

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
“Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre”

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

**CARACTERIZACIÓN DE DOS SISTEMAS DE
EXPRESIÓN EN LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*)
MEDIANTE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES CON
EL GEN REPORTERO *lacZ*.**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA
AGRÍCOLA**

PRESENTA

LYDIA GONZÁLEZ TRINIDAD

Chapingo, México. Octubre de 2006



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**CARACTERIZACIÓN DE DOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN EN
LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) MEDIANTE FUSIONES
TRANSCRIPCIONALES CON EL GEN REPORTERO *lacZ***

Tesis realizada por la **Ing. Lydia González Trinidad** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

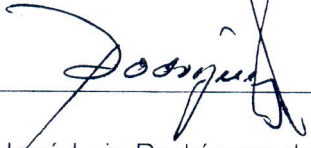
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



M.C. Edith del Rocío García Hernández

**CARACTERIZACIÓN DE DOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN EN
LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) MEDIANTE FUSIONES
TRANSCRIPCIONALES CON EL GEN REPORTERO *lacZ***

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de la **Ing. Lydia González**

Trinidad, autora de la presente tesis de Maestría en Ciencias en

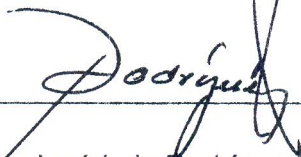
Biotecnología Agrícola, estuvo constituido por:

DIRECTOR:



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



M.C. Edith del Rocío García Hernández

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **Departamento de Fitotecnia** a través de la Coordinación Departamental de Postgrado en Biotecnología Agrícola por todas las facilidades prestadas durante mis estudios de Maestría.

Al **Dr. José Oscar Mascorro Gallardo** por la dirección del trabajo de investigación, por su apoyo, amistad, pero sobre todo por su paciencia.

Al **Dr. José Luis Rodríguez de la O** y a la **Dra. Edith del Rocío García Hernández** por su valiosa revisión, sugerencias y aportaciones realizadas al trabajo de investigación.

A la **M. C. María Elisa** y el **QFB. Ricardo** por su valioso apoyo dentro del Laboratorio de Biotecnología Agrícola, que más de una vez me ayudaron a salir de apuros.

A la **Sra. Celia García** por la amabilidad con la que siempre recibe a los estudiantes.

A mis **maestros** por sus aportaciones en mi formación profesional y a mis compañeros **Deysi y Guillermo**, por compartir el gusto de ser **la primera generación de la Maestría Ciencias en Biotecnología Agrícola 2004-2006**.

DEDICATORIA

A DIOS por permitirme alcanzar una meta de mi vida, por ser el guía de mi camino.

A mi esposo e hijo: Teódulo Ramírez Calvario y Jorge Octavio Ramírez González porque sobre todas las cosas, la meta que alcanzamos es parte del esfuerzo y trabajo.

A mis padres: Apolonio González Domínguez y Hortencia Trinidad Reyes, a ellos con mucho cariño y respeto. Porque de ellos he aprendido que con trabajo, esfuerzo y dedicación se construyen los sueños.

A mis hermanas y sobrino: Martha, Lorena, Josefina y Edgar Oswaldo por darme su apoyo incondicional, confianza y amistad, porque juntos hemos disfrutado de tristezas y alegrías. Agradezco y comparto esta meta con ellos.

DATOS BIOGRAFICOS

La autora de la presente tesis Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia **LYDIA GONZÁLEZ TRINIDAD**, es originaria del Municipio de Valle de Chalco, Solidaridad. Estado de México. Nació el 6 de Septiembre de 1979.

Realizó estudios de Educación Media Superior en la Preparatoria Anexa a la Normal de Chalco; posteriormente ingresó el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, donde realizó sus estudios de Educación Superior, cursando la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, de la que egreso en 2002.

En Agosto de 2004 ingresó a la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, formando parte, orgullosamente, de la primera generación 2004-2006.

ÍNDICE GENERAL

	Pag
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Biotecnología de la levadura y estrés.....	1
1.2. La levadura como hospedante para la expresión de genes.....	2
1.3. Represión catabólica por carbono.....	3
1.4. Regulación del ciclo celular por azúcares a través de la vía RAS/cAMP.....	5
1.5 El efecto del estrés en la expresión de genes de levadura.....	11
1.6 Genes heterólogos expresados en levadura.....	22
1.7 El gen y el promotor <i>CUP1</i>	24
1.8 El gen y el promotor <i>PMAl</i>	31
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1 Localización del sitio de experimentación.....	37
2.2. Material biológico empleado.....	37
2.3. Medios de cultivo para levadura.....	37
2.4. Construcción de la fusión transcripcional <i>CUP1::lacZ</i>	39
2.5. Construcción de la fusión transcripcional <i>PMAl::lacZ</i>	40
2.6. Transformación de la levadura con las construcciones.....	41
2.7 Estrategia experimental para analizar <i>CUP1::lacZ</i>	42
2.8 Estrategia experimental para analizar <i>PMAl::lacZ</i>	47
2.9 Determinación de la actividad β -galactosidasa en levadura.....	49

2.10	Análisis estadístico de los bioensayos	50
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1.	Fusión transcripcional <i>CUP1::lacZ</i>	51
3.1.1.	Inducción por cobre	51
3.1.2.	Efecto de la fuente de carbono	54
3.1.3.	Efecto de los distintos tipos de estrés sobre la transcripción de <i>CUP1</i>	60
3.1.3.1.	Estrés oxidativo	60
3.1.3.2.	Efecto de choque térmico	61
3.1.3.3.	Estrés osmótico y salino	62
3.2	Fusión transcripcional <i>PMA1::lacZ</i>	65
3.2.1.	Efecto de la fuente de carbono	65
3.2.2.	Efecto de los distintos tipos de estrés	67
3.2.2.1.	Efecto de pH	67
3.2.2.2.	Distintos tipos de estrés	68
3.2.2.3.	Estrés por NaCl	69
3.3	Comparación entre <i>CUP1</i> y <i>PMA1</i>	71
IV.	CONCLUSIONES	74
V.	LITERATURA CITADA	76
VI.	ANEXO 1	85
VI.	ANEXO 2	90

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Componentes de medio mínimo de levadura SD.....	37
2. Componentes del medio mínimo de levaduras SGAL.....	37
3. Componentes del medio mínimo de levaduras SGLY.....	38
4. Serie de tratamientos de estrés aplicados a la construcción pSAL5::lacZ.....	46
5. Serie de tratamientos de estrés aplicados a la construcción pRS5::lacZ.....	49
6. Comparación de las propiedades de los promotores <i>CUP1</i> y <i>PMA1</i>	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Represión catabólica en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
3. Características metabólicas de levadura en crecimiento exponencial o entrando a fase estacionaria.....	8
4. Componentes de la vía cAMP-RAS.....	11
5. Vías de producción y eliminación del glicerol.....	19
6. Elementos <i>cis</i> y <i>trans</i> involucrados en el control transcripcional del promotor <i>CUP1</i>	27
7. Elementos <i>cis</i> y <i>trans</i> involucrados en el control transcripcional del promotor <i>PMAL</i>	34
8. Mapa de restricción de pSAL5::lacZ.....	40
9. Mapa de restricción de pRS5::lacZ.....	40
10. Inducción por cobre de <i>CUP1</i> en la construcción pSAL5::lacZ.....	53
11. Efecto de la fuente de carbono sobre <i>CUP1</i> en pSAL5::lacZ.....	55
12. Inducción por fuente de carbono de <i>CUP1</i> en la construcción pSAL5::lacZ al medio de cultivo no se le añadió MES.....	58
13. Inducción por fuente de carbono de <i>CUP1</i> en la construcción pSAL5::lacZ al medio de cultivo se le añadió MES para amortiguar el pH.....	59
14. Inducción por estrés de <i>CUP1</i> en la construcción pSAL5::lacZ.....	61
15. Inducción por choque térmico de <i>CUP1</i> en pSAL5::lacZ.....	61
16. Efecto del estrés salino y osmótico sobre el promotor <i>CUP1</i> en la construcción pSAL5::lacZ.....	63

17. Efecto del NaCl sobre la expresión de <i>CUP1</i> en la construcción pSAL5:: <i>lacZ</i> .	64
18. Efecto de la fuente de carbono sobre <i>PMAl</i> en pRS5:: <i>lacZ</i> (1 y 2 horas).....	65
19. Inducción por fuente de carbono de <i>PMAl</i> en la construcción pRS5:: <i>lacZ</i> al medio de cultivo no se le añadió MES.....	66
20. Efecto de Ph en el promotor <i>PMAl</i> en la construcción pRS5:: <i>lacZ</i>	67
21. Inducción de <i>PMAl</i> por el estrés en la construcción pRS5:: <i>lacZ</i>	68
22. Efecto del NaCl sobre la expresión de <i>PMAl</i> en la construcción Prs5:: <i>lacZ</i>	70

**CARACTERIZACIÓN DE DOS SISTEMAS DE EXPRESIÓN EN LEVADURA
(*Saccharomyces cerevisiae*) MEDIANTE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES CON
EL GEN REPORTERO *lacZ***

RESUMEN

En este trabajo se caracterizó y comparó la regulación transcripcional de dos sistemas de expresión para levaduras: el *CUP1* que es inducible y de expresión moderada y el *PMA1* que es constitutivo y de expresión fuerte. Para lograr esto, se construyeron las fusiones transcripcionales *CUP1::lacZ* y *PMA1::lacZ* en los vectores monocopia pSAL5 y pRS5, que fueron introducidos en la levadura W303-1A que luego se sometió a diferentes tratamientos para registrar el comportamiento de ambos promotores mediante ensayos de β -galactosidasa. Se corroboró que el promotor *CUP1* es titulable por cobre y su máxima expresión se logró al adicionar 200 μ M de CuSO_4 y la inducción se detectó desde los 15 minutos. En experimentos de inducción a una y dos horas, *CUP::lacZ* redujo la expresión en medio con galactosa y glicerol, comparado con el medio con glucosa. Al mantener a los cultivos por todo el ciclo de crecimiento, el resultado fue a la inversa, ya que la mayor expresión se obtuvo en glicerol, luego en galactosa y en glucosa ocurrió una represión parcial. Diversos estreses en general redujeron la expresión del gen reportero a las dos horas de aplicado el tratamiento, pero el efecto fue más drástico en medio con LiCl o con H_2O_2 . Al crecer por todo el ciclo a la levadura con o sin NaCl, se observó un efecto de represión sobre la expresión del gen que se acentuó al transcurrir el ciclo de crecimiento. En la fusión *PMA1::lacZ*, al aplicar como fuente de carbono a glucosa, galactosa o glicerol, en cultivos en fase exponencial creciendo en glucosa, no se observó un descenso en la expresión. En experimentos con las mismas fuentes de carbono por todo el ciclo de cultivo, se obtuvo mayor expresión en glicerol, luego en galactosa y finalmente en glucosa, lo cual no concuerda con reportes de la literatura. Al aplicar diferentes tipos de estrés como choque térmico, frío, estrés osmótico y oxidativo, el efecto fue muy leve hasta las dos horas.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, β -galactosidasa, *CUP1*, *PMA1*.

**CHARACTERIZATION OF TWO SYSTEMS OF EXPRESSION IN YEAST
(*Saccharomyces cerevisiae*) BY MEANS OF TRANSCRIPTIONAL FUSIONS
WITH THE REPORTER GENE *lacZ***

ABSTRACT

In this work the transcriptional regulation was characterized for two yeast expression systems: *CUP1* which is inducible and with moderate expression and *PMA1*, which is constitutive and with strong expression. To accomplish this, *CUP1::lacZ* and *PMA1::lacZ* transcription fusions were constructed in the monocopy vectors pSAL5 and pRS5 and transformed in yeast strain W303-1A, and then submitted to different treatments. The behavior of the promoters expression were recorded through β -galactosidase assays. Our results corroborated that *CUP1* is tritable by copper and the higher expression was obtained with 200 μ M CuSO₄. The induction was at least in 15 minutes. In experiments with one to two hours of induction, *CUP::lacZ* reduced expression in media with galactose and glycerol, compared with glucose. When the culture were maintained for all growth cycle, the result was the opposite, because the higher expression was obtained upon glycerol, then in galactose, and finally in glucose the gene was partially repressed. Several kind of abiotic stresses reduced the expression on reporter gene after two hours of treatment, but the inhibition was higher when the media contained LiCl or H₂O₂. When the yeast was growth with or without NaCl, a repression on the gene occurred, that was higher when the culture become older. With the *PMA1::lacZ* fusion, when glucose, galactose or glycerol were added as carbon source, the expression were similar. In long term experiments with the same carbon sources, the expression was higher in glycerol, then in galactose and was lower in glucose, which is not according previous reports. When the yeast was submitted to several abiotic stresses as heat shock, cold, osmotic and oxidative stress, the effects were little after two hours of treatment.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, β -galactosidase, *CUP1*, *PMA1*

RELACION DE GENES Y PROTEÍNAS DE LEVADURA MENCIONADOS EN ESTE TRABAJO

GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADOS EN LA VÍA PRINCIPAL DE REPRESIÓN CATABÓLICA EN LEVADURA

Genes involucrados en esta vía

<i>HXT1</i>	Transportador de glucosa de baja afinidad
<i>HXT2</i>	Transportador de glucosa de alta afinidad
<i>HXT1-20</i>	Transportador de hexosas de alta y baja afinidad
<i>SNF3</i>	Sensor de glucosa de alta afinidad
<i>RGT2</i>	Sensor de glucosa de baja afinidad
<i>HXK1</i>	Hexocinasa 1
<i>HXK2</i>	Hexocinasa 2
<i>GLK1</i>	Glucocinasa
<i>REG1 (HEX2)</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Glc7
<i>REG2</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Glc7
<i>GLC7 (CID1)</i>	Subunidad catalítica de cinasa 1 de serina/treonina
<i>SNF1 (CAT1)</i>	Cinasa de serina/treonina para la des-represión catabólica por carbono
<i>SNF4 (CAT3)</i>	Proteína regulatoria de la cinasa Snf1
<i>GAL83</i>	Proteína para la represión catabólica por glucosa
<i>SLP1</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Snf1
<i>SLP2</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa Snf1
<i>TUP1</i>	Proteína que se asocia a Ssn6 y a Mig1 para reprimir genes
<i>SSN6 (CYC8)</i>	Proteína asociada a Tup1 y al represor Mig1
<i>MIG1</i>	Represor activo defosforilado bajo crecimiento en glucosa
<i>GRR1</i>	Proteína que podría reclutar al represor Rgt1 para ser ubiquitinado
<i>RGT1</i>	Represor de la transcripción para genes <i>HXT</i>
<i>SKP1</i>	Proteína participante en el complejo de ubiquitinación SCF

<i>CDC53</i>	Proteína participante en el complejo SCF
<i>CDC34 (UBC3)</i>	Enzima conjugada de ubiquitinación de SCF
<i>SCF</i>	Complejo de ubiquitinación constituido por las proteínas Skp1, Cdc53, Cdc34 y una proteína con una caja F

Genes que se reprimen a través de esta vía

<i>SUC2</i>	Invertasa que se reprime en presencia de glucosa o de glicerol
<i>FBP1</i>	Enzima gluconeogénica cuya expresión es reprimida por glucosa
<i>ADH2</i>	Alcohol deshidrogenada reprimida la expresión por glucosa
<i>CYC1</i>	Iso-1-citocromo c, cuyo gen es reprimido por glucosa
<i>GAL4</i>	Activador de genes <i>GAL</i> que es reprimido por Mig1 bajo glucosa

**GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADOS EN EL SENSADO, LA
TRANSDUCCIÓN Y LA RESPUESTA A GLUCOSA A TRAVÉS DE LA VIA
RAS/cAMP**

Genes involucrados directa o indirectamente en esta vía

<i>GPR1</i>	Putativo receptor de glucosa
<i>GPA2</i>	Proteína G que une GTP
<i>RGS2</i>	Regulador negativo que activa la función GTPasa de Gpa2
<i>RAS1,2</i>	Proteína G que une GTP pero no se trimeriza
<i>IRA1,2</i>	Proteínas que activan la función GTPasa de Ras
<i>CDC25</i>	Intercambiador de Ras de GTP/GDP
<i>SDC25</i>	Intercambiador de Ras de GTP/GDP
<i>HXK1</i>	Hexocinasa 1
<i>HXK2</i>	Hexocinasa 2
<i>GLK1</i>	Glucocinasa 1
<i>HXT1-20</i>	Transportadores de hexosas de alta y baja afinidad
<i>CYR1</i>	Adenilato ciclasa
<i>CAP1(SRV2)</i>	Proteína asociada a la adenilato ciclasa Cyr1

<i>PDE1</i>	Fosfodiesterasa de alta afinidad de cAMP
<i>PDE2</i>	Fosfodiesterasa de baja afinidad de cAMP
<i>BCY1</i>	Subunidad regulatoria de la cinasa PkA
<i>TPK1,2,3</i>	Subunidades catalíticas de la cinasa PkA
<i>SCH9</i>	Cinasa que inhibe la actividad de PkA
<i>YAK1</i>	Cinasa de serina/treonina involucrada en el ciclo celular
<i>SOK2</i>	Proteína regulatoria de la vía Pka
<i>MSN2,4</i>	Factores de transcripción regulados por la vía HOG(+) y por Pka(-)
<i>RIM15</i>	Cinasa regulada negativamente por fosforilación de PkA

GENES QUE SE REPRIMEN EN ESTA VÍA DE GLUCOSA, Y QUE TAMBIEN SE ACTIVAN EN FASE ESTACIONARIA Y POR ÉSTRES ABIOTICO

<i>HSP12</i>	Proteína de choque térmico
<i>HSP26</i>	Proteína de choque térmico
<i>CTT1</i>	Catalasa T citosólica
<i>GLC3</i>	Enzima ramificadota de 1,4-glucano (síntesis de glicógeno)
<i>GAC1</i>	Subunidad regulatoria de la fosfatasa 1 de serina/treonina
<i>UB14</i>	Ubiquitina
<i>ADH2</i>	Alcohol deshidrogenada II
<i>SSA3</i>	Proteína de choque térmico de 70 kD citosólica
<i>TPS1</i>	Trehalosa 6-fosfato sintetasa (subunidad de 56 kD)
<i>TPS2</i>	Trehalosa 6-fosfato fosfatasa (subunidad de 105 kD)
<i>TPS3</i>	Subunidad regulatoria del complejo Tps (115 kD)
<i>TSL1</i>	Subunidad regulatoria del complejo Tps (123 kD)
<i>HSP104</i>	Proteína de choque térmico

ALGUNOS DE LOS GENES QUE SE INDUCEN POR GLUCOSA

<i>NTH1</i>	Trehalasa neutra citoplásmica
<i>CLN3</i>	Ciclina específica para las fases G1/S de la división celular

<i>CYC7</i>	Isoforma 2 del citocromo C
<i>PDC1</i>	Subunidad α de la piruvato descarboxilasa
<i>ENO2</i>	Enolasa II (2-fosfoglicerato dehidrogenasa)
<i>PGK1</i>	Fosfoglicerato cinasa
<i>ADH1</i>	Alcohol deshidrogenada I
<i>PYK1</i>	Piruvato cinasa
<i>PKK2</i>	6-fosfofructo-2-cinasa
<i>HKT</i>	Transportadores de hexosas

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Biotecnología de la levadura y estrés

Todos los organismos vivos crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales. Éstas varían en el medio ambiente en el espacio y el tiempo alejándose muchas veces de las condiciones óptimas para el crecimiento y reproducción del organismo. El ambiente es un factor determinante en la evolución de los organismos, pues induce la selección de mecanismos que inducen su supervivencia y adaptación a variaciones del mismo. Para lograr este objetivo han adaptado estrategias para modificar su metabolismo, sus programas de diferenciación o regular su velocidad de crecimiento para sobrevivir en condiciones adversas. Por lo general, durante los periodos de crecimiento activo las células son susceptibles al estrés, mientras que en periodos quiescentes son resistentes.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Las células de levadura pueden someterse a varios tipos de estrés, tanto en situaciones naturales como durante procesos industriales. El daño provocado por el estrés como la respuesta de la levadura al mismo, depende del tipo y magnitud del

mismo, así como del estado de desarrollo de la levadura al momento en que ocurre el estímulo.

Para enfrentar situaciones desfavorables, la levadura sintetiza moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. Entre las mejor caracterizadas en esta respuesta están las llamadas "proteínas de estrés". Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta

1.2. La levadura como hospedante para la expresión de genes

La utilidad de cualquier sistema de expresión es limitada en los eucariotes, debido a diferencias en la estructura y el procesamiento de la información genética. Aún cuando la bacteria *E. coli* constituye un magnífico sistema para la expresión de genes heterólogos, la levadura como un organismo eucariote, también ha jugado un papel importante en el desarrollo de los sistemas de expresión heteróloga. Las principales características del sistema levadura son las siguientes: a) a diferencia de *E. coli*, las proteínas producidas carecen de endotoxinas, b) en algunos casos, los productos elaborados en la levadura poseen mayor actividad biológica que los expresados en *E. coli*, c) la levadura es capaz de incorporar modificaciones post-traduccionales como la miristilación, la acetilación de extremos amino terminales, y el procesamiento proteolítico,

indispensables para que el producto posea actividad biológica, y d) las proteínas heterólogas secretadas por cepas de levadura especialmente diseñadas son de fácil recuperación del medio de cultivo. Vale la pena mencionar que la primera vacuna humana aprobada obtenida por las técnicas de ADN recombinante, y el primer producto para uso alimenticio, la renina, fueron producidos en levadura (Jones *et al.*, 1992; Mellor *et al.*, 1983). Ello ha justificado el desarrollo de herramientas moleculares necesarias para utilizar a la levadura como sistema de expresión heterólogo, exitoso en el análisis funcional de genes de animales y plantas.

