

ESTUDIO DE LOS GENES
KIFBA1 (Fructosa-1,6-Bisfosfato Aldolasa)
Y *KIND11* (NADH: Ubiquinona Oxidorreductasa)
DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

SILVIA M^a DÍAZ PRADO

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

ESTUDIO DE LOS GENES *KIFBA1* (Fructosa-1,6-Bisfosfato Aldolasa) y *KIND11* (NADH: Ubiquinona Oxidorreductasa) DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*.

Memoria para aspirar al grado de
Doctor en Biología
presentada por

Silvia M^a Díaz Prado

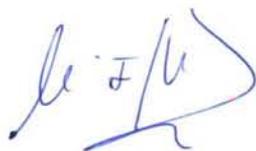
Julio de 2004

Fotografía portada: Aspecto que ofrece al microscopio electrónico un cultivo de células de *Kluyveromyces lactis*.

El presente trabajo: **ESTUDIO DE LOS GENES *KIFBA1* (FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATO ALDOLASA) y *KIND11* (NADH: UBIQUINONA OXIDORREDUCTASA) DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis***, presentado por Dña. Silvia Mª Díaz Prado para aspirar al grado de Doctora en Biología, ha sido realñizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

Revisado el texto, estamos conformes con su presentación para ser juzgado.

A Coruña, 18 de Mayo de 2.004



Dra. Mª Isabel González Siso
Profesora Titular de Bioquímica
y Biología Molecular



Dra. Mª Esperanza Cerdán Villanueva
Catedrática de Bioquímica
y Biología Molecular

La autora de este trabajo ha disfrutado durante su realización de dos becas predoctorales, una de la Universidad de La Coruña de Enero a Septiembre de 2.001 y otra de Formación de Doctores en grupos de Investigación de Excelencia de la Comunidad Autónoma, concedida por la Xunta de Galicia, de Octubre de 2.001 a Marzo de 2.004.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos MCYT (BMC2000-0117), XUGA (PGIDT00PXI10303PR), XUGA (PGIDT01PXI10303PN) y XUGA (XUGA10302A98).

A mis padres y hermanas.
A Mon, Carmen, Marga y Moisés.

Es difícil poder expresar en unas pocas líneas la gran cantidad de agradecimiento y cariño que he ido acumulando a lo largo de estos años en el grupo de Bioquímica. Por ser un grupo de personas unidas por la ciencia, y sobre todo por la amistad y el compañerismo. Por ello quisiera expresar mi más profundo agradecimiento:

A mis directoras de tesis, M^a Isabel González Siso y M^a Esperanza Cerdán Villanueva por su seguimiento a lo largo de este trabajo, por su apoyo constante durante su realización y por permitirme descubrir el gran mundo de la investigación.

A la Universidad de A Coruña por haber disfrutado de una beca predoctoral y a la Xunta de Galicia por haberme concedido la beca de Formación de Doctores en grupos de Investigación.

Al resto de los profesores del área de Bioquímica y Biología Molecular: Ana M^a Rodríguez Torres, M^a Angeles Freire Picos, Esther Rodríguez Belmonte y al único "profe" chico que es capaz de aguantarnos, Manuel Becerra Fernández ¡enhorabuena!

A los que dejaron rastro en el laboratorio de Bioquímica: Elvira Ramil, Belén Tizón, Luís Lombardía, José Luis Cadahía, Mónica González, Mónica Lamas, Alba Piñeiro, Cristina Fernández, Arturo Rodríguez y Gema Ruíz.

A los que actualmente son miembros del laboratorio de Bioquímica: Silvia Seoane (mi compañera de poyata), Laura Núñez, Moisés Blanco, Nuria Tarrío y Cristina Trillo. A Silvia y a Nuria quiero darles las gracias por su buen humor, por compartir conmigo esos bocatas de bacon completo de la cafetería y esas sobremesas que han hecho más llevadera la realización de este trabajo sobre todo los últimos meses. A Laura, mi compañera de mesa de estudio, por ser el ejemplo más claro de orden, limpieza y por tener siempre sembrada en placa esa cepa tan sumamente importante que siempre necesitas a última hora. Quiero hacer una mención muy especial a Moisés, a quien doy mil gracias por estar siempre dispuesto a prestar ayuda y, además, reconozco haber abusado constantemente de sus amplios conocimientos informáticos. ¡Gracias por ayudarme hasta el final!. También quiero darle muchos ánimos a Cris pues cuando menos te des cuenta ya habrás llegado hasta aquí.

A los compañeros de otros laboratorios: Carmen Ganosó, Chus Mourazos y María Paz.

A las mejores técnicas del mundo, Eva Fortuna, Mónica Rey, Rosa Díaz, Inma Brandón y Mary Fraguera. Gracias por todos esos medios, ese material estéril, esas soluciones, etc... porque todos nuestros experimentos comenzaron en vuestras manos. Quiero hacer un agradecimiento especial a Rosa Díaz e Inma Brandón por su ayuda en la secuenciación automática.

A los Servicios Generales de Apoyo a la investigación de la Universidad de A Coruña por la utilización del secuenciador automático, muy especialmente a la Dra. Fernanda Rodríguez (Nani para todos).

A toda mi familia numerosa que, por ser tan numerosa continuaré citando de uno en uno. Empezando por mi gran padre, José Manuel Díaz, el mejor padre del mundo mundial. Quiero darte las gracias por confiar en mí más que yo misma, por enseñarme

que siempre se puede aspirar a más y por estar siempre que se te necesitó. Mi maravillosa madre, M^a Esther Prado, por ser el ejemplo más claro de valentía y como se suele decir coloquialmente hablando “tirar para delante”. Por haber cuidado tanto de nosotras. Gracias por comprendernos y por ser como una hermana y una madre al mismo tiempo. A mi hermana la mayor, M^a Luz Díaz (Lula), por ser el ejemplo más claro de esfuerzo, de sacrificio, por ser tan ordenada, tan apañada, que en estos momentos sufrimos juntas el tan esperado parto de la tesis doctoral, ánimo que cuando menos nos demos cuenta ya seremos doctoras. A mi hermana la segunda, M^a Esther Díaz (Maris) que, además de ser mi hermana tiene el grandioso privilegio de ser mi madrina. Gracias por ese apoyo constante (por no decir diario), gracias por comprenderme, por esas charlas a altas horas de la madrugada en cama o en la ventana de tu habitación, mucho ánimo para esa oposición ya sabes que quien la sigue la consigue y nosotros estamos a punto de conseguirlo. A mi hermana la tercera, Noelia M^a Díaz (Tati), quiero darte las gracias por ser mi hermana no gemela, por ser mi clon, mejor dicho, por dejarme que sea tu clon. A mi novio, José Ramón Souto (Mon para los amigos y Mochi para mí). Gracias por haberte interesado en mí, por ser el ejemplo más claro de esfuerzo, trabajo, sacrificio, afán de superación y el antiejemlo más claro de orden y limpieza claro está. Gracias por compartir tu vida conmigo, por abrirme tu corazón, por dejarme ser alguien importante en tu vida, por aguantarme en los peores momentos, por estar siempre tanto en lo bueno como en lo malo, por esas concentraciones moteras, por la mejor casa con la que podría soñar en “Cullerguai”, por dejarme ser un miembro más en la familia Souto y en la familia Rey, por permitirme el lujo de poder presumir de la mejor suegra. Gracias. A mi suegra, Dña. Carmen Rey, por ser la mejor suegra y madre al mismo tiempo. Gracias por considerarme como una segunda hija para ti, por cuidar siempre de mí, por preocuparte de que nunca me faltase nada y como no, por esos jueves. A mi suegro, que en paz descansa, por haber sabido elegir a la mejor mujer del mundo, por sus historias de la vespino camino de Culleredo, por haber traído al mejor inquilino de cuatro patas (Pastor) a Cullerguai, no te doy las gracias por haberme dejado tan poco tiempo para conocerte.

Quiero dar también las gracias a otro miembro de la familia: a Marga, por saber ser una amiga, una madre y por estar siempre ahí cuando te necesitaba.

A las tres mosqueteras Iglesias: María, Maribel y Aurora. Gracias por vuestra acogida y compañerismo.

Y como no, no por ser el último se merece menor atención, quiero dedicarle este párrafo a mi mejor compañero, mejor amigo y como no, a mi mejor amante: mi amante Bandido.

En fin, a todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS

A: absorbancia.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADP: adenosín-difosfato.

ALA "*5-aminolævulinic acid*": ácido 5-aminolevulínico.

AMP: adenosín-monofosfato.

amp^r: resistencia a la ampicilina.

AOD: oxidasa alternativa.

APS: persulfato amónico.

ARN: ácido ribonucleico.

ATG: metionina, codón de inicio de la traducción.

ATP: adenosín-trifosfato.

BSA: seroalbúmina bovina.

C⁷dGTP: 7-deaza desoxiguanosín-trifosfato.

cADN: ácido desoxirribonucleico complementario.

CIA: cloroformo- alcohol isoamílico.

cm: centímetro.

cm²: centímetros cuadrados.

CoA: coenzima A.

C-terminal: carboxilo-terminal.

D.O.: densidad óptica.

D.S.: desviación estándar.

Da: daltons.

DAP: dihidroxiacetona fosfato.

dATP: desoxiadenosín-trifosfato.

DBO: demanda biológica de oxígeno.

DCbyPCR "*Discriminating clusters by PCR*": PCR por discriminación de grupos.

dCTP: desoxicitosín-trifosfato.

ddATP: didesoxiadenosín-trifosfato.

ddCTP: didesoxicitosín-trifosfato.

ddGTP: didesoxiguanosín-trifosfato.

ddNTPs: didesoxirribonucleótidos trifosfato.

ddTTP: didesoxitimidín-trifosfato.

DEPC: dietil pirocarbonato.

dGTP: desoxiguanosín-trifosfato.

DNasa: enzima que degrada en ADN.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

DQO: demanda química de oxígeno.

DTT: ditioneitol.

dTTP: desoxitimidín-trifosfato.

E.E.: error estándar.

E.R.: expresión relativa.

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético.

EGTA: ácido etilenglicol-di-(β-aminoetiléter) tetra-acético.

F-1,6-P₂: fructosa-1,6-bisfosfato.

FAD: dinucleótido de flavina y adenina (forma oxidada).

fg: femptogramo.

g: gramo.

GAP: gliceraldehido-3-fosfato.

GDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

GDP: guanosín-difosfato.

h: hora.

HEPES: ácido (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina-etano-sulfónico).

IPTG: isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.

kb: kilobase.

kDa: kiloDalton.

K_m: constante de Michaelis-Menten.

kV: kilovoltio.

L: litro.

M: molar.

mARN: ácido ribonucleico mensajero.

mBa: milibares.

MCS "Multiple Cloning Site": sitio de clonaje múltiple.

mg: miligramo.

min: minuto.

mJ: milijulios.

mL: mililitro.

mm: milímetro.

mM: milimolar.

MOPS: ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfónico.

mseg: milisegundos.

n: tamaño de muestra.

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosforilado (forma reducida).

ng: nanogramos.

nm: nanómetro.

nmol: nanomol.

N-terminal: amino-terminal.

°C: grados centígrados.

ONPG: o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido.

ORF "Open Reading Frame": pauta abierta de lectura, secuencia codificadora.

ori: origen de replicación.

pmol: picomol

p.p.m.: partes por millón.

p/v: relación peso/volumen.

pb: pares de bases.

PCIA: fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

PCR "Polymerase Chain Reaction": reacción en cadena de la polimerasa.

PDB "Protein Data Bank": base de datos de proteínas.

PEG: polietilenglicol.

pI: punto isoeléctrico.

Pm: peso molecular.

pmol: picomol.

PMSF: ácido fenilmetilsulfonil fluorhídrico.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

rARN: ácido ribonucleico ribosómico.

RNAsa A: enzima que degrada el ARN.

RSTs "Random Sequenced Tags": etiqueta secuenciada al azar.

SDS: dodecil sulfato sódico.

SDS-PAGE "Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis":
electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

seg: segundos.

TAA: codón de terminación de la traducción.

T[°]A: temperatura ambiente.

TCA cycle: ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina.

tet^r: resistencia a la tetraciclina.

TIM: triosafosfato isomerasa.

T_m: temperatura de fusión (temperatura de *melting*).

U.E.: unidades enzimáticas.

U.V.: ultravioleta.

U: unidades

UAS "*Upstream Activating Sequences*": secuencias activadoras en el promotor de un gen.

v/v: relación volumen/volumen.

V: voltio.

V_f: volumen final.

Wt "*Wild type*": células de tipo salvajes.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

μF: microfaradios.

μg: microgramo.

μL: microlitro.

μm: micrómetro.

μM: micromolar.

μmol: micromol.

Ω: ohmio.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Kluyveromyces lactis</i> como alternativa a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1.1. Problemática del suero de leche	7
1.2. El metabolismo respiro-fermentador de las levaduras	7
1.2.1. El efecto <i>Crabtree</i>	12
1.3. Vías de utilización de los monosacáridos: la Glucólisis y la Ruta de las Pentosas Fosfato	14
1.3.1. Transporte de azúcares	14
1.3.2. Desde azúcar intracelular a triosas fosfato	17
1.3.3. Desde triosas fosfato a piruvato.....	26
1.3.4. Regulación del flujo glucolítico.....	28
1.3.5. Metabolismo del piruvato	30
1.3.6. La Ruta de las Pentosas Fosfato	33
1.4. Oxidación del NADH y producción de energía	35
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. Líneas celulares	59
1.1. Cepas de bacterias <i>Escherichia coli</i>	59
1.2. Cepas de levaduras	59
2. Vectores	61
3. Medios de cultivo	63
3.1. Medios de cultivo para bacterias	63
3.2. Medios de cultivo para levaduras	65
4. Marcadores de tamaño molecular empleados	68
4.1. Marcadores moleculares de ADN.....	68
4.2. Marcadores moleculares de ARN.....	69
4.3. Marcadores moleculares de proteínas.....	69
5. Cebadores empleados	69
6. Técnicas de biología molecular	71
6.1. Obtención de ácidos nucleicos.....	71
6.1.1. Extracción de ADN plasmídico de bacterias	71
6.1.2. Extracción de ADN genómico de levaduras.....	75
6.1.3. Extracción de ARN de levaduras.....	76
6.1.4. Extracción de plásmido de levadura	77
6.2. Medida de la concentración de ácidos nucleicos	81
6.2.1. Medida de la concentración del ADN	81
6.2.2. Medida de la concentración del ARN.....	81
6.3. Modificación enzimática del ADN	81
6.3.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.....	81
6.3.2. Desfosforilación del ADN	82
6.3.3. Ligamiento de fragmentos de ADN.....	82
6.3.4. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	83
6.3.5. Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (<i>PCR</i>).....	84
6.4. Métodos de transformación	87

