



---

---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO- BIOLÓGICAS**

“Participación de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Iku1p en la  
tolerancia a etanol de *Saccharomyces cerevisiae*”

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA:**

**I. B. LUIS ALBERTO MADRIGAL PÉREZ**

**ASESOR: D. C. JESÚS CAMPOS GARCÍA**

**MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO DE 2010.**

# ÍNDICE

No.	Título	Pág.
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
	1. GENERALIDADES	1
	1.1 Fermentación	1
	1.2 Fermentación alcohólica	1
	1.3 El etanol	2
	2. MICROORGANISMOS FERMENTADORES	3
	3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA CON LEVADURAS	3
	3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
	4. ESTRÉS POR ETANOL	5
	4.1 Tolerancia al etanol	6
	a) Cambios en la membrana plasmática	6
	b) Sistema de respuesta a estrés oxidativo	7
	c) Aumento de la actividad ATPasa de la membrana plasmática	8
	d) Proteínas de respuesta a condiciones de estrés	8
	5. CHAPERONAS MOLECULARES	10
	5.1 Familia Hsp70	11
	5.2 Cochaperonas (proteínas J)	13
	6. SISTEMA HscA /HscB	14
	6.1 Sistema Ssq1p/ Jac1p en <i>S. cerevisiae</i>	16
	7. GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADOS EN EL ENSAMBLAJE DE GRUPOS Fe-S	16
<b>II</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>20</b>
<b>III</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>IV</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>V</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
	Objetivo general	21
	Objetivos específicos	22
<b>VI</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
	1. PLÁSMIDOS Y CEPAS	23

2. MEDIOS DE CULTIVO	24
2.1 Medio Luria Bertani (LB)	24
2.2 Medio YPD	25
2.3 Medio de selección de mutantes auxótrofos a uracilo (SC+5-FOA)	25
2.4 Medio mínimo de selección de protótrofos (SC-U)	26
2.5 Medios de almacenamiento	26
3. MÉTODOS	27
3.1 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	27
3.1.1 Aislamiento de plásmidos por lisis alcalina	27
3.1.2 Extracción del ADN total de levaduras	28
3.1.3 Electroforesis en gel de agarosa	29
3.1.4 Tratamiento enzimático de moléculas del ADN (restricción con endonucleasas)	30
4. SELECCIÓN DE MUTANTES AUXÓTROFAS A URACILO	30
5. TRANSFORMACIÓN	31
5.1 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	31
5.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	31
5.3 Preparación de células electrocompetentes de levadura	32
5.4 Transformación de las células electrocompetentes de la levadura UMARN3.3 (Ura <sup>-</sup> )	32
5.5 Selección de levaduras transformantes	33
6. ANÁLISIS DE TOLERANCIA A ETANOL	33
6.1 Curvas de crecimiento	33
6.2 Cinéticas de crecimiento	34
6.3 Análisis de viabilidad	34
6.4 Diluciones en caja	34
7. PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS CON LA MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	35
7.1 Extracción de proteínas totales por lisis alcalina	35
7.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford	36
7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones	37

	desnaturalizantes (SDS- PAGE)	
	7.3.1 Gel separador al 10 %	37
	7.3.2 Gel concentrador al 4 %	37
	7.3.3 Preparación de la muestra y de los marcadores de peso molecular	38
	7.3.4 Tinción de azul de Coomassie	38
	7.4 Western blot	39
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>41</b>
	1. OBTENCIÓN DE LA MUTANTE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AUXÓTROFA A URACILO	41
	2. OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES CON LOS DERIVADOS DE pYES2	43
	2.1 Identificación de cepas transformantes por aislamiento del ADN	43
	3. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Ssq1p, Jac1p e Iku1p	46
	3.1 Análisis por SDS- PAGE	46
	3.2 Análisis por Western blot	48
	4. TOLERANCIA A ETANOL EN LAS CEPAS RECOMBINANTES DE UMARN3.3	49
	4.1 Curvas de tolerancia a etanol	49
	4.2 Cinéticas de crecimiento	54
	4.3 Análisis de la viabilidad celular de estrés por etanol	57
<b>VIII</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>IX</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>X</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>XI</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>69</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Pág.
1	Fermentación alcohólica por la ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)	2
2	Ciclo funcional de las chaperonas Hsp70	13
3	Organización de los genes pertenecientes al grupo <i>isc</i>	15
4	Modelo para la biogénesis de proteínas con centros Fe-S en <i>S. cerevisiae</i>	18
5	Función y localización de proteínas Fe-S en eucariotes	19
6	Mapa de plásmido pYES2, empleado para clonar los genes <i>SSQ1</i> , <i>JAC1</i> e <i>ISU1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	24
7	Esquema representativo de orden para la transferencia en cámara de transferencia semi-húmeda	39
8	Acción de la Uridin-monofosfato sintasa (UMPSasa), en presencia del análogo al ácido orótico, el 5-FOA	41
9	Crecimiento en placa de cepas auxótrofas a uracilo.	42
10	Corrimiento electroforético en un gel de agarosa del aislamiento del ADN total de la cepa transformante de la cepa UMARN3.3-SSQ1 (Ura <sup>+</sup> )	43
11	Corrimiento electroforético en un gel de agarosa del aislamiento del ADN total de una cepa transformante de la cepa de <i>E. coli</i> TOP10 con el plásmido pYES2-SSQ1	44
12	Análisis de restricción del ADN extraído de cepas transformantes de <i>E. coli</i> TOP10 por corrimiento electroforético en gel de agarosa	45
13	Análisis de la expresión de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p	47
14	Análisis por Western blot de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p	48

<b>15</b>	Efecto del etanol en el crecimiento de las cepas UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2, mediante diluciones en caja	<b>50</b>
<b>16</b>	Efecto del etanol en el crecimiento de las cepas UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1, UMARN3.3-pYES2.	<b>51</b>
<b>17</b>	Efecto del etanol sobre el crecimiento de las cepas, UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2.	<b>53</b>
<b>18</b>	Cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés por etanol de las cepas UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2.	<b>54</b>
<b>19</b>	Efecto de la concentración de etanol en la viabilidad de las cepas transformantes	<b>57</b>
<b>20</b>	Modelo de la participación de las proteínas Isu1p y Jac1p en la tolerancia a etanol de <i>S. cerevisiae</i> .	<b>57</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Pág.
1	Chaperonas moleculares relacionadas en sistemas de respuesta a estrés.	10
2	Cepas y plásmidos empleados en el trabajo	23
3	Datos cinéticos de viabilidad en condiciones de estrés por etanol.	56
4	Datos cinéticos en condiciones de estrés por etanol	58

## RESUMEN

La biogénesis de proteínas con centros Fe-S es uno de los procesos metabólicos más conservados entre los organismos. En lo que respecta a las levaduras, este proceso se lleva a cabo por un grupo de proteínas codificadas en un conjunto de genes denominados *isc* (iron-sulphur-cluster), entre los que se encuentran los genes *SSQ1*, *JAC1* e *ISU1*. Las proteínas con centros Fe-S están implicadas en gran número de procesos celulares como: fosforilación oxidativa, ciclo de Krebs, replicación y reparación del ADN, biosíntesis de aminoácidos, entre otros. Es debido al gran número de procesos metabólicos esenciales dependientes, que la biogénesis de centros Fe-S resulta ser una ruta metabólica mitocondrial esencial para la viabilidad celular, por lo menos en levaduras.

El objetivo de éste trabajo fue evaluar la participación de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p, sobre la tolerancia a etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

Se realizó la transformación de la cepa mutante de *S. cerevisiae* UMARN3.3 (Ura<sup>-</sup>). Esta cepa se transformó con los plásmidos pYES2-SSQ1 (HIS) WT, pYES2-JAC1 (HIS) WT, pYES2-ISU1 (HIS) WT y pYES2. La transformación con estos plásmidos generó las cepas UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2. La identificación de las proteínas codificadas por los genes clonados (Ssq1p, Jac1p e Isu1p) se realizó por Western blot.

Con la certeza de tener las cepas transformantes con la correcta expresión de sus proteínas recombinantes, se hicieron los análisis de tolerancia a etanol mediante pruebas con concentraciones crecientes de etanol. Los resultados mostraron que las cepas UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-JAC1 presentaron un mejor crecimiento ante el estrés por etanol, esto en comparación con la cepa UMARN3.3-SSQ1 y el control con el vector. En presencia de una concentración de 10 % de etanol se encontró una  $\mu_{MAX}$  2.5 veces incrementada y un tiempo de duplicación 2 veces menor en las cepas UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-JAC1, comparadas con la cepa control.

Con lo anterior se obtuvo evidencia que indica que las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p están implicadas en la tolerancia a etanol en *S. cerevisiae*, sugiriendo que el ciclo funcional de la chaperona Ssq1p es favorecido por la sobre-expresión de las proteínas Jac1p e Isu1p, permitiendo hacer más eficiente la producción de proteínas con centros Fe-S.





# I.INTRODUCCIÓN

## 1. GENERALIDADES

### 1.1 Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico presente en los organismos vivos que generalmente se lleva a cabo en ausencia de oxígeno. Bioquímicamente, se puede definir a la fermentación como un conjunto de reacciones catabólicas que conducen a la generación de ATP y NADH, donde los compuestos orgánicos sirven tanto de donadores primarios como de aceptores finales de electrones en este proceso. La producción de ATP es mediante la fosforilación a nivel sustrato, en la cual adicionalmente existe acumulación de diversos compuestos orgánicos (etanol, ácido acético, ácido láctico, etc.) llamados productos de fermentación (López-Álvarez, 2007).

### 1.2 Fermentación alcohólica

La vía por la cual se lleva a cabo la fermentación alcohólica que comienza con el catabolismo de la glucosa se denomina ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y puede ser dividida en dos fases (Fig. 1). La primera es una serie de reacciones preparatorias que no implican oxidación-reducción y que conducen a la producción del intermediario clave, el gliceraldehído-3-fosfato. En la segunda parte tienen lugar reacciones de oxidación-reducción, se produce energía en forma de ATP y son liberados los productos de fermentación; en el caso de la fermentación alcohólica se producen principalmente etanol y CO<sub>2</sub>. Por esta ruta metabólica se producen dos moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras en el ciclo de Krebs se producen 38 moléculas de ATP; energéticamente la fermentación alcohólica no es la opción más favorable para las células, sin embargo, el etanol producido es un potente inhibidor del crecimiento para la mayoría de los organismos, lo que ayuda a evitar la competitividad por los nutrientes. La fermentación alcohólica la pueden llevar a cabo bacterias y levaduras, siendo éstas últimas las más utilizadas para este proceso (López-Álvarez, 2007).

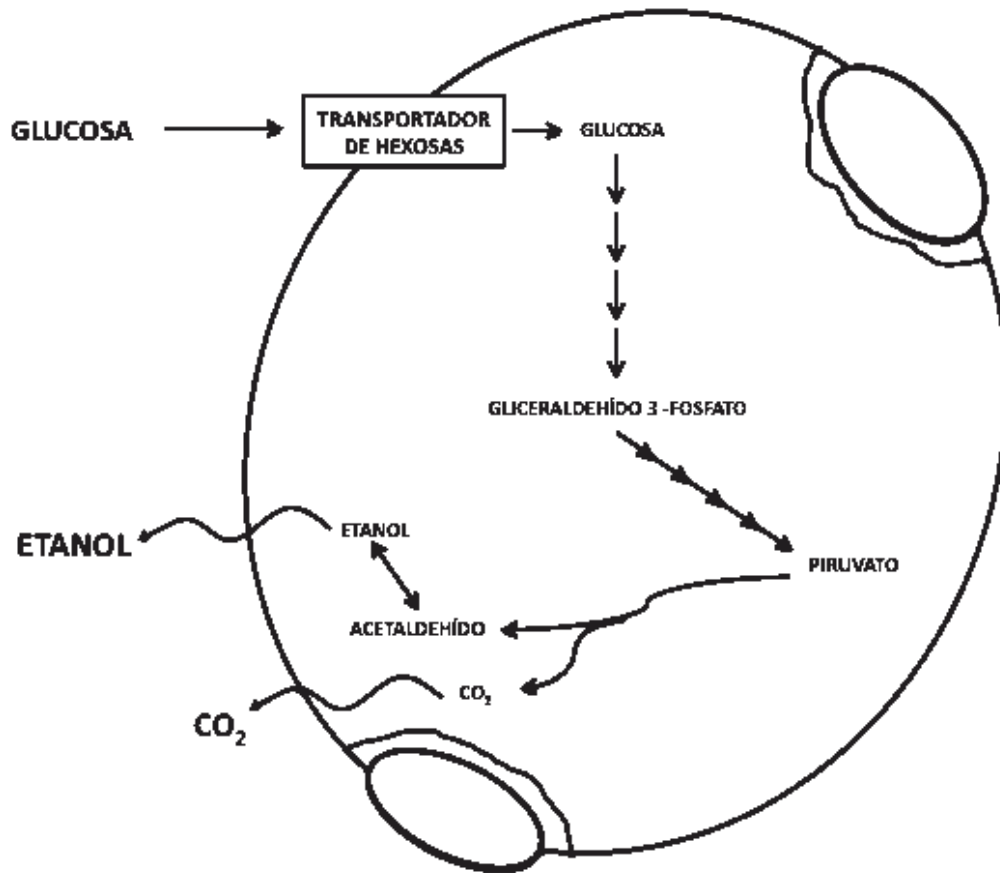


FIGURA 1. Fermentación alcohólica por la ruta metabólica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).  
Los detalles se describen en el texto.

### 1.3 El etanol

El alcohol etílico o etanol se clasifica como un alcohol primario monohídrico. Es un líquido incoloro, volátil, inflamable y con cierto grado de toxicidad, de sabor quemante y un olor agradable que le es característico. Es soluble en agua, tiene punto de fusión de  $-115\text{ }^{\circ}\text{C}$ , un punto de ebullición de  $78.3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una densidad relativa de  $0.789\text{ g/L}$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Morrison y Boyd, 1996).

El etanol se obtiene generalmente por fermentación de azúcares y es el alcohol mayoritario en las bebidas alcohólicas. La síntesis de etanol en forma de

vino, mediante la fermentación de los azúcares de los jugos de fruta, fue probablemente el primer logro del hombre en el campo de la síntesis orgánica (Solomons, 2000).

## 2. MICROORGANISMOS FERMENTADORES

Tradicionalmente el etanol ha sido producido en fermentaciones con especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. Carlsbergensis* (variedad *uvarum*), *Candida sp.*, *Kluyveromyces sp.* y en el caso de las bacterias podemos mencionar a *Zymomonas mobilis*, *Clostridium sp.*, *Thermoanaerobium brockii*, (Glazer y Hiroshi, 1993).

## 3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA CON LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares ubicuos de formas muy variadas, desde los esféricos, ovoides y elipsoidales. Hasta el momento se conocen más de 1500 especies de levaduras, divididas en 141 géneros (Kurtzman y col., 2007). Viven como saprófitas en plantas, materia animal, donde catabolizan preferencialmente azúcares, aunque también polioles, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos como fuentes de carbón y energía. Para descomponer de mejor manera sus sustratos, muchas levaduras toman un papel activo en la formación de filamentos o pseudohifas y produciendo enzimas hidrolíticas, propiedades que hacen a estas especies potencialmente patogénicas para plantas y animales, incluyendo humanos.

Las levaduras al igual que una larga serie de otros microorganismos viven libres e independientes en la naturaleza, se encuentran en las frutas, los granos y otras materias nutritivas que contienen azúcares y en el suelo (especialmente en los viñedos y en los huertos), en el aire, en la piel y en el intestino de los animales.

Son organismos generalmente aerobios, algunas especies son fermentadoras siendo anaerobias facultativas, teniendo la capacidad de intercalar la respiración con la fermentación, incluso pueden llevar ambos metabolismos al

mismo tiempo; por ejemplo, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y unos pocos géneros más.

Son fermentadores enérgicos de los azúcares, aunque detienen su crecimiento y multiplicación por intolerancia a los mismos productos de la fermentación. *Dekkera* su anamorfo *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces bailii* y algunas otras, fermentan glucosa más rápidamente bajo condiciones aerobias que anaerobias, lo que se conoce como el efecto Custer. Sólo unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y oligosacáridos pueden ser fermentados por las levaduras, pero el rango de compuestos que pueden asimilar es mucho más amplio incluyendo además, pentosas, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y glucósidos. Sólo *Schwanniomyces*, *Lypomyces* y *Saccharomyces diastaticus* (una variedad de *S. cerevisiae*) pueden hidrolizar el almidón, otras poseen actividad pectolítica (Jacques y col., 2003). Las levaduras se dividen en tres tipos en base al metabolismo de la glucosa y su regulación: las levaduras Crabtree-positivas, como *S. cerevisiae*, que son sensibles a las concentraciones de glucosa y producen alcohol bajo condiciones aeróbicas en presencia de la cantidad adecuada de glucosa; las levaduras Crabtree-negativas, en las cuales el metabolismo oxidativo no es inhibido en presencia de glucosa y las levaduras aerobias obligadas, como *Rho. glutinis*, que degradan glucosa exclusivamente por respiración (Tibor, 2008).

### 3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

El término levadura es muy comúnmente asociado como sinónimo de *S. cerevisiae*, esta especie es el modelo de estudio por excelencia de organismos eucarióticos. Fue de los primeros organismos a los cuales se les dilucidó su información genética y es por mucho el microorganismo con mayor presencia industrial, gracias a sus características fermentadoras. Estrictamente hablando, *Saccharomyces* no puede ser considerada un anaerobio facultativo, esto desde que el efecto Crabtree ha tomado precedencia, por ejemplo, arriba del 1% de azúcares fermentables en el medio de crecimiento (el porcentaje exacto varía dependiendo de la cepa). Las levaduras fermentan el azúcar por metabolismo anaerobio, a pesar de que el medio de cultivo esté bien aireado (Jacques y col., 2003).

Por sus cualidades fermentadoras, el interés industrial y siendo un modelo de estudio, los trabajos sobre fermentación alcohólica en *S. cerevisiae* son muy extensos, ya no solamente enfocándose en el conocimiento del proceso metabólico, sino ampliando la investigación sobre efectos adversos de los productos, para de esta manera aumentar la producción de etanol, que se ve mermada por el efecto tóxico que éste causa sobre las células que lo producen (Walker-Capriglio y col., 1990).

#### 4. ESTRÉS POR ETANOL

En general el estrés es cualquier cambio en el genoma, el proteoma o el medio circundante que causa una disminución en la velocidad de crecimiento o en la sobrevivencia de un organismo (Vorob'eva, 2004).

Durante la fermentación, las levaduras se ven expuestas a diferentes tipos de estrés, entre los que se incluyen, el causado por las altas concentraciones de alcoholes, presión osmótica, fluctuaciones de temperatura, pH, etc. Es esencial que las células de levadura sean capaces de responder y adaptarse rápidamente a cada condición de estrés para poder sobrevivir. Entre estos mecanismos está la rápida activación y síntesis de moléculas protectoras y la activación de la vía de transducción de señales Ras-cAMP (Yamaji y col., 2003; Aueskaree y col., 2009).

El etanol es uno de los factores de estrés para las levaduras durante la fermentación. Este compuesto ejerce efectos inhibitorios sobre los organismos, entre los que se encuentran la inhibición de la multiplicación celular, afectando también sistemas de transporte como el de glucosa y algunos aminoácidos, desnaturalización de proteínas, también ha sido considerado el responsable de promover la mutagénesis del ADN mitocondrial, aumento de las especies reactivas de oxígeno, teniendo un efecto letal generalizado para las células (Stryer, 1993; Costa y col., 1997; Aueskaree y col., 2009). Es por esto que la producción de etanol por levaduras es limitada por el efecto tóxico del mismo en el organismo (Walker-Capriglio y col., 1990).