1.3. Represión catabólica por carbono

El termino represión catabólica de carbono se refiere a un circuito regulatorio activado por una fuente de carbono preferencial que controla la expresión de genes cuando una fuente de carbono fermentable esta presente. La glucosa tiene dos efectos principales en la expresión de los genes de levadura: reprime la expresión de genes, que incluyen los que codifican enzimas de la vía respiratoria, y regulatorias con la utilización de fuentes otras fuentes de carbono como galactosa y maltosa. Además induce la expresión de genes que se requieren para la utilización de la glucosa, como las enzimas glicolíticas y los transportadores de glucosa (De Winde *et al.*, 1997) (Figura 1).

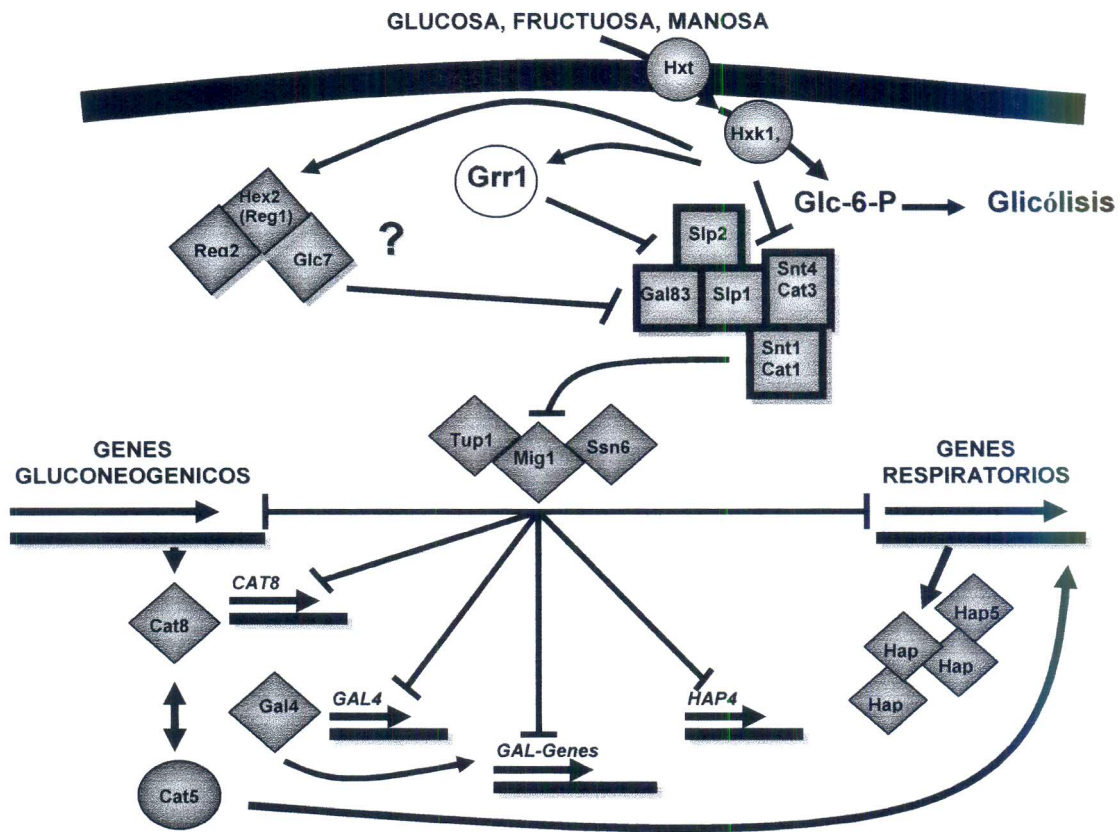


Figura 1. Represión catabólica en *Saccharomyces cerevisiae*.

La represión por glucosa afecta principalmente la síntesis de dos grupos de enzimas: el primero contiene aquellas específicas para la gluconeogénesis fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp) y la fosfoenolpiruvato carboxicinas (Pck1), junto con las enzimas del ciclo del glicoxalato, como la isocitrato liasa (Icl1). La síntesis de estas enzimas es muy sensible a la presencia de glucosa, lo cual evita la ocurrencia simultánea de la glicólisis y la gluconeogénesis (Yin *et al.*, 1996; Ronne, 1995). El segundo grupo está representado por las enzimas del ciclo de KREBS y la respiración en general, que no se requieren durante el crecimiento fermentativo (De Winde *et al.*, 1997). Una vez que la levadura establece su preferencia por la utilización de glucosa dejan de producirse

proteínas involucradas en el consumo y metabolización de fuentes de carbono alternas como la galactosa y la maltosa, (Trumbly, 1992; De Winde *et al.*, 1997).

1.4. Regulación del ciclo celular por azúcares a través de la vía de transducción RAS/Camp

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* enfrenta diversas condiciones medioambientales regulando de manera coordinada el crecimiento, el progreso del ciclo celular y las actividades metabólicas (De Winde *et al.*, 1997). En *S. cerevisiae* la disponibilidad de nutrientes es verificada dentro de un estrecho rango en la fase G₁ del ciclo de división celular (Figura 2).

Los primeros eventos que dan lugar a un nuevo ciclo de proliferación (Inicio A) son ejecutados cuando el suministro de nutrientes es suficiente. Cuando hay cantidades limitadas de cierto nutriente provoca que las células permanezcan temporalmente en G₁ mientras reprograman el metabolismo para la utilización de algún nutriente alternativo disponible. Cuando las células experimentan una inanición definitiva por carencia de uno o más nutrientes, entran a una fase estacionaria llamada G₀ distinta de G₁.

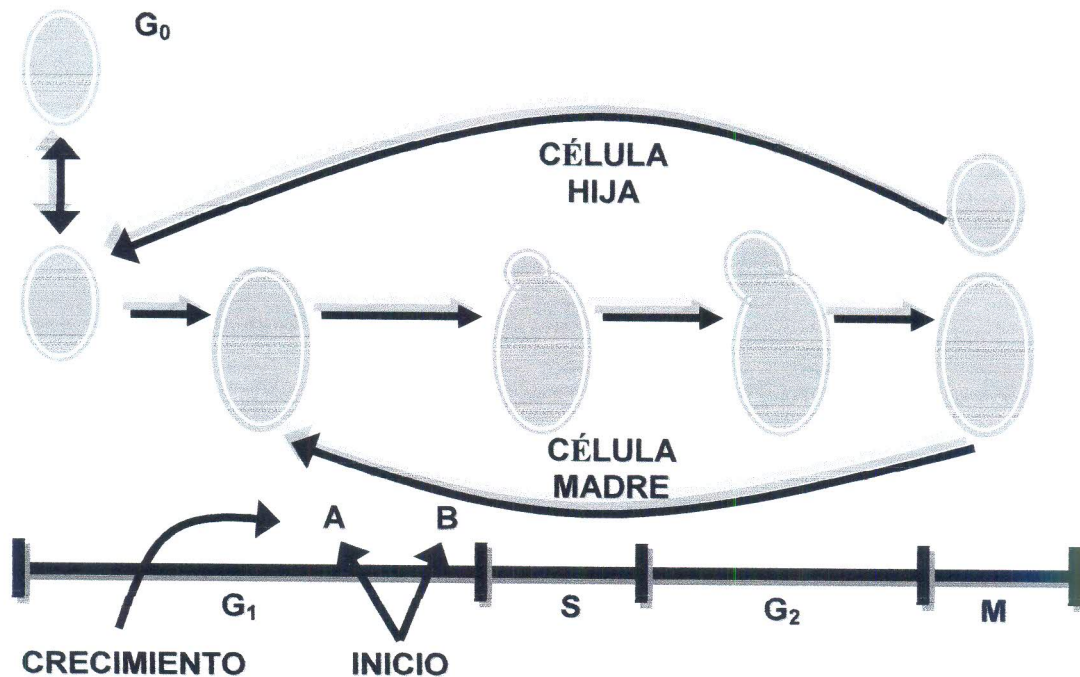


Figura 2. Ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. La proliferación de células de levadura experimenta varias fases de desarrollo, G_1 (gap1), S (síntesis de ADN), G_2 (gap2) y M (división celular mitótica), cada una definida cuando una célula madre inicia una nueva ronda de proliferación, resultando en la descarga de una nueva hija. El último crecimiento continuo en G_1 hasta alcanzar el tamaño celular requerido para iniciar un nuevo ciclo celular. Las diferencias en tamaño entre células madre e hija es pronunciado en un rápido crecimiento, en cultivo fermentativo. El inicio de Inicio en G_1 es separado en dos fases: Inicio A que es el punto de control de nutrientes y crecimiento y en Inicio B que es el punto de replicación y proliferación. Cuando uno o mas nutrientes esenciales del medio de crecimiento es insuficiente las células entran en un estado quiescente fuera del ciclo conocido como G_0 . Cuando los nutrientes están disponibles, las células reanuda el crecimiento a el Inicio A.

Es importante hacer notar que el sensado de nutrientes y la regulación del crecimiento están restringidos a la fase G_1 del ciclo celular, también en otras especies de levaduras como *S. pombe*. antecedentes experimentales muestran que el sensado de nutrientes, la vía de transducción de señales y las rutas de regulación metabólicas involucradas están bien conservadas entre diversas especies eucarióticas (De Winde *et al.*, 1997).

Las células de levadura que carecen de algún nutriente esencial y que entran en fase estacionaria muestran A) acumulación elevada de carbohidratos de reserva (trehalosa y glicógeno), B) activación de genes de control de STRE (Stress Responsive Element) como *CTT1* y *SSA3*, c) represión de proteínas ribosomales, D) resistencia general a estrés E) elevada termotolerancia y F) una alta resistencia de la pared celular a enzimas líticas. Estas características no son muy diferentes de las que muestran las células que se encuentran en crecimiento exponencial en una fuente de carbono no fermentable (Figura 3).

Está podría ser una razón de que la respuesta general y las consecuencias metabólicas de la inanición de nutrientes y la resuplementación nutricional no son han sido muy estudiadas en levadura que crecen en fuentes de carbono no fermentables. Sin embargo las diferencias entre células desprovistas de nutrientes y las células en crecimiento exponencial en un azúcar muy rápidamente fermentable están muy marcadas por las características mencionadas.

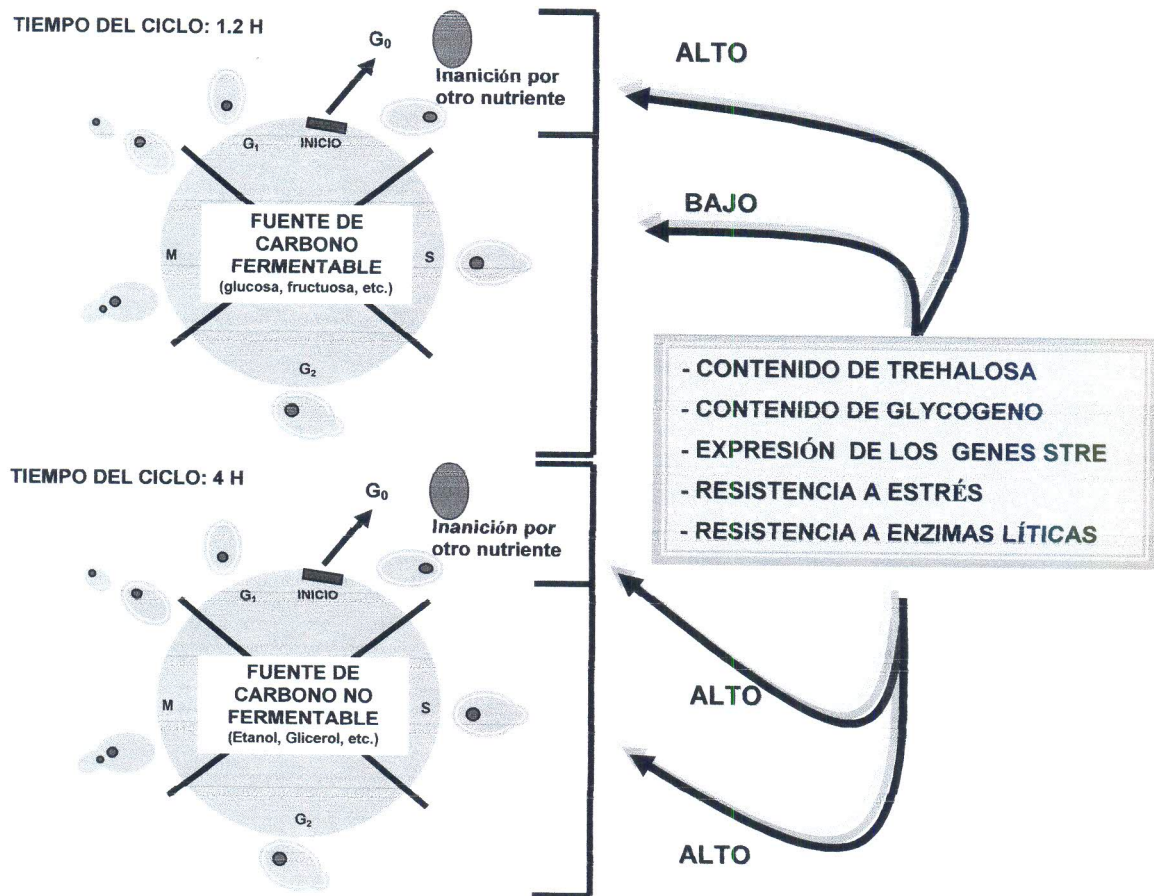


Figura 3. Características metabólicas de células de levadura en crecimiento exponencial o entrando a fase estacionaria, en fuentes de carbono fermentables y no fermentables. Una inanición severa y características ligadas a estrés de *Saccharomyces cerevisiae* se indican en el cuadro, solo están ausentes en células que se encuentran en crecimiento exponencial en fuentes de carbono fermentables.

La vía cAMP-RAS es esencial para el control e integración de estos procesos en particular con respecto a el nivel nutricional. La reprogramación drástica del metabolismo a una transición diáuxica cuando la glucosa es limitada, así como algunas adaptaciones subsecuentes durante la fase post-diáuxica, cuando las células crecen de manera respiratoria en etanol, y durante la entrada a la fase estacionaria, son controlados de manera negativa por la vía RAS/cAMP. Así las células con una elevada actividad de la proteína cinasa A (cPka) dependiente de cAMP, suspenden a acumulación de carbohidratos de reserva, durante la

transición diáuxica y la detención de G₁ por la falta de nutrientes. Por ello esas células son altamente sensibles a estrés por calor y rápidamente pierde viabilidad en la fase estacionaria. En contraste, las células deficientes en cPka muestran cambios fisiológicos asociados con la falta de nutrientes, como la detención de la fase G₁ del ciclo celular, la acumulación de carbohidratos de reserva y un incremento en la resistencia a calor y estrés oxidativo (Pedruzzi *et al.*, 2000).

Una de las principales evidencias de la activación de esta vía (RAS/cAMP) por azúcar fermentable, es el incremento transitorio en los niveles de cAMP y la inmediata activación de las cinasa Pka minutos después de la adición de glucosa. La concentración de cAMP se incrementa alrededor de cinco veces más en un tiempo de aproximadamente un minuto para luego descender de inmediato y abruptamente a un nivel igual o ligeramente superior al prevalente cuando no hay glucosa en el medio (Thevelein y De Winder, 1999). Dado este ligero incremento, se ha sugerido que los niveles de cAMP podrían participar en el mantenimiento del estado de represión catabólica (Gancedo, 1998). Además esta vía solo es activa cuando hay una concentración de glucosa superior a 15 mM, lo cual permite una rápida transición hacia el metabolismo fermentativo sólo cuando hay suficientes azúcares disponibles para activarla y en última instancia, para adaptar el crecimiento con la disponibilidad de nutrientes (Thevelein, 1994).

EL nivel intracelular de cAMP es el resultado de la síntesis y degradación y este equilibrio es importante para el desarrollo de las levaduras y para adaptarse rápidamente al crecimiento en glucosa. La síntesis la lleva a cabo la adenilato ciclasa codificada por *CYR1/CDC35* y su proteína bifuncional asociada Cap/Srv2, cuyo extremo amino parece interaccionar con la proteína RAS. Por otra parte, la degradación del cAMP ocurre vía fosfodiesterasas de baja y alta afinidad codificadas respectivamente por *PDE1* y *PDE2*. La delección de *PDE1*, incrementó Los niveles de cAMP después de la adición de glucosa o bajo acidificación intracelular Y suprimió el incremento de cAMP inducido por glucosa o por acidificación intracelular, por ello se ha sugerido que *PDE1* está específicamente involucrada en la señalización por estos antagonistas. Además la fosfodiesterasa *PDE1* activada rápidamente por la fosforilación al incorporar glucosa a un cultivo de levaduras que habían crecido en glicerol. Finalmente, se sabe que Tpk, la subunidad catalítica de PkA (proteína kinasa A), ejerce una fuerte inhibición sobre la síntesis de cAMP, el mecanismo propuesto consiste en la activación por fosforilación de la fosfodiesterasa *Pde1* por Tpk, la subunidad catalítica activa de PkA (De Winder *et al*, 1997).

Antecedentes experimentales señalan que la tolerancia de *S. 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 Werner-Washburne *et al*, 1996). Por ejemplo, células crecidas en acetato son más tolerantes al calor que las crecidas en glucosa, pero en cambio

acumulan menos trehalosa (Gross *et al.*, 1996). La relación entre estrés y condiciones de crecimiento se explica parcialmente, por el hecho de que la ruta de señalización Ras-PkA (Figura 4), 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).

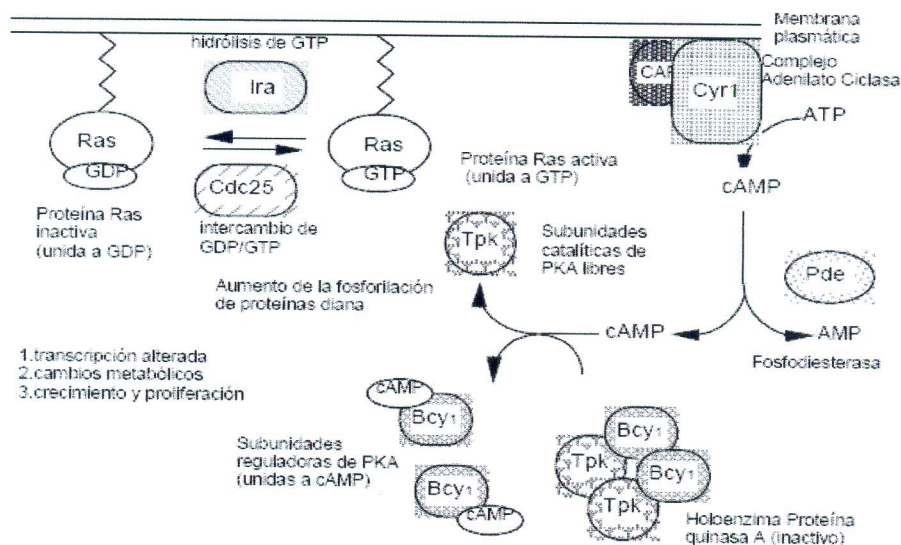


Figura 4. Componentes de la vía cAMP-RAS (Fuente: Martínez-Pastor, 1997).

1.5. El efecto del estrés en la expresión de genes en levadura

Uno de los primeros eventos que se producen tras la exposición a diferentes condiciones de estrés, es el aumento en la producción de trehalosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido), disacárido que actúa como osmoprotectante (Mackenzie *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1991). Al mismo tiempo, se activan sistemas de señalización que producirán inducen la producción de

proteínas adecuadas para responder al estrés (Mager y Moradas-Ferreira, 1993; Mager y de Kruijff, 1995). Además de la producción de proteínas de respuesta específica a un tipo de estrés, también se sintetizan otras generales inducidas por un amplio rango de estreses, cuya función es útil para la célula en muy diferentes condiciones. Los diferentes agentes estresantes pueden causar efectos similares en la célula, cómo la desnaturalización de proteínas, La alteración de membranas, el daño al DNA o la aparición de agentes oxidantes (Piper, 1993; Mager y Moradas-Ferreira, 1993, Moradas-Ferreira, 1996). Ello explica, la síntesis de proteína comunes que forman parte de una respuesta general al estrés. Por ejemplo, muchas HSPs (de las siglas en ingles Heat Shock Proteins), son inducidas no sólo por calor, sino también en otras condiciones de estrés, lo que concuerda con su papel de chaperonas moleculares, necesarias para la reparación de proteínas (Mager y Moradas-Ferreira, 1993). Otro gen de respuesta general a estrés es el de la poliubiquitina, *UBI4*, proteína, implicada en la proteólisis no lisosomal, útil para que la levadura se libere de proteínas dañadas, que podrían ser tóxicas para la célula (Finley *et al.*, 1987). Por otra parte el gen *DDR2* es inducido, por daño al DNA y 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, como se menciono anteriormente una de las respuestas más rápidas comunes a la mayoría de estreses es el aumento de trehalosa. Ello ocurre rápidamente por la activación postraducciona de las enzimas implicadas en su síntesis, pero además, se produce una inducción transcripcional de los genes que codifican estas enzimas. Otra respuesta común al estrés es el aumento de intermediarios

reactivos del oxígeno, que causan daños oxidativos como la catalasa T de *S. cerevisiae* 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 *CUP1*, son inducidos por estrés oxidativo, por la ausencia de glucosa y por el choque térmico.

1.5.1. Respuesta al choque térmico

La respuesta a estrés por calor en levadura es de las mejor estudiadas. Un incremento de 10 a 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas Heat Shock Proteins (HSPs). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares involucradas en impedir la desnaturalización, o inducir la renaturalización de proteínas (Lindquist, 1992). Además se relaciona con la degradación de proteínas mal plegadas y la diseminación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Algunas de estas proteínas se encuentran también están presentes a temperaturas óptimas.

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) (Sorger, 1991).

