apoyado y me ha animado a seguir adelante, y en especial a mis abuelos, Vicente y Ana, que siempre serán un ejemplo para mí.

A todos mis amigos.

Y cómo no, a José, que ha sido mi principal apoyo durante todo este tiempo. Gracias por ayudarme a no perder el horizonte, y recordarme siempre que hay cosas mucho más importantes que la ciencia.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca de Formación del Personal Investigador de la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència.



## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>1. LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b> .....	<b>5</b>
1.1. - LA RESPUESTA CELULAR AL ESTRÉS .....	5
1.2. - LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	6
1.2.1.- <i>Respuesta al choque térmico en levadura. Comparación con otros organismos</i> .....	8
1.2.1.1.-El factor de choque térmico: HSF.....	8
1.2.1.2.- El elemento de respuesta al choque térmico: HSE.....	9
1.2.1.3.- Las proteínas de choque térmico: HSPs.....	10
1.2.2.- <i>Respuesta al estrés oxidativo y por metales</i> .....	12
1.2.2.1.- Defensas no enzimáticas contra el estrés oxidativo .....	13
1.2.2.2.- Defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo .....	14
1.2.2.3.- Factores transcripcionales implicados en la respuesta al estrés oxidativo y por iones metálicos .....	15
1.2.3.- <i>La respuesta a estrés osmótico</i> .....	17
1.2.3.1.- Respuesta a estrés hiperosmótico.....	17
1.2.3.2.- Estrés hiposmótico.....	18
1.2.3.3.- Estrés por sodio.....	20
1.2.4.- <i>La respuesta general al estrés en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i> .....	20
1.2.4.1.- Rasgos comunes en la respuesta a estreses diferentes.....	20
1.2.4.2.- Protección inducida y protección cruzada.....	21
1.2.4.3.- Influencia de las condiciones metabólicas: regulación negativa de la respuesta a estrés por la proteína quinasa A.....	22
1.2.4.4.- El elemento de respuesta a estrés (STRE).....	23
1.2.4.5.- Un ejemplo de regulación positiva vía STRE: la ruta HOG.....	25
1.2.4.6.- Factores transcripcionales implicados en la respuesta general a estrés .....	25
<b>2. LA REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN <i>SACHAROMYCES CEREVISIAE</i></b> .....	<b>27</b>
2.1.- EL CONTROL GENERAL DE LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	27
2.1.1.- <i>El inicio de la traducción en las células eucariotas y su regulación</i> ....	28
2.1.2.- <i>La quinasa Gcn2p fosforila al factor de iniciación de la traducción eIF-2<math>\alpha</math> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i> .....	29
2.1.3.- <i>Regulación traduccional de Gcn4p. Papel de la quinasa Gcn2p</i> .....	30
2.2.- GCN4P: FACTOR DE ESTRÉS. ....	31
2.3.- EN <i>SACCHAROMYCES</i> , eIF-2 $\alpha$ ES FOSFORILADO EN LAS SERINAS 292, 294 Y 301 POR LA PROTEÍNA QUINASA CASEÍNA QUINASA II .....	32
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>1. CEPAS DE LEVADURA Y <i>E. COLI</i>. MÉTODOS GENÉTICOS. PLÁSMIDOS</b> .....	<b>35</b>
<b>2. MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	<b>37</b>

<b>3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURA.....</b>	<b>38</b>
<b>4. TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. ENSAYOS DE VIABILIDAD .....</b>	<b>38</b>
<b>6. AISLAMIENTO DE DNA .....</b>	<b>38</b>
6.1. DNA PLASMÍDICO DE <i>E. COLI</i> .....	38
6.2. DNA GENÓMICO DE LEVADURA.....	39
7. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL DNA.....	39
<b>8. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA. ....</b>	<b>39</b>
<b>9. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE LEVADURA.....</b>	<b>39</b>
<b>10. ELECTROFORESIS DE RNA EN GELES DE AGAROSA DESNATURALIZANTES CON FORMALDEHÍDO.....</b>	<b>40</b>
<b>11. HIBRIDACIÓN DE DNA Y RNA SOBRE FILTRO CON SONDAS MARCADAS.....</b>	<b>40</b>
11.1 MARCAJE DE SONDAS RADIATIVAS DE DNA.....	40
<b>12. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS PARA RETARDO EN GEL .....</b>	<b>41</b>
12.1. TRANSCRIPCIÓN Y TRADUCCIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>MSN2</i> .....	41
12.2. EXPRESIÓN DE <i>MSN2-GSTP</i> Y <i>MSN4-GSTP</i> EN <i>E. COLI</i> .....	41
12.3. EXTRACTOS DE PROTEÍNA TOTAL DE LEVADURA .....	41
<b>13. MARCAJE RADIATIVO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....</b>	<b>42</b>
13.1. PARA RETARDO EN GEL:.....	42
13.2. PARA EXTENSIÓN DE CEBADOR: .....	42
<b>14. RETARDO EN GEL .....</b>	<b>43</b>
14.1. REACCIÓN DE UNIÓN DNA-PROTEÍNA .....	43
<b>15. ANÁLISIS DE <i>FOOTPRINTING IN VIVO</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>16. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>45</b>
16.1. ENSAYOS $\beta$ -GALACTOSIDASA.....	45
16.2. ENSAYOS INVERTASA.....	45
<b>17. MEDIDA DEL NIVEL DE TRADUCCIÓN Y DE INCORPORACIÓN DE METIONINA .....</b>	<b>46</b>
<b>18. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i> E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS. ....</b>	<b>46</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO I: FUNCIÓN DE LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES MSN2P Y MSN4P EN LA RESPUESTA A ESTRÉS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....</b>	<b>51</b>

<b>1.CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DEL DOBLE MUTANTE <i>MSN2</i> <i>MSN4</i>.</b> .....	<b>53</b>
1.1. PAPEL DE <i>MSN2</i> Y <i>MSN4</i> EN LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO .....	53
1.1.1. <i>Antecedentes</i> .....	53
1.1.2. <i>Análisis del crecimiento en medio líquido con fuentes de carbono distintas a la glucosa.</i> .....	55
1.2. RESISTENCIA DE <i>MSN2</i> <i>MSN4</i> FRENTE A DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS	58
1.3. RESISTENCIA DE <i>MSN2</i> <i>MSN4</i> FRENTE A CONDICIONES SEVERAS DE ESTRÉS ....	60
1.4. EFECTO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>MSN2</i> Y <i>MSN4</i> SOBRE LA RESISTENCIA AL AYUNO DE GLUCOSA Y CHOQUE TÉRMICO .....	62
<b>2. FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR LOS GENES <i>MSN2</i> Y <i>MSN4</i>.</b> .....	<b>64</b>
2.1. <i>MSN2</i> Y <i>MSN4</i> SON REQUERIDOS PARA LA TRANSCRIPCIÓN DE DISTINTOS GENES INDUCIDOS POR ESTRÉS. ....	64
2.2. <i>MSN2</i> Y <i>MSN4</i> ESTÁN IMPLICADOS EN LA EXPRESIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS VÍA STRE. ....	69
2.3. PREDICCIÓN TEÓRICA DE LA SECUENCIA DE UNIÓN DE <i>MSN2/4P</i> .....	72
2.4. LAS PROTEÍNAS <i>MSN2P</i> Y <i>MSN4P</i> SE UNEN <i>IN VITRO</i> A LA SECUENCIA STRE. ....	74
2.4.1. <i>Unión de las proteínas purificadas</i> .....	74
2.4.2. <i>Unión de <i>Msn2p</i> a partir de extractos totales de proteína de levadura.</i> ....	75
2.5. LAS SECUENCIAS STRE ESTÁN PROTEGIDAS <i>IN VIVO</i> DE UNA MANERA DEPENDIENTE DE <i>MSN2P</i> Y <i>MSN4P</i> .....	78
2.6. LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS DEDOS DE CINCO DE <i>MSN2P</i> Y <i>MSN4P</i> PRODUCE UN AUMENTO DE LA EXPRESIÓN VÍA STRE .....	82
<b>CAPÍTULO II: LA PRIVACIÓN BRUSCA DE FUENTE DE CARBONO BLOQUEA LA TRADUCCIÓN, PERO NO LA TRANSCRIPCIÓN, EN LA LEVADURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>.</b> .....	<b>87</b>
<b>1. RESPUESTA DE LA LEVADURA AL CAMBIO EN LA FUENTE DE CARBONO.</b> .....	<b>89</b>
<b>2. EXPRESIÓN DEL GEN <i>SUC2</i> EN COMPLETA AUSENCIA DE GLUCOSA.</b> .....	<b>90</b>
<b>3. LA PRIVACIÓN DE GLUCOSA PRODUCE UNA PARADA DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS.</b> .....	<b>92</b>
<b>4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE 2-DESOXIGLUCOSA 0.05% SOBRE EL BLOQUEO DE LA TRADUCCIÓN POR AUSENCIA DE FUENTE DE CARBONO.</b> .....	<b>94</b>
<b>5. EL BLOQUEO DE LA TRADUCCIÓN NO ES DEPENDIENTE DE LA QUINASA <i>GCN2P</i>.</b> .....	<b>94</b>
<b>6. EL BLOQUEO DE LA TRADUCCIÓN NO ESTÁ REGULADO POR LA RUTA RAS-CAMP.</b> .....	<b>96</b>

<b>7. EL BLOQUEO DE LA TRADUCCIÓN EN EL DOBLE MUTANTE <i>MSN2</i> <i>MSN4</i> .....</b>	<b>97</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<i>MSN2P</i> Y <i>MSN4P</i> PARTICIPAN EN LA RESPUESTA A ESTRÉS DE <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i> .....	101
REGULACIÓN DE <i>MSN2P</i> Y <i>MSN4P</i> . CONOCIMIENTOS ACTUALES Y PERSPECTIVAS .....	105
EL BLOQUEO DE LA TRADUCCIÓN POR AUSENCIA DE GLUCOSA. POSIBLES RESPUESTAS .....	108
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>117</b>

## ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BCIP	Bromocloroindolil fosfato
Bisacrilamida	N,N'-metilén-bis-acrilamida
cAMP	AMP cíclico
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DAI	Quinasa activada por RNA de doble cadena
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Proteína fluorescente verde
GSH	Glutación
GTP	Guanosina trifosfato
HCR	Quinasa activada por carencia de hemo
HOG	Ruta de respuesta a alta osmolaridad
HSE	Elemento de choque térmico
HSF	Factor de choque térmico
HSP	Proteína de choque térmico
kb	Kilobases
Kda	Kilodaltons
MAP	Proteína activada por mitógeno
MAP K	MAP quinasa
MAP KK	MAP quinasa quinasa
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
NBT	Nitro azul de tetrazolio
NLS	Señal de localización nuclear
ORF	Pauta abierta de lectura
pb	Par de bases
PDB	Base de datos de proteínas
PEG	Polietilenglicol
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sod	Superóxido dismutasa
STRE	Elemento de respuesta al estrés
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA de transferencia
Trp	Triptófano

UAS	Región activadora en 5'
UAS <sub>PDS</sub>	Región activadora post-cambio diáuxico
5'-UTR	Región 5' no traducida de un mRNA
UORF	ORF en la secuencia líder del mRNA
Ura	Uracilo
UV	Ultravioleta



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. LA RESPUESTA AL ESTRÉS EN *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.1. - La respuesta celular al estrés

La supervivencia de una célula puede depender de su capacidad para adaptarse con rapidez a los cambios en el ambiente que le rodea. Esto, que es cierto para todas las células, cobra quizá una especial importancia en el caso de los organismos unicelulares, los cuáles han de sobrevivir en ambientes generalmente poco constantes, enfrentándose frecuentemente a situaciones nuevas en las que deberán reencontrar su ritmo de crecimiento óptimo. Se entiende por condición de estrés cualquier factor ambiental que tenga un efecto adverso sobre el crecimiento celular. Algunos ejemplos de situaciones estresantes para la célula son, por ejemplo, cambios en la temperatura, la osmolaridad, el pH, la disponibilidad de nutrientes, o la presencia de intermediarios reactivos del oxígeno.

La reacción celular ante los cambios ambientales, y los mecanismos que desarrolla para protegerse contra el daño producido por éstos es lo que se conoce, en general, como la "Respuesta celular al estrés".

El primer caso descrito en la literatura de respuesta molecular a un factor de estrés fue la respuesta al choque térmico (Ritossa, 1964, citado en Mager y Moradas-Ferreira, 1993). El breve calentamiento de larvas de *Drosophila hydei* producía un cambio visible en los patrones de bandas de los cromosomas politénicos de las glándulas salivares, lo que reflejaba un cambio dramático en la actividad génica. En 1974, Tissières *et al.* descubrían que en respuesta al choque térmico se producía la síntesis de un grupo específico de proteínas, que recibieron el nombre de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, ó HSPs).

Pronto se descubrieron proteínas similares en otros eucariotas y procariotas, con un grado de homología entre proteínas de diferentes especies muy elevado. La respuesta al choque térmico es, por consiguiente, un proceso ampliamente conservado en la evolución, y por tanto debe ser fundamental para la célula viva.

La respuesta al choque térmico es la respuesta a estrés más estudiada, hasta el punto de que en ocasiones ambos términos se consideran equivalentes, pero no es la única. Cualquier tipo de estrés desencadena una respuesta celular, que suele tener dos componentes: de un lado, aquellos elementos celulares que se encargan de la protección específica contra esa forma de estrés; del otro, aquellos elementos que se ocupan de proteger a la célula contra daños más generales, que se producen de forma común por formas de estrés muy diferentes.

## Introducción

Durante los últimos años, el interés por alcanzar un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares de respuesta a estrés ha ido en aumento, fundamentalmente por las implicaciones que puede tener en campos tan diversos, como la medicina, la agricultura o la economía. Se ha comprobado que los factores de estrés contribuyen al envejecimiento celular, están implicados en la etiología del cáncer, y juegan un papel importante cuando los tejidos se exponen a hipoxia (por ejemplo en casos de isquemia coronaria o cerebral) (Young y Elliot, 1989; Welch, 1993; Ames *et al.*, 1993). En el campo de la agricultura, lograr un aumento de la resistencia de las plantas superiores a las condiciones de estrés provocadas por la elevada salinidad, el calor o la sequía podría tener importantes consecuencias económicas (Boyer, 1982).

### 1.2. - La respuesta al estrés en *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha perfilado como un organismo modelo muy adecuado para el estudio de la regulación de la respuesta a estrés, por su facilidad de manipulación genética, y por las cada vez mayores homologías encontradas entre los sistemas de señalización por estrés de este organismo y los de eucariotas superiores. Así por ejemplo, al igual que en levadura (ver apartados 1.2.2.3. y 1.2.3.1. de esta introducción), se han identificado sistemas de dos componentes en plantas superiores, que también podrían desempeñar un papel en la transducción de señales de estrés (Chang *et al.*, 1993). El importante papel que desempeñan algunas rutas de MAP quinasas en la transducción de señales de estrés en *Saccharomyces cerevisiae* podría tener su contrapartida en mamíferos, donde se han identificado diferentes MAP quinasas activadas por estrés (Cooper, 1994). Dos de estas quinasas (p38 y JNK1) se activan en situaciones de alta osmolaridad, y pueden complementar parcialmente una mutación en *HOG1*, gen que codifica la MAP quinasa implicada en la ruta de percepción del estrés hiperosmótico en *Saccharomyces cerevisiae* (Galcheva-Gargova *et al.*, 1994 y Han *et al.*, 1994). Otro sistema de señalización activado por estrés en mamíferos, en el que participa la proteína quinasa activada por AMP, guarda homologías estructurales y funcionales con un sistema de señalización de levadura. El dominio N-terminal de esta quinasa y el de la quinasa Snf1p de *S. cerevisiae*, implicada en la respuesta de la levadura a fuentes de carbono distintas a la glucosa, presentan un 60% de identidad, y parecen compartir algunas funciones (Hardie, 1994). Todo apunta a que irán descubriéndose nuevas similitudes entre los sistemas de respuesta al estrés de diferentes clases de eucariotas. Por ello, la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio de los sistemas de percepción del estrés y de las respuestas desencadenadas puede aportar importante información sobre los mecanismos que, en general, ha utilizado la naturaleza para permitir a las células adaptarse a un ambiente hostil.

¿Qué tipo de respuestas celulares desencadena el estrés? Además de alteraciones físico-químicas del ambiente celular, la respuesta principal es la inducción de proteínas cuyas funciones ejercen una protección frente a los efectos dañinos del estrés. En la tabla I se citan algunas de las proteínas inducidas por estrés en levadura. En la tabla se han incluido proteínas que se expresan de forma constitutiva, por desempeñar funciones necesarias para la célula en condiciones normales de crecimiento, pero que también (o ellas o proteínas homólogas de la misma familia) pueden sufrir un aumento en su expresión en condiciones de estrés. Se detalla la localización de la proteína y su función, caso de ser conocida, así como los diferentes factores de estrés que inducen su expresión.

**Tabla I**Proteínas de estrés en *Saccharomyces cerevisiae*:

PROTEÍNA	LOCALIZACIÓN CELULAR	FUNCIÓN	EXPRESIÓN
Hsp150	secretada	desconocida	T
Hsp104	nucleolo	tolerancia a estrés	constitutiva, T, C, Est.
Hsp83	citosol/nucleolo	carabina molecular	T
Hsp70			
Ssa1	citosol	carabina molecular	constitutiva, Ox
Ssa2	citosol	carabina molecular	constitutiva
Ssa3	citosol	carabina molecular	T, Est.
Ssa4	citosol	carabina molecular	T
Ssb1	desconocida	desconocida	T
Ssb2	desconocida	desconocida	T
Ssc1	mitocondria	carabina molecular	constitutiva
Ssd1	retículo endoplásmico	carabina molecular	constitutiva
Hsp60	mitocondria	carabina molecular	constitutiva, T
Hsp30	membrana plasmática	desconocida	T, E
Hsp26	citosol/núcleo	desconocida	T, E, C, Est, Ox...
Hsp12	citosol?	desconocida	T, Est. , C, E, Ox...
ubiquitina	citosol	proteólisis no lisosomal	T
enolasa	citosol	glicolisis	T
gliceraldehído- 3-P deshidrogenasa	citosol	glicolisis	T
fosfoglicerato quinasa	citosol	glicolisis	T

## Introducción

catalasa	citosol	defensa antioxidativa	Ox, T, O, C
glutación sintetasa	citosol	defensa antioxidativa	Ox
glutación reductasa	citosol	defensa antioxidativa	Ox
metalotioneína	citosol	defensa antioxidativa	Ox, M, C
superóxido dismutasa	citosol, mitocondria	defensa antioxidativa	Ox
Ddr2	desconocida	desconocida	T, C, D
tioredoxina	citosol	defensa antioxidativa	Ox
tioredoxina peroxidasa	citosol	defensa antioxidativa	Ox
glucosa-6-P-deshidrogenasa	citosol	reducción de NADP <sup>+</sup>	Ox
trehalosa fosfato sintasa	citosol	síntesis de trehalosa	T, O, Ox
trehalosa fosfato fosfatasa	citosol	síntesis de trehalosa	T
trehalasa	citosol	degradación trehalosa	T
glucógeno sintetasa	citosol	síntesis de glucógeno	C, T
glucógeno fosforilasa	citosol	degradación de glucógeno	C, T

**T:** choque térmico, **C:** ayuno de fuente de carbono, **E:** etanol, **Est:** fase estacionaria, **Ox:** estrés oxidativo, **M:** metales pesados, **O:** choque osmótico, **D:** daño al DNA

### 1.2.1-Respuesta al choque térmico en levadura. Comparación con otros organismos

#### 1.2.1.1.-El factor de choque térmico: HSF

En eucariotas, los genes *heat shock* se regulan por la acción del factor transcripcional de choque térmico, el *Heat Shock Factor* (HSF), que interacciona con una secuencia de DNA conocida como elemento de respuesta al choque térmico (*Heat Shock Element*, o HSE) (revisado por Sorger, 1991).

En *Saccharomyces cerevisiae* o en *Drosophila melanogaster*, hay un único gen que codifica para el HSF, el gen *HSF1* (Clos *et al.*, 1990; Wiederrecht *et al.*, 1988), que es esencial. En otros eucariotas superiores, en cambio, se han descrito familias génicas que codifican este factor, compuestas por un número variable de genes (3 en tomate, 4 en humanos, por ejemplo) (Scharf *et al.*, 1990; Scheutz *et al.*, 1991). Los factores de choque térmico de diversas especies no tienen una homología de secuencia demasiado elevada, pero la organización en dominios y el plegamiento tridimensional sí que son bastante similares (revisado en Mager y De Kruijff, 1995).

El factor de choque térmico se une al HSE en forma de trímero (Perisic *et al.*, 1989, Sorger y Nelson, 1989). En la mayoría de eucariotas, la trimerización y unión al DNA se produce tras una activación por calor (Sorger *et al.*, 1987). En *Saccharomyces cerevisiae*, en cambio, el HSF se

encuentra unido al HSE, en forma de trímero, constitutivamente, pero sus dominios activadores de la transcripción sólo quedan expuestos tras la inducción por calor (Jakobsen y Pelham, 1988; Gross *et al.*, 1990).

Por lo que respecta a la regulación del factor, en levadura y otros eucariotas se han descrito cambios en el estado de fosforilación de la proteína, entre el estado basal y el inducido (Sorger, 1990 y 1991). Aunque la actividad transcripcional del factor está estrechamente relacionada, en un extenso rango de temperaturas, con el nivel de fosforilación del mismo, no se conoce exactamente el mecanismo por el cual la fosforilación podría activar al HSF. En algunos casos se ha sugerido que el estado de fosforilación del HSF afectaría a su capacidad de unirse al DNA y activar la transcripción: Así mismo, se ha propuesto un modelo de regulación del HSF en eucariotas superiores según el cual la proteína Hsp70p se uniría al HSF, actuando como represor en condiciones de no estrés. Con el choque térmico, la demanda de Hsp70p aumentaría como consecuencia del nivel elevado de proteínas dañadas. Esto causaría la disociación del complejo Hsp70-HSF, recuperando su capacidad de activar la transcripción. A su vez, el aumento de la síntesis de Hsp70p produciría la reasociación del complejo, dando lugar a que la respuesta sea transitoria (Morimoto *et al.*, 1990; Sorger, 1991). En consistencia con esto, se ha propuesto que Hsp70p actúa como el “termómetro celular”, de manera que sus niveles indicarían la necesidad de activar la respuesta al choque térmico (Craig y Gross, 1991). Sin embargo, no hay evidencias directas de la interacción entre HSF y Hsp70p.

Por su parte, en procariotas, la respuesta al choque térmico está mediada por un factor  $\sigma$  específico, inducido por calor,  $\sigma^{32}$  que se une al core de la RNA polimerasa y hace que ésta transcriba a partir de los promotores de choque térmico (Grossman *et al.*, 1984). La RNA polimerasa, con el factor  $\sigma^{70}$  transcribe constitutivamente el gen *rpoH*, que codifica el factor  $\sigma^{32}$ , pero esta proteína es muy inestable. Cuando hay un choque térmico, la transcripción de *rpoH* se induce (Tilly *et al.*, 1989), aumenta la eficacia de traducción del mensajero de  $\sigma^{32}$  y la proteína se estabiliza (Straus *et al.*, 1987). La interacción de  $\sigma^{32}$  con una de las proteínas que se producen en estas condiciones, *dnaK*, que parece afectar negativamente a su actividad, podría estar implicada en la finalización de la respuesta (Liberek *et al.*, 1992).

#### 1.2.1.2.- El elemento de respuesta al choque térmico: HSE

La estructura básica del HSE es una repetición, de 3 a 6 veces, de la secuencia 5'-nGAAn-3'. Cada una de estas unidades se dispone contigua a la anterior, e invertida con respecto a las adyacentes: 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3' (Xiao y Lis, 1988). Dentro de la unidad de repetición, la G está muy conservada, mientras que algunas veces se pueden observar cambios de alguna de las A a T.

### 1.2.1.3.- Las proteínas de choque térmico: HSPs

En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito proteínas de choque térmico pertenecientes a las principales familias descritas para la mayoría de organismos, y que se suelen denominar por su peso molecular aproximado.

La proteína Hsp104p es homóloga a HSPs de alto peso molecular descritas en procariotas, como son las proteínas clpA y clpB de *Escherichia coli*, así como a otras proteínas similares de eucariotas, que constituyen la familia de las HSP100. Hsp104p es esencial para la termotolerancia inducida en levadura (Sánchez *et al.*, 1992; Linnquist y Kim, 1996). La función proteolítica de ClpA (que no tiene actividad proteasa por sí misma, pero interacciona con la proteasa ClpP, activándola) llevó a sugerir, en un principio, que Hsp104p pudiera desempeñar su función protectora frente al estrés ayudando a eliminar las proteínas desnaturalizadas por el calor mediante proteólisis. Pero esta función se ha descartado para Hsp104p, proponiéndose una nueva función específica de las HSP100, no descrita para otras HSPs: la de renaturalizar proteínas, resolubilizándolas a partir de agregados insolubles, función que requiere la hidrólisis de ATP (Parsell *et al.*, 1994, Schirmer *et al.*, 1996). Otras HSPs, como HSP60 y HSP70, actúan previniendo la desnaturalización de proteínas, pero son incapaces de actuar una vez éstas han formado agregados. Hsp104p, que no parece participar en la prevención del daño por calor, sería la encargada de reparar el daño una vez causado. Además, se ha propuesto también para Hsp104p un papel regulador, actuando sobre la proteína Sup35p, subunidad del factor de terminación de la transcripción, cuyos agregados actúan y se transmiten como priones, recibiendo el nombre de [PSI<sup>+</sup>]. Los agregados de esta proteína pueden captar las proteínas Sup35p que se están sintetizando de nuevo, y disminuyen la concentración de factor libre; esto produce en los ribosomas la capacidad de leer a través de codones sin sentido con una frecuencia alta. La solubilidad de Sup35p, y por tanto su capacidad de formar priones [PSI<sup>+</sup>], depende de la relación Sup35p/Hsp104p en la célula (Schirmer *et al.*, 1996).

La familia génica de HSP90 tiene dos ejemplos en levadura, la proteína Hsc82p, que se expresa de forma constitutiva, aumentando ligeramente su expresión por el calor, y Hsp82p, que se expresa fundamentalmente tras un choque térmico. En mamíferos se ha descrito la capacidad de Hsp90p de interaccionar con receptores de hormonas esteroideas (Dougherty *et al.*, 1984; Renoir *et al.*, 1986; Sánchez *et al.*, 1986). Tras la disociación del mismo, se produce un aumento en la actividad de unión al DNA del receptor. En levaduras transformadas con el gen que codifica un receptor de hormonas esteroideas y con un gen reporter inducible por esteroides, se ha podido demostrar la capacidad de las HSP90 endógenas de interaccionar con el receptor (Metzger *et al.*, 1988; Schena y Yamamoto, 1988). Por ello, se ha propuesto que la función de HSP90 sería la de



interaccionar transitoriamente con proteínas, estabilizando conformaciones particulares de las mismas.

Las HSP70 son una familia de proteínas con capacidad de unir ATP y con una débil actividad ATPasa, que se estimula cuando se unen a péptidos. En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito ocho genes pertenecientes a esta familia, que se expresan en diferentes condiciones fisiológicas y en diferentes localizaciones celulares, y que a su vez se agrupan en varios subgrupos. Ssa1-4p son una familia de proteínas citoplásmicas esenciales, que se pueden sustituir, al menos parcialmente, unas a otras (Craig y Jacobsen, 1984; Werner-Washburne *et al.*, 1987). Ssa1p y Ssa2p se expresan en condiciones normales de crecimiento, mientras que Ssa3p y Ssa4p lo hacen inducidas por choque térmico o, en el caso de Ssa3p, en fase estacionaria. Este grupo de proteínas parece estar implicado en la translocación post-traducciona l de proteínas al retículo endoplasmático y a la mitocondria. Las proteínas Ssb1p y Ssb2p, también citoplasmáticas, son funcionalmente diferentes de las Ssa, y su función es desconocida (Slater y Craig, 1989; Werner-Washburne *et al.*, 1989). Ssc1p es una proteína esencial, localizada en la matriz mitocondrial, donde actúa ayudando a la translocación de proteínas hacia el interior del orgánulo (Kang *et al.*, 1990). Este mismo proceso lo desempeña la proteína Ssd1p en el interior del retículo endoplásmico.

Hsp60p es otra proteína mitocondrial, perteneciente al grupo de las chaperoninas, proteínas que ayudan al ensamblaje de proteínas oligoméricas (Reading *et al.*, 1989). También parece estar implicada en el procesamiento de proteínas del espacio intermembrana.

Por último, en la mayoría de eucariotas el aumento de la temperatura induce también la síntesis de una serie de HSPs de pequeño tamaño, que constituyen el grupo más diversificado, y menos claro en cuanto a su función. En *Saccharomyces* se han descrito dos proteínas de este tipo, Hsp26p y Hsp12p, cuya función se desconoce (Praekelt y Meacock, 1990; Susek y Lindquist, 1989). Hsp26p, aunque no Hsp12p, comparte con otras proteínas del grupo la presencia en su extremo carboxilo terminal de zonas de identidad de secuencia o alta homología con la proteína  $\alpha$ -cristalina de mamíferos. También posee la capacidad, descrita para otras Hsps pequeñas, de formar agregados de alto peso molecular conocidos como gránulos de choque térmico (Susek y Lindquist, 1989; Bentley *et al.*, 1992). Ambas proteínas se inducen por una amplia variedad de estreses: choque osmótico, oxidativo, etanol, fase estacionaria.. pero hasta el momento no se ha podido elucidar la función que desempeñan (Susek y Lindquist, 1989; Praekelt y Meacock, 1990).

Además de las proteínas de choque térmico de las familias descritas, existen otras que también se inducen por este tipo de estrés, participando en la defensa frente al mismo, y que por tanto pueden ser consideradas HSPs. Entre ellas está la ubiquitina, proteína muy conservada en todos los

### Introducción

eucariotas, que participa en la degradación selectiva de proteínas intracelulares, con la ayuda de diversas enzimas. En levadura existen cuatro genes que codifican la ubiquitina, que se sintetiza en forma de proteínas híbridas, formadas por la ubiquitina fusionada en su extremo carboxilo consigo misma, (poliubiquitina, producto del gen *UBI4*), o con proteínas ribosomales (productos de *UBI1*, *UBI2* y *UBI3*) (Özkaynak *et al.*, 1984 y 1987). De estos genes, *UBI4* es inducible por calor, y su delección produce un fenotipo de sensibilidad a altas temperaturas, así como a privación de carbono o nitrógeno, y a análogos de aminoácidos (Finley *et al.*, 1987). *UBI4* se requiere también para el mantenimiento de la viabilidad de las esporas. Recientemente, Watt y Piper (1997) han descrito que este gen se encuentra sometido a desrepresión por catabolito, a través de los factores Hap2/3/4p y Hap1p, que suelen activar genes con funciones mitocondriales (respiratorias). La inducción de *UBI4* durante el crecimiento respiratorio podría reflejar la contribución de Ubi4p a la tolerancia frente a estrés oxidativo. El papel de la ubiquitina sería el de degradar las proteínas que no pueden ser reparadas por las carabinas moleculares.

#### 1.2.2.- Respuesta al estrés oxidativo y por metales

Durante el metabolismo celular normal se generan especies reactivas del oxígeno que son tóxicas para la célula. También se generan especies de este tipo por la presencia de pro-oxidantes, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadiona, paraquat, por aumentos en la presión de oxígeno, o por exposición a radiaciones ionizantes. Las principales especies reactivas del oxígeno son el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el radical hidroxilo, (OH<sup>•</sup>), el peróxido de hidrógeno, o el oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). El peróxido de hidrógeno no suele ser tóxico por sí mismo, sino por su capacidad de reaccionar con el radical superóxido, por la reacción de Fenton/Haber-Weiss, (O<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → •OH + OH<sup>-</sup> + O<sub>2</sub>), catalizada por metales, en la que se genera radical hidroxilo, especie que sí que es capaz de reaccionar directamente con, por ejemplo, DNA, lípidos y proteínas, en los que puede ocasionar daños importantes que afecten a su función.

El DNA puede sufrir daños oxidativos en bases y azúcares, roturas de simple cadena, aparición de sitios abásicos, como 8-hidroxiguaninas (Woodford *et al.*, 1995), o entrecruzamientos DNA-proteínas (Frankenberg *et al.*, 1993).

La peroxidación de lípidos afecta a la integridad de membranas, generando cadenas de ácidos grasos más cortas, y aumentando la fluidez de las membranas (Steels *et al.*, 1994). Además, durante la peroxidación de lípidos se producen a su vez otros productos, como epóxidos, aldehídos o alcanos que pueden dañar al DNA e inactivar proteínas (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Las proteínas pueden sufrir daños por oxidación de algunas cadenas laterales de aminoácidos, o por entrecruzamientos con otras proteínas, lo que aumentará su susceptibilidad proteolítica y puede disminuir su actividad biológica (Levine *et al.*, 1994). Las proteínas modificadas por oxidación podrían ser sustratos del sistema de la ubiquitina, ya que cuando se disminuyen los niveles de ubiquitinación por inactivación de *UBI4* se produce un aumento de la sensibilidad a  $H_2O_2$  (Cheng *et al.*, 1994).

#### 1.2.2.1.- Defensas no enzimáticas contra el estrés oxidativo

El ejemplo más conocido de defensa no enzimática contra los cambios en el estado redox de la célula es el glutatión (GSH), un tripéptido  $\gamma$ -L-glutamil-L-cistinilglicina. Esta molécula reacciona con los oxidantes a través de su grupo sulfhidrilo para producir glutatión reducido (GSSG). El gen que codifica en levadura la  $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteína sintetasa, uno de los enzimas implicados en la biosíntesis de GSH es *GSH1*, gen cuya expresión se induce por estrés oxidativo (Ohtake *et al.*, 1991).

Otras moléculas pequeñas con propiedades antioxidativas son las metalotioneínas, pequeñas proteínas ricas en cisteínas que tienen la capacidad de unir diferentes iones metálicos (Hamer, 1986). Estas proteínas son un ejemplo de la fuerte relación existente entre los sistemas de defensa antioxidativa y los sistemas de detoxificación u homeostasis de iones metálicos. Hemos visto como el radical  $OH^\cdot$  se produce a partir de  $H_2O_2$  en una reacción catalizada por metales, lo cual constituye uno de los principales efectos tóxicos de los mismos. Una de las formas que tiene la célula de minimizar la formación de radicales superóxido es mediante el secuestro de metales como cobre y hierro, papel desempeñado, entre otras proteínas, por las metalotioneínas. Estas están implicadas, entre otras funciones, en contrarrestar la toxicidad de metales y radiaciones desionizantes, homeostasis de metales y detoxificación frente a radicales libres. En levadura se han encontrado por el momento dos metalotioneínas. La primera descrita fue la codificada por el gen *CUPI*, inducido por estrés oxidativo y por la presencia de metales pesados, así como por la ausencia de fuente de carbono. *CUPI* está regulado transcripcionalmente por secuencias en su promotor reconocidas por el factor Ace1p, que es dependiente de cobre (Thiele, 1988 y 1992). El factor Ace2p se encarga de mantener los niveles basales de *CUPI* (Butler *et al.*, 1991). Por otro lado, se ha descrito que la regulación de *CUPI* por estrés oxidativo se da a través del heat shock factor, que interacciona con las HSEs presentes en su promotor. El Hsf1p también regula la expresión de *CUPI* por choque térmico y por ayuno de fuente de carbono, aunque parece que diferentes dominios del Hsf1p están implicados en la regulación por estos diferentes estreses (Tamai *et al.*, 1994). Más recientemente, Liu y Thiele (1996) han descrito que la inducción por menadiona de *CUPI* (compuesto que causa estrés oxidativo, debido a la generación de radicales superóxido) es también dependiente de Hsf1p.

## Introducción

Recientemente se ha descrito una segunda metalotioneína en levadura, codificada por el gen *CRS5*. Este gen está regulado negativamente por oxígeno, y esta represión aeróbica implica a iones cobre y al factor Ace1p. La represión aeróbica se suprime cuando se trata con concentraciones altas de cobre (Strain y Culotta, 1996).

Otras proteínas implicadas en la homeostasis de metales y que también tienen un efecto antioxidativo son Bsd1p, Bsd2p y Atx2p (homeostasis de Mn, Cu/Cd, y Cu, respectivamente) (Liu y Culotta, 1994; Lapinskas *et al.*, 1995; Lin y Culotta, 1995).

A su vez el glutatión, además de su función antioxidativa, parece también ser importante para la homeostasis del  $\text{Cd}^{2+}$  en *Schizosaccharomyces pombe* (Coblentz y Wolf, 1994).

### 1.2.2.2.- Defensas enzimáticas contra el estrés oxidativo

Entre las defensas antioxidativas de la célula se incluyen algunos enzimas capaces de eliminar radicales de oxígeno y los productos derivados de los mismos.

*Saccharomyces cerevisiae* tiene dos tipos de catalasa, el enzima que cataliza la rotura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ : la catalasa A y la catalasa T, codificada por *CTA1* y *CTT1*, respectivamente (Cohen *et al.*, 1988; Hartig y Ruis, 1986). La catalasa A se localiza en el peroxisoma, eliminando el  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido por la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. El papel fisiológico de la catalasa T, en cambio, no está del todo claro, aunque la expresión de *CTT1* está regulada por un número muy amplio de estreses: choque oxidativo, choque osmótico, choque térmico, ausencia de fuente de carbono, ácidos débiles, etanol, etc. (Marchler *et al.*, 1993).

La levadura tiene también dos tipos de superóxido dismutasa (Sod), enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ : la MnSod, localizada en la mitocondria y codificada por *SOD2*, y la Cu/ZnSod, citoplasmática (posiblemente también peroxisomal), codificada por *SOD1* (Birmingham-McDonogh *et al.*, 1988; VanLoon *et al.*, 1986). El papel de la MnSod mitocondrial parece ser proteger a la mitocondria de los aniones superóxido generados durante la respiración. Cu/ZnSod se ocupa de la eliminación de superóxido del citoplasma y, probablemente, del peroxisoma. Recientemente, Culotta *et al.* (1995) han propuesto un papel fisiológico de la Cu/Zn Superóxido dismutasa en la regulación de los niveles de cobre. Se ha comprobado que el gen *SOD1* es inducido transcripcionalmente por  $\text{Cu}^+$  y por Ace1p, y que esta inducción es necesaria para la protección contra la toxicidad del cobre, pero no para la protección contra radicales libres de oxígeno. Cu/ZnSod parece funcionar en la homeostasis del cobre independientemente de su función eliminadora de radicales superóxido.

