

## Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen **46**  
Volume

Número **1-2**  
Number

Enero-Junio **2004**  
January-June

*Artículo:*

### La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

# La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Jorge Luis Folch-Malloi,\*\* Adriana Garay-Arroyo,\* Fernando Lledías,\*  
Alejandra A. Covarrubias Robles\*

**RESUMEN.** Todos los organismos vivos necesitan adaptarse a condiciones cambiantes del medio ambiente para sobrevivir. Tanto en la naturaleza, en el laboratorio, como en procesos industriales, *S. cerevisiae* atraviesa por diferentes situaciones adversas para su crecimiento, siendo las más importantes condiciones de estrés térmico, osmótico y oxidativo. En esta levadura se ha identificado una vía de respuesta general a estrés que está mediada por la proteína cinasa A; sin embargo, también se han identificado vías específicas de respuesta a cada una de las condiciones estresantes. Así, la vía de HOG regula la respuesta a estrés osmótico, el factor de transcripción HSF induce genes en respuesta a estrés térmico y los factores Yap1p y Yap2p regulan la respuesta a estrés oxidativo, entre otros mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos. Aquí describimos los aspectos que consideramos más relevantes referentes a las vías de percepción y transducción de señales que regulan los genes que constituyen los mecanismos de respuesta a los tipos de estrés más comunes para *Saccharomyces cerevisiae*. También incluimos información que refleja la gran interacción que existe entre las vías de transducción implicadas en las diferentes respuestas que le permite a este organismo coordinar sus procesos fisiológicos para lograr una adaptación óptima.

**Palabras clave:** Respuesta a estrés, transducción de señales, regulación transcripcional.

**ABSTRACT.** All living organisms are subject to changing environmental conditions, to which they must adapt in order to survive. Recently, there have been significant advances leading to the comprehension of the different mechanisms implicated in the responses to stressful situations in the yeast *S. cerevisiae*. In nature, as well as in laboratory conditions or industrial processes, this yeast is subjected to different adverse environmental situations, such as osmotic, thermal and oxidative stresses. A general stress response pathway, mediated by protein kinase A, allows *S. cerevisiae* to cope with these three stressful conditions. However, there are also specific response pathways that include the HOG kinase for osmotic stress, the Heat Shock Factor for thermal stress and Yap1p and Yap2p transcription factors that regulate the oxidative stress response, among other enzymatic and non-enzymatic mechanisms. In this review, we describe the perception and signal transduction pathways that regulate gene expression leading to the adaptation to most common types of stress in *S. cerevisiae*. We also include information regarding the interaction between the signal transduction pathways involved in the different responses that allow this organism to coordinate its various physiological processes for optimal adaptation to the changing environment.

**Key words:** Stress response; signal transduction; transcriptional regulation.

## INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos crecen y se desarrollan de manera óptima bajo ciertas condiciones ambientales. Las condiciones de temperatura, humedad, salinidad, etc. en el medio ambiente varían en el espacio y el tiempo alejándose muchas veces de las condiciones óptimas para el crecimiento y reproducción del organismo en cuestión. Esto explica en gran medida la distribución geográfica y estacional de las distintas especies vivientes. El medio ambiente es un factor determinante en la evolución de los organismos, ya que induce la selección de mecanismos que les permiten su supervivencia y adaptación a las condiciones cambiantes del mismo. Para lograr este objetivo han adoptado estrategias que les llevan a modificar su metabolismo, regular su

velocidad de crecimiento o modificar sus programas de diferenciación y así sobrevivir en condiciones adversas. Por lo general, durante los periodos de crecimiento activo las células son susceptibles al estrés, mientras que en periodos quiescentes son resistentes. Esto ha sido bien documentado para plantas y hongos, donde semillas, esporas y, en algunos casos, el polen constituyen estadios de resistencia mientras que las células o los tejidos hidratados y en crecimiento son susceptibles.<sup>69</sup>

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Este microorganismo muestra 5 fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase lag, la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse.<sup>132</sup> Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un meta-

\* Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.

\*\* Laboratorio de Genética y Fisiología Molecular de Hongos. Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México

bolismo fermentativo del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por litocasa.<sup>140</sup>

Las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante procesos industriales. Tanto el daño provocado por el estrés como la respuesta de la levadura al mismo, depende del tipo y grado del estrés, y del estado de desarrollo de la levadura al momento en que ocurre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrenta este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares (e.g. las membranas) y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función.<sup>52</sup>

Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, la levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés. Entre las moléculas mejor caracterizadas en esta respuesta están las llamadas “proteínas de estrés”. Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta.<sup>108</sup>

Esta revisión tiene el objetivo de reunir la información más relevante sobre los mecanismos de respuesta a los tipos de estrés más comunes a los cuales se enfrenta la levadura *S. cerevisiae*. Consideramos que es en este organismo en donde estas respuestas se encuentran mejor caracterizadas y, por tanto, en donde se ha logrado una visión más integral de las mismas. Hacemos énfasis en las vías de percepción y transducción de señales y los factores de transcripción que regulan los genes que constituyen estas respuestas, con la idea de transmitir la íntima comunicación que existe entre las respuestas a diferentes estímulos estresantes, lo cual a la luz de los datos más recientes resulta evidente.

## 1. PROTECCIÓN CRUZADA: LA RESPUESTA GENERAL A ESTRÉS

Aun cuando un organismo posee mecanismos para adaptarse a los cambios en el medio que afectan su creci-

miento y reproducción, cuando éstos son demasiado severos pueden llegar a ser letales. Por ejemplo, si un organismo se expone de manera abrupta a un choque térmico de 20 a 25°C por encima de su temperatura óptima de crecimiento, éste morirá. Sin embargo, si antes de exponerlo a una temperatura letal se le expone primero por un periodo breve a una temperatura supraóptima no letal (de 10 a 15°C por arriba de la óptima de crecimiento), éste adquiere la capacidad de sobrevivir a la temperatura letal. Este fenómeno se conoce como inducción de la tolerancia.

Se ha observado que la inducción de la tolerancia a un determinado tipo de estrés, conlleva la tolerancia a otros tipos de estrés, aunque éstos sean letales en ausencia de una inducción previa. Así, por ejemplo, cuando un cultivo de levaduras se somete a un tratamiento moderado de calor (37°C por media hora), estas células son capaces de resistir un choque de peróxido de hidrógeno que de otro modo sería letal. A este fenómeno se le ha denominado “protección cruzada”, y ha dado lugar a la idea de que la levadura posee mecanismos comunes o generales de respuesta al estrés. Esta propuesta se ve apoyada por estudios a nivel molecular en donde se demuestra que existe un aumento en la transcripción de genes de respuesta a estrés por calor (HSP por sus siglas en inglés de Heat Shock Proteins) al exponer a las células a un estrés nutricional.<sup>68,139</sup> Otras observaciones como las relacionadas a los patrones de expresión del gen *CTTI* (que codifica para la catalasa T citosólica, una enzima detoxificadora de peróxido de hidrógeno), también apoyan la hipótesis de que existe una fuerte intercomunicación entre las diferentes vías de respuesta a estrés. Este gen no sólo se induce por condiciones hiperoxidantes, sino también por calor o choque osmótico.<sup>138</sup> Este sistema de respuesta coordina e integra la necesidad de establecer un metabolismo basal, en el que se requiere disminuir el gasto energético. Esto conlleva a una disminución en la tasa de crecimiento, con la inducción de diversos mecanismos de protección. La integración de estas respuestas determina la capacidad adaptativa de un organismo.

El descubrimiento de una secuencia consenso que regula en *cis* la expresión de estos genes en los promotores de varios genes de respuesta a diferentes condiciones de estrés (*STRE*, por sus siglas en inglés STress Responsive Element)<sup>65,66,81,138</sup> es una muestra de los mecanismos de coordinación que permiten integrar funciones comunes ante condiciones diversas. Si uno considera que la adaptación de la levadura a los cambios en el medio ambiente no sólo implican el proteger sus funciones básicas y mantenerlas, sino también inducir procesos que en esas condiciones adversas la conviertan en un organismo biológicamente eficiente, resulta sencillo el entender el por qué de la selección de una “respuesta general a estrés”. A continuación se describen los componentes de esta vía.

### 1.a. La vía de cAMP-PKA

Uno de los controles centrales de la “respuesta general a estrés” lo constituyen los niveles de AMP cíclico (cAMP), el cual a través de la proteína-quinasa A (PKA) transduce o señala cambios en el medio ambiente. La caracterización de ciertas mutantes de levadura ha evidenciado la importancia de la PKA en la regulación de la división celular, el tiempo de duplicación y la resistencia a estrés. Dado que estas propiedades están también reguladas por la disponibilidad de nutrientes (en particular de glucosa y otros azúcares fermentables) se ha propuesto que la vía de la PKA juega un papel importante en la percepción de la situación nutricional del medio y la respuesta a estrés.<sup>126,127</sup>

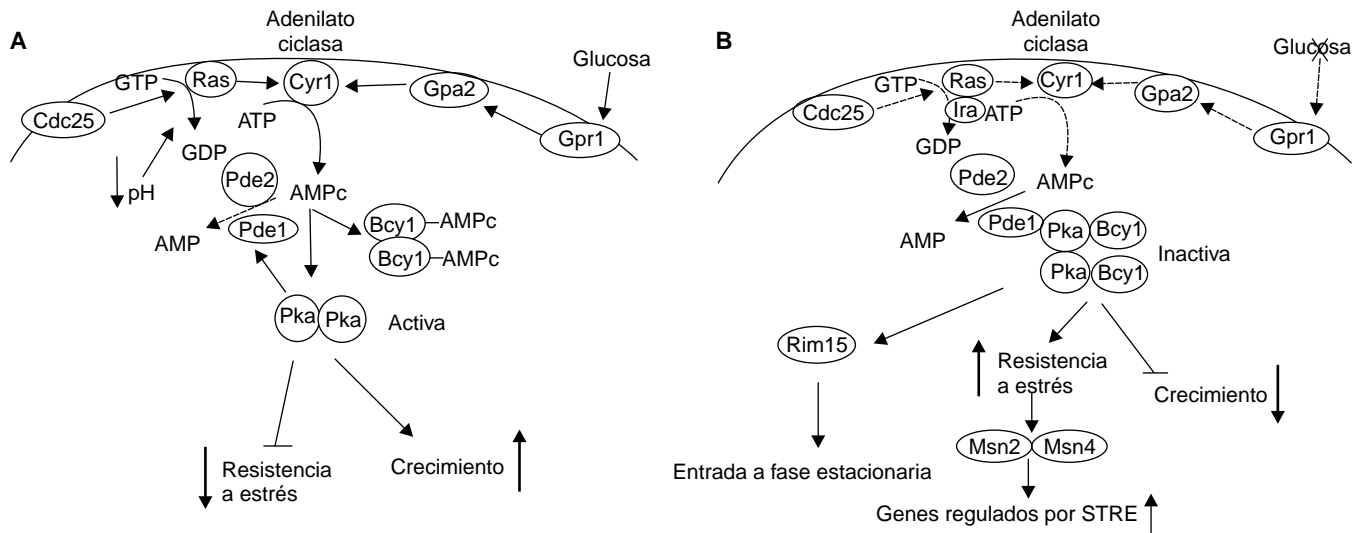
La importancia de esta vía en la respuesta adaptativa a condiciones de estrés es evidente en mutantes en donde la vía cAMP-PKA está hiperactiva ya que éstas son incapaces de detener su ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> al enfrentarse a una falta de nutrientes. Este tipo de mutantes muestra muy baja tolerancia al estrés, pierden viabilidad al entrar en la fase estacionaria, y son incapaces de acumular trehalosa y glucógeno. Este es el caso de mutantes con los alelos constitutivos *RAS2*<sup>val19</sup> y *RAS2*<sup>ile152</sup> o mutantes en *bcy1* (ver más adelante). Por el contrario, mutaciones que disminuyen la actividad de la vía PKA como *ras* o *cyr1* presentan fenotipos con alta tolerancia a condiciones de estrés, tiempos de duplicación largos (por retraso en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular), engrosamiento de la pared celular y, asociado a ello, muestran acumulación de glucógeno y trehalosa, aun en la fase logarítmica de crecimiento.<sup>128</sup>

El cAMP, mediador de la respuesta general a estrés, es sintetizado por la adenilato ciclasa a partir de ATP. Esta enzima está codificada por el gen *CYR1/CDC35* y se ha demostrado que, en levadura, es esencial dado que una disminución drástica en los niveles de cAMP detiene a las células en la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular.<sup>128</sup> La caracterización de mutantes con una actividad disminuida en la adenilato ciclasa evidenció el papel del cAMP en la respuesta a estrés ya que estas mutantes se dividen lentamente y presentan alta tolerancia al estrés por calor<sup>10,56</sup> (y Folch-Mallol et al., datos no publicados).

La importancia del cAMP en el funcionamiento celular se refleja en los múltiples mecanismos de regulación que modulan los niveles de esta molécula. Así, la actividad de la adenilato ciclasa se encuentra regulada positivamente por las proteínas Ras y el sistema de receptores acoplados a proteínas G, Gpr1p-Gpa2p; así como, por la proteína Svr2p que modula la activación por Ras.<sup>30</sup> Las proteínas Ras, codificadas por los genes *RAS1* y *RAS2*, pertenecen a la familia de proteínas G monoméricas y, cuando tienen GTP unido, activan a la adenilato ciclasa. La inactivación de estas proteínas depende de una actividad de GTPasa intrínseca que además

es estimulada por las proteínas Ira1p e Ira2p.<sup>124</sup> A su vez, la activación de las proteínas Ras requiere de una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina llamada Cdc25p que intercambia el GDP asociado a Ras por GTP. Se ha descrito un homólogo de *CDC25*, llamado *SDC25*, cuyo papel en la activación de Ras aún se desconoce.<sup>13,22</sup> Cdc25 es el componente inicial de esta vía de transducción, por lo que podría suponerse la existencia de un regulador que controle su actividad; sin embargo, a la fecha se desconoce. La adenilato ciclasa también está regulada por el sistema Gpr1p-Gpa2p. La proteína Gpr1p pertenece a una familia de receptores acoplados a proteínas G y ha sido la primera de su clase asociada a respuestas nutricionales.<sup>67</sup> Esta proteína percibe la glucosa del medio y activa a la proteína Gpa2, de la familia de las proteínas G $\alpha$  heterotriméricas que a su vez activa a la adenilato ciclasa.<sup>19</sup> Cabe mencionar que el papel de este sistema en la activación de la adenilato ciclasa fue descubierto recientemente. En células vegetativas de levadura se había observado que existen dos estímulos que son capaces de elevar la concentración de cAMP: la adición de glucosa y la acidificación intracelular. Como la adición de glucosa causa también una acidificación del citoplasma era difícil determinar a cuál de los dos estímulos se debía el aumento en cAMP. Por otro lado, en estudios previos se había observado que una mutante *gpa2* $\Delta$  no era deficiente en la señal inducida por glucosa lo que descartaba su papel como activador de la adenilato ciclasa. Sin embargo, al añadir previamente una pequeña cantidad de glucosa para estabilizar el pH intracelular, se observó que la respuesta a glucosa es totalmente dependiente de Gpa2p. El fenotipo de respuesta negativa previamente descrito en la mutante *gpa2* $\Delta$  es debido a que la acidificación intracelular causada por la glucosa afecta la actividad de las proteínas Ira y, por lo tanto la cantidad de Ras activo.<sup>129</sup> Como se mencionó anteriormente, el cAMP regula la actividad de la PKA, una holoenzima conformada por un heterotetrámero de dos subunidades regulatorias codificadas por el gen *BCY1*<sup>130</sup> y dos subunidades catalíticas codificadas por los genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*.<sup>131</sup> La unión cooperativa de dos moléculas de cAMP a cada una de las subunidades de la proteína Bcy1p provoca la disociación de las subunidades regulatorias y la consecuente activación de las subunidades catalíticas. Por otro lado, la concentración intracelular de cAMP está regulada por los genes *PDE1* y *PDE2* que codifican para dos fosfodiesterasas de baja y alta afinidad, respectivamente. La fosfodiesterasa de baja afinidad es a su vez blanco de la PKA, la cual la activa y, de esta manera regula negativamente la acumulación excesiva de cAMP.<sup>77</sup> Una representación esquemática de la vía cAMP-PKA se muestra en la Fig. 1.