Las concentraciones altas de etanol inducen la síntesis de gran variedad de proteínas (Farewell y col., 1998). Algunos estudios sugieren la participación de

proteínas de respuesta a estrés como un mecanismo de tolerancia a etanol (Smeds y col., 1998). Al conjunto de éstos cambios se les conoce como la respuesta al estrés por etanol.

#### **4.1 Tolerancia al etanol**

Algunos microorganismos, como *S. cerevisiae*, sobreviven a concentraciones de etanol que son letales para la mayoría de los microorganismos, del 5 al 10% v/v (la concentración varía dependiendo de la cepa). Es importante para la levadura sobrevivir en altas concentraciones de etanol, ya que una de las rutas principales de producción de energía es la fermentación alcohólica. Para poder contener el daño causado por el etanol éstas células han adquirido una variedad de sistemas de defensa como son los cambios en la membrana plasmática, el sistema de respuesta a estrés oxidativo, un aumento de la actividad ATPasa de la membrana plasmática y las proteínas de respuesta a estrés. Todos estos mecanismos le permiten a las células sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de etanol.

##### **a) Cambios en la membrana plasmática**

El etanol es una molécula anfipática, pero es más hidrofílica que hidrofóbica, sin embargo, puede llegar a concentrarse en el interior de las membranas biológicas y por lo tanto su concentración es mayor en las regiones más acuosas de la membrana, ocasionando un incremento en la polaridad y en consecuencia alterando las propiedades físico-químicas de las membranas. La intercalación de la molécula de etanol en el interior hidrofóbico altera las interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos y puede alterar las propiedades de las fases acuosa y no acuosa y así destruir la organización de la membrana en la interfase agua-fosfolípidos, debilitando la barrera de la misma en el intercambio libre de moléculas polares (Fried y Novick, 1973; Aueskaree y col., 2009). Como efecto final ocurre la pérdida de la integridad de la membrana afectando la capacidad de las células para mantener un gradiente de concentración regulado por la membrana plasmática y afectando además los sistemas involucrados en el transporte de solutos (Rodríguez, 1992).

La membrana plasmática es el sitio principal de impedimento y de interacción con el etanol. Así, un cambio en la composición de lípidos en la presencia de etanol es de esperarse. Esta composición de lípidos alterada combate el efecto deletéreo del etanol (Mishra y Kaur, 1991). Cambios en la longitud de las cadenas e insaturaciones de ácidos grasos de fosfolípidos están entre las alteraciones más comunes inducidas por el etanol. Los esteroides, otro de los componentes de la membrana de levaduras, están involucrados en la integridad celular y han sido implicados también en la tolerancia a etanol (Walker-Caprioglio y col., 1990).

## **b) Sistema de respuesta a estrés oxidativo**

El anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ) son de las especies reactivas de oxígeno (EROs) más importantes producidas por las células. Estas especies son formadas vía reacciones catalizadas por metales, resultado de un metabolismo celular normal, como la respiración y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, en procesos inflamatorios y estrés por calor, etanol y químico (Costa y col., 1997; Pereira y col., 2001). Las EROs causan daño oxidativo a los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos y otros componentes celulares. En respuesta a la destructiva naturaleza de las EROs, los organismos han evolucionado hacia la adquisición de múltiples mecanismos de defensa para proteger y prevenir el daño a sus componentes celulares. La defensa biológica primaria contra el daño oxidativo incluye proteínas protectoras que remueven EROs o secuestran iones metálicos, mientras que las defensas secundarias consisten en enzimas que remueven y reparan los productos de los componentes dañados por oxidación (Costa y col., 1997).

La toxicidad del etanol ha sido relacionada con la producción de EROs, desde que se sabe que la superóxido dismutasa de Mn (MnSOD) y la catalasa T (enzimas protectoras contra las EROs) son inducidas durante el estrés por etanol, produciendo una mayor tolerancia a este compuesto. Células con niveles incrementados de MnSOD y catalasa T son capaces de disminuir el daño causado por EROs (Pereira y col., 2001).



### **c) Aumento de la actividad ATPasa de la membrana plasmática**

La actividad de la bomba de protones ATPasa en la membrana plasmática de hongos genera un gradiente de protones que se acopla a la hidrólisis de ATP para la expulsión de protones a través de la membrana, resultando en el establecimiento de un gradiente electroquímico, el cual permite transportes secundarios. Considerando la gran cantidad de energía que resulta de mantener la bomba de protones trabajando, sólo se ha observado que se encuentra funcionando a su máxima capacidad bajo circunstancias especiales, usualmente la actividad ATPasa se mantiene en niveles bajos. Un ejemplo de esto es la activación de la bomba de protones ATPasa por pH ácido, representando un mecanismo para regular el pH interno (Rosa y Correia., 1991).

El etanol interactúa con las membranas por inserción dentro del interior hidrofóbico, incrementando la polaridad en esta región y debilitando la barrera hidrofóbica, permitiendo de esta manera el libre intercambio con moléculas polares e interacciones hidrofóbicas, afectando el posicionamiento de proteínas en las membranas. Por lo tanto una alteración en la membrana plasmática puede dejar como blanco de ataque a la ATPasa de la membrana plasmática. El flujo de protones transmembranal es sensible a concentraciones crecientes de etanol y se ve significativamente reducido por la velocidad de fermentación (Rosa y Correia., 1991). La disipación del gradiente de protones inducido por etanol tal vez se debe a la inhibición de la actividad ATPasa como proponen Cartwright y col., en 1987, o por un incremento en la permeabilidad de la membrana; puede también ser un efecto de ambos mecanismos juntos.

Sin embargo, se ha propuesto que el aumento de la actividad ATPasa de la membrana se debe a un cambio en el pH citoplasmático de las células durante el estrés por etanol, debido a que el etanol puede actuar como un ácido débil, por lo tanto la actividad de ésta proteína podría estar regulando el pH interno de la célula.

### **d) Proteínas de respuesta a condiciones de estrés**

En eucariotes se ha observado la participación de algunas de las enzimas glicolíticas como la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, enolasa y fosfoglicerato cinasa como proteínas que responden a condiciones de estrés. En *Z. mobilis*, la exposición a altas concentraciones de etanol representa una forma de estrés natural

(Barbosa y col., 1994). En este microorganismo se encontró la participación de algunas enzimas en la ruta glicolítica y fermentativa, las cuales incrementan en cantidad en respuesta a algún tipo de estrés, aunque su papel fisiológico con respecto al estrés es desconocido. También en *Z. mobilis*, se encontraron tres proteínas que responden al estrés por calor y por etanol (SP70, SPS58 y SP18), las cuales corresponden a las proteínas homologas DnaK, GroEL y GroES identificadas en *E. coli* (Haejung y col., 1991). Las proteínas de estrés GroES y GroEL son expresadas en *Z. mobilis* cuando este microorganismo es expuesto a concentraciones altas de etanol (alrededor del 10%) (Barbosa y col., 1994).

La desnaturalización de proteínas es uno de los mayores efectos asociados con el estrés por calor, etanol y pH, este efecto induce respuestas de estrés celular que involucran varios mecanismos celulares. El incremento de las proteínas de choque térmico (Hsps), también denominadas chaperonas moleculares, biomoléculas responsables del correcto plegamiento de polipéptidos recién sintetizados y del plegamiento de proteínas desnaturalizadas o con mal plegamiento, es uno de los mecanismos relacionados. Solamente polipéptidos correctamente plegados pueden adoptar su conformación nativa y ser funcionales. La acumulación de proteínas parcialmente desnaturalizadas expone sus regiones hidrofóbicas, en las cuales se unen las chaperonas. El agotamiento de las reservas de chaperonas sirve como señal para la activación de su síntesis (Vorob'eva, 2003). Las Hsp asociadas a la membrana actúan de manera similar a su contraparte soluble evitando la desnaturalización de enzimas localizadas en la membrana (Vigh y col., 1998). Las chaperonas previenen interacciones indeseables entre superficies de proteínas potencialmente complementarias. Las chaperonas son un grupo de proteínas muy conservadas encontrándose en todas las bacterias, archaeae y eucariotes (Vorob'eva, 2003).

Las chaperonas moleculares son parte importante de la respuesta contra diversos procesos de estrés, ayudan al correcto plegamiento de proteínas dañadas, además de apoyar con las respuesta contra el estrés oxidativo. En el Cuadro 1, se muestran chaperonas moleculares involucradas en sistemas de respuesta al estrés entre los que se menciona al causado por etanol.

CUADRO 1. Chaperonas moleculares relacionadas en sistemas de respuesta a estrés

CHAPERONA	ORGANISMO	FUNCIÓN	
Hsp104p	<i>S. cerevisiae</i>	Plegamiento y activación de proteínas desnaturalizadas	Alexander y col., 2001.
Hsp78p	<i>S. cerevisiae</i>	Solubilización de agregados proteicos	Alexander y col., 2001; Marks y col., 2008.
Hsp42p	<i>S. cerevisiae</i>	Solubilización de agregados proteicos en el citoesqueleto	Alexander y col., 2001.
Hsp30p	<i>S. cerevisiae</i>	Proteína que regula la actividad H(+) ATPasa de Pma1p	Alexander y col., 2001; Marks y col., 2008.
Hsp26p	<i>S. cerevisiae</i>	Solubilización de agregados proteicos	Alexander y col., 2001.
Sse1p	<i>S. cerevisiae</i>	Plegamiento de proteínas	Alexander y col., 2001.
Sse2p	<i>S. cerevisiae</i>	Plegamiento de proteínas	Marks y col., 2008.
Ecm10p	<i>S. cerevisiae</i>	Translocación de proteínas en mitocondria	Alexander y col., 2001.
Ydj1p	<i>S. cerevisiae</i>	Translocación de proteínas y regulación de la función de las chaperonas Hsp90p y Hsp70p	Alexander y col., 2001.
GroES	<i>Z. mobilis</i>	Plegamiento y activación de proteínas desnaturalizadas y de <i>novo</i>	Barbosa, 1994.
GroEL	<i>Z. mobilis</i>	Plegamiento y activación de proteínas desnaturalizadas y de <i>novo</i>	Barbosa, 1994.
Hsc66	<i>P. aeruginosa</i>	<b>Biogénesis de centros Fe-S</b>	Campos- García y col., 2000.
Ssq1p	<i>K. marxianus</i>	<b>Biogénesis de centros Fe-S</b>	López-Álvarez y col., 2007.

## 5. CHAPERONAS MOLECULARES

El término chaperona fue usado por primera vez para describir una actividad asociada con nucleoplasmina en huevos de *Xenopus*. El término se ha expandido para incluir las actividades bioquímicas desplegadas por una gran colección de proteínas que ayudan al plegamiento de polipéptidos nacientes, tránsito a través de

membrana celular y membranas de organelos, desensamblamiento de complejos macromoleculares o agregados y blanco de proteólisis (Genevaux y col., 2007).

La maquinaria celular de chaperonas consiste en varias familias de proteínas que facilitan el plegamiento de polipéptidos *in vivo* y previene un mal plegamiento y la agregación. Las chaperonas son esenciales en dos etapas de la vida de una proteína: durante el plegamiento *de novo* seguida de la traducción y sobre la desnaturalización en condiciones de estrés ambiental. Muchas chaperonas son altamente inducidas por estrés, de ahí que algunas veces sean llamadas “proteínas de choque térmico”.

Las chaperonas moleculares se unen transitoriamente y no covalentemente a polipéptidos nacientes y a proteínas mal plegadas o sin ensamblar, ayudan en la biogénesis de proteínas de dos maneras generalmente: bloquean las interacciones proteína-proteína no productivas y median el plegamiento de proteínas que han sido secuestradas por plegamientos intermedios, a su estado nativo, permitiendo un plegamiento concertado por dominios y el ensamblaje de oligómeros. La familia de proteínas con peso de 70 kDa mejor conocida como Hsp70 y la familia de 60 kDa conocida como Hsp60 o chaperonina (Cpn60s), son los dos mayores grupos de chaperonas moleculares estudiados (Craig y col., 1993).

## 5.1 Familia Hsp70

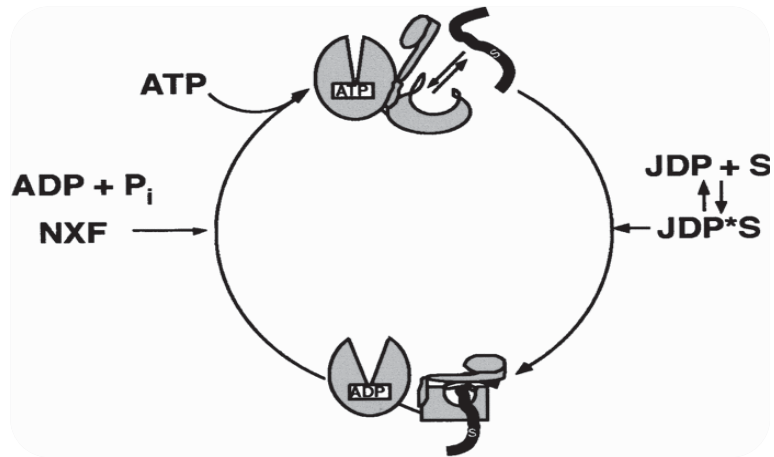
Hsp70 es la familia de proteínas conocida más conservada, la podemos encontrar en toda la biota. Las Hsp70 actúan como chaperonas moleculares bajo condiciones normales y de estrés, estabilizando plegamientos de proteínas y su papel principal es en la termotolerancia. En los organismos eucarióticos se ha encontrado que contienen múltiples miembros de la familia de proteínas Hsp70 (Campos-García y col., 2000).

Las proteínas Hsp70 funcionan en un diverso conjunto de procesos, incluyendo el plegamiento de proteínas, asociación y disociación de multímeros, translocación de proteínas a través de membranas y regulación de respuesta a choque térmico. Todas las células eucarióticas usan múltiples Hsp70s para mantener sus funciones primordiales; en *S. cerevisiae* se han descrito 14 Hsp70s

que están divididas en al menos 5 familias funcionalmente distintas. Las Hsp70s de diferentes familias están altamente conservadas pero no pueden intercambiar funciones; la base de esta especificidad funcional no está bien establecida.

Cada Hsp70 consiste de un dominio altamente conservado de adenosina trifosfatasa de 44-kDa (ATPasa) en el NH<sub>2</sub>- terminal, un dominio menos conservado de unión a péptido de 18-kDa y un dominio variable de 10-kDa en el COOH- terminal de función desconocida. Debido a que se han encontrado diferencias en la especificidad del dominio de unión al péptido entre la Hsp70s, se ha hipotetizado que la unión del péptido forma un papel central en determinar la función específica de cada Hsp70 (James y col., 1997). Existe una particularidad que hace muy característica a las Hsp70s, cuando se encuentran unidas a una molécula de ATP exhiben una baja afinidad y una tasa rápida de intercambio de sus sustratos y cuando están unidas a ADP se caracterizan por una alta afinidad y bajas tasas de intercambio. Las Hsp70s regulan esta unión al ATP o al ADP, con la ayuda de sus cochaperonas. El propósito de las cochaperonas es ayudar a estimular la hidrólisis de ATP y la liberación del sustrato de la Hsp70, ambos eventos permiten una unión ADP-Hsp70 en complejo con su sustrato (Fig. 2) (Genevaux y col., 2007).

Actualmente a las Hsp70s se les considera el componente central de la red de chaperonas en la célula. Asociada con el ribosoma, Hsp70 fomenta el apropiado plegamiento de la proteínas *de novo*. En el citoplasma, Hsp70 media la desoligomerización y reciclamiento de complejos de proteínas nativas y controla funciones clave en la morfogénesis celular y apoptosis, frecuentemente en asociación con Hsp90. Hsp70 también sirve como motor de translocación central en el importe postraducciona de proteínas citoplasmáticas a la mitocondria, cloroplastos y el retículo endoplasmático. Adicionalmente, Hsp70s activamente puede desplegar, solubilizar y reactivar, estabilizar agregados de proteínas y tal vez participar en señalización de proteínas para la ruta de degradación (De Los Rios y col., 2006).



**FIGURA 2:** Ciclo funcional de las chaperonas Hsp70. Hsp70 se muestra en color gris con su sustrato en color negro, NXF, es el factor intercambiador de nucleótidos, JDP, es la proteína con dominio J, también denominada co-chaperona (Tomada de Erbse y col., 2004).

## 5.2 Cochaperonas (proteínas J)

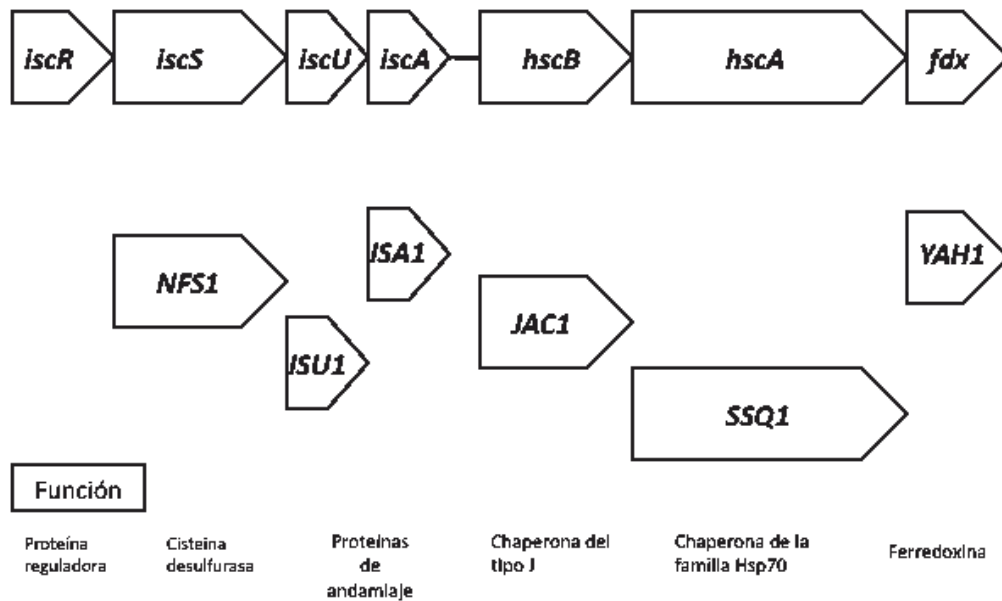
La tasa de actividad en estado estacionario de una ATPasa de Hsp70 no estimulada es muy lento (entre 0.02 y 0.2 min<sup>-1</sup>), para estimular la actividad de una chaperona Hsp70 ayuda la presencia de su sustrato, el cual típicamente estimula la actividad ATPasa de 2 a 10 veces. Es esencial que existan mecanismos de regulación que incrementen la actividad de la ATPasa y por lo tanto la función de la chaperona. La hidrólisis de ATP es el primer objetivo de la regulación hecha mayoritariamente por miembros de la familia de DnaJ, que se encuentran en todos los compartimientos que contienen Hsp70s de células procariontes, eucariontes y también en varios virus tumorales. Las proteínas DnaJ son un grupo heterogéneo de proteínas multidominio definidas por un altamente conservado dominio de cerca de 80 aminoácidos, el dominio J, frecuentemente localizado cerca del NH<sub>2</sub>- terminal, el cual es esencial para estimular la actividad ATPasa de las Hsp70s. Estructuras solucionadas del dominio J provenientes de dos miembros de la familia muestran que este comprende cuatro hélices con una asa entre las hélices 2 y 3 conteniendo un motivo con secuencia conservada (HPD) implicado en la interacción del dominio J con Hsp70 (Bakau y Horwich, 1998).

De esta manera se tienen identificadas varias parejas de chaperona Hsp70 con su respectiva cochaperona, como por ejemplo, DnaK y DnaJ, SufC y SufD de *E. coli*, Ssc1p y Mdj1p, Ssq1p y Jac1p en *S. cerevisiae*, HscA y HscB en *P. aeruginosa*, entre otras, colocándose así entre los sistemas más conservados en los tres reinos existentes.