6.4.1. Transformación de bacterias (<i>Escherichia coli</i>).....	87
6.4.2. Transformación de levaduras.....	90
6.5. Eliminación de plásmidos a partir de células de levadura.....	95
6.6. Replicado de placas (<i>Replica-plating</i>).....	95
6.7. Preparación de extractos proteicos de levaduras.....	95
6.8. Técnicas electroforéticas.....	96
6.8.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	96
6.8.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	98
6.9. Técnicas de secuenciación de ADN.....	99
6.9.1. Preparación de ADN molde.....	99
6.9.2. Secuenciación automática.....	100
6.9.3. Diseño de oligonucleótidos (cebadores) sintéticos.....	102
6.10. Cuantificación del mRNA usando “ <i>Real-Time Reverse- Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ”.....	102
6.11. <i>Northern blot</i>	104
6.11.1. Condiciones de extracción de ARN.....	104
6.11.2. Extracción de ARN de levaduras.....	105
6.11.3. El gel de agarosa.....	105
6.11.4. Las muestras de ARN.....	105
6.11.5. La electroforesis.....	106
6.11.6. La transferencia.....	106
6.11.7. Preparación de las sondas.....	107
6.11.8. Separación y cuantificación de la incorporación de isótopo.....	108
6.11.9. Reacciones de hibridación y lavado.....	108
6.11.10. Cuantificación de los niveles de expresión.....	109
6.12. <i>Southern blot</i>	110
6.12.1. El gel de agarosa.....	110
6.12.2. La electroforesis.....	110
6.12.3. La transferencia.....	110
6.12.4. Preparación de las sondas.....	111
6.12.5. Comprobación del marcaje de las sondas.....	112
6.12.6. Detección inmunológica.....	112
6.12.7. Reacciones de hibridación y lavado.....	112
6.13. Inmunotransferencia (<i>Western blot</i>).....	113
7. Técnicas analíticas.....	114
7.1. Determinación de proteínas de un extracto.....	114
7.2. Determinación de la actividad β -galactosidasa en levaduras.....	114
7.2.1. Determinación cualitativa de la actividad β -galactosidasa.....	115
7.2.2. Determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa.....	115
7.3. Determinación de la lactosa/D-galactosa.....	117
7.4. Determinación de etanol.....	119
7.5. Determinación de glucosa.....	120
7.6. Producción y determinación de la fructosa-1,6-bisfosfato.....	121
7.7. Determinación de la actividad aldolasa.....	124
8. Purificación de proteínas.....	124
9. Crecimiento de cristales mediante el método de la gota colgante.....	125
10. Métodos estadísticos: diseño de planes factoriales.....	126

11. Soporte informático	127
11.1. Análisis de secuencias de ADN.....	128
11.2. Diseño de oligonucleótidos sintéticos.....	128
11.3. Análisis de homologías de secuencias de genes.....	128
11.4. Búsqueda de secuencias consenso de factores transcripcionales.....	129
11.5. Tratamiento de imágenes.....	129
11.6. Análisis estadístico.....	130
11.7. Análisis gráfico.....	130
11.8. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión.....	130
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
1. Clonación de genes a partir de una genoteca empleando la técnica de DCbyPCR	133
2. Estudio del gen <i>FBA1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	139
2.1. Clonación y secuenciación del gen <i>FBA1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	139
2.1.1. Aislamiento de un clon de <i>KIFBA1</i> en la genoteca KEp6 mediante <i>DCbyPCR</i>	144
2.1.2. Digestiones enzimáticas del clon <i>KIFBA1</i> y secuenciación.....	146
2.2. Análisis “ <i>in silico</i> ” de la secuencia.....	148
2.3. Constatación funcional del gen <i>KIFBA1</i>	151
2.3.1. Clonación del gen <i>KIFBA1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> en el vector pUK-S11.....	151
2.3.2. Clonación del gen <i>KIFBA1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> en el vector de expresión pET21d y posterior expresión en <i>Escherichia coli</i>	153
2.4. Localización de las secuencias reguladoras <i>cis</i> dentro de la región promotora del gen <i>FBA1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	160
2.4.1. Fusión del promotor de <i>KIFBA1</i> al gen <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i>	160
2.4.2. Estudios de expresión mediante fusiones al gen <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i>	162
2.5. Expresión transcripcional del gen <i>FBA1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> en condiciones seleccionadas.....	164
2.5.1. Influencia de la fuente de carbono en la expresión del gen <i>KIFBA1</i>	165
2.5.2. Expresión del gen <i>KIFBA1</i> en el mutante <i>rag2</i>	166
2.5.3. Influencia del calcio en la expresión del gen <i>KIFBA1</i>	168
2.5.4. Influencia de la temperatura en la expresión del gen <i>KIFBA1</i>	169
2.5.5. Influencia de la fase de cultivo en la expresión del gen <i>KIFBA1</i>	170
2.5.6. El gen <i>KIFBA1</i> no se induce por choque térmico, por estrés oxidativo ni por ausencia de aminoácidos.....	171
2.5.7. Regulación del gen <i>KIFBA1</i> por oxígeno/hemo.....	173
2.6. Producción de fructosa-1,6-bisfosfato a partir de lactosa.....	179
2.6.1. Estudio del efecto de los factores medioambientales sobre la secreción de β -galactosidasa por cepas recombinantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en permeado de suero de leche.....	183

2.6.2. Estudio de la producción de fructosa-1,6-bisfosfato por cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinantes a partir de lactosa.....	186
3. Estudio del gen <i>NDII</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	191
3.1. Clonación y secuenciación del gen <i>NDII</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i>	191
3.1.1. Aislamiento de un clon de <i>KINDII</i> en la genoteca KEp6 mediante <i>DCbyPCR</i>	201
3.1.2. Digestiones enzimáticas del clon <i>KINDII</i>	203
3.1.3. Secuenciación de <i>KINDII</i>	204
3.2. Análisis “ <i>in silico</i> ” de la secuencia.....	206
3.3. Constatación funcional de la proteína <i>KINDI1p</i> mediante ensayos de complementación a partir de los mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	211
3.4. Regulación transcripcional de <i>KINDII</i>	215
3.4.1. Regulación transcripcional de <i>KINDII</i> por fuente de carbono	217
3.4.2. La transcripción de <i>KINDII</i> no está regulada por estrés ...	224
5. CONCLUSIONES	227
6. BIBLIOGRAFÍA	233

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Kluyveromyces lactis* como alternativa a *Saccharomyces cerevisiae*

Desde tiempos muy antiguos las levaduras han estado ligadas a la vida cotidiana del hombre; la elaboración del pan, cerveza y vino son buen ejemplo de ello, es por esta causa que las levaduras desempeñan una función muy importante desde el punto de vista técnico e industrial. Aunque existen en la naturaleza muchos géneros y especies de levadura, las más utilizadas industrialmente son cepas de *S. cerevisiae*. La fabricación de bebidas alcohólicas estaba ya establecida en las primeras civilizaciones, la mayoría de las cuales tenían mitos acerca del origen de hacer vino, que atribuían a una revelación divina. El uso de la levadura como agente para fermentar el pan tuvo su origen en Egipto, hace unos 6.000 años y fue extendiéndose lentamente desde allí al resto del mundo occidental.

En la actualidad las levaduras, además de servir como modelo eucariota en investigación básica y biomédica, constituyen los microorganismos de elección en muchas industrias de biotecnología, no sólo en procesos clásicos relacionados con la producción de biomasa, etanol y otros productos de interés sino también, gracias al desarrollo más reciente de herramientas específicas de ingeniería genética, para la obtención de proteínas de otros organismos eucariotas superiores, de gran utilización en las industrias farmacéutica y alimentaria. Entre los numerosos ejemplos de proteínas recombinantes producidas por levaduras tenemos hormonas como la insulina, proteínas séricas y un gran número de proteínas de uso terapéutico.

Las levaduras presentan una serie de características favorables (Buckholz y Gleeson, 1991) para la producción de proteínas heterólogas: por una parte, al ser microorganismos unicelulares, presentan las ventajas de los sistemas bacterianos en cuanto a la facilidad de su manipulación y rapidez de crecimiento; por otra, presentan una organización subcelular eucariótica capaz de llevar a cabo los procesos de modificación post-traducciona l de muchas proteínas de mamíferos. Además, las levaduras se han utilizado durante siglos y sus propiedades de crecimiento y metabolismo han sido muy bien estudiadas.

Este papel predominante de las levaduras en biotecnología deriva en parte de la capacidad mostrada de crecer sobre materiales residuales, con las consiguientes implicaciones económicas y ambientales derivadas de este hecho ya que, por una parte,

se reciclan estos residuos disminuyendo su impacto contaminante y, por otra, se reduce el coste de los medios de cultivo.

La mayor parte de las proteínas recombinantes producidas por levaduras se han expresado usando *S. cerevisiae* como sistema hospedador. La elección de este microorganismo se basa no sólo en su familiaridad para los biólogos moleculares y en los conocimientos adquiridos durante años de su genética y fisiología sino también en su consideración como organismo GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (Schaffrath y Breunig, 2000) permitiendo su uso en la industria alimentaria. Por el contrario, la bacteria a partir de la cual se obtuvieron las primeras proteínas heterólogas, *E. coli*, no es considerado un organismo GRAS. La expresión de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae* fue descrita por primera vez en 1981 y la primera vacuna de ingeniería genética que fue autorizada para su administración a humanos, el antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg), se produjo en este organismo.

Sin embargo, *S. cerevisiae* presenta ciertas limitaciones como hospedador para la expresión de proteínas heterólogas (Buckholz y Gleeson, 1991; Müller *et al.*, 1998): las producciones son generalmente bajas, los rendimientos de proteínas heterólogas alcanzan un máximo de 1-5% de la proteína total, incluso utilizando promotores fuertes; también debido a la síntesis del producto del gen clonado se produce un estrés adicional en las células; además, la estabilidad plasmídica es baja, reduciendo el crecimiento y la productividad; y por último, se produce una considerable hiperglicosilación de las proteínas secretadas, generando propiedades inmunológicas inadecuadas para usos farmacéuticos (Karine *et al.*, 1994). Esto puede disminuir las velocidades de crecimiento y por tanto se reduce la productividad total. Para minimizar los efectos deletéreos, se emplean con frecuencia los promotores de plásmidos inducibles, pero sin embargo, aún así, la estabilidad del plásmido desciende significativamente, resultando un sistema de expresión que puede ser difícil aumentar a escala de volúmenes de producción.

Aunque la levadura por excelencia es *S. cerevisiae*, protagonista de las industrias tradicionales de fermentación, existen una serie de levaduras menos convencionales que recientemente se han convertido en alternativas interesantes. De hecho, estas levaduras están siendo más accesibles para técnicas más modernas de genética molecular. Algunas de ellas muestran ciertas características favorables tales como altos niveles de secreción, promotores fuertes o vectores de alta expresión, ofreciendo ventajas sobre la levadura panadera tradicional (Domínguez *et al.*, 1998). Entre estas levaduras alternativas cabe

destacar *K. lactis*, empleada para la producción de la glucoamilasa de la levadura *Axula adenivorans* y la interleucina-1 β de mamíferos (Morlino *et al.*, 1999), debido a ventajas en la aplicación industrial relacionadas con:

- a) la variedad de fuentes de carbono que *K. lactis* puede utilizar es mayor que en *S. cerevisiae* (Barnett *et al.*, 1990). La lactosa de los sueros de quesería es una de las fuentes de carbono que puede ser metabolizada por *K. lactis* pero no por *S. cerevisiae* (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996; Schaffrath y Breunig, 2000). La lactosa es un subproducto considerado residual y cuyo vertido causa un grave problema medioambiental generalizado a numerosos países. Dos genes, el *LAC4* y el *LAC12* son los responsables del uso de la lactosa. El gen *LAC4* codifica para la enzima β -galactosidasa responsable de escindir el disacárido lactosa en sus monosacáridos componentes, glucosa y galactosa. El gen *LAC12* codifica para una lactosa permeasa, un transportador de lactosa cuya función es controlar la entrada del azúcar en la célula. *S. cerevisiae* carece de β -galactosidasa y de lactosa permeasa, es por ello que no puede utilizar la lactosa y por tanto no puede fermentarla a etanol. Estos dos genes son específicos del metabolismo de la lactosa y su transferencia a *S. cerevisiae* es suficiente para permitirle a los transformantes crecer en un medio con lactosa como fuente de carbono, es decir, estos genes son suficientes para convertir a *S. cerevisiae* en una levadura *lac*⁺ (Sreekrishna y Dickson, 1985). *LAC4* y *LAC12* están fuertemente controlados a nivel transcripcional y son coregulados con los genes *GAL* (Webster y Dickson, 1988), que codifican para enzimas del metabolismo de la galactosa. Esta coregulación es mediada por el activador transcripcional Lac9p o KIGal4p (Breunig, 2000), homólogo a Gal4p de *S. cerevisiae* (Zachariae y Breunig, 1993). La activación de Gal4p por lactosa requiere consumo de lactosa y actividad β -galactosidasa (Breunig *et al.*, 2000).
- b) los rendimientos mostrados en la producción de proteínas recombinantes de secreción, las preferidas en la industria, ya que resulta más fácil purificar las proteínas del medio de cultivo que del interior de las levaduras, son mayores en *K. lactis* que en *S. cerevisiae*. La secreción de proteínas heterólogas en el medio de cultivo puede ser una manera conveniente de obtener grandes cantidades de estas proteínas heterólogas en una forma relativamente pura, sin contaminantes de proteínas celulares y abaratando los costos asociados a la extracción y purificación

de la proteína (Romanos *et al.*, 1992). Algunas proteínas secretadas por *S. cerevisiae* no se encuentran libres en el medio de cultivo, sino que son retenidas en el interior celular o en el espacio periplásmico, entre la membrana plasmática y la pared celular, requiriendo manipulaciones de tipo bioquímico o físico para ser liberadas. Esto puede ocasionar problemas en la purificación conduciendo así a un descenso en el rendimiento del producto purificado.

- c) las diferentes características de su metabolismo respiro-fermentador, que inciden decisivamente en el rendimiento de los procesos.
- d) la accesibilidad genética molecular para poder usar sistemas de vectores integrativos o altamente estables (como son los episomales) se está mejorando en *K. lactis* (Schaffrath y Breunig, 2000).
- e) la regulación metabólica, puesto que en *K. lactis* la represión por glucosa es menor que en *S. cerevisiae*, además, la redundancia de genes glucolíticos que existe en *S. cerevisiae* no aparece en *K. lactis*, por ejemplo en el caso de la hexoquinasa, fosfofructoquinasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y piruvato quinasa (Blaisonneau *et al.*, 1997).
- f) su distancia evolutiva con *S. cerevisiae* permite la comparación de dominios funcionales de genes homólogos.
- g) algunas cepas de *K. lactis* contienen mecanismos nuevos de competición microbiana que consisten en plásmidos de ADN citoplasmático lineal que le confieren el fenotipo *Killer* (Stark *et al.*, 1990; Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996).

Por todo ello en la actualidad, esta levadura es una de las más estudiadas a nivel molecular y metabólico después de *S. cerevisiae*.

1.1.1. Problemática del suero de leche

Se denomina “suero” al líquido remanente tras la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso. Este subproducto representa aproximadamente el 85-90% del volumen de la leche.

Existen en la Comunidad Autónoma de Galicia alrededor de 70 industrias queseras (datos facilitados por la Consellería de Agricultura, Gandería e Montes de la Xunta de Galicia). Sólo tres de ellas superan las 1000 Tm/año de producción mientras que 38 producen menos de 100 Tm/año. Globalmente se puede estimar que se generan unos 180 millones de litros de suero lácteo al año y aproximadamente un 60% de esa producción radica en pequeñas o medianas empresas. Motivados por la necesaria aplicación de tecnologías limpias y por las cada vez más exigentes legislaciones en lo relativo al control de vertidos, estas empresas necesitan y promueven iniciativas para el tratamiento del suero de quesería. A pesar del gran valor nutritivo y aplicaciones tecnológicas de algunos componentes de este subproducto, así como de las numerosas investigaciones realizadas al respecto, en la actualidad, todavía no se ha desarrollado ningún proceso capaz de rentabilizar el tratamiento de las importantes cantidades de suero que se producen y se vierten cada año, representando un importante problema medioambiental debido a su elevada carga orgánica (DQO= 35.000-68.000 p.p.m y DBO=30.000-60.000 p.p.m. según Berruga *et al.*, 1997) de la cual el principal responsable es el disacárido lactosa. Una central quesera que procese 100 Tm de leche por día produce efluentes con aproximadamente la misma carga orgánica que una ciudad de 55.000 habitantes (Sienkiewicz y Riedel, 1990). A pesar de la importancia de su producción a nivel mundial, sólo un 50% es transformado y el resto continúa siendo vertido. Por tanto la búsqueda de nuevas y mejores aplicaciones para este residuo continúa siendo un reto importante. En el presente trabajo se realizó una aproximación a esta problemática utilizando cepas recombinantes de *S. cerevisiae* para el aprovechamiento de la lactosa de los lactosueros.