Otra proteína implicada en la homeostasis del cobre es Cup9p. La sobreexpresión de *CUP9* permite crecer a las células en elevadas concentraciones de cobre. Este gen tiene secuencias reguladas por cobre

independientes de Ace1p. Además, la proteína tiene un 47% de identidad con el dominio homeobox de *PBX1* (protooncogén humano), por lo que se especula si es una proteína de unión a DNA (Knight *et al.*, 1994).

El enzima glutatión peroxidasa cataliza la reducción de hidroperóxidos utilizando GSH como reductor. Aunque se ha encontrado actividad glutatión peroxidasa en levadura, todavía no se ha identificado el gen que codifica este enzima. (Galiazzo *et al.*, 1987).

Otras proteínas con actividad antioxidante son la glutatión reductasa (codificada por *GLR1*), la tioredoxina (*TRX1* y *TRX2*), la tioredoxina peroxidasa (*TPX1*), la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (*ZWF1*), o la S-adenosilmetionina descarboxilasa, implicada en la síntesis de poliaminas (*SPE2*).

#### 1.2.2.3.- Factores transcripcionales implicados en la respuesta al estrés oxidativo y por iones metálicos

Se han descrito varios factores transcripcionales que regulan la transcripción de una serie de genes que codifican proteínas con actividad antioxidante. Algunos de ellos (Ace1p, Ace2p, Mac1p), son metaloproteínas, y todos están implicados en regular la expresión de genes que codifican metaloproteínas, o en regular algún aspecto de la homeostasis de metales.

#### ***Yap1p***

Yap1p codifica un factor transcripcional homólogo a c-jun, (producto de un oncogén de mamíferos que, como homodímero, o como heterodímero con c-fos, forma el activador transcripcional AP-1) y es capaz de unirse a sitios AP-1 *in vitro* e *in vivo*. Cepas que llevan este gen en alto número de copias son hiperresistentes a una gran variedad de agentes tóxicos, como agentes alquilantes, cicloheximida, cadmio, queladores de Zn y Fe<sup>2+</sup>, etc. (Hussain y Lenard, 1991; Hertle *et al.*, 1991, Schnell y Entian, 1991) además de producirse un aumento en la expresión de superóxido dismutasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glutatión reductasa, y en los niveles de glutatión en general. *YCF1*, *PDR5* y *SNQ2* (transportadores ABC), *GSH1*, *GLR1*, *TRX2*, *TRR1* (tioredoxina reductasa), *TPS1* (trehalosa fosfato sintetasa) y *SSA1*, entre otros genes, están regulados por Yap1p, y se han localizado posibles sitios de unión en los promotores de *SOD1* y *ZWF1* (Wu y Moye-Rowley, 1994; Kuge y Jones, 1994; Wemmie *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1997; Gounalaki y Thireos, 1994; Stephen *et al.*, 1995)

También se ha descrito en levadura la existencia de un segundo factor similar a AP-1, Yap2p (Cad1p) (Wu *et al.*, 1993). Yap2p puede considerarse un homólogo funcional de Yap1p, pero su papel en cuanto a la activación de la transcripción parece ser secundario (Stephen *et al.*, 1995).

Recientemente Kuge *et al.* (1997) han descrito el mecanismo de regulación de Yap1p por estrés oxidativo. En condiciones de estrés, la capacidad de unión al DNA del factor sufre un ligero aumento, pero el

## Introducción

principal foco de regulación lo constituye la translocación desde el citoplasma al núcleo tras la aparición de condiciones causantes de estrés oxidativo. Para la regulación de la translocación al núcleo es necesaria la presencia del extremo carboxilo terminal de la proteína, un dominio rico en cisteínas que al ser deletado produce localización nuclear constitutiva.

### ***Ace1p***

*Ace1p* es un factor transcripcional perteneciente al grupo de los factores transcripcionales metalreguladores. *Ace1p* es capaz de unir  $Cd^{2+}$  y  $Cu^+$  en distintas configuraciones, pero sólo el conformero  $Cu^+$  puede formar un complejo específico y de alta afinidad con el DNA (Dameron *et al.*, 1993). *Ace1p* está implicado en la regulación por cobre de toda una serie de genes implicados en la homeostasis de este metal, como son *CUP1* (Zhou *et al.*, 1992), *CRS5* (Strain y Culotta, 1996) ó *SOD1* (Gralla *et al.*, 1991), uniéndose a las llamadas Secuencias Dependientes de Cobre presentes en sus promotores.

### ***Mac1p***

Esta proteína regula la transcripción de genes implicados en la reducción de iones hierro y cobre, como el gen *FRE1* (codifica un enzima implicado en la reducción de  $Fe^{3+}$  en la superficie celular, y que parece mediar también la incorporación y reducción de  $Cu^+$ ). Regula también la inducción mediada por  $H_2O_2$  de *CTT1*.

Los mutantes *mac1* tienen un crecimiento lento y son deficientes en respiración, así como hipersensibles a diferentes estreses: calor,  $H_2O_2$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ . No son hipersensibles, en cambio, a  $Cu^+$  (Jungman *et al.*, 1993).

### ***Skn7p***

*Skn7p* (*Pos9p/Bry1p*) es un putativo factor transcripcional que parece estar implicado en la regulación de la biosíntesis de pared celular (su sobreexpresión suprime defectos en pared celular causados por mutaciones en *KRE9* o la delección de *PKC1*, genes implicados en dicho proceso) y del ciclo celular (su sobreexpresión suprime la letalidad debida a pérdida de los factores transcripcionales de G1, SBF y MBF). Recientemente, se ha descrito que la disrupción de este gen produce también un fenotipo de sensibilidad a peróxido de hidrógeno, y se ha comprobado que participa directamente en la regulación de la expresión génica como respuesta al estrés oxidativo (Morgan *et al.*, 1997).

La delección de *SKN7* produce sensibilidad a agentes oxidantes como tert-butil hidroperóxido, cadmio o menadiona. Si se combina esta delección con la delección de *YAP1* no se observa un aumento de la sensibilidad a diamida, peróxido de hidrógeno, cadmio o menadiona respecto a la de una cepa *yap1Δ*, indicando que ambos genes funcionan en la misma ruta. Se ha comprobado que *Skn7p* se requiere para la expresión de los genes *TRX2* y

*TRR1*, y que hay una unión directa de Skn7p al promotor de *TRX2 in vitro*. Yap1p y Skn7p son capaces de unirse a este promotor independientemente de la presencia del otro y, además, *in vitro* se observa también la unión conjunta de las dos proteínas en una misma banda de retardo en gel. Sin embargo, no se ha podido demostrar la interacción entre estas dos proteínas por coimmunoprecipitación o por el sistema del doble híbrido. Aunque en general se observa una epistasis entre *YAPI* y *SKN7*, en el caso concreto de estrés por diamida se observa un mayor efecto de la delección en *YAPI*. Además, este tipo de estrés produce un aumento de la unión al DNA en Yap1p, pero no en Skn7p, indicando al menos cierta divergencia en la función de estas proteínas.

Por último, Skn7p tiene un dominio homólogo a los dominios receptores característicos de los llamados "sistemas de dos componentes", de procariotas. Estos sistemas de transducción de señales constan de una primera proteína, generalmente un homodímero histidina quinasa presente en la membrana celular, que detecta la señal y fosforila un residuo conservado de histidina en la segunda proteína. Este fosfato se transfiere luego a un residuo ácido aspártico del dominio receptor de esta segunda proteína, la proteína reguladora de la respuesta. Este segundo componente, en procariotas, suele ser un factor transcripcional capaz de activar directamente la expresión génica tras recibir la señal. El aspártico fosforilable de Skn7p es el 427, siendo esta fosforilación necesaria para su participación en los procesos de biosíntesis de pared o en el ciclo celular, pero se ha comprobado que esta fosforilación no es necesaria para realizar su función en la respuesta a estrés oxidativo. Por otra parte, Skn7p es el primer "segundo componente" de eucariotas para el que se ha demostrado una función de activación transcripcional directa.

### **1.2.3.- La respuesta a estrés osmótico**

#### 1.2.3.1.- Respuesta a estrés hiperosmótico

Al ser sometidas a un medio extracelular hiperosmótico, las células acusan una pérdida importante de agua citoplasmática. Para contrarrestar este efecto, *Saccharomyces cerevisiae* produce una rápida acumulación de glicerol, posible gracias a la expresión de una serie de genes específicos. El facilitador de glicerol Fps1p, que permite la difusión facilitada de glicerol a través de la membrana, se cierra en estas condiciones, impidiendo así la salida de glicerol del interior celular (Luyten *et al.*, 1995).

La percepción del osmoestrés, en levadura, se produce por un "sistema de dos componentes", como los existentes en procariotas, aunque con algunas características particulares, ya que este sistema está formado por tres componentes. El sensor unido a la membrana plasmática, corresponde en este caso a la proteína Sln1p (Ota y Varshavsky, 1993), y en un primer momento se creyó que el regulador citosólico al cual el sensor transmite la

### Introducción

señal era la proteína quinasa Ssk1p. Pero recientemente se ha descrito que Sln1p no fosforila directamente a Ssk1p, sino a través de la histidina quinasa Ypd1p (Posas *et al.*, 1996). Ssk1p se considera todavía parte del “sistema de dos componentes” porque posee un dominio receptor y un putativo dominio emisor de la señal similares a los encontrados en las correspondientes proteínas de procariotas. En general, en procariotas, el estímulo produce una autofosforilación del sensor en una histidina, y esto hace al sensor capaz de fosforilar al regulador, que transmitirá la señal al núcleo. En eucariotas, la señal no se transmite directamente a la maquinaria transcripcional, sino a un regulador de una cascada de proteína quinasa, que en último término pueden regular la actividad transcripcional (una excepción sería la proteína Skn7p de levadura, que sí que es un factor transcripcional).

En el sistema Sln1p/Ypd1p/Ssk1p, el estímulo (estrés hiperosmótico) no produce una activación, sino una inhibición de la autofosforilación de Sln1p (Maeda *et al.*, 1994). Al impedirse esta autofosforilación, se inhibe la fosforilación de Ypd1p y, en último lugar, de Ssk1p, con la particularidad de que Ssk1p es activo sólo en su forma desfosforilada, por lo que es en esta situación cuando puede transmitir la señal.

Se ha propuesto que Ssk1p desfosforilado activa a una cascada de MAP quinasa, homólogas a las de mamíferos. En esta ruta participan Pbs2p (MAP KK) y Hog1p (MAP K) (Brewster *et al.*, 1993, Maeda *et al.*, 1995), que constituyen, junto a los anteriores componentes, la ruta HOG (High Osmolarity Glycerol Response).

Por otro lado, la activación de Pbs2p tras un cambio a alta osmolaridad también se puede producir por la interacción con el dominio SH3 de la proteína de membrana Sho1p (Maeda *et al.*, 1995).

Entre los genes activados por la ruta HOG, se encuentran *GPD1*, que codifica la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa, (Albertyn *et al.*, 1994), *CTT1*, la catalasa citosólica (Schüller *et al.*, 1994), *HSP12*, de función desconocida (Varela *et al.*, 1995) y *CYC7*, que codifica el iso-2-citocromo c (Evangelista *et al.*, 1996). En los tres últimos casos, se ha comprobado que la inducción por la ruta HOG se realiza vía el elemento STRE (CCCCT, ver más adelante), presente en los promotores de estos genes.

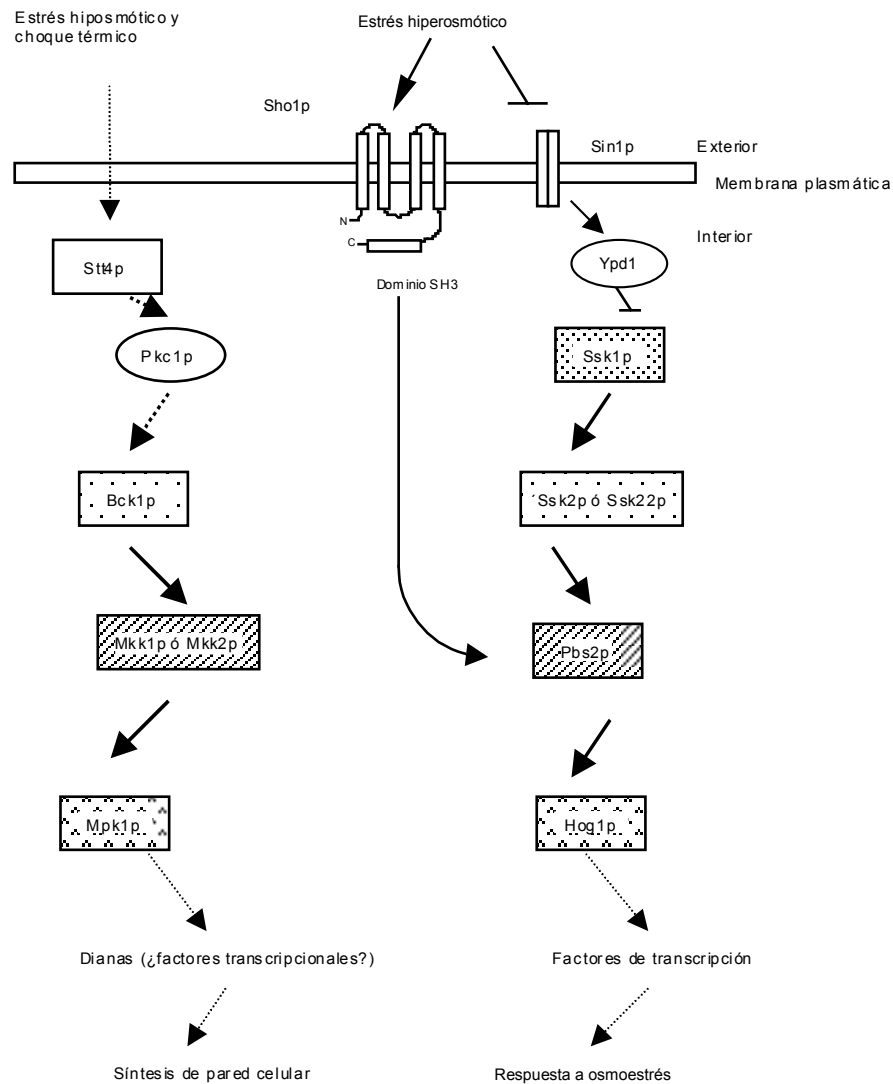
#### 1.2.3.2.- Estrés hiposmótico

Ante una disminución en la osmolaridad externa, las células de levadura dejan de acumular glicerol, y empiezan a liberar el existente al medio (Blomberg y Adler, 1992). Este flujo de glicerol hacia el exterior parece estar mediado por un facilitador de glicerol, la proteína Fps1p (Luyten *et al.*, 1995).

Por otro lado, la respuesta a estrés hiposmótico está regulada por la proteína quinasa C, participando una nueva cascada de MAP quinasa. Proteína quinasa C, activada por la proteína Stt4p, fosforila a la MAP quinasa quinasa Bck1p. Por debajo se encuentran dos MAP quinasa quinasa



funcionalmente redundantes, Mkk1p y Mkk2p, y por último la MAP quinasa Mpk1p (Torres *et al.*, 1991 Lee y Levin, 1992).



**Figura A.** Rutas de transducción de señal por estrés hiposmótico e hiperosmótico en *Saccharomyces cerevisiae*.

La ruta de la proteína quinasa C también parece estar implicada en la percepción de otros estreses, como el choque térmico o la ausencia de nutrientes (en este último caso, independientemente del cAMP) (Costigan y Snyder, 1994). Por otro lado, por su homología con las proteínas quinasa C de

## Introducción

humanos, se ha propuesto que la activación por estrés de la ruta se podría deber a un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula, aunque esto no ha sido demostrado (Kamada *et al.*, 1995).

### 1.2.3.3.- Estrés por sodio

En altas concentraciones de NaCl, el ión sodio entra en la célula vía los canales de  $\text{K}^+$  (codificados por *TRK1* y *TRK2*), y probablemente otros transportadores de cationes (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Gaber *et al.*, 198; Ko *et al.*, 1990). La alta toxicidad que presenta este ion parece deberse a que interfiere con los procesos celulares que requieren  $\text{K}^+$ , puesto que si se aumenta la relación  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  intracelular (por ejemplo sobreexpresando el gen *HAL1*) aumenta la tolerancia a sal (Haro *et al.*, 1993; Gaxiola *et al.*, 1992).

Ante una concentración de  $\text{Na}^+$  elevada, y para evitar la entrada excesiva de  $\text{Na}^+$ , se produce un cambio en el sistema de transporte de  $\text{K}^+$ , que pasa de un estado de baja afinidad, para el que se requiere Trk2p, a otro de alta afinidad, determinado por Trk1p (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Gaber *et al.*, 1988; Ko *et al.*, 1990). Por otra parte, se activa el bombeo de iones sodio al exterior por la ATPasa de tipo P codificada por los genes *ENA1-ENA4*, de los cuales *ENA1* está inducido por sal (Garcia-deblás *et al.*, 1993).

La inducción de *ENA1* está mediada por diferentes rutas de transducción (Márquez y Serrano, 1996). A bajas concentraciones de sal (NaCl 0.3 M), la inducción es mediada por la ruta HOG, sistema que se activa por un estrés osmótico no específico. A elevadas concentraciones de sal (NaCl 0.8 M), la inducción de *ENA1* requiere calcineurina, una proteína fosfatasa de tipo 2B que requiere  $\text{Ca}^{2+}$  y calmodulina para su activación, y en este caso la inducción es específica de sodio. La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), y Hal3p/Sis2p regulan la expresión de *ENA1* como factores negativos y positivos, respectivamente, aunque Hal3p no participa en la transducción de la señal por sal. Cuando se expresa en multicopia el gen *PDE1*, que codifica la fosfodiesterasa de cAMP de baja afinidad, se suprime el fenotipo de sensibilidad a  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$  de mutantes en calcineurina. Por otra parte, en un mutante *bcy1* se inhibe la inducción de *ENA1* por alta concentración de sodio. Todo parece indicar que calcineurina y cAMP actúan antagonicamente en una ruta común para la adaptación a estrés salino (Hirata *et al.*, 1995).

### **1.2.4.- La respuesta general al estrés en *Saccharomyces cerevisiae***

#### 1.2.4.1.- Rasgos comunes en la respuesta a estreses diferentes

Uno de los primeros acontecimientos que se producen tras la exposición a estreses diferentes, es el aumento en la producción de trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil  $\alpha$ -D-glucopiranosido), disacárido que ejerce un efecto protector de los componentes celulares (Mackenzie *et al.*, 1988; Singh *et al.*,

1991). Al mismo tiempo, se activan sistemas de señalización que producirán la posterior inducción de proteínas adecuadas para responder al estrés (Mager y Moradas-Ferreira, 1993; Mager y de Kruijff, 1995).

Hemos visto cómo, además de proteínas específicas para responder a un tipo de estrés concreto, aparecen una serie de proteínas que son inducidas por un amplio rango de estreses, y cuya función concreta es útil para la célula en muy diferentes condiciones. Esto es debido a que diferentes agentes estresantes pueden causar efectos similares en la célula, cómo pueden ser la desnaturalización de proteínas, el desordenamiento de membranas, el daño al DNA o la aparición de agentes oxidantes (Piper, 1993, Mager y Moradas-Ferreira, 1993, Moradas-Ferreira, 1996). Por ello, las proteínas encargadas de responder a estos efectos comunes serán inducidas ante cualquier condición adversa, formando parte de la respuesta general al estrés.

Por ejemplo, muchas HSPs son inducidas no sólo por calor, sino también en otras condiciones de estrés, lo que concuerda con su papel de carabinas moleculares, necesario para la reparación de proteínas alteradas debido al estrés (Mager y Moradas-Ferreira, 1993).

En el mismo sentido, otro gen expresado en diferentes condiciones de estrés es el gen de la poliubiquitina, *UBI4* (Finley *et al.*, 1987). Esta proteína, implicada en la proteólisis no lisosomal de proteínas es útil para que la levadura se libere de proteínas dañadas, que podrían ser tóxicas para la célula.

También el gen *DDR2* se induce, además de por daño al DNA, por calor (Kobayashi y McEntee, 1993). Aunque su función no está clara, quizá ayude a evitar los efectos dañinos del estrés sobre el DNA celular.

Una de las respuestas más inmediatas a la mayoría de estreses es, como hemos dicho, el aumento en la síntesis de trehalosa. Esto se consigue de forma rápida por la activación postraduccional de los enzimas implicados en su síntesis, pero además, se produce una inducción transcripcional de los genes que codifican estos enzimas.

Además, un efecto bastante común del estrés es el aumento de intermediarios reactivos del oxígeno, que causan daños oxidativos. Acorde con esto, la catalasa T de *Saccharomyces* se induce en muy diferentes condiciones: choque térmico, choque osmótico, estrés oxidativo, ácidos débiles (Piper, 1993, Marchler *et al.*, 1993, Schüller *et al.*, 1994). Otros genes, como *CUPI*, se inducen, además de por estrés oxidativo, por la ausencia de glucosa y por el choque térmico.

#### 1.2.4.2.- Protección inducida y protección cruzada

Otro factor a favor de la existencia de una respuesta general al estrés es el fenómeno de la protección cruzada frente a diferentes estreses.

Las células pueden sobrevivir a un estrés severo más fácilmente si antes han sido expuestas a una forma suave del mismo estrés, fenómeno que

## Introducción

se conoce como resistencia adquirida al estrés, o tolerancia inducida. Por ejemplo, células sometidas a un pequeño aumento de temperatura, pueden sobrevivir después a una exposición a temperaturas habitualmente letales para la célula (Coote *et al.*, 1991). De igual manera, si sometemos previamente las células a un choque osmótico suave (por ejemplo, 0.7 M NaCl) aumentará la supervivencia frente a un choque osmótico a 1.4 M NaCl (Trollmo *et al.*, 1988, Varela *et al.*, 1992). La explicación más probable es que el previo desencadenamiento de la respuesta por el choque suave permita que la célula se encuentre más preparada para enfrentarse al choque severo.

Sin embargo, no es tan fácil explicar el fenómeno de la protección cruzada, por el cual la exposición a una forma suave de un determinado estrés puede proteger frente a la posterior exposición a otro estrés, aplicado de forma severa. Por ejemplo, el pretratamiento de células con un choque térmico suave puede conferir resistencia a un elevado choque osmótico (Trollmo *et al.*, 1988; Varela *et al.*, 1992). Igualmente, la exposición de levadura a concentraciones elevadas de etanol o ácidos débiles confiere termotolerancia (Coote *et al.*, 1991). Este hecho podría indicar la existencia de una ruta común de respuesta, pero no en todos los casos se produce la adquisición de tolerancia cruzada. Por ejemplo, un suave choque osmótico no confiere termotolerancia (Trollmo *et al.*, 1988; Varela *et al.*, 1992), ni tampoco el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> confiere resistencia a menadiona, droga generadora de superóxidos (aunque lo contrario sí sucede) (Jamieson, 1992). También la preexposición a choque térmico aumenta la tolerancia a etanol, aunque lo contrario no se produce.

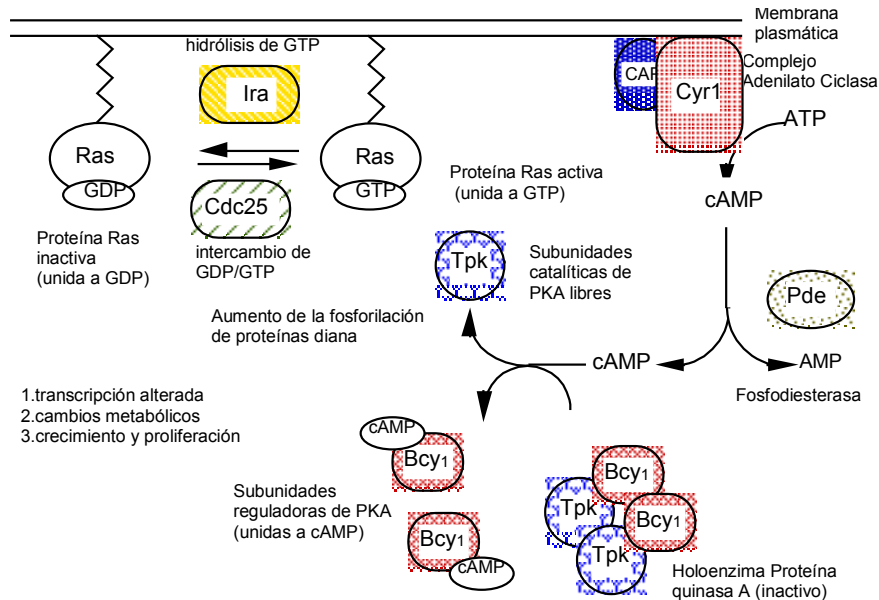
Así pues, una parte de la respuesta a estrés de las células de levadura puede ser compartida por distintos estreses, dando lugar a la protección cruzada, pero al mismo tiempo observamos respuestas que son específicas del propio estrés y que son necesarias en caso de encontrarse con ese estrés en forma severa.

### 1.2.4.3.- Influencia de las condiciones metabólicas: regulación negativa de la respuesta a estrés por la proteína quinasa A

Se sabe desde hace tiempo que la tolerancia de *Saccharomyces cerevisiae* al estrés está influenciada por las condiciones de crecimiento celular. Las células que están cerca de la fase estacionaria son más resistentes al calor y a otros estreses, comparadas con células en fase exponencial (Werner-Washburne *et al.*, 1993 y 1996) y, por ejemplo, células crecidas en acetato son más tolerantes al calor que las células crecidas en glucosa, aunque en cambio acumulan menos trehalosa (Gross *et al.*, 1996).

Esta relación entre estrés y condiciones de crecimiento se explica, al menos en parte, por el hecho de que la ruta de señalización Ras-PKA (ver figura B), implicada en el control del metabolismo, también regula negativamente la transcripción de muchos de los genes inducidos de forma

general por estrés, como son *SSA3*, *CTT1*, *DDR2*, *HSP12*, *HSP26*, *HSP104*, *HSC82* ó *CYC7* (Engelberg *et al.*, 1994; Siderius y Mager, 1997).



**Figura B.** Componentes de la ruta Ras-PKA.

Bissinger *et al.*, en 1989, demostraron que una fusión del promotor de *CTT1* con el gen *lacZ* estaba regulada por la ruta Ras-PKA. Mutantes en *CDC25* y *RAS2* producían un aumento de las actividades  $\beta$ -galactosidasa y catalasa T en condiciones de no estrés, y además se producía una acumulación de glucógeno y trehalosa.

Fueron Boorstein y Craig (1990) quienes demarcaron un primer elemento *cis* que confería la regulación negativa por PKA, presente en el promotor de *SSA3*. Este elemento de 35 pb,  $UAS_{PDS}$ , era necesario además, junto al HSE de *SSA3*, para la expresión tras el cambio diáuxico. También se requerían ambos elementos para la expresión por choque térmico de este gen.

Posteriormente, otros estudios en los genes *CTT1* (Marchler *et al.*, 1993), *DDR2* (Kobayashi y McEntee, 1993) y *HSP12* (Varela *et al.*, 1995) han proporcionado una información más detallada sobre los elementos de respuesta a estrés y su relación con PKA.

#### 1.2.4.4.- El elemento de respuesta a estrés (STRE)

El análisis del promotor de *CTT1* reveló un elemento de 13 pb que confería la inducción de la expresión por ayuno de nitrógeno y por choque térmico, y la represión por alta actividad PKA (Marcher *et al.*, 1993). Este elemento fue denominado STRE (General Stress Responsive Element).

## Introducción

Posteriormente, Kobayashi y McEntee (1993), y Varela *et al.*, (1995) delimitaron en *DDR2* y *HSP12*, respectivamente, un elemento de cinco nucleótidos capaz por sí sólo de inducir esta respuesta. Este elemento, CCCCT ó AGGGG (puede funcionar en ambas orientaciones), es el que ahora se define como STRE.

En la tabla II se citan una serie de genes de respuesta a estrés en cuyos promotores se han identificado diferentes STRES, tomando como positiva la orientación CCCCT, y como negativa AGGGG. Sólo en algunos de estos casos se ha demostrado que estas STRES sean funcionales, como es el caso de *CTT1* (Marchler *et al.*, 1993), *CYC7* (Evangelista *et al.*, 1996), *DDR2* (Kobayashi y McEntee, 1993), *HSP12* (Varela *et al.*, 1995), ó *TPS2* (Gounalaki y Thireos, 1994). En cambio, en otros genes, como *ENAI*, se ha demostrado lo contrario (Alepuz *et al.*, 1997).

**Tabla II**

STRES presentes en diversos genes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Gen	Nº de STRES	Posición y orientación
<i>ADH2</i>	2	-576(-), -563(+)
<i>ALD3</i>	2	-239(+), -362(+)
<i>CTT1</i>	3	-100 (+), -345(-), -330(-)
<i>CYC7</i>	3	-192(-), -276(-), -336(+)
<i>DDR2</i>	4	-175(+), -203(+), -248(+), -472(+)
<i>ENAI</i>	1	-651(+)
<i>GAC1</i>	1	-659(-)
<i>GLC3</i>	3	-213(-), -282(+), -374(-)
<i>GLK1</i>	4	-113(-), -165(+), -172(-), -700(-)
<i>GPD1</i>	4	-34(+), -286(+), -330(+), -791(+)
<i>GPH1</i>	3	-326(-), -357(-), -545(-)
<i>GSY2</i>	2	-196(+), -377(+)
<i>HAL1</i>	1	-399(+)
<i>HSP12</i>	7	-190(+), -232(+), -377(-), -414(-), -435(-)
<i>HSP26</i>	4	-328(+), -466(+), -484(+), -659(-)
<i>HSP82</i>	1	-149(+), -396(+)
<i>HSP104</i>	3	-172(-), -220(-), -252(-)
<i>HXK1</i>	5	-337(-), -478(+), -499(+), -536(+), -592(+)
<i>MDJ1</i>	7	-345(+), -372(+), -589(+), -610(+), -647(+), -792(-), -834(-)
<i>PGM2</i>	7	-215(-), -259(-), -305(-), -359(-), -406(+), -535(+), -724(-)
<i>PTP2</i>	2	-114(+), -105(+)
<i>SOD2</i>	2	-141(+), -925(+)

<i>SSA1</i>	2	-160(-), -211(-)
<i>SSA4</i>	3	-179(-), -432(-), -467(+)
<i>TKL2</i>	2	-77(+), -732(-)
<i>TPS1</i>	6	-239(-), -249(-), -278(-), -305(+), -359(-), -472(-)
<i>TPS2</i>	5	-308(-), -421(+), -441(+), -490(+), -523(+)
<i>TPS3</i>	2	-217(+), -235(+)
<i>TSL1</i>	7	-165(-), -179(-), -231(-), -326(+), -378(-), -606(+), -984(+)
<i>UBI4</i>	2	-252(-), -666(+)
<i>YBR149W</i>	1	-101(-)

CCCCT: (+), AGGGG: (-)

#### 1.2.4.5.- Un ejemplo de regulación positiva vía STRE: la ruta HOG

¿Cómo se transmiten las distintas señales de estrés a las STREs? Una posibilidad es que las diferentes condiciones de estrés creen una señal primaria común, que se transmita al elemento de respuesta a estrés. Otra, que existan diferentes rutas de transducción de señal para los diferentes estreses. El hecho de que una ruta de señalización, la ruta HOG, parece transmitir específicamente la señal de aumento de la osmolaridad externa a las STREs, apoya la teoría de que las diferentes señales se transmiten por diferentes rutas, convergiendo en la STRE (Schüller *et al.*, 1994).

En algunos casos, como *CTT1*, mutaciones en la ruta HOG parecen afectar a la inducción por otros estreses, como ácidos débiles, estrés oxidativo y etanol, pero en estos casos la influencia no parece ser directa, pues no se detecta fosforilación de la MAP quinasa (Schüller *et al.*, 1994). Por otro lado, otros genes, como *GAC1*, *UBI4* ó *CYC7*, parecen tener cierta inducción por osmoestrés independiente de Hog1p (François *et al.*, 1992; Schüller *et al.*, 1994), lo que indica que quizá existan otras rutas para la detección del estrés osmótico.

#### 1.2.4.6.- Factores transcripcionales implicados en la respuesta general a estrés

Otra cuestión abierta hasta el momento es si existe un único factor transcripcional, en el que convergen las diferentes rutas de señalización por estrés, o si cada ruta de estrés activa a factores específicos. Durante mucho tiempo, el/los factores que se unen a la secuencia STRE han permanecido elusivos, aunque se han identificado diversos factores transcripcionales implicados en la respuesta general al estrés.

Kobayashi y McEntee, en 1993, describieron la existencia de una proteína de aproximadamente 140 kDa, presente en extractos totales de levadura que se unía específicamente a oligonucleótidos que incluían el elemento CCCCT. Pero la identidad de esta proteína sigue sin ser conocida.

Más recientemente, Gounalaki y Thireos (1994) describieron la implicación del factor transcripcional Yap1p en la respuesta general al

## Introducción

estrés. En un mutante *yap1Δ* la expresión vía STRE por choque térmico de un gen reportero *lacZ* se ve fuertemente disminuida, y lo mismo sucede cuando se estudia la inducción vía STRE del gen *TPS2*. Pero en cambio, la expresión de *CTT1* no se ve inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, agente que estimula la actividad de Yap1p, y tampoco la inducción de *HSP12* por estrés osmótico o térmico parece estar afectada en un doble mutante *yap1 yap2*. En cualquier caso, no se ha podido observar unión directa de Yap1p a la secuencia STRE, por lo que su efecto sobre la respuesta general a estrés podría ser indirecto, y tampoco parece ser general, ya que encontramos expresión génica vía STRE independiente de Yap1p y Yap2p.

Otro factor nuclear que ha sido implicado recientemente en la respuesta general al estrés es Rox3p. Cepas con este gen delecionado son sensibles a la temperatura, y prácticamente desaparece la inducción por calor y osmostrés de *CYC7*. La expresión de *ROX3* se ve aumentada durante anaerobiosis y otros estreses, mediante un nuevo elemento de respuesta a estrés no descrito anteriormente: GA<sub>10</sub>GGAA (Evangelista *et al.*, 1996). Como supresor en multicopia de alelos *rox3<sup>ts</sup>* se encontró el gen *RTS1*, que codifica una proteína homóloga a la subunidad B' de la serina-treonina proteína fosfatasa PP2A. La deleción de este gen también afecta seriamente la respuesta a estrés de *CYC7*. Evangelista *et al.* proponen un modelo según el cual tanto Rox3p como Rts1p están implicados en mediar múltiples señales de estrés, con Rox3p actuando por debajo de Rts1p.

Por último, en el presente trabajo se van a mostrar evidencias que apuntan a Msn2p y Msn4p, dos factores transcripcionales con dedos de cinc, como los factores transcripcionales que se unen directamente a la secuencia STRE, mediando la respuesta general al estrés de *Saccharomyces cerevisiae* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). *MSN2* y *MSN4* fueron aislados como supresores en multicopia de mutantes termosensibles en la proteína quinasa Snf1p (Estruch y Carlson, 1993), implicada en la desrepresión de los genes reprimidos por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*.

Msn2p y Msn4p presentan cada una dos dedos de cinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, que guardan gran homología entre sí, y también con los dedos de cinc de otras proteínas, como son Mig1p, la proteína de *Saccharomyces cerevisiae* que actúa como represor en la represión por glucosa, las proteínas Egr1 y Egr2, de mamíferos (genes *Early Growth Response*, que actúan en las primeras etapas tras la exposición a factores de crecimiento), o la proteína del tumor de Wilms.



## 2. LA REGULACIÓN DE LA TRADUCCIÓN EN *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.1.- El control general de la biosíntesis de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de sintetizar los 20 aminoácidos que necesita para vivir. Los genes que codifican los enzimas implicados en la biosíntesis de aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae* están sometidos a una regulación que se da, al menos, a dos niveles.

Por una parte, hay mecanismos de regulación que son específicos de las diferentes rutas de biosíntesis (Hinnebusch, 1992).

Por otra parte, gran parte de los genes implicados en estas rutas están sometidos a un sistema de regulación común, conocido como el "control general de la biosíntesis de aminoácidos" (Hinnebusch, 1986 y 1990). Este sistema se activa por la carencia de algún aminoácido, de forma que se activará la expresión de toda una serie de enzimas, no sólo los implicados en su ruta biosintética, sino también los que llevan a la síntesis de otros aminoácidos.

Todos los genes sometidos a este tipo de control se caracterizan por la presencia en sus promotores de secuencias *cis* presentes en múltiples copias y en diferentes orientaciones, que corresponden a la secuencia consenso 5'-TGACTC-3'. A esta secuencia se une el factor transcripcional Gcn4p (Hinnebusch, 1986, 1990, y 1992).

Además de Gcn4p, se han identificado otra serie de reguladores en *trans* del sistema, que se han repartido en dos grupos:

a) Reguladores positivos: las mutaciones en dichos genes producen un fenotipo de incapacidad de desrepresión del sistema en ayuno de aminoácidos. Son los llamados genes *Gcn*, (de *general control non-derepressible*), entre los cuales se incluiría *GCN4* (Hinnebusch y Fink, 1983; Hinnebusch, 1990).

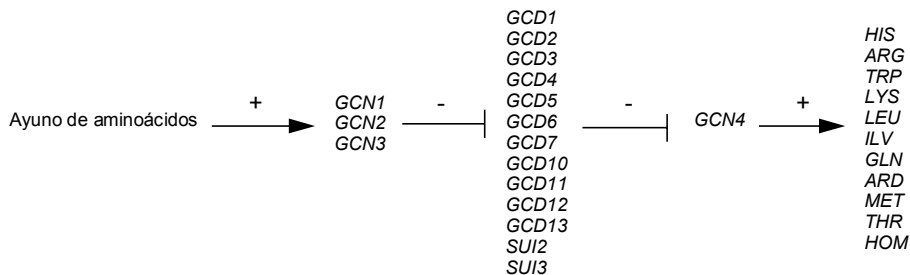
b) Reguladores negativos: las mutaciones en estos genes producen un fenotipo de alta expresión constitutiva de los enzimas del sistema, independientemente de la presencia o no de aminoácidos. Estos genes se conocen como *Gcd* (de *general control derepressed*) (Harashima y Hinnebusch, 1986; Hinnebusch, 1990).