La transcripción de genes inducidos por calor depende de dos elementos regulatorios: el *STRE*, y el *HSE*. Este último elemento consta de por lo menos tres copias de la secuencia nGAAn (donde n puede ser cualquier nucleótido) arreglados en orientaciones alternadas. Cambios de secuencias y/o distancia entre los elementos son tolerados *in vivo*, pero la afinidad por el factor de transcripción puede verse afectada y por lo tanto disminuir la transcripción desde estos promotores mutantes (Santoro *et al.*, 1998). El factor transcripcional que se une a los *HSEs* y activa a los genes que están bajo su control se ha denominado Hsf1p y está codificado por un gen único y esencial para la levadura (Wiederrecht *et al.*, 1988). Un factor similar se ha encontrado en *Drosophila*, en humanos y en otros organismos (Clos *et al.*, 1990; Kingston *et al.*, 1987; Yancey *et al.*, 1982).

En eucariontes superiores, la unión de DNA depende de la trimerización de monómeros de HSF en respuesta al choque térmico (Westwood *et al.*, 1991). Sin embargo, en *S. cerevisiae* Hsf1p se encuentra trimerizado y unido a DNA aún en ausencia de choque térmico. El hecho de que haya unión al *HSE* sin inducción de la transcripción, indica que se requiere de un segundo factor para activar a Hsf1p. Se ha propuesto que en este mecanismo está involucrada la adición de P, pues Hsf1p es fosforilada en respuesta a estrés oxidativo o térmico. Sin embargo, este mecanismo parece estar más relacionado a la inactivación del factor, lo cual permite una respuesta transitoria (Piper, 1997). Estudios con mutantes puntuales con remociones parciales de Hsf1p que aumentan la actividad constitutiva de la transcripción, sugieren la existencia de

un control negativo sobre la activación de este factor de transcripción (Hardy *et al.*, 2002).

1.5.2. 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_2O_2 , menadiona, por aumentos en la presión de oxígeno, y por exposición a radiaciones ionizantes. Las principales especies reactivas del oxígeno son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Y el hidroxilo, ($OH^{\cdot}$). El peróxido de hidrógeno no suele ser tóxico por sí mismo, sino por su capacidad de reaccionar con el radical superóxido ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + O_2$ reacción denominada de Fenton/Haber-Weiss). Esta es catalizada por metales, y en ella se genera un radical hidroxilo, especie capaz de reaccionar directamente con, DNA, lípidos y proteínas, en éstos puede ocasionar daños importantes que afectan a su función (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 disminuye su actividad biológica (Levine *et al.*, 1994). Las proteínas modificadas por oxidación podrían ser sustratos 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).

1.5.3. Defensa 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 γ -L-glutamil-L-cistinilglicina. Esta molécula reacciona con los oxidantes a través de su grupo sulfhidrilo para producir glutatión reducido (GSSG). El gen de levadura que codifica la γ -L-glutamil-L-cisteína sintetasa, enzima implicada en la biosíntesis de GSH es *GSH1*, 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 últimas son un ejemplo de la fuerte relación existente entre los sistemas de defensa antioxidativa y los sistemas de detoxificación u homeostasis de iones metálicos. El radical $OH^\cdot$ se produce a partir de H_2O_2 en una reacción catalizada por metales, lo cual un gran efecto tóxico. Una de las formas que tiene la célula para minimizar la formación de radicales superóxido es mediante el secuestro de metales como cobre y hierro, por metalotioneínas. Estas están implicadas en contrarrestar la toxicidad de metales y radiaciones desionizantes, homeostasis de metales y detoxificación frente a radicales libres. En levadura se han encontrado al presente dos metalotioneínas. La primera descrita fue la codificada por el gen *CUP1*, éste es inducido tanto por estrés oxidativo como por metales pesados, Y

ausencia de fuente de carbono. *CUP1* 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 *CUP1* (Butler *et al.*, 1991). Por otro lado, se ha descrito que la regulación de *CUP1* por estrés oxidativo se da a través del factor de choque térmico o heat shock, que interacciona con las HSEs presentes en su promotor. El Hsf1p también regula la expresión de *CUP1* por choque térmico y por privación 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 DE *CUP1* por menadiona (compuesto que causa estrés oxidativo, debido a la generación de radicales superóxido) También es dependiente de Hsf1p.

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).

Otra forma de defensas antioxidativas de la célula incluyen algunas enzimas capaces de eliminar radicales de oxígeno y productos derivados de los mismos. *S. cerevisiae* tiene dos tipos de catalasas, enzimas que catalizan la rotura de

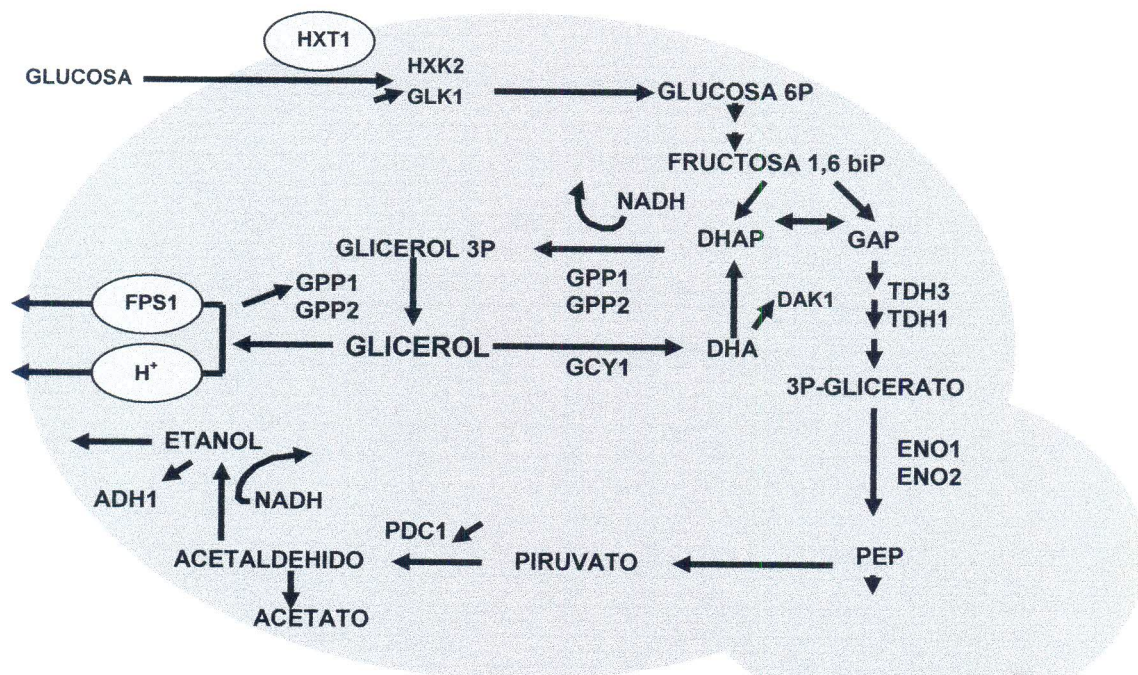
H_2O_2 a O_2 y H_2O : la catalasa A y la catalasa T, codificada por *CTA1* y *CTT1*, respectivamente (Cohen *et al.*, 1988; Hartig y Ruis, 1986). La catalasa A se localiza en el peroxisoma, y su función es eliminar el H_2O_2 producido por la β -oxidación de ácidos grasos. El papel fisiológico de la catalasa T, en cambio, no está del todo claro, aunque la expresión de *CTT1* está relacionada con un número amplio de estreses como el: choque oxidativo, choque osmótico, choque térmico, ausencia de fuente de carbono, ácidos débiles, etanol, etc. (Marchler *et al.*, 1993).

1.5.4. Respuesta al estrés osmótico

Al ser sometidas a un medio extracelular hiperosmótico, las células sufren una pérdida importante de agua citoplasmática. Para contrarrestar este efecto, *Saccharomyces cerevisiae* produce una rápida acumulación de glicerol, esto 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).

Se han postulado tres diferentes fases en la respuesta de la levadura a condiciones de estrés hiperosmótico. La primera es un proceso puramente fisicoquímico que en la levadura es de aproximadamente un minuto (Hohmann, 1997). En este la célula pierde agua pasivamente para equilibrar las presiones hídricas. La segunda fase de la respuesta a este tipo de estrés es la adaptación

Entre los ajustes metabólicos que favorecen la producción de glicerol en condiciones de estrés osmótico se encuentran los siguientes: a) Un incremento en la transcripción de los genes *GPD1* y *GPP2*; los cuales codifican para enzimas que catalizan los últimos pasos en la vía de síntesis de glicerol. b) Un aumento en la actividad fosfofructocinasa (es una enzima de la glucólisis que cataliza una reacción irreversible).



19

c) Inhibición de la producción de etanol debida probablemente a que la *ADH1* utiliza el mismo cofactor que la *GPD1* (NADH). d) Disminución en la transcripción de los genes que codifican para las enzimas TDH3 (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y ENO2 (Enolasa). Esto es relevante para la producción de glicerol ya que, al no existir estas enzimas en cantidades normales, no se utiliza gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y, por lo tanto, se aumenta la reserva de fosfato de dihidroxiacetona (DHAP; precursor del glicerol). e) Reducción de la expresión de la piruvato descarboxilasa (*PDC1*) y de la alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) y una elevación en la actividad de la aldehído deshidrogenasa (*ALD6*). Estos cambios también son importantes para la producción de glicerol ya que se incrementa la concentración de NADH (Blomberg, 1997).

La acumulación de glicerol es producida por dos eventos: El incremento en su síntesis e inhibición de su salida (Albertyn *et al.*, 1994; Ansell *et al.*, 1997; Blomberg y Adler, 1989; Luyten *et al.*, 1995). La enzima responsable de la síntesis de glicerol en *S. cerevisiae* es la GPD. El transcrito de la *GPD1* se induce en condiciones de estrés hiperosmótico y una interrupción del gen, produce un fenotipo de osmosensibilidad (Albertyn *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1993). Se ha descrito otra isoforma del gen denominada *GDP2* cuyo transcrito no se induce en estas condiciones de estrés y cuya interrupción no produce un fenotipo de osmosensibilidad. Sin embargo, la doble interrupción en *GDP1* Y *GDP2* da lugar a una levadura altamente osmosensible que produce cantidades despreciables de glicerol (Ansell *et al.*, 1997).

El último paso en la síntesis de glicerol (Figura 5) involucra la desfosforilación del glicerol-3-fosfato a glicerol, esta reacción es catalizada por las fosfatasas GPD1 y GPD2. GPD2 se regula transcripcionalmente por estrés hiperosmótico y por la vía de HOG. *GPP1* se expresa constitutivamente y se ha demostrado que codifica para una proteína que, *in vitro*, funciona como fosfatasa (Norbeck *et al.*, 1996). La interrupción de, *GPP1*, *GPP2*, o de ambos, no genera ningún fenotipo de sensibilidad a estrés osmótico (Hirayama *et al.*, 1995), lo cual sugiere la existencia de una fosfatasa adicional involucrada en la producción de glicerol.

1.5.5. Respuesta al estrés salino

En altas concentraciones de NaCl, el ión sodio entra en la célula vía los canales de K^+ (codificados por *TRK1* y *TRK2*), y probablemente otros transportadores de cationes (Rodríguez-Navarro y Ramos, 1984; Gaber *et al.*, 1998; Ko *et al.*, 1990). La alta toxicidad que presenta este ion parece deberse a que interfiere con los procesos celulares que requieren K^+ , puesto que si se aumenta la relación K^+/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 Na^+ elevada, y para evitar la entrada excesiva de Na^+ , se produce un cambio en el sistema de transporte de 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 (Garcíadeblás *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 Ca^{2+} y calmodulina para su activación, y en este caso la inducción es específica de sodio. La proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (cPka), 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 Li^+ y 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 antagónicamente en una ruta común para la adaptación a estrés salino (Hirata *et al.*, 1995).

1.6. Genes heterólogos expresados en levadura

Desde hace unos 15 años, se logró la primera complementación funcional heteróloga por un gen de plantas al identificarse la clona correspondiente capaz

de rescatar la mutante *glnA* para glutamino sintetasa de *E. coli* (DasSarma *et al.*, 1986). Sin embargo, la utilidad de este sistema de expresión es limitada para los organismos eucariotes, debido a grandes diferencias en la estructura y el procesamiento de la información genética. El primer gen de eucariote superior aislado por complementación en levadura, fue el *CDC2* de humanos, implicado en la división celular (Lee and Nurse, 1987). Desde entonces, la expresión en levadura se ha utilizado como una herramienta muy útil para aislar genes por complementación o para probar su función.

Los primeros ejemplos de genes de plantas expresados exitosamente en levadura, fueron una cinasa de arroz que complementó la mutante *snf1*, cuyo gen silvestre está implicado en la represión catabólica por glucosa (Alderson *et al.*, 1991), y la enzima formadora de etileno (Efe) de jitomate (Hamilton *et al.*, 1991). Mas tarde, se construyó una genoteca de expresión de cDNA de *Arabidopsis thaliana* en el vector pFL61 de levadura con el promotor *PGK1* (del gen de fosfoglicerol cinasa). Además de haber complementado las auxotrofias más usuales de levadura (*ura3*, *ade1*, *leu2*, *his3*, *trp1*) con los correspondientes cDNAs de *Arabidopsis*, de esta genoteca se han aislado por complementación una gran cantidad de genes de plantas (Minet *et al.*, 1992).

El sistema heterólogo de levadura ha sido de gran utilidad para aislar genes que codifican proteínas de transporte de membranas, por la facilidad para establecer sistemas de selección adecuados basados en mutantes. Por ejemplo, valiéndose de la doble mutante *trk1trk2* que pierde la capacidad para transportar potasio hacia el interior de la levadura, se han podido aislar los

genes codificantes de los canales de potasio *KAT1* y *AKT1* de *Arabidopsis* (Anderson *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992). Además se aislaron de trigo transportadores de K^+ de alta afinidad (Schachtman y Schroeder, 1994) y de *AtKUP1*, y otro transportador dual de alta y baja afinidad para el mismo ion, reportado simultáneamente en *arabidopsis* y en trigo (Fu y Luan, 1998; Kim *et al.*, 1998).

1.7. El gen y el promotor *CUP1*

Según Butt y Ecker (1987), las secuencias de ADN reguladas por metales constituyen elementos interesantes para la expresión heteróloga en levaduras. Para utilizarlos ha sido necesario comprender la expresión de los genes que codifican las metalotioneínas, una familia de proteínas especializadas en la detoxificación de metales pesados como cobre, cadmio y zinc a nivel molecular. Uno de los primeros genes clonados, que codifica una de estas proteínas fue el *CUP1* de *S. cerevisiae*, también denominado como Cu-MT (Fogel y Welch, 1982; Butt *et al.*, 1984); el cual constituye uno de los pocos genes repetidos en levadura, y el número de copias, con un arreglo en tándem en el cromosoma VIII, está relacionado con el nivel de resistencia a la toxicidad por Cu. Las cepas más resistentes, generalmente de origen industrial, son capaces de crecer bajo una concentración de hasta 2 mM. Éstas normalmente tienen 10 o más copias de *CUP1*, mientras que las cepas susceptibles sin ningún gen *CUP1* funcional no pueden crecer a más de 100 μ M de Cu (Welch *et al.*, 1983). El fenómeno que propicia el incremento en el número de copias, ES la amplificación

genética, resultante de la recombinación no recíproca o la conversión genética, bajo la presión selectiva del cobre. Debido al uso de contenedores de cobre para fabricar vinos y cerveza, así como al uso del caldo bordelés el cual contiene altas concentraciones de sulfato de cobre (empleado para el control de enfermedades fungosas en vides), las levaduras han estado en contacto con este metal durante miles de años (Fogel *et al.*, 1983; Hamer *et al.*, 1985).

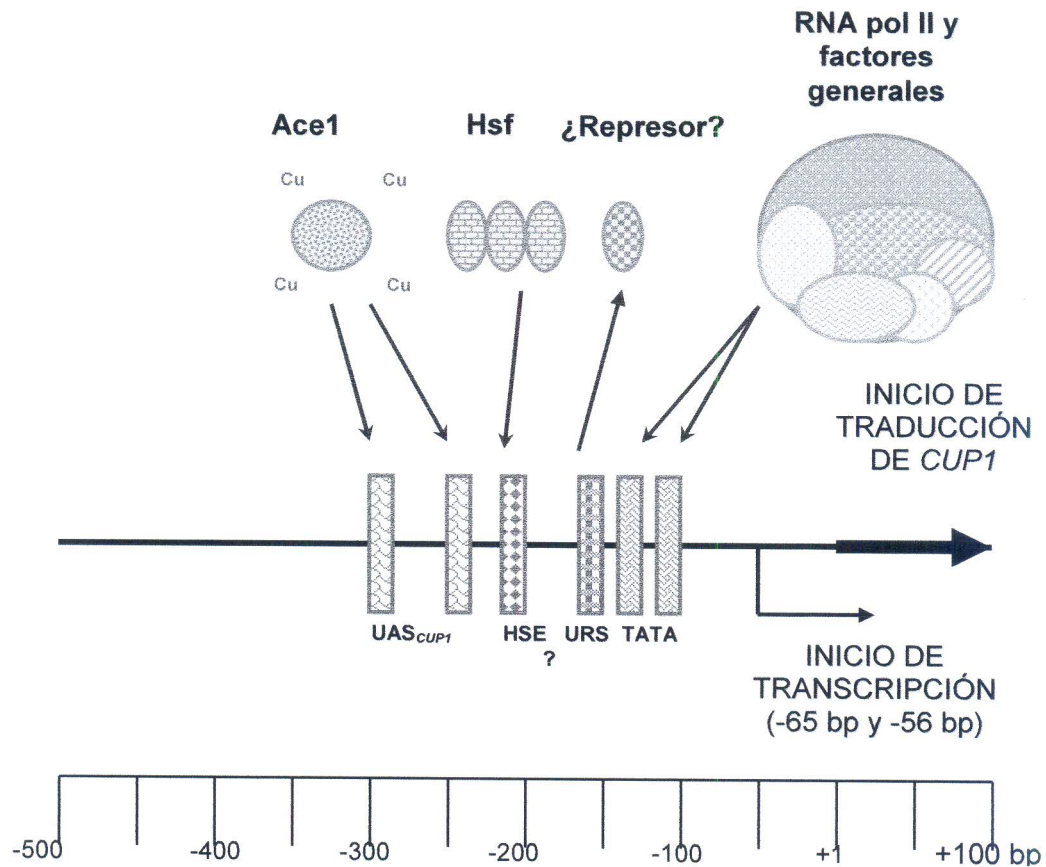
El gen *CUP1* de levadura codifica una pequeña proteína de sólo 61 aminoácidos capaz de unir hasta 8 átomos de cobre de manera cooperativa, a través de 12 residuos de cisteína (Winger *et al.*, 1985). La metalotioneína es capaz de acomplejar *in vitro* al zinc, plata y cadmio; aunque *in vivo*, sólo se ha comprobado que protege de la toxicidad de cobre y cadmio. Por otra parte, el gen es sólo inducido por cobre y plata (Ecker *et al.*, 1986; Hamer, 1986; Furst *et al.*, 1988). Homólogos de este gen se pueden encontrar prácticamente en todos los organismos eucariotes. En organismos superiores constituyen familias multigénicas complejas que codifican proteínas de unión A metales pesados (Hamer, 1986).

1.7.1. El promotor *CUP1* de levadura es regulado por Cu

El promotor *CUP1* posee propiedades que lo han vuelto atractivo para ser empleado tanto en investigación y particularmente en biotecnología industrial, debido a las siguientes ventajas: 1) es un promotor inducible por cobre, lo cual permite el mantenerlo activo o inactivo según sea conveniente. La adición de

cantidades micromolares de cobre, incrementa hasta 25 veces su actividades basal (Butt *et al.*, 1984); 2) la actividades basal puede ser controlable, seleccionando la cepa hospedante adecuada, en la que el número de copias de *CUP1* y la presencia de activadores y represores afectarán el nivel de expresión (Hamer *et al.*, 1986); 3) la fuerza o eficiencia del promotor (el numero de veces que la RNA polimerasa transcribe el gen en un periodo de tiempo determinado) es moderada (Butt y Ecker, 1987).

A la fecha, se han caracterizado varios elementos *cis* y *trans* que afectan el nivel de transcripción basal en relación a la propiedad de este promotor de ser inducido gradualmente en función de la adición de cantidades micromolares, no toxicas de cobre. Un resumen de lo reportado hasta ahora se presenta en la Figura 6. Inicialmente se determinó que el segmento *Bam*HI-*Rsa* I de 431 bp, en la región 5' inmediata al gen *CUP1*, podía retener las principales propiedades de control transcripcional por el gen *CUP1* (Butt *et al.*, 1984; Hamer *et al.*, 1985; Thiele y Hamer, 1986). Análisis posteriores se centraron en tratar de identificar los elementos de control presentes en ésta región. El promotor *CUP1* posee dos cajas TATA putativas, ubicadas a -98 y -142 bp arriba del primer ATG de *CUP1*, y coincidente, se han identificado dos sitios de inicio de la transcripción, a -65 y -56 bp arriba del inicio de transcripción (Karin *et al.*, 1984). Dentro de los elementos *cis* de control positivo, se han caracterizado las secuencias MT-UAS ó UAS_{cup1} (TTTTGCTG y TTTTCCGCTG) (región -274 a -193 arriba del inicio de la traducción) presentes en tándem en el promotor *CUP1*.



ELEMENTOS *cis* EN EL PROMOTOR *CUP1*

-  *UAS_{CUP1}* (TTTTGCTG) (-273 a -266 y -244 a -237)
-  *UAS_{HSE}* (TTCTAGAA) (-227 A-220)
-  URS? (-194 a -143) (ELEMENTO REPRESIBLE POR GLUCOSA, PARCIALMENTE FUNCIONAL EN PRESENCIA DE COBRE)
-  CAJA TATA (TATAAAA) (-142 A -136)
(TATAATA) (-92 A -98)

Figura 6. Elementos *cis* y *trans* involucrados en el control transcripcional del promotor *CUP1* (Fuente: Mascorro-Gallardo, 2000).