Esta vía de transducción de señales se activa al añadir glucosa a células provenientes de medios de cultivo con fuentes no fermentables de carbono (etanol, acetato etc.) o



**Figura 1.** Representación esquemática de la vía cAMP-PKA. **A.** Las proteínas RAS son activadas por Cdc25p al intercambiar GDP por GTP. La acidificación del citoplasma activa la vía por este sistema. En su estado activo, Ras activa a la adenilato ciclasa (Cyr1p) la cual sintetiza cAMP. Este compuesto se une a la subunidad reguladora Bcy1p provocando la liberación de las subunidades catalíticas que adoptan su forma activa. La adenilato ciclasa también puede ser activada directamente por el sistema Gpr1p-Gpa2p cuando hay glucosa en el medio. La concentración de cAMP en estas condiciones también está controlada por la fosfodiesterasa de baja afinidad (Pde1p). Esta última se activa al ser fosforilada por la PKA creando un circuito de autorregulación negativa de la vía. La activación de esta vía promueve el crecimiento y reprime la resistencia a estrés. **B.** Las proteínas IRA antagonizan la actividad de Cdc25p al estimular la actividad intrínseca de GTPasa de RAS. La fosfodiesterasa Pde2p degrada el cAMP. Al disminuir los niveles de cAMP la subunidad reguladora Bcy1p se une a las subunidades catalíticas inactivándolas. En esta situación disminuye la tasa de crecimiento y aumenta la resistencia a estrés mediada por Msn2p y Msn4p. Rim15 se activa y se estimula la entrada a fase estacionaria.

de fase estacionaria o diáuxica. La adición de glucosa provoca un incremento en los niveles de cAMP (a través del sistema Gpr1p-Gpa2p) y esto a su vez activa a la PKA. Inmediatamente ocurre un proceso de retroalimentación negativa mediado por Cdc25p y Pde1p que estabiliza los niveles de cAMP, si bien a una concentración mayor de la que se tenía en el estado previo a la inducción.<sup>128</sup> Por el contrario, diversas situaciones de estrés disminuyen la actividad de la vía y de esta forma dan lugar a la expresión de genes de respuesta a estrés (ver más adelante).

Hasta la fecha se conoce poco de los blancos fosforilados por la PKA, aunque se ha demostrado que fosforila a Cdc25p provocando su disociación de Ras y de la membrana plasmática y, por lo tanto, autorregulando de manera negativa la síntesis de cAMP.<sup>47</sup> En este ciclo de autorregulación también participa la Pde1p. Otro blanco de la PKA es la proteína cinasa llamada Rim15p, la cual controla negativamente la entrada a fase estacionaria.<sup>102</sup> Consistentemente con su papel regulador en la utilización de glucosa, también se ha demostrado que la PKA fosforila a la 6-fosfofructo-2-cinasa, la cual se activa por fosforilación y regula de manera positiva la glicólisis al sintetizar fructosa 2,6-bisfosfato, que a su vez activa a la enzima clave 6-fosfofructo-1-cinasa.<sup>28</sup> Otra enzima clave de la glicólisis, la piruvato cinasa, también es activada por fosforilación por la PKA.<sup>95</sup>

Se ha propuesto recientemente que la señalización hacia la PKA ejercida por glucosa procede a través del sistema Gpr1p-Gpa2p, mientras que la señalización por estrés procedería a través de Cdc25p-Ras.<sup>29</sup> Esto se ve apoyado por datos que sugieren que la chaperona Hsp70p interactúa con Cdc25p para inducir su plegamiento correcto. Al someter a la célula a un estrés, Hsp70 sería reclutada por proteínas desnaturalizadas y abandonaría a Cdc25p lo cual provocaría su inactivación y disminuiría la actividad a través de la vía cAMP-PKA.<sup>40</sup>

Cabe hacer notar que la mayoría de los elementos de la vía cAMP-PKA están duplicados (*CDC25-SDC25*, *RAS1-RAS2*, *IRA1-IRA2*, etc.), con excepción de la subunidad reguladora Bcy1p y de la adenilato ciclasa. Hasta la fecha no es claro el significado de estas duplicaciones.

*1.b. El elemento STRE y los factores de transcripción Msn2p y Msn4p*

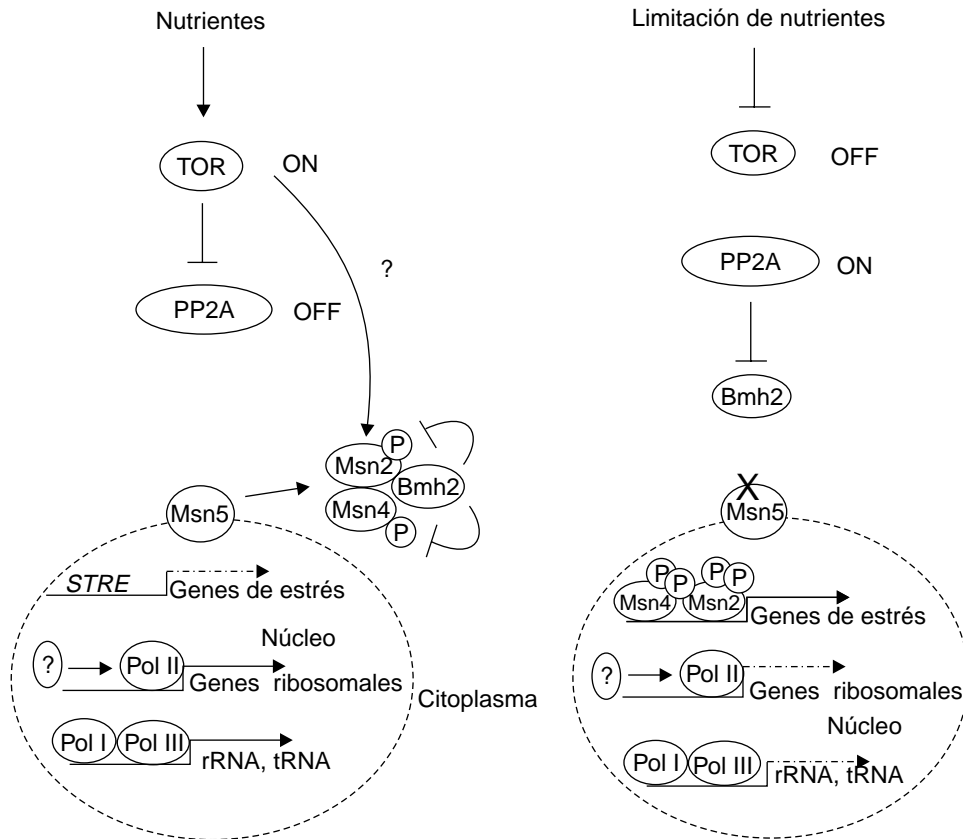
¿Cómo se da y cómo se mantiene la coordinación de un sistema complejo conformado de elementos que participan en funciones diversas? Una de las estrategias utilizadas por las células para estos fines es el de tener blancos comunes en genes que codifican funciones diversas. Esto es posible a través de la intervención de factores transcripcionales ca-

paces de captar estímulos diversos que confluyen en proteínas que activan estos factores, los cuales a su vez activan la transcripción de diferentes genes y, por lo tanto, la expresión de las proteínas a las que codifican.

Sistemas como éstos se ejemplifican en el caso del gen de la catalasa T citosólica, *CTTI*, la cual se induce por múltiples condiciones de estrés (osmótico, oxidativo, térmico). Estudios en el promotor de este gen llevaron al descubrimiento de una secuencia consenso (AGGGG) que es la responsable de la inducción por estrés de este gen y, a la cual se le denominó *STRE* (del inglés STress Responsive Element). Estudios posteriores demostraron la presencia de esta secuencia en una gran cantidad de genes inducidos por estrés.<sup>81</sup> No es sorprendente que, al hacer una búsqueda cibernética en el genoma completo de *S. cerevisiae*, se predican 186 genes en los que *STRE* se encuentra en su región promotora.<sup>84,133</sup> Entre éstos se encuentran diversos tipos de genes que codifican transportadores, proteasas o proteínas que protegen de diferentes tipos de estrés como lo es *HSP104*.<sup>11,84,133</sup> Estos datos, sin embargo, hay que tomarlos con reserva, ya que se ha documentado el caso de genes que contienen al elemento *STRE* en su promotor y, sin embargo, éste no es funcional.<sup>3,83</sup> Basta una copia del elemento *STRE* para lograr la inducción por estrés de un gen reportero, sin embargo, múltiples copias confieren un efecto cooperativo.<sup>66</sup> El elemento *STRE* funciona en ambas orientaciones, y si bien es sensible a cambios dentro de la secuencia consenso, no hay efecto si se modifica la distancia entre ellos cuando están presentes en más de una copia.<sup>134</sup> La expresión de genes mediada por el elemento *STRE* es muy baja en medios con glucosa como fuente de carbono o en mutantes con una PKA hiperactiva (*bcy1*, *RAS2*<sup>val19</sup>). Por el contrario en fuentes no fermentables de carbono, fase diáuxica o estacionaria y, en mutantes con una actividad reducida de PKA, la expresión mediada por el elemento *STRE* es alta. Esto indica que este elemento participa en la inducción de genes en respuesta a limitación de nutrientes; sin embargo, no está claro aún si elementos o factores adicionales y complementarios son los mismos que para el caso de inducción por otros tipos de estrés.<sup>128</sup>

Existe también un elemento relacionado de secuencia T/AAGGGA que se ha denominado PDS (por sus siglas en inglés Post Diauxic Shift) y que media la expresión de genes cuyos productos se requieren cuando la célula entra al cambio diáuxico. Este elemento es reconocido por factores transcripcionales modulados por la vía cAMP-PKA pero de manera distinta a los que reconocen al elemento *STRE*. Esto último se deduce del hecho de que la inducción por calor de estos genes es marginal; además, no se inducen por estrés osmótico y su regulación no se ve afectada por mutaciones en los factores de transcripción que regulan al elemento *STRE*.<sup>23,29</sup>

El elemento *STRE* es reconocido por los factores de transcripción Msn2p y Msn4p. Estas proteínas pertenecen a la familia de “dedos” de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y son capaces de unirse a la secuencia *STRE in vitro* e *in vivo*.<sup>82</sup> Los factores Msn2p y Msn4p no son redundantes funcionalmente. Se han descrito casos como el del gen *PGM2* en donde su transcripción se anula completamente en el fondo mutante *msn2Δ* indicando que Msn4p no regula la transcripción de este gen.<sup>133</sup> La regulación por uno u otro de estos factores transcripcionales depende entonces del contexto del promotor y permite así la regulación fina de diversos genes dependiendo del estrés del que se trate.<sup>29</sup> La existencia de elementos adicionales asociados a la regulación a través del elemento *STRE* es evidente dada la observación de que en dobles mutantes (*msn2/4Δ*) la transcripción mediada por el elemento *STRE* disminuye drásticamente pero no se abate por completo. Estos datos son consistentes con la descripción de factores transcripcionales relacionados llamados Msn1p y Hot1p. Estos factores están involucrados en la transcripción en respuesta a choque osmótico, aunque no se ha demostrado que sea a través del elemento *STRE*.<sup>104</sup> La regulación de estos factores transcripcionales requiere de un control riguroso el cual se obtiene por medio de puntos adicionales de verificación. Así, cuando la levadura se encuentra en condiciones normales de crecimiento, los factores Msn2p y Msn4p se encuentran en el citoplasma, lo cual impide que estos factores activen sus genes blanco. Sin embargo; ante un estrés moderado, estos factores son translocados al núcleo. La localización celular de los factores Msn2p y Msn4p está regulada por fosforilación y por la proteína Bmh2p, miembro de la familia 14-3-3.<sup>7</sup> La localización citoplásmica se debe a que Bmh2p “captura” a Msn2p y Msn4p cuando están fosforilados y los retiene en el citoplasma. Este mecanismo depende de la proteína cinasa TOR, que también está involucrada en la respuesta a privación de nitrógeno<sup>21</sup> (Fig. 2). Aunque no se ha demostrado la actividad de cinasa de la proteína TOR *in vitro*, existen evidencias genéticas y fisiológicas que son consistentes con esta actividad.<sup>106</sup> El estado de fosforilación de Msn2p y Msn4p también depende de la vía de la PKA. Msn2p y Msn4p tienen sitios consenso para fosforilación por PKA, aunque no se ha demostrado que sean substratos directos de esta enzima.<sup>41</sup> Garreau y colaboradores<sup>36</sup> han demostrado que cuando un cultivo de levadura entra a la fase diáuxica, o se somete a un choque térmico moderado, se induce una hiperfosforilación de Msn2p y Msn4p que correlaciona con la activación de la transcripción dependiente de estos factores. Por el contrario, en condiciones óptimas de crecimiento, al incrementarse los niveles de cAMP (y la consecuente activación de PKA) esta hiperfosforilación se previene y



**Figura 2.** La vía de TOR y la localización de Msn2p y Msn4p. La vía de la cinasa TOR regula el crecimiento en respuesta a limitación de nitrógeno pero, aunque no se ha descrito, debe haber comunicación cruzada con la vía de la PKA. En condiciones de abundancia, se propone que TOR fosforila a la fosfatasa Pp2ap inactivándola e inhibiendo la desfosforilación de Msn2p y Msn4p. Al estar estos factores fosforilados son "capturados" por Bmh2p que los retiene en el citoplasma. Aún no se ha identificado la proteína cinasa que fosforila a Msn2p y Msn4p. Al agotarse los nutrientes nitrogenados TOR se inactiva permitiendo a Pp2a desfosforilar a Msn2p y Msn4p, lo que permite su entrada al núcleo y la transcripción de genes de respuesta a estrés. Dentro del núcleo, Msn2p y Msn4p se encuentran hipertfosforilados, aunque hay evidencia de que otra(s) cinasa(s), y no PKA son responsables de esta fosforilación. Msn5p participa en la exportación de Msn2p y Msn4p fuera del núcleo cuando no hay estrés. Otros factores de transcripción se regulan de manera similar controlando la transcripción de genes del metabolismo nitrogenado (*Gln3p-Ure2p*), del ciclo de Krebs (*Rtg1* y *2-Rtg3*) y de los genes ribosomales (ver 106).