1.2. El metabolismo respiro-fermentador de las levaduras

Las levaduras forman un grupo bastante heterogéneo en lo referente a su metabolismo respiro-fermentador. Hay especies que prefieren usar las rutas

fermentadoras mientras que otras son respiradoras. Gancedo y Serrano (1989) clasificaron las levaduras, en función de la utilización metabólica del piruvato mostrada durante el crecimiento aerobio en glucosa, en dos grandes grupos:

- a) los aerobios obligados (por ejemplo especies de *Trichosporon* y *Rhodotorula*) poseen un metabolismo exclusivamente oxidativo, todo el piruvato producido se incorpora en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y son incapaces de crecer en ausencia de oxígeno.

- b) los aerobios facultativos, en los cuales la glucosa proporciona la energía necesaria para el crecimiento tanto en condiciones aerobias como anaerobias, es decir, poseen un metabolismo oxidorreductor. Este grupo puede, a su vez, subdividirse en otros dos, las levaduras respiradoras (por ejemplo, especies de *Candida*, *Pichia* y *Kluyveromyces*) en las cuales la fermentación da cuenta de menos del 30% de la glucosa catabolizada aeróbicamente, y las levaduras fermentadoras (por ejemplo, especies de *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Brettanomyces*) en las cuales la respiración representa menos del 10% del catabolismo aerobio de la glucosa.

La respiración y la fermentación pueden coexistir simultáneamente dando lugar al metabolismo respiro-fermentador en el cual una parte del piruvato producido es convertido en CO₂ por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y otra parte es reducido a etanol y otros compuestos (González-Siso *et al.*, 2000). Estas características metabólicas son cruciales a la hora de seleccionar las condiciones de cultivo o la especie de levadura más adecuada para una determinada bioproducción. Por ejemplo, si se desea obtener biomasa de levadura o algún metabolito asociado a su crecimiento, habrá que procurar que el metabolismo sea predominantemente oxidativo evitando que se disipe fuente de carbono hacia la producción de etanol, pues en este caso representaría un metabolito colateral indeseable. Los rendimientos de producción de biomasa son menores durante el crecimiento fermentador que durante el crecimiento respirador. Por el contrario, si se desea producir etanol u otro metabolito via fermentación hay que favorecer el metabolismo oxidorreductor. En la fermentación, los aceptores finales de electrones son sustancias orgánicas (etanol, lactato, etc.) que todavía albergan energía metabólicamente utilizable en sus enlaces y que será por tanto desaprovechada. En la respiración, el aceptor final de electrones es el oxígeno, con un potencial de

oxidorreducción muy negativo; ello posibilita que se sitúe al final de una larga cadena de transporte de electrones, gracias a la cual se consigue extraer toda la energía metabólicamente aprovechable de los catabolitos. Por tanto, con el mismo aporte de fuente de carbono inicial, un organismo que fermenta será capaz de producir menor cantidad de energía metabólica, menor biomasa y menor rendimiento biotecnológico que un organismo que respire.

El metabolismo energético no sólo está influenciado por el fondo genético sino también por condiciones ambientales, tales como aireación, fase de cultivo, limitación de nutrientes, tipo y concentración del azúcar y suministro de oxígeno que prevalecen en un cultivo de levaduras a un tiempo determinado (González-Siso *et al.*, 2000).

Ambas levaduras, *K. lactis* y *S. cerevisiae*, pertenecen al grupo de aerobias facultativas pues muestran la capacidad de metabolizar la glucosa tanto por la vía oxidativa como la oxidorreductora. La diferencia reside en la importancia relativa de estas rutas en condiciones aerobias, *S. cerevisiae* es una levadura fermentadora aerobia y *K. lactis* es una levadura respiradora aerobia.

Entre los factores ambientales que regulan la respiración y la fermentación en levaduras, la glucosa y el oxígeno son los más estudiados. Cuando la concentración de oxígeno en el medio es baja ambas levaduras, *S. cerevisiae* y *K. lactis*, se ven obligadas a fermentar utilizando para ello solamente fuentes de carbono fermentables tales como la glucosa; sin embargo, cuando la concentración de oxígeno no es limitante y en presencia también de fuentes de carbono fermentables, mientras *S. cerevisiae* sigue optando por la fermentación, *K. lactis* pasa a respirar. Si en estas mismas condiciones aeróbicas, a *S. cerevisiae* se le suministran fuentes de carbono no fermentables, tales como glicerol o acetato, utilizará la respiración.

El metabolismo del piruvato es el punto clave que divide el metabolismo fermentador del respirador, pero la expresión de las enzimas del metabolismo del piruvato en levaduras fundamentalmente respiradoras, como *K. lactis*, parece ser regulada de la misma manera que en levaduras fundamentalmente fermentadoras, como *S. cerevisiae*, con la excepción del gen *PDA1*, que codifica para la subunidad E1 α del complejo de la piruvato deshidrogenasa (Zeeman *et al.*, 2000).

La explicación a las diferencias metabólicas existentes entre las dos levaduras, *S. cerevisiae* y *K. lactis*, no es sencilla y parece ser dependiente de múltiples factores. Entre ellos cabe destacar los altos niveles de expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en el proceso de la respiración y sus mecanismos de regulación, la

represión catabólica por fuente de carbono y la importancia relativa de la glucólisis frente a la ruta de las pentosas fosfato como productoras de intermediarios catabólicos que serán procesados con posterioridad vía fermentación o vía respiración (González-Siso *et al.*, 2000).

Con referencia a los altos niveles de expresión de genes relacionados con la función respiradora y sus sistemas de expresión se ha visto que los niveles de ARN mensajero del gen *CYCI*, que codifica para la isoforma más abundante del citocromo c, una proteína integrante de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en cepas de *K. lactis* son mucho más altos que en *S. cerevisiae* (Freire-Picos *et al.*, 1994). Analizando los sistemas de regulación que presenta este gen en ambas levaduras se ha visto que *KICYCI*, con respecto a *ScCYCI*, presenta elementos activadores adicionales como sitios de unión para el factor Abf1p que incrementa la transcripción de este gen. También se han descrito sitios de unión para el factor Cpf1p que dan lugar a un incremento en los niveles de expresión de *KIQCR7* y *KIQCR8*, que codifican respectivamente para las subunidades VII y VIII del complejo mitocondrial bc1 (Mulder *et al.*, 1994a y 1994b). Finalmente otro mecanismo que puede contribuir al incremento en los niveles de expresión de estos genes es el aumento de la estabilidad de los ARNs mensajeros. Puede especularse que la mayor longitud de los transcritos en *K. lactis* pueda contribuir a la estabilidad de los mismos.

Con respecto a la represión catabólica por glucosa (fuente de carbono fermentable) de los genes relacionados con funciones respiradoras, se ha visto que este fenómeno es muy importante en *S. cerevisiae*. En *K. lactis* se demostró que los niveles de expresión de estos genes en glucosa eran algo menores que los que presentaban en fuente de carbono no fermentable (Freire-Picos *et al.*, 1995; Zaror *et al.*, 1993; Lodi *et al.*, 1998) y que la inducción por fuente de carbono no fermentable sólo tiene lugar en ausencia total de glucosa y, una vez establecida esta inducción, la glucosa añadida no tiene ningún efecto represor sobre el sistema, al contrario que en *S. cerevisiae* (Mulder *et al.*, 1995). Por tanto se concluye que aunque los elementos de represión por glucosa e inducción en fuente de carbono no fermentable están conservados entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*, los mecanismos de acción de estos elementos en ambas levaduras son muy distintos. Este hecho, unido a la posible existencia de diferentes factores reguladores de la transcripción, contribuye a la manifestación de dos patrones metabólicos distintos en *K. lactis* frente a *S. cerevisiae*.

Las diferencias entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* no sólo se limitan a la actividad transcripcional de genes que codifican para proteínas implicadas en la función respiradora; otro punto discordante es el uso de la ruta de las pentosas fosfato como mecanismo auxiliar a la glucólisis para la consecución de los intermediarios catabólicos de tres carbonos. Para demostrarlo, se han obtenido los mutantes para la fosfoglucoisomerasa (que cataliza el segundo paso de la glucólisis, la conversión de glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato) en *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Estos mutantes para crecer en glucosa deberán utilizar la ruta de las pentosas fosfato como alternativa a la glucólisis que tienen bloqueada. Sin embargo, el mutante de *S. cerevisiae* fue incapaz de crecer en glucosa, lo que pone de manifiesto una ruta de las pentosas fosfato muy poco activa en esta especie, en claro contraste con lo que ocurre en *K. lactis* donde la glucosa es metabolizada vía ruta de las pentosas fosfato y el mutante puede crecer (Maitra *et al.*, 1971; Jacoby *et al.*, 1993). Se ha propuesto que la alta capacidad respiradora de *K. lactis* sirve para el mantenimiento de una ruta de las pentosas fosfato operativa y se ha podido constatar que los niveles de ARN mensajero de *KICYC1* en un mutante *rag2* (gen que codifica para la fosfoglucoisomerasa en *K. lactis*) son más altos cuando crece en glucosa que cuando crece en fructosa; cuando el mutante crece en fructosa no se usa la ruta de las pentosas fosfato, ya que la fructosa puede entrar en la vía glucolítica justo después del paso bloqueado por la mutación; sin embargo, cuando el mutante crece en glucosa, se ve obligado a utilizar la ruta de las pentosas fosfato para poder sobrevivir (González-Siso *et al.*, 1996a). En el transcurso de la ruta de las pentosas fosfato se produce NADPH que necesita ser reoxidado a NADP debido a que la cantidad de NADP/NADPH en la célula es constante y si se está consumiendo NADP sin su regeneración se corre el riesgo del agotamiento del mismo, con el consiguiente bloqueo de la ruta de las pentosas fosfato y la muerte celular. Los datos de expresión del gen *KICYC1* indican que la cadena respiratoria, bien directamente o a través de un sistema lanzadera (pues la ruta de las pentosas fosfato se produce en el citoplasma y la cadena respiratoria se localiza en la mitocondria) está implicada en la reoxidación del NADPH a NADP y en el mantenimiento de una ruta de las pentosas fosfato operativa (González-Siso *et al.*, 1996a).

1.2.1. El efecto *Crabtree*

La fermentación, bajo condiciones totalmente aerobias se conoce como el “efecto *Crabtree*”. El efecto *Crabtree* constituye el fenómeno clave de la regulación del metabolismo respiro-fermentador de las levaduras. Se contraponen al “efecto *Pasteur*” que se manifiesta por una disminución de la fermentación en presencia de oxígeno, o lo que es lo mismo, una inhibición de la fermentación por la respiración. Por condiciones totalmente oxidativas se entiende que los niveles de oxígeno disuelto en cualquier punto del fermentador están por encima de la concentración crítica, es decir, aquella a la cual se satura el sistema de consumo de oxígeno de la célula (Alexander y Jeffries, 1990).

Inicialmente se asumía que cuando una levadura producía etanol en condiciones aerobias era *Crabtree*-positiva, y esto implicaba que existía una represión de la respiración por la glucólisis. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la fermentación aerobia es debida a la limitación de la capacidad respiradora inherente a algunas levaduras y no a una represión específica de la respiración. En la actualidad el término efecto *Crabtree* se reserva para aquellos casos en los que tiene lugar represión de la respiración, por ello, una levadura *Crabtree*-positiva es necesariamente fermentadora-aerobia, pero el hecho de que una levadura fermente en condiciones aerobias no implica necesariamente que sea *Crabtree*-positiva. Algunos autores diferencian, además, entre el efecto *Crabtree* denominado *long-term* y el denominado *short-term*. El primero se define como la presencia de fermentación alcohólica aerobia a elevadas velocidades de crecimiento en cultivos con limitación de azúcar. El segundo se refiere a la producción instantánea de etanol observada después de exponer los cultivos aerobios respiradores a un exceso de glucosa (González-Siso, 1999).

En el caso de *S. cerevisiae*, levadura prototipo *Crabtree*-positiva, si se cultiva en continuo con glucosa a una tasa de dilución baja, la levadura muestra un metabolismo completamente respirador (González-Siso *et al.*, 2000).

Estudios del metabolismo del piruvato en *K. lactis* demostraron que un mutante en el cual se bloqueaba la piruvato deshidrogenasa por una mutación en el gen *PDA1*, que codifica para la subunidad mayor, revertía fenotípicamente en *Crabtree*-positivo. Este resultado indicó que *K. lactis* es capaz de producir etanol bajo condiciones aerobias. Es obvio que en la cepa salvaje la actividad *Pdh* permite dirigir todo el piruvato de la glucólisis al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (*TCA*) convirtiéndolo en acetyl-CoA, y sólo cuando este paso se bloquea la enzima alternativa piruvato

descarboxilasa convierte el piruvato en acetaldehído y etanol (Zeeman *et al.*, 1998; Kiers *et al.*, 1998). Además, el etanol producido al final, será asimilado eficientemente debido a la presencia de una alcohol deshidrogenasa inducida por etanol en *K. lactis* (Mazzoni *et al.*, 1992).

Las levaduras *Crabtree*-positivas tales como por ejemplo *S. cerevisiae* producen etanol bajo condiciones aerobias reduciendo de esta manera la producción de biomasa y ATP en comparación con las levaduras *Crabtree*-negativas. La formación de etanol se puede evitar mediante el cultivo en una fuente de carbono limitante, pero esto generalmente resulta en un crecimiento específico y unas tasas de síntesis bajas (Schaffrath y Breunig, 2000; Breunig *et al.*, 2000).

Las características enunciadas en el modelo de Alexander y Jeffries (1990) para la clasificación de las levaduras en *Crabtree*-positivas o negativas no siempre se cumplen, de hecho, dentro de la misma especie existen cepas con comportamientos metabólicos diferenciados a este respecto. González-Siso *et al.* (1996b) realizaron un trabajo con la cepa NRRL-Y1140 de *K. lactis* creciendo en fuentes de carbono fermentables y no fermentables y observaron que la capacidad respiradora de esta levadura era más eficiente que la de *S. cerevisiae* y, además, que bajo condiciones de limitación de oxígeno ambas especies podían alcanzar niveles similares de fermentación y de crecimiento anaerobio. También realizaron cultivos continuos de *K. lactis* en condiciones totalmente oxidativas y observaron que al ir aumentando la tasa de dilución se producía un aumento en las tasas de consumo de O₂ y de glucosa típico de una levadura respiradora *Crabtree*-negativa. Además, observaron ciertos niveles de fermentación residual que aumentaban al aumentar la concentración de sustrato, aún cuando la capacidad respiradora no estaba saturada, pues la tasa de consumo de oxígeno seguía aumentando. En *S. cerevisiae*, el consumo de O₂ aumenta linealmente con la tasa de dilución hasta que alcanza un valor crítico a partir del cual el consumo de oxígeno no aumenta y se produce etanol. Esto significa que la capacidad respiradora se satura y parte de la fuente de carbono es parcialmente desviada hacia la producción de etanol. En las levaduras aerobias obligadas, el aumento en la tasa de dilución está acompañado de un incremento lineal en el consumo de O₂ sin producción de etanol. Esta capacidad respiradora ilimitada se observa también en algunos aerobios facultativos como por ejemplo *K. lactis* entre otros (González-Siso *et al.*, 1996b).