Mediante experimentos de “footprinting”, se ha demostrado que estas secuencias constituyen el sitio de unión del factor de transcripción Ace1, responsable de sensar la concentración de cobre en el medio después de lo cual, de manera proporcional, activa al gen *MT* (Thiele y Hamer, 1986; Thiele, 1988; Huibregtse *et al.*, 1989; Szczypka y Thiele, 1989).

Esta regulación tan sensible y fina es posible debido a que la proteína Ace1, y la metalotioneína misma, son capaces de unir cooperativamente a los átomos de Cu(I) y experimentar un cambio conformacional que incrementa su afinidad por la secuencia UAS_{cup1}, lo cual tiene como efecto un aumento en la tasa de transcripción de *CUP1* (Furst *et al.*, 1988; Furst y Hamer, 1989).

1.7.2. Inducción por choque térmico y estrés oxidativo

En levadura, la respuesta transcripcional al choque térmico (HS) se lleva a cabo a través de elementos *cis* (HSE) y un factor de transcripción (Hsf) que se activa en respuesta al choque térmico, mediante su fosforilación y trimerización. Los elementos *cis* presentes en los genes responsivos al calor presentan tres o más repetidos de la secuencia GAAnnTTCnnGAA ó TTnnGAAnnTTC (Sorger y Nelson, 1989). El promotor *CUP1* presenta una secuencia TTCTAGAA (-229 a -222) que podría poseer afinidad por Hsf, y por lo tanto una capacidad de respuesta al choque térmico. Se demostró que esto es así, aunque de manera indirecta, cuando se aisló una mutante supresora de *ace1* (hipersensible a cobre), que resultó ser el factor Hsf que al ser mutado incrementó su afinidad

por el HSE presente en el promotor de *CUP1*. La proteína Hsf silvestre muestra sólo una ligera afinidad por el HSE de *CUP1*, que sin embargo es detectable *in vitro* mediante experimentos de unión a DNA y de retardo en geles de poliacrilamida, e *in vivo* al seguir la activación de la fusión del promotor *CUP1* a *lacZ* (*CUP1-lacZ*) en respuesta a choque térmico (Silar *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1991). Se ha reportado que la metalotioneína de levadura es capaz de suprimir varios de las deficiencias al estrés oxidativo mostrados por la mutante *sod1Δ* (Tamai *et al.*, 1993). En concordancia con esto, se determinó que el gen *CUP1* es activado transcripcionalmente por estrés oxidativo, y que esta respuesta está mediada por la unión de Hsf a HSE. Un dato interesante es que el patrón de activación por fosforilación de Hsf es diferente al patrón típico inducido por choque térmico (Liu y Thiele, 1996).

1.7.3. Control negativo de *CUP1* por glucosa

La regulación por fuente de carbono ha sido demostrada sólo circunstancialmente, ya que una delección entre el sitio UAS_{*CUP1*} más cercano al inicio de transcripción y la primera caja TATA del promotor *CUP1* (a unas 105 bp del primer inicio de transcripción), incrementó en 10 veces el nivel de expresión basal. Dado que los experimentos se hicieron suministrando glucosa como fuente de carbono, se asume que en esa región podría encontrarse un elemento URS de regulación de *CUP1* se han hecho empleando glucosa como fuente de carbono, así que es evidente que la posible represión del promotor

ejercida por este azúcar, es superada por la activación del mismo cuando se adiciona cobre (Butt y Ecker, 1987).

1.7.4. Vectores basados en el promotor *CUP1*

Aunque el promotor *CUP1* es un promotor débil comparado con otros como el *PGK* y el *GAL1* (Piper, 1994), puede dar resultados similares bajo un manejo adecuado si se trata de producir proteínas recombinantes, con la ventaja adicional que su expresión es independiente del desarrollo y es inducible en un amplio rango. Se ha reportado que el rendimiento de suero de albúmina humana en levadura recombinante fue tan alto bajo el control del promotor *CUP1*, como el obtenido utilizando el promotor *PGK1* (Etcheverry *et al.*, 1986). Un cultivo de levadura puede dejarse crecer hasta, por ejemplo la parte final de la fase exponencial para incrementar la biomasa y luego inducir la producción de proteína recombinante simplemente mediante la adición de cantidades no tóxicas de cobre, lo cual en algunos casos da mejor resultado que empezar el cultivo bajo una expresión constitutiva alta.

La mayoría de los promotores utilizados en los vectores de expresión se derivan de genes de expresión constitutiva, regulados o inducibles por fuentes de carbono, como *PGK*, *GALK1* y *ADH*, contrariamente de *CUP1* cuya regulación es ejercida principalmente por el cobre. Aunque se ha reportado elementos de regulación negativa por glucosa en el promotor *CUP1*, también se sabe que la adición de cobre supera parcialmente esta represión. Cuando se elimina esta

secuencia del promotor, se incrementa la expresión basal, y se duplica el nivel máximo de expresión inducible por cobre en vectores monocopia (Thiele y Hamer, 1986).

Por otra parte no siempre es conveniente el obtener una expresión fuerte, hay genes cuya sobre-expresión puede producir efectos tóxicos para la levadura, por lo cual en ese caso lo mejor es una expresión moderada (Chen *et al.*, 1990). Además, es posible incrementar la fuerza del promotor *CUP1* mediante varias vías, por ejemplo utilizar un vector con origen de replicación multicopia en vez del monocopia, con lo cual se incrementa el número de unidades de transcripción activas (Macreadie *et al.*, 1991); o bien sobre-expresando *ACE1*, el factor de transcripción responsivo a Cu (Thorvaldsen *et al.*, 1993).

Mascorro-Gallardo *et al.*, (1996) llevaron a cabo la clonación del gen *lacZ* en pSAL1 para probar el nivel de expresión y control de la inducción por cobre. La construcción pSAL1::*lacZ* la ensayaron en la cepa RS58 de levadura, a la que añadieron diferentes cantidades de cobre en la fase exponencial del cultivo. Ellos encontraron que la máxima inducción se obtuvo al adicionar 100 μM de CuSO_4 concentración que está muy por debajo del nivel de toxicidad (1000 μM) para esta cepa.

1.8 El gen y el promotor *PMA1*

La ATPasa de protones (H^+ ATPasa) codificada en levadura por *PMA1* es un polipéptido abundante expresado, ya que puede constituir entre 7-10% de la

proteína de la membrana plasmática. Tiene como principal función el bombear protones hacia el exterior de la célula para generar un gradiente electroquímico que luego es utilizado para introducir iones, azúcares y aminoácidos a través de los sistemas de transporte secundarios (Serrano, 1988). Adicionalmente, el bombeo de protones contribuye a regular el pH intracelular (Eraso y Gancedo, 1987). *PMA1* es un gen esencial en levadura, ya que su ruptura produce una mutante inviable (Serrano *et al.*, 1986). Dada la importancia metabólica de esta proteína, su disponibilidad debe de ser cuidadosamente regulada. Las primeras evidencias, demostraron que estaba sujeta a regulación post-traducciona en respuesta a glucosa, ya que su actividad se incrementa después de la adición de este azúcar, lo que induce la fosforilación de Ser/Thr en uno de los sitios del polipéptidos de 100 kD (Chang y Slayman, 1991).

1.8.1. Regulación transcripcional de *PMA1*

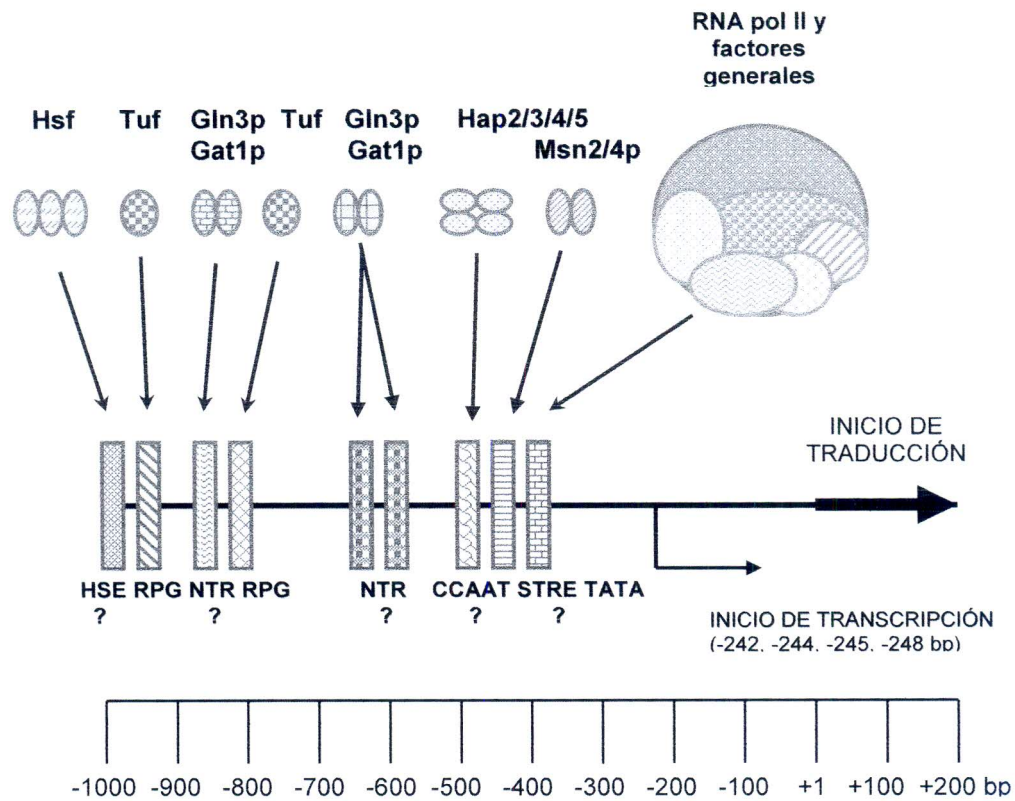
Contra la idea que este gen se expresa de manera constitutiva, originada más que nada por la larga vida media de la proteína (20 horas) (Serrano, 1988; Benito *et al.*, 1991), se ha encontrado que también está sujeto a una evidente regulación transcripcional, mediado por el factor Tuf1/Rap1 el cual responde a la adición de azúcares fermentables (Capieaux *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1993, Figura 7).

La transcripción cuantificada mediante una fusión del promotor *PMA1* con el gen reportero *lacZ*, muestra una reducción de cerca del 60% en la actividad

específica de β -galactosidasa, cuando la fuente de carbono es galactosa en vez de glucosa, (García-Arranz *et al.*, 1994). A pesar de estar influido por la fuente de carbono, la expresión no se abate como es el caso del promotor *GAL1*, donde la transcripción se incrementa hasta 100 veces al emplear galactosa en lugar de glucosa como fuente de carbono (Serrano y Villalba, 1995).

Hasta ahora, no se ha explorado si estos consensos intervienen en la regulación de la transcripción de este gen, aunque, dada la importancia de la ATPasa de protones en levadura, se esperaría que estuviese sujeta a una cuidadosa regulación. Por ello no sería extraño que otros elementos *cis* diferentes a los *RPG* también estén involucrados en el control transcripcional de *PMA1*.

El promotor *PMA1* se considera un promotor fuerte, similar al promotor *GAL1*, por lo cual se le ha utilizado para expresar genes heterólogos de plantas en los cuales se espera que el fenotipo responda proporcionalmente a un incremento en la cantidad de proteína. Rubio *et al* (1995) expresaron en levadura el gen *HKT1* que codifica un putativo cotransportador K^+/Na^+ de trigo, y más recientemente, Zentella *et al* (1999), lograron complementar a la mutante *tps1Δ* con el gen homólogo de *S. lephidophylla* clonado en un vector de expresión con el promotor *PMA1*.



ELEMENTOS *cis* EN EL PROMOTOR *PMA1*

-  UAS_{HSE} (TTCCTGAA) (-932 a -925)
-  UAS_{RPG} (ACCCATACA) (-892 a -884 y -788 A -780)
-  UAS_{NTR} (GATAA Y TTATC) (-815 a -811, -643 a -639 y -581 a -577)
-  UAS_{CCAAT} (CCAAT) (-407 a -402)
-  UAS_{STRE} (CCCCT) (-356 a -352)
-  CAJA TATA (TATAAAA) (-336 a -330)

Figura 7. Elementos *cis* y *trans* involucrados en el control transcripcional del promotor *PMA1* (Fuente: Mascorro-Gallardo, 2000).

Aunque se ha demostrado que el promotor *PMA1* es fuerte y constitutivamente activo, la fuerza del mismo es modulada por la fuente de carbono. Específicamente, es activada por glucosa a través del factor de transcripción denominado Tuf/Rap1/Grf1, el cual se une a las dos regiones UAS-RPG presentes en el promotor (Capieaux *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1993). El factor Tuf es extremadamente importante en la regulación de genes por glucosa, dado que al menos 45 genes son coordinadamente activados en respuesta a la presencia de glucosa, y estos están involucrados en funciones vitales para el crecimiento celular, como son la traducción, transcripción, glicólisis, transporte y diferenciación celular (Diffey, 1992). Rao *et al.* (1993) determinaron que bajo adición de 2% de glucosa (el contenido estándar en un medio de cultivo) se detecta un incremento evidente en el mRNA de *PMA1* a los 20 minutos, alcanzando este un máximo a los 60 minutos.

Mascorro-Gallardo (2000) propone otros elementos hipotéticos en la secuencia del promotor *PMA1*, Por ejemplo, hay tres secuencias NTR que intervienen en la represión catabólica por nitrógeno. En presencia de una fuente de nitrógeno como amonio los genes con estas secuencias se reprimen y al menos se requieren dos de éstas en tándem para ser activadas. Fuentes de nitrógeno menos preferidas por la levadura como la arginina activan a los genes con estos elementos en sus promotores (Smart *et al.*, 1996).

Por todo lo referido anteriormente, tanto *CUP1* y *PMA1* son dos promotores interesantes para utilizarse en biotecnología, para experimentos de

complementación funcional o para producir proteínas recombinantes. En este trabajo se plantea analizar el comportamiento transcripcional de ambos promotores bajo distintas fuentes de carbono y condiciones de estrés similares a las que se exponen a la levadura en procesos como fermentación o producción de proteínas recombinantes, por lo que se plantean los siguientes:

OBJETIVOS

1. Determinar el patrón de regulación transcripcional del promotor inducible por cobre *CUP1*.
2. Determinar el patrón de regulación transcripcional del promotor constitutivo *PMA1*.
3. Comparar ambos promotores como sistemas para la expresión de genes homólogos y heterólogos en la levadura.

II. MATERIALES Y METODOS

2.1. Localización del sitio experimental

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

2.2. Material biológico empleado

Cepas de *Sacharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo fueron:

W303-1A Cepa silvestre (*MAT a leu2-3, 112 ura3-1, trp 1-1, his3-11, 15 ade2-1, can1-100, GAL, SUC2*)

2.3. Medios de cultivo para levadura

Cuadro 1. Componentes de medio mínimo SD

Componente	Cantidad
Yeast Nitrogen Base (w/o aminoacids) 0.7%	7 g/l
Dextrosa 2% (*)	20 g/l
MES 10X (**)	100 ml/l
Leucina (stock 100X, 10 mg/ml)	10 ml/ l
Uracilo (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Histidina (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Triptófano (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Adenina (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Agar (sólido)	20 g/l

Cuadro 2. Componentes del medio mínimo SGAL

Componente	Cantidad
Yeast Nitrogen Base (w/o aminoacids) 0.7%	7 g/l
Galactosa (2%)	20 g/l
MES 10X (**)	100 ml/l
Leucina (stock 100X, 10 mg/ml)	10 ml/ l
Uracilo (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Histidina (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Triptófano (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Adenina (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Agar (sólido)	20 g/l

Cuadro3. Componentes del medio mínimo SGLY

Componente	Cantidad
Yeast Nitrogen Base (w/o aminoacids) 0.7%	7 g/l
Glicerol (3%)	30 ml/l
MES 10X (**)	100 ml/l
Leucina (stock 100X, 10 mg/ml)	10 ml/ l
Uracilo (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Histidina (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Triptófano (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Adenina (stock 100X, 3 mg/ml)	10 ml/ l
Agar (sólido)	20 g/l

Aforar a 1 litro con agua destilada y esterilizada a 110 °C por 15 minutos.

(**) MES= 2-(N-morpholino) ethane-sulphonic acid, PM=195.2).

Se prepara 0.5M, con 97.6 g/l, se disuelve y con Tris base se ajusta el pH a 6.0 se esteriliza a 110°C por 15 minutos. Para algunas cepas de levadura que se

han transformado y que llevan algún marcador como HIS, entonces omitir la histidina para que se seleccionen los transformantes, Una vez con el vector, crecerla en medio mínimo sin histidina para evitar la pérdida del mismo.

2.4. Construcción de la fusión transcripcional *CUP1::lacZ*

Para contar con una fusión transcripcional del promotor *CUP1* con el gen reportero *lacZ*, se partió del vector monocopia pSAL5 construido por Mascorro Gallardo (2000). El vector fue digerido con las enzimas NcoI y NotI. El gen *lacZ* se obtuvo del vector pSAL1::*lacZ* mediante digestión con NcoI y NotI. Después de la digestión, tanto el vector como el inserto se purificaron de un gel de agarosa al 0.8%. Los fragmentos se recuperaron y se purificaron con el sistema Gen Clean II y luego se procedió a llevar a cabo la ligación entre el vector y el inserto con ADN ligasa T4. La construcción pSAL5::*lacZ* se identificó al introducir parte de la ligación por transformación en *E. coli* DH5 α y las clonas recombinantes se identificaron en medio LB+Ap100+X-gal+IPTG, en el cual se desarrolló un color azul claro que indicó la presencia de *lacZ* y su expresión en la bacteria. En la figura 8 se muestra el mapa de restricción de la construcción referida.

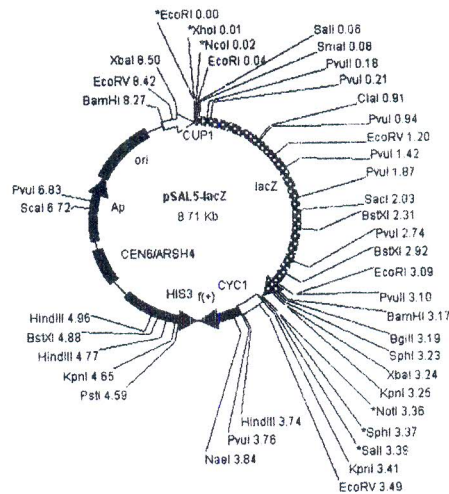


Figura 8. Mapa de restricción de pSAL5::lacZ

2.5. Construcción de la fusión transcripcional *PMA1::lacZ*

Esta construcción se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia referida anteriormente, pero el gen *lacZ* se clonó en el vector pRS5, el cual es un vector de expresión monocopia, con el promotor *PMA1* y el gen marcador *HIS3* (Mascorro-Gallardo, 2000).

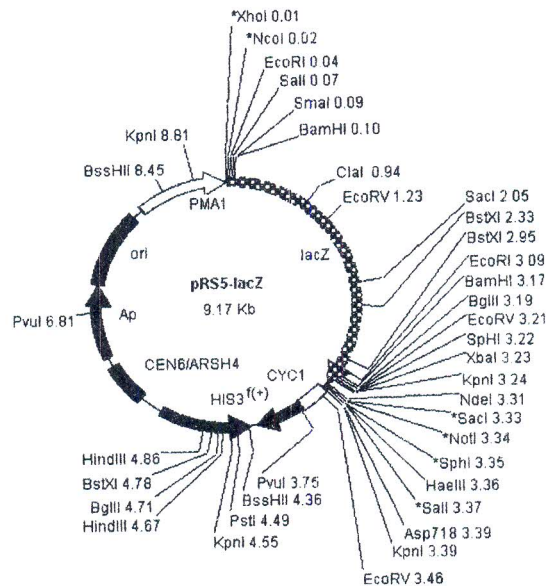


Figura 9. Mapa de restricción de pRS5::lacZ

2.6. Transformación de la levadura con las construcciones.

Para introducir las construcciones en la cepa de levadura W303-1A, se siguió el siguiente procedimiento (Elble, 1992):

1. Tomar 1 ml de cultivo líquido en fase exponencial o estacionaria (1-5 días de crecimiento) y colocarlo en un tubo eppendorf. Trabajar junto al mechero o en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación bacteriana o de hongos.
2. Centrifugar en microfuga a unas 5 K para colectar las células y decantar el sobrenadante.
3. Con el poco medio que haya quedado, resuspender las células y luego añadir 5 μ l de DNA de esperma de salmón (5-10 μ g/ μ l).
4. Añadir 1 μ g de ADN transformante.
5. Añadir 500 μ l de PLATE (Mezcla de 9 ml de PEG 3450 al 50% y 1 ml de acetato de litio 1 M pH 7.5 (10X), el cual se prepara en TE 10X (0.1 M Tris-HCl, 0.01 mM EDTA, pH 7.5) Ambas soluciones deben de esterilizarse en autoclave.
6. Dejar incubando toda la noche, o hasta dos días a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 5 K para colectar las células y retirar el sobrenadante con micropipeta.
8. Añadir 100-200 μ l de medio mínimo y platear en medio mínimo selectivo (SD-HIS).

9. Las colonias aparecen a los 3 días cuando se incubaba a 25-30 °C. Seleccionar al menos 3 colonias para probarlas posteriormente. La caja Petri con los transformantes puede mantenerse a 4 °C por varias semanas.

2.7. Estrategia experimental para analizar *CUP1::lacZ*

Niveles de CuSO₄ probados para el promotor *CUP1*

Día 1

Preparación de inóculo: Se transfirió una colonia de W303-1A (*pSAL5::lacZ*) a 10 ml de medio líquido SD (-HIS), se incubó toda la noche a 27° C, en agitación.