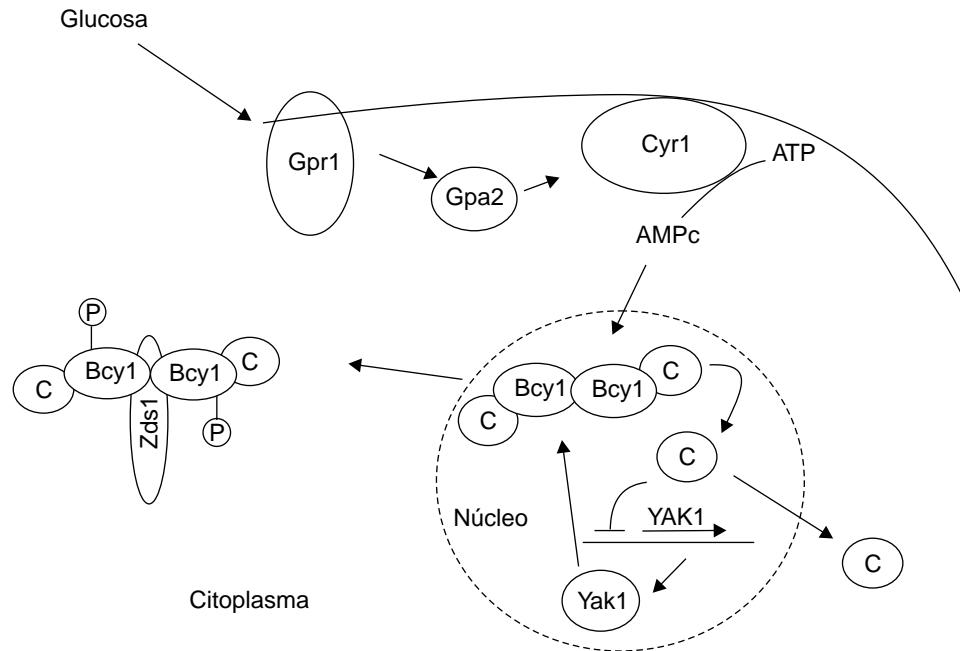
se revierte, lo que indica que otras cinasas diferentes a PKA están involucradas en la activación de Msn2p y Msn4p.<sup>36</sup>

La localización de Msn2p y Msn4p depende también del gen *MSN5* que codifica para un receptor nuclear de exportación. Se ha observado que en células mutantes en *msn5*, las proteínas Msn2p y Msn4p se localizan en el núcleo aún en ausencia de estrés. Estos datos sugieren que la regulación negativa de la respuesta a estrés ejercida por PKA tiene como blanco la exportación de Msn2p y Msn4p del núcleo, entre otros mecanismos.<sup>29</sup>

#### 1.c. Localización de la PKA

La actividad de la vía cAMP-PKA depende no sólo de la localización de los factores transcripcionales, sino tam-

bién de otros componentes de la vía. Ya se ha mencionado, por ejemplo, que Cdc25p requiere estar en la membrana citoplásmica para activar a las proteínas Ras. Sin embargo, la localización de la PKA es uno de los puntos de regulación más importantes. En mamíferos se han estudiado ampliamente los mecanismos de localización de la PKA, mientras que en levadura aún falta mucho para comprender. Griffioen y colaboradores<sup>44</sup> han demostrado que en levaduras crecidas en glucosa, la localización de Bcy1p es mayoritariamente nuclear, mientras que la deprivación de este azúcar causa una redistribución hacia el citoplasma. El significado fisiológico de este fenómeno podría tener como consecuencia una reducción en la actividad de la vía de cAMP-PKA, en particular cuando un cultivo entra a su fase diáuxica de crecimiento. En mamíferos se ha descrito una familia de más de 20 proteínas que dirigen a la PKA a



**Figura 3.** Representación esquemática de los mecanismos de localización de la PKA. En células creciendo en glucosa, Gpr1p promueve la activación de la adenilato ciclasa a través de Gpa2p. El cAMP generado debe entrar al núcleo (aunque no hay prueba experimental de ello) para liberar las subunidades catalíticas (c) que salen al citoplasma. Al terminarse la glucosa del medio, Yak1p fosforila a Bcy1p promoviendo su localización citoplásmica para lo que se requiere Zds1p. Las subunidades catalíticas de la PKA regulan negativamente la transcripción de Yak1p.<sup>46</sup>

blancos intracelulares específicos (AKAPs, por sus siglas en inglés A-Kinase Anchor Proteins). Las subunidades regulatorias de la PKA interaccionan con las AKAPs y, éstas a su vez lo hacen con receptores localizados en la membrana plasmática o en diferentes organelos.<sup>17</sup> En levadura no se han descrito homólogos de AKAPs y los estudios de la estructura de Bcy1p revelan que no hay homología con subunidades regulatorias de mamíferos en el dominio de interacción con las APAKs.<sup>44</sup> Sin embargo, mediante un estudio usando Bcy1p como “anzuelo”, en un sistema de “dos híbridos” de levadura, se aisló un gen (*ZDS1*) que afecta la localización de esta proteína. En mutantes *zds1* deprivadas de glucosa, Bcy1p se localiza mayoritariamente en el núcleo, mientras que la sobreexpresión de *ZDS1* resulta en una acumulación citoplásmica de Bcy1p.<sup>45</sup> Estos datos sugieren la existencia de un homólogo funcional de las AKAPs en levadura, aunque se requiere de un análisis más detallado para confirmarlo y para determinar su función exacta. La interacción de Bcy1p con Zds1p está regulada por fosforilación. Cuando Bcy1p está fosforilada en los residuos de serina del “cluster” II su afinidad por Zds1p aumenta y consecuentemente se retiene en el citoplasma. Esta fosforilación depende de Yak1p, que a su vez es regulado por la PKA en un circuito de autorregulación negativa (Fig. 3). Las subunidades catalíticas de la PKA en levadu-

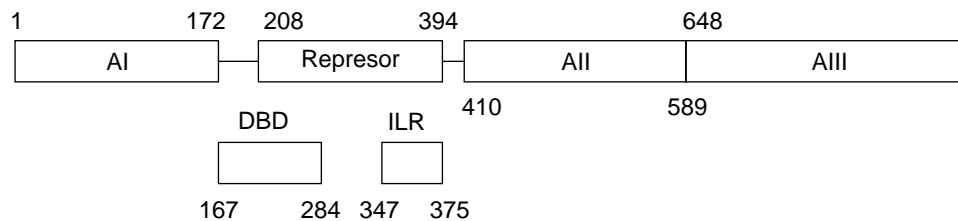
ra deben de salir del núcleo para fosforilar sus blancos citoplásmicos lo cual implica la entrada de cAMP al núcleo.<sup>45</sup> Los mecanismos de transporte de la PKA entre el núcleo y el citoplasma son hasta la fecha desconocidos.

## 2. ESTRÉS POR CALOR

La respuesta a estrés por calor en levadura es de las mejor estudiadas. Como se mencionó anteriormente, un incremento de 10 a 15°C por arriba de la temperatura óptima de crecimiento induce la síntesis de un grupo de proteínas llamadas HSP (de las siglas en inglés por Heat Shock Proteins). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Algunas de estas proteínas se encuentran también presentes a temperaturas óptimas y, estudios genéticos indican que son proteínas indispensables para mantener el plegamiento correcto de otras proteínas, ensamblar y desensamblar proteínas en estados oligoméricos y degradar proteínas desnaturalizadas o mal plegadas.<sup>73</sup>

La transcripción de genes inducidos por calor depende de dos elementos regulatorios: el *STRE*, y el *HSE* (por sus siglas





**Figura 4.** Representación esquemática de los dominios del factor de choque térmico (Hsf1p). Los números indican el aminoácido correspondiente a las fronteras de cada dominio. Los dominios de activación se denominan AI, AII y AIII. DBD se refiere al dominio de unión a DNA e ILR representa la región rica en isoleucinas propuesta para la oligomerización del factor.<sup>119</sup>

en inglés Heat Shock Element). Este último elemento consta de por lo menos tres copias de la secuencia nGAAn (donde n puede ser cualquier nucleótido) arreglados en orientaciones alternadas. Cambios de secuencia y/o distancia entre los elementos son tolerados *in vivo*, pero la afinidad por el factor de transcripción puede verse afectada y por lo tanto disminuir la transcripción desde estos promotores mutantes.<sup>110</sup> El factor transcripcional que se une a los *HSEs* y activa a los genes que están bajo su control se ha denominado Hsf1p y está codificado por un gen único y esencial en esta levadura.<sup>143</sup> Un factor similar se ha encontrado en *Drosophila*,<sup>16</sup> en humano<sup>64</sup> y en otros organismos.<sup>145</sup> Los diferentes dominios de HSF han sido caracterizados en varias especies. Todos ellos comparten dos motivos: uno de unión a DNA  $\alpha$ -giro- $\alpha$ <sup>136</sup> y otro de trimerización que consiste de un “ $\alpha$ -helical coiled-coil”.<sup>93, 118</sup> Mediante el análisis de proteínas quiméricas con secuencias de HSF fusionadas a dominios heterólogos de unión a DNA se lograron identificar tres dominios de activación en este factor de levadura (AI, AII y AIII)<sup>15</sup> (Fig. 4). El dominio AII (residuos 410-648) es esencial para el crecimiento durante un choque térmico pero no para el crecimiento a temperatura óptima. El dominio AI (residuos 1-172) parece funcionar en células no estresadas permitiendo la viabilidad, mientras que el dominio AIII (residuos 589-833) es responsable de la actividad sostenida a alta temperatura.<sup>15,119</sup>

En eucariontes superiores, la unión a DNA depende de la trimerización de monómeros de HSF al darse el choque térmico.<sup>141</sup> Sin embargo, en *S. cerevisiae* Hsf1p se encuentra trimerizado y unido a DNA aún en ausencia de choque térmico.<sup>59,120</sup> El hecho de que haya unión al *HSE* sin inducción de la transcripción, indica que se requiere de un segundo factor para activar a Hsf1p.<sup>80</sup> Se ha propuesto que este mecanismo está dado por fosforilación, ya que Hsf1p se fosforila en respuesta a estrés oxidativo o térmico.<sup>74</sup> Sin embargo, este mecanismo parece estar más relacionado a la desactivación del factor, lo cual permite una respuesta transitoria.<sup>94</sup>

Estudios en los que se utilizan mutantes puntuales o remociones parciales de Hsf1p que aumentan la activación constitutiva de la transcripción, sugieren la existencia de un control negativo sobre la activación de este factor de transcripción.<sup>50</sup>

El mecanismo por el cual se libera este control negativo no está claro, aunque se han sugerido varios modelos. Se ha propuesto que la activación podría darse por cambios conformacionales causados por el mismo incremento de temperatura.<sup>50</sup> Otras observaciones sugieren que Hsp70p participa en la regulación negativa de Hsf1 de una manera similar a la descrita para la vía de cAMP-PKA. En este modelo, Hsp70p haría el papel de “termómetro” al regular la actividad de Hsf1 y la expresión de otras HSP. Se propone que Hsp70 interacciona con Hsf1p y lo mantiene inactivo. Al darse el choque térmico, el aumento de los substratos de Hsp70p (proteínas mal plegadas) titularía Hsp70 liberando Hsf1p lo que conduciría a su activación. Al producirse más Hsp70, ésta podría interactuar de nuevo con Hsf1p dando lugar a una respuesta transitoria tal como se ha observado. Existen datos que apoyan este modelo; tal es el caso de la Hsp70 que, en humanos, se une a Hsf1p e inhibe su actividad sin modificar su unión al DNA.<sup>113</sup> Otra observación que apoya este modelo es que dobles mutantes *ssa1ssa2* (genes que codifican para distintas isoformas de Hsp70) muestran una expresión elevada de HSP a temperatura óptima de crecimiento.<sup>20</sup>

#### 2.a. Papel de las proteínas de estrés por calor en la termotolerancia

Como se ha mencionado, muchas de las HSP se encuentran también presentes a temperatura óptima de crecimiento. Esto explica el que Hsf1p sea esencial en levadura, ya que es necesario para la transcripción (aun a bajos niveles) de proteínas que son necesarias a cualquier temperatura. La hipótesis de que la inducción de las HSP son directamente responsables de la tolerancia al calor es muy controvertida. Por ejemplo, se ha reportado una mutación en HSF1 (*hsf1-m3*) que no impide la inducción de la termotolerancia y, sin embargo sí abate la expresión de HSP.<sup>116</sup> Sin embargo, esta mutante expresa constitutivamente HSP104p, una proteína involucrada en la adquisición de la termotolerancia.<sup>109</sup> Recientemente se ha reportado que los Hsf1ps de humano y de pollo confieren protección a un choque térmico moderado sin activar la transcripción de HSP.<sup>58</sup> Existen

otros mecanismos de protección al calor que no son mediados por HSP, como por ejemplo la síntesis de trehalosa,<sup>114</sup> los cuales aclaran parcialmente esta controversia.

### 3. ESTRÉS HIPEROSMÓTICO

El ambiente natural de la levadura *S. cerevisiae* son las plantas, sus frutos y los jugos de éstos, por lo que este organismo se enfrenta durante su ciclo de vida a una condición de estrés hiperosmótico dado el alto contenido de azúcares y otros solutos presentes en su microambiente. Por ejemplo, cuando la levadura cae encima de una uva (por acción del viento, de los insectos o de la lluvia) tiene que sobrevivir a un medio con un alto contenido de azúcar de, aproximadamente, 30%. Por otro lado, en uno de los procesos más explotado por los humanos como lo es la fermentación de la uva, las levaduras se exponen a un 20% de azúcares y, al final del proceso, a un medio sin azúcares y con un 10% de etanol.<sup>52</sup> Por lo anterior, es de esperarse que *S. cerevisiae* posea los mecanismos que le permitan percibir, responder y adaptarse a cambios en la osmolaridad externa.

Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se está desarrollando un organismo. La respuesta inmediata, que se da en segundos, es una salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo más largo para tratar de llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento de agua, las concentraciones intracelulares de iones y biomoléculas se incrementan dando como resultado una disminución en la actividad celular; una vez que el organismo se adaptó, se retoma el crecimiento.

Específicamente, cuando *S. cerevisiae* se enfrenta a una condición de alta osmolaridad externa sufre un cambio inmediato en el volumen celular debido a la pérdida de agua del citosol. Tal deshidratación es un proceso rápido (aprox. 1 min) y se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que ésta acumula iones tóxicos en beneficio del citoplasma y los organelos.<sup>112</sup> Para sobrevivir y continuar con el crecimiento, las células deshidratadas pueden recuperar el turgor siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable. La proliferación celular se reanuda después de un período de aclimatación el cual varía dependiendo de un número de factores, como pueden ser el tipo y la severidad del estrés, del fondo genético de la cepa, y del estado de crecimiento.<sup>9</sup> En esta fase de aclimatación las células de levadura experimentan una serie de cambios como reestructuración del citoesqueleto de actina, arresto transitorio del ciclo celular, y reprogramación del metabolismo.<sup>125</sup> Al mismo tiempo, se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Además, se induce la ex-

presión de una serie de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la producción de proteínas protectoras y el reajuste en los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos.<sup>105</sup>

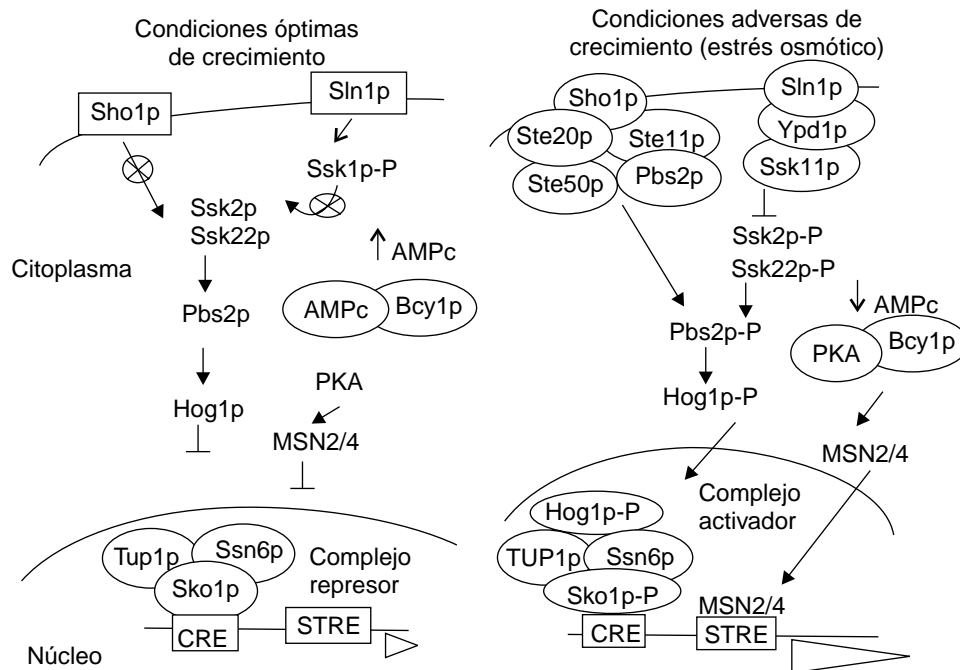
El hecho de que muchos de los procesos y mecanismos involucrados en la adaptación al estrés osmótico se conserven entre los eucariontes, hace de la levadura *S. cerevisiae* un buen modelo para el estudio de este proceso en otros organismos que, desde el punto de vista metodológico, son más difíciles de manejar.