La situación de todos estos factores en la ruta de regulación se describe en la figura C.

La regulación de la expresión de *GCN4* se da fundamentalmente a nivel traduccional. El hecho de que las mutaciones en algunos de los genes que regulan su expresión, como *GCD1* y *GCD2*, sean letales, indica que se requieren para alguna función esencial. Harashima y Hinnebusch, (1986) sugirieron que ésta podía ser la síntesis de proteínas, debido al nivel al que regulan la expresión de Gcn4p. Posteriormente se vio que mutaciones en

## Introducción

*SUI2* Y *SUI3*, que codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, del factor de iniciación de la traducción eIF-2, también afectaban al control general de la síntesis de aminoácidos, en el mismo sentido que las mutaciones *gcd* (Williams *et al.*, 1989; Castilho-Valavicius *et al.*, 1990). Todo esto indicaba que la regulación traduccional de *GCN4* se daba a nivel del inicio de la traducción.



**Figura C.** Genes implicados en el control general de la biosíntesis de aminoácidos.

### 2.1.1.- El inicio de la traducción en las células eucariotas y su regulación.

En eucariotas se han descrito tres mecanismos por los que acontece el inicio de la traducción.

a) El más frecuente sería el de rastreo o barrido (*scanning*), según el cual las subunidades ribosomales 40S se unen al extremo *cap* 5' del mensajero, y rastrean la secuencia líder en dirección 5'-3' hasta que encuentran un codón AUG apropiado, a partir del cual iniciarán la traducción (Hershey, 1991a; Kozak, 1989; Moldave, 1985).

b) El mecanismo de reiniciación sería una variante del anterior, que se daría en mensajeros con más de una pauta de lectura abierta (uORFs) en la secuencia líder. En este caso las subunidades 40S no se disociarían al llegar al codón de parada de las uORFs, sino que seguirían el rastreo, procediendo a la traducción de las siguientes ORFs (Díaz *et al.*, 1993; Hinnebusch, *et al.*, 1984).

c) El mecanismo de iniciación interna se daría en mensajeros sin *cap*, pero que poseen en su extremo 5' secuencias capaces de dirigir la iniciación de la traducción. Ejemplos de este mecanismo se han descrito también en levaduras (Hzuka *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 1993).

El proceso de biosíntesis de proteínas está sumamente regulado y coordinado con el resto de procesos celulares, sufriendo alteraciones en determinadas condiciones de estrés, como pueden ser la ausencia de nutrientes, la mitosis, etc. La regulación de la tasa de traducción en estos casos es sumamente rápida, y un papel importante en este proceso lo desempeña la fosforilación de algunos factores de iniciación y de elongación.

La regulación de la iniciación de la traducción en eucariotas por la fosforilación del factor eIF-2 $\alpha$  es el mecanismo mejor estudiado hasta el

momento. El factor eIF-2 $\alpha$  es una de las tres subunidades del factor eIF-2 ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), que participa en la formación de un complejo ternario con una molécula de GTP y un RNA de transferencia iniciador, el tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Este complejo ternario se asocia con la subunidad ribosomal 40S formando el complejo de preiniciación 43S, que se unirá al mensajero en su extremo *cap* 5' y migrará en dirección 3' hacia el codón de iniciación AUG.

Durante la descodificación del codón de iniciación, se hidroliza el GTP a GDP, y se libera eIF-2.GDP, complejo binario inactivo, que no puede participar en un nuevo proceso de iniciación. Para volver a estar en forma activa, el GDP deberá ser intercambiado por GTP, proceso que no es favorable, pues la afinidad de eIF-2 por GDP es mucho mayor, y se requiere la actuación de un factor adicional, eIF-2B, que cataliza el intercambio de nucleótido de guanina (revisado por Merrick, 1992).

En mamíferos se ha descrito que la fosforilación de eIF-2 $\alpha$  en su serina 51 por las quinasas DAI (inducida por interferón, o por RNA de doble cadena) y HCR (inducida por carencia de hierro, o grupos hemo, en reticulocitos) provoca una estabilización de la unión eIF-2-eIF2B. Así, las formas fosforiladas secuestran el factor eIF-2B presente, que se encuentra en defecto, e impiden el recambio de nucleótido de otros factores eIF-2, produciéndose una inhibición del proceso de traducción (revisado en Hershey, 1991 y London *et al.*, 1987).

### **2.1.2.- La quinasa Gcn2p fosforila al factor de iniciación de la traducción eIF-2 $\alpha$ en *Saccharomyces cerevisiae***

Gcn2p es una serina-treonina proteína quinasa de levadura, que es capaz de fosforilar la Serina 51 del factor eIF-2 $\alpha$ , codificado por el gen *SUI2*, produciendo un efecto similar al que se produce por la fosforilación de eIF-2 $\alpha$  de mamíferos por las quinasas DAI y HCR: estabilizan el complejo con eIF-2B e inhiben el recambio de nucleótido.

La proteína Gcn2p tiene 2 dominios diferenciados: uno de ellos es homólogo a las histidil-tRNA-sintetasas, y se cree que sirve para detectar la existencia en las células de tRNA descargados; el otro es un dominio proteína quinasa, que tiene homología con los dominios proteína quinasa de DAI y HCR. Estas quinasas son capaces de fosforilar a eIF-2 $\alpha$  de levadura *in vitro* e *in vivo*, y pueden sustituir funcionalmente a Gcn2p (Dever *et al.*, 1993).

La diferencia entre mamíferos y levadura es que en los primeros, la fosforilación de eIF-2 $\alpha$  en la Ser51 produce una parada prácticamente total de la traducción, mientras que en levadura sólo se produce una disminución en la tasa de la misma, pero no un bloqueo total. En mamíferos un 25-30% de forma eIF-2 $\alpha$  fosforilada en Ser51 bloquea totalmente el inicio de la traducción, mientras que en levadura ese porcentaje se da en condiciones normales, y tiene que aumentar mucho para que se inhiba la traducción. Una

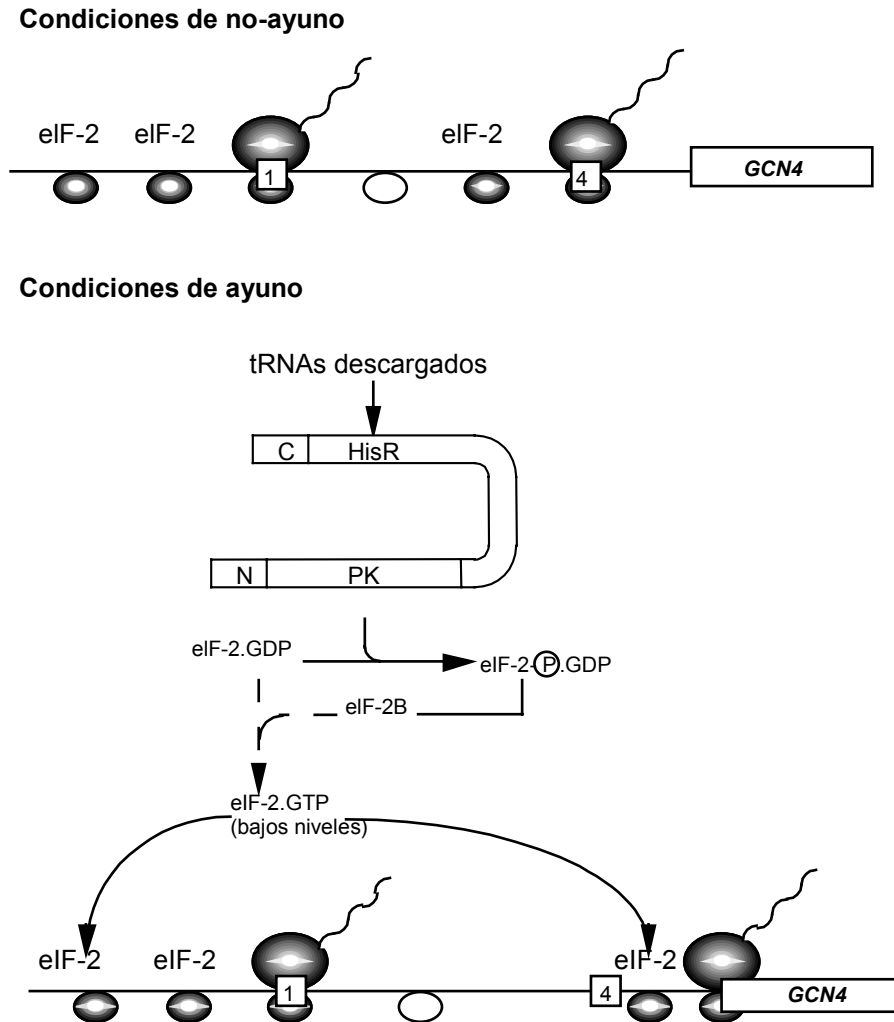
posible explicación sería que, cuando eIF-2 $\alpha$  está fosforilado, el complejo eIF-2 $\alpha$ -eIF-2B de levadura sea más inestable que el de mamíferos, y por tanto para observar un efecto sobre la traducción tendría que haber más formas fosforiladas.

### 2.1.3.- Regulación traduccional de Gcn4p. Papel de la quinasa Gcn2p.

La regulación de la traducción del mensajero de *GCN4* se produce debido a la presencia de cuatro uORFs situadas en el líder del mensajero, en 5' de la ORF que codifica el gen. Este es un hecho habitual en levadura, y la presencia de uORFs se relaciona con una disminución en la tasa de traducción, lo que es compatible con un modelo de rastreo para la iniciación de la síntesis. Así, en levadura, la subunidad 40S del ribosoma se unirá al extremo 5' del mRNA, y rastreará en dirección 3' hasta encontrar el primer codón AUG. Cuando existe una uORF en el mRNA, la traducción se iniciará en ese sitio, y debido a la baja eficiencia que el proceso de reiniciación tiene en eucariotas, la tasa de traducción de las siguientes ORFs bajará.

La delección de las 4 uORFs presentes en el líder de *GCN4* produce una expresión elevada y constitutiva de Gcn4p, independiente de los factores GCN y GCD, lo que implica que el control traduccional se efectúa a través de estas secuencias. Pero no todas las uORFs tienen el mismo efecto: la uORF1 (y también la 2) genera un alto porcentaje de ribosomas reiniciadores, que no se disocian del líder una vez han alcanzado el codón de terminación, por lo que tiene un efecto positivo sobre la traducción de *GCN4*. Las uORF2, 3 y en especial la 4 tienen en cambio un efecto negativo, pues sus secuencias 3' facilitan la disociación del ribosoma una vez se ha traducido la ORF, por lo que no se llega a traducir *GCN4*. Para que se traduzca *GCN4* es necesario que los ribosomas hayan llegado al primer AUG del gen tras barrer el sitio uORF4 sin traducirlo.

En condiciones normales de crecimiento, el reciclaje de eIF-2 por eIF-2B se produce de forma eficiente, y habrá elevados niveles de la forma activa. Por esto, los ribosomas que han traducido la uORF1 podrán readquirir el complejo ternario a tiempo para traducir la uORF4 (pero no las 2 y 3), tras lo cual el ribosoma se disociará y no se traducirá *GCN4* (o lo hace a niveles muy bajos). En condiciones de carencia de aminoácidos, la presencia de tRNAs descargados activa a la quinasa Gcn2p, que fosforila al factor eIF-2 $\alpha$ . Esta forma fosforilada se unirá con mayor afinidad al factor eIF-2B, formado en levadura por los productos de los genes *GCD1*, *GCD2*, *GCD6*, *GCD7* y *GCN3*, y bajará la concentración de eIF-2 activo. Debido a esto, los ribosomas que han traducido uORF1 no podrán readquirir el complejo ternario a tiempo de reiniciar la traducción de uORF4, por lo que pasarán de largo a través de esta uORF sin traducirla, y podrán llegar al codón de iniciación de *GCN4*.



**Figura D.** Modelo sobre el papel de eIF-2 en la regulación traduccional de GCN4 (Dever *et al.*, 1992).

## 2.2.- Gcn4p: factor de estrés.

La ausencia de aminoácidos es una condición de estrés, y por tanto Gcn4p puede ser considerado un factor de estrés. Pero, además, Gcn4p ha sido implicado en la respuesta a irradiación UV, que es distinta de la respuesta a daño al DNA (Engelberg *et al.*, 1994). La activación transcripcional de *HIS3* y *HIS4* se produce a través de Gcn4p, siendo inducida por la radiación UV de forma dependiente de la ruta Ras-cAMP. Esta respuesta mediada por Gcn4p es, sin embargo, independiente de la quinasa Gcn2p.

### **2.3.- En *Saccharomyces*, eIF-2 $\alpha$ es fosforilado en las serinas 292, 294 y 301 por la proteína quinasa Caseína quinasa II**

Además de la fosforilación por Gcn2p, en levadura se ha demostrado que eIF-2 $\alpha$  es fosforilado *in vitro* y, al parecer, también *in vivo* por caseína quinasa II, y que esta fosforilación es necesaria para el funcionamiento óptimo de eIF-2 en levadura. (Feng *et al.*, 1994). El factor eIF-2 $\alpha$  de levadura tiene tres sitios de posible fosforilación por caseína quinasa II, en las serinas 292, 294 y 301, y en la especie salvaje, estos tres sitios se encuentran constitutivamente fosforilados, independientemente de la quinasa Gcn2p.

Todos los datos apuntan a que caseína quinasa II fosforila a eIF-2 $\alpha$  en múltiples sitios o, al menos, media la capacidad de eIF-2 $\alpha$  de ser fosforilado, quizá activando a otras quinasas o inhibiendo fosfatasas.

La mutación de los dos ó tres sitios, por sí sola, no tiene efecto visible sobre la función de eIF-2 (medida por el crecimiento celular), pero si se combina con otras mutaciones (por ejemplo, *GCN2<sup>C</sup>*, alelo que produce la activación constitutiva de Gcn2p) que afectan a la función de eIF-2 $\alpha$ , se ve un empeoramiento importante del defecto que presentan estas otras mutaciones aisladas.

Otros autores (Romero y Dahlberg, 1993), han descrito que en ausencia total de glucosa eIF-2 $\alpha$  pasa a estar en una forma totalmente desfosforilada, lo que podría deberse a la pérdida o reducción de la fosforilación por caseína quinasa II.

En humanos caseína quinasa II no fosforila a eIF-2 $\alpha$  (el factor humano no tiene sitios consenso de fosforilación), pero sí fosforila la subunidad  $\beta$  de eIF-2, y la subunidad  $\epsilon$  de eIF-2B, produciendo un aumento de su actividad. Por otro lado, la desfosforilación de esta subunidad de eIF-2B disminuye unas cinco veces la actividad de eIF-2B.

Queda por estudiar si también en levadura se produce la fosforilación del equivalente de la subunidad  $\epsilon$  de eIF-2B (u otros posibles factores implicados en la actividad de eIF-2B), y si estos cambios en la fosforilación afectan a su función.

En cualquier caso, todo indica que la fosforilación de factores de iniciación, como es el caso de eIF-2 $\alpha$ , constituye un sistema de regulación de la tasa de traducción en levaduras.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. Cepas de levadura y *E.coli*. Métodos genéticos. Plásmidos

En el presente trabajo se han utilizado las siguientes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

Cepa	genotipo	procedencia
W303-1A	MATa, <i>SUC2</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	Thomas y Rothstein, 1989
Wmsn2 msn4	W303-1A <i>msn2-Δ3::HIS3</i> , <i>msn4-1::TRP1</i>	Estruch y Carlson, 1993
H2524	MATa, <i>ino1</i> , <i>leu2-3</i> , <i>leu2-112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gcn2Δ</i> , < <i>HIS4-lacZ</i> >@ <i>ura3-52</i>	A.G. Hinnebusch
MCY 829	MATa, <i>his3-Δ200</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ura3-52</i>	M. Carlson
Wbcy1	W303-1A <i>bcy::LEU2</i>	Este trabajo
GG18	MATa, <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>trp1</i> , <i>ade8</i> , <i>cta1-2</i> , CTT1-18/7x- <i>LEU2-lacZ</i>	Marchler <i>et al.</i> , 1993
GG18msn2msn4	GG18 <i>msn2-Δ3::HIS3</i> , <i>msn4-1::TRP1</i>	Martínez-Pastor <i>et al.</i> , 1996

La cepa de *Escherichia coli* utilizada en todos los experimentos fue DH5α (Hanahan, 1985).

Las interrupciones génicas *msn2-Δ3::HIS3* y *msn4-1::TRP1*, descritas en Estruch y Carlson, 1993, se introdujeron en las cepas W303-1A y GG18 para reemplazar los alelos salvajes, según el método de interrupción génica descrito por Rothstein, 1983.

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo se describen a continuación:

Plásmido	Descripción	Procedencia
pAdh1-Msn2	El fragmento <i>KspI-SalI</i> de pMsn2-NotI se reemplazó por un fragmento <i>KspI-SalI</i> del promotor del gen <i>ADH1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , generado por PCR	W. Görner
pAdh1-Msn2-myc9	El cassette <i>myc9 NotI</i> (Piatti <i>et al.</i> , 1996) se introdujo en el sitio <i>Not I</i> de pAdh1-Msn2	W. Görner
pBluescript SK/KS	Vector de clonación en <i>E. coli</i> . Selección a ampicilina	Stratagene
pEL32	Fragmento genómico <i>XbaI-SalI</i> conteniendo el gen <i>MSN2</i> , clonado en YE <sub>p24</sub>	Estruch y Carlson 1993
pEL45	Fragmento genómico <i>EcoRI-EcoRI</i> conteniendo el gen <i>MSN4</i> , clonado en YE <sub>p24</sub>	Estruch y Carlson 1993
pG3	Plásmido episomal de <i>Saccharomyces</i> . Contiene el promotor de la gliceraldehído-3P deshidrogenasa en posición 5' respecto al polylinker. <i>TRP1</i> como marcador seleccionable	Schena <i>et al.</i> , 1991

Material es y Métodos

pG3MSN2	Subclonación del gragmento <i>Bgl</i> II (posición -8 respecto al codón ATG)- <i>Hind</i> III (posición +68 desde el codón de parada) de <i>MSN2</i> en el sitio <i>Bam</i> HI de pG3	Martínez-Pastor <i>et al.</i> , 1996
pG3MSN4	Contiene el fragmento <i>Hind</i> II- <i>Eco</i> RI que contiene la secuencia de <i>MSN4</i> , en el sitio <i>Bam</i> HI de pG3	Martínez-Pastor <i>et al.</i> , 1996
pGEX-3x	Vector de expresión en <i>E. coli</i> que permite la fusión con el gen de la glutation-S-transferasa (GST)	Pharmacia
pGM18/17	Plásmido que contiene 7 copias del fragmento -368/-356 de <i>CTT1</i> , (conteniendo una STRE), en diversas orientaciones, clonadas en el sitio <i>Eco</i> RI de pLS9	Marchler <i>et al.</i> , 1993
pGPD32C	Fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI (nucleótidos 1341 a 2249) de <i>MSN2</i> en Bluescript, tratado con Klenow, clonado en el sitio <i>Bam</i> HI de pG3	Estruch y Carlson 1993
pGPD45C	Fragmento <i>Eco</i> RV- <i>Eco</i> RV de <i>MSN4</i> en pBluescript KS (nucleótidos 1469 a polylinker), clonado en el sitio <i>Bam</i> HI de pG3	Estruch y Carlson 1993
pLS9	Plásmido que contiene la fusión génica <i>LEU2-lacZ</i> , con un sitio <i>Eco</i> RI disponible para la clonación de fragmentos. <i>URA3</i> como marcador seleccionable	Sarokin y Carlson 1985
PLS11	Plásmido que contiene la región promotora de <i>SUC2</i> desde -900 hasta -384 insertada en el sitio <i>Eco</i> RI de pLS9	Sarokin y Carlson, 1985
pMM1	Plásmido para la expresión de <i>Msn2p</i> . El fragmento <i>Bgl</i> II- <i>Hind</i> III que contiene la pauta de lectura abierta de <i>MSN2</i> se clonó en el polylinker del vector pBluescript SK	Este trabajo
pMM11	Contiene el promotor de <i>HSP12</i> , amplificado por PCR (desde -593 a +249) clonado en los sitios <i>Xba</i> I/ <i>Bam</i> HI de pUC19	Este trabajo
pMsn2-NotI	Fragmento <i>Ksp</i> I- <i>Hind</i> II (3.5 kb) de <i>MSN2</i> clonado en el sitio <i>Eco</i> RI de Ycplac111 modificado con un oligo para dar un sitio <i>Ksp</i> I (pMsn2). Por PCR se introdujo un sitio <i>Not</i> I C-terminal en la posición 2109 y se sustituyó el fragmento de 0.3 kb <i>Nde</i> I- <i>Hind</i> III	W. Görner
pUC19	Vector de clonación en <i>E. coli</i> . Selección a ampicilina	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
pVZ26	Fragmento <i>HSP26 Bam</i> HI- <i>Pst</i> I. Selección a ampicilina	S. Lindquist
pZf32-GEX3x	Plásmido para expresión en <i>E. coli</i> . Contiene el fragmento <i>Eco</i> RI C-terminal de <i>MSN2</i> (Estruch y Carlson, 1993), fusionado con el gen GST en el plásmido pGEX-3x	Martínez-Pastor <i>et al.</i> , 1996
pZfh45-GEX3X	Plásmido para expresión en <i>E. coli</i> . El fragmento <i>Xba</i> I- <i>Eco</i> RI de pEL45 se clonó en pBluescript KS y el fragmento <i>Eco</i> RV del mismo (nucleótido 1467-polylinker) se subclonó en el sitio <i>Sma</i> I de pGEX-	F. Estruch

3x		
Ycplac111	Vector centromérico de <i>Saccharomyces</i> . <i>LEU2</i> como marcador seleccionable	Gietz y Sugino, 1988
YEp24	Plásmido multicopia de <i>Saccharomyces</i> . <i>URA3</i> como marcador seleccionable	Botstein <i>et al.</i> , 197
YIp353	Plásmido integrativo de <i>Saccharomyces</i> con múltiples sitios de clonación para la construcción de fusiones con <i>lacZ</i> . <i>URA3</i> como marcador seleccionable	Myers <i>et al.</i> , 1986
YIp356R	Plásmido integrativo de <i>Saccharomyces</i> con múltiples sitios de clonación para la construcción de fusiones con <i>lacZ</i> . <i>URA3</i> como marcador seleccionable	Myers <i>et al.</i> , 1986
12YIP	Plásmido integrativo de <i>Saccharomyces</i> que contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> bajo el control del promotor de <i>HSP12</i> . Fragmento <i>SalI/HindIII</i> de pMM11 clonado en YIp353	Este trabajo
26YIP	Plásmido integrativo de <i>Saccharomyces</i> que contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> bajo el control del promotor de <i>HSP26</i> . Un fragmento <i>AatII</i> conteniendo el promotor de <i>HSP26</i> se trató con polimerasa T4 para hacer los extremos romos y se cortó posteriormente con <i>BamHI</i> . Este fragmento se clonó en el sitio <i>BamHI-SmaI</i> de YIp356R	Este trabajo

## 2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo de levadura utilizados e describen en Sherman *et al.* (1986). El medio rico para levadura (YPD) se compone de extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% y glucosa 2%. El medio sintético (S) contiene Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids (Difco) 0.67%, suplementado con adenina, uracilo, triptófano e histidina a una concentración de 20 mg/l, y leucina y lisina a 30 mg/l. Como fuente de carbono se añadió glucosa 2% (SD), rafinosa 2% (SRaf), o rafinosa 2% + glucosa 0.05% (SRafg). En los experimentos con transformantes de levadura se omitió uracilo o triptófano, según el caso, para el mantenimiento de plásmidos con estos marcadores.

El medio utilizado para crecer *E. coli* fue LB (medio Luria-Bertani): Bactotripton 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0.5%, suplementado con ampicilina (50 mg/l) cuando se requería para la selección de plásmidos.

Todos los medios sólidos contenían, además, agar 2%.

La temperatura normal de crecimiento fue de 30°C para levaduras y 37°C para *E. coli*. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo con agitación continua en un agitador orbital.

### **3. Curvas de crecimiento de levadura**

Se inocularon células de un cultivo en fase estacionaria en medio SD, y se crecieron exponencialmente durante 24 horas. Las células fueron entonces lavadas y diluidas en medio con una fuente de carbono no represora (SRaf, SRafg ó S) a una densidad de  $2-5 \times 10^6$  células /ml. El crecimiento se siguió midiendo la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ).

### **4. Transformación de microorganismos**

Las transformaciones de *E.coli* se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Hanahan (1983).

Para la transformación de levadura se utilizó el método del acetato de litio según Ito *et al.* (1983), con las modificaciones introducidas por Gietz *et al.* (1995). La selección de los transformantes se realizó en placas de SD sin el requerimiento correspondiente en función del marcador incluido en el plásmido.

### **5. Ensayos de viabilidad**

La viabilidad se midió mediante el plaqueo de la dilución apropiada de células en placas de YPD, salvo que se especifique otro medio, y se expresó como el porcentaje de las unidades formadoras de colonia iniciales, medidas antes del choque de estrés. Los experimentos de viabilidad se repitieron al menos tres veces, dando resultados similares.

### **6. Aislamiento de DNA**

#### **6.1. DNA plasmídico de *E.coli***

Para la obtención de plásmidos a pequeña escala (cultivos de 3 ml) se utilizó el método de la lisis alcalina, basado en el descrito por Birnboim y Doly (1979).

Para obtener plásmidos a mayor escala (partiendo de cultivos de 100 ml), se utilizó el kit Quiagen midi, de Promega, basado también en el método de la lisis alcalina.

## 6.2. DNA genómico de levadura

Se utilizó el método de aislamiento de DNA genómico de levadura para análisis por transferencia Southern, descrito en Hoffman y Winston (1987), con ligeras modificaciones. Se partió de 10 ml de cultivo de levadura crecido hasta saturación. Las células se rompieron en tampón de lisis (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM), con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y un volumen de perlas de vidrio, agitando en vórtex 3-4 min. Tras centrifugar, los ácidos nucleicos libres en la fase acuosa se precipitaron con etanol. Tras resuspender y tratar con RNasa A, se hizo una extracción fenólica y se volvió a precipitar.

## 7. Tratamientos enzimáticos del DNA

Los tratamientos habituales en la manipulación del DNA (digestión con endonucleasas de restricción, desfosforilación de los extremos de moléculas lineales, ligación, etc.), se realizaron según Sambrook *et al.* (1989), siguiendo además las recomendaciones de las compañías suministradoras de los enzimas (Boehringer Mannheim, Promega, Amersham, Pharmacia).

## 8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa sumergidos en tampón TBE 0.5x (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM). Se utilizaron geles con distintas concentraciones de agarosa, entre 0.7 y 1.5%, en función del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles y las muestras se prepararon según Sambrook *et al.* (1989). Las electroforesis se realizaron a voltaje constante entre 2 y 10 V/cm, según la concentración de agarosa y la resolución requerida.

La recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se realizó mediante electroelución.

## 9. Extracción de RNA total de levadura

Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua libre de RNasas y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las células se rompieron agitando en vórtex, con perlas de vidrio, en tampón LETS (LiCl 0.1M,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , Tris-HCl 0.01M (pH 7.4), SDS 0.2%) y con un volumen de fenol saturado en LETS. Tras dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), el RNA se precipitó con un volumen de cloruro de litio 5 M y se guardó a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante al menos dos horas. El precipitado se lavó con

etanol 70% y se resuspendió en agua libre de RNAsas. La cantidad de RNA se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

## 10. Electroforesis de RNA en geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído.

Las electroforesis de RNA se realizaron en geles sumergidos de agarosa con formaldehído según se describe en Sambrook *et al.* (1989). La concentración de agarosa fue generalmente del 1.5%, y las concentraciones finales de formaldehído y tampón MOPS fueron de formaldehído 2.2 M y MOPS 1x (MOPS 20 mM, pH 7.5, acetato sódico 8 mM, EDTA 1 mM), respectivamente.

Las muestras se prepararon mezclando el RNA disuelto en agua estéril (entre 5 y 30 µg de RNA en un volumen de 4.5 µl) con 2 µl de tampón MOPS 5x, 3.5 µl de formaldehído y 10 µl de formamida desionizada. Se incubaron a 65°C durante 15 min y se añadieron 2 µl de disolvente de muestras (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.45 (p/v), xilencianol 0.4% (p/v), bromuro de etidio 0.5 µg/µl. La preparación de las muestras se realizó siempre inmediatamente antes de la electroforesis, que se desarrolló en tampón MOPS 1x a 5 V/cm durante 4 h, con una pre-electroforesis previa de 5 min.

## 11. Hibridación de DNA y RNA sobre filtro con sondas marcadas.

Para la transferencia de DNA desde geles de agarosa a membranas de nylon se siguió el método de capilaridad descrito por Southern (1975).

Para la transferencia de RNA desde geles de agarosa a membranas de nylon se siguió el método de transferencia *Northern*, según se describe en Sambrook *et al.* (1989).

### 11.1 Marcaje de sondas radiactivas de DNA

El marcaje de sondas radiactivas se realizó con el kit Rediprime, de Amersham, que se basa en el método del cebador al azar o *random primed* (Feinberg y Vogelstein, 1983, 1984), siguiendo las instrucciones del proveedor. Como nucleótido marcado se utilizó [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP, suministrado también por Amersham. Las sondas utilizadas fueron las siguientes:

Gen	Obtención	Procedencia
<i>HSP26</i>	fragmento <i>SphI</i> - <i>BglII</i> de 1.4 kb obtenido del plásmido pVZ26	Susek y Lindquist, 1990

<i>HSP12</i>	fragmento <i>EcoRI</i> de 0.5 kb obtenido a partir del cDNA de <i>HSP12</i>	Praekelt y Meacock, 1990
<i>CTT1</i>	fragmentos <i>EcoRI</i> de 1.3 + 1.1 kb obtenidos del plásmido pRB322-5109	Spevak <i>et al.</i> , 1983
<i>DDR2</i>	fragmento <i>HindIII</i> de 1.5 kb obtenido del plásmido pBRA2	McClanahan y McEntee, 1986
<i>SSA3</i>	fragmento <i>EcoRV-BamHI</i> obtenido del plásmido SSA3H	Werner-Washburne <i>et al.</i> , 1987
<i>SSA1</i>	fragmento <i>EcoRV-PstI</i> de 0.3 kb, del plásmido EC551	Werner-Washburne <i>et al.</i> , 1989
<i>UBI4</i>	fragmento <i>EcoRI-HincII</i> de 2 kb obtenido del plásmido pUB2	Finley <i>et al.</i> , 1987
<i>HSP104</i>	fragmento <i>EcoRI</i> de 1.2 kb obtenido del plásmido pUZ1	Y.Sánchez

## 12. Obtención de proteínas para retardo en gel

### 12.1. Transcripción y traducción *in vitro* de *MSN2*

Para la síntesis *in vitro* de Msn2p, se utilizaron 5 µg de plásmido pMM1 linearizado con *ApaI* para transcribir *in vitro* con polimerasa T3. La síntesis de RNA y el *capping* se realizaron según se describe en Estruch y Carlson (1990). El RNA se tradujo en presencia de [<sup>35</sup>S]-metionina en un lisado de reticulocito de conejo (Promega), según las instrucciones del proveedor.

### 12.2. Expresión de Msn2-GSTp y Msn4-GSTp en *E. coli*

Las fusiones Msn2-GSTp y Msn4-GSTp se expresaron en *E. coli* transformada con los plásmidos pZf32-GEX3x y pZfh45-GEX3x respectivamente, y la purificación de proteínas se realizó según se describe en Smith y Johnson, 1988.

### 12.3. Extractos de proteína total de levadura

El método utilizado fue una variación del descrito en Schmitt y McEntee (1996). Se creció un cultivo durante la noche, y a partir de éste se inocularon 100 ml de YPD a una DO<sub>600</sub> de 0.2. Se dejó crecer hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1, y se recogieron las células por centrifugación, eliminando todo el sobrenadante. Se resuspendieron en 2 volúmenes de tampón A (Hepes 50 mM, pH 8.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 M, EDTA 1 mM, glicerol 5%) y, tras añadir perlas de vidrio (hasta 2/3 del volumen total), se agitó en vórtex durante cuatro intervalos de 4 min, a 4°C, dejando reposar en hielo entre los intervalos. Se recogieron las perlas de vidrio y restos celulares centrifugando

5 min en microcentrífuga de mesa a 13000 rpm. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 14000 rpm durante 1 hora a 4°C. Este sobrenadante clarificado se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta una concentración final del 50% de saturación. Se recogieron las proteínas por centrifugación en microcentrífuga de mesa (15 min a 13000 rpm) y se resuspendieron en 200  $\mu\text{l}$  de tampón B (KCl 75 mM, Hepes 25 mM, pH 8.0, ditiotreitól 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol 12%). La concentración de proteínas se midió con el kit Bio-Rad Protein Assay, basado en el método de Bradford (1976).

### **13. Marcaje radiactivo de oligonucleótidos**

#### **13.1. Para retardo en gel:**

Se marcaron en primer lugar 20-75 ng de una de las cadenas del oligonucleótido, con 50-75  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (6000 Ci/mmol, de Amersham), y 1 unidad de polinucleótido quinasa de T4, en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ . La incubación se realizó a 37°C durante 10 min. Una vez finalizada la reacción de marcaje, se hibridó el oligonucleótido marcado con el triple de cantidad de la cadena complementaria, se incubó la mezcla a 95°C durante 2 min y se dejó que la temperatura disminuyese lentamente. Cuando fue menor de 50°C, se completó el volumen hasta 50  $\mu\text{l}$  con solución NaCl 0.5 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. Cuando la temperatura bajó por debajo de los 30°C, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de STE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) y se pasó la muestra por una columna de Sephadex G-10, equilibrada en STE, en una jeringuilla de 1 ml. Se centrifugó 10 segundos a 1000 rpm en centrífuga de mesa, y del eluido se midió 1  $\mu\text{l}$  en un contador de centelleo. La incorporación media habitual fue entre  $1\text{-}5 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$ .

#### **13.2. Para extensión de cebador:**

Se marcaron 20 ng de oligonucleótido con 50  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (6000 Ci/mmol, de Amersham), y 1 unidad de polinucleótido quinasa de T4, en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ . Tras incubar a 37°C durante 10 min, se añadieron 140  $\mu\text{l}$  de TE pH 7.5 (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM). La muestra se extrajo dos veces con fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se precipitó con 3 volúmenes de etanol/0.1 volúmenes de acetato sódico 3M. Tras lavar con etanol 70% y secar la muestra, el precipitado se resuspendió en 40  $\mu\text{l}$  de agua, y se midió 1  $\mu\text{l}$  en un contador de centelleo. La marca incorporada habitualmente fue  $0.8\text{-}1 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$ .



## 14. Retardo en gel

Los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de retardo en gel son los que se describen a continuación. En todos los casos se utilizaron oligonucleótidos de doble cadena.

Oligonucleótido	Secuencia
HSP12	5'-CGA TTT TCC AGG GGC TGT-3'
hsp12	5'-CGA TTT TCC AGT GGC TGT-3'
CTT1-18	5'-AATTGGTAAGGGGCC-3'
CTT1-20	5'-AAT TCA AGG GGA TCA CCG GTA AGG GGC CAA G-3'
CTT1-23	5'-AAT TCA ACT AGA TCA CCG GTA ACG AGC CAA G-3'
DDR2	5'-TTGTCTTTTCTCACCCCTTATGGGGAC-3'
MIG1 bs	5'-GGT AAA AAT GCG GGG AA-3'

### 14.1.Reacción de unión DNA-proteína

En los casos en que se utilizó Msn2p obtenida *in vitro*, o las proteínas de fusión Msn2-GST y Msn4-GST, las reacciones de unión se llevaron a cabo en volúmenes de 10 µl conteniendo el tampón Tris-HCl 30 mM (pH 7.5), KCl 90 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, DTT 1 mM, ZnSO<sub>4</sub> 10 µM, Ficoll (Pharmacia) 4% y 1 µg de poly(dI-dC) (Pharmacia). Tras la adición de la proteína (0.4 µg de proteína de fusión ó 2 µl de lisado de reticulocito) y de los competidores no marcados, las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadieron aproximadamente 0.2 ng/carrera de oligonucleótido marcado, y la reacción se incubó durante 15 min adicionales a temperatura ambiente. Las mezclas de reacción se aplicaron inmediatamente en un gel de poliacrilamida 7% (acrilamida:bisacrilamida 40:1, razón en peso), glicerol 4%, en TBE 0.5x. Los geles se sometieron a preelectroforesis durante 1 h a 20 mA en tampón TBE 0.5x, a 4°C y, tras aplicar las muestras, la electroforesis se corrió a 20 mA a 4°C hasta que el azul de bromofenol alcanzó tres cuartos del final del gel. Los geles se transfirieron entonces a papel Whatman 3M, se secaron y se autorradiografiaron.

En los casos en que se utilizaron extractos totales de proteína, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µl, utilizando el mismo tampón, y unos 50 µg de extracto de proteína total. En los casos en que se añadió anticuerpo, este se incubó con la mezcla de tampón, poly(dI-dC) y proteínas durante 2h en hielo. Tras añadir el oligonucleótido marcado (la misma cantidad que en el caso anterior), la mezcla se incubó durante 20

minutos a temperatura ambiente. El resto del proceso se realizó exactamente igual que en el caso anterior, a excepción de que el porcentaje de poliacrilamida de los geles fue del 5%, y que éstos no contenían glicerol.

En todos los casos la competencia se realizó añadiendo oligonucleótido no marcado en un exceso de 200 veces.

## **15. Análisis de *footprinting in vivo***

El *footprinting* genómico se realizó utilizando sulfato de dimetilo (DMS). Los sitios de metilación se detectaron por extensión de cebador con Taq polimerasa.