Día 2

Se inocularon 200 ml de medio SD (-HIS) con 50 µl de inóculo, se incubó en agitación a 27°C toda la noche.

Día 3

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo a la cual se le midió la absorbancia a 660 nm con el espectrofotómetro JENWAY UV-VIS Spectrophotometer Model 6305, usando como blanco 1 ml de medio SD(-HIS). Para llevar a cabo este experimento se dejó crecer la levadura hasta fase exponencial 0.5 a 0.8 fue en este momento cuando se colectaron 12 ml de cultivo y se centrifugaron por 5 minutos en la centrifuga clínica a 4000 rpm, se retiró el sobrenadante y se repitió la operación. La pastilla resultante de 24 ml se resuspendió en un matraz con 25 ml de medio SD(-HIS) con diferente concentración de CuSO₄.

Tratamientos

SD+ 0 μ M CuSO₄
SD+ 1 μ M CuSO₄
SD+ 10 μ M CuSO₄
SD+ 100 μ M CuSO₄
SD+ 200 μ M CuSO₄
SD+ 500 μ M CuSO₄

Se tomaron datos a la una y dos horas de haber estado bajo estas condiciones. Procediendo de inicio a medir la densidad óptica del cultivo, después se tomaron cuatro muestras por matraz a las cuales se les midió la actividad β -galactosidasa.

Fuentes de carbono probadas para el promotor *CUP1*

Día 1

Preparación de inóculo: Se transfirió una colonia de W303-1A (pSAL5::lacZ) a 10 ml de medio líquido SD (-HIS), se incubó toda la noche a 27° C, en agitación.

Día 2

Se inocularon 200 ml de medio SD (-HIS) con 50 μ l de inóculo, se incubó en agitación a 27°C toda la noche.

Día 3

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo a la cual se le midió la absorbancia a 660 nm con el espectrofotómetro JENWAY UV-VIS Spectrophotometer Model 6305, usando como blanco 1 ml de medio SD(-HIS). Para llevar a cabo este experimento se dejó crecer la levadura hasta fase exponencial 0.5 a 0.8 fue en

este momento cuanto se colectaron 12 ml de cultivo en tubos Falcon y se centrifugaron por 5 minutos a 4000 rpm en una centrífuga clínica, se retiró el sobrenadante y se repitió la operación. La pastilla resultante de 24 ml se resuspendió en un matraz con 25 ml de medio mínimo.

Las fuentes de carbono ensayadas fueron las siguientes:

Tratamientos

SD(-HIS)+CuSO₄ (200 µM)

SGAL(-HIS) +CuSO₄ (200 µM)

SGLY(-HIS) +CuSO₄ (200 µM)

Se tomaron datos a la una y dos horas de haber estado bajo estas condiciones. Procediendo de inicio a medir la densidad óptica del cultivo, después se tomaron cuatro muestras por matraz a las cuales se les midió la actividad β-galactosidasa.

Fuentes de carbono durante todo el ciclo de crecimiento probadas para el promotor *CUP1*

Día 1

Preparación de inóculo: Se transfirió una colonia de W303-1A (pSAL5::lacZ) a 10 ml de medio líquido SD (-HIS), se incubó toda la noche a 27° C, en agitación.

Día 2

Se inocularon 30 ml de medio mínimo (-HIS) con 30 µl de inóculo, se incubó a 27°C en agitación constante.

Día 3

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo a la cual se le midió la absorbancia a 660 nm con el espectrofotómetro JENWAY UV-VIS Spectrophotometer Model 6305, usando como blanco 1 ml de medio SD(-HIS). Las fuentes de carbono utilizadas fueron:

Tratamientos
SD(-HIS)+CuSO₄
SGAL(-HIS)+CuSO₄
SGLY(-HIS)+CuSO₄

Se tomaron muestras a diferente etapa de crecimiento de la levadura, que posteriormente se fueron procesando para determinar la actividad β -galactosidasa.

Condiciones de estrés probadas para el promotor *CUP1*.

Día 1

Preparación de inóculo: Se transfirió una colonia de W303-1A (pSAL5::lacZ) a 10 ml de medio líquido SD (-HIS), se incubó toda la noche a 27° C, en agitación.

Día 2

Se inocularon 200 ml de medio SD (-HIS)+CuSO₄ (200 μ M) con 50 μ l de inóculo, se incubó en agitación a 27°C toda la noche.

Día 3

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo a la cual se le midió la absorbancia a 660 nm con el espectrofotómetro JENWAY UV-VIS Spectrophotometer Model 6305, usando como blanco 1 ml de medio SD (-HIS). Para llevar a cabo este

experimento se dejo crecer la levadura hasta fase exponencial $A_{660} = 0.5$ a 0.8 fue en este momento cuanto se colectaron 12 ml de cultivo en tubos Falcon y se centrifugaron por 5 minutos a 4000 rpm en una centrífuga clínica, se retiro el sobrenadante y se repitió la operación. La pastilla resultante de 24 ml de medio se resuspendió en un matraz con 25 ml de medio SD (-HIS) con la condición de estrés.

La construcción pSAL5::lacZ se ensayo bajo diferentes condiciones de estrés las cuales se mencionan a continuación.

Cuadro 4. Condiciones de estrés probadas para CUP1

<i>Tratamientos</i>	<i>Tratamientos</i>	<i>Tratamientos</i>	<i>Tratamientos</i>
<i>Serie 1</i>	<i>Serie 2</i>	<i>Serie 3</i>	<i>Serie 4</i>
LiCl(100mM)+CuSO ₄	37°C + CuSO ₄	Choque térmico	+NaCl (0.9M)+CuSO ₄
LiCl(100mM)-CuSO ₄	37°C - CuSO ₄	39°C + CuSO ₄	-NaCl +CuSO ₄
Sorbitol(1.5M)+ CuSO ₄	H ₂ O ₂ (0.4mM)+CuSO ₄	39°C - CuSO ₄	
Sorbitol(1.5M)-CuSO ₄	H ₂ O ₂ (0.4mM)- CuSO ₄	Control + CuSO ₄	
Control + CuSO ₄	Control + CuSO ₄	Control – CuSO ₄	
Control – CuSO ₄	Control – CuSO ₄		

Se tomaron datos a la una y dos horas de haber estado bajo estas condiciones. Procediendo de inicio a medir la densidad óptica del cultivo, después se tomaron cuatro muestras por matraz a las cuales se les midió la actividad β -galactosidasa.

2.8. Estrategia experimental para analizar *PMA1::lacZ*

Fuentes de carbono probadas para el promotor *PMA1*

Día 1

Preparación de inóculo: Se transfirió una colonia de W303-1A (pRS5::lacZ) a 10 ml de medio líquido SD (-HIS), se incubó toda la noche a 27° C, en agitación.

Día 2

Se inocularon 200 ml de medio SD (-HIS) con 50 µl de inóculo, se incubó en agitación a 27°C toda la noche.

Día 3

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo a la cual se le midió la absorbancia a 660 nm con el espectrofotómetro JENWAY UV-VIS Spectrophotometer Model 6305, usando como blanco 1 ml de medio SD(-HIS). Para llevar a cabo este experimento se dejó crecer la levadura hasta fase exponencial 0.5 a 0.8 fue en este momento cuando se colectaron 12 ml de cultivo en tubos Falcon y se centrifugaron por 5 minutos en la centrifuga clínica a 4000 rpm, se retiró el sobrenadante y se repitió la operación. La pastilla resultante de 24 ml se resuspendió en un matraz con 25 ml de medio mínimo.

Las fuentes de carbono ensayadas fueron las siguientes:

Tratamientos

SD(-HIS)
SGAL(-HIS)
SGLY(-HIS)

Se tomaron datos a la una y dos horas de haber estado bajo estas condiciones. Procediendo de inicio a medir la densidad óptica del cultivo, después se tomaron cuatro muestras por matraz a las cuales se les midió la actividad β -galactosidasa.

Fuentes de carbono durante todo el ciclo de crecimiento probadas para el promotor *PMA1*

Día 1

Preparación de inóculo: Se transfirió una colonia de W303-1A (pRS5::lacZ) a 10 ml de medio líquido SD (-HIS), se incubó toda la noche a 27° C, en agitación.

Día 2

Se inocularon 30 ml de medio mínimo (-HIS) con 30 μ l de inóculo, se incubó a 27°C en agitación constante.

Día 3

Se tomó una muestra de 1 ml de cultivo a la cual se le midió la absorbancia a 660 nm con el espectrofotómetro JENWAY UV-VIS Spectrophotometer Model 6305, usando como blanco 1 ml de medio SD (-HIS). Las fuentes de carbono utilizadas fueron:

Tratamientos

SD(-HIS)
SGAL(-HIS)
SGLY(-HIS)

Se tomaron muestras a diferente etapa de crecimiento de la levadura, que posteriormente se fueron procesando para determinar la actividad β -galactosidasa.

Condiciones de estrés probadas para el promotor *PMA1*

La construcción pRS5::lacZ se ensayo bajo diferentes condiciones de estrés las cuales se mencionan a continuación.

Cuadro 5. Serie de tratamientos de estrés aplicados a la construcción RS5::lacZ

<i>Tratamientos Serie 1</i>	<i>Tratamientos Serie 2</i>	<i>Tratamientos Serie 4</i>
37°C	pH	SD+NaCl (0.9M)
Frio	4.0	SD-NaCl
NaCl (0.9 M)	6.0	
LiCl (100mM)	8.0	
H ₂ O ₂ (0.4mM)	Control	
Control		

Se tomaron datos a la una y dos horas de haber estado bajo estas condiciones. Procediendo de inicio a medir la densidad óptica del cultivo, después se tomaron cuatro muestras por matraz a las cuales se les midió la actividad β -galactosidasa.

2.9. Determinación de la actividad de β -galactosidasa en levadura

1. Dependiendo de la actividad del promotor, se utiliza de 1-3 ml de cultivo, el cual se crece hasta la absorbencia 0.4-0.5 (fase exponencial). Registrar la absorbencia A_{660} .

2. Centrifugar las células en un tubo eppendorf por 1 minuto, y resuspender el pellet en 100 µl de buffer GTED20.

En este momento se pueden guardar las células en el congelador para procesarlas posteriormente, sobre todo si se están colectando muestras a diferentes tiempos.

3. Añadir 6 µl de TET y agitar enérgicamente en el vortex durante 3 minutos para permeabilizar las células. Es importante hacerlo siempre igual, ya que las diferencias en la permeabilización podrían generar variaciones aparentes en las estimaciones.
4. Valorar la actividad por duplicado, añadiendo en un tubo eppendorf: 20 µl de células permeabilizadas, 0.58 ml de buffer Z y 0.12 ml de ONPG
5. Desarrollar la reacción a 30°C durante un lapso de 5 a 60 minutos, hasta que adquiriera una coloración amarillo no muy intenso, y entonces parar la reacción con 0.3 ml de carbonato de sodio
6. Centrifugar las células por 1 minuto y leer la absorbencia del sobrenadante a 420 nm en una celda de 1 cm

Para calcular la actividad en unidades internacionales, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Actividad} = (1000 \times A_{420}) / (t \times V_c \times A_{660})$$

Donde:

t = tiempo en minutos de la reacción

V_c = volumen del cultivo sin diluir y en ml utilizado en la reacción

2.10. Análisis estadístico de los bioensayos

Para el análisis de los bioensayos se utilizó la hoja de cálculo Excel de Microsoft Office, se graficó el comportamiento de cada uno de los tratamientos donde se evaluarán dos componentes: el tratamiento (eje X) y las unidades de β-galactosidasa (eje Y). Así también se calculó la media y desviación estándar.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL *CUP1::lacZ*

3.1.1. Inducción por cobre de *CUP1*

En el primer experimento para caracterizar al promotor *CUP1* en la construcción pSAL5::*lacZ* transformada en la cepa W303-1A de levadura, se analizó el efecto de diferentes cantidades de sulfato de cobre en la fase exponencial del cultivo y muestreando a diferente tiempo de inducción.

El resultado de estos experimentos se muestran en la Figura 10, donde es importante observar que desde el momento que se añade CuSO₄ al medio, a los 15 minutos ya es posible detectar que a 200 µM se tiene la mayor inducción con 32.78 unidades de β-galactosidasa comparado con las 18.78 y 27.04 unidades que se obtienen con 100 y 500 µM de CuSO₄. Sin embargo a la hora del tratamiento, observamos que a 500 µM de CuSO₄ en el medio se obtiene la mayor inducción con 57.45 unidades y a 200 µM se tienen 54.57. A las dos horas con 200 µM de CuSO₄ se tiene una inducción de 98.43 unidades de β-galactosidasa, superior a lo mostrado por 100 µM con 63.75 unidades y 500 µM con 93.73 unidades. Lo anterior muestra que la máxima inducción de *CUP1* ensayado en la cepa W303-1A se alcanza con 200 µM de CuSO₄. Después de este valor y a juzgar por lo obtenido con 500 µM, se alcanza el límite máximo de inducción.

Mascorro-Gallardo et al (1996) probó la construcción pSAL1::lacZ en la cepa RS58 de levadura donde encontró que la máxima inducción se logra al adicionar 100 μ M de CuSO₄. La diferencia observada se debe al fondo genético, el cual puede variar en cuanto al número de copias del gen *CUP1*, así como el nivel de expresión del factor de transcripción Ace1 que se une al elemento cis de *CUP1*.

Con la información obtenida se corrobora que el promotor *CUP1* es modulable por cobre de una manera titulable y que el efecto del cobre al nivel transcripcional es muy rápido. Lo anterior concuerda con lo reportado por Butt et al (1984); donde señalan que por adición de cantidades micromolares de cobre, este promotor puede inducirse hasta 25 veces respecto a su actividad basal sin cobre.

Por su parte Hamer et al (1986) menciona que la actividad basal puede ser controlable, seleccionando la cepa hospedante adecuada, en la que el número de copias de *CUP1* y la presencia de activadores y represores afectará el nivel de expresión. La fuerza o eficiencia del promotor (el número de veces que la RNA polimerasa transcribe el gen en un periodo de tiempo determinado) es moderada para el caso del promotor *CUP1* (Butt y Ecker, 1987).

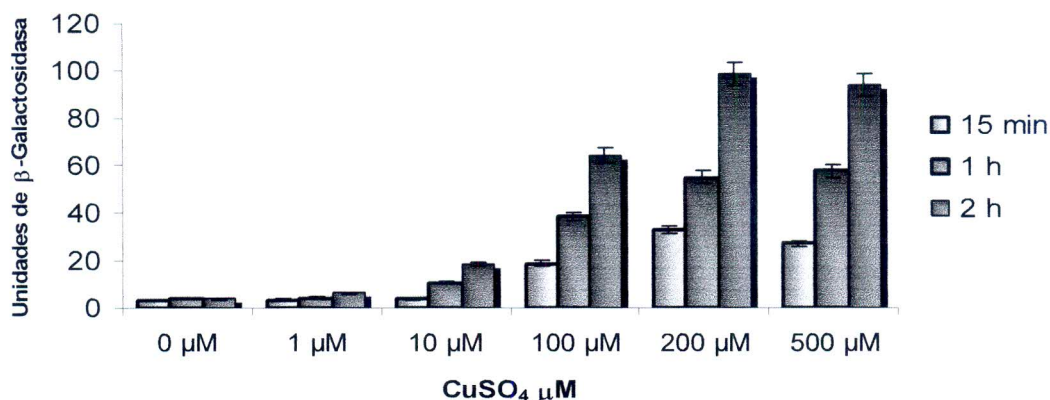


Figura 10. Inducción por cobre de *CUP1* en la construcción pSAL5::lacZ

Butt *et al* (1984) y Hamer *et al* (1985), determinaron que el fragmento BamH I-Rsa I de 431 bp, en la región 5' inmediata al gen *CUP1*, podía retener las principales propiedades de control transcripcional mostradas por el gen *CUP1*. Análisis posteriores demostraron que existen elementos *cis* de control positivo, dentro de las cuales se han caracterizado las secuencias MT-UAS ó UAS_{cup1} ubicadas en la región -274 a -193 arriba del inicio de la traducción, estas secuencias se encuentran presentes en el promotor *CUP1* (Figura 6). Se ha demostrado que estas secuencias constituyen el sitio de unión del factor de transcripción Ace1, el cual es el responsable de sensar el cobre en el medio (Thiele and Hamer, 1986; Thiele, 1988; Huibregtse *et al.*, 1989; Szczypka and Thiele, 1989). Esta regulación tan sensible y fina es posible porque el factor de transcripción Ace1, como la metalotioneína misma, es capaz de unir cooperativamente a los átomos de Cu y experimentar un cambio conformacional que incrementa su afinidad por la secuencia UAS_{cup1}, lo cual tiene como efecto un aumento en la tasa de transcripción de *CUP1* (Furst *et al.*, 1988; Furst and Hamer, 1989) (Figura. 6)

3.1.2. Efecto de la fuente de carbono

En la Figura 11, se muestran los resultados del experimento en el que las células de levadura en fase exponencial de crecimiento en medio SD (glucosa) fueron transferidas a un medio mínimo donde la fuente de carbono fue sustituida por galactosa y glicerol o glucosa de nuevo. Se observa que tras el cambio brusco en la fuente de carbono, las células que estaban en fase exponencial de crecimiento mostraron una parada del crecimiento (datos no mostrados), el crecimiento se analizó midiendo la densidad óptica del cultivo a 660 nm (OD_{660}) y la inducción de *lacZ* se midió ensayando la actividad de la β -galactosidasa en unidades arbitrarias. Solo en la fuente de carbono SD+CuSO₄ el crecimiento continuó. Esto no concuerda con lo reportado en la literatura, ya que *CUP1* tiene un elemento de represión por glucosa, y lo mostrado en la Figura 11, es lo contrario, hay mayor crecimiento y expresión de β -galactosidasa en el medio con glucosa (SD –HIS) como fuente de carbono que en los medios con una fuente diferentes (galactosa (GAL –HIS) y glicerol (GLY –HIS)).

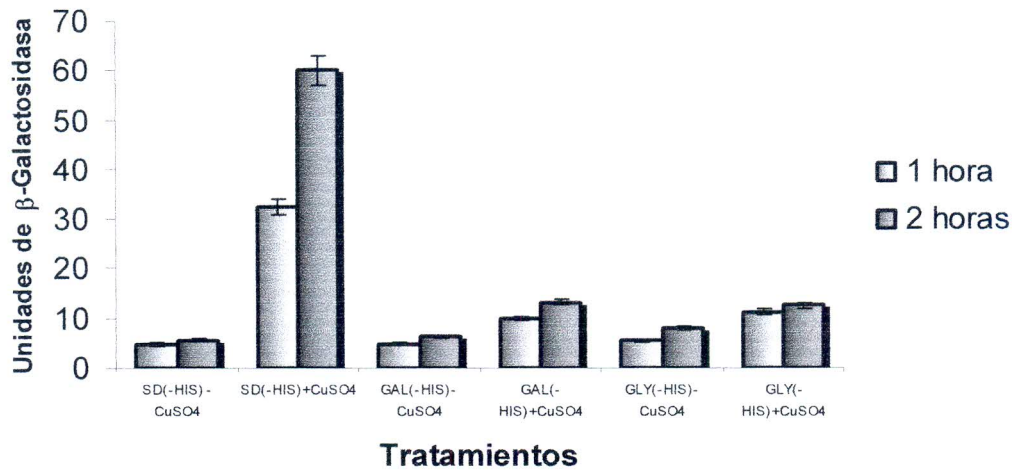


Figura 11. Efecto de la fuente de carbono sobre *CUP1* en pSAL5::lacZ (1 y 2 horas)

En la Figura 11, podemos observar la respuesta del crecimiento de la levadura por el uso de dos tipos de fuentes de carbono, una fermentable la glucosa (reprimido) y la otra no fermentable como la galactosa y el glicerol (no represión). La glucosa tiene dos efectos principales en la expresión de los genes de levadura; primero, reprime la expresión de genes como los que están involucrados en la vía respiratoria y los involucrados en la vía de utilización de galactosa y maltosa. Segundo, se activan los genes necesarios para la utilización de la glucosa, transportadores de glucosa y los usados en al vía glicolítica (De Winde, 1997). Esta es la razón de por que al cambiar de una fuente de carbono fermentable a una no fermentables, la actividad de la β -galactosidasa disminuye, ya que las células tienen que reprogramar su metabolismo de un crecimiento anaerobico a uno aerobico y el proceso toma más de las dos horas a las que se hizo la última estimación en este experimento.

Lo mostrado en esta Figura 11, concuerda con lo reportado por Martínez-Pastor (2005) donde estudió el crecimiento de dos cepas (la silvestre W303-1A y la mutante *msn2msn4*) y al transferir células en crecimiento exponencial a YPD a un medio rico (YP) con galactosa o rafinosa como fuente de carbono (YPGal o YPRaf), no se encontraron diferencias de crecimiento entre ambas cepas. 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 *msn2msn4*. Observó 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. El hecho más destacable observado en este experimento fue que el período de latencia, ya de por sí largo en la cepa silvestre, se alargaba en el doble mutante *msn2msn4* hasta unas 50 horas, más del doble que en la cepa silvestre. Sin embargo observo que una vez iniciado, el ritmo de crecimiento era similar en ambas cepas.