#### 3.a. Transducción de señales al percibirse un medio hiperosmótico: la vía de HOG

Entre los cambios fisiológicos más evidentes que ocurren durante una situación de estrés hiperosmótico en la levadura *S. cerevisiae* es la síntesis y acumulación de glicerol,<sup>2,5</sup> el cual funciona como el principal responsable del mecanismo de osmorregulación, involucrado en el mantenimiento del turgor celular (se detallará más adelante). Se ha demostrado que la biosíntesis de glicerol está regulada a nivel transcripcional principalmente por la vía de HOG (High Osmolarity Glicerol,<sup>2,12,70</sup> (Fig. 5). Esta vía se activa principalmente bajo condiciones de estrés hiperosmótico y regula la transcripción de genes, muchos de los cuales a su vez se inducen por la vía general de respuesta a estrés.<sup>14,38</sup>

La vía de HOG es una de las vías de MAP cinasas mejor caracterizadas (revisado en 53). Las MAP cinasas son unidades de señalización altamente conservadas en eucariontes donde juegan un papel esencial en la respuesta a factores ambientales, hormonas, factores de crecimiento o citocinesis. Estas vías controlan el crecimiento celular, la morfogénesis, la proliferación y muchas de las vías de respuesta a estrés. En cualquiera de estas vías de señalización hay 3 MAP cinasas secuenciales y esenciales, una MAP cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK o MEKK), una MAP cinasa-cinasa (MAPKK o MEK) y una MAP cinasa (MAPK). La MAPKKK fosforila y activa a la MAPKK que, subsecuentemente, fosforila y activa a la MAPK; normalmente esta última fosforilación lleva a la MAPK hacia el núcleo donde fosforila a sus blancos. En esta levadura diferentes vías de MAP cinasas forman un sistema interactivo de señalizaciones lo que conforma una red compleja de respuestas entre las vías, que por otro lado mantienen su especificidad a través de proteínas reclutadoras.<sup>92</sup>

La vía de HOG está involucrada a diferentes niveles en la expresión de aproximadamente 150 genes de respuesta a estrés.<sup>52</sup> Aunque se desconoce cómo una célula percibe un déficit hídrico o estrés osmótico y, por tanto se ignora el mecanismo preciso por el cual se activa esta vía, se ha sugerido que la señal de estrés osmótico se genera a través de



**Figura 5.** Representación esquemática de la vía de HOG. En células creciendo en condiciones control, la vía de HOG está inactiva, el osmosensor Sln1p está activo, fosforilando a Ssk1p e impidiendo la fosforilación de la vía de MAP cinasas. En esta vía la MAPKKK (o MEKK) está constituida por dos proteínas redundantes, Ssk2p/Ssk22p; la MAPKK (o MEK) es Pbs2p y la última MAPK es Hog1p. En condiciones de estrés hiperosmótico, Sho1p recluta por poco tiempo a Pbs2p a la membrana plasmática lo cual hace que se forme el complejo Sho1p-Pbs2p-Ste11p-Ste20p-Ste50p. Una vez que Pbs2p es fosforilado (por la MAPKKK Ssk2p/Ssk22p) se deshace el complejo y Pbs2p fosforila a Hog1p. Por otro lado, en estas condiciones de estrés, Sln1p deja de fosforilar a Ssk1p y la vía de MAP cinasas se activa llegando a fosforilar a Hog1p. El complejo represor Tup1p-Ssn6p-Sko1p se desarticula, Sko1p se convierte en un activador transcripcional que recluta a Hog1p, a los complejos SAGA y SNF-SWI<sup>100</sup> y permite la transcripción de genes de respuesta a estrés, esto en conjunto con la entrada de los factores Msn2p/Msn4p al núcleo.

cambios físicos en la membrana plasmática más que por la unión específica de un ligando particular.<sup>123</sup> Independientemente de cómo sea el mecanismo de percepción, se han caracterizado dos proteínas que podrían participar en este proceso: Sln1p y Sho1p. Estas dos proteínas están localizadas en la membrana plasmática y hay evidencia genética que demuestra que funcionan en la vía de HOG, arriba de la última cinasa Hog1p<sup>78,79</sup> (Fig. 5). Sln1p es una proteína de 1,220 aminoácidos que funciona como un regulador negativo de la vía de HOG; es decir, cuando esta proteína está activa la vía de HOG está inactiva y, viceversa.<sup>78</sup> En su estructura primaria se pueden distinguir diferentes dominios (cinasa-histidina) que permiten agruparla entre las proteínas que conforman los "sistemas de dos componentes" que, a través de una cascada de fosforilaciones, participa en, al menos uno de los sistemas de percepción y señalización ante esta situación de estrés. Por otro lado, Sho1p es una proteína de 367 aminoácidos<sup>79</sup> localizada en la membrana plasmática cuya función (posiblemente entre otras) es la de anclar a la MAPKK de la vía de HOG (Pbs2p) a la membrana plasmática lo cual constituye un requisito indispensable para que esta vía funcione adecuada-

mente. En condiciones de estrés osmótico, (en pocos minutos) Pbs2p se une a Sho1p y recluta a las demás proteínas (Ste11p, Ste20p, Ste50p) en la membrana plasmática. Una vez que se fosforila Pbs2p, el complejo se disgrega y continúa la cascada de fosforilación hacia Hog1p.<sup>103</sup> Aparentemente, el único dominio esencial para la función de Sho1p en esta vía de transducción es el dominio SH3 que es el de interacción con Pbs2p.<sup>101</sup>

La caracterización de la vía de HOG se ha llevado a cabo a través de diversos estudios genéticos y gracias a esto se ha podido conformar el esquema que se muestra en la Fig. 5. En este esquema se indica que la MAPKKK está compuesta por dos proteínas funcionalmente redundantes llamadas Ssk2p y Ssk22p que fosforilan a la MAPKK o Pbs2p que finalmente fosforila a la última MAPK conocida como Hog1p. Una vez que se fosforiló Pbs2p, la fosforilación de Hog1p en respuesta a un estrés hiperosmótico, es rápida y transitoria. Se ha podido detectar la fosforilación en tirosina de Hog1p y su posterior translocación al núcleo después de un minuto de haber sometido a un cultivo de levaduras a un tratamiento con 0.5M de NaCl. Hog1p permanece fosforilado y localizado en el núcleo por

aprox. 10 minutos, tiempo en el que se hace aparente un incremento en el nivel de mRNA de genes inducidos por estrés hiperosmótico.<sup>105</sup> Mutaciones en las proteínas Hog1p y Pbs2p dan lugar a un fenotipo de osmosensibilidad; mientras que mutaciones en los otros componentes de la vía no tienen este fenotipo.<sup>53</sup>

La aparición de Hog1p fosforilado, el cual permanece así de manera transitoria, y la duración de este evento depende de la severidad del estrés osmótico. Esto último sugiere que la vía está controlada por un mecanismo de retroalimentación que promueve su inactivación una vez que la respuesta transcripcional ha sido inducida y, que aparentemente es suficiente para contender con la condición de estrés. Se han caracterizado una serie de fosfatasa que interactúan genéticamente con la vía de HOG las cuales afectan el nivel y/o el período de fosforilación tanto de Pbs2p como de Hog1p. Aunque a la fecha se desconoce la señal que induce este mecanismo de retroregulación, no hay duda de que estas fosfatasa son importantes para que la vía de HOG se inactive en el momento apropiado y la célula pueda retomar su crecimiento.

Una vez fosforilada, la cinasa Hog1p se transloca al núcleo, en donde, transduce la señal de hiperósmosis a través de por lo menos ocho factores transcripcionales: Smp1p, Sgd1p, Sko1p, Gcn4p, Skn7p, Hot1p, Msn1p, Msn2p y Msn4p.

**Smp1p.** Es un factor recientemente identificado que es fosforilado por Hog1p y afecta la expresión de algunos genes de respuesta a estrés.<sup>53</sup>

**Sgd1p.** Es un gen nuclear esencial, que no tiene similitud con ninguna proteína reportada. El gen se aisló como supresor de una mutante osmosensible y su sobreexpresión suprime parcialmente el fenotipo de osmosensibilidad de las mutantes *hog1* y *pbs2*.<sup>1</sup>

**Sko1p.** Es una proteína que forma parte de un complejo proteínico con Ssn6p-Tup1p. Se ha demostrado que Ssn6p-Tup1p reprime por lo menos 6 grupos de genes en *S. cerevisiae*, incluyendo genes regulados por los niveles de oxígeno (genes hipóxicos), reprimidos por glucosa, específicos de cepas haploides, inducidos por daño a DNA y de respuesta a estrés osmótico.<sup>53,117</sup> Al parecer, la proteína que se une al DNA y recluta al complejo Ssn6p-Tup1p a los diferentes promotores es la encargada de dar especificidad en la respuesta. En el caso del grupo de genes de respuesta a estrés osmótico, el complejo Ssn6p-Tup1p interactúa con Sko1p que se une a secuencias CRE<sup>98</sup> y de esta manera reprime la expresión de los genes que contienen esta secuencia en sus promotores. Mutaciones en cualquiera de los componentes de este complejo (Sko1p-Ssn6p-Tup1) liberan la represión de este grupo de genes. Se ha demostrado que para que exista desrepresión de los genes dependientes de Sko1p en respuesta a estrés osmótico, se requiere de

la presencia de Hog1p; ya que, bajo estas condiciones de estrés Hog1p fosforila Sko1p causando una disociación del complejo y la expresión de genes blanco.<sup>83,99</sup> El complejo represor Sko1p-Ssn6p-Tup1p se convierte en complejo activador gracias a la presencia y fosforilación de Hog1p. La cinasa PKA interviene en este proceso pues determina la localización nuclear de Sko1p.<sup>90</sup>

**Gcn4p.** Es un activador transcripcional que participa en la regulación de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos en *S. cerevisiae*. Recientemente se demostró que también activa genes de respuesta a estrés osmótico en colaboración con la cinasa Hog1p. La función de este factor es relevante en esta respuesta; ya que mutaciones en el gen correspondiente dan lugar a levaduras osmosensibles. Por otro lado, no sólo se ha observado que esta situación de estrés afecta la síntesis de aminoácidos sino también la incorporación de los mismos en proteínas.<sup>91</sup>

**Skn7p.** Es una proteína nuclear no esencial, que parece estar involucrada en múltiples procesos celulares como son el control del ciclo celular, la respuesta oxidativa, la respuesta a estrés por altas temperaturas y el metabolismo de la pared celular.<sup>53</sup> Tiene diferentes sitios de unión en el DNA lo que sugiere que la especificidad de pegado a cada uno de estos sitios lo dan otras proteínas que también se unen a DNA y que interactúan con Skn7p. Esta proteína es un activador controlado por el sistema de dos componentes (Sln1p-Ssk1p<sup>71</sup>) y, existe evidencia que indica que este factor regula la respuesta celular a condiciones hipoosmóticas para ajustar el metabolismo de la pared celular, el control de la proliferación celular y la respuesta a estrés.<sup>72</sup>

**Hot1p.** Es una proteína nuclear que interactúa con Hog1p; su remoción suprime parcialmente la letalidad generada por la activación constitutiva de la vía de HOG.<sup>104</sup> Este factor transcripcional se fosforila por Hog1p y, en complejo con esta proteína, se asocia a los promotores de varios genes de respuesta a estrés; sin embargo se desconoce la secuencia a la cual se une.<sup>4</sup>

**Msn1p.** Es el factor que presenta un mayor porcentaje de similitud con Hot1p y, su remoción disminuye la expresión de varios genes de respuesta a estrés; aunque no suprime la letalidad causada por la sobre-expresión o constitutividad de la vía de HOG,<sup>104</sup> esto sugiere una contribución menor en la respuesta mediada por esta vía.

**Msn2p y Msn4p.** El papel de estos factores se describe con anterioridad en este escrito (ver "El elemento *STRE* y los factores Msn2p y Msn4p"); sin embargo, cabe mencionar que existe una relación estrecha entre la vía de HOG y estos factores, ya que esencialmente todos los genes que no se expresan en una mutante *msn2/msn4* tampoco lo hacen en una mutante *hog1* y la expresión mediada por Msn2p/Msn4p a través del elemento *STRE* requiere del funcionamiento de esta vía.<sup>105</sup>

### 3.b. Síntesis y acumulación de glicerol

La vía de HOG regula la síntesis de glicerol, el cual forma parte de un grupo de moléculas conocidas como "osmolitos compatibles".<sup>146</sup> Estos compuestos se acumulan en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación causada por el estrés hiperosmótico y tienen la característica de acumularse en grandes cantidades sin afectar el funcionamiento de la célula. Hay una gran variedad de osmolitos compatibles utilizados por los organismos: iones, azúcares, polioles de estos azúcares así como aminoácidos y sus derivados.<sup>146</sup> Las levaduras acumulan preferencialmente polioles de azúcares. En el caso de *S. cerevisiae* el compuesto acumulado bajo condiciones de estrés osmótico es el glicerol.<sup>2,8</sup> El glicerol puede ser utilizado por la levadura como fuente de carbono y energía, así como para proteger a las células contra altas temperaturas, estrés oxidativo y estrés hiperosmótico. El glicerol es un alcohol polihídrico que se sintetiza a partir de dihidroxiacetona fosfato, un intermediario de la glucólisis. Este compuesto es reducido por las enzimas Gpd1/2 (dependiente de NAD-glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) a glicerol 3-fosfato que es desfosforilado por las enzimas Gpp1/2 (dependiente de NAD-glicerol 3-fosfato fosfatasa) a glicerol. Los genes *GPD1/2* y *GPP1/2* se expresan de manera diferente y sus correspondientes mutantes exhiben fenotipos que reflejan su posible función fisiológica; es decir, *GPD1* y *GPP2* participan en la respuesta a estrés osmótico y su regulación está mediada por la vía de HOG,<sup>5,88</sup> mientras que la expresión de *GPD2* y *GPP1* se da bajo condiciones anaeróbicas o micro-aeróbicas,<sup>5,88</sup> consistentemente con esto, la mutante en *gpd1* es osmosensible, mientras que la mutación de *gpd2* muestra un nivel bajo de osmosensibilidad, bajo condiciones aeróbicas, la cual se incrementa notablemente bajo condiciones anaeróbicas.<sup>5</sup> Consecuentemente, la doble mutante *gpd1/gpd2* es sensible a ambas condiciones de crecimiento. Por otro lado, la mutación sencilla de *gpp1* o *gpp2* no confiere osmosensibilidad mientras que la doble mutante *gpp1/gpp2* muestra un fenotipo de osmosensibilidad tan fuerte como el de *gpd1/gpd2*, lo cual indica que las fosfatasas son funcionalmente redundantes en estas condiciones de crecimiento.<sup>88</sup> La duplicación de genes también es evidente en otros casos, como por ejemplo en el sistema de asimilación de amonio en donde de manera similar se ha relacionado al hecho de que esta levadura es un organismo facultativo.<sup>26</sup>