Se crecieron 600 ml de cultivo de las cepas correspondientes en YPD, salvo que se especifique otro medio, a 30°C, hasta una  $DO_{600}$  de 0.6-1. Se aplicaron las correspondientes condiciones de estrés y se recogieron las células rápidamente por filtración. Se resuspendieron en YPD con un volumen final de 2-3 ml. Tras añadir 2.5 µl de DMS/ml de células, se incubó durante 4 min a temperatura ambiente. Las reacciones se pararon con 30 ml de tampón TNEβ frío (Tris-HCl 10mM, pH 8.0, EDTA 1mM, NaCl 40 mM, β-mercaptoetanol). Tras centrifugar, las células se lavaron una vez en 30 ml de tampón SCEβ (182 g/l de sorbitol, 29.4 g/l de citrato tri-sódico di-hidrato, 2.92 g/l de EDTA pH 7, β-mercaptoetanol 100 mM), y se resuspendieron en 2 ml de tampón SCEβ conteniendo 5 mg/ml de Zymolyase 20T de *Arthrobacter luteus* (Seikagaku Corporation). Tras incubar a 37°C durante 45 min, las células se lisaron con 2 ml de tampón de lisis (SDS 2%, Tris-HCl 0.1 M, pH 9.0, EDTA 50 mM) incubando 5 min a 65°C. Tras añadir 2 ml de acetato potásico 5 M, las muestras se pusieron en hielo durante al menos 1 hora. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13000 rpm durante 40 min a 4°C. El DNA se precipitó con 1 volumen de etanol y  $NH_4OAc$  0.5 M a pH 5.5, lavando dos veces con etanol 50% y resuspendiendo en 4 ml de TE. La precipitación de DNA se repitió varias veces con  $NaOAc$  0.3 M y 1 volumen de etanol, reduciendo cada vez el volumen de resuspensión. El DNA se trató con RNasa A (libre de DNasas) durante 1 hora a 37°C, precipitando como anteriormente, y resuspendiendo en 0.3 ml de TE. Para cada reacción de extensión de cebador, 50 µl de DNA se digirieron con 25 unidades de un enzima de restricción que cortase a unas 200-300 pb del cebador ( *Bgl*III en el caso del promotor *HSP26*, *Apa*I ó *Hind*III para *HSP12* y *Cla*I para *HSP104*), a 37°C durante 4 horas, extrayendo con fenol/cloroformo y precipitando. Al DNA se le añadieron aproximadamente 1 ng de cebador, oligonucleótido marcado en 5' con [ $\gamma$ - $^{32}P$ ] ATP (unas  $10^6$  cpm), 10 µl de tampón de PCR 10x y agua hasta 96 µl. La muestra se calentó a 95°C durante 5 min, y tras añadir 3 µl de dNTPs 10 mM y 8 unidades de Taq polimerasa, se llevaron a cabo 40 ciclos de extensión de cebador (1 min a 94°C, 2 min a 50°C y 3 min a 72°C), seguidos de 10 min de

extensión a 72°C. Los productos de PCR se purificaron por adición de 10 µl de solución al 10% de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y precipitación en hielo durante 20 min. El DNA se recogió por centrifugación (30 min, 14000 rpm a 4°C), resuspendiendo en 0.2 ml de NH<sub>4</sub>OAc 0.5 M/NaOAc 0.3 M, y precipitando de nuevo con 660 µl de etanol. Tras una segunda precipitación con etanol, las muestras se resuspendieron en 5 µl de NaOH 100 mM, EDTA 1 mM, y 5 µl de tampón disolvente de muestras. Una alícuota de 2 µl se analizó en un gel de secuencia al 8% en poliacrilamida. Los oligonucleótidos utilizados para la extensión son los siguientes:

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Situación respecto ATG	Distancia a STRE
HSP12-1	ccttcctcttcaatttctag	-306 a -329	80 pb
HSP26-1	acaattctctacctcttggcaatgtggc	-584 a -555	50 pb
HSP104-1	tgaaggaattgaggcaagattacaatgcc	-104 a -132	83 pb

## 16. Medida de actividades enzimáticas.

### 16.1. Ensayos β-galactosidasa

La actividad enzimática β-galactosidasa se ensayó según se describe en Ausubel *et al.* (1994). El método se basa en el descrito previamente por Miller (1972).

### 16.2. Ensayos invertasa

La actividad invertasa secretada se ensayó en células enteras según se describe en Goldstein y Lampen (1975), con las modificaciones descritas por Celenza y Carlson (1984). Tras recoger las células de los cultivos por centrifugación se congelaron a -20°C. Tras su descongelación, se lavaron 2 veces con un volumen abundante de azida sódica 10 mM fría y se resuspendieron en 250 µl de azida sódica fría, manteniendo en hielo. Se añadieron 100 µl de acetato sódico 0.2 M, pH 5.1 a 50 µl de estas células, precalentando en baño de agua a 37°C durante 3 minutos. Se añadieron 50 µl de sacarosa 0.5 M, preparada inmediatamente antes de su utilización y precalentada. Tras mezclar se incubó 30 minutos a 37°C. Se añadieron 300 µl de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M y se transfirió el tubo a un baño de agua hirviendo, donde se dejó hervir 3 min para inactivar el enzima. Para valorar la glucosa, tras enfriar las muestras, se añadieron 2 ml de una mezcla que contenía 40

$\mu\text{g}$  de glucosa oxidasa, 5  $\mu\text{g}$  de peroxidasa, 30  $\mu\text{g}$  de o-dianisidina y 0.2 ml de  $\text{KPO}_4$  1 M, pH 7.0 en 2 ml de agua, y se incubó 30 minutos a 37°C. La reacción se paró con 2 ml de HCl 6 M y se midió la absorbancia a 540 nm. El mismo procedimiento se siguió con las muestras patrón, que en vez de las células contenían 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{g}$  de glucosa. Como blanco se utilizó el tubo 0 de las muestras patrón. Para 50  $\mu\text{l}$  de células, se interpoló la cantidad de glucosa en la recta patrón, y se dividió por 1.368, lo que nos da las unidades invertasa. Estas se expresan en  $\mu\text{moles}$  de glucosa desprendida/min por 100 mg de peso seco de células.

### **17. Medida del nivel de traducción y de incorporación de Metionina**

El método utilizado fue el descrito en Varela *et al.*(1992). Muestras de 2 ml de cultivo en los medios indicados (SD, SRaf, etc) fueron marcadas con un pulso de 0.45 MBq L- $^{35}\text{S}$ -metionina ( $>37$  TBq  $\text{mmol}^{-1}$ , Amersham), durante 10 min a 30°C. Las muestras se pusieron inmediatamente en un baño de etanol-hielo a -20°C y se dividieron en alícuotas de 1 ml. Para medir la incorporación de metionina en células, una alícuota fue directamente filtrada a través de filtros Whatman GF-C, que retienen las células de levadura enteras, y lavada con medio fresco. Para medir la radioactividad incorporada a proteínas (medida del nivel de traducción) una segunda alícuota se agitó en vórtex con perlas de vidrio, tras la adición de 0.5 ml de NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 perlas de NaOH + 1.33 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta un volumen final de 10 ml), se incubó a 37°C durante 10 min, se precipitó con 2 ml de ácido tricloroacético 25% (TCA) frío durante 15 minutos, y se filtró a través de filtros Whatman GF-C, lavando con TCA 10% frío (síntesis proteica).

### **18. Análisis de proteínas por transferencia Western e incubación con anticuerpos.**

Extractos de proteína total obtenidos según el apartado 12.3 se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% en poliactilamida. La electrotransferencia (*Western*) de las proteínas a un filtro de nitrocelulosa se realizó en una cubeta miniProtean II de BioRad, a 200 mA durante 90 min, en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%). Una vez terminada la transferencia, el filtro fue incubado durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBST (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, 0.1% Tween 20) conteniendo leche descremada en polvo al 5%. Se incubó con el anticuerpo primario (anti  $\beta$ -galactosidasa monoclonal, de Boehringer Mannheim, dilución 1:2000 en TBST, o anti-Msn2p, policlonal, dilución 1:750 en TBST) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados de 10 min con TBST, y se añadió el anticuerpo

secundario (anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina, de Bio-Rad, diluído 1:5000, o anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, de BioRad, dilución 1:5000 en TBST), incubando 90 min más. Tras lavar 3 veces de 10 min con TBST, se lavó una vez en tampón de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), y se reveló con los reactivos para fosfatasa alcalina, BCIP y NBT (ambos de Promega), parando la reacción con agua.



## **RESULTADOS**





**CAPÍTULO I: FUNCIÓN DE LOS FACTORES  
TRANSCRIPCIONALES Msn2p Y Msn4p EN LA  
RESPUESTA A ESTRÉS DE *Saccharomyces cerevisiae***



## 1. Caracterización fenotípica del doble mutante *msn2 msn4*.

### 1.1. Papel de *MSN2* y *MSN4* en la utilización de diferentes fuentes de carbono

#### 1.1.1. Antecedentes

El gen *MSN2* fue aislado utilizando una estrategia genética diseñada para identificar genes relacionados funcionalmente con *SNF1* (Estruch y Carlson, 1990). El gen *SNF1* (*CAT1/CCR1*) codifica una serina-treonina proteína quinasa necesaria para la desrepresión de los genes sometidos a represión catabólica. Snf1p parece actuar inhibiendo la represión transcripcional mediada por el complejo Ssn6p/Tup1p/Mig1p (Keleher *et al.*, 1992; Nehlin *et al.*, 1990 y 1991, Schultz y Carlson, 1987; Williams *et al.*, 1991).

En esta estrategia se utilizó una cepa de levadura portadora de un alelo termosensible del gen *SNF1* (*snf1-11ts*). Esta cepa se transformó con una genoteca genómica de levadura en el vector multicopia YEp24 y la selección de los transformantes se realizó en medio Sraf + 0.1% glucosa-ura, a la temperatura semirestrictiva de 33°C, condiciones que no permiten el crecimiento de la cepa mutante.

Uno de los plásmidos obtenidos mediante esta estrategia fue pEL32. La presencia de este plásmido incrementa 3-4 veces la expresión del enzima invertasa (requerido para metabolizar la rafinosa) en la cepa *snf1-11ts*. Este incremento es más moderado (2-3 veces) en una cepa portadora de la mutación *snf4-Δ2*. *SNF4* codifica una subunidad del complejo de la quinasa Snf1p, necesaria para su actividad. pEL32 suprime el fenotipo Raf de *snf1-11ts* a 33°C, pero no a 37°C. En una cepa portadora de una mutación nula *snf1-Δ10*, pEL32 sólo permite un débil crecimiento a la temperatura de 30°C. Por otra parte, el hecho de que la presencia de pEL32 no tenga efecto sobre la actividad quinasa *in vitro* de Snf1p sugiere que el gen supresor actúa por debajo de Snf1p en la ruta de transducción de señal (Estruch y Carlson, 1993).

El gen supresor de pEL32 se designó *MSN2* (multicopy suppressor of snf). *MSN2* codifica una proteína de 77,183 KDa, que contiene dos dedos de cinc en tándem cerca del extremo carboxilo terminal. Estos dedos de cinc son del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, que fueron descritos por primera vez en el factor transcripcional TFIID de *Xenopus* (Miller *et al.*, 1985). Son homólogos a los dedos de cinc de las proteínas Mig1p y Rgm1p de levadura, y a los de las proteínas de mamíferos Egr (Early Growth Response: Respuesta temprana al crecimiento): Egr-1/Zif268/Krox-24/NGFI-A y Egr-2/Krox-20 (Joseph *et al.*, 1988; Lemaire *et al.*, 1988; Milbrandt, 1987, Sukhatme *et al.*, 1988,

Estruch, 1990), así como a la proteína del tumor de Wilms (Call *et al.*, 1990, Gessler *et al.*, 1990). Msn2p posee un extremo amino terminal ácido, así como una zona ácida entre los residuos 260 y 279. El extremo carboxilo terminal es básico y altamente cargado. Además, tiene un alto contenido en serina (16%), treonina (8%) y asparagina (14%).

Cepas portadoras de mutaciones en el gen *MSN2*, ya fuera por inserción (*msn2-1::URA3* y *msn2-2::URA3*) o por delección (*msn2-Δ3::HIS3*), no mostraron ningún fenotipo en cuanto al crecimiento aeróbico en glucosa, crecimiento en rafinosa en presencia de antimicina A (inhibidor de la respiración) ó crecimiento anaeróbico en rafinosa. Esto llevó a considerar la posible existencia de un gen homólogo, funcionalmente redundante, que explicara la ausencia de fenotipo de los mutantes *msn2*.

En busca de este posible gen, se rastreó una genoteca genómica de levadura con una sonda correspondiente a la secuencia de los dedos de cinc de *MSN2*. Mediante esta estrategia se aisló el plásmido pEL45. Este plásmido también suprime el fenotipo Raf en *snf1-11ts* y *snf4-Δ2*, pero más débilmente que pEL32. El gen contenido en la región de pEL45 con homología a *MSN2* se denominó *MSN4*.

*MSN4* también posee dos dedos de cinc en el extremo C-terminal altamente homólogos a los de *MSN2*, y con mayor homología que respecto a los genes anteriormente nombrados. Ambas proteínas presentan un 41% de identidad, y un 60% de similitud. Son similares en tamaño y composición en aminoácidos. Msn4p también posee un alto contenido en serina (15%), treonina (8%) y asparagina (11%). Además, existen dos regiones cortas (correspondientes a los residuos 285-313 y 485-514 de Msn2p) altamente conservadas, que presentan un 69 y 71% de identidad, respectivamente.

La disrupción de *MSN4*, como la de *MSN2*, no produjo ningún fenotipo, observándose una expresión en invertasa normal. La doble disrupción *msn2-1::URA3 msn4-1::URA3*, en cambio, producía una disminución de 2 a 3 veces en la expresión de invertasa, aunque no suficiente para producir un defecto en crecimiento en rafinosa. Un doble mutante por delección de los genes (*msn2-Δ3::HIS3 msn4-Δ2::URA3*) crecía más lentamente en rafinosa y galactosa, en anaerobiosis, mientras que los correspondientes mutantes sencillos seguían sin presentar fenotipo.

La introducción de las mutaciones *msn2-Δ3::HIS3* y *msn4-1::TRP1* en la cepa W303-1A, que muestra un crecimiento en medios con galactosa más vigoroso que las cepas derivadas de S288C (utilizadas en los estudios mencionados anteriormente), dio lugar a una cepa (Wmsn2msn4) que mostró un defecto acusado en la capacidad de fermentar galactosa. Todos los fenotipos indicaban que, aunque la expresión de invertasa no estaba seriamente afectada por la ausencia de *MSN2/4*, sí que parecía haber un defecto en la utilización de azúcares.

Esto era, a grandes rasgos, lo que se conocía de los genes *MSN2* y *MSN4* cuando se inició el presente trabajo. Por un lado, se conocía que las proteínas Msn2p y Msn4p eran homólogas funcionalmente, además de en secuencia, ya que sólo la doble delección mostraba fenotipos relacionados con la utilización de fuentes de carbono. Ambos genes podrían tener un papel en la activación de *SUC2*, pero en su ausencia el defecto no era tampoco demasiado acusado, por lo que no estaba claro el papel fisiológico que podían desempeñar. Una explicación al débil fenotipo se daría si Msn2p y Msn4p contribuyeran modestamente a la activación de *SUC2*, pero fueran otras proteínas no relacionadas las principales responsables de su activación. También podría ser que hubieran más proteínas de función redundante a la de Msn2p y Msn4p, que no hubieran sido identificadas en este rastreo. Por último, podrían estar afectando a la expresión de *SUC2* indirectamente, afectando a otro activador.

Además, también se podía esperar que Msn2p y Msn4p afectaran a otros genes diferentes a *SUC2*. Por ejemplo, los datos sugerían un posible papel de Msn2p y Msn4p en la ruta de utilización de galactosa, en la que *SUC2* no participa.

Por todo ello, uno de los primeros objetivos del presente trabajo fue el de intentar elucidar el papel que podían desempeñar *MSN2* y *MSN4* en la utilización de fuentes de carbono diferentes a la glucosa. Se pasó a utilizar la cepa W303-1A y derivados como *background* de trabajo por su mejor crecimiento en galactosa, siendo la utilización de este azúcar uno de los defectos asociados a la mutación. En primer lugar, y puesto que los fenotipos anteriormente descrito se habían observado en el crecimiento en placa, se procedió a estudiar el crecimiento en medio líquido de las cepas W303-1A y Wmsn2msn4 en presencia de diferentes fuentes de carbono.

### **1.1.2. Análisis del crecimiento en medio líquido con fuentes de carbono distintas a la glucosa.**

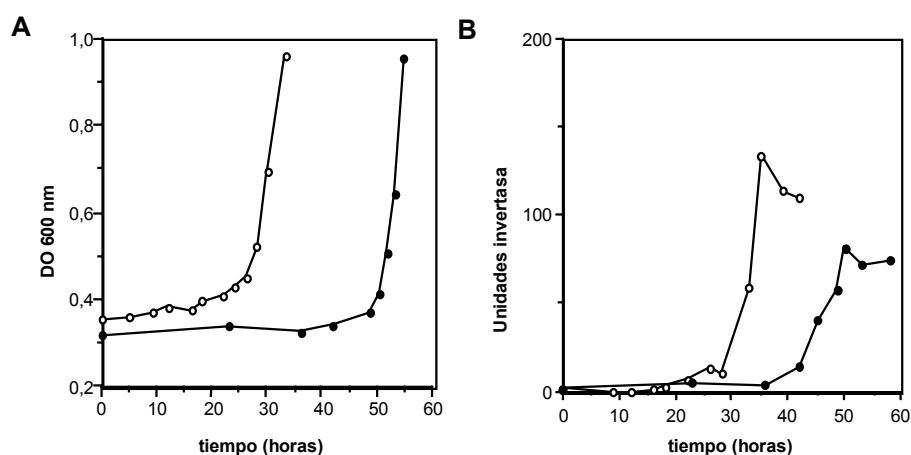
En primer lugar se estudió el crecimiento de ambas cepas al transferir células creciendo exponencialmente en YPD a un medio rico (YP) con galactosa o rafinosa como fuente de carbono (YPGal o YPRaf). En estas condiciones no se encontraron diferencias de crecimiento entre ambas cepas (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando se analizó el crecimiento en medio sintético conteniendo como fuente de carbono rafinosa o galactosa libres de glucosa se observó un comportamiento diferente en la cepa silvestre W303-1A y en la mutante Wmsn2msn4.

La figura 1A muestra el resultado de un experimento en el que células de levadura en fase exponencial de crecimiento en medio sintético con glucosa fueron transferidas a un medio sintético donde la fuente de carbono fue sustituida por rafinosa (SRaf). El crecimiento se analizó midiendo la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ), mientras que la inducción del

gen *SUC2* se midió ensayando la actividad invertasa en células enteras según se describe en Materiales y Métodos.

Observamos que tras el cambio brusco en la fuente de carbono, las células que estaban en fase de crecimiento exponencial mostraron una parada transitoria del crecimiento. La cepa silvestre W303-1A no reiniciaba el crecimiento hasta unas 20 horas después del cambio, un período de latencia sorprendentemente largo, que no había sido anteriormente descrito. Por esta razón, y paralelamente a nuestros estudios sobre los genes *MSN2* y *MSN4* intentamos analizar las causas de esta larga parada del crecimiento, obteniendo los resultados que se describen en el capítulo II de este trabajo.

El hecho más destacable observado en este experimento era que el período de latencia, ya de por sí largo en la cepa silvestre, se alargaba en el doble mutante *msn2 msn4* hasta unas 50 horas, más del doble que en la cepa silvestre. No obstante, una vez iniciado, el ritmo de crecimiento era similar en ambas cepas. Estos resultados eran cualitativamente repetibles, aunque, según el experimento, el período de latencia podía variar en unas pocas horas.



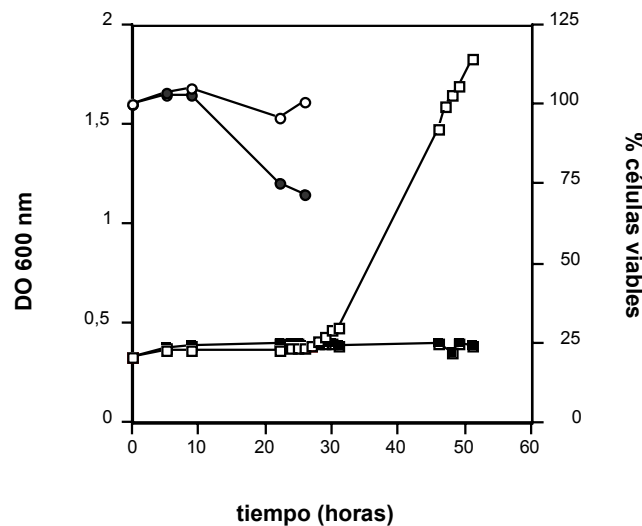
**Figura 1. Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre el crecimiento en fuentes de carbono diferentes a la glucosa.** A) Curva de crecimiento de la cepa silvestre W303-1A (círculos vacíos) y de la cepa mutante Wmsn2msn4 (círculos llenos) en medio sintético conteniendo 2% rafinosa (SRaf). B) Variación de la actividad invertasa de la cepa silvestre W303-1A (círculos vacíos) y de la cepa mutante Wmsn2msn4 (círculos llenos) en medio sintético conteniendo 2% rafinosa (SRaf).

Cuando se midió la actividad invertasa a lo largo de la curva de crecimiento (figura 1B), se observó que los niveles de actividad invertasa eran nulos durante la mayor parte del período de latencia, empezando a detectarse actividad antes del reinicio del crecimiento, y alcanzándose el máximo de expresión cuando las células ya habían resumido totalmente el

crecimiento exponencial (cepa silvestre) o un poco antes, en el caso del doble mutante. Como era esperable, las células no eran capaces de reiniciar el crecimiento hasta que expresaban en cantidad suficiente la enzima invertasa, que permite metabolizar la nueva fuente de carbono. Y esto sucedía así en ambas cepas, aunque en el doble mutante se produce un alargamiento del tiempo necesario para expresar el enzima.

Pero, ¿por qué se tarda tanto en sintetizar la invertasa? Medidas de la activación transcripcional mostraron que tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante el gen *SUC2* se transcribía al mismo nivel (resultados no mostrados). Como se discute en el capítulo II, la ausencia de actividad invertasa no se debe a un defecto en la transcripción sino en la traducción.

Pero en el momento en que se llevaron a cabo estos experimentos, desconocíamos aún el hecho de la parada de la traducción provocada por la ausencia de glucosa, por lo que, se buscaron otras explicaciones a la excesiva longitud del período de latencia.



**Figura 2. Resistencia al cambio de fuente de carbono.** Eje izquierdo: Curva de crecimiento de la cepa silvestre W303-1A (cuadrados vacíos) y de las células mutantes *msn2 msn4* (cuadrados llenos) en medio sintético conteniendo 2% rafinosa (SRaf). Eje derecho: En los tiempos indicados, tras el cambio de fuente de carbono, se midió la viabilidad de la cepa silvestre W303-1A (círculos vacíos) y *msn2 msn4* (círculos llenos) según se indica en Materiales y métodos

Una posible explicación del período de latencia era que las células estuvieran perdiendo viabilidad al verse bruscamente privadas de glucosa, durante el tiempo en que aún no disponen de los enzimas necesarios para metabolizar el nuevo azúcar. Al disminuir el número de células vivas,

transcurriría más tiempo hasta que pudiera observarse macroscópicamente el reinicio del crecimiento, medido por aumento de la densidad óptica a 600 nm. El alargamiento de la fase de latencia en el doble mutante podría explicarse si esta cepa presentase una tasa de supervivencia menor que la de la cepa silvestre en estas condiciones.

Para comprobar estas hipótesis se realizaron medidas de viabilidad en diferentes puntos de la curva de crecimiento en SRaf, obteniéndose el resultado presentado en la figura 2. Se pudo comprobar que durante el período de latencia de la cepa silvestre (alrededor de 24 horas, en este caso) las células de W303-1A no sufrían una pérdida significativa de viabilidad. Por tanto, quedaba descartado que ésta fuera la explicación de la larga fase de latencia en la cepa silvestre.

En la cepa Wmsn2msn4, en cambio, durante este mismo período se observaba cierta disminución de la viabilidad, en comparación con la cepa silvestre. Esta pérdida de viabilidad podría ser uno de los factores implicados en el retraso respecto a la cepa silvestre, pero la magnitud de la caída de viabilidad durante este tiempo no era lo suficientemente grande como para que pudiera ser determinante. Por lo tanto, debían existir otros factores que explicaran el alargamiento de la fase de latencia en el mutante *msn2 msn4*, algunos de los cuales intentaremos discutirlos en el capítulo II del presente trabajo.

Pero el hecho de que la cepa Wmsn2msn4 fuera más sensible a la falta de fuente de carbono disponible que la cepa silvestre era un resultado a considerar, que nos indicaba que Wmsn2msn4 resistía peor que la cepa silvestre la situación de estrés creada por la ausencia de fuente de carbono disponible. Este resultado nos indujo a caracterizar mejor este fenotipo, así como a estudiar la resistencia del doble mutante *msn2 msn4* frente a diferentes condiciones de estrés, con objeto de comprobar si el defecto de resistencia se limitaba a la ausencia de carbono, o era un defecto general de resistencia a situaciones de estrés.

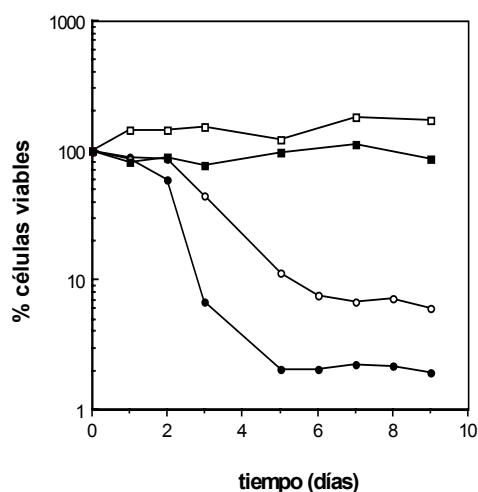
## **1.2. Resistencia de *msn2 msn4* frente a diferentes condiciones de estrés**

Para caracterizar mejor este efecto, realizamos un estudio de la disminución de viabilidad experimentada por la cepa silvestre W303-1A y el doble mutante *msn2 msn4* en condiciones de ausencia total de fuente de carbono (medio sintético, S). La figura 3 muestra el resultado de un experimento en el que células en fase exponencial de crecimiento o en fase estacionaria fueron transferidas a medio sintético S, y durante 9 días se midió el porcentaje de células capaces de resistir estas condiciones de ayuno.

Como se observa en la figura 3, comprobamos que, cuando las células que se transfieren a medio S se encuentran en fase exponencial, la cepa Wmsn2msn4 es más sensible a condiciones de ayuno de fuente de



carbono que la cepa silvestre. A los 2 días, la reducción de viabilidad alcanza un 30% en la cepa Wmsn2msn4, mientras que el nivel de viabilidad de la cepa silvestre no ha disminuido. En el tercer día se empiezan a observar cambios, ya importantes, en W303-1A, que disminuye su viabilidad al 45%, pero en la cepa mutante el efecto es aún más importante, ya que sólo un 7% de las células iniciales sobreviven (una diferencia en viabilidad de casi un orden de magnitud con respecto a la cepa silvestre). Finalmente, las pérdidas de viabilidad empiezan a estabilizarse en ambas cepas, quedando un *pool* más o menos constante de células resistentes a esta situación de estrés, que corresponde al 8% de las células silvestres, y el 2% de las células mutantes.



**Figura 3. Resistencia al ayuno de fuente de carbono.** Células de levadura de un cultivo crecido durante la noche de W303-1A (símbolos vacíos) o cepa Wmsn2msn4 (símbolos llenos) se inocularon en YPD y se crecieron hasta saturación (cuadrados) o se mantuvieron en crecimiento exponencial durante 2 días (círculos). Las células fueron entonces lavadas y resuspendidas en medio sintético sin glucosa (S) a una  $DO_{600}$  de 0.3. La viabilidad se midió según se describe en Materiales y Métodos.

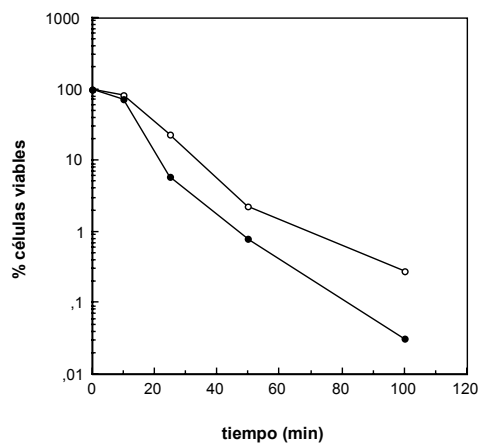
En cambio, cuando se transfirieron células en fase estacionaria no se observaron diferencias en viabilidad entre ambas cepas, que mantuvieron su viabilidad constante durante el tiempo estudiado. Tampoco se observaron pérdidas de viabilidad en ninguna de las dos cepas cuando las células, ya fuera en fase exponencial o estacionaria, fueron transferidas a un medio sin fuente de nitrógeno, al menos durante el tiempo en que se siguió la viabilidad (resultados no mostrados). Así pues, la pérdida de viabilidad por ausencia de fuente de carbono se limita a las células que se encuentran en fase exponencial. Estos experimentos son repetibles cualitativamente, aunque la curva de pérdida de viabilidad puede variar según el experimento.

Para comprobar si la mayor sensibilidad de *msn2 msn4* se extendía a otras condiciones de estrés, pasamos a estudiar el crecimiento de esta cepa en medio líquido (YPD), en condiciones de estrés osmótico (YPD + NaCl 0.8 M) y oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM). En ambos casos, la cepa Wmsn2msn4 tuvo un ritmo de crecimiento similar al de la cepa silvestre, sin que se detectaran diferencias en el reinicio del crecimiento, tras la parada transitoria del crecimiento que ocurre tras el cambio de medio. Esta parada es de tan solo 3-4 horas, siendo por tanto mucho más corta que la observada en medio SRaf.

Las condiciones de estrés estudiadas son bastante suaves, mientras que la ausencia total de fuente de carbono, donde habíamos observado diferencias entre ambas cepas, constituye una situación de estrés muy severo. Por ello, decidimos someter a las cepas W303-1A y Wmsn2msn4 a condiciones de estrés más severas que las anteriormente descritas, para comprobar si en este caso se observaban diferencias de sensibilidad.

### 1.3. Resistencia de *msn2 msn4* frente a condiciones severas de estrés

La termotolerancia se estudió sometiendo a las células a una temperatura de 45°C en baño termostatzado, y midiendo la viabilidad a diferentes tiempos. La figura 4 muestra que el comportamiento de las dos cepas es diferente. Podemos observar que la viabilidad de la cepa Wmsn2msn4 es inferior a la de la cepa silvestre desde los primeros minutos, alcanzándose a los 100 minutos una diferencia de un orden de magnitud en la tasa de supervivencia (un 0,03% de células mutantes sobreviven, frente a un 0,3% de células silvestres).

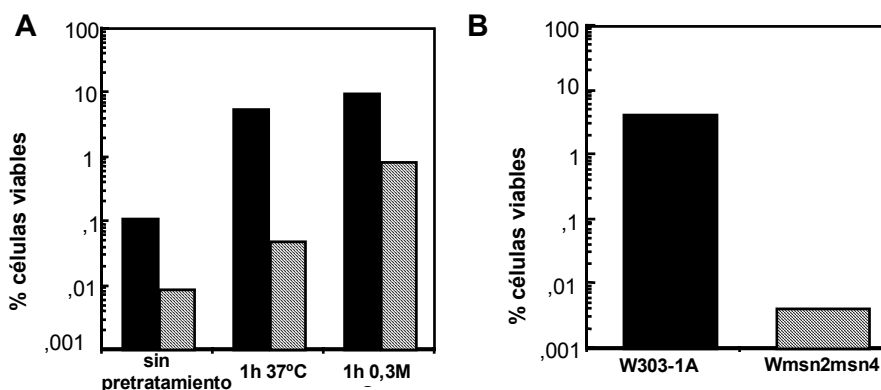


**Figura 4. Termotolerancia.** Células de levadura de un cultivo crecido durante la noche de W303-1A (símbolos vacíos) o cepa Wmsn2msn4 (símbolos llenos) se inocularon en medio SD y se mantuvieron en crecimiento exponencial durante 24 horas a 30°C. A una DO<sub>600</sub> de 0.3, las células se dividieron en alícuotas y se transfirieron a un baño de agua a 45°C, midiéndose la viabilidad en los tiempos indicados.

La diferencia de viabilidad entre cepa silvestre y mutante fue todavía mayor cuando el choque térmico se produjo en ausencia de glucosa en condiciones similares de temperatura y tiempo de incubación.

Cuando se pretrataron las células a 37°C durante una hora, previamente al experimento, los niveles de viabilidad de ambas cepas aumentaron, pero se mantuvieron las diferencias entre silvestre y doble mutante (resultados no mostrados).

Otra condición de estrés utilizada fue el choque osmótico. En la figura 5A se muestra la supervivencia de células en fase exponencial de la cepa *msn2 msn4* tras la exposición durante 7 horas a NaCl 3 M). La severidad del estrés provoca la muerte de un elevado porcentaje de células, sólo un 0,01% de las células con la doble mutación *msn2 msn4* sobreviven, frente al 1% de las células silvestres.



**Figura 5. Supervivencia tras exposición a estrés osmótico y estrés oxidativo.** A) Estrés osmótico. Sin pretratamiento: Cultivos crecidos durante la noche de W303-1A (barras llenas) y Wmsn2msn4 (barras rayadas) se diluyeron con YPD a una  $DO_{600}$  de 0.1 y se crecieron hasta una  $DO_{600}$  de 1.0. Los cultivos fueron entonces diluidos hasta una  $DO_{600}$  de 0.2 en YPD NaCl 3 M, e incubados a 30°C durante 7 horas. Pretratamiento térmico: Previamente al choque osmótico, se incubaron las células durante 1 hora a 37°C. Pretratamiento osmótico: Se incubaron las células durante 1 hora en YPD NaCl 0.3 M, antes del choque osmótico severo. B) Estrés oxidativo. Cultivos crecidos durante la noche de W303-1A (barras llenas) y Wmsn2msn4 (barras rayadas) se inocularon en YPD y se crecieron hasta una  $DO_{600}$  de 0.3. Se añadió peróxido de hidrógeno hasta una concentración final de 5 mM, y se incubaron durante 1 hora con agitación vigorosa a 30°C.

El tratamiento de las células a 37°C durante 1 hora, ó en YPD suplementado con NaCl 0.3 M durante 1 hora, previamente al estrés osmótico, incrementó la resistencia de ambas cepas, pero se mantuvieron (choque osmótico previo), o incluso aumentaron las diferencias entre W303-1A y Wmsn2msn4 (pretratamiento con choque térmico). En este caso, el pretratamiento con choque osmótico suave aumenta la tasa de supervivencia

de W303-1A y Wmsn2msn4 hasta el 10% y 1%, respectivamente (2 órdenes de magnitud). El choque térmico suave a 37°C produce una protección cruzada que aumenta la resistencia de W303-1A hasta el 7%, y el 0,5% en la cepa Wmsn2msn4.

En cuanto al comportamiento frente a altas concentraciones de oxidantes, en la figura 5B se muestra la resistencia de las cepas W303-1A y Wmsn2msn4 tras ser sometidas durante 1 hora a la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM en el medio, concentración de peróxido de hidrógeno que produce un estrés oxidativo importante. En estas condiciones, un 5% de las células de W303-1A iniciales sobreviven, frente a sólo un 0,004% de las células con la doble mutación *msn2 msn4*.

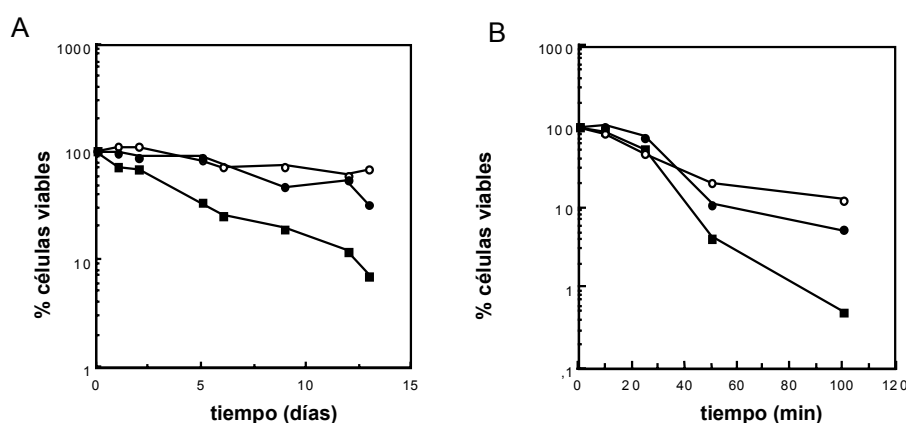
De los resultados anteriores podemos concluir que la ausencia de los genes *MSN2* y *MSN4* produce una sensibilidad pleiotrópica a diferentes formas de estrés severo.

#### **1.4. Efecto de la sobre-expresión de los genes *MSN2* y *MSN4* sobre la resistencia al ayuno de glucosa y choque térmico**

Se investigó si la sobre-expresión de estos genes, por separado, hacía a las células más resistentes al estrés. Para ello, las regiones codificantes de *MSN2* y de *MSN4* se fusionaron con el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, (Schena *et al.*, 1991) y los plásmidos resultantes (pG3MSN2 y pG3MSN4) se utilizaron para transformar la cepa silvestre W303-1A. Sorprendentemente, el tiempo requerido para la aparición de transformantes fue significativamente mayor cuando la cepa W303-1A se transformó con los plásmidos pG3MSN2 y pG3MSN4 que cuando se transformó con el control, pG3. Este efecto era más acusado con el plásmido pG3MSN2. Es decir, la presencia de estos plásmidos parece tener un efecto negativo sobre el crecimiento celular. Sin embargo, cuando se comparó la supervivencia de las cepas que sobre-expresaban *Msn2p* ó *Msn4p* con la de la cepa control en condiciones de estrés, se observó que la sobre-expresión de ambos genes incrementa la resistencia frente a las condiciones de estrés estudiadas. Los resultados obtenidos al someter a estas cepas a estrés por ausencia de glucosa y estrés térmico se muestran en la figura 6.