Al analizar la actividad de la β -galactosidasa (Figura 11) se observa que solo la fuente SD+CuSO₄ es la que muestra mayor número de unidades de β -galactosidasa, esto tal vez se debe a que las células de levadura al sufrir un cambio brusco de fuente de carbono, reprograman su metabolismo para poder hacer uso de la fuente de carbono disponible, y las células tardan en expresar

la β -galactosidasa. Se ha reportado la expresión de la fusión *GAL10::lacZ*, a través de la actividad β -galactosidasa. Donde se observó actividad de β -galactosidasa únicamente justo antes del reinicio del crecimiento y cuando se midió la actividad invertasa, se observó que los niveles de actividad invertasa eran nulos durante la mayor parte del periodo de latencia, empezando a detectarse actividad antes del reinicio del crecimiento, y alcanzándose el máximo de expresión cuando las células ya habían reasumido totalmente el crecimiento exponencial (cepa silvestre) o un poco antes, en el caso del doble mutante *msn2 msn4*. Las células no fueron 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 produjo un alargamiento del tiempo necesario para expresar el enzima. 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 (Martínez-Pastor, 2005).

En la Figura 6 se destaca, que la presencia de Cu en el medio hace que se supere la represión ejercida por la glucosa, ya que se asume que pueda existir un elemento URS de regulación negativa por glucosa entre el sitio UAS_{CUP1} y la primera caja TATA del promotor *CUP1*, según lo reportado por Thiele y Hamer (1996) y Butt y Ecker (1987).

Para completar la información sobre el efecto de la fuente de carbono en la regulación transcripcional de *CUP1*, se llevaron a cabo experimentos en los que la cepa se mantuvo desde el inicio y por varias horas (días) en las fuentes de carbono glucosa, galactosa y glicerol. Estos datos se presentan en la Figura 12, donde se puede observar que la mayor expresión se observa en glicerol, luego en dextrosa y finalmente en galactosa.

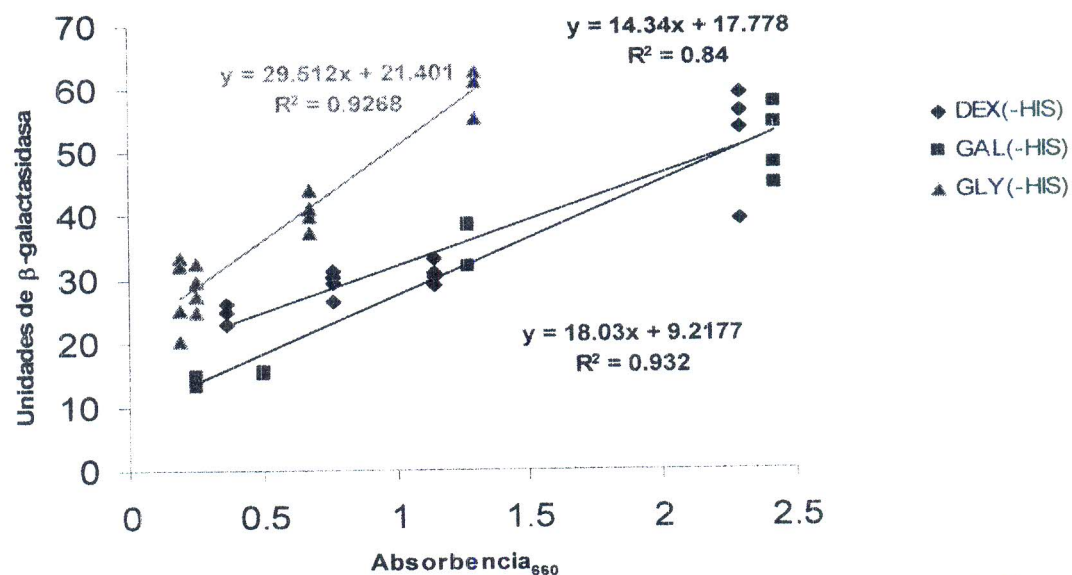


Figura 12. Inducción por fuente de carbono de *CUP1* en la construcción pSAL5::lacZ. Al medio de cultivo no se le añadió MES.

Cuando se llevan experimentos por varias horas y días con levadura, es importante amortiguar los cambios de pH en el medio. Para esto se puede añadir al medio el amortiguador MES (ácido 2-N-morfolino etano-sulfínico). El efecto del MES es impresionante, como puede verse en la Figura 13, ya que bajo estas condiciones el nivel de expresión de *CUP1*, estimado con *lacZ*, fue mayor bajo glicerol, luego galactosa y luego glucosa, incrementándose los valores de unidades de β-galactosidasa mas de 10 veces, comparando cuando

no se añadió MES. Esto se observó durante todo el tiempo que se monitoreó la actividad del promotor, lo cual incluye las fases exponencial, diáuxica y estacionaria.

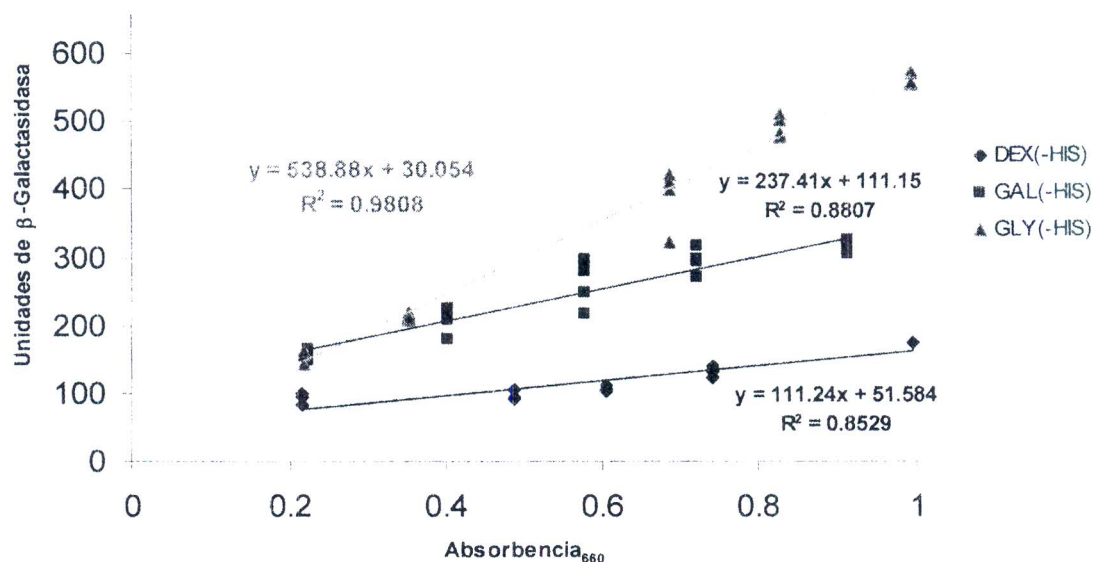


Figura 13. Inducción por fuente de carbono de *CUP1* en la construcción pSAL5::lacZ. Al medio de cultivo se le añadió MES para amortiguar el pH.

En la Figura 13, se observa que la represión por glucosa del promotor *CUP1* es muy notoria ya que bajo esta fuente de carbono la levadura expresa niveles bajos de actividad de β -galactosidasa comparados por los expresados en galactosa y glicerol. Se aprecia claramente que mientras se llega a una absorbencia de 1 medida a 660 nm para glucosa es de aproximadamente 150 unidades de β -galactosidasa, para galactosa es de aproximadamente 300 unidades, prácticamente el doble y en el caso de glicerol de 550 unidades, bastante mayor que en glucosa. Estos resultados son muy contrastantes con los obtenidos en los medios donde no se aplicó MES, ya que en glucosa la actividad de la β -galactosidasa es de tan solo apenas 28 unidades, para

galactosa aproximadamente 25 unidades y finalmente para glicerol de 50 unidades, cuando el cultivo tiene una absorbencia de 1.0.

3.1.3. Efecto de distintos tipos de estrés sobre la transcripción de *CUP1*.

3.1.3.1. Estrés oxidativo

En los diferentes experimentos donde se ensayó la construcción pSAL5::lacZ para ver el comportamiento bajo diferentes condiciones de estrés se observó que cuando en el medio se aplica peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante hay una represión de la expresión de β -galactosidasa comparado con el control; sin embargo al comparar entre H_2O_2 (con $CuSO_4$ y sin $CuSO_4$) hay mayor expresión de β -galactosidasa en presencia de cobre.

Se ha reportado que el gen *CUP1* es activado transcripcionalmente por estrés oxidativo, y la respuesta está mediada por la unión previa fosforilación de Hsf al elemento HSE. En el promotor *CUP1* se encuentran dos elementos HSE de respuesta a choque térmico (Figura 6). Sin embargo, al igual que los resultados obtenidos aquí, el peróxido no inhibe la expresión de *CUP1*, sino la menadiona. Lo anterior muestra que debe haber una vía de señalización que detecta menadiona y esto se manifiesta en la expresión de *CUP1*, lo cual no ocurre cuando se aplica el estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (Liu y Thiele, 1996).

3.1.3.2. Efecto del choque térmico.

Para probar la funcionalidad de los elementos HSE del promotor *CUP1*, se llevaron a cabo experimentos de choque térmico cultivando las levaduras en medio con dextrosa hasta la mitad de la fase exponencial y luego se aplicó un choque térmico a 37 y 39 °C por 1 y 2 horas.

En las figuras 14 y 15 puede verse que no hay una respuesta a la activación de *CUP1* a través de la actividad de la β -galactosidasa, esto mismo sucede cuando se cumplen 2 horas, lo anterior en comparación con el control que creció a temperatura de 25 °C.

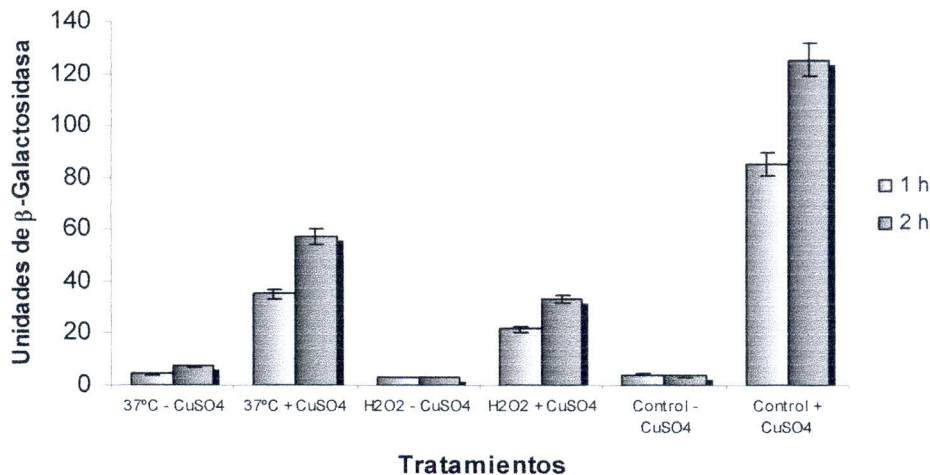


Figura 14. Inducción por estrés de *CUP1* en la construcción pSAL5::lacZ

Liu and Thiele (1996) reportaron que la transcripción de *CUP1* en respuesta a calor, carencia de glucosa y estrés oxidativo directo, requiere de el dominio carboxilo terminal localizado en Hsf. Sin embargo encontraron que en la

respuesta a estrés por calor, la transcripción de *CUP1* es transitoria ya que la respuesta esta presente entre los cinco y los cuarenta minutos de iniciado el tratamiento a una temperatura de 39°C. Es posible que a tiempos más largos como los que se estimaron aquí, prevalezca la inhibición en la síntesis de proteínas, desde el nivel de transcripción de los genes y la actividad de varias enzimas, en este caso de la β -galactosidasa.

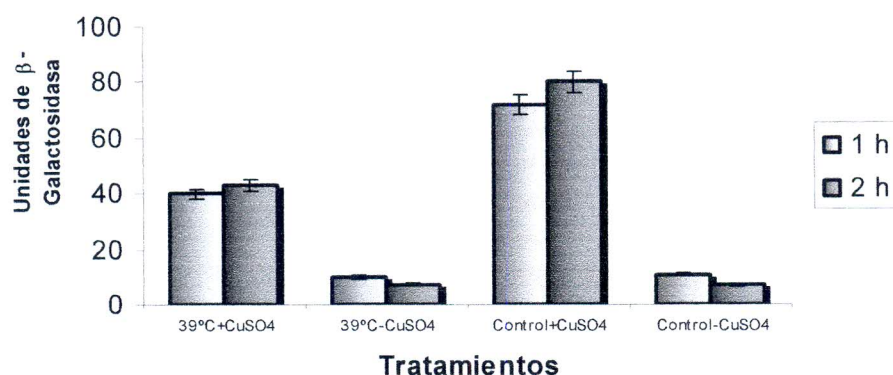


Figura 15. Inducción por choque térmico de *CUP1* en pSAL5::*lacZ*

3.1.3.4. Estrés osmótico y salino.

Se analizó el efecto del estrés salino sobre la actividad del promotor *CUP1*. Para lo anterior, se hicieron experimentos con cloruro de litio y con sorbitol. Lo anterior permite diseccionar el efecto de la sal, ya que al aplicar cloruro de sodio en cantidades elevadas, se está aplicando estrés osmótico y salino al mismo tiempo. El cloruro de litio permite ver si hay un efecto tóxico de la sal, ya que su efecto se presenta a baja osmolaridad.

Puede observarse en la Figura 16, un drástico efecto de represión del promotor *CUP1* por efecto de cloruro de litio, al comparar el nivel de expresión con cobre,

con y sin cloruro de litio. Bajo cloruro de litio, los valores de actividad prácticamente caen casi al nivel basal de expresión. Con sorbitol se observa un descenso en la actividad transcripcional de *CUP1*, lo cual es evidente hasta las 2 horas de aplicación del estrés.

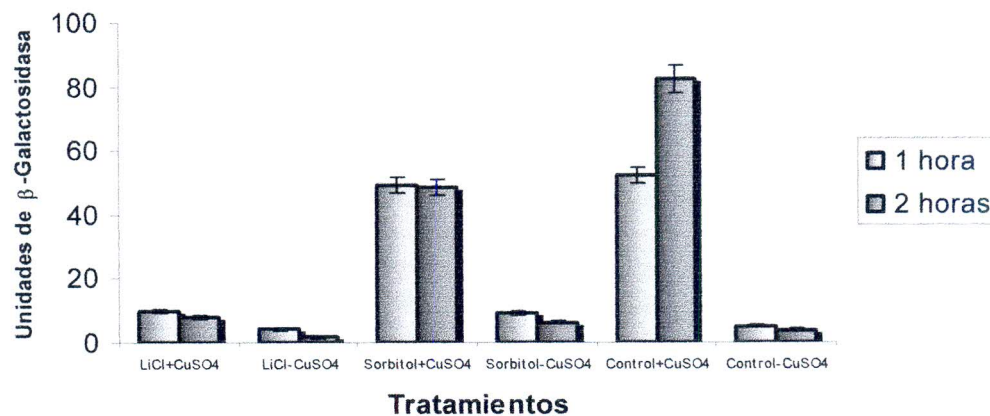


Figura 16. Efecto del estrés salino y osmótico sobre el promotor *CUP1* en la construcción pSAL5::lacZ.

El efecto negativo del LiCl en la actividad de β -galactosidasa puede deberse a que realmente la sal (el litio) afecte negativamente la transcripción mediada por *CUP1*, a través de una vía no elucidada aún. Otra alternativa es que el litio sea muy tóxico para la actividad de β -galactosidasa (efecto post traduccional). Lo anterior podría determinarse mediante experimentos de *northern blot*, en los que una caída en el ARN mensajero indicaría un efecto al nivel transcripcional, como se observa utilizando el gen reportero *lacZ*.

Cuando se estimó la actividad transcripcional de *CUP1* con la actividad de β -galactosidasa, se observa una notable represión por efecto de NaCl, en

experimentos en que el cultivo se mantuvo en dextrosa, con NaCl y con CuSO_4 por varias horas (Figura 17).

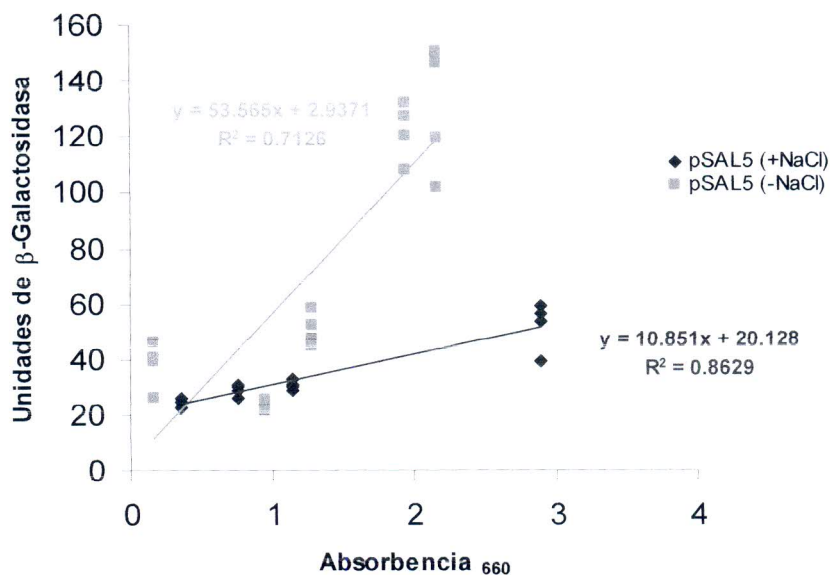


Figura 17. Efecto del NaCl sobre la expresión de *CUP1* en la construcción pSAL5::*lacZ*.

El efecto del NaCl sobre el promotor *CUP1* no se ha reportado hasta ahora, por lo cual para confirmar estos resultados, sería muy conveniente diseñar más experimentos como el anterior, en los que se aplique por separado sorbitol y LiCl, para determinar si la represión se debe a la toxicidad, o a la hiperosmolaridad. Los resultados de ambos agentes estresantes en el lapso de 1 ó 2 horas después de aplicado el estrés, parecen sugerir que el LiCl afecta más negativamente la expresión de *CUP1* que la hiperosmolaridad con sorbitol (Figura 16).

3.2. FUSIÓN TRANSCRIPCIONAL *PMA1::lacZ*

3.2.1. Fuentes de carbono

La Figura 18 muestra la respuesta de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ* cuando se cambia en fase de crecimiento exponencial, de una fuente fermentable a una no fermentable (de glucosa, a galactosa o glicerol), se aprecia que después de una o dos horas de incubación, la diferencia en la expresión de β -galactosidasa no es muy significativa, ya que prácticamente no se aprecian diferencias.

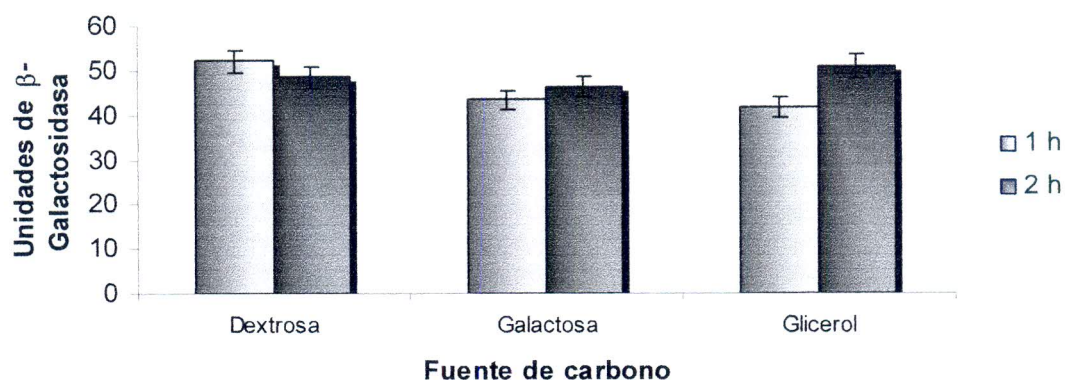


Figura 18. Efecto de la fuente de carbono sobre *PMA1* en *pRS5::lacZ* (1 y 2 horas).

Es interesante comparar este resultado con el obtenido bajo similares condiciones con el promotor *CUP1*, pues en ese caso, la expresión en glucosa fue cuatro veces mayor a las dos horas que bajo galactosa o glicerol.

También se llevó a cabo un experimento por más tiempo en las diferentes fuentes de carbono (Figura 19), y se midió el comportamiento de la β -galactosidasa en diferentes fases del crecimiento de la levadura. Se observa

menor expresión de la β -galactosidasa en condiciones de glucosa, que en el medio que contiene galactosa y glicerol.

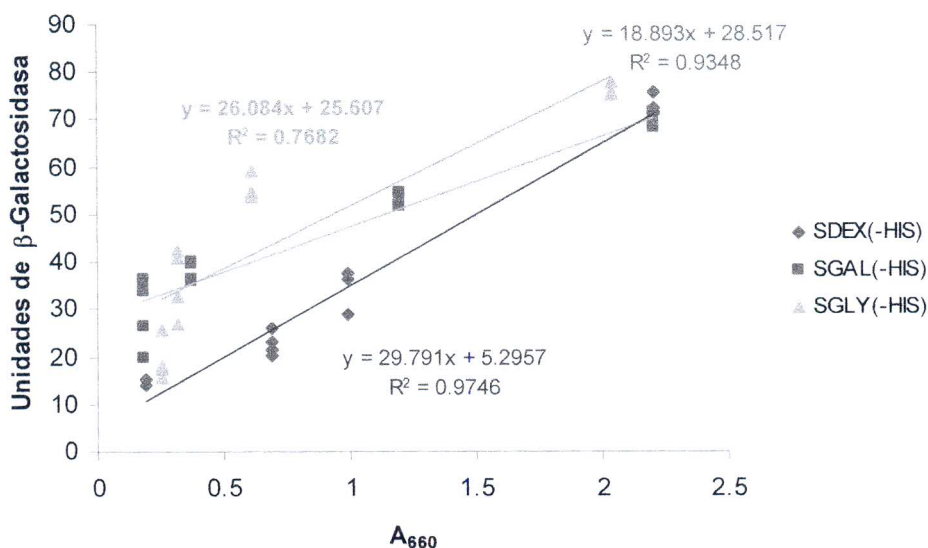


Figura 19. Inducción por fuente de carbono de *PMA1* en la construcción pRS5::lacZ. Al medio de cultivo no se le añadió MES

García-Arranz *et al.*, (1994), mencionan que en la fusión de *PMA1* con el gen reportero *lacZ*, se muestra una reducción de cerca del 60% en la actividad de β -galactosidasa, cuando la fuente de carbono es galactosa en vez de glucosa, lo cual se contrapone a los resultados aquí obtenidos. *PMA1* esta sujeto a regulación transcripcional en presencia de glucosa la cual es mediada por el factor Tuf1/Rap1 el cual responde al paso de una fuente de carbono no fermentable a azúcar fermentable como la glucosa, incrementando la expresión de *PMA1* en un lapso de 20 a 60 minutos (Rao *et al.*, 1993).