## 6. SISTEMA HscA /HscB

La presencia del gen *hscA* se ha reportado en varias bacterias, por ejemplo, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Azotobacter vinelandii*, *Buchnera aphidicola*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Ralstonia solanacearum*, *Pasteurella multocida*, *Rickettsia conorii*, *R. prowazekii* y *Bordetella pertussis* (Campos-García y col., 2000).

En *P. aeruginosa* se identificó que el gen *hscA* forma parte del operón *isc* por sus siglas en inglés (*iron sulphur cluster*), constituido río arriba por el gen *hscB* y río abajo por el gen *fdx* (Fig. 3) (Campos-García y col., 2000).



**FIGURA 3:** Organización de los genes pertenecientes al grupo *isc*. Se representan los genes del operón *isc* de *P.aeruginosa* denominados *iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscB*, *hscA* y a *fdx* y sus homólogos encontrados en *S. cerevisiae* denominados: *NFS1*, *ISU1*, *ISA1*, *JAC1*, *SSQ1* y *YAH1*, los cuales no se encuentran en forma de operón.

(Modificado Skovran y Downs 2000; Schilke y col., 2003).

Las proteínas codificadas por el operón *isc* forman parte de un proceso metabólico muy conservado entre los organismos, denominado biogénesis de centros Fe-S. Donde la proteína HscA perteneciente a la familia de chaperonas Hsp70 y codificada por el gen *hscA* de *P. aeruginosa*, forma parte central de la ruta metabólica, regulando mediante su actividad ATPasa la eficiencia del proceso y como proteína reguladora de la actividad ATPasa de HscA, se encuentra una cochaperona denominada HscB codificada por el gen *hscB* de *P. aeruginosa*.



## 6.1. Sistema Ssq1p/ Jac1p en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, Schilke y col. en el año 1999 encontraron un sistema homólogo a HscA/ HscB de *P. aeruginosa*, correspondiente a la chaperona molecular Ssq1p y su cochaperona Jac1p, las cuales forman parte de la ruta de ensamblaje de proteínas con centros Fe-S, al igual que las proteínas bacterianas; sin embargo, estas proteínas no se encuentran codificadas en un operón como su contraparte bacteriana, los genes se encuentran distribuidos en los diferentes cromosomas de *S. cerevisiae* (Fig.3) (Muhlenhoff y col., 2003).

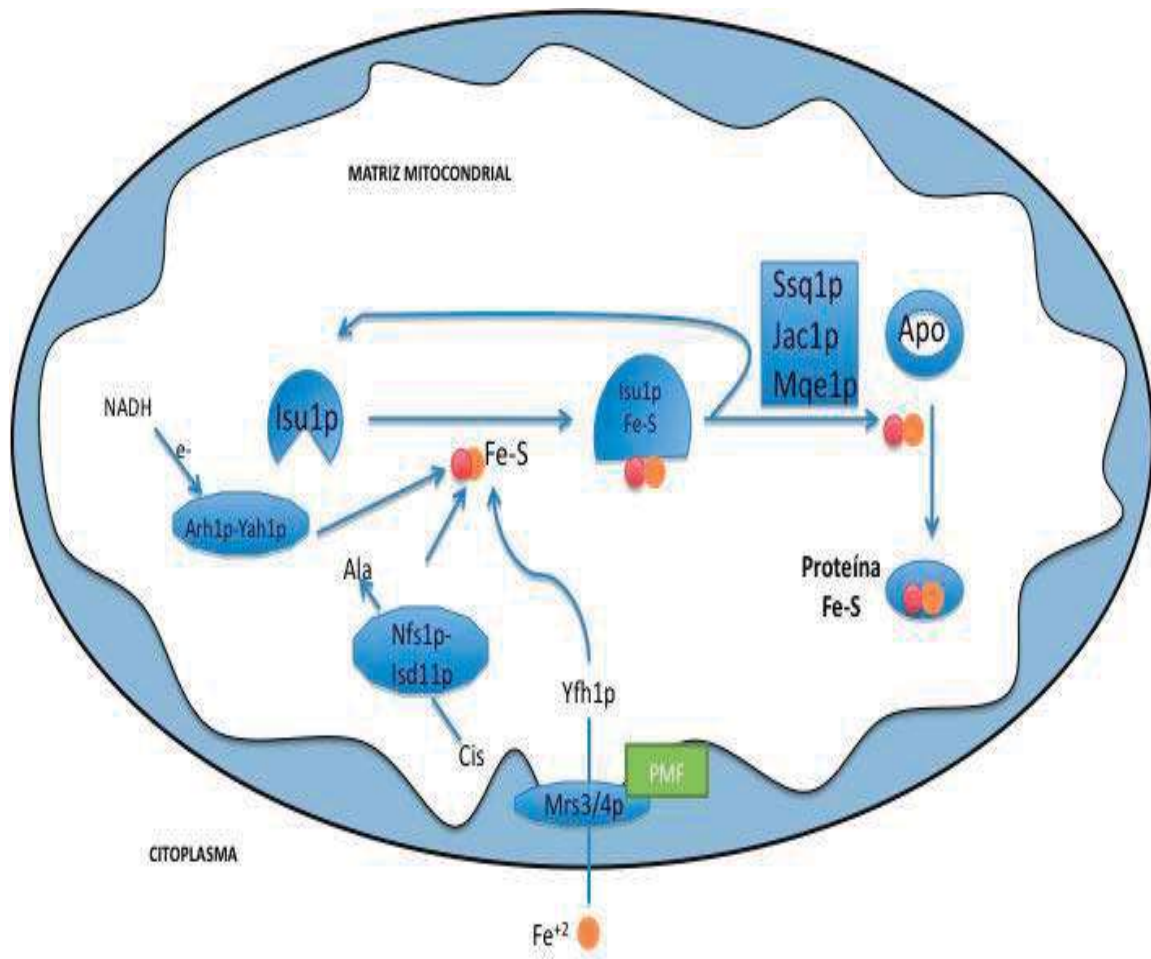
## 7. GENES Y PROTEÍNAS INVOLUCRADOS EN EL ENSAMBLAJE DE GRUPOS Fe-S EN *S. cerevisiae*

Los genes *SSQ1* y *JAC1* forman parte de un grupo de seis genes: *NFS1*, *ISU1*, *ISA1*, *JAC1*, *SSQ1* y *YAH1*, conservados en varios organismos y forman el grupo de genes denominado *isc* (Dutkiewicz y col., 2003). De acuerdo a lo reportado por Lill y Muhlenhoff en 2008, se ha propuesto un modelo en *S. cerevisiae* para la biogénesis de proteínas con centros Fe-S, donde el hierro ( $Fe^{2+}$ ) es transportado del citoplasma a la matriz mitocondrial con la ayuda de las proteínas Mrs3p/ Mrs4p. Este transporte es favorecido por el potencial de membrana (PMF). De estas últimas proteínas el hierro es donado a la frataxina (Yfh1p), la cual se encarga de la formación del centro Fe-S con la ayuda de la L-cistein desulfurasa (Nfs1p) que remueve el azufre de la cisteína para formar alanina, quedando el azufre unido a la enzima. Después el azufre es reducido a  $S^0$  con la acción de la ferredoxina (Yah1p) y la frataxina (Yfh1p) produce el grupo Fe-S (aunque este paso aún no está muy claro), que es transferido a la proteína Isu1p. Finalmente, Isu1p con el centro Fe-S adquiere una conformación que permite que Jac1p la “etiquete” para que interaccione con la chaperona Ssq1p. Una vez unidas las tres proteínas, la actividad ATPasa de Ssq1p se ve favorecida por la unión de la cochaperona y de su sustrato. Posteriormente, con ayuda del factor intercambiador de nucleótidos (Mge1p), Ssq1p hidroliza el ATP permitiendo la liberación del grupo Fe-S de Isu1p a la apoproteína

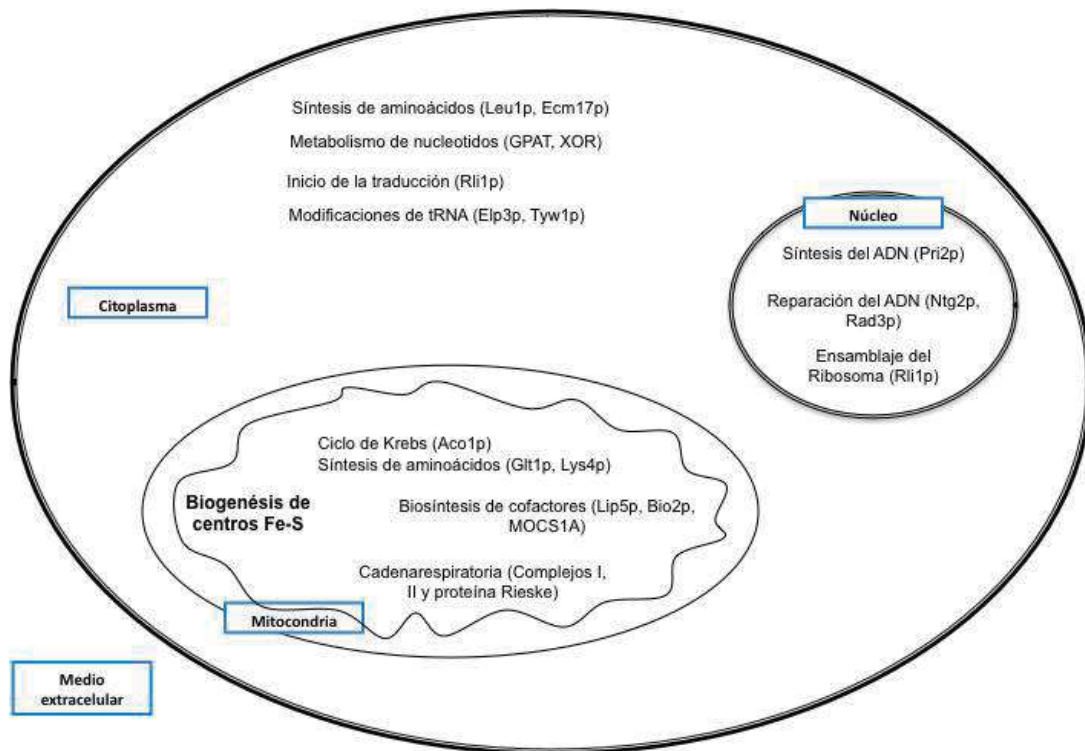
correspondiente, formándose de esta manera la proteína con centro o centros Fe-S (Fig. 4).

En la mayoría de las proteínas Fe-S, los centros de Fe son tetraédricos y los ligandos son azufres de grupos tiolato de los residuos de cisteína. Los grupos sulfuro poseen dos o tres enlaces de coordinación. Son comunes tres tipos de centros Fe-S con estas características (2Fe-2S, 4Fe-4S y 3Fe-4s). Aunque se pueden encontrar centros 8Fe y 7Fe en ciertas nitrogenasas.

Entre las proteínas Fe-S que se conocen están: NADH deshidrogenasa I, aconitasa B, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, fumarasa A, proteína de reducción de fumarato-nitrato, glutamato sintasa, lipoato sintasa, ferredoxina, biotina sintasa, sulfito reductasa, isopropilmalato isomerasa, primasas y succinato deshidrogenasa (Tukumoto y Takahashi, 2001; Lill y Mühlhoff, 2008). Muchas de estas proteínas son esenciales para las células y forman parte de rutas metabólicas muy importantes, como la fosforilación oxidativa, vía de Krebs, reparación del ADN, modificaciones a tRNA, biosíntesis de aminoácidos, ciclo de las pentosas, replicación del ADN, entre otras (Fig. 5). De aquí la importancia de la biogénesis de centros Fe-S, siendo una ruta metabólica de la mitocondria que es esencial para la viabilidad en levaduras.



**FIGURA 4.** Modelo para la biogénesis de proteínas con centros Fe-S en *S. cerevisiae* (Modificado de Lill y Muhlenhoff, 2008). Los detalles se describen en el texto.



**FIGURA 5.** Función y localización de proteínas Fe-S en eucariotes. (Modificado de Lill y Muhlenhoff, 2008). Los detalles se describen en el texto

## II. ANTECEDENTES

En el año 2000, Campos-García y col. observaron que al transformar con un plásmido conteniendo el operón *hscBAfdx* a una mutante de *P. aeruginosa* W51M22 afectada en el gen *hscA*, que es incapaz de asimilar y tolerar etanol, recuperó su fenotipo, sugiriendo que estos genes están involucrados en el mecanismo de tolerancia a etanol.

En el 2002, Villagómez-Zavala clonó el operón *hscBAfdx* de *P. aeruginosa* y transformó la cepa etanológica de *E. coli* KO11 reportando un notable aumento en el nivel de tolerancia a etanol en esta cepa, sugiriendo que el operon *hscBAfdx* se encuentra involucrado en el mecanismo de tolerancia a etanol en un organismo etanológico.

En el 2004, Núñez-Pastrana probó el efecto de la mutación del gen *hscA* en las cepas etanológicas de *E. coli* (KO11 y LY01) observando una disminución en la producción de etanol.

En el 2007, Resendiz-Tamayo, describe que la mutación del *hscA* en la cepa etanológica de LY01 disminuyó el nivel de tolerancia a etanol. Con respecto a la producción de etanol, encontró que disminuyó (15%) en la cepa mutante y aumentó (75%) al ser transformada con un plásmido que contenía los genes *hscA/hscB*. Adicionalmente, encontró que la mutación del gen *hscA* disminuyó la actividad enzimática así como la estabilidad de la alcohol deshidrogenasa (ADHIII) en la cepa LY01, sugiriendo que la participación del sistema de chaperonas moleculares HscA/HscB está relacionada con la tolerancia y producción de etanol, probablemente mediante el plegamiento y estabilización de enzimas relacionadas con la síntesis del etanol.

En el 2007, López, encontró que al transformar la cepa levadura *Kluyveromyces marxianus* (UMPe1) con el plásmido pYES2-SSQ1 (His) WT, el cual expresa la chaperona molecular Ssq1p homóloga a la proteína HscA de *P. aeruginosa*, toleró concentraciones de etanol del 12% (v/v), sugiriendo que la chaperona molecular Ssq1p está involucrada en la tolerancia de etanol en *K. marxianus*.

Por otro lado, en 2008, Marks y col. encontraron que al medir la respuesta del transcriptoma de un cepa de *S. cerevisiae* durante el estrés por fermentación, que el gen *ISU1* mostró un aumento en su transcripción de hasta 5 veces.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Los estudios hasta ahora realizados muestran efectos de las chaperonas moleculares Ssq1 y HscA sobre el nivel de tolerancia y producción de etanol en *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. marxianus*. La finalidad del presente trabajo es conocer el efecto en la tolerancia a etanol al transformar *S. cerevisiae*, con plásmidos que contienen los genes *SSQ1*, *JAC1* e *ISU1*.

### **IV. HIPÓTESIS**

Las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p, participan en el mecanismo de tolerancia a etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

### **V. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la participación de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p, sobre la tolerancia a etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Expresar individualmente las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2.- Evaluar la tolerancia a etanol en las cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3.- Proponer un modelo de la participación de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p en la tolerancia a etanol de *Saccharomyces cerevisiae*.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. PLÁSMIDOS Y CEPAS

CEPA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
TOP10	Cepa estándar de laboratorio	Casadaban y Cohen, 1980.
UMARN3	Cepa aislada de un fermento de agave	López- Álvarez, 2007.
UMARN3.3 (Ura <sup>-</sup> )	Cepa con auxotrofia a uracilo	Este trabajo

CUADRO 2. Cepas y plásmidos empleados en el trabajo.

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pYES2-SSQ1 (His) WT	Plásmido que expresa la chaperona molecular Ssq1 con una etiqueta de histidinas	Craig y col., 2003.
pYES2-ISU1 (His) WT	Plásmido que expresa la proteína Isu1 con una etiqueta de histidinas	Craig y col., 2003.
pYES2-JAC1 (His) WT	Plásmido que expresa la cochaperona Jac1 con una etiqueta de histidinas	Craig y col., 2003.
pYES2 <sup>TM</sup>	Vector para la expresión de proteínas	Sirkosk y Hieter, 1989.



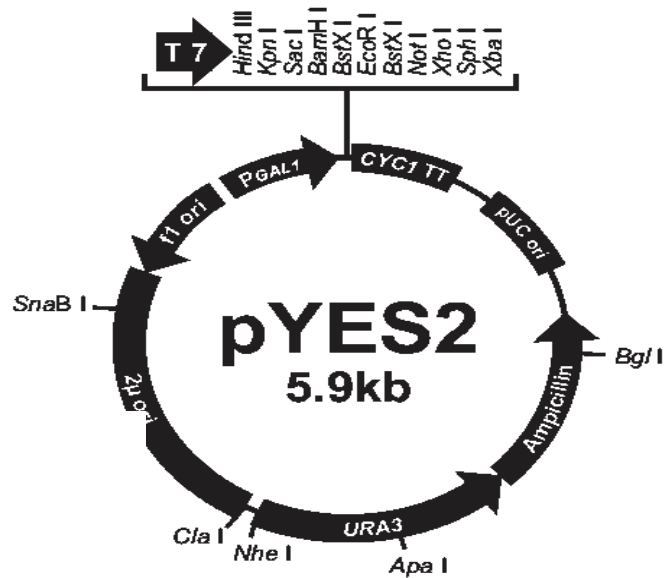


FIGURA 6. Mapa de plásmido pYES2, empleado para clonar los genes *SSQ1*, *JAC1* e *ISU1* de *S. cerevisiae*.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

### 2.1 Medio Luria- Bertani (LB)

Composición por litro de agua destilada (para el caso de caldo Luria CL no se le agrega agar):

Peptona de caseína 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 5 g

Agar bacteriológico 15 g

El medio fue esterilizado 15 minutos a 121 °C, posteriormente se dejó enfriar para la adición del antibiótico ampicilina (100 µg/ ml) en caso que así lo requiriese.

## 2.2 Medio YPD

Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo no se le agrega agar):

Extracto de levadura 10 g

Peptona de caseína 20 g

Agar bacteriológico 15 g

Glucosa 20 g

El medio se esterilizó 15 minutos a 121 °C, posteriormente se dejó enfriar para la adición de la glucosa esterilizada 5 min a 121 °C o del etanol absoluto.

## 2.3 Medio de selección de mutantes auxótrofos a uracilo (SC+5- FOA)

Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo no se agregó agar):

Base de nitrógeno sin aminoácidos (YNB) 6.7 g (Sigma- Aldrich)

Mezcla de aminoácidos sin uracilo (Drop out mix) 2 g (Sigma- Aldrich)

Glucosa 2 g

Uracilo (50 µg/ ml) 50 mg (Sigma)

Acido fluororótico (5-FOA) 1 g (Zymo Research)

Agua destilada c. b. p. 1000 ml

Agar bacteriológico 20 g

Se disuelven todos los componentes y se esterilizan a 15 libras de presión a 121 °C durante 15 min. Por separado se esteriliza el agar (Amberg y col., 2005).

## 2. 4 Medio mínimo para la selección de protótrofas (SC-U)

Composición por litro de agua destilada (para el caso del caldo no se agregó agar):

Base de nitrógeno sin aminoácidos (YNB) 6.7 g (Sigma- Aldrich)

Mezcla de aminoácidos sin uracil (Drop out mix) 2 g (Sigma- Aldrich)

Glucosa o galactosa 2 g

Agua destilada c. b. p. 1000 ml

Agar bacteriológico 20 g

Se disuelven todos los componentes y se esterilizan a 15 libras de presión a 121 °C durante 15 min. Por separado se esteriliza el agar (Amberg y col., 2005).

Se utilizó el mismo medio de cultivo para el crecimiento de las levaduras auxotrofas añadiendo solamente: Uracil (50 µg/ ml) 50 mg (Sigma) (SC).