Se siguió durante 13 días la viabilidad de las cepas W303-1A (pG3), W303-1A (pG3MSN2) y W303-1A (pG3MSN4) en ausencia de glucosa (Figura 6A). Por otro lado se observó que la cepa W303-1A transformada con el plásmido control pG3 presenta una viabilidad superior a la observada habitualmente en la cepa W303-1A. Atribuimos este hecho no a la presencia del plásmido en sí, sino al hecho de que para mantener el plásmido esta cepa se crece siempre en medio selectivo, sin el requerimiento correspondiente al marcador del plásmido, en este caso triptófano (medio SD-Trp). Sabemos que el medio sintético, también llamado medio mínimo, no es el medio ideal

para el crecimiento de las células, puesto que en estas condiciones se produce la inducción de algunos genes inducibles por estrés, como comentaremos en el apartado 2 de los resultados. Por ello, es posible que el mantenimiento constante en medio sintético, al inducir algunos genes de resistencia a estrés, sea capaz de inducir una protección cruzada que aumenta la resistencia a situaciones posteriores, o adicionales, de estrés.



**Figura 6. Resistencia al ayuno de fuente de carbono (A) y termotolerancia (B) en cepas que sobre-expresan los genes *MSN2* o *MSN4*.** Cultivos crecidos durante la noche de W303-1A transformada con pG3 (cuadrados llenos), pG3MSN2 (círculos abiertos) o pG3MSN4 (círculos llenos) fueron inoculados en medio SD-Trp y mantenidos en crecimiento exponencial durante 24 horas. Entonces fueron transferidos a medio S-Trp a una DO<sub>600</sub> de 0.3 (A) o transferidos a un baño de agua a 45°C (B). La viabilidad se midió en los tiempos indicados.

En cualquier caso, a pesar del ligero aumento de la resistencia de la cepa control, es evidente que la presencia de los genes *MSN2* o *MSN4* en sobre-expresión (debida, por una parte, a un mayor número de copias, y por otra, a la elevada expresión que produce el promotor del gen *GPD1*), produce un aumento de la resistencia al estrés por ausencia de carbono respecto al control. Las cepas que sobre-expresan *MSN2* y *MSN4* apenas sufren disminución de la viabilidad durante los 13 días, presentando al final una tasa de supervivencia del 75% (W303-1A (pG3MSN2)) y del 35% (W303-1A (pG3MSN4)), frente al 7% de la cepa control.

La sobre-expresión de *MSN2* parece tener un mayor efecto protector que la de *MSN4*, hecho que se observó repetidamente en los distintos experimentos realizados. Este hecho concuerda con resultados anteriores, que parecen conferir a Msn2p un papel preponderante respecto a Msn4p, ya que tanto la ausencia como la sobre-expresión del primero tienen efectos más claros.

En la figura 6B se muestra el efecto de la sobre-expresión de *MSN2* y *MSN4* sobre la resistencia al choque térmico. Al cabo de 100 minutos de permanencia a 45°C, sólo un 0,45% de las células control sobreviven, frente a un 7% de las células que sobre-expresan *MSN4*, y un 15% de las que sobre-expresan *MSN2*. De nuevo se observa un aumento de la resistencia al estrés térmico por la sobre-expresión de los genes *MSN2* o *MSN4*, siendo el efecto ligeramente mayor al sobre-expresar *MSN2*.

Llegados a este punto, parecía claro que *MSN2* y *MSN4*, que en un principio parecían estar implicados en la utilización de azúcares, desempeñaban un papel importante en la resistencia al estrés de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Por un lado, la ausencia simultánea de estos genes, de función aparentemente redundante, produce una sensibilidad pleiotrópica a toda una serie de condiciones de estrés severo. Por otro lado, la sobre-expresión de estos genes aumenta la resistencia de la levadura a estas condiciones de estrés. Todo ello apuntaba a que los factores *MSN2* y *MSN4* eran protagonistas importantes de la respuesta a estrés de levadura. Faltaba por elucidar la función molecular concreta de estos factores transcripcionales, aspecto que se analiza en el siguiente apartado.

## **2. Función de las proteínas codificadas por los genes *MSN2* y *MSN4***

### **2.1. *MSN2* y *MSN4* son requeridos para la transcripción de distintos genes inducidos por estrés.**

Al pensar en una posible función de *MSN2* y *MSN4* en la respuesta a estrés era lógico esperar, dada su estructura, que estuvieran actuando como factores transcripcionales, regulando la expresión de otros genes.

Msn2p y Msn4p poseen, como se ha descrito, dos dedos de cinc del tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>, motivo típico de unión a DNA que se encuentra en numerosos factores transcripcionales cuya capacidad de regular la expresión génica se ha demostrado.

Así, las proteínas Egr, de mamíferos, que poseen dedos de cinc homólogos a los de Msn2p y Msn4p, parecen estar implicadas en la transducción de señal en respuesta a estímulos mitogénicos y específicos de diferenciación. Los genes de respuesta a crecimiento temprano (EGR) se inducen rápidamente en respuesta a factores de crecimiento, suero y otras señales, y sus productos actúan como reguladores transcripcionales de unión a DNA, implicados en modular la proliferación celular y la diferenciación (Christy *et al.*, 1989; Joseph *et al.*, 1988; Lemaire *et al.*, 1988; Milbrandt *et al.*, 1987; Sukhatme *et al.*, 1988).

El gen supresor del tumor de Wilms codifica una proteína con un dominio de unión al DNA, también homólogo, y actúa como represor transcripcional (Madden *et al.*, 1991).

En cuanto a las proteínas con homología a Msn2p y Msn4p en levadura, Mig1p está implicado en la respuesta celular a la glucosa, requiriéndose para la represión por glucosa de, entre otros genes, *SUC2*, *GALI* y *GAL4* (Flick y Johnston, 1992; Griggs y Johnston, 1991; Nehlin *et al.*, 1991; Nehlin y Ronne, 1990). Se ha propuesto que su papel es unir al DNA al complejo represor Ssn6p-Tup1p.

También la proteína Rgm1p parece ser un represor transcripcional, pero se desconocen sus dianas (Estruch, 1991).

Parecía lógico esperar que Msn2p y Msn4p, al igual que sus homólogos, pudieran desempeñar un papel activo en la regulación transcripcional. De hecho, Estruch y Carlson (1993) demostraron, mediante fusiones con LexA, que Msn2p y Msn4p podían actuar como activadores de la transcripción. Lo más razonable era suponer que el papel de Msn2p y Msn4p en la respuesta al estrés sería el de activar transcripcionalmente uno o más genes implicados en la protección frente a diferentes estreses.

Por ello se estudió la inducción transcripcional de diversos genes implicados en la respuesta a estrés, en las cepas silvestre y doble mutante *msn2 msn4*. Como condiciones de inducción se eligieron, inicialmente, el choque térmico (1 hora a 37°C), y la ausencia de glucosa (1 hora en medio S), ya que a nivel fenotípico el mutante *Wmsn2msn4* mostraba una resistencia defectuosa a estos estreses.

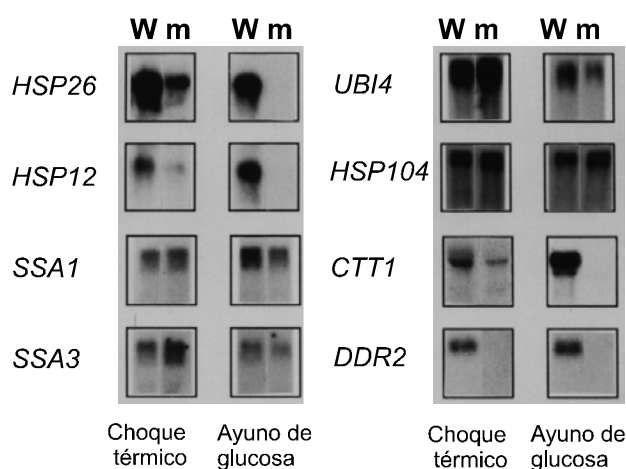
El primer gen en el que encontramos un defecto de expresión fue *HSP26*, que codifica una de las HSPs de pequeño tamaño en levadura, de función desconocida. El defecto era muy dramático en condiciones de ayuno de glucosa, pues en la cepa mutante no se observaba ninguna expresión, que sin embargo era muy elevada en la cepa silvestre. A 37°C se observaba cierta inducción en el mutante, pero a niveles mucho menores que los observados en la cepa silvestre.

Un defecto similar se observó en la inducción de *HSP12*, que codifica otra de las HSPs de pequeño tamaño. En cambio, no se observaron defectos en la expresión de HSPs más grandes, como *SSA1* ó *SSA3*, de la familia de las HSP70. Esto nos indujo a pensar que la acción de *MSN2* y *MSN4* podría restringirse a la regulación de las proteínas de choque térmico de pequeño tamaño, cuya función concreta en la respuesta a estrés no se conoce.

Sin embargo, al ampliar nuestro análisis se encontraron otros genes afectados que no pertenecían a esta familia, y fue quedando claro que Msn2p y Msn4p tenían un papel mucho más general en la regulación de genes de estrés. Entre los genes regulados por *MSN2/4* estaban *CTT1*, que codifica la catalasa citosólica, *DDR2*, inducido por daño al DNA, pero de función desconocida, ó *GPH1*, que codifica la glucógeno fosforilasa.

En la figura 7 se muestran los resultados del primer rastreo de genes regulados por *MSN2* y *MSN4*. Podemos ver que el estrés por ayuno de glucosa produce una ausencia prácticamente total de la expresión de genes como *HSP26*, *HSP12*, *CTT1* ó *DDR2*. Estos mismos genes presentan una expresión afectada frente al choque térmico, aunque el efecto no es tan drástico como en ausencia de glucosa.

En cambio, vemos otros genes, como *SSA1*, *SSA3*, *UBI4* ó *HSP104*, cuya expresión no se ve afectada, en ninguna de estas condiciones de estrés, por la ausencia de *MSN2* y *MSN4*.



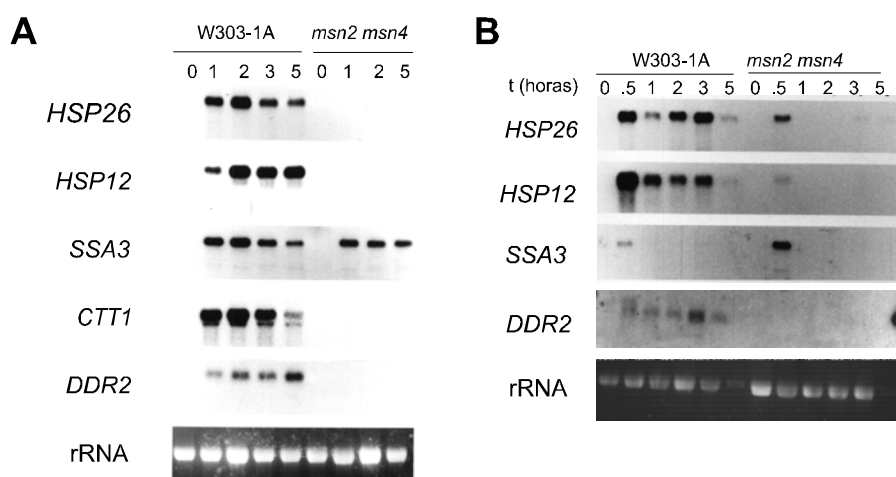
**Figura 7. Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre la expresión de genes inducibles por estrés.** Choque térmico: Células en fase exponencial de crecimiento de las cepas W303-1A (W) y Wmsn2msn4 (m) fueron transferidas a un baño de agua a 37°C e incubadas durante 1 hora. Ayuno de glucosa: Células en fase exponencial de crecimiento de las cepas W303-1A (W) y Wmsn2msn4 (m) fueron transferidas a medio S e incubadas durante 1 hora a 30°C. Tras ambos tratamientos, se recogieron las células y se extrajo RNA total, según se describe en materiales y métodos. 4 µg de cada muestra fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1.6% y analizados por transferencia *Northern* e hibridación con las sondas indicadas.

Con el fin de determinar si el defecto de transcripción de los genes afectados era completo o, por el contrario, se trataba tan sólo de un retraso en el tiempo de inducción, se analizaron los niveles de transcrito a diferentes tiempos de inducción (figura 8).

Se siguió durante 5 horas la expresión de *HSP12*, *HSP26*, *CTT1*, *DDR2* y *SSA3* en ausencia de glucosa (figura 8A). Mientras que en W303-1A a las 5 horas ya se empezaba a acusar una disminución de los niveles de mensajeros de la mayoría estos genes (con la excepción de *DDR2*, cuya expresión parece ir en aumento, y *HSP12*, de expresión mantenida), durante este período de tiempo no se pudo observar ninguna expresión de *HSP12*, *CTT1*, *DDR2* ó *HSP26* en el doble mutante. En cambio la inducción de *SSA3* se produce a niveles similares a los de la cepa silvestre.



También se siguió durante 5 horas la inducción de diversos genes por choque térmico a 37°C (figura 8B). En los genes *HSP26* y *HSP12*, se observa un pequeño pico de inducción en el doble mutante, a la media hora de choque térmico, pero los niveles de mensajero están muy reducidos con respecto a la cepa silvestre. En la cepa W303-1A, aunque también se observa un pico de inducción a las 0.5 horas, la expresión se mantiene durante varias horas. En el gen *SSA3* de nuevo no se aprecian diferencias entre las cepas W303-1A y *Wmsn2msn4*, coincidiendo el pico de expresión a los 30 minutos. Por último, el gen *DDR2* sigue una cinética de inducción diferente a los anteriores genes, con un máximo de expresión a las 3 horas. En este caso, no se aprecia inducción en la cepa *Wmsn2msn4*.



**Figura 8. Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre la activación dependiente del tiempo de genes inducibles por ayuno de fuente de carbono y por choque térmico.** Se extrajo RNA total a partir de las cepas W303-1A o *Wmsn2msn4* tras la incubación en los tiempos indicados en medio S (A) o a 37°C (B). 4 µg de cada muestra fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1.6% y analizados por transferencia *Northern* e hibridación con las sondas indicadas. La aplicación y transferencia de cantidades iguales de RNA se verificaron por tinción con bromuro de etidio.

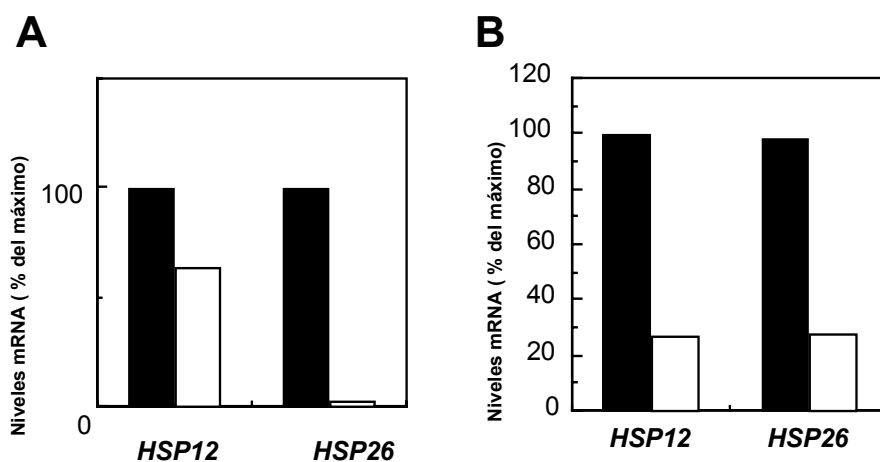
Así pues, de los genes inducibles por estrés cuya expresión pudimos estudiar, un número importante de los mismos resultó tener una inducción defectuosa por ambos estreses en el doble mutante. Un hecho que nos llamó la atención es que todos los genes afectados por la ausencia de *MSN2* y *MSN4* eran genes que tenían secuencias STRE en su promotor, habiéndose demostrado para al menos tres de ellos (*HSP12*, *CTT1* y *DDR2*) que estas secuencias están implicadas en la inducción por estrés de los mismos (Varela *et al.*, 1995; Marchler *et al.*, 1993; Kobayashi y McEntee, 1993). El STRE es

un elemento regulador de la transcripción que media la inducción por múltiples estreses. Esto nos llevó a estudiar la respuesta de *Wmsn2msn4* frente a otros estreses que inducen la respuesta de estos genes a través del elemento STRE, como son el estrés osmótico o el estrés oxidativo.

Para ello estudiamos los niveles de mensajero de *HSP12* y *HSP26* en células de *W303-1A* y *Wmsn2msn4* sometidas a estrés osmótico (figura 9A) y estrés oxidativo (figura 9B). En este caso los niveles de mensajero detectados en la hibridación *Northern* se analizaron densitométricamente, y se representaron los porcentajes respecto al nivel máximo.

La ausencia de *MSN2* y *MSN4* produjo una reducción del 35% en los niveles de mensajero de *HSP12* inducidos por estrés osmótico, respecto a la inducción producida por el mismo tratamiento en la cepa silvestre (figura 9A). En el caso de *HSP26*, el efecto fue mucho más drástico, disminuyendo la expresión en un 95%.

En condiciones de estrés oxidativo, los niveles de *HSP12* y *HSP26* se redujeron en un 72% y 70%, respectivamente, en el doble mutante *msn2 msn4*.



**Figura 9. Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre la activación de genes inducibles por estrés osmótico y estrés oxidativo.** Se extrajo RNA total a partir de las cepas *W303-1A* o *msn2 msn4* tras la incubación durante 1 hora en medio YPD NaCl 0.7 M (A) o YPD H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.008% (B). 4 µg de cada muestra fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1.6% y analizados por transferencia *Northern* e hibridación con las sondas de los genes *HSP12* y *HSP26*. En la figura se muestra el resultado del análisis densitométrico de las bandas obtenidas en la autorradiografía, expresado como porcentaje del máximo nivel de expresión.

En otras condiciones de estrés, como por ejemplo la presencia de sorbato 10 mM, o etanol 7%, los niveles de mensajero de *HSP12*, *CTT1* ó *DDR2* resultaron indetectables en el mutante *msn2 msn4* (resultados no mostrados).

Así pues, la inducción transcripcional de genes que contienen en su promotor elementos STRE, por condiciones de estrés que activan la transcripción a través de dicho elemento, está fuertemente afectada en la cepa mutante *Wmsn2msn4*.

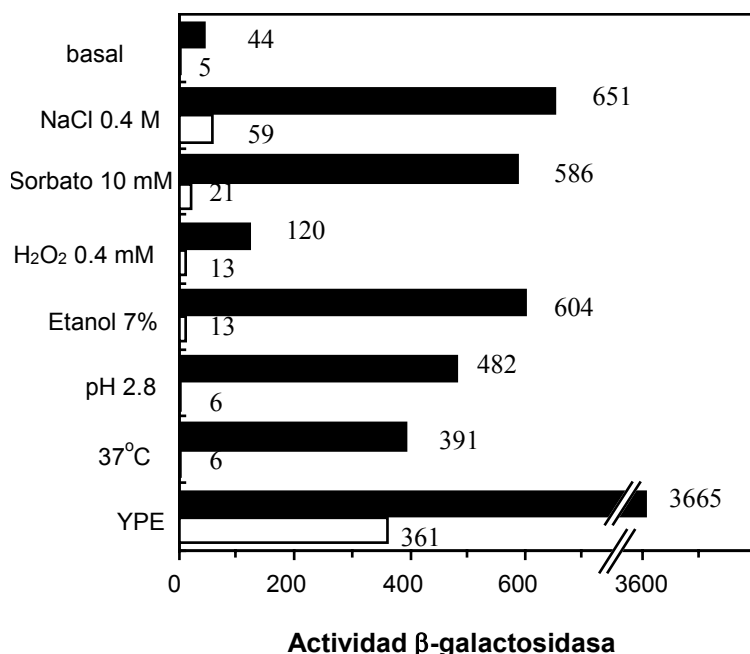
Por todo ello, resultaba tentador aventurar que *MSN2* y *MSN4* pudieran ejercer su acción a través de este elemento, del cual hasta el momento se habían buscado infructuosamente el/los factores reguladores. En este momento establecimos una colaboración con uno de los grupos que estaban trabajando en la inducción vía STRE, el grupo del Dr. Ruis, en Viena, que fue uno de los primeros grupos en describir este elemento (Marchler *et al.*, 1993), y el que le dio su actual nombre. Una construcción realizada por este grupo, el plásmido pGM18/17, nos permitió estudiar directamente la expresión génica vía STRE en el doble mutante *msn2 msn4*.

## **2.2. *MSN2* y *MSN4* están implicados en la expresión inducida por estrés vía STRE.**

El plásmido pGM18/17, descrito en Marchler *et al.*, 1993, contiene siete copias de uno de los elementos STRE del promotor de *CTT1*, en diversas orientaciones, colocados en tándem en posición 5' respecto a una fusión *LEU2-lacZ*. Este plásmido, integrativo, permite medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa dependiente de STRE inducida por diversas condiciones de estrés. Se deleccionaron los genes *MSN2* y *MSN4* en la cepa GG18 (Marchler *et al.*, 1993), que lleva una única copia integrada cromosómicamente del plásmido pGM18/17, obteniéndose la cepa GG18msn2msn4.

Células en fase de crecimiento exponencial de ambas cepas fueron sometidas a diferentes condiciones de estrés, y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa (figura 10).

Como se observa en la figura 10, en el mutante el nivel de transcripción basal se vio reducido en un factor de 10 veces. Por otro lado, la inducción de la transcripción por choque térmico, bajo pH, ácido sórbico y elevadas concentraciones de etanol estaba completamente abolida en el doble mutante. En el caso de los estreses osmótico y oxidativo, así como cuando las células fueron crecidas en un medio de desrepresión (YPE) se detectaron bajos niveles de transcripción en el doble mutante. Sin embargo, el factor de inducción fue comparable con el de la cepa silvestre.



**Figura 10. Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre la expresión de un gen reporter *LEU2-lacZ* bajo el control del elemento STRE.** Cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas GG18 (barras llenas) y GG18msn2msn4 (barras vacías), crecidos en medio YPD, fueron sometidos a diferentes estreses durante 1 hora, y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa en los extractos crudos. Los datos presentados son la media de al menos tres experimentos independientes.

Así pues, la activación transcripcional de un gen reporter *LEU2-lacZ* regulado por STRE se encuentra dramáticamente afectada en el doble mutante. En algunos tipos de estrés la inducción vía STRE es totalmente dependiente de la presencia de *MSN2/4*. En otros casos (estrés osmótico y oxidativo, crecimiento en YPE) hay inducción de STRE independiente de *MSN2/4*, pero los niveles tanto basal como inducido están reducidos unas 10 veces respecto a la cepa silvestre, indicando que *MSN2/4* son necesarios para la correcta activación en respuesta a estos estreses.

Para corroborar que los efectos de *MSN2* y *MSN4* sobre la respuesta a estrés se debían a su papel en la regulación de la expresión génica a través del elemento STRE, se estudió el efecto de la sobre-expresión de los genes *MSN2* y *MSN4* en el vector pG3, anteriormente descrito, sobre la expresión  $\beta$ -galactosidasa a partir del reporter STRE-*LEU2-lacZ*.

En consistencia con un posible papel de estos factores en la regulación vía STRE se encontró que la sobre-expresión de *MSN2* y *MSN4* produce una activación de este reporter en condiciones de ausencia de estrés (Tabla I). Sin embargo, el nivel relativamente bajo de actividad, comparado con los niveles detectados bajo condiciones de estrés, sugiere que la

regulación de la función de Msn2p y Msn4p incluye mecanismos post-traduccionales. Estos resultados son también consistentes con la expresión constitutiva de *MSN2* (P. M. Alepuz y F. Estruch, resultados no publicados).

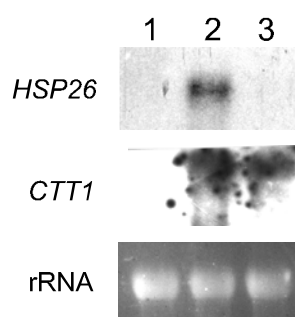
Este resultado indica que la sobre-expresión de estos genes induce la expresión vía STRE del reporter STRE-*LEU2-lacZ* en condiciones de no estrés.

### Tabla I

Efecto de la sobre-expresión de Msn2p y Msn4p sobre la inducción transcripcional del gen reporter STRE-*LEU2-lacZ*.

Plásmido	Actividad $\beta$ -galactosidasa (nmol/min/mg proteína)
pG3	22.9
pG3MSN2	85
pG3MSN4	44

La inducción de genes regulados vía STRE en ausencia de estrés por la sobre-expresión de *MSN2* y *MSN4* también está apoyada por el experimento que se muestra en la figura 11. Se encontró que las células transformadas con pG3MSN2 expresan los genes *CTT1* y *HSP26* incluso bajo condiciones de ausencia de estrés. En las células que sobre-expresan *MSN4* se observó una débil inducción de *CTT1*, pero no de *HSP26*.



**Figura 11. Expresión constitutiva de genes inducidos por estrés en células que sobre-expresan *MSN2* ó *MSN4*.** Se analizaron células silvestres transformadas con pG3 (1), pG3MSN2 (2) o pG3MSN4 (3). El RNA total se extrajo de células creciendo exponencialmente en medio SD-Trp y se analizaron por transferencia *Northern* e hibridación con sondas de los genes *HSP26* y *CTT1*. La aplicación y transferencia de cantidades iguales de RNA se verificó por tinción con bromuro de etidio.

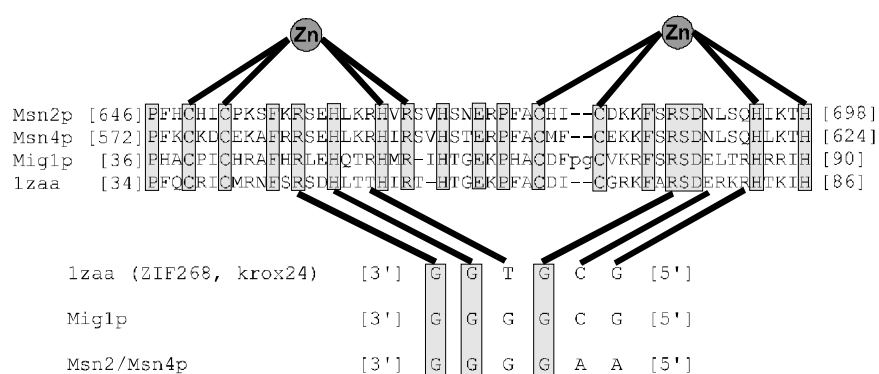
Estos resultados aportan, además, una posible explicación del defecto en el crecimiento observado en las cepas W303-1A (pG3MSN2) y W303-1A (pG3MSN4), que se ha mencionado en el apartado 1.4. Es posible

que la activación indebida de mecanismos de defensa en condiciones de no estrés, tenga efectos negativos sobre el crecimiento celular.

Los anteriores resultados indican que Msn2p y Msn4p se requieren para la expresión mediada por STRE y apoyan fuertemente la hipótesis de que *MSN2* y *MSN4* sean los factores de unión a STRE (STRFs), pero en cualquier caso, quedaba por demostrar que la acción de Msn2p/4p sobre la STRE fuera directa. En 1994, Gounalaki y Thireos describieron un caso similar al aquí detallado: la actividad de un promotor dirigido por STRE, basado en un oligómero que contenía una de las STRE del gen *DDR2* (Kobayashi y McEntee, 1993) estaba seriamente afectada en un mutante *yap1Δ*, que carece del factor transcripcional Yap1p. Sin embargo, no se pudo demostrar que hubiera unión *in vitro* de Yap1p a dicho promotor, por lo que se concluyó que su acción sobre la transcripción vía STRE era de naturaleza indirecta. Esta posibilidad cabía también para Msn2/4p.

### 2.3. Predicción teórica de la secuencia de unión de Msn2/4p

La cristalización de complejos DNA-proteína se ha conseguido para diferentes proteínas con dedos de cinc, y esto ha permitido por comparación de secuencias realizar predicciones teóricas de la secuencia de unión de Msn2p y Msn4p, entre otras proteínas. En la figura 12 se muestra la comparación de secuencias de los dedos de cinc de Msn2p, Msn4p, Mig1p y Egr1(1zaa). Las predicciones de la secuencia de unión mostradas se basan en los datos obtenidos a partir de los dedos de cinc II y III de EGR1, de los cuales se dispone de una estructura cristalizada de la proteína unida al DNA (Pavletich y Pabo, 1991).



**Figura 12. Predicción de la secuencia de DNA reconocida por los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p.** Alineamientos múltiples de secuencia muestran los dos dedos de cinc de Msn2p, Msn4p y Mig1p comparados con la secuencia de dos dedos de cinc (II) y (III) de la proteína de respuesta a crecimiento temprano Egr1 (krox24, 1zaa) de ratón. Se dispone de la estructura cristalina de Egr1, accesible bajo el código de entrada 1zaa del PDB. Los números

datos para 1zaa se refieren a la numeración en la entrada de PDB. Las posiciones completamente conservadas en el alineamiento se señalan en gris. Se indica la coordinación de los dos iones de cinc. Se ha encontrado que Arg46, His49 y Arg74 establecen puentes de hidrógeno específicos con pares G/C (sombreado en gris). Su conservación global sugiere contactos similares para los dedos de cinc de Mig1p, Msn2p y Msn4p. Thr52, que es responsable del reconocimiento de un par de bases T/A en Egr1, es reemplazado por arginina en las otras tres proteínas. Se predice, por analogía con las otras argininas, especificidad por un par G/C en la posición respectiva. El dedo III de Egr1 y el dedo II de Mig1p son idénticos con respecto a sus residuos de contacto con el DNA. Aparentemente, su especificidad de unión a DNA es la misma. En Msn2p y Msn4p, Glu77 es reemplazada por una asparagina, mientras que Arg80 es reemplazada por una glutamina. En un modelo tridimensional del complejo Msn2p-STRE, generado por ordenador, se puede demostrar que la asparagina y la glutamina son capaces de establecer interacciones directas por puentes de hidrógeno con pares A/T en las posiciones respectivas del STRE (datos no mostrados). La especificidad de asparagina por pares A/T en la posición media de este tipo de dedos de cinc es bien conocida (Choo *et al.*, 1994). La selección de pares AT en la posición 5' del STRE a través de la respectiva glutamina podría no ser tan fuerte, y permitir cierta variación.

El dedo II de EGR1 se une a la secuencia de nucleótidos [3']GGT[5']. En la estructura cristalina, los residuos Arg46 y His49 establecen contactos específicos con pares G/C. Cuando se alinea esta secuencia con la del dedo de cinc I de Msn2p, Msn4p y Mig1p, se observa que estos residuos están conservados. Thr52, responsable de la especificidad del dedo II de EGR1 por el par T/A en 5', está reemplazada por un residuo de arginina en Msn2p, Msn4p y Mig1p. De acuerdo con los códigos de reconocimiento establecidos para los dedos de cinc Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (Choo *et al.*, 1994), se puede predecir que los dedos de cinc I de Msn2p, Msn4p y Mig1p se unirán específicamente a la secuencia de nucleótidos [3']GGG[5'].

El dedo III de Egr1p se une a la secuencia de nucleótidos [3']GCG[5']. Los residuos Arg74, Glu77 y Arg80 de la estructura del cristal, que determinan la especificidad de secuencia, están conservados en el dedo II de Mig1p, por lo que se puede predecir que éste se unirá a la misma secuencia. Los residuos respectivos en Msn2p y Msn4p son arginina, asparagina y glutamina. Según los códigos de reconocimiento, se puede predecir una unión específica del dedo de cinc II de Msn2p/Msn4p a la secuencia de nucleótidos [3']GAN[5']. Los resultados de la modelización por homología del complejo Msn2p/STRE (resultados no mostrados) indican una especificidad por un par A/T en la posición 5' de la secuencia de nucleótidos reconocida por Msn2p y Msn4p. Sin embargo, la selección por la respectiva glutamina podría no ser tan fuerte, y permitir una cierta variación. A partir de estos datos, se puede predecir que los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p serían capaces de unirse a la secuencia STRE con alta especificidad, y que la unión ocurriría de una manera muy similar a la observada en la estructura cristalizada de Egr1p.

## 2.4. Las proteínas Msn2p y Msn4p se unen *in vitro* a la secuencia STRE.

Los resultados presentados anteriormente indicaban claramente que *MSN2* y *MSN4* se requieren para la inducción de la transcripción por diferentes estreses mediada por STRE y que la regulación se produciría por unión directa de los factores a este elemento, pero quedaba por demostrar experimentalmente que esta unión se producía realmente. Para demostrar experimentalmente este último punto, se intentaron diferentes aproximaciones *in vitro*, utilizando el método de retardo en gel. Se estudió la unión entre oligonucleótidos que contenían secuencias STRE y proteínas Msn2p y Msn4p obtenidas de diferentes formas.

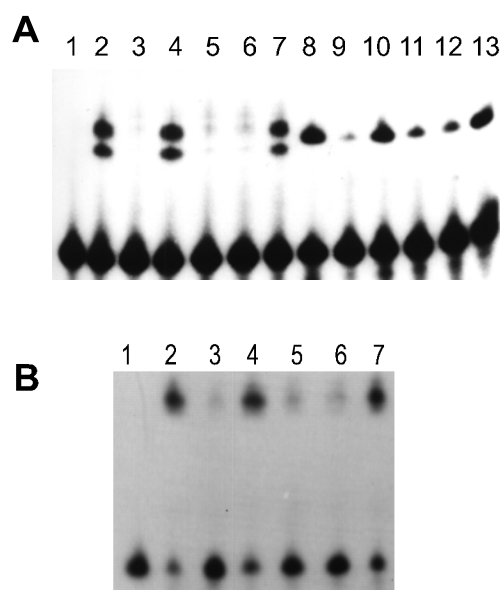
### 2.4.1. Unión de las proteínas purificadas

Una de las aproximaciones fue sintetizar la proteína Msn2p completa *in vitro*, a partir del plásmido pMM1. Los intentos por obtener Msn4p de la misma manera fueron infructuosos, por lo que en este caso se expresó el dominio de unión a DNA de Msn4p en forma de una fusión a GST, en *Escherichia coli*. También se hizo el mismo tipo de construcción para Msn2p.

Las proteínas fueron usadas para ensayos de retardo en gel con un oligonucleótido que incluye la secuencia de una STRE funcional del promotor de *HSP12* (pares de bases -221 a -241; Varela *et al.*, 1995). La figura 13 muestra que tanto Msn2p como Msn4p-GSTp y Msn2-GSTp son capaces de unirse a este oligonucleótido (carreras 2A, 8A y 2B). La naturaleza específica de esta interacción se determinó mostrando la reducción del complejo de unión en presencia del mismo oligonucleótido sin marcar radiactivamente (carreras 3A, 9A, 3B) en un exceso molar de 200 veces. Para probar que las proteínas Msn2p y Msn4p reconocen la secuencia AGGGG dentro del oligonucleótido, y no el resto de la secuencia, se introdujo una mutación puntual en el elemento STRE, generando la secuencia AGTGG. Este oligonucleótido no puede competir con la secuencia STRE del oligonucleótido original (carreras 4A, 10A, 4B), lo que demuestra que Msn2p y Msn4p no son capaces de unirse a la secuencia mutada. Otros experimentos de competición apoyaron el reconocimiento específico de la secuencia STRE por Msn2p y Msn4p-GSTp. Oligonucleótidos con elementos similares procedentes de los promotores de *CTTI* (carreras 5A, 11A, 5B) y *DDR2* (6A, 12A, 6B) compitieron efectivamente por la unión, pero un oligonucleótido con el sitio de unión de la proteína Mig1p (carreras 7A, 13A, 7B) fue incapaz de competir con eficiencia. Por lo tanto, Msn2p y Msn4p son capaces de reconocer la secuencia STRE presente en oligonucleótidos procedentes de diferentes promotores, pero no reconocen,



en cambio, la secuencia de unión de la proteína Mig1p, a pesar de que los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p guardan una homología elevada con los de Mig1p.



**Figura 13. Las regiones de los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p se unen a oligonucleótidos que contienen secuencias STRE.** El retardo en gel se llevó a cabo con un oligonucleótido derivado del promotor de *HSP12* (nucleótidos -241 a -221), marcado terminalmente con  $^{32}\text{P}$ . Las proteínas utilizadas fueron Msn2p sintetizada *in vitro* (carreras 2-7, figura 13A) o fusiones con GST purificadas por cromatografía de afinidad, que contienen el dominio de unión a DNA de Msn4p (carreras 8-13 figura 13A) o Msn2p (carreras 2-7, figura 13B) fusionado con la glutatión S-transferasa. Como control se añadió en la carrera 1A lisado de reticulocito. Los oligonucleótidos no marcados se añadieron como competidores en un exceso de 200 veces: HSP12 (carreras 3 y 9 de A, 3 de B), HSP12 mutado (*hsp12*) (carreras 4 y 10 de A, y 4 de B), CTT1-18 (carreras 5 y 11 de A, y 5 de B), DDR2 (carreras 6 y 12 de A y 6 de B) y MIG1 (carreras 7 y 13 de A y 7 de B).

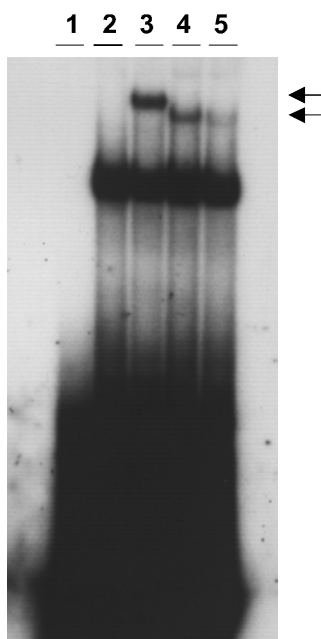
#### 2.4.2. Unión de Msn2p a partir de extractos totales de proteína de levadura

La siguiente aproximación para estudiar la interacción Msn2p-STRE consistió en utilizar extractos totales de proteína de levadura como fuente de Msn2p. Los primeros intentos no permitieron detectar ninguna interacción específica (resultados no mostrados), hecho que atribuimos a la posible baja concentración de esta proteína en los extractos totales. Para evitar este

## Capítulo I

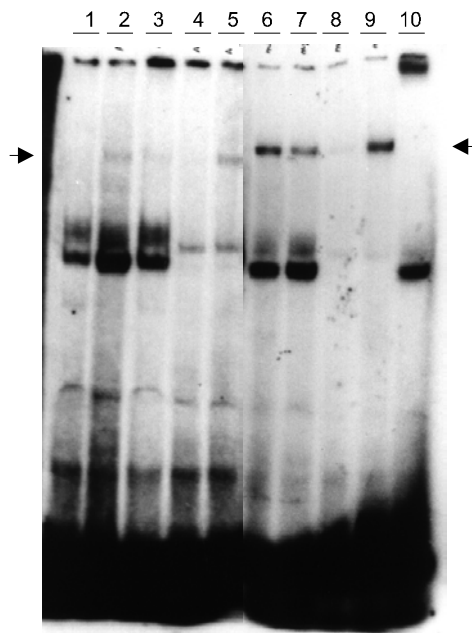
problema se utilizaron extractos totales obtenidos a partir de cepas que producían cantidades elevadas de Msn2p. Para ello se transformó la cepa mutante *Wmsn2msn4* con los plásmidos pAdh1-Msn2, pAdh1-Msn2-myc9, y pAdh1-*msn2::ΔEcoRI-myc9*, que colocan el gen *MSN2* bajo el control del promotor del gen *ADHI*, de alto nivel de expresión. En el segundo caso, se añadieron además 9 copias de un fragmento del gen *myc*, de mamíferos, que constituye un epitopo reconocible por anticuerpos específicos. pAdh1-*msn2::ΔEcoRI-myc9* tiene delecionado el fragmento interno *EcoRI-EcoRI* del gen *MSN2*.