La levadura también puede incorporar glicerol del medio de crecimiento. Este proceso se lleva a cabo por tres mecanismos: a) difusión pasiva, b) difusión facilitada y c) se sugiere un sistema de incorporación activa.<sup>53</sup> (a) La difusión pasiva no representa una contribución importante, es medible pero baja y disminuye en células que están creciendo en alta osmolaridad.<sup>122</sup> (b) La difusión facilitada está mediada

por un canal de glicerol conocido como Fps1p que participa en el movimiento del mismo hacia ambos lados de la membrana plasmática, controlando de esta manera el contenido intracelular de glicerol. La actividad de Fps1p está regulada por cambios osmóticos, de tal forma que el canal se cierra durante condiciones hiperosmóticas para permitir una acumulación de glicerol, mientras que un decremento en la concentración osmótica extracelular promueve la apertura del mismo.<sup>76</sup> (c) *S. cerevisiae* posee dos proteínas (Gup1p y Gup2p) que podrían estar involucradas en un sistema de simporte de glicerol con Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup>. El análisis de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas predice que contienen segmentos transmembranales y esta observación es apoyada porque hay evidencia experimental que demuestra que, al menos, Gup1p está localizada en la membrana plasmática. Las células que carecen de esta proteína crecen con una velocidad reducida en relación a la cepa silvestre en medios en donde el glicerol es la única fuente de carbono. Consistentemente con la función propuesta, las mutantes en los genes para estas proteínas también muestran una disminución en la incorporación de glicerol.<sup>54</sup>

### 4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) Y ESTRÉS OXIDATIVO

El dióxígeno (O<sub>2</sub>) es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua de mar y al menos 47% de la corteza terrestre. Además, casi todos los seres vivos utilizan el dióxígeno para respirar y obtener energía. Sin embargo, a partir de esta molécula, se forman durante la respiración, moléculas más reactivas conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS de las siglas en inglés de Reactive Oxxygen Species). Las ROS regulan varios procesos celulares pero también resultan nocivas para los organismos.<sup>48</sup>

Las ROS son derivados del oxígeno más reactivo que el O<sub>2</sub> en su estado basal. La molécula de dióxígeno es un birradical libre, esto es, posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital  $\pi$  de antiunión ( $\pi^*$ ) (Fig. 6). En esta molécula los electrones no apareados poseen giros paralelos, de tal manera que para que el O<sub>2</sub> oxide otro átomo o molécula, éste tendría que aceptar un par de electrones con giro contrario o aceptar un solo electrón a la vez (limitación del giro o "spin"). Si un solo electrón se adiciona al dióxígeno, éste se localizará en uno de los orbitales  $\pi^*$  de antiunión y el producto será el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). De la adición de un electrón más, resultará el ión peróxido el cual se protona rápidamente en el ambiente celular y se produce el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un oxidante débil; sin embargo, difunde y cruza las membranas fácilmente y, al reaccionar con algunos metales de transición como el hierro o el cobre re-

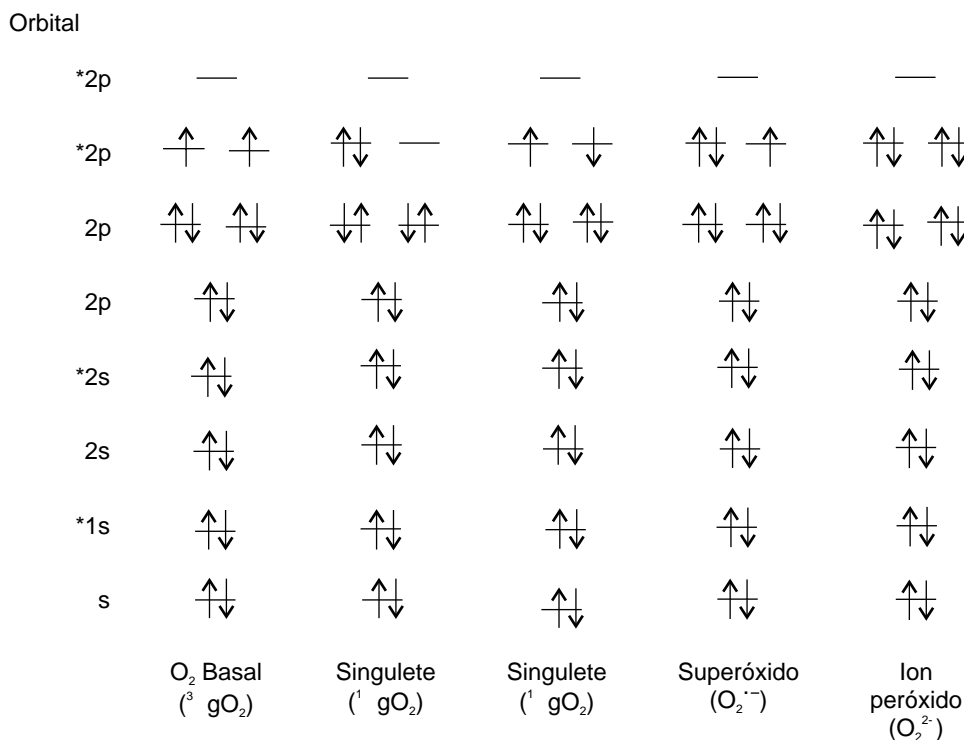


Figura 6. Estructura electrónica de las especies reactivas generadas a partir de la molécula de dioxígeno.

ducidos (Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>+</sup> respectivamente) forma al radical hidroxilo (HO·) uno de los radicales conocidos con mayor reactividad. En el ion peróxido los dos átomos se encuentran unidos por un solo enlace débil, de tal forma que al aceptar un par de electrones extra, este enlace se elimina totalmente. La protonación de este producto genera agua. El dioxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) a diferencia de las ROS mencionadas, no es producto de la reducción parcial del dioxígeno basal. El <sup>1</sup>O<sub>2</sub> se genera mediante la captación de energía por uno de los electrones desapareados del O<sub>2</sub> en su estado basal, al cambiar de giro forma el <sup>1</sup>ΣgO<sub>2</sub> (Fig. 6). Esta forma del oxígeno singlete es muy inestable y decae en la forma <sup>1</sup>ΔO<sub>2</sub> (Fig. 6) cuando se aparean los dos electrones de los orbitales π\* de antiunión. La forma <sup>1</sup>ΔO<sub>2</sub> puede volver al estado de dioxígeno basal con la emisión de un fotón o bien puede aceptar un electrón o un par de electrones con giros opuestos, razón por la cual el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> resulta tan reactivo.

Las ROS se generan endógenamente en las células, no sólo como consecuencia de la reducción incompleta del oxígeno a agua durante la respiración, sino también en otros procesos metabólicos como la β-oxidación de ácidos grasos, o al exponer las células a fuentes de radiación ionizante, a químicos de reciclaje redox o a metales pesados. A pesar de las condiciones prooxidantes de la vida aeróbica y de los distintos insultos ambientales, los organismos son

capaces de mantener un ambiente redox intracelular reducido. Sin embargo, si la concentración de las ROS sobrepasa la capacidad celular para eliminarlos, se produce un estado de estrés oxidativo. Existe mucha información sobre el daño a lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos mediado por los intermediarios reactivos del O<sub>2</sub>, daños que eventualmente pueden conducir a la muerte celular.<sup>121</sup> Para contender con el estrés oxidativo y proteger los componentes celulares al mantener un adecuado ambiente redox dada la inherente exposición a las ROS, los organismos constantemente detectan y se adaptan a cualquier perturbación mediante una batería de defensa antioxidante conformada por sistemas enzimáticos y no enzimáticos.

#### 4.a. Sistemas de defensa anti-oxidante no enzimáticos

Los sistemas de defensa no enzimáticos consisten típicamente de moléculas pequeñas que son solubles en agua o, en algunos casos, en un ambiente lipídico. Éstos actúan en general como atrapadores de algunas de las ROS.

El **glutatión** (GSH) es un tripéptido γ-L-glutamyl-L-cisteinilglicina y es el mejor ejemplo de defensa no enzimática. El GSH actúa como un atrapador, posee un grupo sulfhidriilo que reacciona con los oxidantes y se produce glutatión reducido (GSSG). El glutatión es posiblemente la molécula atrapadora de intermediarios reactivos de oxígeno más abun-

dante en la célula, en consecuencia, su papel en el mantenimiento del estado redox celular es importante.<sup>18</sup>

Las **poliaminas**, derivados de los aminoácidos, también han sido implicadas en la protección de la levadura contra el estrés oxidativo. Las poliaminas actúan como antioxidantes al atrapar diversos ROS y en especial al radical superóxido. De hecho la espermina y la espermidina son esenciales para el crecimiento aeróbico de *S. cerevisiae*, una mutante nula *spe2*, un gen esencial para la síntesis de poliamidas, es hipersensible al oxígeno.<sup>6</sup>

El **ácido eritroascórbico** muestra propiedades antioxidantes similares al ácido ascórbico, es decir actúa como un buen agente reductor al reaccionar con el radical hidroxilo (HO), con el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y con el  $H_2O_2$ . También inactiva el  $^1O_2$  y reduce los radicales tiolo. Aunque el ácido eritroascórbico ha sido identificado en la levadura, su papel específico no ha sido esclarecido.<sup>63</sup>

Las **metalotioneínas** son proteínas pequeñas, ricas en cisteína que tienen la capacidad de unir ciertos iones metálicos. Entre las funciones de las metalotioneínas se incluye el almacenamiento de los metales en una forma no tóxica, inaccesible para la producción de otras ROS por la reacción de Fenton.<sup>49</sup>

Las **flavohemoglobinas** son otras metalo-proteínas con un papel posible en la protección contra el estrés oxidativo y/o en su detección. Mutantes deficientes en la flavohemoglobina son sensibles a la diamida (generador del anión superóxido) y la expresión del gen que la codifica se induce en presencia de oxígeno.<sup>147</sup>

Las **glutarredoxinas** son una clase de proteínas pequeñas con un sitio activo que contiene dos cisteínas sensibles al cambio redox. *S. cerevisiae* tienen dos genes de glutarredoxina (*GRX1* y *GRV2*) que a pesar de presentar un alto grado de similitud, parecen tener papeles distintos para proteger a la célula en contra del  $H_2O_2$  y del radical superóxido, respectivamente.<sup>75</sup>

Las **tioredoxinas** son un grupo de proteínas pequeñas las cuales son ricas en grupos sulfhidrilo que son empleadas como agentes reductores por la tioredoxina peroxidasa y por la ribonucleótido reductasa. La remoción de los genes de la tioredoxina en la levadura da lugar a células hipersensibles al  $H_2O_2$ .<sup>86</sup>

#### 4.b. Sistemas de defensa enzimáticos

Los sistemas de defensa enzimáticos incluyen a varias enzimas las cuales son capaces de remover ROS.

La **catalasa** transforma el  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$ . *S. cerevisiae* posee dos de estas enzimas codificadas por los genes *CTA1* y *CTT1*. El gen *CTA1* codifica para la catalasa que se localiza en los peroxisomas, la cual es la encargada de remover el  $H_2O_2$  que se produce durante la  $\beta$ -oxidación de

los ácidos grasos. Como se ha mencionado, el gen *CTT1* se regula por estrés oxidativo, osmótico y ante la falta de nutrientes. Las cepas deficientes en ambas catalasas son hipersensibles al  $H_2O_2$  en la fase estacionaria y las mutantes en uno u otro gen son incapaces de montar una respuesta adaptativa al  $H_2O_2$  en fase de crecimiento exponencial.<sup>107</sup>

La levadura posee dos **superóxido dismutasas (SOD)**, la MnSod codificada por el gen *SOD2* que se localiza en la mitocondria y la Cu/Zn Sod codificada por el gen *SOD1* de localización citoplásmica. Las SOD dismutan el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a  $H_2O_2$  y  $O_2$ . La Cu/Zn Sod parece ser la enzima que remueve  $O_2^{\cdot-}$  del citoplasma y posiblemente también del peroxisoma, mientras que la MnSod parece proteger la mitocondria del  $O_2^{\cdot-}$  generado durante la respiración y en la exposición al etanol.<sup>42,60</sup> Cabe mencionar que la falta de esta proteína también provoca un fenotipo osmosensible.<sup>34</sup>

Las **enzimas de la ruta de las pentosas** glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*ZWFI*), la transcetolasa (*TKLI*) y la ribulosa-5-fosfato epimerasa (*RPE1*) son enzimas cruciales para la producción de poder reductor celular en la forma de NADPH. La glutatión reductasa y la tioredoxina reductasa (ver abajo) requieren del NADPH como reductor para reducir el glutatión oxidado (GSSG) y la tioredoxina. Dado que el GSH y la tioredoxina son antioxidantes importantes, no es sorprendente que las mutaciones que afectan a los genes de las enzimas de la ruta de las pentosas vuelvan a las células hipersensibles a oxidantes tales como el  $H_2O_2$ .<sup>61,115</sup>

La **glutatión reductasa** es la enzima responsable de la reducción de glutatión oxidado (GSSG) y, por lo tanto del mantenimiento de la proporción GSH/GSSG intracelular. Las mutantes con defectos en el gen de la glutatión reductasa (*GLR1*) acumulan un exceso de glutatión oxidado y son hipersensibles a oxidantes.<sup>18</sup>

La glutatión peroxidasa cataliza la reducción de hidroperóxidos, al usar GSH como reductor. *S. cerevisiae* presenta tres de estas enzimas Gpx1p, Gpx2p, y Gpx3p. Mientras que la mutante nula de Gpx3p es hipersensible al peróxido, las mutantes de las otras isoformas no muestran un fenotipo evidente.<sup>57</sup>

La **tioredoxina peroxidasa (Tsa)** es una enzima abundante en la levadura, su nivel aumenta al doble en respuesta a una concentración de  $O_2$  del 95% o en presencia de agentes que contengan tioles como el mercaptoetanol. La tioredoxina peroxidasa reduce el  $H_2O_2$  y a hidroperóxidos de alquilo en conjunto con la **tioredoxina reductasa** y el NADPH.<sup>37,89</sup>

Las **peroxirredoxinas (Prxs)** son una superfamilia de proteínas antioxidantes que dependen de un grupo tiol para su función. A diferencia de las otras enzimas antioxidantes mencionadas, las peroxirredoxinas no requieren de cofactores redox tales como metales o grupos prostéticos. También cono-

cidas como tiorredoxina peroxidasa (Tpx) o alquilo hidroperóxido reductasa, estas enzimas protegen contra el  $H_2O_2$ , hidroperóxidos orgánicos o peroxinitritos.<sup>37</sup> *Saccharomyces cerevisiae* tiene al menos cinco peroxirredoxinas que se localizan en distintos compartimientos celulares donde realizan diferentes funciones. Además de su papel como antioxidantes algunas Prxs están implicadas en la regulación de cascadas de señalización mediadas por  $H_2O_2$ .<sup>25</sup>