## 2.5 Medios de almacenamiento

A) Las cepas de *E. coli* que cuentan con los plásmidos pYES2-SSQ1 (His) WT, pYES2-JAC1 (His) WT y pYES2-ISU1 (His) WT, fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio líquido LB y glicerol al 50% a -80 °C.

B) La cepas mutantes auxótrofas seleccionadas fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio líquido SC+5-FOA, y glicerol al 50% a -80 °C.

C) Las cepas transformadas con los plásmidos pYES2-SSQ1 (His) WT, pYES2-JAC1 (His) WT y pYES2-ISU1 (His) WT, fueron almacenadas en viales de 1.5 ml en medio líquido SC-U 2% glucosa y glicerol al 50% a -80 °C.

## 3. MÉTODOS

### 3. 1 Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

El aislamiento del ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina de acuerdo con el siguiente protocolo adaptado de Sambrook y col., 1989.

#### 3.1.1 Aislamiento plásmidos por lisis alcalina

1.- El cultivo de *E. coli* conteniendo el plásmido fue crecido en caldo Luria toda la noche a 30 °C con agitación constante, 3 ml fueron centrifugados a 13 000 rpm en una microcentrifuga por 3 min, para sedimentar las células.

2.- El sobrenadante fue desechado y la pastilla resuspendida en 100 µl de STE se agregaron 20 µl de lisozima de 20 mg/ ml se agitó con vortex manual y se incubó por 5 min.

3.- Se agregaron 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N, SDS (dodecil-sulfato de sodio) 1% mezclando suavemente y se incubó 5 min en hielo.

4.- Fueron adicionados 150 µl de una solución de 3 M de acetato de sodio pH 4.8, se incubó 10 min en hielo y posteriormente centrifugado a 13 000 rpm por 2 min.

5.- Fueron adicionados 150 µl de la mezcla fenol/ cloroformo (1:1), fue mezclado en vortex moderadamente y centrifugado por 7 min a 13 000 rpm.

6.- El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se agregaron 500 µl de la mezcla de etanol/ isopropanol (60%/ 40%), y este se incubó en hielo por 10 min, para que precipitara el ADN y centrifugar por 2 min a 13 000 rpm.

7.- Se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70%, y se centrifugó por 5 min a 13 000 rpm, repitiendo este paso 3 veces.

8.- La pastilla fue secada y resuspendida en 50 µl de agua estéril, con 3 µl de RNAasa.

9.- Las muestras fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o sometidas a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

## **STE**

Sacarosa 50 mM

Tris 25 mM

EDTA 10 mM a pH 8

### **3.1.2 Extracción del ADN total de levaduras**

- 1.- Se crecieron levaduras en 3 ml de medio YPD 2% de glucosa toda la noche.
- 2.- El cultivo crecido se cosechó en tubos Eppendorff de 1.5 ml.
- 3.- Se centrifugó a 13 000 rpm, 1 min, y se descartó el sobrenadante.
- 4.- La pastilla se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis.
- 5.- Se adicionaron 0.3 g de perlas de vidrio estériles (5 perlas) y 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla fenol- cloroformo 1:1 y se vortexeó a alta velocidad por 3 min.
- 6.- Fueron adicionados 20  $\mu\text{l}$  de buffer TE y fue agitado en un vortex a alta velocidad por 40 s.
- 7.- Se centrifugó en microcentrifuga a 13 000 rpm, 5 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio.
- 8.- Se adicionó 500  $\mu\text{l}$  de la mezcla etanol- isopropanol (60%/40%), fue mezclado muy bien por inversión e incubado en hielo a 15 min.
- 9.- Fue centrifugado a 13 000 rpm, 5 min, se decantó y lavó con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%.
- 10.- Se centrifugó a 13 000 rpm, 3 min, se decantó y secó la pastilla.

11.- La pastilla fue resuspendida en 50  $\mu$ l de agua desionizada y estéril y se le adicionó 3  $\mu$ l de RNAasa, fue incubada 30 min a 37 °C.

#### **Buffer de lisis**

Triton X- 100 (2%)

SDS (1%)

NaCl (100 mM)

Tris HCl pH 8 (10 mM)

EDTA pH 8 (1 mM)

#### **Buffer TE**

Tris HCl pH 8 (10 mM)

EDTA pH 8 (1 mM)

### **3.1.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Una vez aislado el ADN tanto de levaduras como de bacterias, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de agarosa 1% disuelta en amortiguador TAE. Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal y se sumergieron en amortiguador TAE. Las muestras del ADN se mezclaron con azul de bromofenol en solución de glicerol al 30%, colocándose en los orificios del gel. Se permitió que el corrimiento electroforético procediera aplicando 130 voltios durante 30 min. Posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y las bandas se observaron por medio de un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (fotodocumentador Vilbert Loumart). Como marcador de tamaño molecular del ADN lineal se utilizó el ADN del fago lambda digerido con las endonucleasas *EcoRI* y/ ó *HindIII*.

## **TAE**

Tris- acetato 0.04 M

EDTA 0.001 M pH 8

### **3.1.4 Tratamiento enzimático de moléculas del ADN (restricción con endonucleasas)**

El ADN purificado se digirió utilizando una unidad de endonucleasas de restricción por  $\mu\text{g}$  de ADN, incubando a 37 °C por un mínimo de 4 horas. Posteriormente se realizó un corrimiento electroforético de la mezcla de restricción en gel de agarosa al 1% para verificar los fragmentos obtenidos.

## **4. SELECCIÓN DE MUTANTES AUXÓTROFAS A URACILO**

Para la selección de cepas auxótropas a uracilo denominadas Ura<sup>-</sup>, se utilizó el medio mínimo de selección YNB con aminoácidos, agregando ácido fluororótico (5-FOA) (Boeke y col., 1984). A partir de preinóculos se espatularon de 100  $\mu\text{l}$  a 1000  $\mu\text{l}$  en cajas con medio sólido (SC+5-FOA), aminoácidos, uracilo y 5-FOA, se incubaron a 30 °C de 24 a 48 h hasta observar la aparición de colonias. Con el fin de confirmar que realmente se seleccionaron levaduras Ura<sup>-</sup>, éstas se resembraron en el mismo medio de selección (SC+5-FOA).

## 5. TRANSFORMACIÓN

### 5.1 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

- 1.- Para obtener células competentes, se creció la cepa TOP10 de *E. coli* durante toda la noche a 37 °C con agitación constante en 4 ml de medio de cultivo CL.
- 2.- Se transfirieron 2.5 ml del cultivo a matraces de 1000 ml, los cuales contenían 250 ml del medio CL (dilución 1:100). Se incubó a la misma temperatura con agitación constante por 3-4 h hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8 a 600 nm.
- 3.- El cultivo fue colocado en hielo por 10 min y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C en una centrífuga Eppendorf 5810 R
- 4.- Las células obtenidas se lavaron dos veces con agua destilada fría y fueron resuspendidas en 50 ml de solución de glicerol al 10% en agua destilada, estéril y fría, centrifugándose 15 min, 5000 rpm a 4 °C.
- 5.- Finalmente se resuspendieron en 200 µl de glicerol al 10%.

### 5.2 Transformación de células competentes de *E. coli*

- 1.- A 100 µl de células competentes se les adicionó de 1-5 µl del ADN plasmídico (aproximadamente de 10 a 20 ng), la mezcla se colocó entre los electrodos de una celda en la cámara del electroporador (Bio Rad MicroPulser) y se les dio un pulso de 2.4 kV, 4kΩ durante 6 ms.
- 2.- Posteriormente las células electroporadas fueron adicionadas a 2 ml de CL e incubadas de 1-2 horas con agitación constante a 37 °C.
- 3.- Después se distribuyeron 100 µl de las células electroporadas en placas de agar con medio selectivo.



### **5.3 Preparación de células electrocompetentes de levadura**

- 1.- Se creció la cepa de levadura UMARN3.3 (Ura<sup>-</sup>) en 25 ml de medio líquido SC 2% glucosa, incubando 6 h., a 30 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8-1.0 a 600 nm ( $1 \times 10^8$  células por ml).
- 2.- El cultivo se enfrió a 4 °C por 15 min.
- 3.- Se cosechó a 5 000 rpm por 5 min. a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- 4.- El paquete celular se lavó con 30 ml. de agua desionizada estéril y se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- 5.- Se repitió el paso anterior.
- 6.- Se resuspendió el paquete celular en 12.5 ml de una solución fría de DTT 0.025 M incubándose 10 min, posteriormente se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- 7.- Se resuspendió el paquete celular en 12.5 ml de una solución fría de Tris 5mM-EDTA 0.5 mM (TE) se centrifugó a 5 000 rpm por 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante.
- 8.- Se resuspendió el paquete celular en 2.5 ml., de solución TE.

\* Las células son de uso inmediato para su transformación.

### **5.4 Transformación de las células electrocompetentes de la levadura UMARN3.3 (Ura<sup>-</sup>)**

- 1.- A las células electrocompetentes de levadura (400 µl) se le adicionaron 200 ng de ADN plasmídico, se mezclaron y se incubaron 5 min en hielo.
- 2.- Se les adicionó 400 µl de una solución 1 M de sorbitol, mezclando perfectamente.
- 3.- La mezcla se transfirió a una celda para electroporación estéril de 0.2 cm.

4.- Se utilizó el electroporador Bio Rad micro pulser y se aplicó un pulso de 1.3 KV.

5.- Inmediatamente se procedió a sembrar las células electroporadas en el medio de selección (SC-U), el cual contiene 1 M de sorbitol con el fin de eliminar lo más posible el choque salino para las células electroporadas.

### **5.5 Selección de células transformantes**

Después de transformar las células competentes con los plásmidos, se espatularon los 800 µl de muestra en cajas de petri con 25 ml de medio sólido SC-U, sorbitol 1 M, glucosa al 2%,. Los cultivos se incubaron a 30 °C por un lapso de 48 a 72 h hasta la aparición de colonias, las cuales se resembraron en el mismo medio de selección.

Utilizando la metodología descrita por Fink y col., en 2003, se extrajo ADN total de las levaduras transformadas, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* (TOP10) con 100 ng del ADN, las cuales fueron seleccionadas por la resistencia a ampicilina conferida por los plásmidos. De las transformantes de *E. coli* se realizó el aislamiento de los plásmidos por lisis alcalina. A los cuales se les realizó un análisis de restricción.

## **6. ANÁLISIS DE TOLERANCIA A ETANOL**

### **6.1 Curvas de crecimiento**

Las pruebas de tolerancia etanol fueron realizadas en medio líquido SC-U con glucosa y galactosa al 2%, con concentraciones crecientes de etanol, (0, 4, 8, 10, 12%). Posteriormente de un precultivo se agregó el volumen adecuado para inocular una batería de tubos que contenían 3 ml de medio SC-U 2% glucosa ó galactosa con las concentraciones de etanol mencionadas a una D. O. <sub>600</sub> de 0.1. La serie de tubos se incubó por 18 h a 30 °C con agitación constante en un rotador de tubos. La tolerancia se determinó mediante la D. O. <sub>600</sub> en el espectrofotómetro JENWAY 6406 UV/ VIS.

## 6.2 Cinéticas de crecimiento

Las pruebas de velocidad de crecimiento fueron realizadas en medio líquido SC-U, galactosa al 2% con concentraciones de etanol de 0, 5 y 10%. Se inocularon los matraces partiendo de un precultivo, tomando el volumen adecuado para partir de una D. O. <sub>600</sub> de 0.1, y tomando muestras de 1 ml cada 2 h partiendo de las 0 h, donde se graficó la D. O.<sub>600</sub> vs. Tiempo. A partir de los datos graficados se calcularon los valores cinéticos.

## 6.3 Análisis de viabilidad

La curva de viabilidad a etanol fue realizada en medio líquido SC-U con galactosa al 2% con concentraciones crecientes de etanol (0, 5, 10, 12, 14, 15%). De precultivos preparados con anterioridad se añadieron 200 µl para inocular matraces que contenía 10 ml de medio YPD 2% glucosa, se incubaron a 30°C por 12 h con agitación constante y se verificó su crecimiento por cuantificación de la D. O. <sub>600</sub> en el espectrofotómetro. Después de verificar su crecimiento se adicionó el etanol hasta lograr la concentración de etanol deseada en el medio. Los matraces se incubaron a 30 °C con agitación constante (150 rpm). Posteriormente se realizaron muestreos de 1 ml a los cuales se les determinó la viabilidad con el colorante azul de tripano. Al finalizar, el conteo se realizó un gráfico entre el porcentaje de células viables contra el tiempo y una con concentraciones crecientes de etanol.

## 6.4 Diluciones en caja

- 1.- Se crecieron las cepas de levadura transformante toda la noche en 3 ml de medio líquido SC-U al 2 % de glucosa ó galactosa.
- 2.- Se midió D. O.<sub>600</sub> y se tomó el volumen necesario para que en un tubo Eppendorff con 1 ml de agua destilada se obtuviera una D. O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0.1.
- 3.- Posteriormente partiendo de la primera solución se hicieron diluciones en 1 ml de volumen final de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000.

4.- De las diluciones preparadas se tomaron 10  $\mu$ l y se vertieron sobre un caja de petri que contuviera el agar con medio SC-U con glucosa ó galactosa, y con 10 % de EtOH o sin EtOH, formando con cada gota depositada una fila conteniendo las diluciones de la misma cepa.

5.- Se repitió el último paso con todas las cepas transformantes.

6.- Se dejaron secar las gotas en la cámara de flujo laminar estéril.

7.- Se incubaron las cajas a 30 °C por un lapso de 72 h.

## 7. PROCEDIMIENTOS RELACIONADOS CON LA MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 7.1 Extracción de proteínas totales por lisis alcalina

1.- Se crecieron las cepas de levadura transformantes toda la noche en 3 ml de medio líquido SC-U al 2% de glucosa ó galactosa.

2.- Se cosechó el cultivo a 13, 000 rcf por 3 min y se desechó el sobrenadante.

3.- El paquete celular se resuspendió en 500  $\mu$ l de agua destilada, y se le añadió el mismo volumen de una solución 0.7 N de hidróxido de sodio, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.

4.- Se centrifugó a 5, 000 rcf por 1 min, se descartó el sobrenadante.

5.- Al paquete celular se le añadió 100  $\mu$ l de buffer reductor de carga SDS-PAGE y se mezcló.

6.- Se calentó de 95 a 100 °C, por 5 min.

7.- Se centrifugó a 3, 500 rcf por 1 min y se recuperó el sobrenadante como el total de proteínas.

\* Las muestras obtenidas quedan listas para cargarse en un gel SDS- PAGE.

### **Amortiguador reductor de carga SDS- PAGE**

Tris HCl 0.5 M pH 6.8

Glicerol al 25 % (v/v)

SDS al 10% (v/v)

Azul de bromofenol al 0.5 % (w/v)

2- mercaptoetanol al 0.005 % (v/v)

### **7.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Bradford**

Se realizó una curva estándar de determinación de proteína usando albúmina sérica bovina (BSA) preparada de un stock de 1 mg/ml. Para llevar a cabo la determinación de la proteína purificada. Se realizó una dilución de 1: 10 con NaCl 0.15 M.

1.- En tubos Eppendorff se realizó la adición de alícuotas de 0, 5, 10 , 15 y 20  $\mu$ l de BSA (Sigma) y 10  $\mu$ l de la proteína purificada, las cuales se llevaron a un volumen final de 100  $\mu$ l con NaCl.

2.- Se les adicionó 1 ml de azul brillante de Coomassie, se agitó y se incubó durante 2 min a temperatura ambiente.

3.- Se determinó la absorbencia a 595 nm. La lectura se realizó en el espectrofotómetro.

4.- Se empleó la curva estándar para la determinación de la concentración de proteína.

### **Azul brillante de Coomassie**

1.- Se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G250 en 50 ml de EtOH al 95%.

2.- Se adicionaron 100 ml de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) al 85%.

3.- Posteriormente se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 1.

4.- La solución se almacenó a 4 °C.

### **7.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)**

Para elaborar un gel desnaturalizante al 10 % se ensamblaron las placas de vidrio, seguido de eso, se preparó el gel.

#### **7.3.1 Gel separador al 10%**

Se preparó una disolución mezclando las siguientes soluciones: 2.2 ml de agua destilada, 1.66 ml de la mezcla de acrilamida- bisacrilamida al 30%, 1.26 ml de 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 50.4  $\mu$ l de SDS al 10 %, 25.6  $\mu$ l de persulfato de amonio (PSA) al 10 % y 4.5  $\mu$ l de N, N, N, N-Tetrametil-Etilendiamina (TEMED). Se mezcló vigorosamente cada vez que se agregó cada disolución, se vació en las placas de vidrio y se agregó una capa de agua con la finalidad de obtener un gel plano en su superficie, dejándolo polimerizar por aproximadamente 30 min.

#### **7.3.2 Gel concentrador al 4%**

Se preparó una disolución mezclando las siguientes soluciones: 1.22 ml de agua destilada, 0.27 ml de mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 30%, 0.5 ml 1 M Tris- HCl pH 6.8, 19.8  $\mu$ l SDS al 10 %, 10.8  $\mu$ l de PSA al 10 % y 2.7  $\mu$ l de TEMED. Se mezcló cada vez que se agregó cada reactivo, se vació en los vidrios, se colocó el peine de teflón y se dejó polimerizar aproximadamente 20 min.

Después de que polimerizó el gel, se armó y llenó la cámara de electroforesis con el buffer de corrida (Tris-Glicina), se cargó el gel con las muestras en cada carril, se conectó la cámara a la fuente de poder y se corrió a un amperaje constante de 30 mA por gel, se dejó correr durante 2 h. Después de que se corrió el gel por el tiempo

indicado se apagó la fuente de poder, se desensambló la cámara, se removió el gel y éste fue teñido con el azul brillante de Coomassie.

### **7.3.3 Preparación de la muestra y de los marcadores de peso molecular**

Se mezcló en una relación de 1:4 el amortiguador de carga para geles desnaturalizantes con la muestra a analizar (2-10 µg), así como los marcadores de peso molecular (Fermentas) y se calentaron en baño maría a 95 °C durante 10 min.

### **7.3.4 Tinción de azul de Coomassie**

1.- Se agregaron 20 ml (o el volumen necesario para cubrir el gel) de la solución de azul de Coomassie y se agitó constantemente durante 30 min.

2.- Se recuperó el colorante y se lavó con agua destilada.

3.- Se adicionó la solución de desteñido y se dejó actuar durante aproximadamente 3 h.

#### **Amortiguador de corrida (Tris-Glicina)**

Tris base 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 3.46 mM

#### **Solución de desteñido**

Metanol 40% (v/v)

Agua destilada 50% (v/v)

Ácido acético glacial 10% (v/v)

## 7.4 Western blot

1.- Se transfirió el gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (Fig. 7).



**FIGURA 7.** Esquema representativo de orden para la transferencia en cámara de transferencia semi- húmeda. La transferencia se llevó a cabo durante 45 min. a 15 V,

- 2.- La membrana se bloqueó por 1 h en buffer TBS-T al 5% de leche.
- 3.- Se lavó 3 veces la membrana con TBS-T, cada lavado por 5 min.
- 4.- Se adicionó el anticuerpo ANTI-HIS (Bio Rad) en una dilución 1:2000, en 10 ml, de solución de TBS-T, al 0.1 % de leche, incubando por 1 h a temperatura ambiente.
- 5.- Se eliminó la solución y se lavó 3 veces la membrana con TBS-T, cada lavado por 5 min.
- 6.- Se adicionó el anticuerpo Anti-mouse HRP (Santa Cruz Biotechnology), en una dilución 1:2000, en 10 ml, de solución de TBS-T, al 0.1 % de leche incubando por 1 h a temperatura ambiente.
- 7.- Se eliminó la solución y se lavó 2 veces la membrana con TBS-T, cada lavado por 5 min, se dió un último lavado con TBS por 2 min.