1.3. Vías de utilización de los monosacáridos: la Glucólisis y la Ruta de las Pentosas Fosfato

La mayoría de las levaduras emplean azúcares como la principal fuente de carbono y energía. Los sustratos que pueden ser respirados por las levaduras incluyen: pentosas, alcoholes que provienen de azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes alifáticos, hidrocarburos y compuestos aromáticos. La glucólisis es una vía casi universal de los seres vivos que sirve para la obtención de energía metabólica. La glucólisis es la secuencia de reacciones oxidativas que convierte la glucosa en piruvato en el citoplasma de las levaduras, con la producción de ATP (figura II). El estudio de la glucólisis en levaduras por científicos pioneros a principios del siglo XIX, promovió el nacimiento de la bioquímica como una nueva disciplina científica.

El flujo glucolítico está regulado por mecanismos de retroinhibición complejos que permiten alcanzar un nivel intracelular constante de ATP permitiendo así que la célula mantenga su homeostasis. Generalmente las enzimas glucolíticas constituyen el 30-60% de la proteína celular (Nakajima *et al.*, 2000). En *S. cerevisiae*, los genes que codifican para enzimas glucolíticas se expresan a niveles altos. De hecho, los promotores de algunos genes glucolíticos se han utilizado para dirigir la expresión a altos niveles de genes heterólogos (Park *et al.*, 1993).

1.3.1. Transporte de azúcares

Las membranas celulares no son permeables a todos los solutos. Por esta razón, el transporte es el primer paso en el metabolismo de los carbohidratos, excepto en aquellos casos en los que el di- o tri-sacárido es hidrolizado fuera de la célula. El transporte a través de la membrana es llevado a cabo por transportadores específicos, a veces denominados permeasas. En *S. cerevisiae* se ha caracterizado una familia de transportadores de glucosa (Flores *et al.*, 2000). La transcripción de los genes que codifican estos transportadores está regulada por la concentración de glucosa en el medio de cultivo (Boles y Hollenberg, 1997; Özcan y Johnston, 1999).

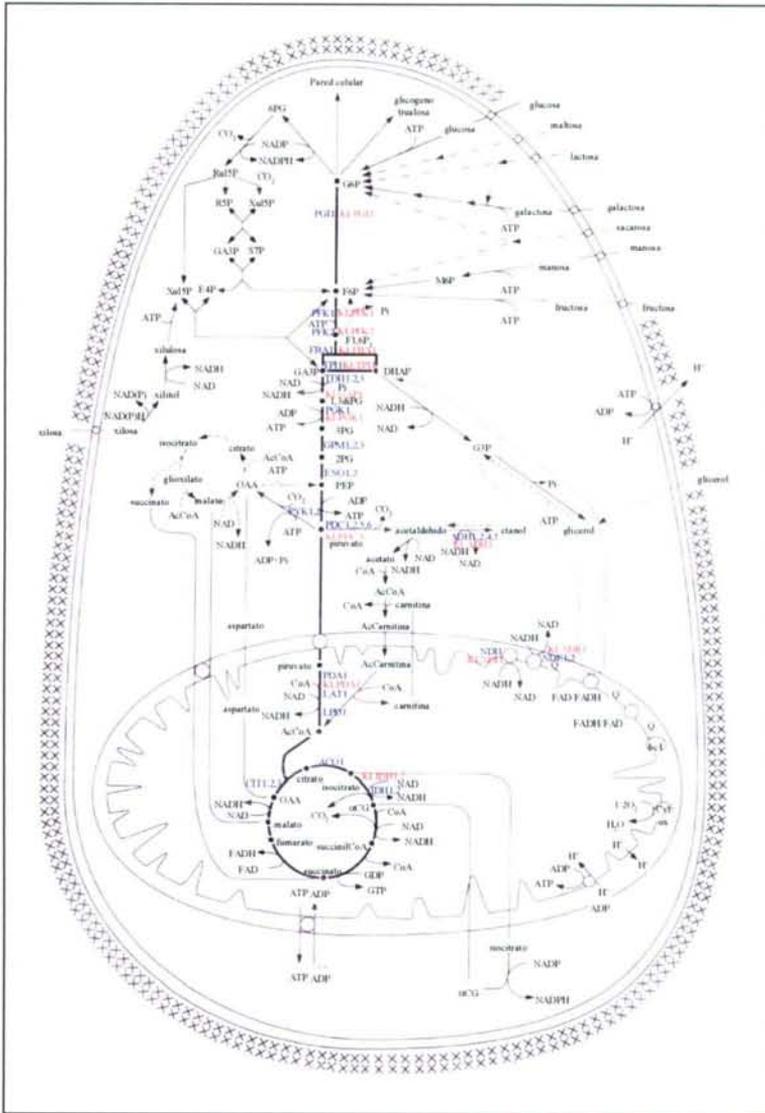


Figura 11: Esquema de las diferentes rutas implicadas en el metabolismo energético y del carbono en levaduras. La figura representa una célula de levadura hipotética. La línea gruesa con puntos negros representa la ruta de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbocílicos. Las líneas discontinuas denotan reacciones que ocurren durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. Las líneas con puntos y rayas discontinuas indican que, dependiendo del género de levadura, algunos de los disacáridos representados podrían ser hidrolizados fuera de la célula o transportados hacia dentro y ser hidrolizados en el citoplasma. Los círculos en las membranas indican sistemas de transporte o proteínas localizadas en estas estructuras. Las líneas que atraviesan la membrana mitocondrial no implican necesariamente que el metabolito correspondiente atraviese esta membrana libremente. No hay más orgánulos dibujados que la mitocondria. Las abreviaturas empleadas para representar la glicólisis son estándar, el resto no son estándar y son las siguientes: 6PG, 6-fosfogluconato; Ru5P, ribulosa 5-fosfato; R5P, ribosa 5-fosfato; Xu5P, xilulosa 5-fosfato; S7P, sedoheptulosa 7-fosfato; E4P, eritrosa 4-fosfato; G3P, glicerol 3-fosfato; Pi, fosfato inorgánico; OAA, oxaloacetato; Q, ubiquinona; bc1, citocromo y Cyt ox, citocromo oxidasa. En azul se representan los genes de *S. cerevisiae* y en rojo los de *K. lactis* que se citan en el presente trabajo. Figura modificada de Flores *et al.* (2000).

El transporte de los monosacáridos más comunes, glucosa, fructosa o manosa, en *S. cerevisiae* es un proceso de difusión facilitada; sin embargo, para otras levaduras puede ser diferente.

En *K. lactis* el transporte de glucosa parece que tiene lugar por difusión facilitada, en esta levadura se han identificado dos genes que codifican para transportadores con diferentes afinidades para la glucosa: *HGT1* que codifica para un transportador de glucosa de alta afinidad y *RAG1* que codifica para un transportador de baja afinidad por la glucosa. La sobre expresión de *HGT1* no restaura el fenotipo salvaje de un mutante *rag1* indicando que *HGT1* y *RAG1* poseen diferentes funciones en el transporte de glucosa. *HGT1* se expresa constitutivamente mientras que *RAG1* está sujeto a regulación transcripcional (Schaffrath y Breunig, 2000).

Las cepas salvajes de *K. lactis* están divididas en dos grupos teniendo en cuenta su diferente sensibilidad a la antimicina A, inhibidor de la cadena respiratoria: los que crecen en glucosa en presencia del inhibidor se llaman *Rag*⁺ (resistencia a antimicina A en glucosa) y los que no crecen se denominan *Rag*⁻. Las cepas salvajes *Rag*⁺ poseen *RAG1* y *HGT1*, mientras que algunas cepas *Rag*⁻ tienen el gen *RAG1* deletado. *RAG1* es inducido por varias hexosas pero esta inducción es lenta. Posiblemente, la limitación de O₂ en cultivos discontinuos de alta densidad contribuya a una inducción plena de este gen. La expresión de *HGT1* no varía con las condiciones de cultivo mientras que la transcripción de *RAG1*, que es indetectable durante el crecimiento en glicerol, aumenta durante el crecimiento en glucosa (Flores *et al.*, 2000). El doble mutante *rag1 hgt1* mostró una gran reducción en los niveles de consumo de glucosa y el crecimiento se detuvo antes que para el caso de la cepa salvaje. Parece, por tanto, que otro sistema alternativo con una baja afinidad por la glucosa es capaz de transportar la glucosa en el doble mutante. En *K. lactis*, *RAG1* es un gen único. Su transcripción está controlada positivamente por los productos de al menos tres genes: *RAG4* (que codifica para el único sensor de glucosa en *K. lactis*), *RAG5* (que codifica para la hexoquinasa en *K. lactis*) y *RAG8* (un gen esencial que codifica para la caseína quinasa I, *CKI*) (Lemaire *et al.*, 2002).

En *K. lactis*, además de *RAG1* y *HGT1*, existen otros dos transportadores de glucosa, el *KHT1* y el *KHT2*. El producto del gen *KHT1* es casi idéntico a *Rag1p* excepto para los dos últimos aminoácidos y su regulación es también muy similar, de hecho, los genes *KHT1* y *KHT2* sustituyen al *RAG1* en algunas especies. El gen *RAG1* procede de una recombinación reciente entre *KHT1* y *KHT2*, *RAG1* es por tanto un gen

quimérico (Weirich *et al.*, 1997; Breunig *et al.*, 2000). Los genes *KHT1* y *KHT2* están muy próximos y se transcriben en *tandem*. Mutaciones en cualquiera de estos dos genes reducen ligeramente la represión por glucosa y la inducción por lactosa, mientras que en el doble mutante, el efecto de la glucosa es completamente suprimido. *KHT1*, *KHT2* y *RAG1* se localizan en el mismo *locus* cromosomal. El hecho de que *KHT1* y *KHT2* sean capaces de complementar el fenotipo *Rag⁻* del mutante *rag1* de *K. lactis* indica que estos genes codifican transportadores funcionales de glucosa. La presencia de *KHT1* y *KHT2* está correlacionada con una alta sensibilidad a la represión por glucosa encontrada en sólo unas pocas cepas de *K. lactis*. Este descubrimiento sugiere que la represión por glucosa en *K. lactis* depende de transportadores de glucosa particulares (Milkowski *et al.*, 2001). *KHT1* es un gen inducido por glucosa que codifica para un transportador de baja afinidad muy similar a *Rag1p*. *Kht2p* posee una regulación más compleja. La transcripción de los genes *KHT1* y *KHT2* es alta en ausencia de glucosa.

1.3.2. Desde azúcar intracelular a triosas fosfato

Las hexosas intracelulares entran en la ruta glucolítica después de un paso de fosforilación (Flores *et al.*, 2000). La glucosa, fructosa y manosa son fosforiladas por hexoquinasas, la glucoquinasa puede fosforilar la glucosa y la manosa mientras que la galactoquinasa fosforila la galactosa. *S. cerevisiae* posee dos hexoquinasas y una glucoquinasa (Entian, 1997); *K. lactis* sólo tiene una hexoquinasa codificada por el gen *RAG5* (Bar *et al.*, 2003). Los mutantes *rag5* de *K. lactis* no sólo son incapaces de crecer en glucosa y fructosa sino también en lactosa (Prior *et al.*, 1993). Mientras que los niveles de transcripción de los genes *HXK1*, *HXK2* y *GLK1* que codifican para las dos hexoquinasas y la glucoquinasa de *S. cerevisiae* son regulados por glucosa (Herrero *et al.*, 1995), los niveles de mRNA de *RAG5* no varían significativamente entre cultivos en glucosa o glicerol (Prior *et al.*, 1993). La hexoquinasa 2 es una enzima central en el metabolismo de la glucosa y en la represión por glucosa en la levadura *S. cerevisiae*. La delección en el gen *HXK2* en esta levadura produce un cambio dramático en su fisiología debido a que los mutantes para esta enzima poseen un crecimiento completamente oxidativo cuando crecen en cultivos discontinuos en fase exponencial y a elevadas concentraciones de glucosa produciéndose una ausencia inicial de productos de la fermentación y un mayor rendimiento de biomasa. Este mutante tiene mayor actividad H^+ -ATPasa mitocondrial y una baja actividad piruvato descarboxilasa que coincide con

una acumulación intracelular del piruvato. La concentración de la fructosa-1,6-bisfosfato, el activador alostérico de la piruvato quinasa, disminuyó más en el mutante *hvk2* que en la cepa salvaje, esto sugiere que la redirección del flujo de carbono en el mutante *hvk2* hacia la producción de biomasa es una consecuencia de la disminución de la represión por glucosa (Diderich *et al.*, 2001)

En todos los casos estudiados, los genes que codifican hexoquinasas a partir de levaduras no convencionales fueron capaces de complementar la mutación *hvk2* de *S. cerevisiae* (Prior *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 1996; Petit y Gancedo, 1999).

La mayoría de las hexoquinasas son inhibidas por trealosa-6-P, un compuesto que juega un papel importante en la regulación de la glucólisis en *S. cerevisiae* (Blázquez *et al.*, 1993). Se sabe que la hexoquinasa 2 de *S. cerevisiae* juega un papel importante en la represión catabólica de ciertos genes, pero no existe información de la posible participación de las hexoquinasas de otras levaduras no convencionales en la represión catabólica.

La fosfoglucosa isomerasa convierte la glucosa-6-P en fructosa-6-P. En *K. lactis* el gen *RAG2* codifica para la fosfoglucosa isomerasa (Flores *et al.*, 2000). El mutante *rag2* de *K. lactis* es capaz de crecer en glucosa, este crecimiento es dependiente de una respiración activa (Goffrini *et al.*, 1991). Este comportamiento contrasta con la falta de crecimiento en glucosa encontrado en el mutante *pgi* equivalente de *S. cerevisiae* (Maitra, 1971) indicando que en *K. lactis*, la capacidad de la ruta de las pentosas fosfato es suficiente para la utilización de la glucosa. González-Siso *et al.* (1996a) detectaron una producción de etanol significativa cuando crecieron el mutante *rag2* en glucosa y postularon que la dependencia de la actividad respiradora para el crecimiento en glucosa del mutante *rag2* está relacionado con la necesidad de una NAD(P)H deshidrogenasa mitocondrial externa para la reoxidación del NADPH producido en la ruta de las pentosas fosfato.

La fosfofructoquinasa cataliza la fosforilación de la fructosa-6-P a fructosa-1,6-P₂. La actividad de la enzima está afectada por una gran variedad de efectores. La fosfofructoquinasa recibió mucha atención en *S. cerevisiae* porque se pensó que era el "cuello de botella" de la glucólisis. Pero esta idea se rechazó cuando se encontró que la sobre expresión de genes que codifican para la fosfofructoquinasa no incrementan la fermentación en *S. cerevisiae* (Schaaff *et al.*, 1989; Heinisch, 1986) y por la comprensión de que el control de una ruta raramente está atribuida a un único paso (Kacser y Burns, 1979). En todas las especies de levaduras en las que se han estudiado

las características genéticas de la fosfofructoquinasa, se han encontrado dos genes. En *K. lactis* la enzima es un octámero compuesto de dos tipos diferentes de subunidades con unas masas moleculares de 119 y 102 kDa (Bar *et al.*, 1997) codificadas por los genes *KIPFK1* y *KIPFK2* (Heinisch *et al.*, 1993). En contraste con el comportamiento de los mutantes *pfk1 pfk2* en *S. cerevisiae*, los mutantes *Klpfk1 pfk2* que carecen de las dos subunidades de la fosfofructoquinasa pueden seguir creciendo en glucosa si la respiración es funcional, indicando una vez más que la actividad de la ruta de las pentosas fosfato es suficiente para la utilización de la glucosa (Flores *et al.*, 2000). Esta visión se basa en el hecho de que la interrupción del gen *KITAL1*, que codifica para una transaldolasa, suprime este crecimiento (Jacoby *et al.*, 1993). Tanto *KIPFK1* como *KIPFK2* pueden restaurar la capacidad de crecimiento en glucosa en los mutantes *pfk1 pfk2* de *S. cerevisiae*. La expresión simultánea de uno de los genes *PFK* de *K. lactis* y uno de *S. cerevisiae* no producen enzima activa en ensayos *in vitro* (Heinisch *et al.*, 1993). La enzima de *K. lactis* es activada por fructosa-2,6-P₂ y AMP e inhibida por ATP. Ambos compuestos son igualmente efectivos en la liberación de la inhibición de ATP, a diferencia de *S. cerevisiae* en donde la fructosa-2,6-P₂ es la más efectiva (Bar *et al.*, 1997).

Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa

La fructosa-1,6- P₂ aldolasa cataliza la reacción reversible que transforma la fructosa-1,6- P₂ en dos triosas fosfato y conecta la glucólisis y gluconeogénesis con otras rutas como por ejemplo la ruta de las pentosas fosfato. La aldolasa está presente en animales, plantas y en la mayoría de los microorganismos. Existen dos clases de aldolasas. Las aldolasas de la clase I se encuentran en organismos superiores: animales y plantas aunque también se han encontrado en algunas bacterias. Se caracterizan por ser homotetrámeros de 40 kDa de peso molecular cada subunidad. Las aldolasas de la clase II se encuentran en organismos inferiores (bacterias, levaduras, hongos y algas verde azuladas), la proteína natural posee dos subunidades (homodímeros) de 40 kDa de peso molecular, cada una de las cuales contiene un catión de zinc esencial para la función catalítica. Aunque ambas enzimas catalizan la misma reacción difieren en su compleja distribución filogenética a través de los grupos taxonómicos; sus secuencias aminoacídicas, la estructura de sus sitios activos (Marsh y Lebherz, 1992) y sus

mecanismos de reacción. En la tabla II se muestran las propiedades catalíticas y estructurales de diferentes aldolasas pertenecientes a las clases I y II.

Tabla II: Propiedades catalíticas y estructurales de aldolasas representativas de la clase I y II. ND: no determinada. Tabla modificada de Marsh y Lebherz (1992).

Fuente	CLASE I			CLASE II		
	Arqueobacteria	Eubacteria	Eucariota	Arqueobacteria	Eubacteria	Eucariota
	<i>Halobacterium vallismortis</i>	<i>Micrococcus aerogenes</i>	Músculo de conejo	<i>Halobacterium mediterranei</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tamaño subunidad (kDa)	27	33	40	ND	39	40
Estructura nativa	Homodécámero	Monómero	Homo-tetramero	ND	Homodimero	Homodimero
Unión a iones metálicos	NO	NO	NO	Fe ²⁺	Zn ²⁺	Zn ²⁺
Formación Base-Schiff	SI	SI	SI	NO	NO	NO
Rango pH óptimo	Amplio 7,2-8,5	Amplio 6,5-8,5	Amplio 6,9-8,8	Estrecho 7,2	Estrecho 7,5	Estrecho 7,0

El análisis filogenético de las aldolasas de clase II permitió la separación de dos tipos, denominadas aldolasas de clase II tipo A y tipo B originadas a partir de una duplicación génica (Plaumann *et al.*, 1997). Las aldolasas de tipo A son funcionales en la glucólisis y gluconeogénesis mientras que las aldolasas de tipo B pertenecen al ciclo de Calvin-Benson. En la figura I2 se muestra un árbol filogenético de las aldolasas de clase I y II de diferentes organismos.

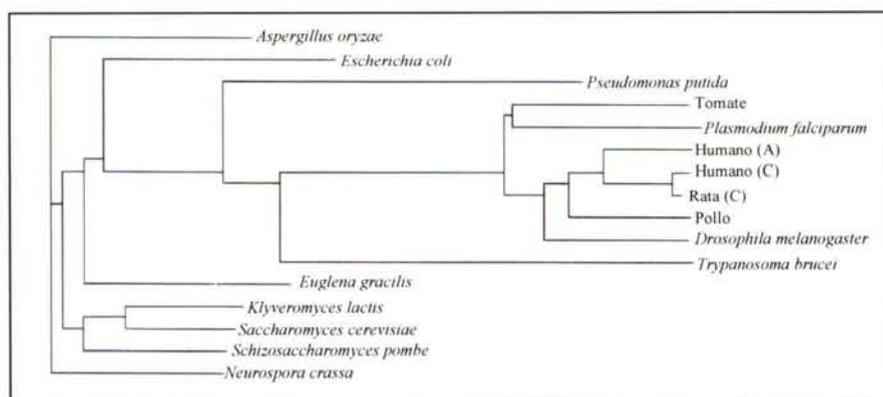


Figura I2: Árbol filogenético de las aldolasas de clase I y II pertenecientes a diferentes organismos.

La mayoría de los organismos contienen una única clase de aldolasa aunque unos pocos poseen ambas clases. *E. coli*, por ejemplo, es uno de los pocos organismos que expresa ambos tipos de actividad aldolasa, probablemente representa una redundancia catalítica que ha sido ampliamente eliminada por la mayoría de los organismos a través de la evolución. En otros organismos, que contienen una única clase de aldolasa, existen dos o hasta incluso tres isoenzimas genéticamente diferentes.

Hasta este trabajo no se tenían conocimientos de esta enzima en la levadura *K. lactis*. Como uno de los objetivos del presente trabajo consistió en la clonación del gen de la aldolasa en esta levadura, a continuación se expone de modo más detallado las aldolasas de clase I ó II y sus diferentes isoformas en distintos organismos, con el fin de poder comprender más a fondo la gran variabilidad existente a lo largo del árbol filogenético.

La fructosa -1,6-bisfosfato aldolasa de levaduras

En *S. cerevisiae* el gen que codifica para esta enzima se llama *FBA1* (*ORF YKL060c*) y fue el último gen de la glucólisis en ser clonado (Schwelberger *et al.*, 1989). La aldolasa de *S. cerevisiae* pertenece a la clase II. Schwelberger *et al.* (1989) determinaron la estructura primaria del gen *FBA1* de *S. cerevisiae*. Existe una homología en toda la secuencia aminoacídica con la aldolasa de clase II de *E. coli*. Por el contrario, no existe homología con la secuencia de aminoácidos del centro activo de la enzima de ratón, la cual está muy conservada en todas las aldolasas de clase I. Tampoco observaron homología con las secuencias nucleotídicas conocidas que codifican para las aldolasas de la clase I, indicando que los miembros de las dos clases de aldolasas son totalmente distintas con respecto a la estructura primaria. Estos autores interrumpieron el gen de la aldolasa, el diploide interrumpido (*FBA1/fba1::URA3*) posee una actividad específica aldolasa que es la mitad que la cepa silvestre (*FBA1/FBA1*). El haploide (*fba1::URA3*) no muestra ninguna actividad, de lo que se concluye que el gen es único. Las esporas haploides con el gen interrumpido, al igual que otros mutantes glucolíticos, son incapaces de crecer en glucosa como fuente de carbono, crecen peor en medios con lactato. Los haploides son inestables y no hay forma posible de hacer un *bypass* de la reacción de la aldolasa en esta levadura. La interrupción de las dos copias genómicas del gen *FBA1* resulta letal para la levadura.

Al igual que otras enzimas glucolíticas, la aldolasa es bastante abundante en

células de tipo salvaje representando cerca del 0,5% de la proteína celular total. Al contrario de lo que ocurre con la fosfoglicerato quinasa, enolasa y piruvato quinasa que son inducidas por glucosa, la actividad aldolasa no está muy influenciada por la fuente de carbono presente en el medio de cultivo, dado que se obtienen los mismos niveles de enzima en extractos celulares de glucosa y glicerol con etanol (Schwelberger *et al.*, 1989). Estos mismos resultados fueron corroborados después de que realizasen análisis de *Northern blot* en los mismos medios de cultivo concluyendo que este gen se expresa constitutivamente (Compagno *et al.*, 1991).

A partir de los trabajos de Baker (1986) se sabe que la expresión de ocho genes glucolíticos, incluyendo el *FBA1*, está regulada positivamente por el producto del gen *GCR1*. Compagno *et al.* (1991) observaron que la actividad específica de algunas enzimas glucolíticas, incluyendo la aldolasa, se reduce entre 5 y 50 veces en cepas que portan una mutación nula del gen *GCR1*. El producto de este gen actúa como un elemento regulador transcripcional positivo aportando altos niveles de expresión de genes que codifican para enzimas glucolíticas. Estos autores realizaron fusiones del promotor del gen *FBA1* de *S. cerevisiae* al gen *lacZ* para poder estudiar la regulación transcripcional y los elementos del promotor. Los resultados obtenidos revelaron la existencia de una región reguladora positiva UAS_{FBA1} que contiene secuencias conocidas que constituyen los sitios de unión para proteínas multifuncionales, tales como Rap1p y Abf1p (siendo ambas necesarias pero no suficientes para conseguir los máximos niveles de expresión de este gen), y dos motivos TTCC para la unión de Gcr1p. En los promotores de genes glucolíticos es frecuente encontrar sitios de unión para Rap1p adyacentes a una o más secuencias con el motivo CTTCC, la presencia de este último elemento se ha correlacionado con una activación transcripcional eficiente. No existen secuencias represoras implicadas en la modulación de los niveles basales de la expresión de este gen. La *UAS* del promotor del gen *FBA1* posee homología con otras secuencias activadoras de levaduras conocidas, en concreto posee dos secuencias interesantes que también fueron encontradas en el *UAS* del gen *ENO2* (Brindle *et al.*, 1990).

Se sabe muy poco sobre los efectos reguladores ejercidos por la formación y disociación de agregados multi-enzima de enzimas que operan en la misma ruta metabólica. En este sentido, Boles y Zimmermann (1993) reemplazaron dos enzimas endógenas de un organismo (la fosfogluco isomerasa y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. cerevisiae*) por enzimas heterólogas de organismos diferentes. La

fosfoglucoasa isomerasa de la levadura la reemplazó por la misma enzima de la bacteria *E. coli* y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. cerevisiae* la reemplazó por la misma enzima de la mosca *Drosophila melanogaster*. Las enzimas de la levadura y de *D. melanogaster* pertenecen a diferentes tipos de aldolasas por ello parece poco probable que la proteína heteróloga pueda reemplazar a la enzima de la levadura. Sin embargo, ambas enzimas heterólogas pueden restaurar completamente su función normal cuando sus genes se introducen en levaduras mutantes. Esto sugiere que estas enzimas no son necesarias e imprescindibles para la formación de un agregado enzimático con otras enzimas glucolíticas de levadura. Sin embargo, Matic *et al.* (2001) observaron la existencia de una interacción entre la fosfofructoquinasa y la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. cerevisiae* para formar un complejo enzima-enzima. La formación de este complejo tiene lugar tanto en presencia como en ausencia de AMP, pero la presencia de AMP es necesaria para que las actividades enzimáticas individuales incrementen. La formación de estos complejos presenta varias ventajas biológicas para la célula tales como la regulación del metabolismo, la transferencia directa de metabolitos entre enzimas y proteger los metabolitos del citosol acuoso.

La enzima de *Candida utilis* se ha purificado y se vio que posee un peso molecular de 70 kDa y contiene un ión Zn^{2+} al igual que la enzima de *S. cerevisiae* (Kowal *et al.*, 1966).

Mutoh y Hayashi (1994), mientras estudiaban la resistencia de *Schizosaccharomyces pombe* a los metales pesados, encontraron fortuitamente la secuencia de ADN homóloga a la del gen fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. cerevisiae* en una genoteca de ADN genómico de *S. pombe*. La *ORF* codifica para un polipéptido con 358 aminoácidos. La secuencia aminoacídica obtenida a partir de la secuencia de nucleótidos es altamente homóloga (63%) a la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. cerevisiae*. También muestra una homología considerable con las enzimas de clase II de *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* y *Rhodobacter sphaeroides*. Las secuencias aminoacídicas de las enzimas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* son, como cabría esperar, las más homólogas entre sí, esto es debido a su cercana relación taxonómica, pues se piensa que se han dividido al menos hace 1.10^9 años.

La fructosa –1,6-bisfosfato aldolasa de bacterias

La enzima de clase II de *E. coli* ha sido muy estudiada. La resolución de la estructura de las aldolasas de clase II de *E. coli* reveló que, al igual que las aldolasas de la clase I de los eucariotas, adopta un plegamiento α/β -barril. La enzima de clase I de *E. coli* es menos conocida que la de clase II. En procariotas ya se han descubierto las aldolasas de clase I de *E. coli*, *Micrococcus aerogenes*, *Lactobacillus casei*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Synechocystis sp.* y *Haloarcula vallismortis*. Estas aldolasas de clase I parecen ser más diversas que las aldolasas de eucariotas. Generalmente tienen subunidades cuyas masas moleculares comprenden un rango de 27 a 40 kDa, pudiendo ser desde monoméricas a decaméricas (Thomson *et al.*, 1998).

La secuencia aminoacídica de la enzima de *E. coli* es más homóloga a la de la levadura *S. cerevisiae* que a la de las secuencias aminoacídicas de otras aldolasas bacterianas cuyas secuencias han sido ya determinadas. La explicación más lógica para esta relación filogenética es la transferencia horizontal de genes de la aldolasa de la clase II de algunas eubacterias a las levaduras en algún momento determinado de la evolución.

En *E. coli* las aldolasas de clase II se expresan constitutivamente, mientras que las enzimas de la clase I son inducidas por sustratos gluconeogénicos, de este modo, sólo un 0-5% de la actividad aldolasa total es aportada por la aldolasa de clase I cuando *E. coli* crece en glucosa, pero esta expresión puede ser incrementada hasta un 60% de la actividad aldolasa total cuando crece en fuentes de carbono como piruvato o lactato. Thomson *et al.* (1998) clonaron, purificaron y sobre expresaron la enzima aldolasa de clase I de *E. coli* que resultó ser claramente diferente a la aldolasa de clase II clonada y sobre expresada previamente por Alefounder *et al.*, (1989).

A partir de análisis estructurales tridimensionales realizados con la enzima aldolasa de *E. coli*, se ha podido saber que las aldolasas presentan un alto grado de conservación, sobre todo en dominios cruciales para la actividad enzimática (Blom *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1996).

La fructosa –1,6-bisfosfato aldolasa humana

Existen tres isoenzimas genéticamente diferentes de aldolasa de clase I de vertebrados, se distinguen en función de sus propiedades catalíticas y antigénicas (Ali *et al.*, 1998). En humanos la aldolasa A existe en la mayoría de los tejidos pero predomina en el músculo y en los eritrocitos. La aldolasa B, conocida previamente como la aldolasa del hígado, se encuentra en ciertas células del riñón e intestino delgado y la aldolasa C está en el cerebro (Ali *et al.*, 1998; Dalby *et al.*, 1999).

En cuanto a las propiedades catalíticas, la isoenzima del músculo humano cataliza la escisión de la fructosa-1,6-bisfosfato a una mayor tasa que la isoenzima del hígado (Dalby *et al.*, 1999).

En cuanto a las propiedades antigénicas, las regiones específicas de las isoenzimas (*ISRs*) de la aldolasa de vertebrados han sido objeto de estudio durante varios años, en concreto, se han construido enzimas quiméricas entre las enzimas del músculo e hígado (Dalby *et al.*, 1999). En estos estudios se propuso que existían cuatro regiones (*ISR1-4*) que eran importantes para determinar la especificidad de las enzimas. Las tres primeras forman un grupo distinto pues se encuentran agrupadas en el exón 3 del gen humano de la aldolasa. La cuarta es la región C-terminal flexible que muestra un alto grado de divergencia en las secuencias entre las aldolasas de tipo I, sugiriendo que esta región debe ser considerada aparte.

Las isoformas A y C de la aldolasa humana se expresan constitutivamente, pero la isoforma B está sujeta al control de la dieta. En el tejido fetal, la isoforma A es predominante pero a medida que el embrión se desarrolla, se produce una represión de esta isoforma en el hígado, riñón e intestino, acompañado de la expresión de la isoforma B (Ali *et al.*, 1998). Las regiones promotoras de los genes que codifican para la isoforma B de la aldolasa de diferentes especies están muy conservadas (Ali *et al.*, 1998).