Cabe señalar que en estos experimentos no se añadió MES al medio de cultivo, lo cual pudo haber distorsionado y alterado el patrón de comportamiento normal de *PMA1*. Es necesario repetir este experimento bajo condiciones más controladas que permitan replicar lo que reporta la literatura.

3.2.2. Efecto de distintos tipos de estrés

3.2.2.1. Efecto del pH

En la figura 20, se muestran los resultados de someter a tres diferentes condiciones de pH a las células de levadura, esto aplicado en crecimiento exponencial. Los resultados muestran que no hay diferencia entre los tratamientos de pH 4.0, 6.0 y 8.0 comparado con el testigo (pH= 7.0).

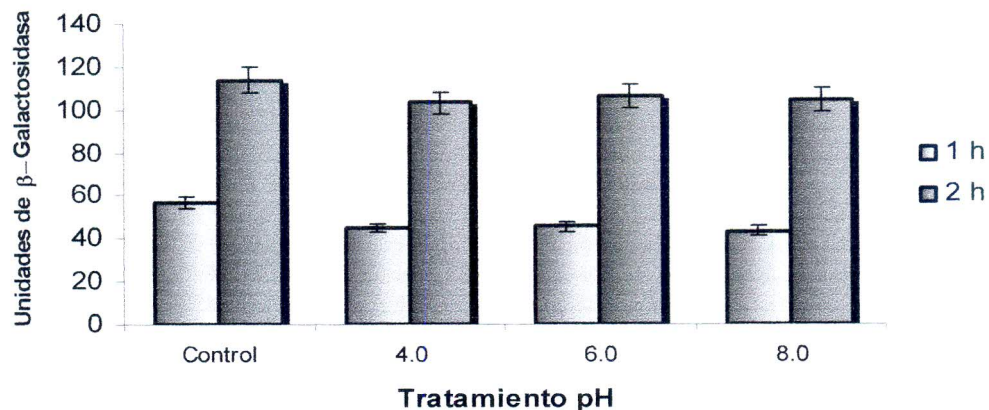


Figura 20. Efecto de pH en el promotor *PMA1* en la construcción pRS5::*lacZ*

Serrano (1991), señala que *PMA1* es regulado principalmente por dos factores: la glucosa y el pH ácido debajo de 4.0. Mientras que la glucosa activa a *PMA1* en células en fase exponencial, a través de las dos secuencias activadoras (ACCCATACA) el pH ácido activa a la H^+ -ATPasa en la fase estacionaria, en células des-reprimidas por el agotamiento de la glucosa y la acumulación de etanol y ácidos orgánicos, con la finalidad de mantener activa a la H^+ -ATPasa para que lleve a cabo su importante función de regular el pH intracelular. Tanto

el ARNm como la proteína codificada por *PMA1* permanecen constantes a lo largo del ciclo de la levadura y sólo en la fase estacionaria ocurre una disminución de ambos en el orden de un 20-40%, por lo cual *PMA1* se considera un gen de expresión constitutiva y fuerte, similar al promotor inducible por galactosa *GAL1* (Serrano, 1991).

3.2.2.2. Distintos tipos de estrés

Al probar distintas condiciones de estrés sobre *PMA1* a través de la actividad de β -galactosidasa de *lacZ*, en todos los casos, en menor o mayor medida, se observa una disminución en la actividad, comparado con el control (figura 21).

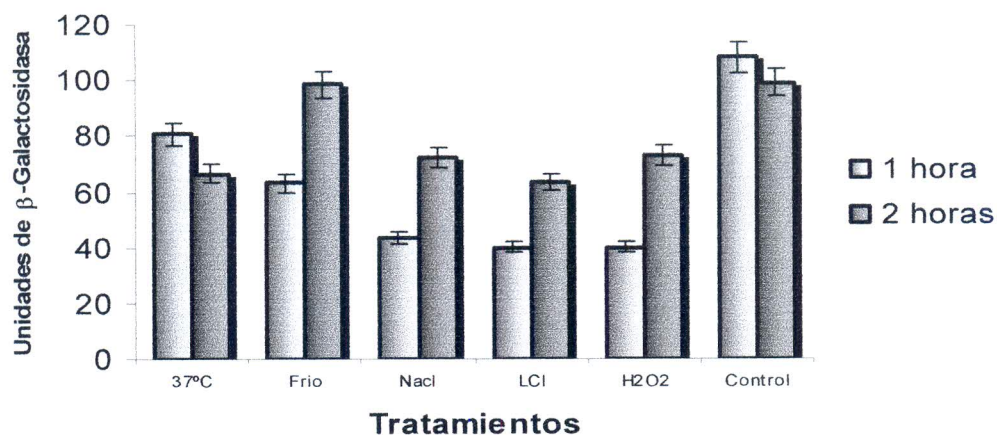


Figura 21. Inducción de *PMA1* por el estrés en la construcción pRS5::*lacZ*.

Lo anterior es un resultado interesante, que estaría mostrando que la actividad transcripcional del promotor *PMA1* es bastante estable aún bajo condiciones de estrés de diferente tipo como pueden ser el calor, frío, salino, osmótico y oxidativo, al menos bajo las condiciones probadas aquí, en tiempos de 1 y 2

horas. Los cambios ambientales bruscos, son por lo general rápidamente detectados por las células, a lo cual responden activando y desactivando genes, por lo cual estas evidencias parecerían indicar que no hay efectos drásticos de estos tipos de estrés sobre *PMA1*. Lo anterior también contrasta con la respuesta de *CUP1* a los mismos tipos de estrés en los tiempos de 1 y 2 horas, ya que este promotor, a diferencia de *PMA1*, redujo significativamente su expresión en presencia de H_2O_2 y LiCl.

3.2.2.3. Estrés por NaCl

Se llevo a cabo un experimento donde se determinó el comportamiento de *PMA1* en la construcción pRS5::*lacZ* en el medio con glucosa y cloruro de sodio. Como se aprecia en la Figura 22, hay un efecto inductivo de NaCl sobre la actividad de *PMA1*::*lacZ*. Aunque la recta de regresión ajustada bajo condiciones de NaCl muestra un buen ajuste, no así la recta que explica el comportamiento sin NaCl. Parece que en este último caso, un modelo cuadrático podría ajustar mejor a la distribución de actividades *lacZ* en las distintas etapas en que se hicieron las determinaciones.

La motivación para llevar a cabo este experimento fue que se identificó en el promotor *PMA1*, un elemento STRE, de respuesta a estrés osmótico a través de la vía de *HOG1* (Figura 7). A juzgar por este resultado, tal elemento es capaz de activar *PMA1*, pero en un tiempo mayor a las 2 horas, como queda de manifiesto en los datos de la Figura 16 y 17. Cabe señalar que el experimento

en NaCl se llevo a cabo en medio en el cual no se añade el antieogénico, por lo cual es probable que la respuesta al NaCl sea cuantitativamente mayor a la observada. De estos experimentos, puede decirse que el estrés osmótico debido a NaCl, incrementa la expresión, probablemente a través de la vía de transducción de *HOG1*, ya que el promotor *PMA1* cuenta con un elemento STRE al cual se unen los factores de transcripción Msn2Msn4 (Figura 7).

Una prueba definitiva para probar lo anterior sería la de introducir la construcción pSAL5::lacZ en la mutante *hog1*, donde se esperaría que se afecte negativamente el patrón de expresión de *CUP1* por efecto del estrés osmótico.

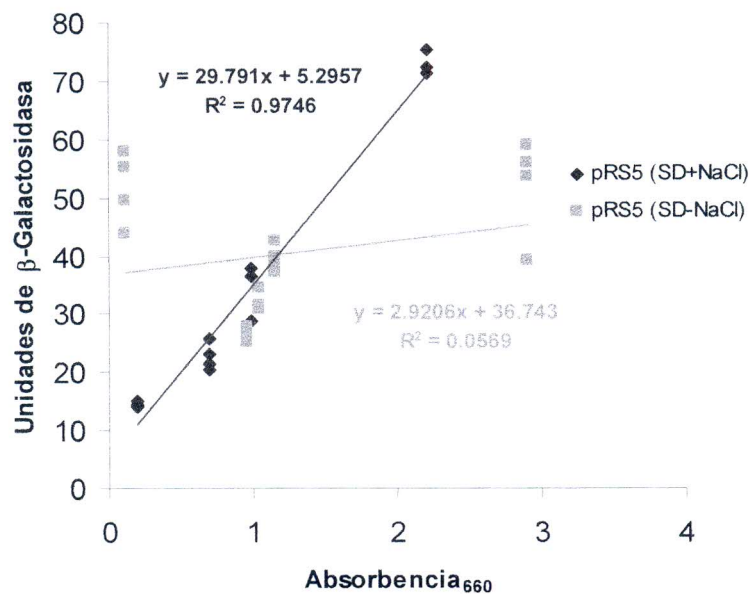


Figura 22. Efecto del NaCl sobre la expresión de *PMA1* en la construcción pRS5::lacZ

A reserva que estos datos se pudieran corroborar bajo condiciones más controladas añadiendo al medio MES, lo cual no se hizo en este experimento,

parece que el estrés osmótico o salino o la combinación de ambos contribuye a incrementar la actividad de *PMA1*, como se determinó con la fusión *PMA1::lacZ*. Esto podría tener sentido ya que *PMA1* es la bomba primaria que bombea protones hacia fuera de la célula, lo cual crea las condiciones de potencial de membrana adecuados para activar algunos de los sistemas membranales de transporte como los canales de K (Serrano, 1988). En altas concentraciones de NaCl, el ión sodio entra en la célula vía los canales de 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 K⁺, puesto que si se aumenta la relación K⁺/ Na⁺ intracelular se incrementa la tolerancia a Na⁺ (Gaxiola et al., 1992).

3.3. COMPARACIÓN ENTRE *CUP1* y *PMA1*

Es interesante comparar el comportamiento transcripcional de un promotor de expresión moderada e inducible, con la de otro de expresión constitutiva y fuerte mediante sus respectivas fusiones transcripcionales. Parece que el nivel de expresión mantenido por ambos promotores es muy similar al menos hasta la fase exponencial ($A_{660}=1.0$), lo cual se contradice con la idea que *CUP1* es un promotor moderado en comparación con *PMA1*. *CUP1* tiene la ventaja que es inducible, lo cual le dá una gran versatilidad biotecnológica.

El cuadro 6, resume las propiedades comparativas de ambos promotores según las determinaciones de este trabajo complementadas con lo reportado por otros autores.

Cuadro 6. Comparación de las propiedades de los promotores *CUP1* y *PMA1*

Factor	<i>CUP1::lacZ</i>	<i>PMA1::lacZ</i>
Expresión	inducible	constitutivo
Tiempo de inducción	15 min	20-60 min
Fuerza	moderada	fuerte
Inducción por Cu	+25	se
<i>Inducción por azúcares:</i>		
Glucosa	r+	i+
Galactosa	l	R
Glycerol	i+	R
pH	nd	se (pH 4.0-8.0)
Inducción por NaCl	r+	i+
<i>Inducción por estrés:</i>		
choque térmico	r	r ó se
Frío	nd	se
LiCl	r+	r ó se
Sorbitol	r+	r ó se
H ₂ O ₂	r+	r ó se

i = inducción leve;
i+ = inducción evidente;
r = represión leve;
r+ = represión evidente;
se = sin efecto;
nd = no determinado

Las células, incluyendo la levadura poseen genes de expresión constitutiva y otros inducibles. Genes que codifican enzimas o productos involucrados en el metabolismo del carbono muestran una inducción más lenta, mientras que los que tienen que ver con cambios ambientales bruscos y repentinos, muestran una respuesta más rápida, cuando la hay. Lo anterior pone una nota de precaución sobre la interpretación de los resultados, pues algunas veces, el hecho de no ver un efecto rápido, no excluye que en el largo plazo pueda observarse una respuesta muy diferente, como se pudo observar en los experimentos con distintas fuentes de carbono.

Si un promotor se utiliza con fines biotecnológicos, es conveniente conocer su comportamiento bajo diferentes condiciones o bajo condiciones similares a las que se presentan durante un cultivo continuo. La información generada de este trabajo permitirá hacer un uso más razonado de ambos sistemas de expresión, ya sea para expresar genes homólogos o heterólogos en la levadura para experimentos de complementación funcional, así como para la expresión y producción de proteínas recombinantes.

Esta información contribuye a la caracterización de la serie de vectores pSAL1-8 y pRS1-8 previamente construidos por Mascorro Gallardo (2000), de los cuales se cuenta con versiones mono y multicopia y con los marcadores de auxotrofia para leucina, histidina, uracilo y triptófano.

IV. CONCLUSIONES

1. El promotor *CUP1* es un sistema de expresión muy versátil y de gran utilidad biotecnológica debido a que es inducible y titulable.
2. La expresión de *CUP1* es afectada por la fuente de carbono, ya que esta es mayor en glicerol y en galactosa, mientras que glucosa reprime parcialmente.
3. La represión de *CUP1* en glucosa se compensa porque en esta fuente de carbono se alcanza una mayor biomasa en menor tiempo que en galactosa y glicerol.
4. Al amortiguar el medio de cultivo con MES, hay un efecto dramático sobre los valores de la β -galactosidasa, que se incrementan en más de diez veces, comparado con el medio sin MES.
5. La expresión de *CUP1* sufrió un descenso en un lapso de 1-2 horas después de aplicar el estrés osmótico, choque térmico, estrés oxidativo y estrés iónico.
6. En *CUP::lacZ*, el mayor efecto de represión se observó con LiCl y H₂O₂.
7. En experimentos que abarcan todo el ciclo de crecimiento de la levadura, hay un efecto notable de represión de *CUP1* por NaCl.
8. El promotor *PMA1* es de expresión constitutiva (housekeeping) fuerte, aunque al evaluarse la fuerza del promotor con la fusión *PMA1::lacZ*, dio similares resultados que con *CUP1*.

9. No pudo corroborarse la inducción de *PMA1* bajo una fuente de carbono como glucosa, comparado con galactosa y glicerol.
10. El efecto del estrés por choque térmico, frío, oxidativo, osmótico, y salino fue menos drástico en afectar la expresión de *PMA1* en comparación con *CUP1*.
11. No hubo un efecto en la expresión de *PMA1* debido al pH del medio de cultivo en el rango probado de 4.0 a 8.0
12. Al evaluar el efecto de NaCl en la expresión de *PMA1*, durante todo el ciclo de crecimiento de la levadura, se observa una inducción de este promotor por la sal, probablemente a través de la vía HOG.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

- Albertyn, J.; S. Hohmann; J. M. Thevelein; B. A. Prior. 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.
- Alderson, A., P. A. Sabelli, J. R. Dickinson, D. Cole and M. Richardson. 1991. Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon catabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3736-3740.
- Anderson, J. A., S.S. Huprikar, L.A. Kochian, W.J. Lucas and R. F. Gaber. 1992. Functional expression of a probable *A. thaliana* potassium channel in *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3736-3740.
- Ansell, R.; K., Granath; S., Hohmann; J., Thevelein; L., Adler. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺ dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* 16:2179-2187.
- Benito, B., E. Moreno and Lagunas. 1991. Half-life of the plasma membrana ATPase and its activating system in resting yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1063:265-268.
- Bissinger, P.H., Wieser, R., Hamilton, B. y Ruis, H. 1991. Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (*CTT1*) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J.*, 10, 585-592.
- Blomberg, A. 1997. Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis.* 18:1429-1440.
- Blomberg, A.; L. Adler. 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171: 1087-1092.
- Boorstein, W. R.; E. A., Craig, 1990a. Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *EMBO J.* 9:2543-2553.
- Boorstein, W. R.; E. A., Craig, 1990b. Transcriptional regulation of SSA3, an HSP70 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 3262-3267.

- Butler, G. y Thiele, D.J. 1991. *ACE2*, an activator of yeast metallothionein expression which is homologous to *SW5*. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 476-485.
- Butt, T. and D. J. Ecker. 1987. Yeast metallothionein and applications in biotechnology. *Microbiol. Rev.* 51 (3):351-364.
- Butt, T. R., E. J. Sternberg, J. A. Gorman, P. Clark, D. Hamer, M. Rosenberg and S. T. Crooke. 1984. Copper metallothionein of yeast, structure of the gene, and regulation of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:3332-3336.
- Capieaux, E., M.-L. Vignais, A. Sentenac and A. Goffeau. 1989. The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J. Biol. Chem.* 264:7437-7446.
- Chang, A. and C. W. Salyman. 1991. Maturation of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase involves phosphorylation during intracellular transport. *J. Cell Biol.* 115:289-295
- Chen, J. B., Sun and S. M. Jazwinsky. 1990. Prolongation of the yeast life span by the *v-Ha-RAS* oncogene. *Mol. Microbiol.* 4:2081-2086.
- Chiu, W. I., Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi and J. Sheen. 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr. Biol.* 6:325-330.
- 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.
- DaSarma, S., E. Tischer and H. M. Goodman. 1986. Plant glutamine synthetase complements a *glnA* mutation en *E. coli*. *Science.* 232:1242-1244.
- De Winde, J. H., J. M. Thevelein and J. Winderickx. 1997. From Feast to Famine: adaptation to nutrient depletion in yeast. *In: Yeast Stress Responses.* p. 7-52.
- Diffley, J. F. X. 1992. Global regulators of chromosome function in yeast. *Antonie Van Leeuwenhoek* 62:25-33.
- Ecker, D.J., T. R. Butt, E. J. Sternberg, M.P. Neeper, Ch. Debouck, J. A. Goan and S. T. Crooke. 1986. Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J. Biol. Chem.* 261:16895-16900.
- Elble, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13: 18-20.

- Engelberg, D., Zandi, E., Parker, C.S. and M, Karin. 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.
- Eraso, P. and C. Gancedo. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during grow. *FEBS Lett.* 224: 187-192
- Etcheverry, T., W. Forrester and R. Hitzeman. 1986. Regulation of the chelatin promoter during the expression of the human serum albumin or yeast phosphoglycerate kinase in yeast. *Biotechnology* 4:726-730.
- Foguel, S. and J. W. Welch. 1982. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Pronc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5342-5346.
- Foguel, S. W. Welch and M. Karin, 1983. Gene amplification in yeast: *CUP1* copy number regulates copper resistance. *Curr. Genet.* 7:1-9
- Folch-Mallol, J. L., A. Garay-Arroyo, F. Lleidas, A. A., C. Robles. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Int. Microbiología.* 46 (1-2):24-46.
- Fu, H. H., and S. Lua. 1998. AtKUP1: A dual-affinity K⁺ transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:63-73.
- Furst, P. and D. Hamer, 1989. Cooperative activation of a eukaryotic transcription factor: interaction between Cu(I) and yeast ACE1 protein . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:5267-5271.
- Furst, P., S. Hu, R. Hackett and D. Hamer. 1988. Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DND binding protein. *Cell* 55:705-717.
- 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.
- Gancedo, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Rev.* 62:334-361.
- Garay A., A. 1999. Caracterización de genes involucrados en la respuesta al estrés osmótico. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 53 pp.
- Garay-Arroyo., A.; A. A., Covarrubias. 1999. Three genes whose expression is induced by different stress conditions in *S. cerevisiae*. *Yeast*.

- García-Arranz, M., A. M. Maldonado, M. J. Mazón and F. Portillo. 1994. Transcriptional control of yeast plasma membrana H⁺-ATPase by glucosa. *J. Biol. Chem.* 269:18076-18082.
- 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.
- Gross, C. y K, Watson. 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.
- Hamer, D. H., D. J. Thiele and J.E. Lemontt. 1985. Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228:685-690.
- Hamer, H. 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 55:913-951.
- 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.
- 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.
- Hamilton, A. J., M. Bouzayen and D. Grierson. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7434-7437.
- Hirata, D., Harada, S., Namba, H. Miyakawa, T. 1995. Adaptation to high-salt stress in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) and cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Gen. Genet.*, 249, 257-264.
- Hirayama T., T. Maeda, H. Saito, K. Shinozaki. 1995. Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 249:127-138.