8.- Se reveló la membrana por el método (HRP- color development soluc.) de la siguiente manera:

- Se preparó la solución A, disolviendo 40 mg de 4-CN en 20 ml de metanol.
- La solución B, se preparó adicionando 500 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 50 ml de TBS.

Se colocó la membrana en la solución B y se le adicionó la solución A, dejándose incubar hasta la aparición de bandas en la membrana, se paró la reacción con agua.

#### **Buffer de transferencia**

Tris base 20mM

Glicina 190 mM

Metanol 20 % (v/v)

#### **TBS**

Tris HCl 10 mM

NaCl 0.9 % (w/v)

#### **TBS-T**

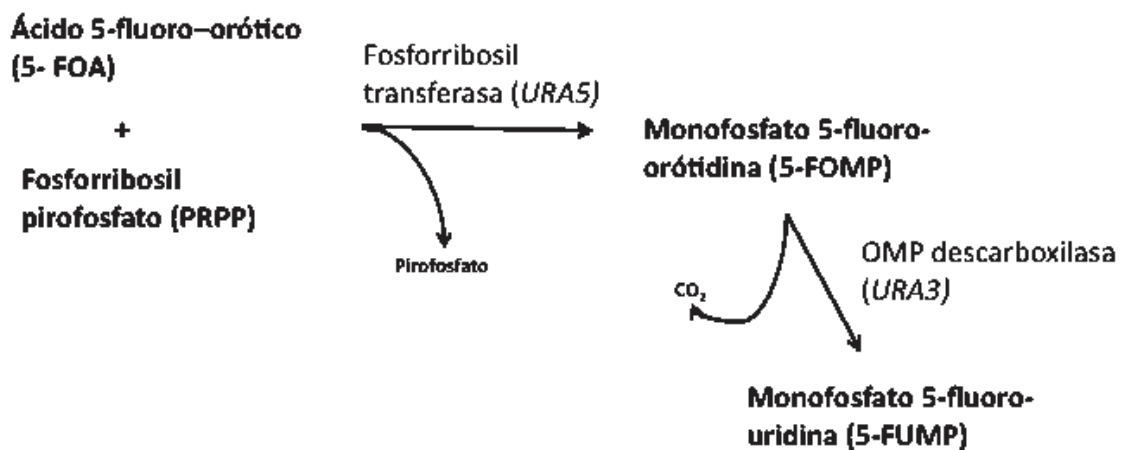
TBS+0.1 % (v/v) de Tween 20

## VII. RESULTADOS

### 1. OBTENCIÓN DE LA MUTANTE DE *Saccharomyces cerevisiae* AUXÓTROFA A URACILO

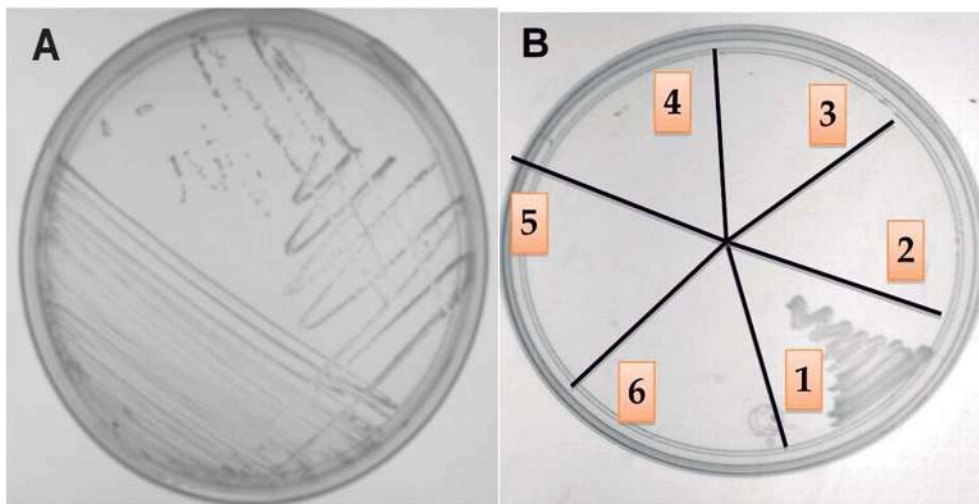
Para la obtención de las cepas recombinantes se obtuvieron líneas celulares mutantes en el gen *URA3* de *S. cerevisiae* utilizando el compuesto 5-FOA, como se describe en material y métodos. Este gen codifica para la enzima oritidín-monofosfato descarboxilasa (OMP-descarboxilasa), enzima clave en la biosíntesis de pirimidinas (Fig. 8), siendo las cepas mutantes en éste gen auxótrofas a uracilo (Ura<sup>-</sup>) (Santoso y Thornburg, 1998).

### UMP sintasa



**FIGURA 8.** Acción de la Uridin-monofosfato sintasa (UMPSasa) en presencia del análogo al ácido orótico, el 5-FOA (Tomado de Santoso y Thornburg, 1998).

Las cepas con el fenotipo Ura<sup>-</sup>, fueron capaces de crecer en placas con medio SC+5-FOA, mientras que en un medio mínimo sin uracilo (SC-U), fueron incapaces de crecer (Fig. 9). Éstos resultados comprueban en primera instancia una mutación en la ruta biosintética del uracilo por la capacidad de las cepas de crecer en un medio con el compuesto 5-FOA; además se corroboró la auxotrofia a uracilo, por la incapacidad de las cepas de crecer en un medio sin uracilo.



**FIGURA 9.** Crecimiento en placa de cepas auxótrofas a uracilo. A, cepa de *Saccharomyces cerevisiae* UMARN3.3 (Ura<sup>-</sup>) crecida en el medio SC+5-FOA. B, en el No. 1 la cepa parental UMARN3 (WT) y del No. 2- 6, cepas Ura<sup>-</sup> crecidas en medio SC-U. En ambas pruebas se incubó a 30 °C durante 72 h.

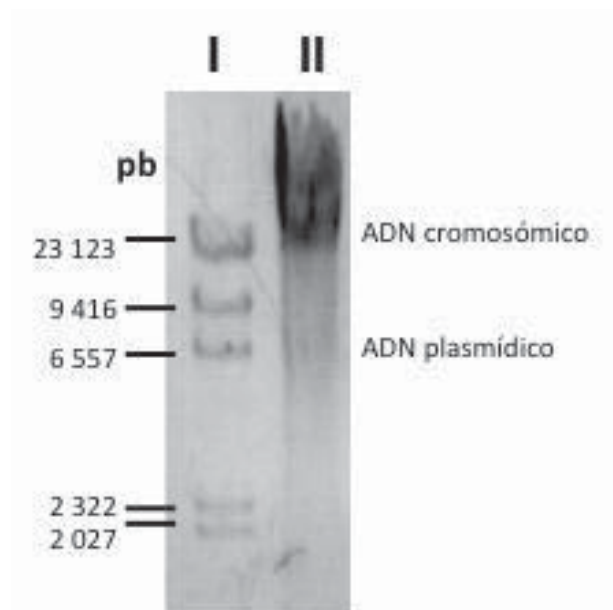
## 2.- OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES CON LOS DERIVADOS DE pYES2

Teniendo la cepa auxótrofa a uracilo, se procedió a obtener células recombinantes partiendo del plásmidos pYES2-SSQ1, pYES2-JAC1 y pYES2-ISU1 (Fig. 6) que tiene clonados individualmente los genes *SSQ1*, *JAC1* e *ISU1* procedentes de *S. cerevisiae*. Todos los genes están clonados en sentido del promotor P<sub>GAL1</sub>, el cual es inducible por galactosa y en el carboxilo terminal de cada gen se adiciona una etiqueta de 6 histidinas (6XHIS).

Las clonas transformantes fueron seleccionadas por su capacidad de biosintetizar uracilo, siendo las cepas transformantes protótrofas a uracilo (Ura<sup>+</sup>). Por lo tanto las cepas transformadas tuvieron la capacidad de crecer en el medio SC-U.

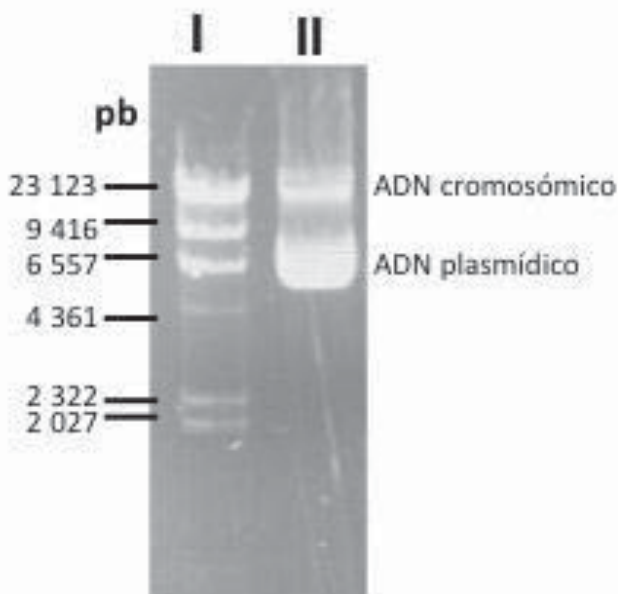
### 2.1 Identificación de cepas transformantes por aislamiento del ADN

Se obtuvieron cultivos de cepas UMARN3.3 con fenotipo Ura<sup>+</sup>, de los cuales se hizo la extracción del ADN total, para observar la existencia de bandas correspondientes al ADN plasmídico (Fig. 10).



**FIGURA 10.** Corrimiento electroforético en un gel de agarosa del aislamiento del ADN total de la cepa transformante UMARN3.3-SSQ1 (Ura<sup>+</sup>). Carril I, marcador de tamaño molecular, ADN del fago  $\lambda$  (*Hind*III). Carril II, aislamiento del ADN total de la cepa UMARN3.3 (Ura<sup>+</sup>).

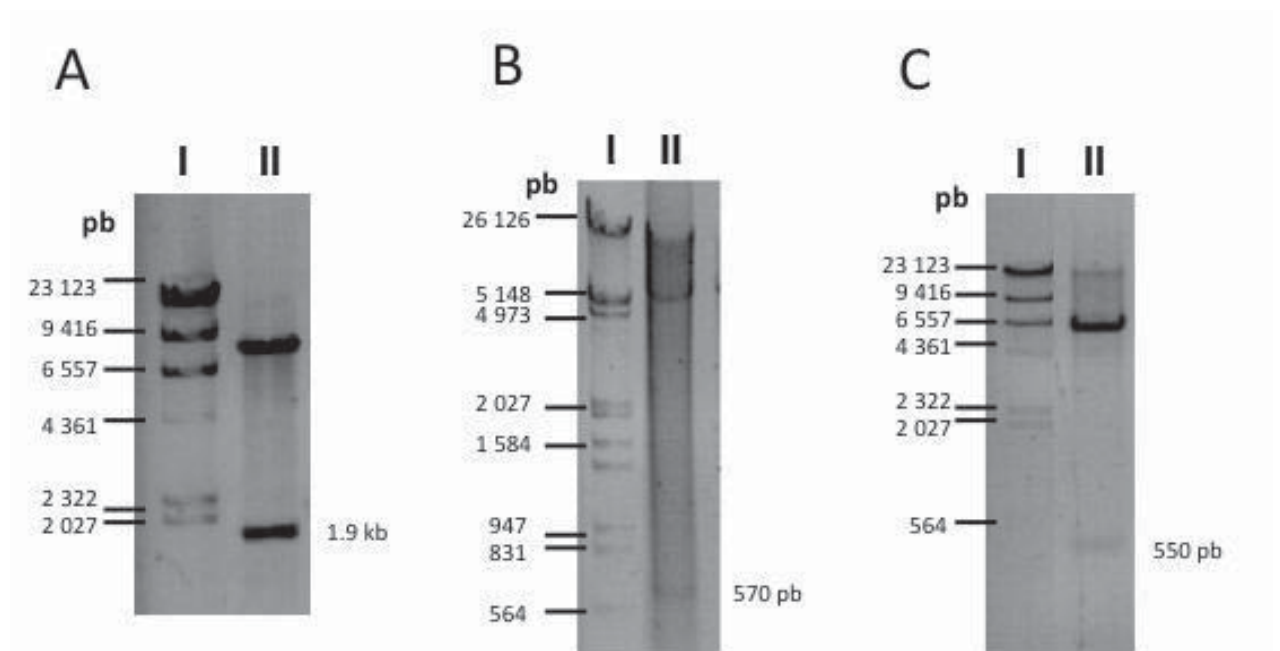
Se logró observar en los geles de agarosa la existencia de dos bandas, la de menor tamaño molecular que corresponde al ADN plasmídico y una banda de mayor tamaño molecular correspondiente al ADN cromosomal (Fig. 10). Sin embargo la concentración del ADN plasmídico no fue suficiente para su digestión con endonucleasas, por lo que se procedió a transformar la cepa de *E. coli* TOP10 con el ADN extraído de las levaduras como se describe en material y métodos. De esta manera debido a que el sitio de replicación de bacterias del plásmido pYES2 es de alto número de copias (60 copias por célula en bacterias comparado con 10 copias por célula en levadura). Esto permite tener una mayor cantidad del ADN, lográndose digerir el ADN plasmídico y así detectar el plásmido transformado (Fig. 11).



**FIGURA 11.** Corrimiento electroforético en un gel de agarosa del aislamiento del ADN total de una cepa transformante de *E. coli* TOP10 con el plásmido pYES2-SSQ1. Carril I, marcador

de tamaño molecular, ADN del fago  $\lambda$  (*Hind*III). Carril II, aislamiento del ADN total de la cepa *E. coli* TOP10.

Para caracterizar el ADN aislado de las cepas de *E. coli* TOP10 con los plásmidos pYES2-SSQ1, pYES2-JAC1 y pYES2-ISU1 se hizo un análisis de restricción (FIGURA 12).



**FIGURA 12.** Análisis de restricción del ADN extraído de cepas transformantes de *E. coli* TOP10 por corrimiento electroforético en gel de agarosa. A, marcador de tamaño molecular ADN del fago  $\lambda$  (*Hind*III/*Eco*RI) (carril I), restricción con las endonucleasas *Xho*I y *Kpn*I del ADN extraído de cepas transformantes de *E. coli* TOP10 con el plásmido pYES2-SSQ1(carril II). B, marcador de tamaño molecular ADN del fago  $\lambda$  (*Hind*III/*Eco*RI) (carril I), restricción con las endonucleasas *Xba*I y *Eco*RI del ADN extraído de cepas transformantes de *E. coli* TOP10 con el plásmido pYES2-JAC1 (carril II). C, marcador de tamaño molecular ADN del fago  $\lambda$  (*Hind*III) (carril I), restricción con las endonucleasas *Xho*I y *Kpn*I del ADN extraído de cepas transformantes de *E. coli* TOP10 con el plásmido pYES2-ISU1 (carril II).

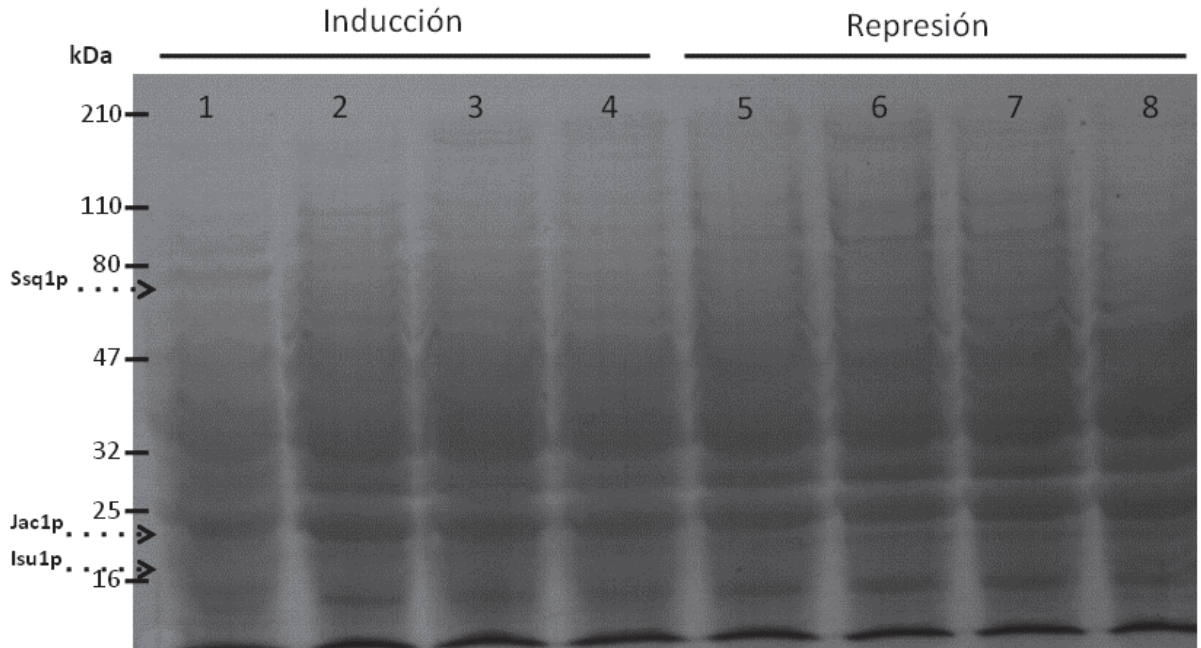
Se observa en la Figura 12A una banda aproximadamente de 1.9 kb que corresponde al tamaño teórico del gen *SSQ1* (1 936 pb) clonado en el vector pYES2 (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). En la Figura 12B se observaa una banda de

aproximadamente 570 pb, correspondiente al tamaño del gen *JAC1* (573 pb) clonado en el vector pYES2 (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) y en la Figura 12C una banda de aproximadamente 550 pb, correspondiente al tamaño del gen *ISU1* (554 pb) clonado en el vector pYES2 (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Se nombró a las cepas UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-JAC1, respectivamente. Adicionalmente se transformó una cepa control, con el plásmido pYES2, denominándose UMARN3.3-pYES2.

### 3. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS Ssq1p, Jac1p e Isu1p

#### 3.1 Análisis por SDS-PAGE

Para determinar si en las cepas transformante se expresan las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p, se procedió a separar las proteínas por electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en el cual todos los aislamientos de proteínas se hicieron empleando como inductor a la galactosa. Se esperaba observar bandas que muestren una expresión diferencial en los pesos moleculares teóricos reportados para las proteínas, 73 kDa para Ssq1p, 21 kDa para Jac1p y 17 kDa para Isu1p (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)).