El gen de la isoforma B de la aldolasa humana consta de 14.500 pb que codifican para un polipéptido de 364 aminoácidos. Las mutaciones en este gen, en humanos, son las responsables de una enfermedad hereditaria, recesiva y autosomal causada por la deficiencia catalítica de la isoforma B en el hígado, riñón e intestino que se conoce como intolerancia a la fructosa hereditaria (Ali *et al.*, 1998; Dalby *et al.*, 1999; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002).

Esta enfermedad fue descubierta por Chambers y Pratt en una mujer de 24 años de edad, en el año 1956 (Ali *et al.*, 1998). Esta mujer, después de tomar fructosa, tenía síntomas fóbicos, náuseas, dolores abdominales, debilidad, etc. Estos síntomas desaparecieron cuando tomó glucosa. Se observó que los niños, en estas condiciones, eran más vulnerables que los adultos, pues si consumen grandes cantidades de fructosa la reacción es más severa y en especial los niños pueden sufrir ataques o entrar en fase de coma. Se sabe que la ingesta persistente de fructosa, en estos pacientes, conduce a un síndrome de toxicidad crónica, estado en el cual pueden producirse daños irreversibles en hígado y riñón produciendo cirrosis hepática e incluso a veces la muerte (Ali *et al.*, 1998; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002). El tratamiento consiste en la eliminación estricta de fructosa y sacarosa de la dieta (Ali *et al.*, 1998; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002).

Desde que se clonó el gen que codifica para la isoforma B de la aldolasa humana, ya se han descrito 22 mutaciones asociadas con la intolerancia a la fructosa hereditaria. Existen otras mutaciones que han sido asociadas con defectos estructurales que conducen a una disociación de los tetrámeros, pérdida de la especificidad por el sustrato y pérdida de la estabilidad enzimática (Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002).

1.3.3. Desde triosas fosfato a piruvato

La triosa fosfato isomerasa interconvierte la dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato. En *S. cerevisiae* la ausencia de actividad triosa fosfato isomerasa produce una acumulación de sólo una de las dos triosas, la dihidroxiacetona fosfato, produciéndose una alteración en el metabolismo de la glucosa, no pudiendo crecer los mutantes en glucosa como única fuente de carbono (Compagno *et al.*, 2001). El gen correspondiente de *K. lactis* ha sido clonado e interrumpido; en contraste con el comportamiento del mutante *tpi* de *S. cerevisiae*, el mutante de *K. lactis* que carece del gen que codifica para la triosa fosfato isomerasa es capaz de crecer en glucosa (Compagno *et al.*, 1999). El crecimiento no es posible en presencia del inhibidor de la respiración antimicina A, este comportamiento es similar al mostrado por los mutantes *rag2* y *pfk1 pfk2*.

En el paso catalizado por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el gliceraldehído-3-fosfato se convierte en 1,3-bisfosfoglicerato. Este es un paso importante en la glucólisis pues la oxidación del aldehído genera un compuesto acilfosfato rico en energía. El NADH generado en la reacción tiene que ser reoxidado

por la glucólisis para continuar. En *S. cerevisiae* se han clonado tres genes *TDH1*, *TDH2* y *TDH3* que codifican tres isoenzimas diferentes. Los mutantes que poseen sólo el gen *TDH1* no son viables y aquellos que carecen de *TDH2* o *TDH3* crecen más despacio en glucosa que el salvaje (McAlister y Holland, 1985). También se ha clonado el gen *KIGAP1* que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *K. lactis*. Este gen y el que codifica para la alcohol deshidrogenasa I son transcritos en direcciones opuestas y separados por sólo 1,2 kb, sugiriendo que ambos comparten elementos comunes en el promotor (Shuster, 1990).

En la reacción catalizada por la 3-fosfoglicerato quinasa el compuesto acilfosfato rico en energía del 1,3-bisfosfoglicerato es utilizado para producir ATP. En *S. cerevisiae* el gen *PGK1* que codifica para la fosfoglicerato quinasa es un gen de alta expresión, por ello su promotor se ha utilizado para dirigir la expresión de proteínas heterólogas (Chambers, 1997; Flores *et al.*, 2000). También se han clonado los genes que codifican para la 3-fosfoglicerato quinasa de otras levaduras no convencionales. En *K. lactis* el gen correspondiente codifica una proteína de 416 aminoácidos (Fournier *et al.*, 1990).

La fosfoglicerato mutasa cataliza la interconversión entre el 3- y el 2-fosfoglicerato. En contraste con la proteína de *S. cerevisiae* que es una enzima tetramérica, la fosfoglicerato mutasa de *S. pombe* es monomérica y carece de un segmento de aminoácidos en el extremo carboxilo que en *S. cerevisiae* está implicado en la actividad catalítica (Walter *et al.*, 1999) y una región de 24 aminoácidos que en *S. cerevisiae* está involucrada en interacciones entre subunidades. Todavía no existen estudios de esta enzima en *K. lactis*.

La enolasa cataliza la deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. En *S. cerevisiae* existen dos genes *ENO1* y *ENO2* que codifican las dos subunidades de esta enzima homodimérica (Holland y Holland, 1978). La transcripción de *ENO1* es constitutiva mientras que *ENO2* se estimula 20 veces en glucosa, sugiriendo una participación diferencial de las isoenzimas en la glucólisis o en la gluconeogénesis (McAlister y Holland, 1982). Müller *et al.* (1995) describen que en los mutantes para la isoenzima *ENO1* y para otras enzimas del catabolismo de carbohidratos la inducción de la isoenzima glucolítica *ENO2* dependía de la capacidad de estos mutantes para incrementar los niveles de glucosa-6-fosfato después de la adición del azúcar. Tampoco existen estudios de esta enzima en *K. lactis*.

La piruvato quinasa cataliza la segunda reacción productora de ATP en la ruta glucolítica. En *S. cerevisiae* existen dos genes que codifican dos proteínas diferentes. Una codificada por el gen *PYK1*, que es fuertemente activada por fructosa-1,6-bisfosfato y la otra codificada por el gen *PYK2* (*YOR347c*) que no responde a este compuesto. Esta última enzima es reprimida por glucosa y en ciertas condiciones puede permitir el funcionamiento de la glucólisis a una tasa reducida (Boles *et al.*, 1997). No hay evidencias de la existencia de más de un gen de la piruvato quinasa en levaduras no convencionales (Flores *et al.*, 2000). El gen de esta enzima no ha sido clonado todavía en *K. lactis*.

1.3.4. Regulación del flujo glucolítico

En *S. cerevisiae* la regulación del flujo glucolítico es un tema que actualmente atrae la atención de muchos investigadores los cuales postularon un gran número de hipótesis pero todavía queda mucho por resolver. Se han identificado un gran número de reacciones clave tales como el transporte de glucosa, la fosforilación, las actividades fosfofructoquinasa y piruvato quinasa. Esta última enzima representa un punto de control importante siendo activada alostéricamente por la fructosa-1,6-bisfosfato. La piruvato quinasa, en mamíferos, se encuentra como cuatro isoenzimas diferentes con propiedades reguladoras distintas (Jurica *et al.*, 1998). La fosfofructoquinasa fue una de las enzimas mejor estudiadas y durante un largo periodo de tiempo se consideró que era el único paso limitante de la glucólisis. En la mayoría de los casos no existe un único paso limitante sino que el control del flujo glucolítico es compartido entre varias reacciones diferentes (Gonçalves y Planta, 1998; Boles, 1998). Esta idea se ve apoyada por la imposibilidad de aumentar el flujo sobre expresando la fosfofructoquinasa, esto no sólo se debe a que el control está compartido en varios pasos de la glucólisis sino también a que se produce una adaptación de reguladores alostéricos. De hecho, se ha propuesto que la regulación a nivel de la transcripción o traducción tiene una importancia limitada en el flujo glucolítico de *S. cerevisiae* siendo el control alostérico el más importante. La fosfofructoquinasa es sensible a reguladores alostéricos tales como ATP, AMP, fructosa-6-fosfato, fructosa-2,6-bisfosfato, fructosa-1,6-bisfosfato y NH_4^+ . Durante algún tiempo se pensó que la fructosa-2,6-bisfosfato era el efector predominante de la glucólisis, pues estudios *in vivo* demostraron que este metabolito tenía un fuerte efecto activador en la actividad fosfofructoquinasa (Larsson *et al.*, 2000).

Sin embargo, esta activación parece ser importante sólo cuando se cambia de fuente de carbono (Boles *et al.*, 1996; Heinisch *et al.*, 1996).

Müller *et al.* (1997) realizaron un trabajo con una cepa mutante en la cual se incrementaron los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato y la actividad fosfofructoquinasa sin conseguir un aumento en el flujo glucolítico. Existen otras enzimas como la piruvato quinasa y la hexoquinasa que también están sujetas a regulación alostérica. La piruvato quinasa es activada por la fructosa-1,6-bisfosfato mientras que la hexoquinasa es inhibida por trealosa-6-fosfato *in vitro*. La importancia de la trealosa-6-fosfato en la regulación del flujo glucolítico fue descubierta cuando una delección del gen *TPS1* que codifica para la trealosa-6-fosfato sintasa produjo un fenotipo que aparentemente presentaba desórdenes en la regulación glucolítica (Ernandes *et al.*, 1998). Estos mutantes mostraron una hiperacumulación de azúcares fosfato y como resultado las células agotaron el ATP. El ATP y los nucleótidos de adenina también son importantes en la regulación del flujo glucolítico en primer lugar porque actúan como sustratos o productos en la mayoría de las reacciones que parecen ser importantes para controlar la glucólisis, por ejemplo: hexoquinasa, fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa. En segundo lugar, se sabe que el ATP es un regulador alostérico que inhibe la fosfofructoquinasa y la hexoquinasa mientras que el AMP activa la fosfofructoquinasa. Por último, la tasa de consumo de ATP (demanda de ATP) juega un papel importante en los niveles de glucólisis.

Larsson *et al.* (1997) realizaron cultivos continuos con la levadura *S. cerevisiae* y observaron que se producía un aumento en el flujo glucolítico, a una tasa de crecimiento constante, cuando se cambiaba un cultivo limitante en glucosa o en energía a limitante en nitrógeno con exceso de energía. Al mismo tiempo, los niveles de ATP disminuyeron existiendo una correlación lineal negativa entre los niveles de ATP y los flujos glucolíticos. En resumen podría decirse que el ATP posee un efecto inhibitorio en el flujo glucolítico que parece estar distribuido a lo largo de varias reacciones glucolíticas, siendo las más importantes la fosfofructoquinasa y la piruvato quinasa pudiendo estar también involucradas la hexoquinasa y la enolasa. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que el ATP no es el único componente en el sistema regulador que emplean las células para ajustar la velocidad de una ruta metabólica central como puede ser la glucólisis a niveles apropiados.

Recientemente Neil y colaboradores (2004) clonaron los genes *KIGCR1* y *KIGCR2* de *K. lactis*. De los estudios realizados concluyeron que *KIGCr1p* podría

interaccionar directamente con los promotores de genes glucolíticos pero no con los promotores de las permeasas de glucosa y que el control ejercido por *KlGcr1p* y *KlGcr2p* sobre los genes transportadores de glucosa sería indirecto.

1.3.5. Metabolismo del piruvato

El piruvato producido en la glucólisis puede ser oxidado a CO_2 o transformado a etanol. En la mayoría de las levaduras, bajo condiciones aerobias predomina la oxidación mientras que en condiciones anaerobias e incluso en condiciones aerobias a elevadas concentraciones de glucosa en las levaduras que poseen efecto *Crabtree* predomina la transformación a etanol.

La piruvato deshidrogenasa

La oxidación del piruvato a CO_2 ocurre via ciclo *TCA* (de Krebs o ácidos tricarbóxicos). Para que el piruvato pueda entrar en el ciclo *TCA* primero tiene que sufrir una descarboxilación oxidativa que es catalizada por la piruvato deshidrogenasa, un complejo multienzimático mitocondrial que está formado por tres componentes diferentes: la piruvato deshidrogenasa (E1), la dihidrolipoamida acetil transferasa (E2) y la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3). El elemento E1, a su vez, consiste en dos subunidades $\text{E1}\alpha$ y $\text{E1}\beta$. Los genes respectivos de *S. cerevisiae* se llaman *PDA1* (Steensma *et al.*, 1990) ó *PDHa1* (Behal *et al.*, 1989), *PDH β 1* (Miran *et al.*, 1993), *LAT1* (Niu *et al.*, 1988) y *LPD1* (Ross *et al.*, 1988). Debido a la localización del complejo piruvato deshidrogenasa, el piruvato citosólico tiene que ser transportado a la mitocondria. Nalecz *et al.* (1991) purificaron un transportador mitocondrial del piruvato a partir de *S. cerevisiae*.

La interrupción del gen *KIPDA1*, que codifica para la subunidad $\text{E1}\alpha$ del complejo en *K. lactis*, produjo un descenso de la tasa de crecimiento específico en medio mínimo con glucosa, mientras que el crecimiento en medio rico o en etanol no se vio afectado. Estos mutantes producen etanol durante el cultivo discontinuo en aerobiosis (Zeeman *et al.*, 1999). La expresión de *KIPDA1* se reprime durante el crecimiento en glucosa debido al producto de la proteína *Rag3* (Tizzani *et al.*, 1998) un homólogo del gen *PDC2* de *S. cerevisiae* que controla la transcripción de la piruvato descarboxilasa (Hohmann, 1993). La actividad de la piruvato deshidrogenasa en *K.*

lactis parece estar regulada a nivel de la subunidad E1 α del complejo mientras que en *S. cerevisiae* la transcripción de *PDA1* es constitutiva. De hecho, el mRNA de *ScPDA1* es usado como control de carga para la cuantificación en la técnica de *Northern blot* (Wenzel *et al.*, 1995). Existen otros mecanismos adicionales de regulación del complejo piruvato deshidrogenasa en *K. lactis* como por ejemplo la fosforilación, la cual parece ser el mayor mecanismo regulador en los complejos de mamíferos. La actividad piruvato deshidrogenasa está fuertemente controlada por la relación NAD⁺:NADH. De hecho las diferencias de actividad observadas en cultivos con etanol y acetato podrían mostrar regulación transcripcional o post-traducciona como consecuencia de las diferencias en las relaciones NAD⁺:NADH mitocondriales en estos cultivos que derivan a su vez de la diferencia existente en lo que se refiere a la localización subcelular de las enzimas que convierten el etanol y acetato (Zeeman *et al.*, 2000).

La piruvato descarboxilasa

Durante la fermentación alcohólica de azúcares, las levaduras reoxidan NADH a NAD⁺ en las reacciones finales desde el piruvato. La primera de estas reacciones está catalizada por la piruvato descarboxilasa (*PDC*), posteriormente el piruvato es descarboxilado por la alcohol deshidrogenasa (*ADH*) antes de su reducción final a etanol. La generación de NAD⁺ es necesaria para mantener el balance redox y prevenir el bloqueo de la glucólisis. Una alternativa para la generación del NAD⁺ es la ruta de generación de glicerol a partir de la dihidroxiacetona fosfato, que precisa la intervención consecutiva de dos enzimas, dihidroxiacetona fosfato reductasa y glicerol fosfatasa. El glicerol es uno de los productos más importantes de la fermentación alcohólica de levaduras, junto con el etanol y el dióxido de carbono.