Evidencias diversas muestran que la regulación de la respuesta antioxidante en *S. cerevisiae* ocurre mayoritariamente a nivel transcripcional. Estas evidencias también muestran una superposición considerable entre las respuestas provocadas ante una condición de estrés oxidativo y aquéllas observadas en distintas condiciones de estrés como las promovidas por la falta de nutrientes, por el calor, el choque osmótico y la resistencia a metales pesados como el cadmio. Lo anterior sugiere que las diversas condiciones de estrés generan conjuntamente una condición hiperoxidante. Consecuentemente, se han identificado varios de los factores transcripcionales que regulan la expresión génica en respuesta al estrés oxidativo cuya actividad, en algunos de los casos, se modula por las vías de señalización de las diferentes condiciones de estrés.<sup>85</sup>

#### 4.c. Factores transcripcionales tipo bZip

Los factores de transcripción tipo *bZip* muestran similitud en su secuencia con los factores de transcripción descritos en mamíferos tales como c-Jun. En *S. cerevisiae* estos factores también presentan los dominios básicos de unión al DNA y los dominios de dimerización presentes en las proteínas de mamíferos.<sup>31</sup>

Entre los factores más extensamente estudiados están tres proteínas llamadas **Yap1p**, **Yap2p** y **Gcn4p** las cuales participan en la respuesta protectora de la levadura contra las condiciones de tensión oxidativa. El papel de Yap1p en la regulación de enzimas que protegen contra oxidantes se hizo evidente cuando se descubrió que mutantes en *yap1* resultaban hipersensibles a diferentes agentes oxidantes.<sup>111</sup>

Las mutantes deficientes en Yap1p presentan una disminución en la transcripción de los genes que codifican varias enzimas con actividad antioxidante como la superóxido dismutasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la glutatión reductasa. En estas mutantes la respuesta adaptativa al  $H_2O_2$  se encuentra seriamente afectada, lo cual muestra que Yap1p afecta la transcripción de los genes que median esta respuesta. Esto se ve apoyado por el hecho de que la presencia del gen *YAP1* en un alto número de copias resulta en un incremento modesto en los niveles celulares de glutatión y en las actividades de las enzimas antioxidantes mencionadas. Entre los genes activados por Yap1p se en-

cuentran aquellos que codifican para proteínas que participan en la síntesis del glutatión y de la vía de las pentosas, la cistationina  $\gamma$ -liasa (*Cys3*) que genera cisteína, un precursor del glutatión a partir de la cistationina, la  $\gamma$ -glutamilo cisteína sintasa (*GSH1*), que es la enzima limitante en la biosíntesis de GSH y la glutatión reductasa dependiente de NADPH (*GLR1*), que recicla el GSH oxidado. Yap1p también activa a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*ZWF1*), que regula el flujo de carbón a través de la ruta de las pentosas y la transaldolasa (*TAL1*). Datos experimentales demuestran que Yap1p y Skn7p (ver el apartado "Transducción de señales al percibirse un medio hiperosmótico: la vía de HOG") cooperan para activar un grupo de genes entre los que se incluye la catalasa citosólica (*CTT1*), la citocromo *c* peroxidasa (*CCP1*), la peroxirredoxina (*TSAl*), la alquilo hidroperóxido reductasa (*AHP1*), la tiorredoxina 2 (*TRX2*), la tiorredoxina reductasa (*TRR1*), la cobre/zinc (*SOD1*) y la manganeso (*SOD2*) superóxido dismutasas.<sup>24</sup>

Los posibles sitios de unión de Yap1p se han localizado en la secuencia del promotor de algunos genes como *SOD1*, *TWF*, *TRX2*, *GLR1* y *GSH1*.<sup>18,43,144</sup>

La regulación de los genes de la respuesta antioxidante mediada por Yap1p depende de la acumulación nuclear del factor. En presencia de  $H_2O_2$ , dos residuos de cisteína forman un enlace disulfuro intramolecular provocando un cambio conformacional que enmascara el sitio de reconocimiento del factor por un sistema de exportación nuclear (mediado por Crm1p/Xpo1p), esta oxidación promueve la acumulación nuclear. Una tiorredoxina nuclear, también controlada por Yap1p, reduce al factor y permite su devolución al citoplasma.<sup>24,25</sup>

El gen *YAP2* fue identificado por su habilidad de conferir resistencia a cadmio cuando se encuentra en un alto número de copias; las mutantes nulas de *yap2* son hipersensibles a varios agentes oxidantes. A la fecha, el papel del gen *YAP2* en la regulación de los genes antioxidantes no es del todo claro dado que no se han identificado sus genes blanco; sin embargo, se ha demostrado su papel en la regulación de la respuesta adaptativa al  $H_2O_2$  al detectar una respuesta disminuida en las mutantes nulas en *yap2*.<sup>135</sup>

La proteína Gcn4p fue identificada originalmente como un factor responsable de la regulación de la expresión de varios genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos. El sitio de unión para Gcn4p es muy similar al de Yap1p aunque Gcn4p no ha sido directamente implicada en la regulación génica en respuesta a oxidantes. Sin embargo, se ha propuesto un papel para Gcn4p en el control, al menos parcial, de la respuesta de la levadura a la radiación UV, un efectivo productor de ROS intracelulares, en especial oxígeno singulete ( $^1O_2$ ).<sup>51</sup>



#### 4.d. Factores transcripcionales que unen cobre

Estos factores transcripcionales presentan un dominio de "puño", rico en cisteínas, que une cobre.<sup>33</sup> La proteína **Ace1p** que pertenece a este grupo, regula la expresión de algunos genes involucrados en la homeostasis del cobre, incluido *CUP1*, que codifica a la metalotioneína, una proteína pequeña, también rica en cisteínas, que directamente une iones metálicos e impide su participación en reacciones de oxidación. Ace1p también regula la expresión de *SOD1* al unirse directamente a su región promotora.

**Mac1p**, otro factor de transcripción, presenta los dominios de unión al DNA y la región rica en cisteínas, los cuales muestran similitud a los descritos en Ace1p. Se ha reportado que la proteína Mac1p regula la transcripción de genes involucrados en la reducción de los iones de hierro y cobre, también se le ha implicado como intermediario en la inducción del gen de la catalasa *CTT1* en presencia de  $H_2O_2$ . Sin embargo, no hay evidencia de la unión de Mac1p al promotor de catalasa, por lo que el papel de este factor puede ser indirecto. La presencia del cobre unido en las proteínas Mac1p y Ace1p sugieren que estos factores de transcripción pueden ser sitios sensibles a cambios redox y por lo tanto puedan tener un papel en la habilidad de la célula para detectar la presencia de agentes oxidantes.<sup>62</sup>

#### 4.e. Factores transcripcionales con dedos de zinc

La proteína **Hap1p** regula la expresión de los genes *CYC1* (iso-1-citocromo) y *CYC7* (iso-2-citocromo *c*) en respuesta a oxígeno y en presencia de hemo.<sup>55</sup> Hap1p también tiene un papel en la regulación de varios genes que codifican hemo-proteínas tales como *CTT1* y *CTA1* (la catalasa citosólica y la catalasa peroxisomal, respectivamente), componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y la *SOD2* (manganeso superóxido dismutasa mitocondrial). Además de Hap1p, las proteínas Hap2p, Hap3p y Hap4p también están involucradas en controlar la expresión de varios genes en respuesta al hemo. Estas proteínas han sido también implicadas en la regulación del gen de *SOD2* durante la fase estacionaria.<sup>32</sup>

### 5. ESTRÉS POR SALES

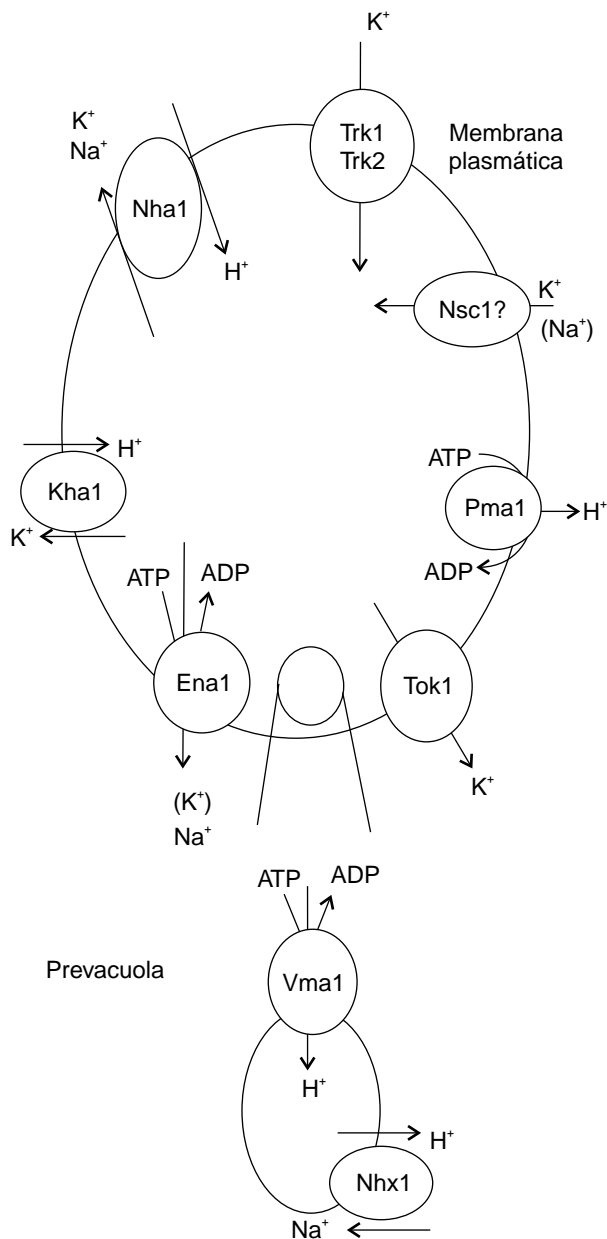
Cuando un organismo se enfrenta a una condición de estrés salino se generan, simultáneamente, dos tipos de estrés; por un lado, hay una condición de estrés osmótico que depende de la concentración de sal usada y, por otro lado, hay una toxicidad provocada por los diferentes iones. La respuesta a condiciones de estrés hiperosmótico ya se describió anteriormente y en esta sección nos vamos a enfocar a la

caracterización de los sistemas de transporte iónico necesarios para mantener una homeostasis interna adecuada.

Se ha calculado que una concentración de sal de 50-150 mM corresponde a la fuerza iónica que se encuentra dentro del citoplasma de muchos organismos<sup>112</sup> y, existe evidencia que demuestra que estas concentraciones tienen efectos positivos en la estructura de las proteínas debido a las fuerzas electrostáticas que se generan. Por otro lado, se ha demostrado que altas concentraciones salinas (más de 300-500 mM) inhiben las reacciones metabólicas ya que perturban el balance hidrofóbico-electrostático afectando así el funcionamiento proteínico.<sup>112</sup>

No todos los iones afectan con la misma magnitud el funcionamiento proteínico y, se ha propuesto un orden tanto para aniones como para cationes en función del grado de perturbación que pueden causar a las diferentes proteínas. Para los aniones el orden decreciente en cuanto a daño es  $SCN^- > I^- > ClO_4^- > NO_3^- > Cl^- > SO_4^{2-}$  y, para los cationes  $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Li^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+$ .<sup>146</sup>

Adicionalmente a estos efectos salinos no específicos que ocurren a altas concentraciones, algunas enzimas son especialmente sensibles a la inhibición de su actividad causada por los iones  $Na^+$  o  $Cl^-$ , aún cuando se encuentren en bajas concentraciones, probablemente debido a la interacción específica de los iones con sitios importantes de la proteína. Además, todos los organismos difieren en cuanto a su sensibilidad a los diferentes iones; por ejemplo en la levadura *S. cerevisiae*, el ión  $Na^+$  resulta más tóxico que el  $K^+$  o el  $Cl^-$  cuando el cultivo crece en glucosa como fuente de carbono. Cuando este organismo se enfrenta a una situación de estrés por NaCl, la respuesta se centra en mantener una homeostasis adecuada del ion  $Na^+$  al regular no sólo su concentración interna sino al mantener una relación alta  $K^+/Na^+$ . Esto último es muy importante, ya que la toxicidad por  $Na^+$  (en un cierto nivel) se puede revertir añadiendo  $K^+$ .<sup>137</sup> Esto se puede explicar porque el  $Na^+$  puede entrar a las células de levadura a través de los canales de  $K^+$  (codificados por los genes *TRK1* y *TRK2*)<sup>137</sup> y, parte de su toxicidad se debe a que interfiere con los procesos celulares que requieren del  $K^+$ . Para prevenir una toma excesiva de  $Na^+$ , los canales de  $K^+$  cambian de un estado de baja afinidad a otro de alta afinidad lo cual les permite discriminar entre los dos iones e incorporar, preferencialmente,  $K^+$ . Por otro lado, el exceso de  $Na^+$  que entra a la célula se expulsa a través de una ATPasa de tipo P codificada por el gen *ENA1* y por una proteína antiportadora  $Na^+/H^+$  (*Nha1p*).<sup>35,97,142</sup> El ion que se alcanza a acumular intracelularmente es removido al internalizarlo en la vacuola. El transportador que lleva a cabo esta compartimentalización es *Nhx1p*, el cual requiere un gradiente de protones que es generado tanto por la ATPasa como por la pirofosfatasa, ambas proteínas vacuolares.<sup>39</sup> Cabe mencionar que estudios



**Figura 7.** Representación esquemática de algunos de los sistemas de transporte iónico de la membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Muchos han sido caracterizados genética y fisiológicamente; entre éstos se encuentran la ATPasa de  $\text{H}^+$  (Pma1p), la ATPasa de  $\text{Na}^+$  (Ena1p), el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nha1p) y los transportadores de  $\text{K}^+$  (Trk1p, Trk2p, Kha1p, Tok1p y Nsc1p). También se han caracterizado una ATPasa de  $\text{H}^+$  (Vma1p) y un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nhx1p) en la membrana de la vacuola.<sup>137</sup>

fisiológicos sugieren que en la membrana plasmática de esta levadura existe un canal inespecífico de entrada de cationes denominado NSC1, por el cual también pudiera ingresar el  $\text{Na}^+$ .<sup>53</sup> En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la enzima Hal2p es inhibida por concentraciones milimolares de

$\text{Na}^+$  y por concentraciones submilimolares de  $\text{Li}^+$ ; se ha especulado que la causa de la toxicidad de estos iones es que el sustrato de Hal2p (pAp, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato) se acumula e inhibe sulfotransferasas<sup>87</sup> y exonucleasas que procesan RNA.<sup>27</sup> Ya que se ha demostrado que el  $\text{Li}^+$  es capaz de unirse a uno de los dos sitios ocupados por el  $\text{Mg}^{++}$  en el sitio activo de la enzima Hal2p, se ha sugerido que la inhibición de Hal2p por  $\text{Na}^+$  se debe a que éste compite por el mismo sitio de unión que el  $\text{Li}^+$ . Por otro lado, cabe mencionar que la intoxicación por  $\text{Na}^+$  de Hal2p se puede revertir añadiendo  $\text{K}^+$ ; sin embargo, hasta ahora se desconoce la razón precisa de este efecto.<sup>137</sup>

Muchos de los sistemas de transporte iónico de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* han sido caracterizados genética y fisiológicamente; entre éstos se encuentran la ATPasa de  $\text{H}^+$  (Pma1p), la ATPasa de  $\text{Na}^+$  (Ena1p), el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nha1p) y los transportadores de  $\text{K}^+$  (Trk1p, Trk2p, Kha1p, Tok1p y Nsc1p). También se han caracterizado una ATPasa de  $\text{H}^+$  (Vma1p) y un antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nhx1p) en la membrana de la vacuola (Fig. 7).