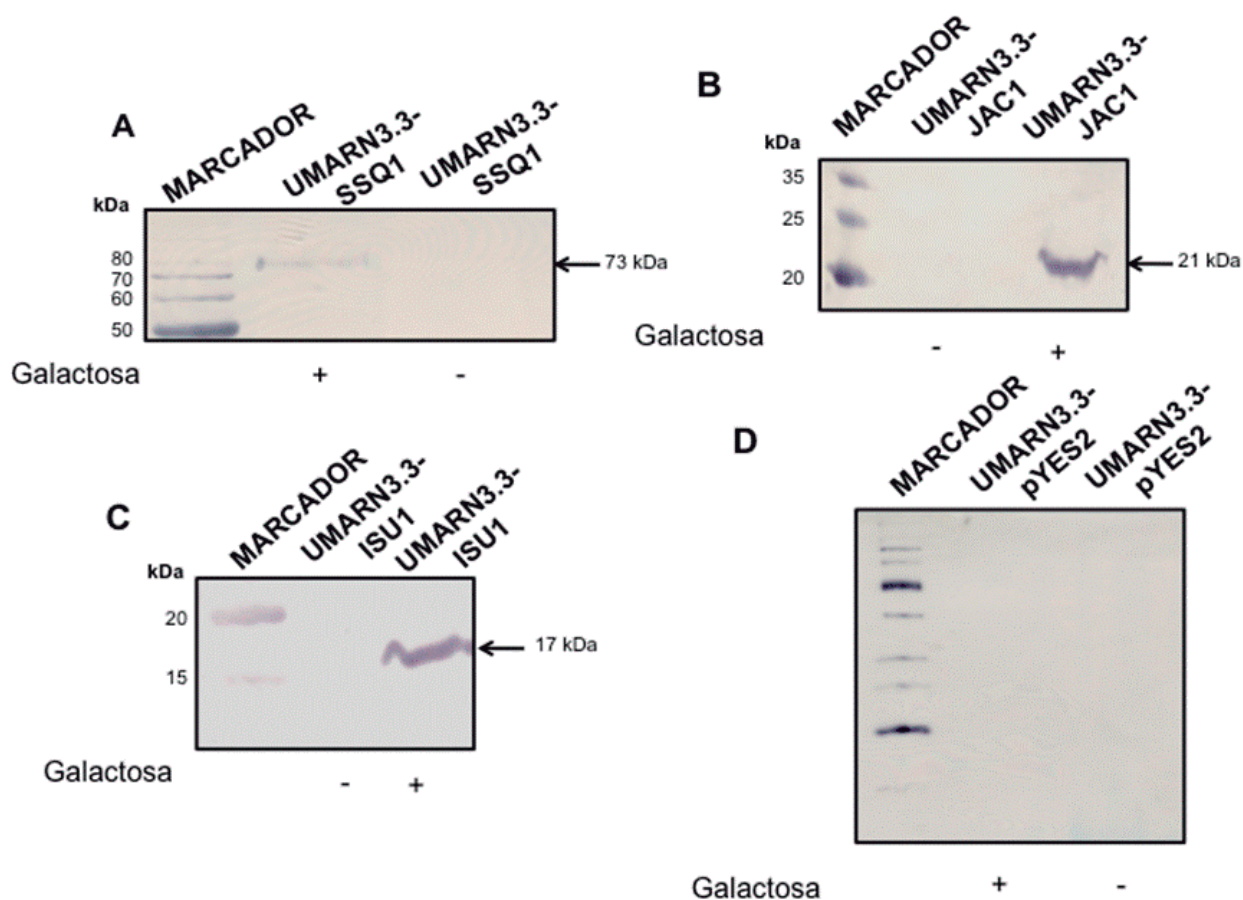
**FIGURA 13.** Análisis de la expresión de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p. Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS- PAGE). Carriles 1-4, extractos celulares de las cepas UMARN3.3-pYES2, UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1, respectivamente. La inducción se llevó a cabo por 18 h con galactosa al 2 % en medio SC-U. Carriles 5-8, extractos celulares de las cepas UMARN3.3-pYES2, UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1, respectivamente.

Los resultados mostrados en el gel indicaron que en ninguno de los extractos celulares se observó la sobre-expresión de bandas proteicas de interés (Fig. 13). Por lo que se procedió a identificar la presencia de las proteínas por un análisis de Western blot.



### 3.2 Análisis por Western blot

Para éste experimento se probaron nuevamente extractos celulares en condiciones de inducción y represión. La inmunodetección se llevo a cabo con dos anticuerpos, el primario ANTI-HIS (Bio Rad), que permitió detectar la etiqueta de 6 histidinas localizada en el carboxilo terminal de las proteínas recombinantes (Ssq1p, Jac1p e Isu1p) y el anticuerpo secundario Anti-mouse HRP (Santa Cruz Biotechnology) que detectó al anticuerpo primario y permitió la detección visual de las proteínas por medio de una reacción colorimétrica (Fig. 14).



**FIGURA 14.** Análisis por Western blot de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Isu1p. Membrana de nitrocelulosa con la inmunodetección. MPM, marcador de peso molecular. A, inmunodetección en los extractos celulares de la cepa UMARN3.3-SSQ1. B, inmunodetección en los extractos celulares de la cepa UMARN3.3-JAC1. C,

inmunodetección en los extractos celulares de la cepa UMARN3.3-ISU1. Panel D, inmunodetección en los extractos celulares de la cepa UMARN3.3-pYES2. Extractos celulares obtenidos 18 h bajo inducción con galactosa ó 18 h de crecimiento en medio SC-U con glucosa.

Se observó en la Figura 14A una banda en el extracto celular inducido de aproximadamente 73 kDa, correspondiente al peso molecular teórico de la proteína Ssq1p de *S. cerevisiae* (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). En B, también detectamos una banda aproximadamente de 21 kDa en condiciones de inducción, correspondiente al peso molecular teórico de la proteína Jac1p de *S. cerevisiae* (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). En C, la banda detectada aproximadamente de 17 kDa, fue correspondiente al peso molecular teórico de la proteína Isu1p de *S. cerevisiae* (SDG [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Finalmente, en D, con extractos celulares de la cepa control sólo con el vector pYES2, no se observó ninguna banda. Por lo que se logró identificar las proteínas de interés, además las proteínas solamente se visualizaron en los extractos celulares que se encontraron en condiciones de inducción, esto nos indica una expresión regulada bajo el promotor P<sub>GAL1</sub> del plásmido pYES2.

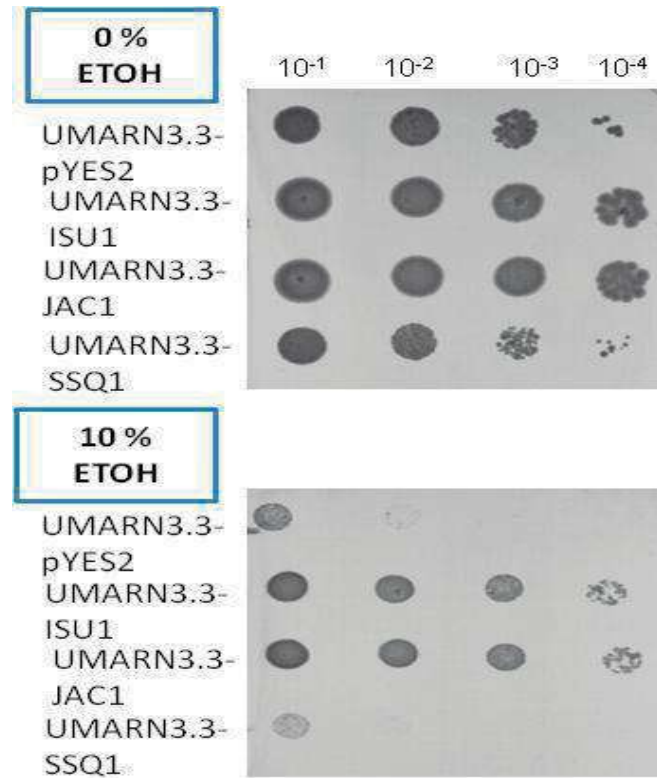
## 4. TOLERANCIA A ETANOL EN LAS CEPAS RECOMBINANTES DE UMARN3.3

### 4.1 Curvas de tolerancia a etanol

Para determinar el efecto de la expresión de los genes *SSQ1*, *JAC1* e *ISU1* de las cepas transformantes se sometieron a condiciones de estrés por etanol, mediante crecimiento en diluciones en caja y curvas de crecimiento con concentraciones crecientes de etanol, como se describe en material y métodos.

En los ensayos mediante diluciones en caja, se observó un mayor crecimiento de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 en comparación de la cepa control y la UMARN3.3-SSQ1 (Fig. 15). Con este resultado se sugiere la

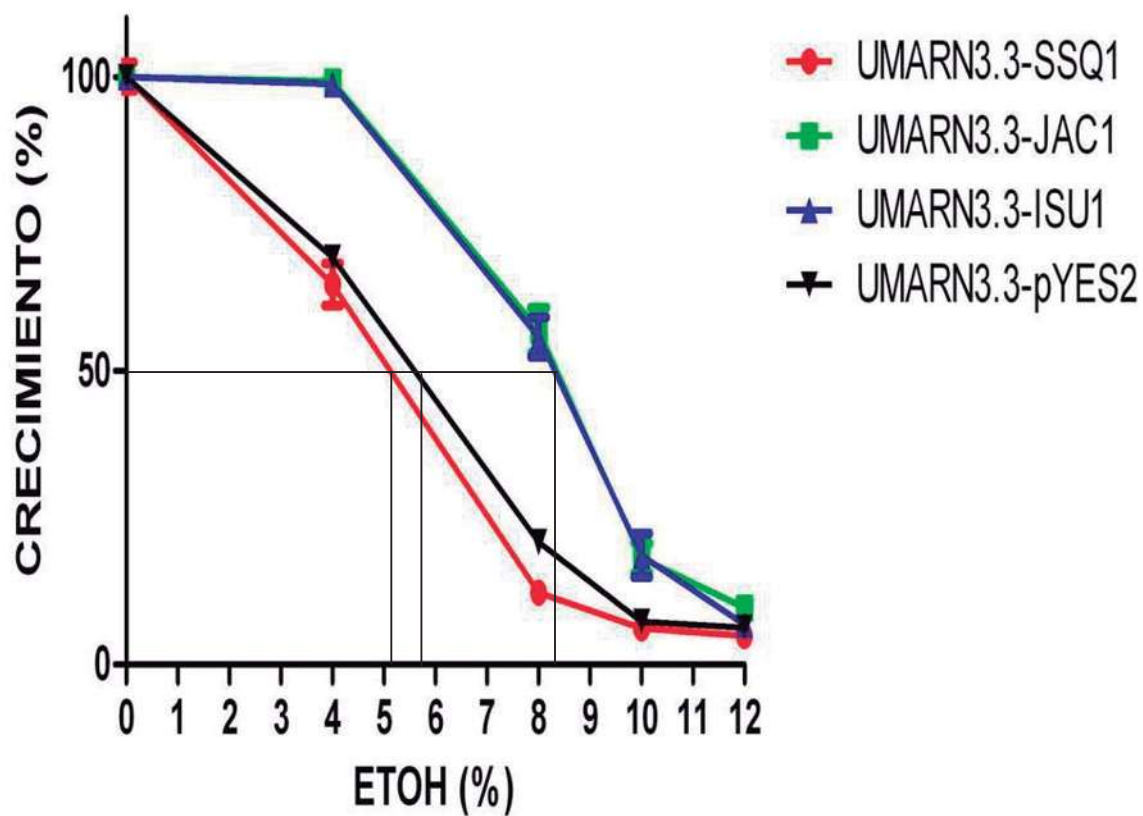
probable participación de las proteínas Jac1p e Isu1p como mecanismo de respuesta al estrés por etanol (Fig. 15).



**FIGURA 15.** Efecto del etanol en el crecimiento de las cepas UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2 mediante diluciones en caja de las cepas recombinantes, además de la cepa UMARN3.3 (Ura<sup>-</sup>) y su cepa parental UMARN3. Cultivos crecidos en medio SC-U, al 2 % de galactosa ó glucosa, durante 72 h, a 30 °C con y sin EtOH al 10% (v/v).

Para determinar de manera cuantitativa la diferencia de crecimiento entre las cepas recombinantes, se procedió a realizar curvas de crecimiento en condiciones de estrés por etanol (Fig. 16). Este experimento nos permite calcular la Dosis inhibitoria media ( $D_{150}$ ), que es la concentración necesaria de una sustancia, en este

caso etanol, para disminuir el crecimiento en un 50%, comparado con el crecimiento en ausencia del agente químico (Fig. 16).

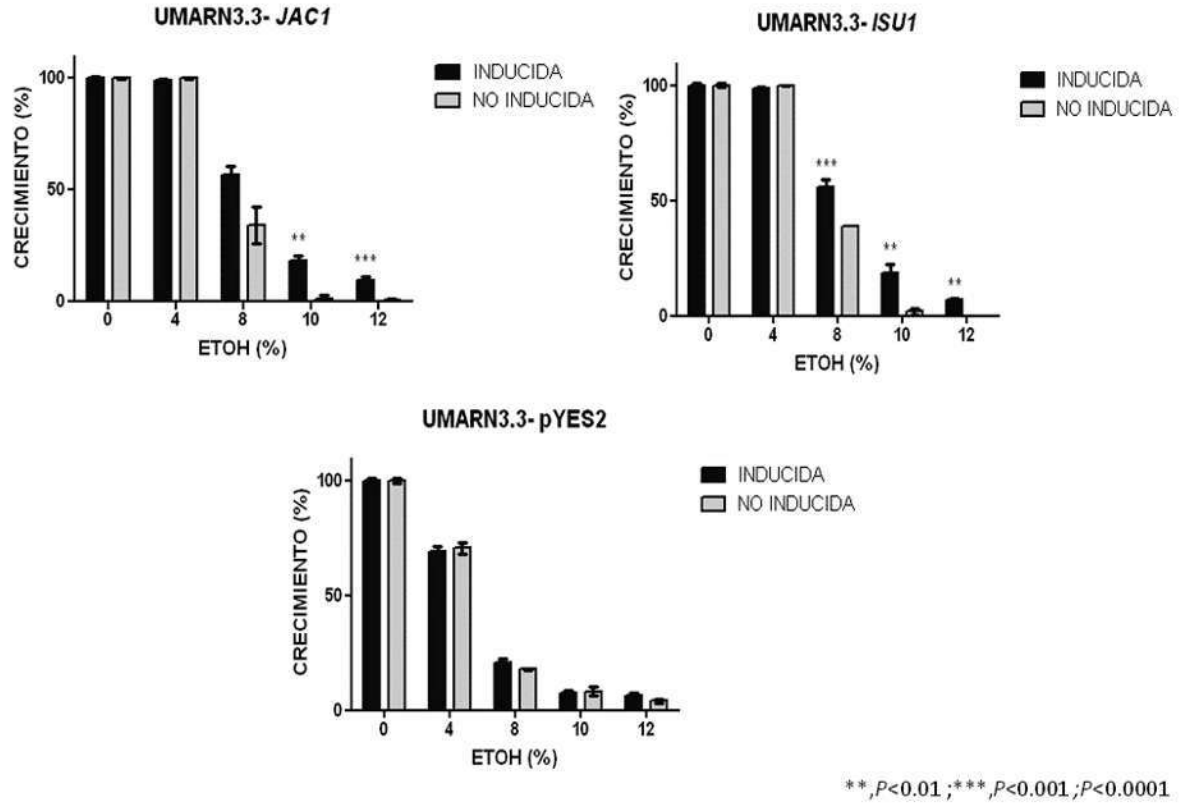


D <sub>150</sub>	
Cepa	ETOH (%v/v)
UMARN3.3-SSQ1	5.1
UMARN3.3-JAC1	8.2
UMARN3.3-ISU1	8.2
UMARN3.3-pYES2	5.8

**FIGURA 16.** Efecto del etanol en el crecimiento de las cepas UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2. datos tomados a 18 h de crecimiento en medio SC-U al 2 % de galactosa, n= 3, con barras de error estándar. Los datos se normalizaron tomando como el 0% de crecimiento, 0.1 de D. O. <sub>600</sub>, y el 100% de crecimiento fue definido con el mayor valor de D. O. <sub>600</sub> en cada grupo de datos de las cepas analizadas. La dosis inhibitoria media es indicada en la tabla adjunta.

Se observó mayor crecimiento de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 en condiciones de inducción con galactosa comparando con la cepa control UMARN3.3-pYES2 y la cepa UMARN3.3-SSQ1. Además, el cálculo gráfico de la Dosis inhibitoria media ( $D_{150}$ ), nos indicó un aumento del 41% en el nivel de tolerancia a etanol de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1, comparadas con el control. Sugiriendo que las proteínas Jac1p e Isu1p, participan en el mecanismo de respuesta al estrés por etanol y de esta manera favoreciendo el crecimiento de las cepas recombinantes en estas condiciones.

Para determinar el efecto del etanol en el crecimiento en las cepas, graficamos el (%) de crecimiento comparando cada una de las concentraciones probadas (Fig. 17).



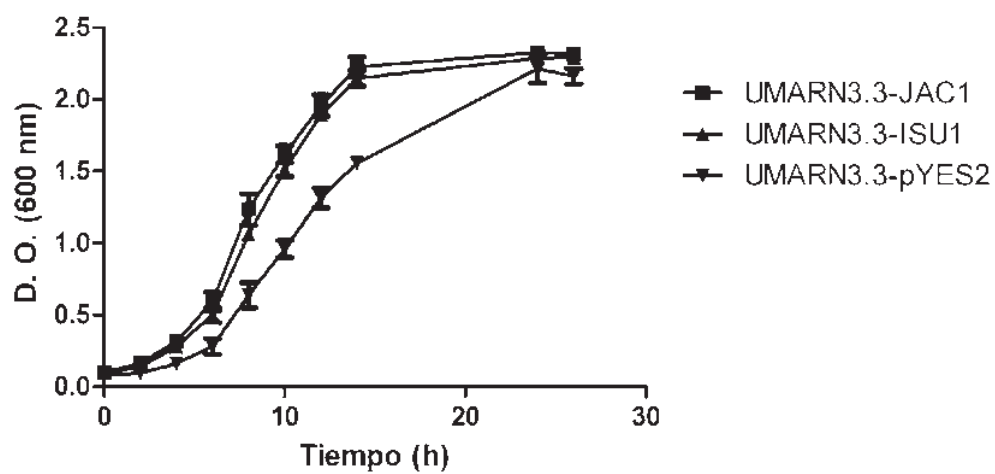
**FIGURA 17.** Efecto del etanol sobre el crecimiento de las cepas UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2. Análisis estadístico *t* de student.  $n=3$ . Las barras representan el error estándar.

En las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 se encontraron diferencias significativas en el crecimiento, bajo condiciones de inducción, comparado con la condición de represión usando glucosa. La cepa control UMARN3.3-pYES2 no presentó variación en el crecimiento bajo ambas condiciones (Fig. 17). Con este resultado destacamos que en el tratamiento inductivo, es donde se presenta el mayor crecimiento, reforzando la hipótesis de que las proteínas Isu1p y Jac1p participan en el mecanismo de respuesta al estrés por etanol.

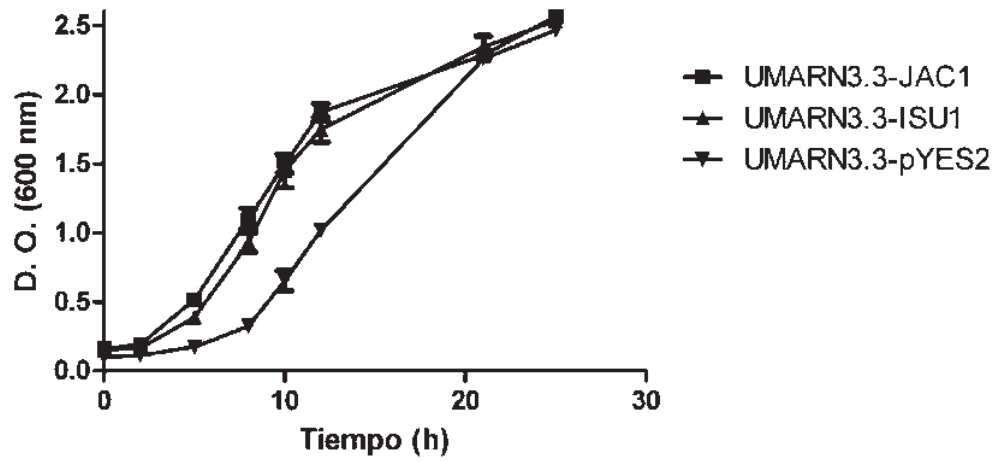
## 4.2 Cinéticas de crecimiento

Con el antecedente de la diferencia en fenotipo de las cepas transformantes, se hicieron cinéticas de crecimiento para abordar este comportamiento en función del tiempo de incubación, ya que en los análisis mostrados anteriormente sólo nos puede brindar datos cuantitativos de un tiempo determinado (Fig. 18).