En *S. cerevisiae* se han encontrado varios genes que codifican para la piruvato descarboxilasa y se ha visto que la actividad enzimática aumenta en glucosa. El producto del gen *PDC2* está involucrado en el control de la expresión de los genes *PDC* estructurales (Hohmann, 1997). Por contra de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en *K. lactis* sólo existe un gen, el *RAG6*, que codifica para la piruvato descarboxilasa siendo su secuencia aminoacídica muy homóloga a otras proteínas Pdc de levaduras. La interrupción de *RAG6* indicó que es el único gen estructural que codifica para la *PDC* en *K. lactis* (Bianchi *et al.*, 1996). Los mutantes *rag6* de *K. lactis* crecen en glucosa a la misma velocidad que el salvaje. La transcripción del gen *RAG6* es estimulada por

glucosa, siendo el producto del gen *RAG3* necesario para dicha inducción (Prior *et al.*, 1996). Las mutaciones en *RAG1*, *RAG5* o *RAG2* reducen la inducción por glucosa de *RAG6* (Bianchi *et al.*, 1996). Zeeman *et al.* (2000) observaron que por el contrario de lo que sucede en *S. cerevisiae*, la piruvato descarboxilasa de *K. lactis* no es necesaria para el crecimiento en glucosa, etanol y acetato. Los niveles de actividad de esta enzima son generalmente menores en *K. lactis* que en *S. cerevisiae*. Las levaduras *Crabtree-*negativas suelen tener bajas actividades piruvato descarboxilasa. Además, en *K. lactis* la transcripción de la *PDC* es reprimida por etanol. La actividad PDCasa (piruvato descarboxilasa) en una cepa salvaje de *S. cerevisiae* creciendo en etanol es bastante baja pero aumenta hasta diez veces con la adición de glucosa, menos de diez veces con la adición de galactosa y menos todavía con glicerol (Boles y Zimmermann, 1993). Los niveles PDCasa en mutantes glucolíticos de *S. cerevisiae* que crecen en etanol o acetato son mayores que en la cepa salvaje. Además, en los mutantes para la fructosa bisfosfato aldolasa se observaron los mayores niveles PDCasa bajo condiciones gluconeogénicas (Boles y Zimmermann, 1993). Esto sugiere que la inducción plena de la actividad PDCasa necesita la acumulación de hexosas y triosas fosfato.

Desviación del piruvato

El acetil CoA también se puede formar en el citosol a través del llamado *bypass* o desviación del piruvato, que implica la síntesis de acetil CoA a través de la acción de la piruvato descarboxilasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil CoA sintetasa. Estas reacciones y el transporte del acetil CoA formado a la mitocondria podría, en principio, “escaparse” de la acción de la piruvato deshidrogenasa (Pronk *et al.*, 1996). Las enzimas que participan, en *S. cerevisiae*, en la desviación del piruvato, se localizan en el citosol, pero no existe información en cuanto a la localización en otras levaduras (Meaden *et al.*, 1997).

En *K. lactis* la interrupción del gen *KIPDA1* causa una producción de etanol en cultivos discontinuos aerobios indicando que la desviación del piruvato no produce suficiente acetil CoA en estas condiciones o que la mitocondria tiene una capacidad limitada para importar el acetil CoA del citosol (Zeeman *et al.*, 1999).

1.3.6. La ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato es una ruta metabólica importante implicada en la producción de NADPH para las reacciones biosintéticas y ribosa 5-fosfato para la síntesis de ácidos nucleicos y cofactores; también proporciona eritrosa 4-fosfato para la síntesis de aminoácidos aromáticos. Las primeras reacciones de la ruta son dos reacciones oxidativas que son fisiológicamente irreversibles mientras que las otras no son oxidativas pero sí reversibles. La división del metabolismo de las hexosas entre la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato ocurre a nivel de la glucosa-6-fosfato (figura 13).

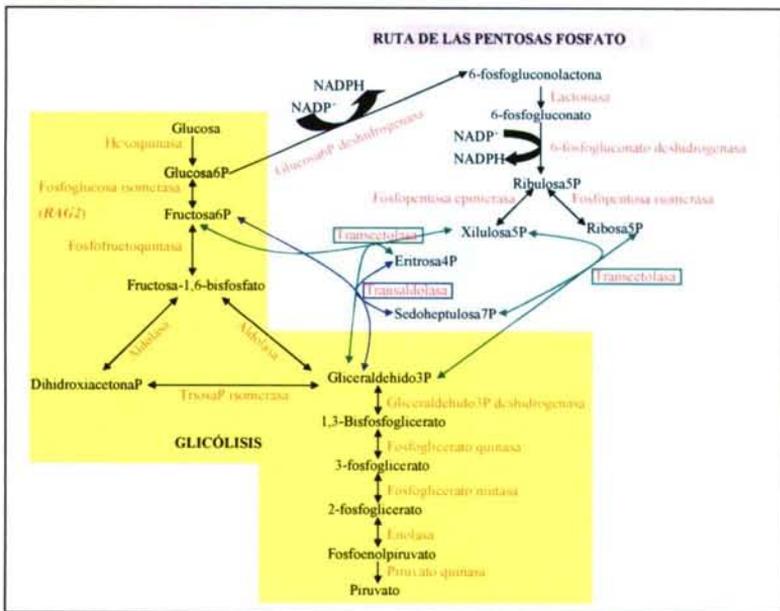


Figura 13: Mecanismo de *by-pass* que ejerce la ruta de las pentosas fosfato sobre la glucólisis en el mutante *rag2*.

Se ha observado que la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo influye sobre la cantidad de azúcar que se dirige a la ruta de las pentosas fosfato. En *S. cerevisiae*, el crecimiento en un medio suplementado con aminoácidos disminuye el flujo a través de la ruta de las pentosas fosfato (Gancedo y Lagunas, 1973). En estas levaduras, que usan nitrato como fuente de nitrógeno, es de esperar que se produzca un incremento en el flujo de carbono a través de la ruta de las pentosas fosfato debido al incremento del NADPH requerido (causado por el funcionamiento de la nitrato y nitrito reductasa).

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dirige la glucosa a la ruta de las pentosas fosfato catalizando la oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfo- δ -gluconolactona. Los mutantes de *S. cerevisiae* para el gen *ZWF1* que carecen de actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa requieren una fuente de azufre. Este requerimiento puede ser explicado por la existencia de dos pasos en la biosíntesis de metionina que requieren NADPH (Thomas *et al.*, 1991). La hidrólisis de la 6-fosfato- δ -gluconolactona a 6-fosfo-gluconato ocurre espontáneamente a pH neutro pero a una velocidad muy lenta.

La 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del 6-fosfo-gluconato a ribulosa 5-fosfato. La ribulosa 5-fosfato puede ser isomerizada a ribosa 5-fosfato o epimerizada a xilulosa 5-fosfato. La primera reacción es catalizada por la ribosa 5-fosfato isomerasa. La segunda reacción es catalizada por la ribulosa 5-fosfato epimerasa.

La transcetolasa cataliza dos reacciones en la ruta de las pentosas fosfato en las cuales un glicolaldehído (2 carbonos) es transferido desde un donador cetosa a un aceptor aldosa. En ambas reacciones, el donador es la xilulosa 5-fosfato, pero el aceptor es en un caso la ribosa 5-fosfato y en otro caso la eritrosa 4-fosfato. En *S. cerevisiae* se han aislado dos genes que codifican para transcetolasas y son *TKL1* y *TKL2*. En *K. lactis* sólo se aisló un único gen que se llama *KITKL1*. Este gen de *K. lactis* es capaz de complementar la mutación *tkl1 tkl2* de *S. cerevisiae*. La secuencia de aminoácidos de *KITKL1* parece estar más relacionada con transcetolasas procariontas que con las eucariotas (Jacoby y Heinisch, 1997).

La transaldolasa cataliza la formación reversible de gliceraldehído-3-fosfato y sedoheptulosa-7-fosfato a partir de eritrosa-4-fosfato y fructosa-6-fosfato. Los mutantes de *K. lactis* que carecen de esta enzima, codificada por el gen *KITAL1*, han sido de gran utilidad para descubrir las diferencias entre esta levadura y *S. cerevisiae* en lo que se refiere a la capacidad de la ruta de las pentosas fosfato para la utilización de la glucosa. *KITAL1* posee una pauta abierta de lectura de 1002 pb que codifica para una proteína que presenta una homología del 76% con la transaldolasa de *S. cerevisiae*. *KITAL1* puede complementar la delección *tal1* de *S. cerevisiae*. El inicio de la transcripción de *KITAL1* se localiza a -69 pb con respecto al codón de inicio ATG. La delección de una gran parte de la *ORF* no produjo ningún fenotipo obvio. En *K. lactis* el doble mutante que carece de la fosfofructoquinasa y la transaldolasa no puede crecer en glucosa, pero aquellos mutantes que carecen sólo de la fosfofructoquinasa sí que pueden. Estos resultados indican que cuando la glucólisis está bloqueada *K. lactis* puede utilizar la

glucosa exclusivamente mediante la ruta de las pentosas fosfato (Jacoby *et al.*, 1993), esta situación no ocurre en *S. cerevisiae*. Por tanto, los mutantes *Rag* (resistente a antimicina A en glucosa) de *K. lactis* son capaces de crecer en glucosa gracias a la ruta de las pentosas fosfato donde la glucosa es oxidada a intermediarios con tres átomos de carbono y de donde se obtiene energía siempre y cuando la cadena respiratoria no esté bloqueada. Por el contrario en *S. cerevisiae* no existen cepas *Rag* porque el bloqueo de los primeros pasos de la glucólisis impide a la levadura crecer en glucosa debido a que la ruta de las pentosas fosfato no es muy activa en *S. cerevisiae* (González-Siso *et al.*, 2000).

1.4. Oxidación del NADH y producción de energía

Las reacciones catabólicas generan NADH tanto en el citosol como en la mitocondria. En *S. cerevisiae* existen al menos cinco mecanismos para la reoxidación del NADH: la fermentación alcohólica, la producción de glicerol, la respiración del NADH citosólico mediante una deshidrogenasa mitocondrial externa, la respiración del NADH citosólico mediante sistemas lanzadera y la oxidación del NADH intramitocondrial mediante una deshidrogenasa mitocondrial interna.

Durante el crecimiento respirador, el NADH citosólico y el mitocondrial son reoxidados por la cadena respiratoria. Esta reoxidación está unida a la producción de ATP en un proceso conocido como fosforilación oxidativa. El ATP generado en la mitocondria es liberado al citosol mediante un traslocador ADP/ATP específico. En *S. cerevisiae* existen tres genes que codifican para traslocadores ADP/ATP mitocondriales: *AAC1* (Adrian *et al.*, 1986), *AAC2* (Lawson y Douglas, 1988) y *AAC3* (Kolarov *et al.*, 1990). La proteína más implicada en la traslocación parece ser *Aac2*. El papel de *Aac1* no está completamente claro (Viola *et al.*, 1995). En *K. lactis* sólo existe un único gen que codifica para el traslocador ATP/ADP (Viola *et al.*, 1999).

La cadena respiratoria mitocondrial incluye cuatro estructuras oligoméricas, complejos I al IV, capaces de transferir electrones y que se encuentran localizados en la membrana interna de este orgánulo. La energía liberada a partir de las reacciones de transferencia de electrones es usada para traslocar protones a través de la membrana generando un gradiente electroquímico que puede ser utilizado para sintetizar ATP por medio de la ATPasa o complejo V. Además, los hongos y las plantas pueden tener

componentes adicionales tales como NADH deshidrogenasas alternativas y/o una oxidasa terminal alternativa (Joseph-Horne *et al.*, 2001).

En la figura I4 se muestra un esquema general de la cadena respiratoria de hongos, aunque es importante tener en cuenta que para los diferentes géneros pueden existir variaciones en sus componentes que no se muestran en la figura.

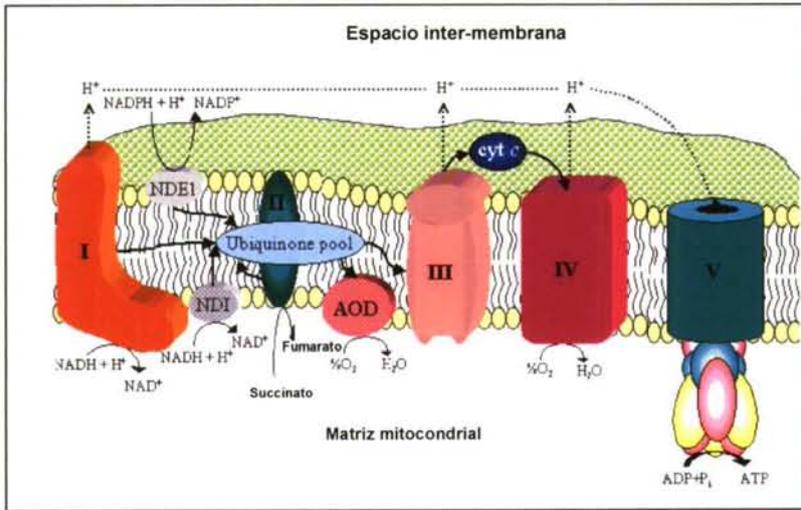


Figura I4: Cadena respiratoria mitocondrial de hongos. I, II, III, IV y V son los complejos transportadores de electrones; NDEI es la NADH:ubiquinona oxidoreductasa externa; NDI, es la NADH:ubiquinona oxidoreductasa interna; cyt c, es el citocromo c y AOD, es la oxidasa alternativa. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones.

Con 43 subunidades en mamíferos (Skehel *et al.*, 1998; Sazanov *et al.*, 2000; Fearnley *et al.*, 2001), al menos 35 subunidades en hongos (Videira, 1998) y entre 13 y 14 subunidades en procariontas (Yagi *et al.*, 1998), el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) es el complejo multiproteico más largo y más complicado de la cadena respiratoria (Dröse *et al.*, 2002). Contribuye en más de un 40% al gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial (Wikström, 1984). Constituye la fuente principal de radicales de oxígeno producidos en la matriz mitocondrial (Robinson, 1998). Todavía se conoce muy poco acerca de su mecanismo de reacción, especialmente la interacción con la ubiquinona y el acoplamiento del transporte de electrones y la traslocación de protones (Brandt, 1997 y 1999).

Aunque el complejo I está presente en la mayoría de las mitocondrias de hongos, unas pocas especies de levaduras, como *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *K. lactis*, carecen de este complejo y poseen en su lugar una deshidrogenasa alternativa (Joseph-Horne *et al.*,

2001). En *Aspergillus niger* (Prömper *et al.*, 1993) y *N. crassa* (Videira, 1998) las delecciones en el complejo I son viables, lo que sugiere que estos organismos contienen también una NADH deshidrogenasa interna alternativa.

Por tanto en las mitocondrias de hongos y plantas existen dos tipos de NAD(P)H deshidrogenasas. El complejo I que oxida NADH de la matriz mitocondrial, es capaz de transferir dos electrones desde el NADH hasta la ubiquinona (Joseph-Horne *et al.*, 2001), bombea protones a través de la membrana mitocondrial interna (cuatro protones por cada par de electrones transferidos), contribuyendo por tanto a la fosforilación oxidativa, es sensible a rotenona (un inhibidor de la cadena respiratoria) y son complejos multiprotéicos. Las NAD(P)H deshidrogenasas alternativas que oxidan NADH de la matriz mitocondrial (enzimas internas) o NADH/NAD(P)H citosólico (enzimas externas), transfieren electrones desde el NADH hasta la ubiquinona pero no bombean protones y por tanto no contribuyen a la generación del gradiente electroquímico, son insensibles a rotenona y están constituidas por una única proteína.

Aunque el descubrimiento de actividad NADH ubiquinona oxidorreductasa alternativa en *Saccharomyces carlsbergensis* (Von Jagow y Klingenberg, 1970) y *Neurospora crassa* (Weiss *et al.*, 1970) data de 1970, aún se conoce muy poco sobre la distribución y función de estas enzimas.