**La ATPasa de  $\text{H}^+$  (Pma1p).** Esta proteína es una de las encargadas de generar el gradiente protónico electrogénico que dirige el transporte secundario; o sea genera un potencial negativo intracelular lo que permite la expulsión tanto de  $\text{K}^+$  como de  $\text{Na}^+$  mediada por los simportadores.<sup>112</sup>

**Los sistemas de transporte de  $\text{K}^+$ .** Como se dijo anteriormente, el  $\text{K}^+$  es transportado, principalmente, por los transportadores Trk1p y Trk2p y su afinidad por este ion aumenta en condiciones de estrés salino. Por otro lado, no sólo es importante la incorporación de  $\text{K}^+$  a la célula sino también lo es la salida de éste, ya que cerca del 70% de todo el  $\text{K}^+$  que se incorpora se regresa al medio extracelular.<sup>137</sup> Para lograr este objetivo la levadura emplea diversos transportadores como Tok1p, Ena1p y Nha1p (transportadores que se han caracterizado por transportar  $\text{Na}^+$  pero que tienen la capacidad de transportar  $\text{K}^+$ ) y Kha1p.<sup>137</sup>

**La ATPasa de  $\text{Na}^+$  (Pmr2p).** Esta ATPasa es la principal encargada de sacar el  $\text{Na}^+$  de las células de levadura y funciona a pH's básicos. El locus *PMR2* está conformado por un arreglo de 5 genes juntos, muy similares entre sí (*ENA1* a *ENA5*), de los cuales *ENA5* es el menos parecido, ya que los otros 4 tienen más del 90% de identidad. Los 4 genes restantes presentan diferencias en sus patrones de expresión, siendo *ENA1* el más regulado a nivel transcripcional; en tanto que los genes *ENA2-4* presentan una expresión baja constitutiva. *ENA1* se induce fuertemente bajo condiciones de estrés por  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  y su mutación da como resultado una levadura muy sensible a estrés iónico. Esta proteína es la responsable de, prácticamente, toda la salida del  $\text{Na}^+$  y, por lo tanto, de la tolerancia al mismo en *S. cerevisiae*. Como se dijo anteriormente, *ENA1* se regula transcripcionalmente por una compleja red de vías de transduc-

ción de señales. En respuesta a un estrés osmótico moderado (aun cuando éste sea impuesto por una sal) se regula por la vía de HOG; en condiciones de estrés salino, la vía de calcineurina es la encargada de regular la expresión del gen a través de Crz1p. *ENA1* está sujeto a represión catabólica mediada por Mig1p, en tanto que, Sko1p reprime la expresión del gen que es liberada y activada por la vía de PKA. Por otro lado, la vía de TOR regula la respuesta de este gen a ayuno de aminoácidos. Otro nivel de control de la expresión de este gen involucra al sistema de fosfatasa Hal3p-Ppz1p. Hal3p es un regulador negativo de la fosfatasa Ppz1p que está involucrada en la tolerancia a sal<sup>96</sup> y en la regulación del ciclo celular. Se ha visto que una mutante en Ppz1p incrementa los niveles basales de expresión y la inducción por sal de *Ena1p*.<sup>53</sup>

**El antiportador Nhap1.** Contrariamente a la ATPasa de Na<sup>+</sup>, este antiportador funciona a pH ácido y es capaz de transportar tanto Na<sup>+</sup> como K<sup>+</sup>. El gen que codifica para esta proteína presenta una expresión constitutiva y, se cree que tiene una función dual en un amplio rango de pH; es decir a pH ácido participa en la regulación de la concentración interna de cationes, en tanto que a pH básico (en donde la principal responsable de expulsar Na<sup>+</sup> es la ATPasa) este antiportador participa en amortiguar el pH citoplásmico.<sup>97</sup>

**El antiportador Nhx1p.** Aparentemente esta proteína está localizada en el compartimento prevacuolar donde media la compartimentalización del Na<sup>+</sup> de manera dependiente del pH. Esto sugiere que este ion se transfiere de la prevacuola a la vacuola por medio del tráfico vesicular. Para que este movimiento sea eficiente se requiere de un canal de cloro (Gef1p) en la membrana prevacuolar, ya que este canal media el influjo aniónico y permite que haya un gradiente, establecido por la H<sup>+</sup>-ATPasa, de suficiente magnitud para dirigir la acumulación de Na<sup>+</sup> en contra de su gradiente.<sup>39</sup> Consistentemente este gen se induce por estrés salino.

## CONCLUSIONES

Esta descripción de los diferentes mecanismos asociados a la respuesta a diversas condiciones de estrés pretende dejar una muestra de la complejidad biológica que se ha seleccionado durante la evolución de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y que le ha permitido a este microorganismo adaptarse y, consecuentemente, sobrevivir y reproducirse a las condiciones cambiantes del medio. Aun cuando es evidente la selección de diferentes moléculas reguladoras que le dan cierta especificidad a las vías de transducción de señales, cabe resaltar la íntima interacción que existe entre cada una de las diferentes vías. Uno de los mejores ejemplos lo constituye la intercomunicación entre

las vías de PKA y la de HOG; ya que, se requiere de una coordinación tal que le permita a la célula realizar los cambios pertinentes para no sólo enfrentar las condiciones de estrés (a través de la vía de HOG), sino también acoplar su metabolismo y velocidad de crecimiento (a través de la vía de PKA) de tal manera que pueda lograr una adaptación exitosa a la nueva situación ambiental. Esta comunicación se tiene que dar desde que la célula percibe el estímulo estresante, de tal forma que exista una coordinación entre el ajuste metabólico y la respuesta de defensa ante la situación adversa que se presente. Es así que la expresión mediada por los factores transcripcionales Msn2p/MMsn4p, a través del elemento *STRE* requiere del funcionamiento de la vía de HOG.

Otro ejemplo de interacción entre las diferentes vías de respuesta a estrés es la regulación de la expresión del gen *CTTI*, el cual codifica para la catalasa citoplásmica que se encarga de destoxificar a este compartimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como se menciona en el texto anterior, la expresión de este gen depende muy rigurosamente de las vías de HOG y PKA-cAMP y, cabe mencionar que, tanto los niveles de expresión como los de actividad enzimática son notablemente mayores en respuesta a estrés osmótico que en respuesta a estrés oxidativo impuesto por tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas observaciones indican que un estrés hiperosmótico da lugar a una acumulación intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual requiere de ser destoxificado eficientemente, de tal forma que en esta levadura se ha seleccionado, a lo largo de la evolución, un mecanismo para que este gen se active al momento que la célula percibe un estrés hiperosmótico en el medio. Así pues, una estrategia para asegurar una destoxificación eficiente en estas condiciones sería que estuviera modulado por una vía que percibe directamente una situación de hiperosmosis, en este caso la vía de HOG-PKA. Esto no quiere decir que este gen no responda también al estímulo generado por un estrés oxidativo, lo cual de hecho hace a través de diferentes factores transcripcionales y elementos *cis* en su promotor. Por tanto, no es de sorprender que la comunicación entre las diferentes respuestas se dé no sólo a través de los genes blanco, responsables de la adaptación de este organismo a diferentes ambientes, sino también entre los elementos que conforman las vías de transducción específicas para cada situación de estrés. Es relevante comentar el hecho de que mucha de la información disponible en la literatura en esta área sólo nos deja una visión parcial de lo que se ha seleccionado en un sistema biológico para lograr su supervivencia o preservación como especie. En particular esto se da por la tendencia a estudiar, por ejemplo, los patrones de expresión de un gen en respuesta a un estímulo determinado en condiciones muy limitadas, ya sea de fondos genéticos (e.g. una cepa modelo), como de tiempos y/o grados en la severidad

del tratamiento, etc., muy pocos de los cuales semejan en buena medida las condiciones naturales en las cuales estos mecanismos fueron seleccionados. Por lo tanto, este tipo de análisis en realidad proporciona información valiosa pero parcial, y por ello ha sido un error el tratar de generalizar mecanismos que en realidad resultan válidos sólo para situaciones o cepas muy particulares.

El surgimiento de nuevas áreas como lo es la “genómica funcional” ha hecho posible la detección de estas interacciones y de otras, antes no consideradas, gracias a herramientas tales como el análisis global de transcriptomas y proteomas provenientes de cultivos de levadura sometidos a diferentes condiciones de estrés; o bien provenientes de cepas mutantes en diferentes genes identificados como claves en las respuestas correspondientes. Esto ha permitido establecer redes de comunicación entre las diferentes vías de transducción de señales de un estímulo, no sólo ambiental sino también de un programa de desarrollo determinado. Aunque aún no conocemos con precisión la función de cada uno de los genes codificados en el genoma de levadura, éste es el objetivo central de la genómica funcional, de tal forma que no está lejos el día en que podamos disponer de esa información, sobre todo porque el avance en las diferentes metodologías de biología molecular y aquéllas aplicadas para realizar determinaciones con una gran precisión permiten al científico el acumular datos de una manera comprensiva sobre los diferentes mecanismos implicados en los procesos de crecimiento y de respuesta a las diferentes perturbaciones del medio. Esta tendencia de intercomunicación entre la biología molecular, la genética, la bioquímica y las ciencias informacionales llevará a que en un futuro cercano se pueda aplicar una visión macroscópica e integrativa del funcionamiento celular, extendiendo así el impacto que tuviera el enfoque clásico de la genética y fisiología microbianas. Se puede predecir que la aplicación certera de programas o matrices computacionales ‘ad hoc’ a la inmensa información que se acumulará a partir del análisis de transcriptomas, proteomas, metabolomas y fenomas hará posible la descripción de la interacción entre todos los componentes en la célula (o sistema), no sólo a nivel cualitativo sino también cuantitativo. Esto es justamente la finalidad última de lo que se perfila como una nueva área en la biología llamada “biología de sistemas”. En esta denominación un sistema se refiere a una célula así como a un organismo multicelular y, resulta plausible que este nuevo enfoque integrativo tenga un impacto importante en la generación de un nuevo concepto de ingeniería genética y/o metabólica. Desde luego uno de los organismos modelo “ad hoc” para este tipo de análisis es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; ya que ésta ofrece muchas de las características que se requieren para obtener información a los diferentes niveles de funcionamiento de un organismo; de tal manera que es posible examinar la estructura y

dinámica de la función celular y del organismo, más que las características aisladas de cada una de las partes de una célula u organismo. Finalmente cabe mencionar que un análisis integrativo como el que proporcionaría la biología de sistemas permitirá, a largo plazo, integrar las múltiples interacciones que ocurren en un ser vivo, de tal forma que a la larga sea posible modelar un ser vivo virtual, capaz de responder y adaptarse a condiciones ambientales adversas.

#### REFERENCIAS

1. Akhtar, N., A.K. Pahlman., K Larsson., A.H., Corbett & L. Adler. 2000. *SGD1* encodes an essential nuclear protein of *Saccharomyces cerevisiae* that affects expression of the *GPD1* gene for glycerol 3-phosphate dehydrogenase. FEBS Lett. 483(2-3):87-92.
2. Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M. & B.A. Prior. 1994. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. Mol Cell Biol 14(6):4135-44.
3. Alepuz, P. M., Cunningham, K.W. & F. Estruch. 1997. Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of stress-activated *ENA1* gene. Mol. Microbiol. 26:91-98.
4. Alepuz, P., Jovanovic, A., Reiser, V., & G. Ammerer. 2001. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. Mol Cell. 7(4):767-77.
5. Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M., & L. Adler. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J 16(9):2179-87.
6. Balasundaram, D., Tabor, CW. & H. Tabor. 1991. Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl Acad. Sci 88:5872-5876.
7. Beck T, & M.N. Hall. 1999. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. Nature 402(6762):689-92.
8. Blomberg, A., & L. Adler. 1989. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 171(2):1087-92.
9. Blomberg, A. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. FEMS Microbiol Lett. 182(1):1-8.
10. Boutelet F, P. A., & F. Hilger. 1985. Yeast *cdc35* mutants are defective in adenylate cyclase and are allelic with *cyr1* mutants while *CAS1*, a new gene, is involved in the regulation of adenylate cyclase. EMBO J. 4(10):2635-41.
11. Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., & M. Jacquet. 1998. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diuixic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 180:1044-1052.
12. Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E., & Gustin, M.C. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. Science 259(5102):1760-3.
13. Camus, C., Geymonat, M., Garreau, H., Baudet-Nessler, S. & M. Jacquet. 1997. Dimerization of Cdc25p, the guanine-nucleotide exchange factor for Ras from *Saccharomyces cerevisiae*, and its interaction with Sdc25p. Eur. J. Biochem 247:703-708.
14. Causton, H., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, CT., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., & R.A. Young. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. Mol Biol Cell. 12(2):323-37.