La incubación del oligonucleótido CTT1-20 marcado con unos 60 μg de proteína total extraída de las cepas anteriores, permitió observar la aparición de una banda de retardo que aparentemente correspondía a Msn2p (carrera 4), pues no aparecía en el doble mutante *msn2 msn4* (carrera 2) y presentaba mayor tamaño en la cepa que expresaba Msn2-myc (carrera 3). La banda de retardo correspondiente a Msn2-*ΔEcoRI-myc* (carrera 5) presentaba un tamaño similar a la proteína Msn2p silvestre, pues el tamaño de la deleción es similar al fragmento añadido 9xmyc.



**Figura 14. Unión de la proteína Msn2p presente en extractos totales de levadura, con diferentes modificaciones, a un oligonucleótido que contiene secuencias STRE.** El retardo en gel se realizó con un oligonucleótido derivado del promotor de *CTT1* (nucleótidos -382 a -355) (CTT1-20), que contiene dos secuencias STRE. Se utilizaron extractos proteicos totales de la cepa *Wmsn2msn4* (carrera 2) y de *Wmsn2msn4* transformada con plásmidos que dan lugar a la sobre-expresión de la proteína Msn2p-myc (carrera 3), Msn2p (carrera 4), o Msn2p-*ΔEcoRI* (carrera 5). En la carrera 1 se muestra el oligonucleótido libre.

El posible efecto de las condiciones de estrés sobre la capacidad de unión de Msn2p se analizó obteniendo extractos de proteínas a partir de células en fase exponencial de crecimiento y sometidas a estrés por ácidos débiles (sorbato sódico 10 mM). La cantidad de Msn2p en los extractos se comprobó por electrotransferencia *Western* e inmunodetección con anticuerpo anti-Msn2p, sin que se detectaran diferencias significativas entre los extractos (resultados no mostrados). En las condiciones en que las proteínas fueron extraídas, no se observaron diferencias claras en la unión entre extractos obtenidos en condiciones de estrés y no estrés (Figura 15), como se puede ver al comparar la banda de Msn2p en las carreras 2 y 3, y la banda correspondiente a Msn2-myc en las carreras 6 y 7. El tratamiento se realizó en presencia de inhibidores de fosfatasa, para que se conservaran los posibles cambios en el estado de fosforilación de la proteína, pero si hubo cambios de este tipo en la proteína, estos no parecen afectar a la capacidad de unión de la misma.



**Figura 15. Unión de las proteínas Msn2p y Msn2p-myc presentes en extractos totales de levadura a oligonucleótidos que contienen secuencias STRE.** Efecto de las condiciones de estrés sobre la unión. El retardo en gel se realizó con el oligonucleótido CTT1-20. Se utilizaron extractos proteicos totales de la cepa Wmsn2msn4 (carrera 1) y de Wmsn2msn4 transformada con plásmidos que producen la sobre-expresión de la proteína Msn2p (carreras 2-5) o la proteína Msn2p-myc (carreras 6-10). Los extractos proteicos utilizados en las carreras 3 y 7 se obtuvieron en condiciones de estrés por sorbato 10 mM. Como competidores se añadieron el oligonucleótido CTT1-20 no marcado (carreras 4 y 8) y el oligonucleótido CTT1-23, que contiene mutaciones puntuales en las dos STRE, no marcado (carreras 5 y 9).

## Capítulo I

En la carrera 10 se añadió anticuerpo monoclonal anti-myc al extracto proteico antes de incubar con el oligonucleótido marcado.

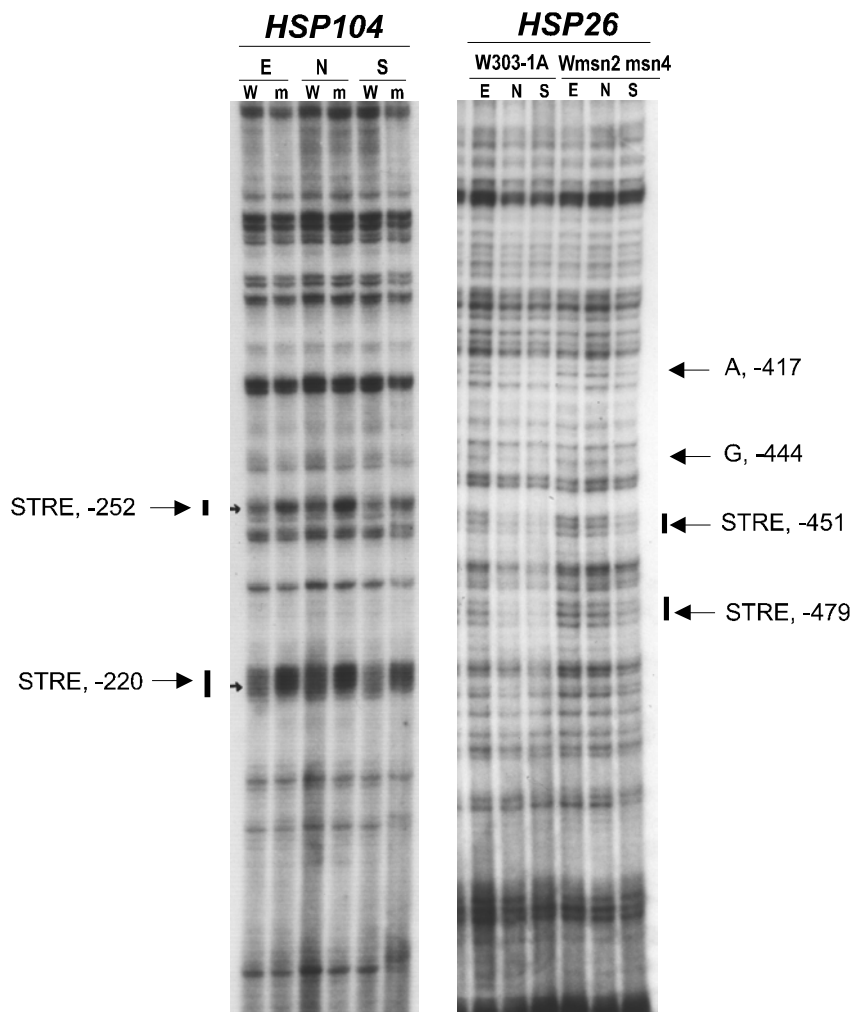
Como control, para comprobar que las bandas observadas en realidad correspondían a Msn2p, se incubó la mezcla de reacción del extracto que contenía Msn2-myc con anticuerpo anti-myc, y se observó la aparición de un super-retardo (*supershift*) debido al mayor tamaño molecular del complejo (Msn2-myc)-(anti-myc) (carrera 10). Se realizó un ensayo similar con anticuerpo anti-Msn2p, y se observó un efecto similar de retraso de la banda (resultado no mostrado).

Para comprobar la especificidad de la unión se añadió un exceso de oligonucleótido CTT1-20 sin marcar, en un exceso molar de 200 veces. La desaparición de la banda de unión correspondiente a Msn2p en la carrera 4, y de Msn2-myc en la carrera 8 indicaba que la unión era específica. Por otro lado, cuando se intentó competir con el oligonucleótido CTT1-23, que contiene mutaciones puntuales en las dos STRE, no hubo competencia (carreras 5 y 9), indicando de nuevo que las secuencias reconocidas por Msn2p dentro del oligonucleótido CTT1-20 son las STRE.

### **2.5. Las secuencias STRE están protegidas *in vivo* de una manera dependiente de Msn2p y Msn4p**

Los resultados de retardo en gel demostraban que Msn2p y Msn4p reconocen de forma específica la secuencia STRE *in vitro*. Para analizar si la interacción también se produce *in vivo* se la técnica de *footprinting in vivo* con DMS. El sulfato de dimetilo es una sustancia capaz de atravesar *in vivo* las membranas celulares e interaccionar con el DNA, dando lugar a una metilación de las guaninas del DNA, que se dará en mayor o menor grado según la accesibilidad de las mismas. Así, si una zona de secuencia está protegida por una proteína *in vivo*, la metilación de las guaninas de esa zona se producirá en menor proporción que si la secuencia estuviera libre de proteínas.

Se estudiaron los niveles de metilación de los promotores de *HSP26*, *HSP104* y *HSP12* en las cepas W303-1A y Wmsn2msn4 sometidas a diferentes estreses. Nuestro objetivo era analizar, por un lado, la ocupación de las STRE *in vivo* en ambas cepas, y por otro, comprobar si el nivel de ocupación varía debido a la exposición al estrés. Células de tipo silvestre y células que carecían de Msn2p y Msn4p crecieron logarítmicamente durante cinco generaciones a 25°C. El cultivo se dividió, y una alícuota se expuso a condiciones de estrés (NaCl 0.4 M ó sorbato 10 mM), mientras la otra se mantuvo a 25°C. Ambas muestras se trataron con DMS, en condiciones en que este compuesto metila las guaninas y, en menor proporción, las adeninas del DNA cromosómico. El DNA cromosómico metilado se extrajo, y se determinó la metilación de promotores que contienen secuencias STRE mediante extensión de cebador.



**Figura 16.** Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre la protección *in vivo* de secuencias STRE presentes en los promotores de *HSP104* y *HSP26*, en condiciones de estrés osmótico y por ácidos débiles. Las cepas W303-1A (W) y Wmsn2msn4 (m) fueron crecidas hasta fase logarítmica (E) y tratadas con NaCl 0.4 M (N) ó con ácido sórbico 10 mM (S) durante 20 minutos. Las células control (E) y las sometidas a condiciones de estrés (N y S) fueron tratadas con DMS y posteriormente se aisló el DNA. Se llevaron a cabo reacciones de extensión de cebador con los oligonucleótidos HSP104-1 y HSP26-1, se separó el DNA en un gel de secuenciación (acrilamida/urea) y se autorradiografió. Las flechas indican la posición de las secuencias STRE, así como de algunas guaninas o adeninas cuya metilación se encuentra protegida en estas condiciones. La identificación de la posición de las bases se hizo mediante comparación con la secuencia obtenida mediante el método de Sanger *et al.* (1977), utilizando como cebadores los oligonucleótidos HSP104-1 y HSP26-1.

En la figura 16 se muestran los efectos del estrés osmótico (N) y estrés por sorbato (S), sobre la protección de zonas concretas en los

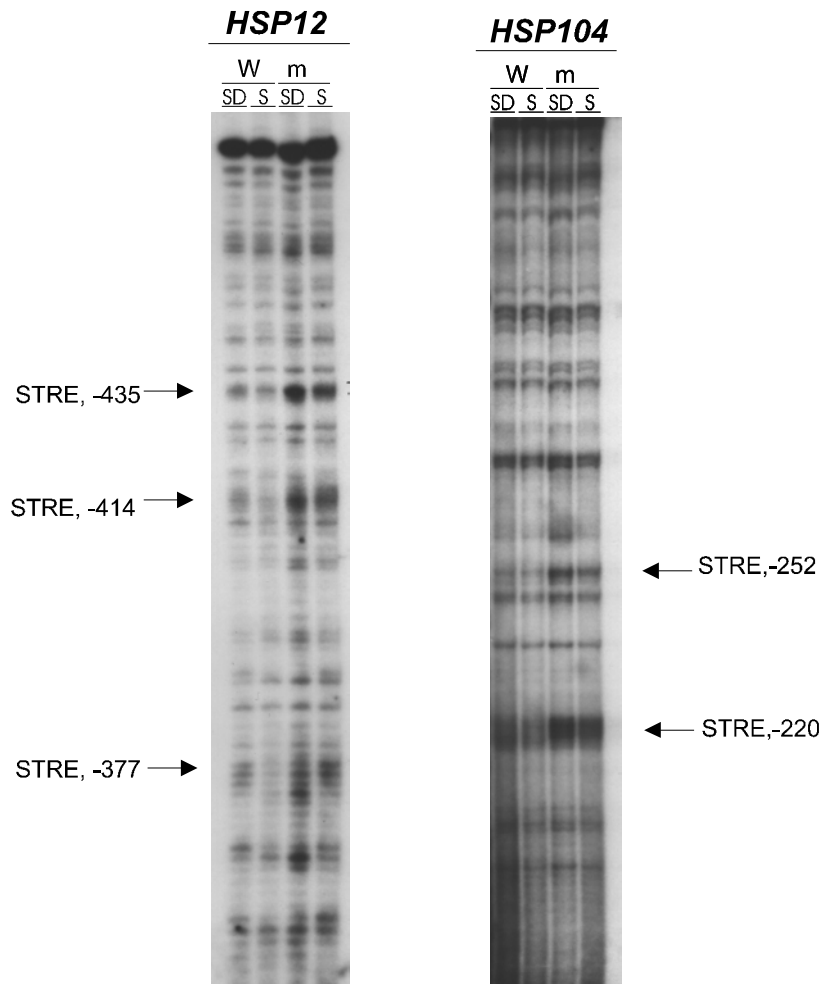
promotores de *HSP104* y *HSP26*. En el promotor de *HSP104* se observa un aumento de la protección de metilación en presencia de ácido sórbico en la cepa silvestre, pero no en la cepa *Wmsn2msn4*. La protección se restringe a dos zonas que se corresponden con las STRE presentes en las posiciones –220 y –252 del promotor de *HSP104*. Por lo tanto, al menos dos elementos STRE de este promotor (existe un tercero en –172) se encuentran protegidos *in vivo* de una forma dependiente de *MSN2/4*. El estrés por alta osmolaridad causado por adición de NaCl 0.4 M produjo un similar aumento de la protección de estas dos STRE, de nuevo sólo en las células silvestres, pero en este caso el nivel de protección fue menos pronunciado. También se observó algo de protección en ausencia de estrés, lo que es consistente con una transcripción basal mediada por STRE dependiente de *MSN2/4*.

En el promotor de *HSP12* se observaron protecciones similares de las STRE en las posiciones –377, –414 y –435 (resultados no mostrados). En cambio, en el promotor de *HSP26* se pudieron observar hechos diferenciales con respecto a los anteriores promotores (figura 16).

Por un lado, en la cepa silvestre, se observa una protección de las STRE presentes en –451 y –479, tanto por estrés osmótico como por estrés oxidativo. Pero en este caso se observan protecciones adicionales: además de los elementos STRE, se encuentran protegidas un par A/T en la posición –417, un par G/C en la posición –444 y las G comprendidas entre –487 y –496.

En el DNA de la cepa *Wmsn2msn4*, además, se observó otra diferencia con respecto a los casos anteriores: en presencia de sorbato, hay una cierta protección tanto de las STRE como de las guaninas que se han indicado anteriormente. Este hecho se observó repetidamente sólo en el promotor de *HSP26*, y exclusivamente en el caso de estrés por sorbato. Este resultado podría indicar la existencia de un factor, diferente a *Msn2p* y *Msn4p*, aunque quizá homólogo a estas proteínas, que se une a las secuencias STRE (entre otras) del promotor de *HSP26* en presencia de sorbato.

En la figura 17 se muestran los *footprinting in vivo* correspondientes a los promotores de *HSP12* y *HSP104* en los que se analizan los posibles cambios originados por condiciones de ayuno de glucosa (S). De nuevo se observa una protección de los elementos STRE presentes en ambos promotores en la cepa silvestre, bajo dichas condiciones de estrés. En este caso las condiciones control corresponden al crecimiento en medio mínimo con glucosa, SD, que como hemos indicado anteriormente puede considerarse que produce un cierto nivel de estrés celular. Como se puede observar, en estas condiciones hay una cierta protección de las STRE, que, aunque menor que en ausencia de glucosa, es importante, sobre todo en el caso del gen *HSP12*. En concreto *HSP12* es un gen que presenta un nivel importante de inducción en medio SD, lo que concuerda con estos datos de protección de STRE *in vivo*.



**Figura 17.** Efecto de la doble mutación *msn2 msn4* sobre la protección *in vivo* de secuencias STRE presentes en los promotores de *HSP12* y *HSP104*, en condiciones de ayuno de glucosa. Las cepas W303-1A (W) y Wmsn2msn4 (m) fueron crecidas hasta fase logarítmica en medio SD y transferidas a medio mínimo sin glucosa (S) durante 20 minutos. Las células control (SD) y las estresadas (S) fueron tratadas con DMS y posteriormente se aisló el DNA. Se llevaron a cabo reacciones de extensión de cebador con los oligos HSP12-1 y HSP104-1, se separó el DNA en un gel de secuenciación y se autorradiografió. Las flechas indican la posición de las secuencias STRE. La identificación de la posición de las bases se hizo mediante comparación con la secuencia obtenida mediante el método de Sanger *et al.* (1977), utilizando como cebadores los oligos HSP12-1 y HSP104-1.

En la cepa mutante, en ninguno de los dos promotores, bajo las dos condiciones estudiadas, se observa protección de las STRE.

Todos los resultados anteriores nos muestran que in vivo existen diferentes grados de ocupación de STRE en condiciones de estrés y no estrés. Esta ocupación es dependiente de la presencia de Msn2/4p en todos los casos, excepto en el del gen HSP26 en presencia de sorbato. Por lo tanto, aunque estos resultados indican que podrían existir factores adicionales que actúen a través de este elemento, confirman que Msn2p y Msn4p son STRFs, es decir, factores que regulan la expresión inducida por el elemento STRE, mediante la unión directa al mismo.

## **2.6. La sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p produce un aumento de la expresión vía STRE**

Entre los experimentos iniciales realizados con *MSN2* y *MSN4*, para caracterizar un posible papel en las rutas de utilización de azúcares, se estudió el efecto de la sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p sobre la expresión de *SUC2* (actividad invertasa). Al sobre-expresar los dedos de cinc de Msn2p y Msn4p cabía esperar que compitieran con los dedos de cinc de las proteínas nativas por la unión al DNA. Se esperaba encontrar un efecto sobre la expresión invertasa, y en caso de existir proteínas homólogas, este efecto podría ser mayor que el producido por la delección de *MSN2* y *MSN4*.

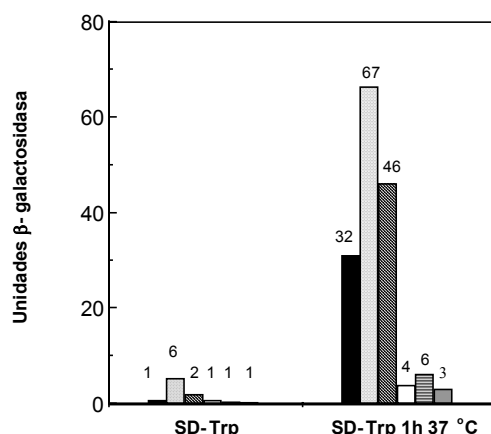
Se construyeron plásmidos que expresaban las regiones C terminal de *MSN2* (codón 492 hasta el final) y *MSN4* (codón 493 hasta el final) a partir del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GPD1*) en el vector pG3, que ya ha sido descrito anteriormente. Estos plásmidos, pGPD32C (para la sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn2p) y pGPD45C (para la sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn4p) se utilizaron para transformar la cepa silvestre W303-1A y la cepa *Wmsn2msn4*. Se observó que la presencia de dichos plásmidos tenía un efecto negativo sobre el crecimiento en medio selectivo con glucosa, respecto al mostrado por la misma cepa transformada con el plásmido control pG3. Este efecto ya fue observado cuando se sobre-expresaron los genes *MSN2* y *MSN4* completos.

El papel de Msn2p y Msn4p en la inducción vía STRE hizo sugerente el estudio del efecto que la sobre-expresión de los dominios de unión al DNA podría tener en la expresión dependiente de STRE. Las hipótesis de partida fueron que la sobre-expresión de los dominios de unión podría tener un efecto dominante negativo al impedir la unión de las proteínas de tipo silvestre sin poder activar la transcripción por sí mismas, o bien que la unión podría activar la transcripción incluso en condiciones de ausencia de estrés. La actividad dependiente de STRE se midió de dos formas: a partir de promotores completos (los de los genes *HSP12* y *HSP26*) fusionados con *lacZ*, y a partir de la fusión STRE-*LEU2-lacZ* anteriormente descrita.



Como se observa en la figura 18, en condiciones de no estrés (medio SD-Trp), la expresión del gen *HSP26* es 9 veces mayor en presencia de pGPD32C. El efecto de los dedos de cinc de Msn4p es más modesto, produciéndose un incremento de 3 veces en la expresión. Sin embargo, cuando se analizó el efecto de estas sobre-expresiones en una cepa mutante *msn2 msn4* no se observó ningún incremento de actividad por la sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn2p ó Msn4p, en ausencia de estrés.

En condiciones de estrés (medio SD-Trp, 1 hora a 37°C), los valores absolutos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa silvestre con pGPD32C y pGPD45C fueron superiores a los de la cepa control, sin embargo los niveles de inducción eran menores (12 veces al sobre-expresar el dominio de unión al DNA de *MSN2*, y 24 veces al sobre-expresar el dominio de unión al DNA de *MSN4*, frente a las 50 veces de inducción de la cepa control). En la cepa mutante *Wmsn2msn4* se observó una cierta inducción por choque térmico del promotor de *HSP26*, que es independiente de *MSN2* y *MSN4*, y que podría deberse al heat shock factor. Esta inducción fue de 4 veces en la cepa control, y de 15 y 8 veces al sobre-expresar los dedos de cinc de Msn2p y de Msn4p, respectivamente.



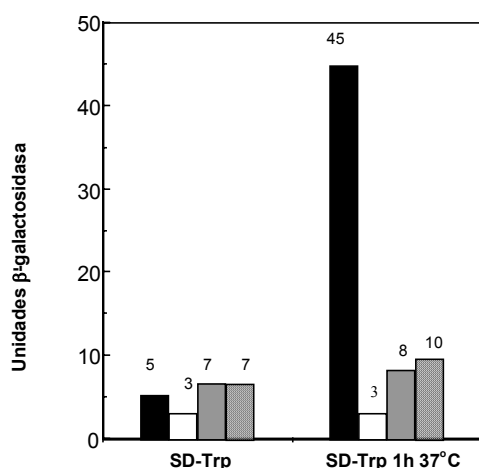
**Figura 18. Efecto de la sobre-expresión de los dedos de cinc de *MSN2* y *MSN4* sobre la expresión del gen *lacZ* bajo el control del promotor de *HSP26*.** Cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas W303-1A y *Wmsn2msn4* cotransformadas con el plásmido integrativo 26YIp y los plásmidos episomales pG3, pGPD32C ó pGPD45C, crecidas en medio SD-Trp (medio selectivo para los plásmidos derivados de pG3), fueron sometidos a estrés térmico durante 1 hora, y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa en los extractos crudos, antes y después del estrés. W303-1A (26YIp)(pG3): barras llenas; W303-1A (26YIp) (pGPD32C): barras punteadas; W303-1A (26YIp) (pGPD45C): barras rayadas en diagonal; *Wmsn2msn4* (26YIp)(pG3): barras vacías; *Wmsn2msn4* (26YIp) (pGPD32C): barras rayadas en horizontal; *Wmsn2msn4* (26YIp) (pGPD45C): barras grises.

Resultados similares se obtuvieron al estudiar el efecto de estas sobre-expresiones sobre la inducción de la fusión génica *HSP12-lacZ*

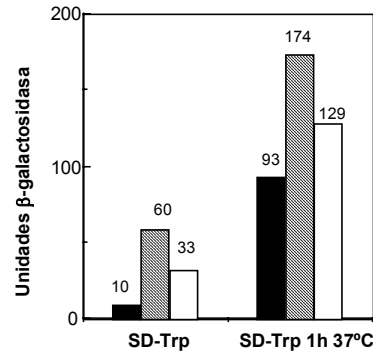
(construcción 12YIp), aunque en este caso en la cepa mutante no se observó ninguna inducción por choque térmico del gen *HSP12* que fuera independiente de Msn2p y Msn4p (figura 19). Los valores absolutos de actividad fueron de nuevo superiores cuando se sobre-expresaron los dominios de unión al DNA de *MSN2* y *MSN4*, pero en ninguno de los casos se produjo una inducción por estrés.

Cuando se midió la inducción estrictamente vía STRE en la cepa W303-1A transformada con las sobre-expresiones y con la construcción pGM18/17, se observó el mismo efecto cualitativo que sobre los promotores completos (Figura 20). La sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn2p produjo un aumento de 5 veces respecto al control en los niveles basales de expresión vía STRE (en ausencia de estrés), y la sobre-expresión de los dedos de cinc de Msn4p produjo un aumento de 4 veces.

Al inducir la expresión por choque térmico, de nuevo se alcanzaron valores absolutos superiores con las sobre-expresiones, aunque los niveles de inducción siguieron siendo menores.



**Figura 19. Efecto de la sobre-expresión de los dedos de cinc de *MSN2* y *MSN4* sobre la expresión del gen *lacZ* bajo el control del promotor de *HSP12*.** Cultivos en fase exponencial de crecimiento de las cepas W303-1A cotransformada con el plásmido integrativo 12YIp y el plásmido episomal pG3, y Wmsn2msn4 cotransformada con el plásmido integrativo 12YIp y los plásmidos episomales pG3, pGPD32C ó pGPD45C, crecidas en medio SD-Trp (medio selectivo para los plásmidos derivados de pG3), fueron sometidos a estrés térmico durante 1 hora, y se midió la actividad β-galactosidasa en los extractos crudos, antes y después del estrés. W303-1A (12YIp)(pG3): barras llenas; Wmsn2msn4 (12YIp)(pG3): barras vacías; Wmsn2msn4 (12YIp) (pGPD32C): barras grises; Wmsn2msn4 (12YIp) (pGPD45C): barras ralladas.



**Figura 20. Efecto de la sobre-expresión de los dedos de cinc de *MSN2* y *MSN4* sobre la expresión de un gen reporter *LEU2-lacZ* bajo el control del elemento STRE.** Cultivos en fase exponencial de crecimiento de la cepa W303-1A cotransformada con el plásmido integrativo pGM18/17 y los plásmidos episomales pG3 (barras llenas), pGPD32C (barras ralladas) y pGPD45C (barras vacías), respectivamente, crecidos en medio SD, fueron sometidos a estrés térmico durante 1 hora, y se midió la actividad β-galactosidasa en los extractos crudos, antes y después del estrés.

Así pues, los anteriores resultados muestran que la sobre-expresión de los dedos de cinc de *Msn2p* y *Msn4p* incrementa la expresión basal (en ausencia de estrés) de promotores con secuencias STRE.

Una posible explicación es que los dedos de cinc por sí mismos tuvieran acceso al DNA y de alguna manera facilitaran (quizá favoreciendo una apertura de la cromatina) la unión de los factores completos al DNA, que serían los que tendrían un efecto activador. Hay que excluir que los dedos de cinc por sí mismos tengan capacidad de activar la transcripción, ya que en la cepa *Wmsn2msn4* no hay incremento de la expresión cuando se sobre-expresan estos dominios. Es decir, hace falta que estén los factores completos para que se alcancen niveles elevados de transcripción.

*Capítulo I*

**CAPÍTULO II: LA PRIVACIÓN BRUSCA DE FUENTE DE  
CARBONO BLOQUEA LA TRADUCCIÓN, PERO NO LA  
TRANSCRIPCIÓN, EN LA LEVADURA *Saccharomyces  
cerevisiae***



## 1. Respuesta de la levadura al cambio en la fuente de carbono.

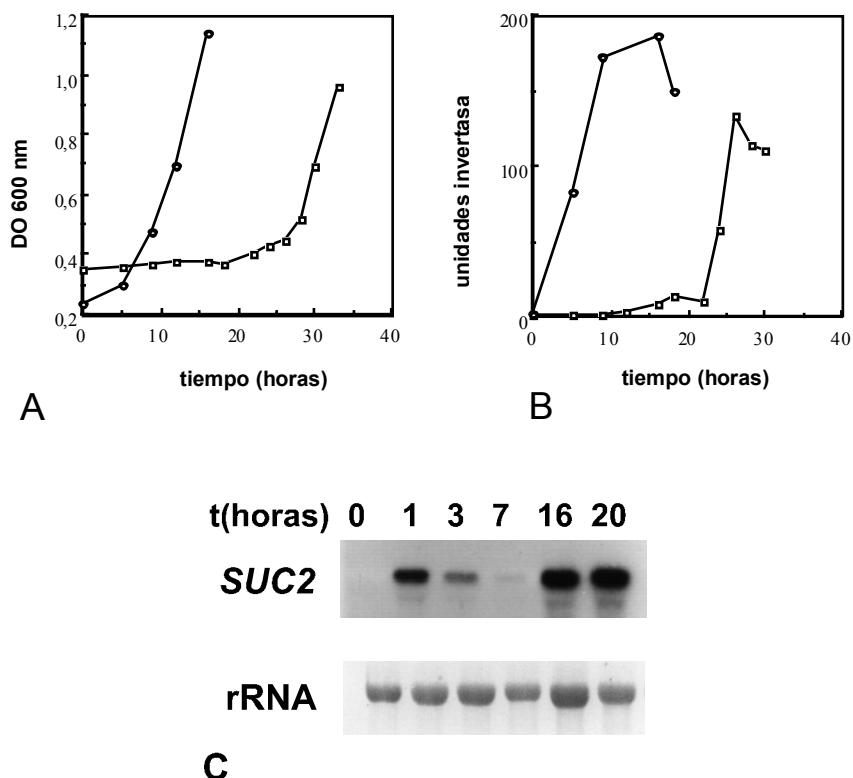
En el capítulo I de este trabajo hemos descrito cómo, durante la caracterización fenotípica del doble mutante *msn2 msn4*, se observó un fenómeno sorprendente en la cepa W303-1A. Tras la transferencia de células en fase exponencial de crecimiento en medio con glucosa (SD) a un medio con rafinosa como fuente de carbono (SRaf) se producía una parada del crecimiento extremadamente larga (20 a 25 horas), de la cual no pudimos encontrar ninguna descripción en la literatura. Anteriormente, y como ya se ha descrito, se había observado que cuando el cambio se efectuaba a un medio rico con rafinosa, YPRaf, no se producía esta fase de latencia. Las diferencias entre el medio rico y el sintético se deben, en parte, a la presencia de glucosa u otros azúcares fácilmente metabolizables en el medio rico, ya que cuando se añadió una pequeña cantidad (0.5%) de glucosa al medio sintético con rafinosa, el tiempo requerido para reiniciar el crecimiento exponencial se redujo a niveles similares a los observados en medio rico.

Como vimos en el primer apartado de los resultados, hasta poco antes de reiniciarse el crecimiento no se aprecian niveles significativos de invertasa, el enzima codificado por el gen *SUC2*, y que permite el uso de rafinosa como fuente de carbono. Era lógico por tanto, asumir que la fase de latencia es el tiempo requerido para desreprimir el gen *SUC2* y sintetizar el enzima.

Por tanto, estudiamos los niveles de mRNA de *SUC2* en diferentes puntos de la curva de crecimiento en SRaf (Figura 21C). Al poco tiempo de producirse el cambio a condiciones no represoras se encontró una expresión transitoria de *SUC2*. Esta expresión inicial no produce niveles detectables de invertasa (Figura 21B) y no es suficiente para producir el crecimiento celular (Figura 21A). Una segunda activación de *SUC2* se produce poco tiempo antes de que empiece el crecimiento exponencial. Los niveles de mRNA observados son bastante similares a los observados en el primer pico, pero esta vez dan lugar a niveles medibles de actividad invertasa (Figura 21B) y crecimiento celular (Figura 21A).

Para comprobar si este comportamiento observado es común a otros azúcares, medimos el crecimiento celular tras transferir células en fase exponencial a medio mínimo sintético con galactosa como fuente de carbono (SGal). Los resultados fueron similares a los obtenidos con rafinosa, siendo incluso más larga la fase de latencia. Del mismo modo, al añadir 0.05% de glucosa al medio con galactosa (SGalg), la fase de latencia desapareció. También se midió en este medio la expresión de una fusión *GALI0-lacZ*, a través de la actividad  $\beta$ -galactosidasa. De nuevo la actividad se observó únicamente justo antes del reinicio del crecimiento. Así pues, el fenómeno

observado no es exclusivo de la expresión de invertasa, sino que se extiende a los productos de otros genes reprimidos por glucosa.



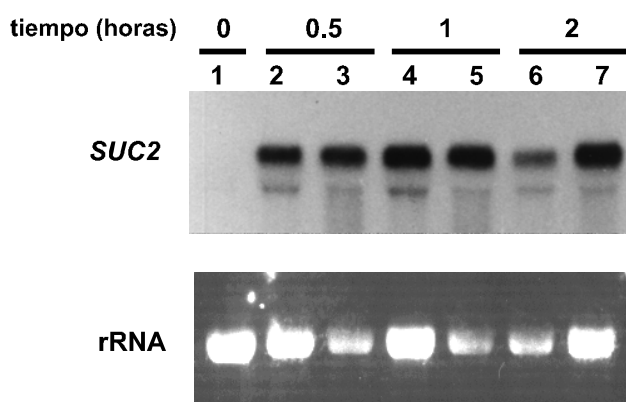
**Figura 21. Expresión del mRNA de *SUC2* y actividad invertasa a lo largo de la curva de crecimiento en medio SRAF.** (A) Crecimiento de la cepa de levadura W303-1A en medio SRAF (cuadrados) y en SRAfg (círculos). (B) Actividad invertasa a diferentes tiempos de incubación en SRAF (cuadrados) y SRAfg (círculos). La actividad invertasa se expresa como  $\mu\text{mol}$  de glucosa liberado/min/100 mg (peso seco) de células. (C) mRNA de *SUC2* a diferentes tiempos de incubación (en horas) en medio SRAF. 4  $\mu\text{g}$  de cada muestra se fraccionaron en geles de agarosa al 1.6% y se analizaron por transferencia *Northern* e hibridación. La aplicación y transferencia de cantidades iguales de RNA se verificó por tinción con bromuro de etidio.

## 2. Expresión del gen *SUC2* en completa ausencia de glucosa.

Para tratar de explicar las diferencias en la actividad invertasa observadas a tiempos cortos entre células transferidas a SRAF y a SRAfg, se comparó la cinética de desrepresión de *SUC2* en ambos medios por transferencia *Northern* e hibridación. La figura 22 muestra que el nivel de



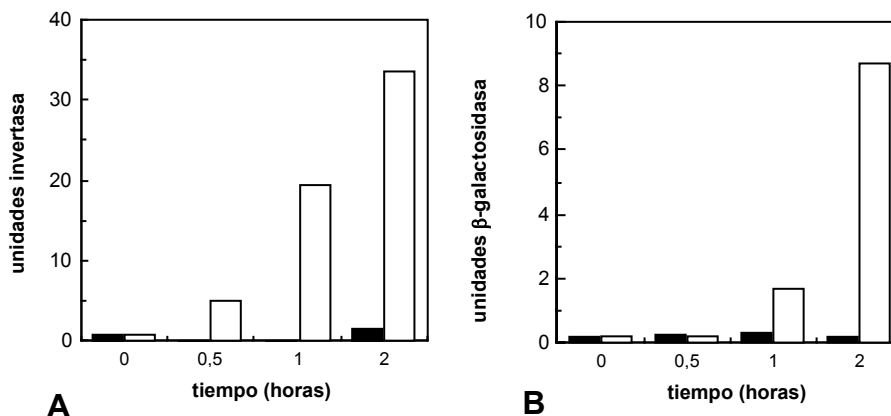
mensajero de *SUC2* a los 30 minutos y 1 hora tras la transferencia a condiciones no represoras no está afectada por la presencia de glucosa en el medio, ya que las cantidades de transcrito de *SUC2* son similares en las células desreprimidas en SRaf y en SRafg. A tiempos más largos se observa una caída en la cantidad de mRNA de *SUC2* cuando la desrepresión ocurre en medio SRaf (figura 22, carrera 6).



**Figura 22.** La expresión de *SUC2* no depende de la presencia de glucosa en el medio. El RNA total se preparó a partir de la cepa silvestre W303-1A, previamente crecida en medio SD (carrera 1), tras incubar los tiempos indicados en SRaf (carreras 2, 4 y 6) o medio SRafg (carreras 3, 5 y 7). La aplicación y transferencia de cantidades iguales de RNA se verificó por tinción con bromuro de etidio.

Un análisis más detallado de la actividad invertasa durante este período se muestra en la figura 23A. La actividad invertasa se detecta sólo cuando la desrepresión se lleva a cabo en presencia de una baja concentración de glucosa. Es decir, a pesar del hecho de que en las células desreprimidas en SRaf y SRafg hay cantidades iguales de mensajero de *SUC2* a los 30 min y 1 h, no se detecta ninguna actividad invertasa cuando nos encontramos en completa ausencia de glucosa. Para excluir la posibilidad de una inactivación inespecífica de la invertasa en ausencia total de glucosa, se examinó la expresión de una fusión génica *SUC2-LEU2-lacZ* contenida en el plásmido pLS11 integrado en el locus *URA3* cromosómico. Esta fusión génica está regulada por represión por glucosa de manera análoga a la del gen *SUC2* silvestre (Sarokin y Carlson, 1985). La figura 23B muestra que la actividad  $\beta$ -galactosidasa se detecta solamente en medio SRafg.

También se analizó por electrotransferencia *Western* e inmunodetección con anticuerpo anti- $\beta$ -galactosidasa la presencia de  $\beta$ -galactosidasa en estas condiciones. Como cabía esperar, la presencia de la proteína se detectó únicamente en el medio SRafg (resultados no mostrados).