- Hohmann, S., W. Mager. 1997. Shaping up: The responses of yeast to osmotic stress. *In* S. Hohmann, W. H. Mager, ed. Yeast stress responses. Landes Company, Texas, USA.
- Jones, E. W., J. R. Pringle, and J. R. Broach. 1992. The Molecular and Cell Biology of *Saccharomyces cerevisiae*, Vol. 2. Gene Expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
- Jones, D. L., D. C. Petty, A. Hayes, E. Ragni, L. Popolo, S. G. Oliverz and L. I. Stateva. 2003. Transcriptome profiling of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with a constitutively activated Ras/cAMP pathway. *Physiol Genomics*. 16:107-118.
- Karin, M., R. Hajarian, A. Haslinger, P. Valenzuela, J. Welch and S. Fogel. 1984. Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the *CUP1* locus of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:337-341.
- Kim, E. J., J. M. Kwak, N. Uozumi and J. I. Schroeder. 1998. *AtKUP1*: An *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity. *Plant Cell*. 10:51-52.
- Ko, C.H., Buckley, A.M. y Gaber, R.F. 1990. *TRK2* is required for low affinity K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 125, 305-312.
- Kobayashi, N. and K. McEntee.. 1993. Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 248-256.
- Lee, M.G and P. Nurse. 1987. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327:31-35.
- 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.
- Lindquist, S. y Craig, E.A. 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22, 631-677.
- Liu, X. D. and D.J. Thiele. 1996. Oxidative stress induces heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes and Dev.* 10:592-603.
- 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.
- Macreadie, I.G., O. Horaitis, A.J. Verkuylen and K.W. Savin. 1991. Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu^{+2} mediated expression of foreign genes in yeast. *Gene* 104:107-111.
- 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/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.*, 382, 89-92.
- Martinez-Pastor, 2005. Regulación transcripcional de la respuesta al estrés en la levadura *saccharomyces cerevisiae*. Papel de los factores transcripcionales *msn2p* y *msn4p*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España. 155 p.
- Mascorro-Gallardo, J. O., A. A. Covarrubias and R. Gaxiola. 1996. Construction of a CUP1 promoter-based vector to modulate gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 172:169-170.
- Mascorro-Gallardo, J. O. 2000. Caracterización del Gen SITPS1 de *Selaginella lepidophylla* por complementación funcional de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos. 163 pp.
- Mett, V.L., L.P. Lochhead and P.H.S. Reynolds. 1993. Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:4567-4571.
- Minet, J., A. Wiemken and R. Aeschbacher. 1999. Trehalose and trehalase in plants: recent development. *Plant Sci.* 147:37-47.

- Pedruzzi, I., N. Bürckert, P. Egger and C. De Virgilio. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zing finger protein Gis1. *The EMBO Journal*. 19:2569-2579.
- Piper, P.W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 11, 339-355.
- Piper, P.W. 1994. Measurement of transcription. In: *Molecular Genetics of Yeast*. Pp. 135-146. J.R. Johnston (ed). IRL Press. 275 pp.
- Rao, R., D. Drummond-Barbosa and C. W. Salyman. 1993. Transcriptional regulation by glucose of the yeast PMA1 gene encoding the plasma membrane H⁺-ATPase. *Yest* 9: 1075-7084.
- Rubio, F., W. Gassmann and J. I. Shoeder. 1995. Sodium-driven potassium uptake by the plant potassium transporter Hkt1 and mutations coferring salt tolerance. *Science* 270:1660-1663.
- Schachtman, D. P. and J. I. Schroeder. 1994. Cloning, transport mechanism and localization of a high affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370:655-658.
- 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* CTT1 gene. *EMBO J.*, 13, 4382-4389.
- Sentenac, H. N. Bonneaud, M. Minet, F. Lacroute, J. M. Salmon, F. Gaymard and C. Grignon. 1992. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*. 256:663-665.
- Serrano, R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 947:1-28.
- Serrano, R. and J. M. Villalba. 1995. Expresión and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*. *Methods Cell Biol.* 50:481-496.
- Serrano, R., M.C. Kielland- Brandt and G. R. Fink. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), k⁺ and Ca⁺² -ATPases. *Nature* 319:689-693.
- Siderius, M. and 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.

- Sorber, P. K. and H. C. M. Nelson. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59:807-813.
- Sorger, P.K. 1991. Heat shock factor and heat shock response. *Cell*, 65, 363-366.
- 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.
- 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.
- Thevelein, J. M. and J. H. De Winder. 1990. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33:904-918.
- Thevelein, J. M. 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast* 10:1753-1790.
- 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.
- Thiele, D. J. and D. H. Hamer. 1986. Tandemly duplicated upstream control sequences mediate copper-induced transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* copper-metallothionein gene. *Mol. Cell Biol.* 6:1158-1163.
- Thorvaldsen, J., A. K. Sewell, Ch. L. McCowen and D. R. Winge. 1993. Regulation of metallothionein genes by the *ACE1* and *AMT1* transcription factors. *J. Biol. Chem.* 268:12512-12518.
- 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.
- 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.

- Winge, D. R., S. Foguel, G. Cathala and M. Karin. 1983. Industrial yeast display tandem gene iteration at the ACE1 and AMT1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 268:12512-12518.
- Yang, W.; W. Gahl and D. Hamer. 1991. Role of the heat shock factor in yeast metallothionein gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 11:3676-3681.
- Zentella, R., J.O. Mascorro-Gallardo, P. Vand Dijck, J. Folch-Mallol, B. Bonini, Ch. Van Vaeck, R. Gaxiola, A. A. Covarrubias, J. Nieto-Sotelo, J. M. Thevelein and G. Iturriaga. 1999. A *Selaginella lepidophylla* thehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress tolerance defects in a yeast *tps1* mutant. *Plant physiol.* 119: 1473-1482.
- Zhuo, J. and P. B. Goldsbrough. 1994. Functional homologues of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 6:876-884.

VI. ANEXO 1

EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA FUSIÓN *CUP1::lacZ*

INDUCCIÓN POR COBRE DE *CUP1* EN LA CONSTRUCCIÓN *pSAL5::lacZ*

Experimento (15 min) promotor *CUP1*

Tratamientos:	0 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M
A660	0.657	0.661	0.678	0.685	0.664	0.704
β -gal	3.17	3.17	2.94	16.37	31.25	24.45
	3.37	3.35	4.25	18.61	26.89	25.97
	3.26	3.53	4.25	20.64	34.37	28.41
	2.94	3.68	3.51	19.49	38.62	29.32
Media	3.19	3.43	3.74	18.78	32.78	27.04
Desvest	0.18	0.22	0.64	1.81	4.96	2.23

INDUCCIÓN POR COBRE DE *CUP1* EN LA CONSTRUCCIÓN *pSAL5::lacZ*

Experimento (1 hora) promotor *CUP1*

Tratamientos:	0 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M
A660	0.755	0.769	0.791	0.792	0.773	0.781
β -gal	3.95	4.33	11.52	36.63	51.18	63.77
	4.32	4.24	11.44	39.85	54.56	55.58
	3.70	4.29	10.07	36.70	57.80	54.09
	3.68	4.26	9.56	40.42	54.74	56.37
Media	3.91	4.28	10.65	38.40	54.57	57.45
Desvest	0.30	0.04	0.98	2.02	2.71	4.32

INDUCCIÓN POR COBRE DE *CUP1* EN LA CONSTRUCCIÓN *pSAL5::lacZ*

Experimento (2 horas) promotor *CUP1*

Tratamientos:	0 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	200 μ M	500 μ M
A660	0.924	0.925	0.925	0.934	0.871	0.887
β -gal	3.61	3.71	17.50	67.38	96.29	95.36
	3.75	8.24	19.26	63.33	96.67	94.86
	3.38	6.55	18.22	62.97	103.06	91.97
	4.26	6.38	18.18	61.30	97.70	92.73
Media	3.75	6.22	18.29	63.75	98.43	93.73
Desvest	0.37	1.87	0.73	2.58	3.14	1.64

Inducción de CUP1 en la construcción pSAL5::lacZ por fuentes de carbono

Experimento de Fuentes de Carbono Promotor CUP1 (1 hora)

Tratamientos:	SD(-HIS) - CuSO ₄	SDEX(- HIS)+CuSO ₄	SGAL(-HIS)- CuSO ₄	SGAL(- HIS)+CuSO ₄	SGLY(-HIS)- CuSO ₄	SGLY(- HIS)+CuSO ₄
A ₆₆₀	0.694	0.691	0.448	0.475	0.475	0.548
β-gal	5.07	25.14	4.40	11.12	4.32	7.88
	4.88	32.34	5.23	8.31	5.50	10.07
	4.65	35.73	4.28	8.31	5.33	13.28
	4.45	36.8	5.35	11.55	6.45	13.5
Media	4.76	32.50	4.82	9.82	5.40	11.18
Desvest	0.270	5.264	0.553	1.755	0.873	2.703

Inducción de CUP1 en la construcción pSAL5::lacZ por fuentes de carbono

Experimento de Fuentes de Carbono Promotor CUP1 (2 horas)

Tratamientos:	SD(-HIS) - CuSO ₄	SDEX(- HIS)+CuSO ₄	SGAL(-HIS)- CuSO ₄	SGAL(- HIS)+CuSO ₄	SGLY(-HIS)- CuSO ₄	SGLY(- HIS)+CuSO ₄
A ₆₆₀	0.856	0.841	0.478	0.494	0.498	0.578
β-gal	4.20	66.81	3.59	13.96	12.45	6.97
	5.88	55.49	6.52	13.90	5.54	13.26
	6.49	50.39	6.77	12.14	7.38	15.51
	6.30	67.04	7.69	12.68	6.82	14.59
Media	5.72	59.93	6.14	13.17	8.05	12.58
Desvest	1.043	8.339	1.774	0.905	3.034	3.854

Inducción de CUP1 en la construcción pSAL5::lacZ por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo de Fuentes de Carbono Promotor CUP1 -MES

SDEXTROSA

A ₆₆₀	0.36	0.763	1.14	2.896
β-Gal	25.97	31.23	28.9	39.1
	22.77	30.32	30.7	53.71
	24.86	26.33	33.12	58.99
	24.58	29.17	30.16	56.05
Promedio	24.55	29.26	30.72	51.96
Desvest	1.33	2.13	1.77	8.84

Inducción de CUP1 en la construcción pSAL5::lacZ por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo de Fuentes de Carbono Promotor CUP1 -MES

SGALACTOSA

A ₆₆₀	0.253	0.498	1.275	2.42
β-Gal	14.62	15.56	31.76	47.85
	14.36	15.36	38.27	44.54
	13.3	14.95	38.58	57.52
	13.38	15.36	38.58	54.13
Promedio	13.92	15.31	36.80	51.01
Desvest	0.67	0.26	3.36	5.89

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo de Fuentes de Carbono Promotor *CUP1* -MES

SGLYCEROL

A_{660}	0.189	0.249	0.676	1.296
β -Gal	20.1	27.17	39.73	62.65
	25.04	32.53	41.11	55.24
	33.5	24.63	37.24	61.11
	32.27	29.45	44.03	61.11
Promedio	27.73	28.45	40.53	60.03
Desvest	6.31	3.36	2.83	3.27

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo de Fuentes de Carbono Promotor *CUP1* +MES

SDEXTROSA

A_{660}	0.416	0.588	0.805	0.942	1.560
β -Gal	72.59	84.8	93.32	101.19	72.82
	83.17	82.65	91.30	98.53	74.52
	88.78	83.78	96.58	101.19	74.44
	73.44	80.38	86.33	104.24	74.44
Promedio	79.50	82.90	91.88	101.29	74.06
Desvest	7.83	1.90	4.29	2.33	0.82

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo de Fuentes de Carbono Promotor *CUP1* -MES

SGALACTOSA

A_{660}	0.223	0.403	0.577	0.721	0.913	2.40
β -Gal	146.66	180.07	287.93	271.18	301.36	77.94
	151.21	221.83	248.00	315.27	304.10	74.35
	151.51	207.27	217.60	297.22	303.56	75.51
	165.45	224.90	296.60	292.01	305.47	77.69
Promedio	153.71	208.52	262.53	293.92	303.62	76.37
Desvest	8.14	20.46	36.68	18.14	1.71	1.73

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo de Fuentes de Carbono Promotor *CUP1* -MES

SGLYCEROL

A_{660}	0.189	0.249	0.676	1.296
β -Gal	20.1	27.17	39.73	62.65
	25.04	32.53	41.11	55.24
	33.5	24.63	37.24	61.11
	32.27	29.45	44.03	61.11
Promedio	27.73	28.45	40.53	60.03

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por estrés

Experimento de Estrés Promotor *CUP1* (1 hora)

Tratamientos:	37°C - CuSO ₄	37°C + CuSO ₄	H ₂ O ₂ - CuSO ₄	H ₂ O ₂ + CuSO ₄	Control - CuSO ₄	Control + CuSO ₄
A ₆₆₀	1.316	0.93	0.774	0.73	0.899	0.866
β-gal	4.44	44.9	3.25	17.02	4.15	83.29
	4.44	36.89	3.43	21.62	4.21	67.66
	4.1	30.45	2.6	24.55	3.39	90.37
	4.22	28.42	3.02	23.48	4.17	98.53
Media	4.30	35.17	3.08	21.67	3.98	84.96
Desvest	0.169	7.427	0.358	3.326	0.394	13.108

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por estrés

Experimento de Estrés Promotor *CUP1* (2 horas)

Tratamientos:	37°C - CuSO ₄	37°C + CuSO ₄	H ₂ O ₂ - CuSO ₄	H ₂ O ₂ + CuSO ₄	Control-CuSO ₄	Control+CuSO ₄
A660	1.622	1.402	0.932	0.824	1.672	1.424
β-gal	7.05	68.9	2.66	29.49	3.34	123.59
	7.03	59.55	2.6	35.07	3.41	114.6
	7.34	55.84	3.08	33.98	3.45	137.07
	7.72	43.93	2.86	33	3.36	125.28
Media	7.29	57.06	2.80	32.89	3.39	125.14
Desvest	0.323	10.332	0.217	2.416	0.050	9.235

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por estrés

Experimento de Estrés Promotor *CUP1* (1 hora)

Tratamientos:	39°C+CuSO ₄	39°C-CuSO ₄	Control+CuSO ₄	Control-CuSO ₄
A660	0.470	0.448	0.427	0.360
β-gal	34.06	9.76	86.72	13.05
	43.13	8.61	69.72	10.18
	39.14	9.86	67.02	9.07
	43.26	10.79	63.6	10.9
Media	39.90	9.76	71.77	10.8
Desvest	4.34	0.89	10.28	1.68

Inducción de *CUP1* en la construcción *pSAL5::lacZ* por estrés

Experimento de Estrés Promotor *CUP1* (1 hora)

Tratamientos:	39°C+CuSO ₄	39°C-CuSO ₄	Control+CuSO ₄	Control-CuSO ₄
A660	0.587	0.634	0.657	0.549
β-gal	48.34	7.73	106.67	7.93
	49.07	7.85	76.34	6.64
	32.54	6.25	78.8	5.78
	41.94	7.42	58.2	6.86
Media	42.97	7.31	80.00	6.80
Desvest	7.66	0.73	20.01	0.88

Inducción de *CUP1* en la construcción pSAL5:*lacZ* por estrés

Experimento de Estrés Promotor *CUP1* (1 hora)

Tratamientos:	LiCl+CuSO ₄	LiCl-CuSO ₄	Sorbitol+CuSO ₄	Sorbitol-CuSO ₄	Control+CuSO ₄	Control-CuSO ₄
A660	0.952	0.71	0.427	0.403	0.808	0.908
β-gal	10.86	3.80	51.69	8.05	53.82	6.08
	9.56	3.40	50.08	8.24	49.32	4.83
	9.27	4.73	46.84	9.09	55.96	5.00
	9.56	4.35	46.84	11.52	49.32	4.79
Media	9.81	4.07	48.86	9.23	52.11	5.18
Desvest	0.71	0.59	2.43	1.60	3.33	0.61

Inducción de *CUP1* en la construcción pSAL5:*lacZ* por estrés

Experimento de Estrés Promotor *CUP1* (2 horas)

Tratamientos:	LiCl+CuSO ₄	LiCl-CuSO ₄	Sorbitol+CuSO ₄	Sorbitol-CuSO ₄	Control+CuSO ₄	Control-CuSO ₄
A660	1.074	1.12	0.792	0.517	1.342	1.548
β-gal	10.27	1.61	59.79	5.23	83.79	3.47
	5.94	2.24	53.33	7.51	62.13	3.85
	7.09	1.47	34.74	6.06	89.55	3.80
	8.30	0.87	46.96	6.22	93.35	4.28
Media	7.90	1.55	48.71	6.26	82.21	3.85
Desvest	1.85	0.56	10.68	0.94	13.95	0.33

Inducción de *CUP1* en la construcción pSAL5:*lacZ* por estrés (SDEX –NaCl y +NaCl)

Experimento de SDEX+NaCl

A660	0.360	0.763	1.14	2.896
β-Gal	25.97	31.23	28.9	39.1
	22.77	30.32	30.7	53.71
	24.86	26.33	33.12	58.99
	24.58	29.17	30.16	56.05
Promedio	24.55	29.26	30.72	51.96
Desvest	1.33	2.13	1.77	8.84

Inducción de *CUP1* en la construcción pSAL5:*lacZ* por estrés (SDEX –NaCl y +NaCl)

Experimento de SDEX-NaCl

A660	0.163	0.947	1.284	1.94	2.16
β-Gal	40.24	21.43	58.35	126.80	101.44
	39.01	22.17	44.34	131.95	119.42
	26.25	22.8	47.45	107.98	146.37
	46.13	25.59	52.44	119.84	150.14
Promedio	37.91	23.00	50.65	121.64	129.34
Desvest	8.37	1.82	6.13	10.37	23.09

VII. ANEXO 2

EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LA FUSIÓN *PMA1::lacZ*

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento Fuentes de carbono (1 hora)-

	Dextrosa	Galactosa	Glicerol
A_{660}	0.902	0.788	0.766
β -Gal	53.57	45.53	32.49
	50.69	42.70	42.16
	50.45	40.07	44.77
	53.41	45.24	47.38
Media	52.03	43.39	41.70
Desvest	1.69	2.55	6.50

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento Fuentes de carbono (2 horas)-

	Dextrosa	Galactosa	Glicerol
A_{660}	1.39	0.855	0.794
β -Gal	57.49	42.21	51.16
	33.42	41.76	42.82
	52.18	53.82	51.93
	50.24	46.44	57.46
Media	48.33	46.06	50.84
Desvest	10.40	5.59	6.04

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo Fuentes de carbono (-MES)-

SDEXTROSA

	Dextrosa	Galactosa	Glicerol	
A_{660}	0.189	0.689	0.989	2.208
β -Gal	13.9	25.93	28.9	72.2
	13.9	23.23	28.9	71.14
	14.23	21.36	37.75	71.42
	15.23	20.33	36.53	75.37
Promedio	14.32	22.71	33.02	72.53
Desvest	0.63	2.46	4.78	1.94

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo Fuentes de carbono (-MES)-

SGALACTOSA

A_{660}	0.179	0.37	1.2	2.204
β -Gal	26.43	35.81	52.0	69.13
	36.2	36.35	52.11	71.55
	33.71	39.45	51.44	68.38
	19.92	40.13	54.33	68.07
Promedio	29.07	37.94	52.47	69.28
Desvest	7.37	2.17	1.27	1.58

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ* por fuentes de carbono

Experimento a largo plazo Fuentes de carbono (-MES)-

SGLYCEROL

A_{660}	0.253	0.321	0.611	2.04
β -Gal	18.31	26.98	53.53	75.49
	25.69	32.76	59.13	75.32
	17.39	42.63	54.48	75.28
	15.81	41.04	54.59	77.77
Promedio	19.30	35.85	55.43	75.97
Desvest	4.38	7.33	2.51	1.21

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ*

Experimento pH (1 hora)

	Control	4.0	6.0	8.0
A_{660}	1.328	1.246	1.228	1.33
β -Gal	50	39.15	40.73	39
	58.3	43.87	44.19	41.16
	55.7	50.8	47.04	49.34
	61.41	45.68	50.3	43.23
Media	56.35	44.88	45.57	43.18
Desvest	4.84	4.81	4.08	4.45

Inducción de *PMA1* en la construcción *pRS5::lacZ*

Experimento pH (2 horas)

	Control	4.0	6.0	8.0
A_{660}	1.806	1.792	1.172	1.79
β -Gal	113.17	112.23	126.76	130.05
	115.61	89.52	127.93	101.89
	112.07	104	78.63	91.28
	114.29	107.05	91.78	94.52
Media	113.79	103.20	106.28	104.44
Desvest	1.52	9.73	24.92	17.64

Inducción de *PMA1* en la construcción pRS5::*lacZ* por estrés

Experimento estrés (1 hora)

Tratamientos:	37°C	Frio	NaCl	LCI	H ₂ O ₂	Control
A660	0.869	0.653	0.657	0.76	0.614	0.793
β -Gal	100.34	61.13	47.5	45.4	36.48	116.2
	73.76	63.29	43.75	37.7	38.87	102.14
	73.76	65.77	33.9	41.22	34.09	108.4
	74.68	61.75	48.93	35.96	39.73	105.4
Media	80.635	62.985	43.52	40.07	37.2925	108.035
Desvest	13.144	2.067	6.775	4.173	2.539	6.014

Inducción de *PMA1* en la construcción pRS5::*lacZ* por estrés

Experimento estrés (2 horas)

Tratamientos:	37°C	Frio	NaCl	LCI	H ₂ O ₂	Control
A660	1.53	0.704	0.84	1.246	0.679	1.496
β -Gal	69.86	94.78	79.89	59.1	70.21	105.16
	64.19	94.62	58.59	64.82	70.86	92.57
	65.57	103.47	67.59	50.62	75.61	94.2
	66.52	100.63	82.53	78.3	75.12	104.01
Media	66.535	98.375	72.15	63.21	72.95	98.985
Desvest	2.414	4.400	11.140	11.629	2.808	6.517

Inducción de *PMA1* en la construcción pRS5::*lacZ* por estrés (-NaCl y +NaCl)

Experimento (+NaCl)

A660	0.189	0.689	0.989	2.208
β -Gal	13.9	25.93	28.9	72.2
	13.9	23.23	28.9	71.14
	14.23	21.36	37.75	71.42
	15.23	20.33	36.53	75.37
Promedio	14.32	22.71	33.02	72.53
Desvest	0.63	2.46	4.78	1.94

Inducción de *PMA1* en la construcción pRS5::*lacZ* por estrés (-NaCl y +NaCl)

Experimento (-NaCl)

A660	0.118	0.964	1.048	1.148	2.896
β -Gal	57.88	25.10	30.91	38.79	39.1
	43.81	25.68	34.44	37.28	53.71
	55.32	27.80	31.48	39.81	58.99
	49.56	27.59	31.29	42.39	56.05
Promedio	51.64	26.54	32.03	39.57	51.96
Desvest	6.27	1.35	1.62	2.15	8.84