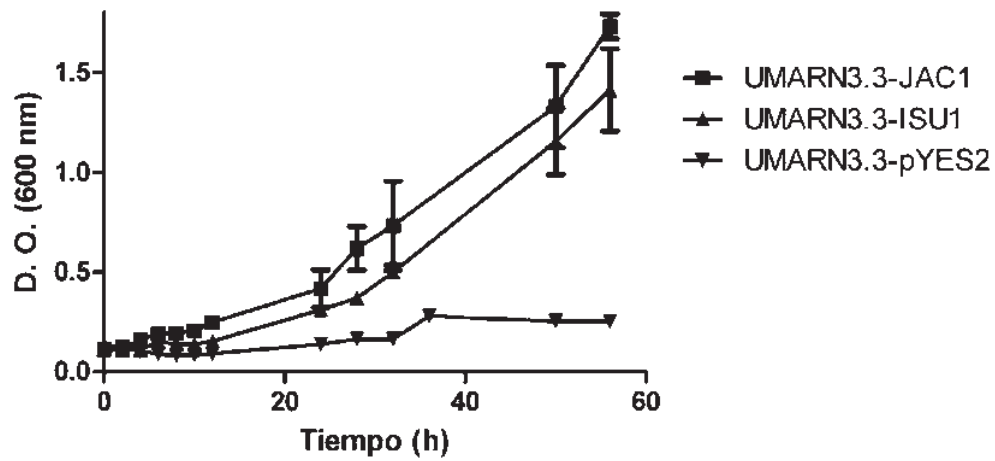
A



B



C



**FIGURA 18.** Cinéticas de crecimiento en condiciones de estrés por etanol de las cepas UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2. A, cinética de crecimiento al 0 % de etanol (v/v). B, cinética de crecimiento al 5 % de etanol (v/v). C, cinética de crecimiento al 10 % de etanol (v/v). Crecimiento en medio SC-U al 2 % de galactosa en agitación constante a 30 °C. n= 3. Las barras representan el error estándar.



Se observó que las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 presentaron una mayor velocidad de crecimiento y una fase de adaptación (Lag) menor comparadas con el control. Su fase exponencial se inicia a un tiempo menor. El crecimiento antes marcado se observó a lo largo del tiempo en todos los tratamientos probados al 0, 5 y 10 % de etanol (v/v); sin embargo, la biomasa obtenida al final no mostró diferencias. Una vez más obtuvimos evidencia de la participación de las proteínas Jac1p e Isu1p en un mecanismo de tolerancia a etanol independientemente del tiempo.

Para analizar matemáticamente los datos graficados en la Figura 18, se procedió a realizar el cálculo de la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{MAX}$ ) y del tiempo de duplicación ( $T_D$ ). Éstos datos nos arrojan de manera más detallada las diferencias y efectos de los tratamientos sobre las distintas cepas recombinantes (Cuadro 3).

**CUADRO 3.** Datos cinéticos de crecimiento en condiciones de estrés por etanol.

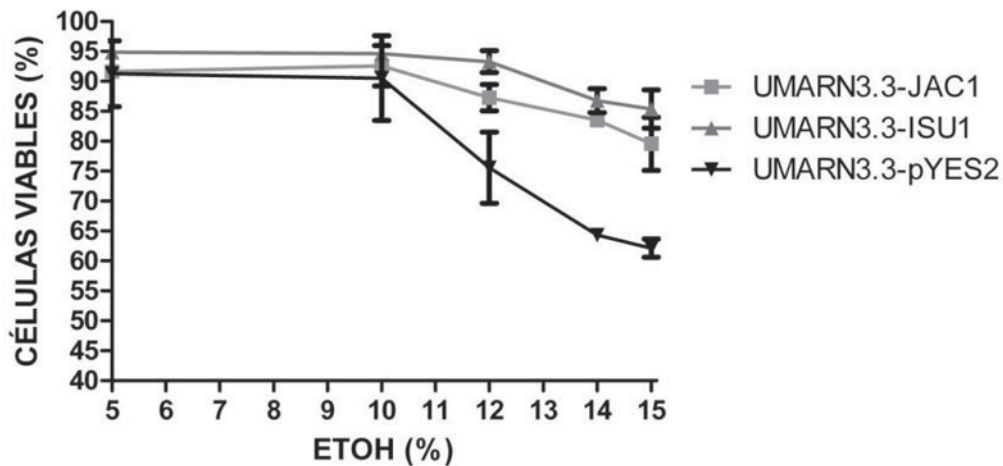
CEPA	0 % EtOH			5 % EtOH			10 % EtOH		
	$\mu_{MAX}$	$T_D$	R <sup>2</sup>	$\mu_{MAX}$	$T_D$	R <sup>2</sup>	$\mu_{MAX}$	$T_D$	R <sup>2</sup>
UMARN3.3-JAC1	0.1026	6.75	0.95	0.1015	6.82	0.99	0.0428	16.20	0.90
UMARN3.3-ISU1	0.1040	6.66	0.96	0.0933	7.42	0.99	0.0470	14.74	0.93
UMARN3.3-pYES2	0.1031	6.72	0.97	0.0602	11.51	0.98	0.0202	34.30	0.75

Los datos cinéticos se tomaron en la fase exponencial y con la fórmula de crecimiento exponencial ( $Y = Y_0^{(k \cdot X)}$ ), se hicieron los cálculos de los parámetros cinéticos, donde  $K = \mu_{MAX}$  y el tiempo de duplicación  $T_D = \ln(2)/\mu_{MAX}$  tomando un mínimo de 8 datos por triplicado, para los cálculos.  $\mu_{MAX} = h^{-1}$ ,  $T_D = h$ . Todas las cinéticas se hicieron en medio SC-U al 2 % de galactosa en agitación constante, a 30 ° C.

De los datos anteriores la mayor diferencia se observó al 10 % de EtOH, encontrándose que  $\mu_{MAX}$  es hasta 2.1 veces mayor en las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 comparadas con el control. Sin embargo, el factor de correlación ( $R^2$ ) no es bueno para la cepa UMARN3.3-pYES2 esto debido a que en ésta concentración la cepa tiene un crecimiento mínimo, por lo que el modelo matemático utilizado para analizar los datos no se ajustó adecuadamente, sin embargo, las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 se ajustan al modelo matemático utilizado (Fig 18C). Lo anterior podría significar que la diferencia observada podría ampliarse bajo un modelo más preciso. Los datos arrojados por este análisis nos mostraron que la expresión de las proteínas Jac1p e Isu1p modifica de manera favorable los parámetros de crecimiento, indicando una participación benéfica de estas proteínas sin etanol y durante el estrés por etanol.

#### 4.3 Análisis de la viabilidad celular de estrés por etanol

Para determinar la viabilidad de las cepas UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1 y UMARN3.3-pYES2, se procedió a someter las cepas a diferentes concentraciones de etanol 3 h. Posteriormente a las suspensiones celulares se les sometió a tinción con azul de tripano para determinar la viabilidad celular (Fig. 19).



**FIGURA 19.** Efecto de la concentración de etanol en la viabilidad de las cepas transformantes. Viabilidad tomada a las 3 h, de haber retado los cultivos con etanol. n= 2, observado las barras de error estándar.

Se observó que durante la exposición a etanol en las concentraciones hasta el 10% de etanol (v/v), no hubo un efecto significativo diferencial entre las cepas. Posteriormente, se observó que la viabilidad de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 fue mayor que la cepa control a concentraciones del 12% de etanol y mayores. Esto nos indica que la participación de las proteínas Jac1p e Isu1p durante el estrés por etanol favorece que las células se mantengan viables. De esta manera se sugiere que el mayor crecimiento antes observado se debe a un efecto favorable en la viabilidad de las células.

Las cinéticas de muerte de las células sometida a estrés de etanol nos arrojaron parámetros matemáticos sobre el comportamiento de las cepas recombinantes (Cuadro 4).

**CUADRO 4.** Datos cinéticos de viabilidad en condiciones de estrés por etanol.

CEPA	0 % EtOH			10 % EtOH			15 % EtOH		
	<i>-k</i>	<i>D</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>-k</i>	<i>D</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>-k</i>	<i>D</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
UMARN3.3-JAC1	0.4200	2.381	0.94	1.128	0.886	0.98	7.383	0.135	0.90
UMARN3.3-ISU1	0.3528	2.384	0.90	1.039	0.962	0.90	7.471	0.134	0.92
UMARN3.3-pYES2	0.4093	2.443	0.90	1.599	0.652	0.90	12.03	0.083	0.90

Los datos cinéticos fueron calculados con regresión lineal, donde la pendiente es el inverso de la velocidad de muerte  $-1/k$  y el tiempo de reducción decimal es  $D$  y se calcula con la siguiente formula,  $D=2.3/k$ , los datos fueron calculados con una n=2.  $-1/k= h$ ,  $D= h$ . Todas las cinéticas se hicieron en medio SC-U al 2 % de galactosa en agitación constante, a 30 ° C.

Encontramos que la velocidad letal ( $-k$ ) en el tratamiento al 15% de etanol (v/v), es alrededor de 1.6 veces menor en las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 comparados con el control, lo que nos indicó una menor mortalidad de estas cepas en condiciones de estrés por etanol, además un tiempo de reducción decimal ( $D$ ) hasta 1.6 veces mayor en las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 comparadas con el control, indicando que es necesario un tiempo mayor para la reducción de la población celular.

Teniendo resultados consistentes con datos recabados anteriormente por las curvas de tolerancia a etanol, los datos de viabilidad celular confirman un fenotipo más tolerante de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1, sugiriendo la participación de éstas proteínas como un mecanismo de respuesta al estrés por etanol, para el mantenimiento de la viabilidad celular.

## VIII. DISCUSIÓN

Las modificaciones genéticas, como la inactivación o la sobre-expresión controlada de genes desde vectores episomales ó integrativos requieren el uso de genes de selección para la eficiente detección de células transformantes. Después de las modificaciones genéticas, los genes de selección deben de mantener una buena selección para evitar células revertantes, especialmente durante la expresión de genes a partir de vectores episomales. Muchos de los genes de selección usados en levadura confieren resistencia contra antibióticos u otros compuestos tóxicos, la selección de las cepas que tienen dichos sistemas de selección, requiere la adición de estos compuestos tóxicos al medio de crecimiento. Complementario a su toxicidad, el precio de muchos de esos compuestos hace que su uso en grandes cantidades no sea posible. Una alternativa para esto es usar genes de selección que complementen algún requerimiento nutricional, los más comúnmente usados son alelos de genes que codifican enzimas clave en procesos metabólicos esenciales (Pronk, 2002).

El objetivo de éste trabajo fue evaluar la participación de las proteínas Ssq1p, Jac1p e Iku1p, sobre la tolerancia a etanol en *Saccharomyces cerevisiae*.

Para esto se utilizó un esquema de selección negativo basado en el metabolismo de las pirimidinas para producir líneas celulares que tengan alteraciones estables en la expresión de genes. En esta selección se usó el compuesto 5-FOA para generar un metabolito tóxico, el monofosfato 5-fluorouridina (5-FUMP), el cual provee la base de la selección, debido a que la uracil monofosfato sintasa (UMPSasa) cataliza un paso limitante en la biosíntesis de pirimidinas. De esta manera sólo las células que tengan una mutación en el gen *URA3*, que codifica la oritidin-monofosfato descarboxilasa (OMP descarboxilasa), tendrán la capacidad de crecer en un medio de crecimiento al cual se le añade 5-FOA. Complementario a esto, éstas células son incapaces de biosintetizar uracilo (Fig. 8) (Santoso y Thornburg, 1998).

Con la obtención de la cepa de *S. cerevisiae* auxótrofa a uracilo se procedió a realizar la transformación con el vector de expresión pYES2, un vector binario con sitio de replicación para *E. coli* y otro para *S. cerevisiae*. Este plásmido contiene marcadores de selección para ambos organismos y además contiene un promotor para levaduras inducible por galactosa, el P<sub>GAL1</sub> (Fig. 6). Éste vector ha sido utilizado para establecer el efecto de la sobre-expresión de algunas proteínas (Sethuraman y col., 2001; Sterner y col., 2002; Fahrenkrog y col., 2004). En pYES2 se clonaron los genes de interés para el estudio, *SSQ1*, *JAC1* e *ISU1* de *S. cerevisiae*, todos clonados individualmente bajo el promotor inducible, además en el carboxilo terminal de las proteínas se añadió una etiqueta de 6 histidinas (6XHIS) (Dutkiewicz y col., 2003).

Para establecer que las cepas obtenidas eran transformantes y no cepas revertantes de la mutación en el gen *URA3*, se procedió a realizar un aislamiento del ADN total de levaduras. Éste método indicó la presencia del ADN plasmídico, sin embargo, la cantidad del ADN cromosómico es por lo menos 10 veces mayor que la del plasmídico (Fig. 10), lo que causa que después de la digestión con endonucleasas, el ADN cromosomal impide observar bandas específicas en el corrimiento electroforético en gel de agarosa, dificultando de esta manera la posible caracterización del ADN plasmídico. Por lo que con el ADN total de las posibles transformantes se procedió a transformar una cepa de *E. coli* (TOP10), un método muy común para identificar vectores episomales en levaduras. La cantidad de ADN cromosomal no es un problema en este organismo, ya que la cantidad de plásmido que se obtiene es equiparable en concentración a la del ADN cromosomal (Fig. 11). Adicionalmente, la concentración obtenida del ADN plasmídico es por lo menos 3 veces mayor que en levaduras permitiendo de esta manera que la visibilidad de las bandas en el corrimiento electroforético de agarosa después de la digestión con endonucleasas sea más claro. Es por estos métodos que se logró confirmar a las cepas transformantes (Fig. 12).

Sin embargo, los protocolos anteriores sólo nos indican la transformación de las cepas, por lo que para asegurar la expresión de los genes clonados, se analizaron los extractos celulares mediante geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Lo que se

esperaba obtener en estos geles es la existencia de bandas enriquecidas que indiquen la presencia de una proteína en grandes cantidades sólo en los tratamientos bajo inducción (galactosa), y en las cepas que tienen los plásmidos con los genes clonados (UMARN3.3-SSQ1, UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1), no observando ésto en la cepa control (UMARN3.3-pYES2) (Fig. 13). En ninguno de los tratamientos ni cepas se logró observar las bandas proteicas esperadas, lo que abrió dos vertientes: que la cepas no estuvieran expresando las proteínas o que la cantidad de proteína expresada no sea la suficiente para observar bandas diferenciales.

Por lo que se llevó a cabo su identificación por Western blot, para determinar la expresión de las proteínas en estos ensayos se detectaron las proteínas utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas (Fig. 14). Con este resultado no solamente aseguramos que las proteínas se están expresando, sino que logramos observar que bajo las condiciones probadas y tiempos de incubación la expresión sólo se da en los tratamientos bajo inducción con galactosa.

Teniendo asegurado no solamente la obtención de las cepas transformantes, sino la correcta expresión de las proteínas clonadas en los plásmidos, se hicieron los ensayos de respuesta al estrés por etanol denominados también de tolerancia a etanol. En estos experimentos se crecieron las cepas transformantes en varias concentraciones de etanol, incluyendo un rango del 0 % al 12 % de etanol (v/v), los rangos en los que se considera un estrés por etanol varían de acuerdo a la cepa de *S. cerevisiae* en estudio. Algunos autores manejan desde un 5 % hasta un 10 % de etanol (v/v) (Rosa y Correia 1991; You y col., 2003; Voorst y col., 2006), por lo que con el rango utilizado aseguramos que se establezca el estrés por etanol.

El primer ensayo que se realizó para observar el fenotipo de las cepas transformantes bajo estrés por etanol, fue una curva de crecimiento con las concentraciones de etanol antes descritas. La finalidad de este experimento fue encontrar un crecimiento diferencial entre las cepas transformantes bajo tratamientos de inducción y represión de los genes en estadios y periodos de incubación específicos. De esta manera encontramos que las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 mostraron un mayor crecimiento en presencia de etanol en el tratamiento bajo inducción

(galactosa), en comparación con las cepas UMARN3.3-pYES2 y UMARN3.3-SSQ1 (Fig. 16). Esto nos indica que la expresión de las proteínas Jac1p e Isu1p tienen un efecto benéfico en la tolerancia a etanol, mientras que en la expresión de la proteína Ssq1p no se observó un efecto positivo en la tolerancia a etanol.

En la curva de crecimiento con el tratamiento represivo (glucosa), no encontramos variación en el crecimiento de las cepas transformantes en la mayoría de los tratamientos mostrando todas el mismo patrón de crecimiento del control. Esto es de esperarse, ya que no deberían de estar sobre-expresando las proteínas debido a que el promotor  $P_{GAL1}$  bajo el cual están clonados los genes es reprimible con glucosa. Sin embargo, en el ensayo con 4 % de etanol se logra observar que las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 tienen mayor crecimiento (Datos no mostrados). Esto se puede explicar con el hecho de que el promotor  $P_{GAL1}$  no se reprime totalmente por glucosa como lo reporta en 1985 Giniger y col., teniendo esta actividad “por goteo” que permite la expresión de proteínas. Esto podría dar como resultado el fenotipo observado en las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1, en condiciones de represión. Para corroborar los resultados anteriores se hizo el ensayo de crecimiento de las cepas transformantes mediante diluciones en caja. En este experimento de crecimiento se probaron dos concentraciones de etanol 0 % y la del 10 % (v/v). Se decidió probar el 10 %, ya que es el tratamiento en el cual observamos una mayor variación entre los tratamiento de inducción y represión en las cepas transformantes. De esta manera encontramos que se mantuvo el fenotipo de mayor crecimiento de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 en ambas condiciones (Fig. 15). Este ensayo confirmó el dato de que la expresión de las proteínas Jac1p e Isu1p tiene un efecto benéfico en el crecimiento en condiciones de estrés por etanol.

Adicionalmente, se decidió hacer una comparación de crecimiento en condiciones de inducción y represión entre las mismas cepas recombinantes, para determinar las concentraciones de etanol en las cuales existieran diferencias de crecimiento. Se observó de esta manera que solamente las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 tuvieron mejor crecimiento en condiciones inductoras. UMARN3.3-ISU1 mostró diferencias de crecimiento en tratamientos desde el 8 % de etanol (v/v), mientras que UMARN3.3-JAC1,



mostró diferencias a partir del 10 % de etanol (v/v). Como se esperaba, la cepa control UMARN3.3-pYES2 no mostró diferencias. Sin embargo, la cepa UMARN3.3-SSQ1, mostró un comportamiento interesante al 10 % de etanol (v/v), se observó que el crecimiento fue menor en condiciones de inducción, teniendo claramente la expresión de la proteína Ssq1p un efecto contrario al esperado sobre el crecimiento (Fig. 17). No se tienen antecedentes de un comportamiento similar, lo que nos permite abundar que se pudiera tratar de un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en presencia de etanol influenciado por la expresión de la proteína.

Posteriormente se hicieron pruebas de viabilidad para determinar la toxicidad del etanol sobre las cepas transformantes UMARN3.3-JAC1, UMARN3.3-ISU1, UMARN3.3-SSQ1. Cabe señalar que las células inviables no necesariamente están muertas, ya que bioquímicamente inviable se refiere a las células que no tienen la capacidad de dividirse, en el caso de las levaduras la capacidad de gemar, aunque convencionalmente se señala a las células teñidas como muertas y las células sin teñir vivas. El mayor porcentaje de células viables fue de las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 (Fig. 19), consistente con los datos obtenidos anteriormente. Adicionalmente se calcularon los datos cinéticos de muerte, donde encontramos que las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 al 10 y al 15 % de etanol (v/v), tienen una velocidad de muerte ( $-1/k$ ) menor y un tiempo de reducción ( $D$ ) mayor, es decir, sus datos cinéticos nos mostraron una mayor capacidad de mantenerse viables en condiciones de estrés por etanol, comparadas con la cepa control y la cepa UMARN3.3-SSQ1, que mantienen un comportamiento similar. Lo que nos indica que el aumento de la tolerancia a etanol observado en los análisis anteriores es debido a un aumento de la viabilidad celular de las cepas.