15. Chen, T., & C.S. Parker. 2002. Dynamic association of transcriptional activation domains and regulatory regions in *Saccharomyces* heat shock factor. PNAS 99(3):1200-1205.
16. Clos J, W. J., Becker P.B, Wilson S, Lambert K, & C., Wu. 1990. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. Cell 63(5):1085-97.
17. Colledge, M., & J.D. Scott. 1999. AKAPs: from structure to function. Trends Cell Biol. 9:216-221.
18. Collinson, L.P. & I.W. Dawes. 1995. Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, *GLR1*, encoding glutathione reductase. Genes Dev. 156:123-127.
19. Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.-F., Colavizza, D., & J.M. Thevelein. 1998. Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 17:3326-3341.
20. Craig, E. A., Baxter, B.K., Becker, J., Halladay, J. & T. Zigelhoffer. 1994. Is Hsp70 the cellular thermometer? Trends Biochem. Sci. 16:135-140.
21. Crespo, J. L., Powers, T., Fowler, B., & M.N. Hall. 2002. The TOR-controlled transcription activators *GLN3*, *RTG1*, and *RTG3* are regulated in response to intracellular levels of glutamine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(10):6784-6789.
22. Damak, F., Boy-Marcotte E., Le-Roscouet, D., Guilbaud, R. & M. Jacquet. 1991. *SDC25*, a *CDC25*-like gene which contains a RAS activating domain and is a dispensable gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol 11:202-212.
23. Davidson, J. F., Whyte, B., Bissinger, P.H. & R.H. Schiestl. 1996. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5116-5121.
24. Delaunay, A., Isnard, A.D., & M.B. Toledano. 2000. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. EMBO J. 19(19):5157-66.
25. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., & M. B. Toledano. 2002. A thiol peroxidase is an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox-transducer in gene activation. Cell 111(4):471-81.
26. DeLuna, A., Avendaño, A., Riego, L., & A. Gonzalez. 2001. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. J Biol Chem. 276(47):43775-83.
27. Dichtl, B., Stevens, A., & D. Tollervey. 1997. Lithium toxicity in yeast is due to the inhibition of RNA processing enzymes. EMBO J. 16(23):7184-95.
28. Dihazi H, Kessler, R., & K. Eschrich. 2003. Glucose-induced stimulation of the Ras-cAMP pathway in yeast leads to multiple phosphorylations and activation of 6-phosphofructo-2-kinase. Biochemistry 42(20):6275-82.
29. Estruch, F. 2000. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. FEMS Microbiol Rev. 24:469-486.
30. Fedor-Chaikin, M., Deschenes, R.J. & J.R. Broach. 1990. *SVR2*, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase. Cell 61:329-340.
31. Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C. & K. Struhl. 1997. Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. Mol. Cell Biol. 17:6982-6993.
32. Flattery-O'Brien, J., Grant, C.M. & I.W. Dawes. 1997. Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *SOD2* gene is dependent on the additive effects of *HAP2/3/4/5*- and *STRE* binding elements. Mol. Microbiol. 23:303-312.
33. Furst, P., Hu, S., Hackett, R. & D. Hamer. 1988. Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. Cell 55:705-717.
34. Garay-Arroyo, A., Lledias, F., Hansberg, W., & A.A. Covarrubias. 2003. Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmotic stress. FEBS Lett. 539(1-3):68-72.
35. Garcíadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R., & A. Rodríguez-Navarro. 1993. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet 236:363-368.
36. Garreau, H., Hasan, R.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., & M. Jacquet. 2000. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 146:2113-20.
37. Garrido, E., & C.M. Grant. 2002. Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. Mol Microbiol. 43(4):993-1003.
38. Gasch, A., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., & P.O. Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell. 11(12):4241-4257.
39. Gaxiola, R.A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S.L., & G.R. Fink. 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, At-Nhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(4):1480-5.
40. Geymonat, M., Wang, L., Garreau, H. & M. Jacquet. 1998. Ssa1p chaperone interacts with the guanine exchange factor of ras Cdc25p and controls the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 30:855-864.
41. Görner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H. & C. Schüller. 1998. Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. Genes Dev. 12:586-597.
42. Gralla, E. & J.S. Vallentine. 1991. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu, Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. J. Bacteriol. 173:5918-5920.
43. Grey, M. & M. Brendel. 1994. Overexpression of the *SNQ3/YAP1* gene confers hyperresistance to nitrosoguanidine in *Saccharomyces cerevisiae* via a glutathione-independent mechanism. Curr. Genet. 25:469-471.
44. Griffioen, G., Anghileri, P., Imre E., Baroni, M.D. & H. Ruis. 2000. Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 275:1449-1456.
45. Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, A., Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M.D., & R. Ruis. 2001. Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. Mol. Cell Biol. 21:511-523.
46. Griffioen, G., & J.M. Thevelein. 2002. Molecular mechanisms controlling the localization of protein kinase A. Curr Genet. 41(4):199-207.
47. Gross, E., Goldberg, D. & A. Levitzki. 1992. Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc25p in response to glucose results in its dissociation from Ras. Nature 360:762-765.
48. Halliwell, B. & M.C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. London, Oxford University Press.
49. Hamer, D. 1986. Metallothionein. Ann. Rev. Biochem 55:913-951.
50. Hardy, J. A., Walsh, S.T. & H.C. Nelson. 2000. Role of an alpha-helical bulge in the yeast heat shock transcription factor. J Mol Biol. 295(3):393-409.
51. Hinnebusch, A., & K. Natarajan. 2002. Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. Eukaryot Cell. 1(1):22-32.
52. Hohmann, S. & W. Mager. 1997. Shaping up: The responses of yeast to osmotic stress. Yeast stress responses. S. Hohmann and W. Mager. U.S.A., Chapman & Hall:101-146.
53. Hohmann, S. 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces*

- cerevisiae*. Yeast stress responses. S. Hohmann and W. Mager. Germany, Springer:121-200.
54. Holst, B., Lunde, C., Lages, F., Oliveira, R., Lucas, C., & M.C. Kieland-Brandt. 2000. *GUP1* and its close homologue *GUP2*, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 37(1):108-24.
  55. Hon, T., Hach, A., Lee, H. C., Cheng, T., & L. Zhang. 2000. Functional analysis of heme regulatory elements of the transcriptional activator Hap1. *Biochem Biophys Res Commun.* 273(2):584-91.
  56. Iida, H. & I. Yahara. 1984. A heat shock-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth. *J. Cell. Biol.* 99:1441-1450.
  57. Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., & A. Kimura. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 274(38):27002-9.
  58. Inouye S, K. K., Izu H, Fujimoto M, Sugahara K, Yamada S, Shin-kai Y, Oka Y, Katoh Y, & A. Nakai. 2003. Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol. Cel. Biol.* 23(16):5882-95.
  59. Jacobsen, B. & H.R. Pelham. 1988. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 8:5040-5042.
  60. Jamieson, D., Rivers, S.L. & D.W.S. Stephen. 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology.* 140:3277-3283.
  61. Juhnke, J., Krems, B., Kotter, P. & K.D. Entian. 1996. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol. Gen. Genet* 252:456-464.
  62. Jungmann, J., Reins, H.A., Lee, J., Romeo, A.R., Kosman, D. & S. Jentsch. 1993. *MAC1*, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors and is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* 12:5051-5056.
  63. Kim, S., Huh, Wk., Kim, J.Y., Huang, S.W. & S.O. Kang. 1996. D-arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1297:1-8.
  64. Kingston R. E, Schuetz. T., & Z. Larin. 1987. Heat-inducible human factor that binds to a human hsp70 promoter. *Mol Cell Biol.* 7(4):1530-4.
  65. Kobayashi, N. & K McEntee. 1990. Evidence for heat shock transcription factor-independent mechanism for heat shock induction of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6550-6554.
  66. Kobayashi, N. & K McEntee. 1993. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13:248-256.
  67. Kraakman, L., Lemarie, K., Ma, P., Teunissen, A.W.R.H., Donaton, M.C.V., VanDijck, P. Winderickx, J., de Winde, J.H., & J.M. Thevelein., 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol* 32:1002-1012.
  68. Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L., & S. Lindquist. 1986. An ancient developmental induction: heat shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* 231:1154-1157.
  69. Larcher, W. 1995. *Physiological Plant Ecology.* Berlin, Springer-Verlag.
  70. Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P., & L. Adler. 1993. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 10(5):1101-11.
  71. Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., & J.S. Fassler. 1998. The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17(23):6952-62.
  72. Li, S., Dean, S., Li, Z., Horecka, J., Deschenes, R.J., & J.S. Fassler. 2002. The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates *OCHI* via the transcription factor, Skn7p. *Mol Biol Cell.* 13(2):412-24.
  73. Lindquist, S. 1992. Heat shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:748-755.
  74. Liu, X. D. & D.J. Thielle. 1996. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* 10:592-603.
  75. Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. & C.M. Grant. 1998. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 9:1081-1091.
  76. Luyten, K., Alvertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., & S. Hohmann. 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 14(7):1360-71.
  77. Ma, P., Wera, S., Van Dick, P. & J.M. Thevelein. 1999. The *PDE1* encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signalling. *Mol. Biol. Cell.* 10:91-104.
  78. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., & H. Saito. 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369(6477):242-5.
  79. Maeda, T., Takekawa, M., & H. Saito. 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269(5223):554-8.
  80. Mager W.H., & A.J. De Kruijff. 1995. Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* 59(3):506-31.
  81. Marchler, G., Schuller, C., Adam, G., & H. Ruis. 1993. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J* 12(5):1997-2003.
  82. Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & F. Estruch. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (*STRE*). *EMBO J.* 15:2227-2235.
  83. Márquez, J. A., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., & R. Serrano. 1998. The Ssn6-Tup1 repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and -independent genes. *EMBO J.* 17(9):2543-2553.
  84. Moskvina, E. Schüller, C., Maurer, C.T., Mager, W.H. & H. Ruis. 1998. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* 14:1041-1050.
  85. Moye-Rowley WS. 2002. Transcription factors regulating the response to oxidative stress in yeast. *Antioxid Redox Signal.* 4(1):123-40.
  86. Muller, E. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 266:9194-9202.
  87. Murguía, J.R., Belles, J.M., & R. Serrano. 1996. The yeast HAL2 nucleotidase is an *in vivo* target of salt toxicity. *J Biol Chem.* 271(46):29029-33.
  88. Pahlman, A., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S., & L. Adler. 2001. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 276(5):3555-63.
  89. Park, S.K., Cha, M.K., Jeong, W., & I.H. Kim. 2000. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275(8):5723-5732.
  90. Pascual-Ahuir, A., Posas, F., Serrano, R., & M. Proft. 2001a. Multiple levels of control regulate the yeast cAMP-response element-binding protein repressor Sko1p in response to stress. *J Biol Chem.* 276(40):37373-8.

91. Pascual-Ahuir, A., Serrano, R., & M. Proft. 2001b. The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21(1):16-25.
92. Pawson, T., & J.D. Scott. 1997. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* 278(5346):2075-80.
93. Peteranderl, R. & H.C. Nelsson. 1992. Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry* 31(48):12272-6.
94. Piper, P. 1997. The Heat Shock response. Helderberg, Springer-Verlag.
95. Portela, P., Howell, S., Moreno, S., & S. Rossi. 2002. In vivo and in vitro Phosphorylation of Two Isoforms of Yeast Pyruvate Kinase by Protein Kinase A. *Journal of Biological Chemistry* 277(34):30477-30487.
96. Posas, F., Camps, M., & J. Arino. 1995. The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol Chem.* 270(22):13036-41.
97. Prior, C., Potier, S., Souciet, J.L., & H. Sychrova. 1996. Characterization of the *NHA1* gene encoding a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 387(1):89-93.
98. Proft, M., & R. Serrano. 1999. Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol.* 19(1):537-46.
99. Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., & F. Posas. 2001. Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J.* 20(5):1123-33.
100. Proft, M. & Struhl, K. 2002. Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell.* 9(6):1307-17.
101. Raitt, D., Posas, F., & H. Saito. 2000. Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* 19(17):4623-31.
102. Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A., & C. De Virgilio. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev.* 12:2943-2955.
103. Reiser, V., Salah, S.M., Ammerer, G. 2000. Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol.* 2(9):620-7.
104. Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G. & H. Ruis. 1999. Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Mol Cell Biol* 19(8):5474-5485.
105. Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., & S. Hohmann. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275(12):8290-300.
106. Rohde, J., Heitman, J., & M.E. Cardenas. 2001. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* 276(13):9583-6.
107. Ruis, H. & B. Hamilton. 1992. Regulation of yeast catalase genes. In *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, CSH Press:153-172.
108. Ruis, H. & C. Schüller. 1995. Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17:959-966.
109. Sánchez, Y. & S. Lindquist. 1990. *HSP104* is required for induced thermotolerance. *Science* 248:1112-1115.
110. Santoro, N., Johansson, N. and D.J. Thiele. 1998. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 18:6340-6352.
111. Schnell, N., Krems, B. & K.D. Entian. 1992. The *PARI (YAP1/SNQ3)* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-Jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr. Genet.* 21:269-273.
112. Serrano, R. 1996. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int. Rev. of Cyt.* 165:1-52.
113. Shi, Y., Mosser, D.D. & R.I. Morimoto. 1998. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12(5):654-66.
114. Singer M.A. & S. Lindquist. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16(11):460-8.
115. Slekar, K., Kosman, D.J. & V.C. Culotta. 1996. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *J. Biol. Chem.* 271:28831-28836.
116. Smith, B. J. & M.P. Yafee. 1991. Uncoupling thermotolerance from the induction of heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(24):11091-4.
117. Smith, R., & A.D. Johnson. 2000. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 25(7):325-30.
118. Sorger P., K. & H.C. Nelson. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59(5):807-13.
119. Sorger, P. K. 1990. Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* 62(4):793-805.
120. Sorger, P.K. 1991. Heat shock factor and heat shock response. *Cell* 65:363-366
121. Storz, G., Christman, M.F., Sies, H. & B.N. Ames. 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl Acad. Sci* 84:8917-8921.
122. Sutherland, F., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B.A., & S.G. Kilian. 1997. Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 179(24):7790-5.
123. Tamas, M., Rep, M., Thevelein, J.M., & S. Hohmann. 2000. Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* 472(1):159-65.
124. Tanaka, K., Matsumoto K. & A. Toh-e. 1989. Ira1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* 9:757-768.
125. Tao, W., Deschenes, R.J., & J.S. Fassler. 1999. Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. *J Biol Chem.* 274(1):360-367.
126. Tatchell, K. 1993. RAS genes in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. San Diego, Academic Press.
127. Thevelein, J. M. 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast* 10:109-130.
128. Thevelein, J. M., & de J.H. Winde. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 33(5): 904-918.
129. Thevelein, J. M., Cauwenberg, L., Colombo, S., De Winde, J. H., Donation, M., Dumortier, F., Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Nauwelaers, D., Rolland, F., Teunissen, A., Van Dijck, P., Versele, M., Wera, S. & J. Winderickx. 2000. Nutrient-induced signal transduction through the protein kinase A pathway and its role in the control of metabolism, stress resistance and growth in yeast. *Enzyme and Microbial Technology* 26:819-825.
130. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McBullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G. & M. Wigler. 1987a. Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 7:1371-1377.
131. Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. & P. Wigler. 1987b. Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50:277-287.
132. Tortora J. G., F., R.B., & L.C. Case. 1986. Microbiology. Menlo Park, CA, USA, Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.

133. Treger, J. M., Schmitt, A.P., Simon, J.R. & K. McEntee. 1998a. Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273:26875-26879.
134. Treger, J. M., Magee, T.R., & K. McEntee. 1998b. Functional analysis of the stress response element and its role on the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:13-19.
135. Vilela, C., Linz, B., Rodrigues-Pousada, C., & J.E. McCarthy. 1998. The yeast transcription factor genes *YAP1* and *YAP2* are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. *Nucleic Acids Res.* 26(5):1150-9.
136. Vuister, G., Kim, S.J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C., & A. Bax. 1994. Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nat Struct Biol.* 1(9):605-14.
137. Wadskog, I. & L. Adler. 2003. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. *En Yeast Stress Responses*. Ed. Hohmann, S. and Mager W.H. 201-440 pp.
138. Weiser, R., Adam, G., Wagner, A., Schüller, C., Marchler, G., Ruis, H., Krewiec, Z. & T Bilinski. 1991. Heat shock factor-independent heat control of transcription of the *CTT1* gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol Chem* 266: 12406-12411.
139. Werner-Washburne, M. B., J., Kosc-Smithers, J. & E.A. Craig. 1989. Yeast *HSP70* RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *Journal of Bacteriology* 171:2680-2688.
140. Werner-Washburne M., B. E., Johnston G.C., & R.A. Singer. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 57:383-401.
141. Westwood, J. T., Clos, J. & C. Wu. 1991. Stress-induced oligomerization of heat shock factor. *Nature* 353:822-827.
142. Wieland, J., Nietsche, A.M., Strayle, J., Steiner, H., & H.K. Rudolph. 1995. The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* 14:3870-3882.
143. Wiederrecht G, S. D., & C.S. Parker. 1988. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54(6):841-53.
144. Wu, A. & W.S. Moye-Rowley. 1994. *GSH1*, which encodes  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell Biol.* 14:5832-5839.
145. Wu, C. 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:441-69.
146. Yancey, P., Clark, M.E., Hand, SC., Bowlus, R.D., & G.N. Somero. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 217(4566):1214-22.
147. Zhao, X., Raitt, D., Burke, P.V., Clewell, A.S., Kwast, K.E. & R.O. Poyton. 1996. Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem* 271:25131-25138.

*Correspondencia:*

**Alejandra A. Covarrubias Robles**

Departamento de Biología Molecular de Plantas.  
Instituto de Biotecnología.  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Av. Universidad 2001, col. Chamilpa  
Cuernavaca 62210, MORELOS, México  
Teléfono: (52) (777) 3 29 16 68  
Fax: (52) (777) 3 13 99 88  
E-mail: crobles@ibt.unam.mx