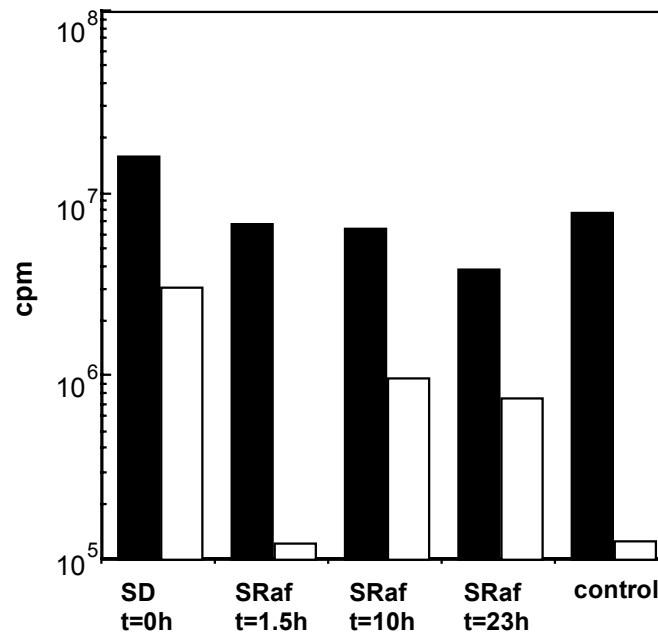


**Figura 23.** Expresión de invertasa y  $\beta$ -galactosidasa dirigida por el promotor de *SUC2* depende de la presencia de glucosa en el medio. La actividad invertasa (A) y  $\beta$ -galactosidasa (B) se midieron a diferentes tiempos de incubación en medios SRaf (barras llenas) y SRafg (barras vacías).

### 3. La privación de glucosa produce una parada de la síntesis de proteínas.

Puesto que los niveles de transcrito de *SUC2* en medio SRaf y SRafg eran similares, pero sólo se observaba actividad invertasa en presencia de glucosa, pensamos que las diferencias se debían encontrar en los niveles de traducción. Pasamos a estudiar si la incorporación de aminoácidos y/o la síntesis proteica estaban afectadas por la ausencia de glucosa durante la desrepresión. Siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos, se midió la cantidad de [ $^{35}$ S]-Metionina captada por las células e incorporada en proteínas en diferentes puntos de la cinética de crecimiento en medio SRaf. Como se observa en la figura 24, la transferencia de la levadura a medio SRaf reduce la incorporación de metionina en las células a un 40% de la inicial, pero esta reducción no explica por sí misma los resultados comentados anteriormente. En cambio, la incorporación de metionina en proteínas, que utilizaremos como indicativo de la tasa de traducción, sí que sufre una fuerte caída en estas condiciones, similar a la que se produce en presencia de cicloheximida, inhibidor de la traducción utilizado como control. A las 1.5 horas del cambio de medio el nivel de traducción se ha reducido a un 7,1% del nivel inicial, en presencia de glucosa. El mismo nivel de bloqueo de la traducción (un 7,5% de tasa de traducción inicial) se consigue con la adición de cicloheximida en presencia de glucosa (control). Por tanto, podemos decir que existe una parada prácticamente total de la traducción. Este bloqueo total de la traducción es transitorio, pues a partir de

las 10 horas del cambio de medio se puede observar que se han recuperado niveles importantes de traducción, aunque estos son inferiores a los observados inicialmente. El que no se alcancen tasas de traducción similares a las existentes en presencia de glucosa puede deberse a la menor incorporación de aminoácidos existente en estas condiciones, que de hecho está reducida en un porcentaje similar al de la caída del nivel de traducción.

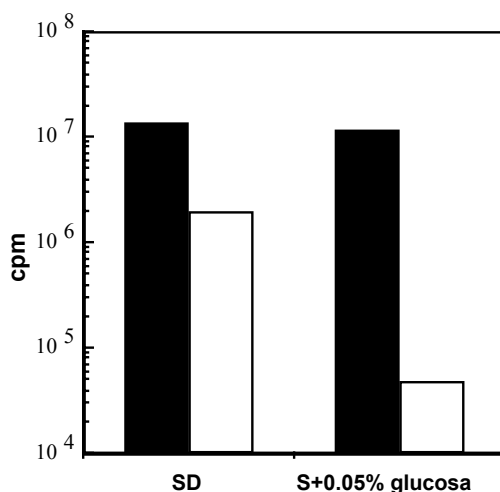


**Figura 24.** Incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina y síntesis proteica en ausencia de glucosa. Células creciendo exponencialmente en medio SD se transfirieron a medio SRaf y se midió la incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina (barras llenas) y su incorporación en proteínas (barras vacías) tras los tiempos indicados de incubación en dicho medio. La incorporación basal (control) se midió añadiendo a las células 0.1 mg/ml de cicloheximida antes de la adición de [<sup>35</sup>S] metionina.

Así pues, llegamos a la conclusión de que la ausencia de actividad invertasa cuando las células se transfieren a medio de desrepresión sin glucosa es consecuencia de un defecto general en la síntesis de proteínas. La capacidad de traducción se reestablece al cabo de varias horas de incubación, permitiendo entonces la síntesis de invertasa cuando se produce el segundo pico de expresión de *SUC2*.

#### 4. Efecto de la presencia de 2-desoxiglucosa 0.05% sobre el bloqueo de la traducción por ausencia de fuente de carbono

La 2-desoxiglucosa es un derivado de la glucosa no metabolizable. Para comprobar si la detección de glucosa en el medio era suficiente para impedir la parada de la traducción, se añadió 2-desoxiglucosa 0.05% al medio, y se midieron los niveles de incorporación de metionina y traducción. Según se muestra en la figura 25, se produjo una parada de la traducción incluso algo menor que la observada en ausencia total de glucosa (disminución de la tasa de traducción a un 2,4% del control). Esto sugiere que no es la no detección de glucosa lo que produce la parada de la traducción.



**Figura25.** Incorporación de  $[^{35}\text{S}]$  metionina y síntesis proteica en presencia de 2-desoxiglucosa. Células creciendo exponencialmente en medio SD se transfirieron a medio S + 0.05% 2-desoxiglucosa y se midió la incorporación de  $[^{35}\text{S}]$  metionina (barras llenas) y su incorporación en proteínas (barras vacías) tras 90 minutos de incubación en dicho medio.

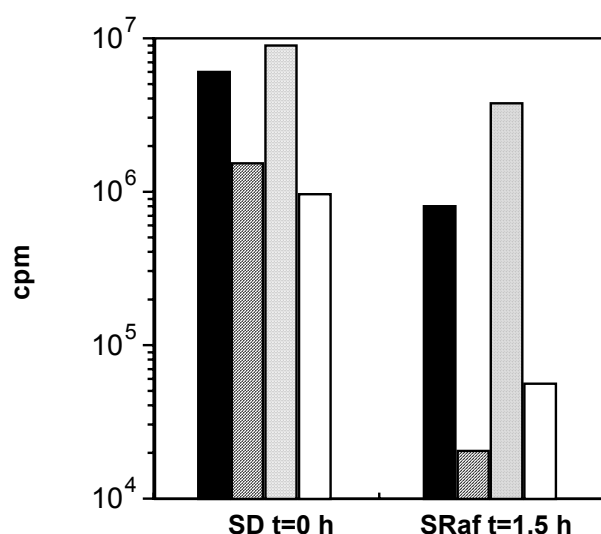
#### 5. El bloqueo de la traducción no es dependiente de la quinasa Gcn2p

La cepa H2524 contiene una delección del gen *GCN2*, que codifica una proteína quinasa implicada en la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF-2 $\alpha$ . Gcn2p ha sido implicada en la regulación traduccional de la expresión de la proteína Gcn4p, activador general de los genes de

biosíntesis de aminoácidos. En ausencia de aminoácidos, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  por Gcn2p en su serina 51 produce una estabilización de la unión de eIF-2 $\alpha$  con eIF-2B, el factor catalizador del intercambio de nucleótido de guanina. El factor eIF-2B, que se encuentra en defecto respecto a eIF-2 $\alpha$ , queda así secuestrado, y se produce una disminución de la tasa de traducción, por la menor capacidad de formar los complejos ternarios de iniciación. Así, esto permite que el complejo 40S, en su rastreo del mRNA, se salte las uORFs 2, 3 y 4 anteriores al codón AUG de *GCN4*, e inicie la traducción en la ORF que codifica este gen.

La fosforilación de eIF-2 $\alpha$  en su Ser 51 por diversas quinasas, ha sido descrita en mamíferos como un mecanismo de regulación de la traducción. En este caso, la fosforilación se produce en diversas condiciones de estrés, como la privación de hemo o la infección viral, y, al contrario de lo descrito en levaduras, donde la parada de la traducción es parcial, en mamíferos se produce un bloqueo total de la traducción.

Aunque en levadura sólo se ha descrito la fosforilación de eIF-2 $\alpha$  en su serina 51 por el estrés concreto de privación de aminoácidos, decidimos estudiar si el factor Gcn2p podría estar implicado en la regulación de la traducción por otros tipos de estreses, como el que nos ocupa, la privación de glucosa.



**Figura 26.** Incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina y síntesis proteica en ausencia de la quinasa Gcn2p. Células creciendo exponencialmente en medio SD de las cepas MCY829 y H2524 (*gcn2-*) se transfirieron a medio SRaf y se midió la incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina (MCY829: barras llenas; H2524: barras grises) y su incorporación en proteínas (MCY829: barras ralladas; H2524: barras vacías) tras 90 minutos de incubación en dicho medio.

Para ello se llevó a cabo un ensayo de incorporación de metionina y traducción en las cepas MCY829 (cepa silvestre) y H2524 (*gcn2-*). La delección de *GCN2* no impidió que se produjera el bloqueo de la traducción por privación de fuente de carbono, obteniéndose un porcentaje de traducción respecto al control sólo ligeramente superior al obtenido en la cepa silvestre, diferencia que puede ser consecuencia del distinto fondo genético de las cepas MCY829 y H2524 (figura 26).

Por tanto, concluimos que la presencia de *GCN2* no es imprescindible para que se produzca la parada de la traducción debida a este tipo de estrés. Sin embargo, no podemos descartar que la inhibición de la traducción se deba a una variación en el estado de fosforilación de eIF-2 por la acción de otras quinasas o fosfatasa.

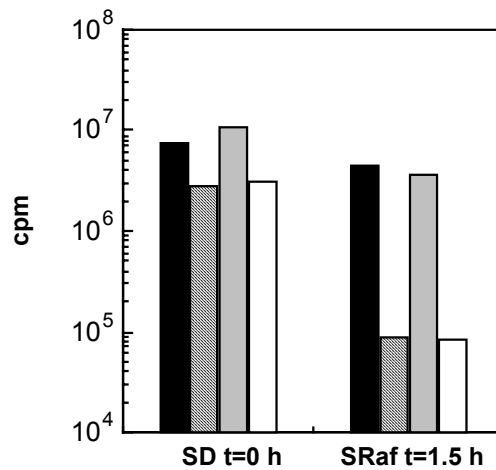
En levadura se ha determinado que el estado normal de eIF-2 $\alpha$  en la célula es una forma trifosforilada, fosforilación que parece ser dependiente de la caseína quinasa II (Feng *et al*, 1994). En presencia de un estrés severo por ausencia de glucosa, Romero y Dahlberg (1986) describen la aparición de una especie no fosforilada de eIF-2 $\alpha$ . El cambio de medio SD a medio SRaf constituye un estrés severo por ausencia de glucosa durante el tiempo en que las células no son capaces de metabolizar la rafinosa. Esta desfosforilación podría ser, al menos, uno de los factores que contribuyen al bloqueo de la traducción, a través de la actuación de una fosfatasa desconocida.

## **6. El bloqueo de la traducción no está regulado por la ruta RAS-cAMP.**

Se llevó a cabo un estudio de la incorporación de metionina y traducción en las mismas condiciones anteriores, pero en un mutante *bcy1*. La mutación en el gen *BCY1*, que codifica la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (dependiente de AMP cíclico) produce una desregulación de la quinasa por el AMP cíclico, de modo que la quinasa se encuentra activa independientemente de las condiciones del medio. Puesto que la ruta RAS-cAMP actúa como un sensor de la disponibilidad de nutrientes en el medio, al estar activa la quinasa la célula actúa como si hubiera nutrientes, independientemente de que los haya o no. Por ello se decidió comprobar si la parada de la traducción está regulada por esta ruta, y si se producía o no la parada de la traducción al estar la quinasa constitutivamente activa.

En la figura 27 se muestra que en el mutante *bcy1* la parada de la traducción se produce de un modo similar al de la cepa silvestre. Si en la cepa W303-1A la tasa de traducción disminuye hasta el 3,2%, en la cepa Wbcy1 lo hace hasta el 2,6%. Esto parece indicar que esta ruta no está, al menos directamente, implicada en la regulación de este proceso. Aunque un mutante *bcy1* actúa como si el nivel de nutrientes en el medio fuera siempre

elevado, sigue siendo indispensable la presencia de una fuente de carbono metabolizable que permita obtener la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de traducción.

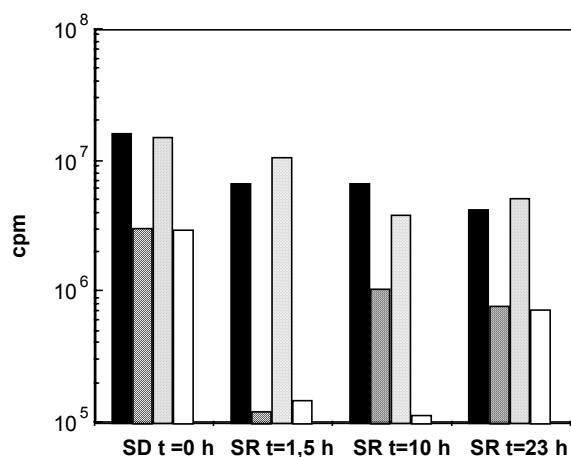


**Figura 27.** Incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina y síntesis proteica en un mutante *bcy1*. Células creciendo exponencialmente en medio SD de las cepas W303-1A y *Wbcy1* se transfirieron a medio SRaf y se midió la incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina (W303-1A: barras llenas; *Wbcy1*: barras grises) y su incorporación en proteínas (W303-1A: barras ralladas; *Wbcy1*: barras vacías) tras 90 minutos de incubación en dicho medio.

## 7. El bloqueo de la traducción en el doble mutante *msn2 msn4*

Debido a que la fase de latencia tras la transferencia de células en fase exponencial a un medio sin glucosa es mucho más extensa en la cepa *Wmsn2msn4*, decidimos estudiar si este retardo del crecimiento estaba de alguna manera relacionado con la parada de la traducción descrita en los apartados anteriores.

En la figura 28 se observa que, efectivamente, el período de parada de la traducción es más largo en la cepa *Wmsn2msn4*. Mientras a las 10 horas de la transferencia a medio Sraf la cepa W303-1A ya ha recuperado gran parte de los niveles iniciales de traducción (un 30%), la cepa *Wmsn2msn4* sufre todavía un bloqueo total de la traducción (un 4,5% de la tasa inicial en SD). A las 23 horas, ambas cepas tienen tasas de traducción similares (un 25-30%), por lo tanto, una vez superado el bloqueo de la traducción, no hay diferencias entre las dos cepas.



**Figura 28.** Incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina y síntesis proteica en un mutante *msn2 msn4* en ausencia de glucosa. Células creciendo exponencialmente en medio SD de las cepas W303-1A y Wmsn2msn4 se transfirieron a medio SRaf y se midió la incorporación de [<sup>35</sup>S] metionina (W303-1A: barras llenas; Wmsn2msn4: barras grises) y su incorporación en proteínas (W303-1A: barras rayadas; Wmsn2msn4: barras vacías) tras los tiempos indicados de incubación en dicho medio.

Estos resultados implican que el defecto en *MSN2* y *MSN4* dificulta la restauración de la síntesis de proteínas tras la parada inicial de la traducción, hecho que podría deberse a la mayor dificultad de esta cepa para superar el estrés causado por la ausencia de glucosa. Esto podría producir una respuesta más lenta a la nueva situación, de manera que tardasen más en restablecerse las condiciones adecuadas para el desbloqueo de la traducción. Aunque desconocemos las causas exactas por las que el hecho se produce, este resultado permite explicar el retraso en el crecimiento de la cepa Wmsn2msn4 en Sraf. Aunque las diferencias en la expresión de *SUC2* no son importantes entre ambas cepas (resultado no mostrado), el mayor período de parada traduccional en el doble mutante retrasa la expresión de invertasa en cantidades suficientes para metabolizar la rafinosa y reiniciar el crecimiento.



**DISCUSIÓN**



## **Msn2p y Msn4p participan en la respuesta a estrés de *Saccharomyces cerevisiae***

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha descrito una nueva ruta de inducción por estrés, hasta ahora no descrita en otros organismos. Al comprobar la inducción por calor de ciertos genes que no contenían secuencias HSE en sus promotores, en concreto el gen *DDR2* y el gen de la catalasa citosólica, *CTT1*, se identificó un nuevo elemento en *cis*, de secuencia consenso AGGGG ó CCCCT, al que se comprobó que no se unía el HSF. Este elemento, que se induce por múltiples factores de estrés, recibió el nombre de Elemento de Respuesta al Estrés (Stress Response Element, ó STRE). Algunas de las condiciones de estrés que pueden activar la expresión a través de este elemento son el choque térmico, el ayuno de nitrógeno, el choque osmótico y el choque oxidativo, el pH externo ácido, los ácidos débiles, como el sórbico, y la presencia de etanol. Por esta amplia capacidad de inducción por estrés, se ha hipotetizado que esta UAS podría ser un componente de la Respuesta General al Estrés en la levadura *Saccharomyces*.

En la introducción de este trabajo se ha intentado recoger una visión general de los conocimientos que se han obtenido en los últimos años sobre la respuesta al estrés de *Saccharomyces* a nivel transcripcional, tanto de las rutas de respuesta específicas, como de la respuesta general a estrés, cuya existencia se ha discutido y en la que parece tener un papel importante el elemento STRE. En general, aquellas condiciones de estrés que inducen tolerancia al estrés activan las STRE, y asimismo, las condiciones que activan este elemento inducen resistencia cruzada contra otros tipos de estrés (Marchler *et al.*, 1993; Schüller *et al.*, 1994). Es más, de los pocos genes para los cuales se ha demostrado un papel significante en la resistencia al estrés severo, como son *HSP104*, *CTT1* ó los *SSA*, los dos primeros contienen secuencias STRE en su promotor y parecen estar bajo el control de este elemento, y el gen *SSA3* está controlado por el elemento PDS, del cual se ha propuesto que podría ser una variante del STRE (Boorstein y Craig, 1990). También parece haber una relación directa entre la ruta RAS-PKA, que ha sido relacionada con la resistencia celular al estrés y el elemento STRE, al que regula negativamente (Marchler *et al.*, 1993). Varios de los genes de la biosíntesis de trehalosa, cuyo aumento en los niveles de síntesis ha sido relacionado con la adquisición de tolerancia a estrés, están también bajo el control de secuencias STRE (Winderickx *et al.*, 1996).

Todo ello indica una correlación entre la función del elemento STRE y la tolerancia a estrés severo. Por consiguiente, el fenotipo esperable para un mutante en el gen que codifica el factor transcripcional que actúa a través de dicho elemento (que podemos llamar STRF ó *Stress Response Factor*)

## Discusión

sería la hipersensibilidad pleiotrópica a condiciones de estrés. Sin embargo, durante varios años se ha intentado, sin éxito, descubrir cuál es el factor o los factores que se unen a este elemento. Varios factores transcripcionales, como Yap1p ó Rox3p, parecen ser importantes para la inducción vía STRE, pero en ningún caso se ha demostrado una unión directa de los mismos a la secuencia CCCCT (Gounalaki y Thireos, 1994; Evangelista *et al.*, 1996).

En el presente trabajo se han presentado evidencias que indican que Msn2p y Msn4p son los factores transcripcionales que regulan la expresión génica a través del elemento STRE o STRF, sin descartar que puedan existir otros STRF adicionales.

Las líneas de evidencia que apoyan esta hipótesis son diversas. En primer lugar, la ausencia de las proteínas Msn2p y Msn4p produce un fenotipo de sensibilidad general al estrés severo, que concuerda con el que cabría esperar en un mutante que careciese del STRF. Aunque no se observaron defectos en el crecimiento del doble mutante *msn2 msn4* sometido a condiciones suaves de estrés, cuando se sometió a condiciones severas de estrés térmico, estrés osmótico, estrés oxidativo o estrés por ayuno de glucosa, entre otras, la viabilidad de *Wmsn2msn4* resultó seriamente disminuída frente a la de una cepa silvestre. Los fenotipos encontrados en el doble mutante *msn2 msn4* pueden ser explicados por la ausencia de transcripción dependiente de STRE. En las células silvestres, los genes activados por este elemento se expresan a bajo nivel cuando las células se encuentran en fase exponencial de crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono, pero se inducen rápidamente por condiciones de estrés. Los productos de estos genes podrían constituir una primera línea de defensa contra la agresión, de la que carecería el mutante *msn2 msn4*. En consistencia con este papel fisiológico de Msn2p y Msn4p, la sobre-expresión de *MSN2* y *MSN4* produce la expresión constitutiva de genes regulados por STRE en condiciones de no estrés, así como un aumento de la resistencia general al estrés.

El hecho de que en fase estacionaria no se observen defectos en la resistencia al estrés de *Wmsn2msn4* indicaría que en esta fase del crecimiento celular otros mecanismos de defensa independientes de los activados por Msn2p y Msn4p son los que contribuyen al elevado nivel de resistencia observado en estas células. Así mismo, en condiciones de estrés suave no hay defecto de crecimiento en el doble mutante, lo que sugiere la existencia de mecanismos independientes de STRE que permiten el crecimiento bajo estas condiciones desfavorables.

Al estudiar la expresión de diversos genes regulados por estrés, hemos encontrado que varios de ellos presentaban una expresión afectada (o en algunos casos, nula) en el doble mutante *msn2 msn4*. Los genes afectados contienen secuencias STRE en su promotor, habiéndose determinado el papel activo de estas secuencias en la regulación de algunos de ellos, como *CTT1*, *HSP12* y *DDR2*. Un caso especial lo constituye el gen *HSP104*, gen

que presenta un patrón de regulación típico de genes controlados por STRE, y cuya expresión no parece afectada en condiciones de choque térmico o ausencia de glucosa, en la cepa *Wmsn2msn4*. Esta situación está en aparente contradicción con el hecho de que estas proteínas se unen *in vivo* a las secuencias STRE de este gen. Quizá el hecho de que no se observen defectos en su expresión en ausencia de fuente de carbono o frente a choque térmico, se deba a que en estas condiciones de estrés estén actuando otras rutas de transducción de señal que actúen a través de otros factores. Una posibilidad es que la inducción se produzca a través del *Heat Shock Factor*. En este sentido, el promotor de *HSP104* contiene elementos HSE, y se ha comprobado que el HSF puede inducir la expresión en condiciones de ausencia de glucosa, como sucede en el caso del gen de la metalotioneína, *CUP1* (Tamai *et al.*, 1994). En nuestro laboratorio se está trabajando en la obtención de un triple mutante *hsf1 msn2 msn4* que permita estudiar la redundancia de las dos rutas en la inducción de la transcripción de *HSP104* en estas condiciones.

Otro gen cuya expresión no está afectada en el doble mutante es *SSA3*. En este gen se han descrito dos tipos de elementos reguladores: uno de ellos es el elemento PDS (T/AGGGA) (Boorstein y Craig, 1990), que se induce tardíamente en la curva de crecimiento de levadura tras el cambio diáuxico, y que es similar en secuencia al STRE, estando igualmente regulado por cAMP. Se ha propuesto que quizá constituya una variante del STRE, pero en todo caso nuestros datos indican que su regulación es independiente de *MSN2/4*, y por tanto su función podría ser distinta de la de las STRE. El segundo elemento descrito en *SSA3* es el HSE, capaz de mediar la inducción por choque térmico y ayuno por glucosa, como hemos indicado anteriormente (Tamai *et al.*, 1994).

En cuanto al defecto en la expresión de genes regulados por STRE en el doble mutante *msn2 msn4*, éste se produce en todas las condiciones de estrés estudiadas, lo que sugiere un papel general de *Msn2p* y *Msn4p* en la activación a través de STRE, y concuerda con el defecto en la tolerancia general a estrés que se produce en el mutante *Wmsn2msn4*.

Las funciones de *Msn2p* y *Msn4p* en la respuesta a estrés parecen ser parcialmente redundantes. Hemos encontrado defectos parciales en la tolerancia a estrés y en la transcripción STRE-dependiente en el mutante sencillo *msn2* (resultados no mostrados), pero en todos los casos el fenotipo del doble mutante *Wmsn2msn4* es más severo que el de cualquier mutante sencillo.

Una importante línea de evidencia que apoya el papel de *Msn2p* y *Msn4p* en la respuesta a estrés vía STRE la constituye el hecho de que la activación transcripcional de un gen reporter *LEU2-lacZ* regulado vía STRE está dramáticamente afectada en el mutante *Wmsn2msn4*. En el doble mutante, la expresión basal está reducida en un factor de 10 veces respecto a la cepa *W303-1A*, y no se produce ninguna inducción por choque térmico, ni

## Discusión

por bajo pH, sorbato, o altas concentraciones de etanol. En cambio, en células sometidas a estrés osmótico u oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o en células crecidas en medio rico con etanol como fuente de carbono (condiciones de desrepresión), aunque los niveles de expresión son inferiores en la cepa mutante, el factor de inducción es similar al de las células silvestres. Estos datos podrían apuntar a la presencia de otros factores necesarios para la inducción vía STRE en estas condiciones de estrés. Otra pregunta que cabe hacerse es si las diferentes condiciones de estrés que activan la inducción vía STRE lo hacen a través de una única ruta de transducción de señal, o si existen diferentes rutas. La implicación de la ruta HOG en la activación de STRE por estrés osmótico, pero no por otros tipos de estrés, parece indicar que la segunda opción es cierta, aunque no se puede descartar que existan otras rutas de señalización que sean comunes a varios estreses. La observación de que todavía existe inducción osmótica dependiente de la ruta HOG en un mutante *msn2 msn4* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996), apoya tanto la existencia de múltiples rutas en la inducción vía STRE como la posibilidad de que otros factores se unan a este mismo elemento.

La última línea de evidencia que apoya a Msn2p y Msn4p como los STRF es su capacidad de unirse *in vitro* e *in vivo* a estas secuencias.

En primer lugar, se han obtenido resultados *in vitro*. Utilizando Msn2p traducida *in vitro*, y Msn2p y Msn4p expresadas en *E.coli* como fusiones con GST, hemos demostrado que ambas proteínas son capaces de unirse específicamente a oligonucleótidos que contienen secuencias STRE. La unión no se observa, en cambio, en un oligonucleótido mutado en una sola base de la STRE, apoyando así la especificidad de la unión a este elemento. Tampoco se observa ninguna unión a un oligonucleótido que contiene el sitio de unión de Mig1p, contrariamente a lo que se había sugerido (Estruch y Carlson, 1993).

Además, se han obtenido evidencias de la unión al STRE de la proteína Msn2p presente en extractos totales de levadura. La presencia de Msn2p en los complejos DNA-proteína se ha demostrado mediante la unión de anticuerpos anti-Msn2p, y anticuerpos anti-myc, que reconocen un epitopo de la proteína myc, de mamíferos (Piatti *et al.*, 1996), incorporado en 9 copias en el extremo C terminal de Msn2p. Se ha demostrado la especificidad de la unión de esta proteína a la secuencia STRE, mediante competencia con oligonucleótidos silvestres y mutados en los elementos STRE.

En segundo lugar, los datos de *footprinting* apoyan la unión *in vivo* de estos factores a la secuencia STRE. En la cepa silvestre W303-1A, la metilación de las guaninas por DMS en las secuencias STRE de *HSP12*, *HSP26* y *HSP104* está protegida en células sometidas a estrés. Esta protección es dependiente de *MSN2/4*, puesto que desaparece cuando estas proteínas no están presentes (mutante *Wmsn2msn4*). Aunque en condiciones de no-estrés (crecimiento exponencial en YPD) ya se observa una ligera

protección de las STRE en la cepa silvestre, hay un claro aumento de la protección en condiciones de estrés, sugiriendo que la unión está regulada, y no es constitutiva como ocurre en el caso de la unión del HSF al HSE en *Saccharomyces cerevisiae*.

Todos los datos aportados apoyan la hipótesis de que Msn2p y Msn4p son los STRF (Factores de unión a STRE) largo tiempo buscados, aunque la existencia de inducción por choque osmótico en un doble mutante *Wmsn2msn4* puede indicar el requerimiento de otros factores, específicos de algunas de las condiciones de estrés que activan la STRE. En cualquier caso, el descubrimiento de factores transcripcionales que se unen específicamente a la STRE ha abierto ya el camino a análisis más detallados de las rutas que pueden transmitir las diferentes señales de estrés a este elemento.

Una pregunta que parece obvio hacerse, llegados a este punto, es por qué estos genes, implicados en la respuesta a estrés, fueron clonados como supresores en multicopia de un mutante termosensible *snf1*. Sobre todo si tenemos en cuenta que la proteína quinasa Snf1p no está, aparentemente, implicada en la regulación de STRE, ya que la activación inducida por estrés de STRE se produce también en mutantes *snf1* (C. Schüller y H. Ruis, observación no publicada). Hemos descrito como en la levadura la completa ausencia de fuente de carbono utilizable produce una parada metabólica que retrasa fuertemente la capacidad de utilizar rafinosa o galactosa como fuente de carbono. Nuestra sugerencia es que, durante esta crisis, que constituye una situación de estrés celular, la activación de genes de respuesta a estrés puede aumentar la resistencia celular, y este efecto sería facilitado por la sobre-expresión de *MSN2* y *MSN4*, incrementando la resistencia a esta situación de estrés y facilitando la superación de dichas condiciones, tanto a nivel transcripcional como traduccional y, posiblemente, metabólico.

### **Regulación de Msn2p y Msn4p. Conocimientos actuales y perspectivas**

Una cuestión importante, una vez determinado el/los factores que median la regulación de un sistema de inducción transcripcional es: ¿quién y cómo se regula al regulador? En nuestro caso, diversos estudios se han realizado en nuestro laboratorio y en el del Dr. Ruis, en Viena, que han aportado nuevas luces sobre los mecanismos por los que se regula la actuación de Msn2p. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en Msn2p, y no en Msn4p, porque todo parece indicar que Msn2p es el factor que lleva el peso principal en la inducción vía STRE. Como se ha mencionado, *MSN2* y *MSN4* son funcionalmente redundantes en el sentido de que el fenotipo del doble mutante es más acusado que el de los mutantes sencillos. No obstante, el mutante sencillo *msn2* muestra un grado moderado

## Discusión

de sensibilidad al estrés, y es parcialmente defectuosa la activación transcripcional vía STRE. Por el contrario, los fenotipos del mutante sencillo *msn4* y el de la cepa silvestre son indistinguibles en cuanto a sensibilidad a estrés e inducción dependiente de STRE. Estas observaciones son repetibles, y apoyan la idea de que Msn2p es el factor principal en la inducción vía STRE, mientras que el papel de Msn4p sería secundario, quizá actuando solamente en ausencia de Msn2p, al que no puede suplir totalmente.

¿Cómo se regula Msn2p en función del estrés? Sabemos que los niveles de mensajero de *MSN2* se mantienen constantes independientemente de las condiciones de estrés. Por tanto, cabe suponer que toda la regulación se da a nivel post-transcripcional.

Un posible punto de regulación sería la variación de la capacidad de unión al DNA de la proteína, en función de las condiciones de estrés. Este es el mecanismo de regulación del heat shock factor en mamíferos, donde es la presencia de un choque térmico lo que induce la trimerización y capacidad de unión al HSE. No ocurre así en *Saccharomyces cerevisiae*, donde la unión es constitutiva, y lo que varía es la capacidad de activación del factor, seguramente por cambios en el estado de fosforilación del mismo (Jakobsen y Pelham, 1988; Gross *et al.*, 1990). En el caso que nos ocupa, los ensayos de retardo en gel nos llevan a concluir que la afinidad de unión a DNA de Msn2p es independiente de las condiciones de estrés, al menos en las condiciones estudiadas. También podemos concluir que es independiente de Msn4p, ya que en una cepa que carece de dicha proteína, Msn2p es capaz de unirse a la STRE. Caso de que la unión se produjera en forma de multímero (por ejemplo un dímero), indicaría que Msn2p es capaz de unirse en forma de homodímero, aunque ello no excluiría que fuera capaz de formar heterodímeros con Msn4p, en el caso de encontrarse éste presente.

Como hemos indicado anteriormente, los ensayos de *footprinting in vivo* muestran que la protección de la STRE varía de forma dependiente del estrés por lo que concluimos que la unión no es constitutiva, como sucede con el HSF de *Saccharomyces*. Puesto que la afinidad de unión no parece estar afectada, una posible explicación es que la regulación se da a nivel de la localización celular del factor transcripcional.

Los estudios realizados por el grupo del Dr. Ruis demuestran que, en efecto, existe una regulación de la entrada al núcleo de Msn2p en función del estrés, que parece constituir el principal punto de regulación de este factor. Utilizando la versión de Msn2p que lleva el epítipo *myc9* (Piatti *et al.*, 1996) y que ha sido utilizada en los estudios de retardo en gel del presente trabajo, se ha seguido por inmunolocalización la presencia de Msn2p en la célula. También se ha podido seguir *in vivo* la presencia de Msn2p utilizando una versión que sustituye el epítipo *myc9* por la proteína fluorescente verde (*Green fluorescent protein* ó GFP). Ambas fusiones están además, bajo el control del promotor de *ADHI*, de levadura, puesto que la señal bajo el control del promotor nativo de *MSN2* era muy baja en



condiciones de no estrés. En células en condiciones óptimas de crecimiento se puede observar cómo la señal de Msn2p-myc9 ó Msn2p-GFP (por inmunofluorescencia indirecta, o fluorescencia directa, respectivamente), aparece distribuída difusamente por el citoplasma, y parcialmente excluída del núcleo. Tras someter a diversas condiciones de estrés, en todos los casos se observa una clara acumulación de la proteína en el núcleo, desapareciendo la señal citoplasmática. Por medio de la fusión con GFP se ha podido observar que la entrada al núcleo de Msn2p es rápida, y se revierte también rápidamente al eliminar las condiciones de estrés, produciéndose una exportación del núcleo al citoplasma. La translocación en ambos sentidos se puede producir en ausencia de síntesis de proteínas.

Además, se ha comprobado que la translocación al núcleo se realiza de forma dependiente de la proteína quinasa A y de los niveles de AMP cíclico. Es un hecho conocido que la ruta de la proteína quinasa A regula negativamente la inducción vía STRE, pero sigue sin conocerse el mecanismo por el cual se ejerce esta regulación. Görner y colaboradores proponen que la regulación por PKA podría ejercerse a través del control de la localización de Msn2p. En condiciones de baja actividad proteín quinasa A (mutante *bcy1 tpk1<sup>w</sup> tpk2 tpk3*) Msn2p se encuentra localizado constitutivamente en el núcleo, y en cepas en las que se puede inhibir la producción de cAMP interno y se añade cAMP exógeno, se observa que en presencia de cAMP la localización de Msn2p es citoplasmática, produciéndose un transporte al núcleo cuando se elimina el cAMP del medio. Por lo tanto, parece haber una clara relación entre la actividad de PKA, regulada a través de los niveles de cAMP, y la localización celular de Msn2p. Un hecho que queda por determinar es si el papel de PKA es directo o indirecto, para lo cual será necesario determinar si Msn2p está fosforilado por la proteína quinasa A. Existen datos que apoyan este hecho, pues se ha conseguido copurificar Msn2p y PKA en experimentos de coimmunoprecipitación (G. Griffioen, comunicación personal), indicando que ambas proteínas pueden interaccionar.

¿Cómo se regula la localización nuclear de Msn2p? Cabe esperar dos posibles modos de regulación: la localización nuclear puede ser el resultado de un mecanismo de importación dependiente del estrés, o bien acontecer como consecuencia de una exportación regulada. En los últimos años, se han descrito diferentes formas de control de la importación al núcleo de factores transcripcionales (Nigg, 1997), que podrían ser aplicables a este caso. Uno de los mecanismos descritos implica la retención del factor transcripcional en el citoplasma a través de un anclaje específico, por interacción con otra proteína. Este es el caso del factor NF- $\kappa$ B, que interacciona con I $\kappa$ B en el citoplasma (Baldwin, 1996). El hecho de que los estudios de localización de Msn2p se han realizado sobreexpresando la proteína, implicaría que, caso de ser este el tipo de regulación ejercido sobre

### Discusión

Msn2p, el factor citoplasmático regulador debería encontrarse en un gran exceso.

El segundo tipo de regulación del transporte al núcleo implica el bloqueo de las señales de importación al núcleo por medio de fosforilaciones. Algunos de estos casos han sido descritos en *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína Swi5p se expresa en la transición G2/M del ciclo celular, pero entra en el núcleo sólo durante la anafase tardía, cuando se inactivan las quinasas de ciclinas tipo B. Swi5p es fosforilado por la quinasa dependiente de ciclinas B (CDK-B) cerca de su señal de localización nuclear, y la ausencia de fosforilación permite la acumulación en el núcleo (Moll *et al.*, 1991; Nasmyth *et al.*, 1990). Otro factor, Pho4p, inductor de la respuesta a bajas concentraciones de fosfato, es fosforilado por un complejo ciclina-CDK, y esta fosforilación parece ser necesaria para su anclaje en el citoplasma (O'Neill *et al.*, 1996). Si éste es el modo de regulación de Msn2p cabría preguntarse cuáles son las posibles quinasas implicadas en este proceso. Una posible candidata, dada la estrecha relación entre su actividad y la localización de Msn2p, sería la proteína quinasa A. La fosforilación por PKA podría ser el hecho que impida el importe al núcleo de Msn2p. De hecho, se pueden encontrar varios sitios consenso para PKA cerca del dominio de unión al DNA de Msn2p, en una región que contiene varias áreas cargadas positivamente. Sin embargo, estas áreas carecen de homología con otras NLSs descritas.