El último de los análisis de tolerancia a etanol que se realizó fue determinar los datos cinéticos de crecimiento, este análisis nos indica con datos más robustos la existencia de una diferencia en el crecimiento de las cepas recombinantes. Lo que encontramos fue que en los tratamientos al 0 y al 5 % de etanol (v/v) se mantuvo un comportamiento similar a las cepas probadas en 10 % de etanol (v/v). La diferencia en las velocidades de crecimiento máxima ( $\mu_{MAX}$ ) fue muy marcada, teniendo las cepas UMARN3.3-JAC1 y UMARN3.3-ISU1 una velocidad hasta 2.1 veces mayor que la cepa

control y la cepa UMARN3.3-SSQ1, en la prueba al 10% de etanol (v/v) (Fig. 18). Una mayor velocidad de crecimiento nos indica que en un tiempo determinado se tendrá un mayor número de células. La diferencia de crecimiento existente en las cepas transformantes es consistente con los ensayos anteriores, siendo que las cepas que expresan las proteínas Isu1p y Jac1p, tienen la capacidad de crecer mejor ante el estrés por etanol, en comparación con la cepa control y la cepa que sobre-expresa la proteína Ssq1p.

¿Como es que la sobre-expresión de las proteínas Jac1p e Isu1p, puedan estar favoreciendo la tolerancia a etanol?. Se sabe que estas dos proteínas participan en la ruta metabólica de biosíntesis de centros Fe-S en *S. cerevisiae*. Dentro de la ruta, la chaperona de 73 kDa denominada Ssq1p perteneciente a una familia muy conservada de chaperonas, la familia Hsp70. Los miembros de esta familia tienen características conservadas, todas poseen un dominio ATPasa y un dominio de unión a un sustrato, además de que generalmente se ven acompañadas por una proteína J conocida como cochaperona. El sustrato de Ssq1p es la proteína Isu1p y su cochaperona la proteína Jac1p. La función de Isu1p en la biosíntesis de centros Fe-S, se relaciona con el transporte y liberación del centro Fe-S en la apoproteína correspondiente; sin embargo, se ha encontrado que tiene una fuerte influencia sobre la actividad ATPasa de Ssq1 (Dutkiewicz y col., 2003). Por otro lado, Jac1p como característica de su familia (Proteínas J) tiene, al igual que Isu1p, la capacidad de activar el dominio ATPasa de Ssq1 (Dutkiewicz y col., 2003). También se ha encontrado que Jac1p es fundamental para que Isu1p encuentre el dominio de unión al sustrato de la proteína Ssq1p (Andrew y col., 2006; Lill y Mühlenhoff, 2008); de esta manera se ha establecido que la actividad ATPasa de Ssq1p depende de Isu1p y Jac1p. Además se ha encontrado que si se modifica la estequiometría de cualquiera de éstas dos últimas proteínas la actividad ATPasa de Ssq1p se ve aumentada hasta 12 veces (Dutkiewicz y col., 2003).

Todas la proteínas Hsp70 mantienen un ciclo funcional (Fig. 2), cuya está marcada por la actividad ATPasa que mantienen, de manera que nosotros proponemos que al sobre-expresar las proteínas Jac1p e Isu1p, aumenta la actividad ATPasa de Ssq1p. Al presentarse este aumento, la velocidad de su ciclo funcional se vería favorecida, de manera que al ser

Ssq1p el punto central para la biosíntesis de centros Fe-S y al favorecer su ciclo, estamos haciendo más eficiente la ruta metabólica (Fig. 20).

Al someterse las células al estrés por etanol, se puede ver favorecida la recuperación de proteínas desnaturalizadas con centros Fe-S debido a la eficiencia de la biosíntesis de centros Fe-S. También puede que al estar “reciclando” el hierro libre ( $\text{Fe}^{+2}$ ), se vea disminuido el ataque por estrés oxidativo, ya que el  $\text{Fe}^{+2}$  es un catalizador de la producción de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, no se tiene evidencia que lo pruebe (Fig. 20).

Por otro lado, es probable que simplemente las proteínas Isu1p y Jac1p al estar favoreciendo la eficiencia de la ruta metabólica de biosíntesis de centros Fe-S, estén ayudando a mantener funcionales algunos sistemas celulares, ya que se sabe que proteínas derivadas de esta ruta participan en un gran número de procesos metabólicos esenciales para la célula (Fig. 5).

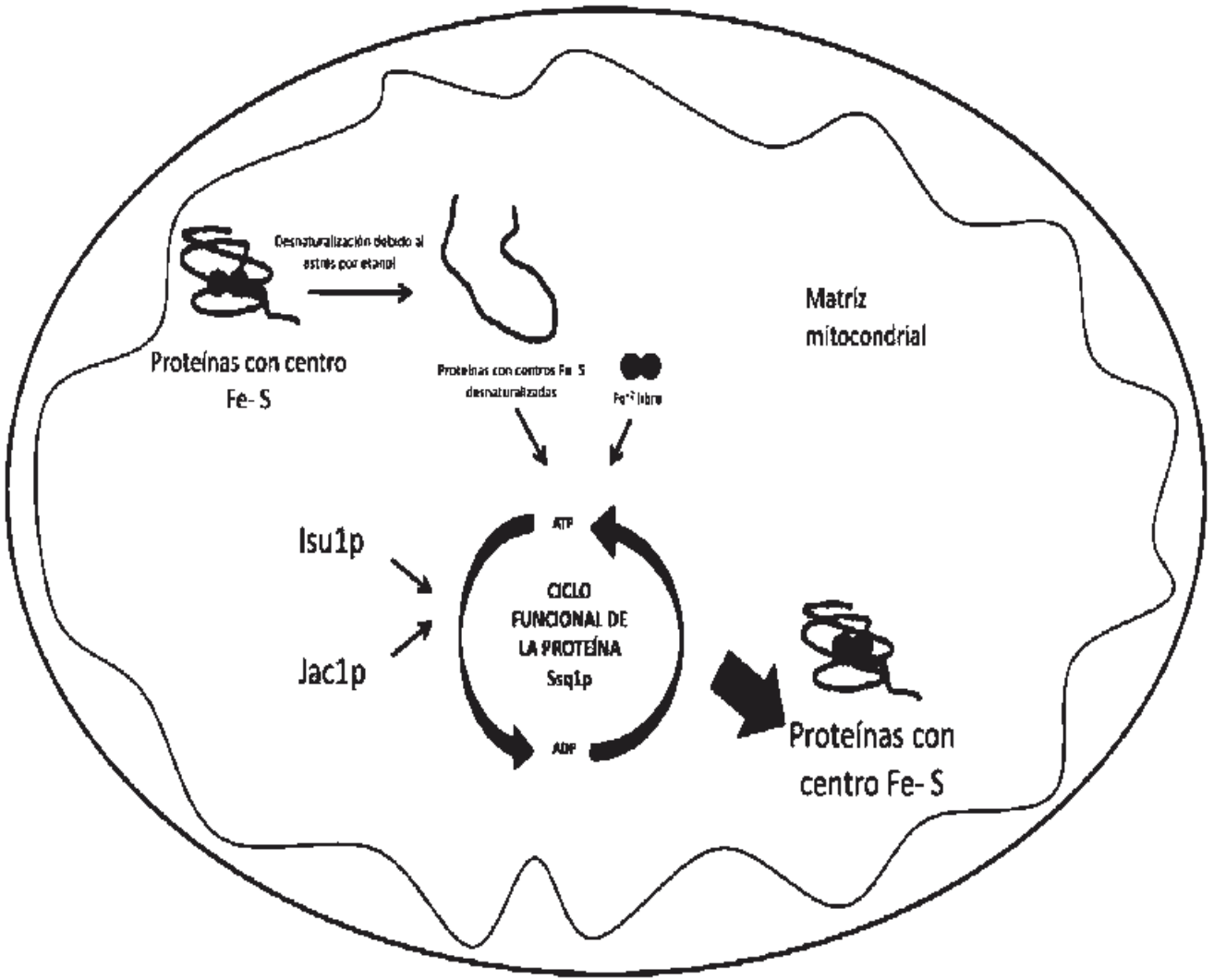


FIGURA 20. Modelo de la participación de las proteínas Ssq1p, Isu1p y Jac1p en la tolerancia a etanol de *S. cerevisiae*. Los detalles se describen en el texto.

## **IX. CONCLUSIONES**

- La sobre-expresión de las proteínas Isu1p y Jac1p aumentaron la tolerancia a etanol de la cepa UMARN3 de *S. cerevisiae*.

## **X. PERSPECTIVAS**

- Determinar si la tolerancia al etanol es debida a un aumento en la eficiencia de la ruta metabólica de biosíntesis de centros Fe-S.
- Determinar si la tolerancia a etanol está relacionado con la disminución de ERO.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

Amutha B., Gordon D. M., Gu Y., Lyver E. R., Dancis A. y Pain D. 2008. GTP is required for iron-sulfur cluster cluster biogenesis in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 283: 1362-1371.

Andrew A. J., Dutkiewicz R., Knieszner H., Craig E. A. y Marszalek J. 2006. Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. *J. Biol. Chem.* 281: 14580-14587.

Andrew A. J., Song J. Y., Schilke B. y Craig E. A. 2008. Posttranslational regulation of the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu. *Mol. Biol. Cell.* 19: 5259- 5266.

Auesukaree C., Dammernsawad A., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Boochird C., Kaneko Y. y Harashima S. 2009. Genome-wide identification of genes involved in tolerant to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Genet.* 50: 301-310.

Bandyopadhyay S., Chandramouli K. y Jonhson M. K. 2008. Iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1112-1119.

Barbosa, M.F., Yomano, L.P. y Ingram, L.O. 1994. Cloning, sequencing and expression of stress genes from the ethanol-producing bacterium *Zymomonas mobilis*: the *groESL* operon. *Gene.* 148: 51-57.

**Campos- García J., Ordoñez L. G. y Soberón-Chávez G. 2000.** The *Pseudomonas aeruginosa hscA* gene encodes Hsc66, a Dnak homologue. *Microbiol.* 146: 1429-1435.

**Cartwright, C. P., F. J. Veazey y H. Rose. 1987.** Effect of ethanol on activity of the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiology.* 53:1286-1291

**Chandramouli K. and Jonhson M. K. 2006.** HscA and Hscb stimulate (2Fe-2S) cluster transfer from IscU to apo-ferrodoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry.* 45: 11087-11095.

**Cherry J. M., Ball C., Weng S., Juvik G., Schmidt R., Adler C., Dunn B., Dwight S., Riles L., Mortimer R. K., Botstein D. 1997.** Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 387: 67-73

**Chi, Z. y Arneborg, N. 1999.** Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 88: 1047-1052.

**Conway T., Sewell G. W. Osman Y. A. and Ingram L. O. 1987.** Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bact.* 169: 2591-2597.

**Costa V., Amorim M. A., Reis E., Quintanilha A. y Moradas- Ferreira P. 1997.** Mitochondrial superoxide dismutase is essential for etanol tolerance of

*Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*. 143: 1649-1656.

**Craig E. A., Gambill B. D. y Nelson R. J. 1993.** Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57 : 402-414.

**Dutkiewicz R., Schilke B., Knieszner H., Walter W., Craig E. A. y Marszalek J. 2003.** Ssq1, a mitochondrial hsp70 involved in iron-sulphur (Fe/S) center biogenesis. *J. Biol. Chem.* 278: 29719-29727.

**Farewell, A., Kvin, K., and Nystrom, T. 1998.** *uspB*, a new  $\sigma$ -regulated gene in *Escherichia coli* which is required for stationary-phase resistance to ethanol. *J. Bacteriol.* 180:6140-6147.

**Fosset C., Chauveau M., Guillon B., Canal F., Drapier J. and Bouton C. 2006.** RNA silencing of mitochondrial m-Nfs1 reduces Fe-S enzyme activity both in mitochondria and cytosol of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 281: 25398-25406.

**Frazzon J., Fick J. R. and Dean D. R. 2002.** Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 680-685.

**Fried, V.A. and Novick, A. 1973.** Organic solvents as probes for the structure and function of the bacterial membrane: effects of ethanol on the wild type and an ethanol-resistant mutant of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 114:239-248.



**Genevaux P., Georgopoulos C. y Kelley W. L. 2007.** The hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli* a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol. Microbiol.* 66: 840-857.

**Glazer, A.N. y Hiroshi, N. 1993.** Ethanol. *Microbial Biotechnology.* ASM Press. Washington D.C. pp. 359-391.

**Gupta, R.S. and Goldin, G.B. 1993.** Evolution of *hsp70* gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 37:573-582.

**Guthrie, C. y Fink, G. R. 2004** *Methods in enzymology: Guide to yeast genetics and molecular and cell biology.* Elsevier. pp. 847.

**Haejung, A. N., Scopes, R.K., Rodriguez, M., Keshav, K.F. and Ingram L.O. 1991.** Gel electrophoretic analysis of *Zymomonas mobilis* glycolytic and fermentative enzymes: identification of alcohol dehydrogenase II as a stress protein. *J. Bacteriol.* 173:5975-5982.

**Hausmann A., Samans B., Lill R., y Mühlenhoff U. 2008.** Cellular and mitochondrial remodeling upon defects in iron-sulfur protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 283: 8318-8330.

**Hirashi H., Machizuki M. and Takagi H. 2006.** Enhancement of stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase

Rsp5 and ubiquitin-conjugation enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2762-2765.

Hu X. H., Wang M. H., Tan T., Li J. R., Yang H., Leach L., Zhang R. M. and Luo Z.W. 2007. Genetic dissection of ethanol tolerant in the pudding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 175: 1479-1487.

Jacques, K. A., Lyons, T. P., Kelsali, D. R. 2003. The alcohol textbook. 4<sup>th</sup>. edition. Nottingham University Press. Pp. 120

James P., Pfund C. y Craig E. A. 1997. Functional specificity among hsp70 molecular chaperones. *Science.* 275: 387-389.

Jiménez J. y Benítez T. 1987. Adaptation of yeast cell membrans to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 1196-1198.

Knight S. A. B., Sepuri N. B. V., Pain D. y Dancis A. 1998. Mt-hsp70 homolog, Ssc2p, required for maturation of yeast frataxin and mitochondrial iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 273: 18389-18393.

Kurtzman, C.P; Fell. J.W. 1998. The yeast, a txomic study, 3rd edition, Elsevier Science, Amsterdam.

Lill R. 2009. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature.* 460: 831- 838.

**Lill R. y Mühlenhoff U. 2008.** Maturation of iron- sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77: 669- 700.

**López-Álvarez. 2007.** Selección y manipulación genética de una levadura tolerante y sobreproductora de etanol. Tesis de Maestría. IIQB. UMNSH.

**Marks V. D., Sui S. J. H., Erasmus D. Merwe G. K., Brumm J., Wasserman W. W., Bryan J. y Vuuren H. J. J. 2008.** Dynamics of the yeast transcriptome during fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Res.* 8: 35-52.

**Matsou Y., Asakawa K., Toda T. y Katamaya S. 2006.** A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 1992-1994.

**Mishra P. y Kaur S. 1991.** Lipids as modulators of ethanol tolerant in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 697-702.

**Morrison y Boyd, 1996.** Química orgánica. 5ª. Edición. ADDISON-WESLEY IBEROAMERICANA. U.S.A. pp. 621-625.

**Mühlenhoff U., Gerber J., Richhardt N., Lill R. 2003.** Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J.* 63: 4815-25.

Özcan S., Dover J. and Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 2566-2573.

Pereira M. P., Eleutherio E. C. y Panek A. D. 2001. Acquisition of tolerant against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* 1:11.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J. Augustyn, O.P.H. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the south African wine industry. *S. Afr. J. Enol.*, 20: 61-74.

Pronk J. T. 2002. Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2085- 2100.

Resendiz, Tamayo. C., 2007. Obtención y caracterización de mutantes del gen *hscA* de cepas de *Escherichia coli* etanológicas. Tesis de maestria, IIQB. UMSNH.

Rodríguez, B.I.M. 1992. Producción de alcohol por fermentación. Biotecnología HOY. CONACYT, México, D.F. pp. 83-96.

Rosa M. F. y Correia I. 1991. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 830-835.

**Santosa D. y Thornburg R. 1998.** Uridine 5'-monophosphate synthase is transcriptionally regulated by pyrimidine levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant. Physiol.* 116: 815-821.

**Schilke B., Williams B., Knieszner H., Puksza S., D'Silva P., Craig E. A. y Marszalek J. 2006.** Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Current biology.* 16: 1660-1665.

**Schilke B., Voisine C., Beinert H. y Craig E. 1999.** Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 10206-10211.

**Solomons T. W. G. 2000.** QUIMICA ORGANICA. LIMUSA.México. pp. 678

**Seaton B.L. and Vickery L.E. 1994.** A gene encoding a DnaK/hsp70 homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2066-2070.

**Skovran E. y Downs D. M. 2000.** Metabolic defects caused by mutations in the *isc* gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: implications for thiamine synthesis. *J. Bacteriol.* 182 : 3896-3903.

**Slater M. R. y Craig E. A. 1987.** Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1906-1916.

**Smeds, A., Varmanen, P., and Palva, A. 1998.** Molecular characterization of a

stress-inducible gene from *Lactobacillus helveticus*. *J. Bacteriol.* 180:6148-6153.

**Stryer, L. 1993.** Bioquímica. Reverté. Pp.199-201.

**Tibor D. 2008.** Handbook of spoilage yeasts. 2 edition. U. S. A. pp. 64-67.

**Vigh, L., Maresca, B. and Harwood, J.L. 1998.** "Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?" *TIBS.* 23:369-373.

**Voisine C., Cheng Y. C., Ohlson M., Schilke B., Hoff K., Beinert H., Marszalek J. y Craig E. A. 2001.** Jac1, a mitochondrial J- type chaperone, is involved in the biogenesis of the Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry.* 98: 1483-1488.

**Voisine C., Schilke B., Ohlson M., Beinert H., Marszalek J. y Craig E. A. 2000.** Role of the mitochondrial hsp70s, Ssc1 and Ssq1, in the maturation of Yfh1. *Mol. Cell. Biol.* 20: 3677-3684.

**Voorst F., Houghton- Larsen J., Jonson L., Kielland- Brandt M. C. y Brandt A. 2006.** Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast.* 23 : 351-359.

**Vorob'eva L. I.2004.** Stressors, stress reaction, and survival of bacteria: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40: 217-224.

**Walker, G. M. 1998.** Yeast physiology and biotechnology, John Wiley and Sons.

New York.

**Walker-Caprioglio H. M., Casey W. M. y Parks L. W. 1990.** *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2853-2857.

**Xu X. M., Lin H., Latijnhouwers M. and Meller S. G. 2009.** Dual localized AtHscB involved in iron sulfur protein biogenesis in *Arabidopsis*. *PLoS ONE.* 4: 1-9.

**Yamaji K., Hara S. y Mizoguchi H. 2003.** Influence of Ras function on ethanol stress response of sake yeast. *J. Biosc. Bioeng.* 96: 474-480.

**Yang M., Cobine P. A., Molik S., Naranuntarat A., Lill R. Wing D. R. y Culotta V. C. 2006.** The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. *EMBO J.* 25: 1775-1783.

**You K. M., Rosenfield C. y Knipple D. 2003.** Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1499-1503.

**Zhang Y., Lyver E. R., Nakamaru-Ogiso E., Yoon H., Amutha B., Lee D., Bi E., Ohnishi T., Daldal F., Pain D. and Dancis A. 2008.** Dre2, a conserved

eukaryotic Fe/S cluster protein, functions in cytosolic Fe/S protein biogenesis.  
*Mol. Cell. Biol.* 28: 5569-5582.

**Zheng L., Cash V.L., Flint D.H. and Dean D.R. 1998.** Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273:13264-13272.