Así pues, son aún muchas las incógnitas que quedan por despejar en este proceso, y que requerirán experimentos adicionales para su elucidación. Algunos de estos experimentos están siendo ya llevados a cabo, y quizá en poco tiempo podamos conocer nuevos datos sobre el mecanismo de regulación de Msn2p, el factor de unión a STRE. Este conocimiento puede tener múltiples implicaciones, no sólo sobre los estudios de la respuesta celular al estrés, sino también, por ejemplo, nos permitirá obtener información sobre cómo ejerce la proteína quinasa A su función reguladora sobre la expresión génica.

### **El bloqueo de la traducción por ausencia de glucosa. Posibles respuestas**

El punto de inicio de este estudio sobre la traducción fue la observación de que la expresión de invertasa se veía fuertemente retardada cuando se producía la desrepresión en ausencia total de glucosa. La utilización de rafinosa por la levadura depende de la actividad de la invertasa, que es codificada por el gen *SUC2*, regulado por represión por glucosa. A tiempos cortos tras el cambio a condiciones no represoras, la activación transcripcional de *SUC2* es similar en medio mínimo con rafinosa

y en rafinosa suplementada con una cantidad no represora de glucosa. Sin embargo, la actividad invertasa sólo se detecta durante las primeras horas en el medio que contiene glucosa. Nuestros resultados indican que la causa del retraso observado en la expresión de invertasa cuando la desrepresión se lleva a cabo en completa ausencia de glucosa es la inhibición de la traducción. En ausencia de una fuente de carbono metabolizable la tasa de incorporación de metionina en proteínas (tasa de traducción) es similar a la observada en presencia de cantidades inhibitorias de cicloheximida. La inhibición de la traducción es totalmente responsable de la ausencia de proteína, puesto que en presencia de glucosa el mismo nivel de mRNA produce cantidades detectables de proteína y actividad enzimática.

En las células eucarióticas, el factor de iniciación de la traducción  $2\alpha$  (eIF- $2\alpha$ ) ha sido implicado en la regulación de la traducción en respuesta a condiciones de estrés (Hinnebusch, 1993 y 1994). Factores adversos para el crecimiento celular, como la deficiencia de hemo, las infecciones virales, o la presencia de glutatión oxidado producen, en mamíferos, la fosforilación de eIF- $2\alpha$  en su serina 51, provocando una inhibición total de la síntesis proteica. En levadura se ha mostrado que la privación de aminoácidos activa a la proteína quinasa Gcn2p, que, a su vez, fosforila a eIF- $2\alpha$  también en la serina 51. Esta reacción tiene un efecto inhibitorio en la síntesis general de proteínas, que específicamente estimula la traducción de Gcn4p, un activador transcripcional de los genes biosintéticos de aminoácidos (Hinnebusch, 1994). Al contrario de lo que sucede en mamíferos, la parada de la traducción no es total. Además de la privación de aminoácidos, otras condiciones tienen un efecto sobre el estado de fosforilación de eIF- $2\alpha$ . Romero y Dahlberg (1986) han analizado el estado de fosforilación de eIF- $2\alpha$  en distintas condiciones de crecimiento, por electroforesis bidimensional. Se observa una forma fosforilada de la proteína durante el crecimiento logarítmico en fuentes de carbono fermentables y no-fermentables, choque térmico, ayuno de aminoácidos esenciales, fase estacionaria y esporulación. Solamente con aquellas células que fueron privadas de fuente de carbono, se aisló eIF- $2\alpha$  en estado no fosforilado.

Además, Feng *et al.*, (1994) han determinado que el estado normal de eIF- $2\alpha$  en la célula de levadura es una forma trifosforilada, en las serinas 292, 294 y 301. Esta triple fosforilación es dependiente de la caseína quinasa II. La mutación de los tres sitios de fosforilación de eIF- $2\alpha$  por caseína quinasa II no produce una parada del crecimiento por sí sola (no inhibe la traducción). Sólo cuando la desfosforilación de eIF- $2\alpha$  se combina con una disminución de la actividad de intercambio de nucleótido se observa una parada total de la traducción (Feng *et al.*, 1994). También en humanos se ha descrito que la fosforilación de la subunidad  $\epsilon$  de eIF-2B por caseína quinasa II produce una disminución de la actividad de este factor, y por tanto una disminución de la tasa de traducción. Así pues, vemos que hay ejemplos de

### Discusión

alteraciones de la tasa de traducción por cambios en el estado de fosforilación de alguno de los factores de iniciación de la traducción. Por lo tanto, no descartamos que la parada de la traducción debida a la privación brusca de glucosa pudiera deberse a un cambio en el estado de fosforilación de eIF-2 $\alpha$ , aunque éste no fuera causado por la quinasa Gcn2p, o en otro de los factores participantes en el inicio de la traducción. La observación de una forma totalmente desfosforilada en condiciones de ausencia de glucosa (Romero y Dahlberg, 1986), podría apuntar a la actuación de una fosfatasa sobre eIF-2 $\alpha$  como posible mecanismo causante de la parada de la traducción observada.

Independientemente del mecanismo por el que se efectúa el bloqueo de la traducción, la causa inicial de que este se produzca parece ser la incapacidad de la célula de obtener la energía necesaria para mantener el metabolismo celular, debido a la ausencia de una fuente de carbono utilizable. Así, la detección de una fuente de carbono no metabolizable, como es la 2-desoxiglucosa, no previene el bloqueo de la traducción.

Esto nos lleva a considerar cuáles pueden ser las causas que producen un bloqueo de la traducción más largo en el tiempo en la cepa Wmsn2msn4. Si la causa del bloqueo es la ausencia de glucosa en el medio, cabe pensar que uno de los primeros pasos será la movilización de las reservas celulares de glucosa, como es el glucógeno, o la síntesis de glucosa vía gluconeogénesis. La primera de estas vías, la movilización del glucógeno, depende del enzima glucógeno fosforilasa, codificado por el gen *GPHI*. Este es un gen dependiente de estrés, que se activa a través del elemento STRE, y cuya inducción es defectuosa, o en muchos casos nula, en el mutante Wmsn2msn4 (resultados no mostrados). Este, entre otros, podría ser un factor que alargue la parada de la traducción en el doble mutante. La expresión de diversos genes de respuesta a estrés puede ser necesaria para superar la situación adversa creada por el cambio de fuente de carbono y, como hemos comprobado, muchos de estos genes dependientes de estrés no se expresan, o lo hacen mínimamente, en Wmsn2msn4.

Aunque aún son muchas las incógnitas que quedan por despejar, consideramos que la descripción de este fenómeno de inhibición de la traducción en ausencia de glucosa es en sí importante. No hay que descartar que otras condiciones de estrés (aparte de la ya mencionada privación de aminoácidos) puedan producir un fenómeno similar en levadura. De hecho, el cambio a unas condiciones adversas para el crecimiento suele ir acompañada, en muchos casos, de una parada transitoria del crecimiento. Este es el caso, por ejemplo, del sometimiento a un choque osmótico o térmico de cierta magnitud. Cabría estudiar si la causa de la parada temporal del crecimiento es de nuevo un bloqueo de la traducción. Este hecho puede tener además, una importancia práctica, pues muy a menudo la inducción transcripcional se mide indirectamente por la actividad enzimática de un gen reporter. Esto puede conducir a error, ya que como nuestros resultados

muestran , la ausencia de actividad enzimática no siempre es sinónimo de la ausencia de transcripción.



**CONCLUSIONES**





1. La doble mutación *msn2 msn4* produce una sensibilidad pleiotrópica al estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Este aumento de la sensibilidad está relacionado con la expresión defectuosa de diversos genes implicados en la respuesta general al estrés. Los genes afectados están regulados por el Elemento de Respuesta a Estrés (STRE), que induce la transcripción de los mismos en respuesta a múltiples formas de estrés.
3. La expresión a través del elemento STRE requiere la presencia de los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p.
4. Msn2p y Msn4p se unen *in vitro* e *in vivo*, de forma específica al elemento STRE.
5. Los anteriores puntos nos llevan a concluir que Msn2p y Msn4p son los factores transcripcionales que regulan la inducción a través del elemento STRE, ó STRF.
6. La privación brusca de glucosa produce, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una parada transitoria de la traducción, pero no de la transcripción. La parada de la traducción se debe a la ausencia de una fuente de carbono utilizable para la obtención de energía metabólica.
7. Esta parada de la traducción no depende de la proteína quinasa Gcn2p ni de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M. y Prior, B.A. (1994) *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4135-4144.
- Alepuz, P.M., Cunningham, K.W. y Estruch, F. (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress activated *ENAI* gene. *Mol. Microbiol.* (en prensa).
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. y Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7915-7922.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. **1**. John Wiley and Sons, New York.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, **14**, 649-683.
- Belazzi, T., Wagner, A., Wieser, R., Schanz, M., Adam, G., Hartig, A. y Ruis, H. (1991) Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase (*CTT1*) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.*, **10**, 585-592.
- Bentley, N.J., Fitch, I.T. y Tuite, M.F. (1992) The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast*, **8**, 95-106.
- Bermingham-McDonough, O., Gralla, E.B. y Valentine, J.S. (1988) The copper,zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4789-4793.
- Bienz, M. y Pelham, H.R.B. (1987) Mechanisms of heat shock activation in higher eukaryotes. *Adv. Genet.*, **24**, 31-72.
- Birnboim, H.V., y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
- Bissinger, P.H., Wieser, R., Hamilton, B. y Ruis, H. (1991) Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T

*Bibliografía*

(*CTTI*) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.*, **10**, 585-592.

Blomberg, A. y Adler, L. (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.*, **33**, 143-212.

Boorstein, W.R. y Craig, E.A. (1990) Regulation of a yeast *HSP70* gene by a cAMP transcriptional control element. *EMBO J.*, **9**, 2543-2553.

Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. and Davis, R.W. (1979) Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, **8**, 17-24.

Bourret, R.B., Borkovich, K.A. y Simon, M.I. (1991) Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 401-444.

Boyer, J.S. (1982) Plant productivity and environment. *Science*, **218**, 443-448.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.

Brent, R. y Ptashne, M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, **43**, 729-736.

Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. y Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.

Bushman, J.L., Foiani, M., Cigan, A.M., Paddon, C.J., Hinnebusch, A.G. (1993) Guanine nucleotide exchange factor interactions between essential subunits GCD2, GCD6 and GCD7 and regulatory subunit GCN3. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4618-4631.

Butler, G. y Thiele, D.J. (1991) *ACE2*, an activator of yeast metallothionein expression which is homologous to *SWI5*. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 476-485.

Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeager, H., Lewis, W.H., Jones, C. y Housman, D.E. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, **60**, 509-520.

- Castilho-Valavicius, B., Yoon, H., y Donahue, T.F. (1990) Genetic characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* translational initiation suppressors *sui1*, *sui2* and *SUI3* and their effects on *HIS4* expression. *Genetic*, **124**, 483-495.
- Cigan, A.M., Bushman, J.L., Boal, T.R. y Hinnebusch, A.G. (1993) A protein complex of translational regulators of *GCN4* is the guanine nucleotide exchange factor for eIF-2 in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5350-5354.
- Cigan, A. M., Pabich, E.K., Feng, L. y Donahue, T.F. (1989) Yeast translation initiation suppressor *sui2* encodes the  $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2 and shares sequence identity with the human  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2784-2788.
- Celenza, J. y Carlson, M. (1984) Cloning and genetic mapping of *SNF1*, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 49-53.
- Christy, B., y Nathans, D. (1989) DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **86**, 8737-8741.
- Clos, J., Westwood, J.T., Becker, P.B., Wilson, S., Lambert, K. y Wu, C. (1990) Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. *Cell*, **63**, 1085-1097.
- Coblenz, A., y Wolf, K. (1994) The role of glutathione biosynthesis in heavy-metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol.Rev.*, **14**, 303-335.
- Cohen, G., Rapatz, W. y Ruis, H. (1988) Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTAI* gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 159-163.
- Cooper, J.A. (1994) MAP kinase pathways- straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr. Biol.*, **4**, 1118-1121.
- Coote, P.J., Cole, M.B. y Jones, M.V. (1991) Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may be triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1701-1708.

*Bibliografía*

- Costigan, C. y Snyder, M. (1994) *SLK1*, a yeast homolog of MAP kinase activators, has a RAS/cAMP-independent role in nutrient sensing. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 286-296.
- Craig, E.A. y Gross, C.A. (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 135-139.
- Craig, E.A. y Jacobsen, K. (1984) Mutations of the heat-inducible 70 kilodalton genes of yeast confers temperature sensitive growth. *Cell*, **38**, 841-849.
- Culotta, V.C, Joh, H.D., Lin, S.J., Slekar, K.H. y Strain, J. (1995) A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J. Biol. Chem.* **270**, 29991-29997.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. y Meyerowitz, E.M. (1993) Arabidopsis ethylene response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, **262**, 539-544.
- Cheng, L., Watt, R., y Piper, P.W. (1994) Polyubiquitin gene expression contributes to oxidative stress resistance in respiratory yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 358-362.
- Choo, Y. y Klug, A. (1994) Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11168-11172.
- Choo, Y., Sanchez-García, I. y Klug, A. (1994) *In vivo* repression by a site-specific DNA-binding protein designed against an oncogenic sequence. *Nature*, **372**, 642-645.
- Dameron, C.T., George, G.N., Arnold, P., Santhanagopalan, N., Winge, D.R. (1993) Distinct metal binding configurations in Ace1. *Biochemistry*, **32**, 7294-7301.
- Dever, T. E., Feng, L., Wek, R.C., Cigan, A.M., Donahue, T.F. y Hinnebusch, A.G. (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 $\alpha$  by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of *GCN4* in yeast. *Cell*, **68**, 585-596.
- Dever, T.E., Chen, J.J., Barber, G.N., Cigan, A.M., Feng, L., Donahue, T.F., London, I.M., Katze, M.G. y Hinnebusch, A.G. (1993) Mammalian eukaryotic initiation phactor 2 $\alpha$  kinases functionally substitute for GCN2



protein kinase in the *GCN4* translational control mechanism of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 4616-4620.

Díaz, M., Sánchez, Y., Bennett, T., Sun, C.R., Godoy, C., Tamanoi, F., Duran, A., Pérez, P. (1993) The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2*<sup>+</sup> gene codes for the  $\beta$  subunit of a geranyl-geranyl-transferase type I required for  $\beta$ -glucan synthesis. EMBO J., **12**, 5245-5254.

Dougherty, J., Puri, J. y Toft, D. (1984) Polypeptide components of two 8S forms of chicken oviduct progesterone receptor. J. Biol. Chem. **259**, 8004-8009.

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

Estruch, F. (1991) The yeast putative transcriptional repressor RGM1 is a proline-rich zinc finger protein. Nucleic Acids Res., **18**, 4873-4877.

Estruch, F. and Carlson, M. (1990) Increased dosage of the *MSN1* gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the SNF1 protein kinase. Nucleic Acids Res., **18**, 6959-6964.

Estruch, F. y Carlson, M. (1993) Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol., **13**, 3872-3881.

Evangelista, C.C., Rodríguez Torres, A.M., Limbach, M.P. y Zitomer, R.S. (1996) Rox3 and *RTS1* function in the global stress response pathway in bakers yeast. Genetics, **142**, 1083-1093.

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., **132**, 6-13.

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1984) Addendum. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., **137**, 266-267.

Feng, L., Yoon, H., y Donahue, T.F. (1994) Casein kinase II mediates multiple phosphorylation of *Saccharomyces cerevisiae* eIF-2 $\alpha$  (encoded by *SUI2*), which is required for optimal eIF-2 function in *S. cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., **14**, 5139-5153.

*Bibliografía*

Finley, D., Özkaynak, E. y Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperature, starvation and others stresses. *Cell*, **48**,1035-1046.

Flick, J.S., y Johnston, M. (1992) Analysis of URS<sub>G</sub>-mediated glucose repression of the *GALI* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **130**, 295-304.

François, J.M., Thompson-Jaeger, S., Skroch, J., Zellenka, U., Spevak, W. y Tatchell, K. (1992) *GACI* may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type I in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **11**, 87-96.

Frankenberg, D., Frankenberg-Schwagner, M., y Harbich, R. (1993) Mechanisms of oxygen radiosensitization in irradiated yeast. I. DNA double-strand breakage. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**, 511-521.

Gaber, R.F., Styles, C.A. y Fink, G.R. (1988) *TRK1* encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2848-2859.

Galcheva-Gargova, Z., Dérijard, B., Wu, I.-H. y Davis, R.J. (1994) An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science*, **265**, 806-808.

Galiazzo, F., Schiesser, A., y Rotilio, G. (1987) Glutathione peroxidase in yeast. Presence of the enzymes and induction by oxidative conditions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **147**, 1200-1205.

García, M. T., Cuesta, R. y Tamame, M. (1995). El Control General de la Biosíntesis de Aminoácidos en *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo de regulación de la expresión génica en levaduras. En: *Microbiología y genética molecular*. Casadesús, J., ed. Vol. **I**. Universidad de Huelva, Servicio de publicaciones. Págs. 305-326.

Garciadeblás, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 363-368.

Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F., Villalba, J.M. y Serrano, R. (1992) A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.*, **11**, 3157-3164.

Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R.L., Orkin, S.H., y Bruns, G.A.P. (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*, **343**, 774-778.

Gietz, R.D. y Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.

Gietz, D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., y Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, **11**, 355-360.

Goldstein, A. y Lampen, J.O. (1975)  $\beta$ -D-fructofuranoside fructohidrolase from yeast. *Methods Enzymol.* **42C**, 504-511.

Gounalaki, N. y Thireos, G. (1994). Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO J.*, **13**, 4036-4041.

Gralla, E.B., Thiele, D.J., Silar, P. y Valentine, J.S. (1991) ACE1, a yeast copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8558-8562.

Grant, C.M., Collinson, L.P., Roe, J. y 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.

Griggs, D.W. y Johnston, M. (1991) Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8597-8601.

Gross, D.S, English, K.E., Collins, K.W. y Lee, S. (1990) Genomic footprinting of the yeast *HSP82* promoter reveals marked distortion of the DNA helix and constitutive occupancy of heat shock and TATA elements. *J.Mol. Biol.*, **216**, 611-631.

Gross, C. y Watson, K. (1996) Heat shock protein synthesis and trehalose accumulation are not required for induced thermotolerance in derepressed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **220**, 766-772.

*Bibliografía*

Grossman, A.D., Erickson, J.W. y Gross, C.A. (1984) The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor for heat- shock promoters. *Cell*, **38**, 383-390.

Gustin, M.C., Davenport, K. y Sohaskey, M. (1995) Osmosensing signal transduction pathways. *Yeast*, **11**, S17.

Halliwell, B., y Gutteridge, J.M.X. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.

Hamer, D.H. (1986) Metallothionein. *Ann. Rev. biochem.*, **55**, 913-951.

Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L. y Ulevitch, R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, **265**, 808-811.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E.coli*. En "DNA cloning: a practical approach. Vol. I pp. 109-135. Ed. D. M. Glover. IRL Press, Oxford.

Harashima, S. y Hinnebusch, A.G. (1986) Multiple *GCD* genes required for repression of *GCN4*, a transcriptional activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3990-3998.

Hardie, D.G. (1994) Ways of coping with stress. *Nature*, **370**, 599-600.

Haro, R., Bañuelos, M.A., Quintero, F.J., Rubio, F. y Rodríguez-Navarro, A. (1993) Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plant*, **89**, 868-874.

Hartig, A., Ruis, H. (1986) Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTT1* gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *Eur. J. Biochem.*, **160**, 487-490.

Hershey, J.W.B. (1991a) Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 717-755.

Hershey, J.W.B. (1991b) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.*, **60**, 717-755.

Hertle, K., Haase, E. y Brendel. M. (1991) The *SNQ3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* confers hyper-resistance to several functionally unrelated chemicals. *Curr. Genet.*, **19**, 429-433.

Hinnebusch, A.G. (1984) Evidence for translational regulation of the activator of general amino acid control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6442-6446.

Hinnebusch, A.G. (1986) The general control of amino acid biosynthetic genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem.*, **21**, 277-317.

Hinnebusch, A.G. (1990) Transcriptional and translational regulation of gene expression in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, **38**, 195-240.

Hinnebusch, A.G. (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. En "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*. Volumen II. Gene expression. Strathern, J.N., Jones, E.W., y Broach, J.R., eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hinnebusch, A.G. (1993) Gene-specific translational control of the yeast *GCN4* by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Mol. Microbiol.*, **10**, 215-223.

Hinnebusch, A.G. (1994) The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. *Semin. Cell Biol.*, **5**, 417-426.

Hinnebusch, A.G., y Fink, G.R. (1983) Positive regulation in the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5374-5378.

Hinnebusch, A.G., Jackson, B.M., Mueller, P.P. (1984) Evidence for regulation of reinitiation in translational control of *GCN4* mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7279-7283.

Hirata, D., Harada, S., Namba, H. Miyakawa, T. (1995) Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 257-264.

Hoffman, C.S., y Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-272.

*Bibliografía*

Hussain, M. y Lenard, J. (1991) Characterization of *PDR4*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that confers pleiotropic drug resistance in high-copy number: identity with *YAP1*, encoding a transcriptional activator. *Gene*, **101**, 149-152.

Hzuka, N., Najita, L., Franzusoff, A., Sarnow, P. (1994) Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7322-7330.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., y Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.

Jakobsen, B.K. y Pelham, H.R. (1988) Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 5040-5042.

Jamieson, D.J. (1992) *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. *J. Bacteriol.*, **174**, 6678-6681.

Jamieson, D.J. (1995) The effect of oxidative stress on *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report*, **1**, 89-95.

Jamieson, D.J., Rivers, s. L. y Stephen, D.W.S. (1994) Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*, **140**, 3277-3283.

Joseph, L.J., Le Beau, M.M., Jamieson, G.A.J., Acharya, S., Shows, T.B., Rowley, J.D., y Sukhatme, V.P. (1988) Molecular cloning, sequencing, and mapping of *EGR2*, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7164-7168.

Jungmann, J., Reins, H., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D. y Jentsch, S. (1993) *MAC1*, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.*, **12**, 5051-56.

Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J. y Levin, D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes and Dev.*, **9**, 1559-1571.

- Kang, P.-J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A. y Pfanner, N. (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, **348**, 137-143.
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J. y Carlson, M. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, **68**, 709-719.
- Knight, S.A., Tamai, T.J., Kesman, D.J. y Thiele, D.J. (1994) Identification and analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* copper homeostasis gene encoding a homeodomain protein. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7792-7804.
- Ko, C.H., Buckley, A.M. y Gaber, R.F. (1990) *TRK2* is required for low affinity K<sup>+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **125**, 305-312.
- Kobayashi, N. y McEntee, K. (1990) Evidence for a heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6550-6554.
- Kobayashi, N. y 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.
- Koch, C., Schleiffer, A., Ammerer, G., y Nasmyth, K. (1996) Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at Start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes and Dev.*, **10**, 129-141.
- Kozak, M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.*, **108**, 229-241.
- Kuge, S., y 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. y 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. y Lindquist, S. (1986) An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oncogenesis. *Science*, **231**, 1154-1157.

*Bibliografia*

Lapinskas, P.J., Cunningham, K.W., Liu, X.F., Fink, G.R., y Culotta, V.C. (1995) Mutations in *PMRI* suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1382-1388.

Lee, K. y Levin, D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (*BCK1*) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 172-182.

Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R. y Charnay, P. (1988) Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4691-4695.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., y Shacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, **233**, 346-357.

Liberek, K., Galitsky, T.P., Zylick, M. y Georgopoulos, C. (1992) The DnaK chaperone modulates the heat shock response of *Escherichia coli* by binding to the  $\sigma^{32}$  transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3516-3520.

Lindquist, S. y Craig, E.A. (1988) The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631-677.

Lindquist, S. y Kim, G. (1996) Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5301-5306.

Liu, X.D. y Thiele, D.J. (1996) Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes and Dev.*, **10**, 592-603.

Liu, X.F. y Culotta, V.C. (1994) The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in *BSD2*, a novel metal homeostasis gene. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7037-7045.

Lin, S.J., y Culotta, V.C. (1995) The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen-toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3784, 3788.

London, I.M., Levin, D.H., Matts, R.L., Thomas, N.S.B., Petryshyn, R. y Chen, J.-J. (1987) Regulation of protein synthesis, p. 359-380. En: P.D. Boyer y E.G. Krebs (ed.), *The enzymes*. Academic Press, Inc., New York.



- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and it is interactive under osmotic stress. *EMBO J.*, **14**, 1360-1371.
- Madden, S.L., Cook, D.M., Morris, J.F., Gashler, A. Sukhatme, V.P. y Rauscher, F.J. (1991) Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science*, **253**, 1550-1553.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M. y Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245.
- Maeda, T., Takekawa, M. y Saito, H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, **269**, 554-558.
- Mager, W.H. y Varela, J.C.S. (1993) Osmostress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **10**, 253-258.
- Mager, W.H. y Moradas-Ferreira, P. (1993) Stress response of yeast. *Biochem. J.*, **288**, 1-13.
- Mager, W.H. y De Kruijff, A.J.J. (1995) Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 506-531.
- Marchler, G., Schüller, C., Agam, G. y 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.
- Márquez, J.A., y Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENAI* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.*, **382**, 89-92.
- Martínez-Pastor, M. T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. y 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.
- Martínez-Pastor, M. T. y Estruch, F. (1996) Sudden depletion of carbon source blocks translation, but not transcription, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **390**, 319-322.

*Bibliografía*

McClanahan, T., y McEntee, K. (1986) DNA damage and heat shock dually regulate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 90-96.

Merrick, W.C. (1992) Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.*, **56**, 291-315.

Metzger, D., White, J. y Chambon, P. (1988) The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature* **334**, 31-36.

Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.

Miller, J., McLachlan, A.D. y Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, **4**, 1609-1614.

Milbrandt, J. (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*, **238**, 797-799.

Moldave, K. (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 1109-1149.

Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H. y Nasmyth, K. (1991) The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell*, **66**, 743-758.

Moradas-Ferreira, P., Costa, V., Piper, P. y Mager, W. (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Mol. Microbiol.*, **19**, 651-658.

Morgan, B.A., Banks, G.R., Toone, W.M., Raitt, D., Kuge, S. y Johnston, L. H. (1997) The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **16**, 1035-1044.

Morimoto, R.I., Tissières, A. y Georgopoulos, C. (1990) *Stress Proteins in Biology and Medicine*, pp. 1-35. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Morimoto, R.I., Sarge, K.D. y Abravaya, K. (1992) Transcriptional regulation of the heat shock genes. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21987-21990.

- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M. y Lusty, C.J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene*, **45**, 299-320.
- Nasmyth, K., Adolf, G., Lydall, D. y Seddon, A. (1990) The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of SWI5 nuclear entry. *Cell*, **62**, 631-647.
- Nehlin, J.O., y Ronne, H. (1990) Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.*, **9**, 2891-2898.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M. y Ronne, H. (1991) Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.*, **10**, 3373-3377.
- Nigg, E. A. (1997) Nucleocytoplasmatic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, **386**, 779-783.
- Oh, S. y Sarnow, P. (1993) Translation initiation by internal ribosomal binding in gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Devel.*, **3**, 295-300.
- Ohtake, Y. y Yabuuchi, S. (1991) Molecular cloning of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 953-961.
- O'Neill, E.M., Kaffman, A., Jolly, R.J. y O'Shea, E.K. (1996) Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. *Science*, **271**, 209-212.
- Ota, I.M. y Varshavsky, A. (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, **262**, 566-569.
- Özkaynak, E., Finley, D. y Varshavsky, A. (1984) The yeast ubiquitin gene: Head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein. *Nature*, **312**, 663-666.
- Özkaynak, E., Finley, D. Solomon, M.J y Varshavsky, A. (1987) The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.*, **6**, 1429-1439.
- Parkinson, J.S. (1993) Signal transduction schemes of bacteria. *Cell*, **73**, 857-871.

*Bibliografía*

Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. y Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature*, **372**, 475-478.

Pavletich, N.P. y Pabo, C.O. (1991) Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science*, **252**, 809-817.

Perisic, O., Xiao, H. y Lis, J.T. (1989) Stable binding of Drosophila heat shock factor to head-to-head and tail-to-tail repeats of a conserved 5 bp recognition unit. *Cell*, **59**, 707-806.

Petko, L. y Lindquist, S. (1986) Hsp26 is not required for growth at high temperature, nor for thermotolerance, spore development, or germination. *Cell*, **45**, 885-894.

Piatti, S., Böhm, T., Cocker, J.H., Diffley, J.F.X. y Nasmyth, K. (1996) Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes and Dev.*, **10**, 1516-1531.

Piper, P.W. (1993) Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **11**, 339-355.

Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, **86**, 865-875.

Praekelt, U.M. y Meacock, P.A. (1990) *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.*, **223**, 97-106.

Pringle, J.R. y Hartwell, L.H. (1981) The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces*. Metabolism and gene expression (Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R., Eds.) pp. 97-142. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Reading, D.S., Hallberg, R.L. y Myers, A.M. (1989) Characterisation of the yeast *HSP60* gene coding for mitochondrial assembly factor. *Nature*, **337**, 655-659.

- Renoir, J.M., Buchou, T. y Baulieu, E.E. (1986) Involvement of a nonhormone-binding 90-kilodalton protein in the nontransformed 8S form of the rabbit uterus progesterone receptor. *Biochemistry*, **25**, 6405-6413.
- Rodríguez-Navarro, A. y Ramos, J. (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **159**, 940-945.
- Romero, D.P. y Dahlberg, A.E. (1986) The alpha subunit of initiation factor 2 is phosphorylated *in vivo* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.*, **6**, 1044-1049.
- Rose, M. y 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., Winston, F. y Hieter, P. (1990) *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Rothstein, R.J. (1983) One-step disruption in yeast. *Methods Enzymol.*, **101**, 202-210.
- Ruis, H. y Schüller, C. (1995) Stress signaling in yeast. *BioEssays*, **17**, 959-965.
- Sambrook, J., Fritsch, E. S. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, E., Housley, P. y Pratt, W. (1986) The molybdate-stabilized glucocorticoid binding complex of L-cells contains a 98-100 Kdalton nonsteroid-binding phosphoprotein that is part of the murine heat-shock complex. *J. Steroid Biochem.* **24**, 9-18.
- Sánchez, Y. y Lindquist, S.L. (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*, **248**, 1112-1115.
- Sánchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A. y Lindquist, S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.*, **11**, 2357-2364.
- Sánchez, Y., Parsell, D.A., Taulien, J., Vogel, J.L., Craig, E.A. y Lindquist, S. (1993) Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J. Bacteriol.* **175**, 6484-6491.

### Bibliografía

- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Scid. USA*, **74**, 5463-5467.
- Sarokin, L. y Carlson, M. (1985) Upstream region of the *SUC2* gene confers regulated expression to a heterologous gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2521-2526.
- Scharf, D.D., Rose, S., Zott, W., Schoff, F., y Nover, L. (1990) Three tomato genes code for heat stress transcription factors with a remarkable degree of homology to the DNA-binding domain of the yeast HSF. *EMBO J.*, **9**, 4495-4501.
- Schena, M. y Yamamoto, K.R. (1988) Mammalian glucocorticoid receptor derivatives enhance transcription in yeast. *Science*, **241**, 965-967.
- Schena, M., Picard, D. y Yamamoto, K.R. (1991) Vectors for constitutive and inducible gene expression in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 389-398.
- Scheutz, T.J., Gallo, G.J., Sheldon, L., Tempst, P. y Kingston, R.E. (1991) Isolation of a cDNA for *HSF2*: Evidence for two heat shock factor genes in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6911-6915.
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. y Lindquist, S. (1996) HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 289-296.
- Schmitt, A.P. y McEntee, K. (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5777-5782.
- Schnell, N. y Entian, K.D. (1991) Identification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* gene (*PARI*) conferring resistance to iron chelators. *Eur. J. Biochem.*, **200**, 487-493.
- Schüller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. y Ruis, H. (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element of the *Saccharomyces cerevisiae* *CTTI* gene. *EMBO J.*, **13**, 4382-4389.
- Schultz, J. y Carlson, M. (1987) Molecular analysis of *SSN6*, a gene functionally related to the *SNF1* protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4744-4756.

- Sewell, A.K., Yokoya, F., Yu, W., Miyagawa, T., Murayama, T. y Winge, D.R. (1995) Mutated yeast heat shock transcription factor exhibits elevated basal transcriptional activation and confers metal resistance. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25079-86.
- Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. (1986) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Siderius, M. y Mager, W.H. (1997) General stress response: in search of a common denominator. En *Yeast Stress Responses* (ed. S. Hohman y W.H. Mager), pp. 213-230. Landes, Austin.
- Silar, P., Butler, G., Thiele, D.J. (1991) Heat shock transcription factor activates transcription of the yeast metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1232-8.
- Slater, M.R. y Craig, E.A. (1987) Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1906-1916.
- Smith, B.J. y Yaffe, M.P. (1991) Uncoupling thermotolerance from the induction of heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11091-11094.
- Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Sorger, P.K., Lewis, M.J. y Pelham, H.R.B. (1987) Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature*, **329**, 81-84.
- Sorger, P.K. y Nelson, H.C.M. (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 heat shock response. *Cell*, **65**, 363-366.
- Spevak, W., Fessl, F., Rytka, J., Traczyk, A., Skoneczny, M. y Ruis, H. (1983) Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1545-1551.

### Bibliografía

Steels, E.L., Learmonth, R.P., y Watson, K. (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.*, **140**, 569-576.

Stephen, D.W.S., Rivers, S.L. y Jamieson, D.J. (1995) The role of the *YAP1* and *YAP2* genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **16**, 415-423.

Strain, J. y Culotta, V.C. (1996) Copper ions and the regulation of *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein genes under aerobic and anaerobic conditions. *Mol. Gen. Genetics*, **251**, 139-145.

Straus, D.B., Walter, W.A., y Gross, C.A.. (1987) The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of  $\sigma^{32}$ . *Nature*, **329**, 348-351.

Sukhatme, V.P., Cao, X., Chang, L.C., Tsai-Morris, C.H., Stamenkovich, D., Ferreira, P.C.P., Cohen, D.R., Edwards, S.A., Shows, T.B., Curran, T., Le Beau, M.M. y Adamson, E.D. (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell*, **53**, 37-43.

Susek, R.E. y Lindquist, S.L. (1989) Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the superfamily of small heat shock proteins but is without a demonstrable function. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 5265-5271.

Tamai, T.J., Liu, X., Silar, P., Sosinowski, T., y Thiele, D.J.(1994) Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 8155-8165.

Thiele, D.J. (1988) *ACE1* regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2745-2752.

Thiele, D.J. (1992) Metal regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1183-1191.

Thomas, B. J. y Rothstein, R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619-630.

Tilly, K., Spence, J. y Georgopoulos, C. (1989) Modulation of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor  $\sigma^{32}$ . *J. Bacteriol.*, **171**, 1585-1589.



Tissières, A., Mitchel, H.K. y Tracy, U. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol., **84**, 389-398.

Torres, L., Martin, H., García-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. y Nombela, C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. Mol. Microbiol., **5**, 245-2854.

Trollmo, C., Andre, L., Blomberg, A. y Adler, L. (1988) Physiological overlap between osmotolerance and thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett., **56**, 321-326.

Tsukiyama, T., Becker, P.B., Wu, C. (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. Nature, **367**, 525-532.

Van Loon, A.P.G.M., Pesold-Hurt, B., Schatz, G. (1986) A yeast mutant lacking mitochondrial manganese-superoxide dismutase is hypersensitive to oxygen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 3820-3824.

Varela, J.C.S., Van Beekvelt, C., Planta, R.J. y Mager, W.H. (1992) Osmostress-induced changes in yeast gene expression. Mol. Microbiol., **6**, 2183-2190.

Varela, J.C.S., Praekelt, U.M., Meacock, P.A., Planta, R.J. y 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.

Varela, J.C.S. y Mager, W.H. (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. Microbiology, **142**, 721-731.

Watt, R. y Piper, P.W. (1997) *UBI4*, the polyubiquitin gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is a heat shock gene that is also subject to catabolite derepression control. Mol. Gen. Genet., **253**, 439-447.

Welch, W.M. (1993) How cells respond to stress. Sci. Am., **268**, 5, 34-41.

Wemmie, J.A., Szczycka, M.S., Thiele, D.J., y 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.

*Bibliografía*

Werner-Washburne, M., Stone, D.E., y Craig, E.A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 2568-2577.

Werner-Washburne, M., Becker, J., Kosic-Smithers, J., y Craig E.A. (1989) Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J. Bact.*, **171**, 2680-2688.

Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G.C., Singer, R.A. (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **57**, 383-401.

Werner-Washburne, M., Braun, E.L., Crawford, M.E., Peck, V.M. (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **19**, 1159-1166.

Wiederrecht, G., Seto, D. y Parker, C.S., (1988) Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell*, **54**, 841-853.

Wieser, R., Adam, G., Wagner, A., Schüller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krawiec, Z. y Bilinski, T. (1991) Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTTI* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12406-12411.

Williams, N.P., Hinnebusch, A.G., y Donahue, T.F. (1989) Mutations in the structural genes for eukaryotic initiation factors 2 $\alpha$  and 2 $\beta$  of *Saccharomyces cerevisiae* disrupt translational control of *GCN4* mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **86**, 7515-7519.

Williams, F.E., Varanasi, U. Y Trumbly, R.J. (1991) The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3307-3316.

Winderickx, J., de Winde, J.H., Crauwells, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. y 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.

Woodford, D.V., Parish, J.H., y Moradas-Ferreira, P. (1995) Hydrogen peroxide induces DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, S49.

*Bibliografía*

Wu, A.L. y More-Rowley, W.S. (1994) *GSH1*, which encodes glutamylcysteine synthetase, is a target for yAP1 transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5832-5839.

Wu, A., Wemmie, J.A., Edgington, N.P., Goebel, M., Guevara, J.L., y More-Rowley, W.S. (1993) Yeast bZip proteins mediate pleiotropic drug and metal resistance. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18850-18858.

Xiao, H., y Lis, J.T. (1988) Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science*, **239**, 1139-1142.

Young, R.A. y Elliot, T.J. (1989) Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell*, **59**, 5-8.

Zhou, P., Szczycka, M.S., Sosinowski, T., y Thiele, D.J. (1992) Ace1 protein is a sensor for intracellular copper concentration and activates expression of metallothionein gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3766-3775.