Las NADH ubiquinonas oxidorreductasas alternativas internas compiten con el complejo I por el NADH y la ubiquinona en la matriz mitocondrial (de Vries y Marres, 1987; Yagi, 1991). Varios estudios indican que esta actividad está sujeta a control metabólico en *Torulopsis utilis* (Katz *et al.*, 1971) y *N. crassa* (Schwitzguebel y Palmer, 1982). Esta actividad es mayor durante la fase logarítmica temprana pero cuando las células entran en fase estacionaria, es decir cuando la fuente de carbono ya se ha consumido, no hay actividad y el complejo I pasa a ser la NADH deshidrogenasa predominante en la cadena respiratoria. En procariotas se sabe que existen muchas NADH deshidrogenasas de la cadena respiratoria, por ejemplo *E. coli* tiene un complejo I mínimo codificado por el operón *nuo* (Weidner *et al.*, 1993) y una NADH ubiquinona oxidorreductasa alternativa codificada por el gen *ndh* (Young *et al.*, 1981). Además, ya hay evidencias de que las NADH deshidrogenasas alternativas pueden complementar defectos del complejo I en diferentes situaciones, por ejemplo la interrupción del complejo I en *Paracoccus denitrificans* sólo es posible si se introduce en el organismo la enzima *NDH2* de *E. coli* (Finel, 1996). Por todo ello, y dado que las NADH deshidrogenasas alternativas no bombean protones, al menos sirven para mantener los

equivalentes reducidos a niveles fisiológicos. Por otra parte, todavía están surgiendo datos en cuanto a la caracterización de esta enzima que ya se sabe que interviene en levaduras en el estrés oxidativo (Davidson y Schiestl, 2001) y en plantas interviene en el desarrollo y en las respuestas lumínicas (Svensson y Rasmusson, 2001).

La oxidasa alternativa (*AOD*) es una oxidasa terminal secundaria codificada por un gen nuclear presente en plantas y en la mayoría de los hongos (*S. cerevisiae* y *S. pombe* son notables excepciones), por ello hay que tener cuidado cuando se usa a *S. cerevisiae* como organismo modelo para estudios cualitativos y cuantitativos del metabolismo redox (Bakker *et al.*, 2001). La *AOD* está localizada en la membrana mitocondrial interna y cataliza la reducción del oxígeno a agua después de recibir electrones directamente de la ubiquinona reducida, haciendo un *bypass* del complejo III y el complejo IV. En consecuencia, las células expresando la *AOD* son insensibles a los inhibidores de la respiración tales como antimicina A y cianida. En la mayoría de los sistemas estudiados, las oxidasas alternativas están sujetas a múltiples formas de regulación y generalmente operan sólo bajo condiciones que inhiben el transporte normal de electrones.

Como uno de los objetivos del presente trabajo consistió en la clonación de la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna de la levadura *K. lactis*, se realizó una descripción comparativa de las deshidrogenasas mitocondriales alternativas de diferentes organismos.

Las deshidrogenasas mitocondriales alternativas de *Saccharomyces cerevisiae*

NADH deshidrogenasa mitocondrial interna 1

S. cerevisiae carece del complejo de tipo I NADH deshidrogenasa (Nosek y Fukuhara, 1994). En su lugar *S. cerevisiae* contiene una única subunidad NADH:ubiquinona oxidorreductasa, la cual acopla la oxidación del NADH intramitocondrial a la cadena respiratoria. Esta enzima, cuyo sitio activo se localiza mirando hacia la matriz mitocondrial (Rigoulet *et al.*, 2004), cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH intramitocondrial a la ubiquinona (de Vries y Grivell, 1988; Marres *et al.*, 1991). El único gen nuclear *ND11*, (*ORFYML120c*) localizado en el cromosoma XIII, consta de una *ORF* de 1539 pb que codifican para una proteína precursora de 513 aminoácidos. Esta proteína tiene un peso molecular de 57 kDa (de

Vries *et al.*, 1992) y una secuencia amino-terminal de 26 aminoácidos que le sirve para el importe hacia la mitocondria (de Vries *et al.*, 1992).

Después de su purificación inicial, se pensó que la proteína Ndi1p era una NADH deshidrogenasa externa (de Vries y Grivell, 1988). Posteriormente se estableció que la proteína madura Ndi1p estaba localizada en la membrana mitocondrial interna, con su sitio activo mirando hacia la matriz mitocondrial (Marres *et al.*, 1991).

La proteína Ndi1p reacciona específicamente con NADH. Su actividad con compuestos relacionados tales como NADPH o deamino-NADH es al menos 250 veces menor que su actividad con NADH (de Vries y Grivell, 1988). La *K_m* para el NADH es aproximadamente de 30µM (de Vries y Grivell, 1988). *In vitro*, la proteína Ndi1p puede usar varios aceptores de electrones, como por ejemplo ubiquinona-2, ubiquinona-6, dicloroindofenol o ferricianida (de Vries y Grivell, 1988). Cuando está localizada en la membrana mitocondrial, la actividad de Ndi1p con ubiquinona-2 es cinco veces mayor que con el aceptor de electrones endógeno ubiquinona-6 (de Vries y Grivell, 1988). Con la ubiquinona-6 como sustrato, la proteína Ndi1p tiene un pH óptimo muy amplio, desde pH 4,5 a 9,5 (de Vries y Grivell, 1988). Esta enzima es inhibida por flavona, pero es insensible a los inhibidores típicos del complejo de tipo I, tales como la rotenona (de Vries y Grivell, 1988; Rosenfeld y Beauvoit, 2003).

El gen *NDII* está sujeto a represión por glucosa. Cuando crece en fuentes de carbono no fermentables, tales como lactato o etanol, *S. cerevisiae* contiene mucha más proteína Ndi1p que en glucosa como fuente de carbono fermentable (de Vries y Grivell, 1988). En cultivos continuos con glucosa, los niveles de mRNA de la *NDII* aumentan cuatro veces después del *shift* diáuxico, es decir, después de que la glucosa se termina y las células continúan creciendo en el etanol que se produjo previamente en las primeras fases de crecimiento del cultivo (de Risi *et al.*, 1997). Los niveles de mRNA de la *NDII* disminuyen sólo dos veces en cultivos anaerobios con respecto a los cultivos aerobios.

Fisiología de los mutantes *Andi1*

Las mitocondrias aisladas de los mutantes *Andi1* de *S. cerevisiae* no oxidan sustratos que generan NADH en la matriz mitocondrial, por ejemplo malato junto con piruvato o etanol. Esto confirma que la proteína Ndi1p es la única NADH deshidrogenasa mitocondrial interna de *S. cerevisiae* (Bakker *et al.*, 2000; Marres *et al.*,

1991). En medios de cultivo con glucosa, galactosa o etanol como única fuente de carbono, los mutantes *Andi1* muestran una tasa de crecimiento específica similar a la de las células de tipo salvaje (Marres *et al.*, 1991). Por el contrario, en acetato y piruvato, el crecimiento se suprime (Marres *et al.*, 1991). Es sorprendente que el mutante *Andi1* tenga un crecimiento normal en etanol, ya que para la completa disimilación del etanol se esperaba que necesitase la reoxidación del NADH intramitocondrial generado en el ciclo del ácido cítrico. En ausencia de una NADH deshidrogenasa mitocondrial interna, una lanzadera redox podría transportar los equivalentes redox desde la matriz mitocondrial al citosol, acoplando la oxidación del NADH intramitocondrial a las NADH deshidrogenasas externas o a la lanzadera glicerol-3-fosfato.

Un posible mecanismo que acople la oxidación del NADH intramitocondrial a las NADH deshidrogenasas externas podría ser la lanzadera etanol-acetaldehído (figura 15). Esta lanzadera, propuesta por Von Jagow y Klingenberg (1970), consiste en una isoenzima mitocondrial y una citosólica de la alcohol deshidrogenasa. Como el etanol y el acetaldehído generalmente difunden libremente a través de las membranas biológicas, no se necesitan transportadores biológicos para el intercambio neto de NADH mitocondrial y NAD^+ citosólico. Además, este proceso no necesita energía de Gibbs adicional.

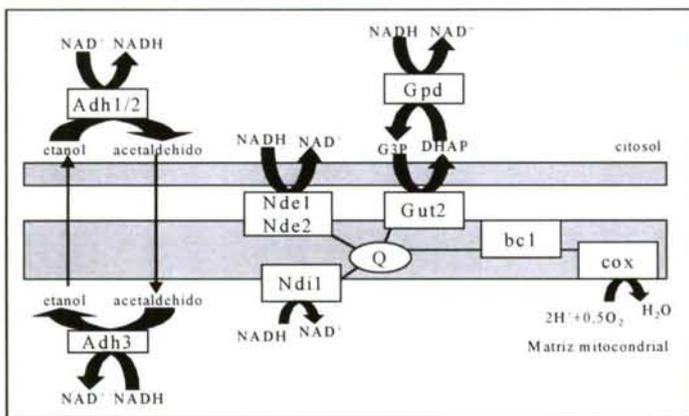


Figura 15: Esquema de la cadena respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*. Adh, alcohol deshidrogenasa; bc1, complejo bc1; cox, citocromo c oxidasa; Gpd, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa soluble; Gut2, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa unida a membrana; Nde, NADH deshidrogenasa externa; Ndi1, NADH deshidrogenasa interna; Q, ubiquinona; G3P, glicerol-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato. Figura modificada de Bakker *et al.* (2000).

Existen evidencias experimentales de que esta lanzadera opera en los mutantes *Andi1* de *S. cerevisiae*. Por el contrario de lo que ocurre con los mutantes únicos *Adh3*

y *Andi1*, el doble mutante $\Delta adh3\Delta andi1$, que carece de la proteínas Ndi1p y de la alcohol deshidrogenasa Adh3p (Young y Pilgrim, 1985), no muestra crecimiento respirador en cultivos continuos aerobios con glucosa como fuente de carbono limitante. Sin embargo, mostró una alta tasa de fermentación alcohólica y un bajo rendimiento en biomasa (Bakker *et al.*, 2001). El hecho de que el rendimiento de biomasa del mutante *Andi1* en glucosa sea de $0,43\text{gg}^{-1}$ frente a $0,49\text{gg}^{-1}$ para el salvaje, apoya la idea de que opere una lanzadera redox que no requiere una energía metabólica neta (Bakker *et al.*, 2001).

Expresión heteróloga de la *ND1* de levadura: terapia génica de mamíferos deficientes en el complejo de tipo I

La NADH-quinona (Q) oxidorreductasa de mamíferos, también denominada complejo de tipo I, está compuesta de al menos 43 subunidades, siete de ellas son codificadas por ADN mitocondrial y se designan por ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, el resto están codificadas por ADN nuclear (Bai *et al.*, 2001). Las mutaciones y deleciones en las siete subunidades codificadas por ADN mitocondrial no son corregibles y las mutaciones en las subunidades codificadas por ADN nuclear son difíciles de reparar (de Grey, 2000). Se han probado distintas quimioterapias pero no resultaron efectivas (Shoffner y Wallace, 1994; Chrzanowska-Lightowlers *et al.*, 1995; Bai *et al.*, 2001). Defectos en el complejo de tipo I están asociados a varias enfermedades mitocondriales en humanos (Schapira, 1998; Robinson, 1998), una de ellas es la LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber, Bai *et al.*, 2001). Por ello, las células de mamíferos deficientes en el complejo de tipo I NADH deshidrogenasa poseen ciertos desórdenes celulares (Kitajima-Ihara y Yagi, 1998), principalmente debido al deterioro en la capacidad de la cadena respiratoria para oxidar el NADH a NAD^+ (provocando acidosis láctica) y el deterioro de la capacidad de esta enzima para bombear protones produciendo una disminución de la tasa de síntesis de ATP y un incremento en la producción de radicales superóxido (Wallace, 1992). Esto a su vez provoca mutaciones en el ADN mitocondrial, peroxidación de lípidos, desnaturalización proteica, etc. De todos estos problemas quizás el deterioro de la capacidad de la enzima para bombear protones y la producción de radicales superóxido sean los peores. Por ello en la actualidad se están investigando un gran número de terapias, una de ellas consiste

en la propuesta de la *NDII* de *S. cerevisiae* como una candidata para terapia génica de pacientes deficientes del complejo de tipo I (Barrientos, 2003) basándose en que:

- a) La proteína Ndi1p de *S. cerevisiae* es más simple que el complejo de tipo I, ya que la proteína Ndi1p está formada por una única subunidad mientras que el complejo de tipo I posee al menos 43 subunidades (Seo *et al.*, 1998).
- b) La proteína Ndi1p cataliza una reacción de dos electrones mientras que el complejo de tipo I cataliza una reacción de un electrón. Esto reduciría el riesgo de producción de radicales libres (Seo *et al.*, 1998).

La *NDII* de *S. cerevisiae* ha sido expresada en la bacteria *E. coli* (Kitajima-Ihara y Yagi, 1998) en plantas y hongos. Además, el complejo de tipo I y la Ndi1p de *S. cerevisiae* pueden coexistir en las mitocondrias de bacterias, plantas y hongos (Yagi, 1991; Moller *et al.*, 1993; Luttk *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000) sugiriendo que ni la asociación Ndi1p con la membrana mitocondrial interna ni su función son impedidas por la presencia del complejo I endógeno. En las células transformadas, la proteína Ndi1p actúa como una parte integral de la cadena respiratoria. Además, la expresión heteróloga de la *NDII* de *S. cerevisiae* en fibroblastos de pulmón de hamster chino deficientes en el complejo de tipo I restauró la oxidación del NADH intramitocondrial. Esta actividad no fue inhibida por rotenona, un inhibidor del complejo de tipo I, pero fue inhibida por flavona, un inhibidor de la *NDII* de *S. cerevisiae* (Seo *et al.*, 1998). La expresión de la *NDII* también restauró la habilidad de las células de hamster chino deficientes en el complejo de tipo I para crecer en galactosa, lo cual requiere una cadena respiratoria funcional (Seo *et al.*, 1998). Más recientemente, la *NDII* de *S. cerevisiae* fue expresada en células de riñón humano (Seo *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 2000) consiguiendo también que en estas células la proteína de *S. cerevisiae* fuese funcional. Estos estudios de expresión heteróloga demuestran que la proteína Ndi1p puede funcionar en varios tipos celulares, desde bacterias hasta células de mamíferos. Este hecho hace que el gen *NDII* de *S. cerevisiae* sea un candidato interesante para terapia génica de pacientes deficientes del complejo de tipo I.

El experimento inverso, la expresión funcional del complejo de tipo I en *S. cerevisiae*, podría ser una manera interesante de incrementar los rendimientos de biomasa en esta levadura. Pero esto es mucho más complicado que la expresión heteróloga de la *NDII*, puesto que el complejo de tipo I consta de muchas subunidades

de las cuales unas son codificadas por el genoma mitocondrial y otras por el genoma nuclear.

NADH deshidrogenasas externas

Las mitocondrias de levaduras al igual que la de las plantas (Moller *et al.*, 1993) pero en contraste con las mitocondrias de mamíferos (de Vries y Marres, 1987), no sólo contienen una NADH deshidrogenasa mitocondrial interna, sino que también poseen actividad NADH deshidrogenasa externa (Von Jagow y Klingenberg, 1970; Rosenfeld y Beauvoit, 2003). Al igual que la NADH deshidrogenasa interna, la isoenzima externa es insensible a rotenona y no bombea protones (Rosenfeld y Beauvoit, 2003). *S. cerevisiae* tiene dos genes que codifican para isoenzimas NADH deshidrogenasas externas, *NDE1*, (*ORFYMR145c*) localizada en el cromosoma XIII, y *NDE2*, (*ORFYDL085w*) localizada en el cromosoma VI (Luttik *et al.*, 1998; Small y McAlister-Henn, 1998; Rosenfeld y Beauvoit, 2003). Estas deshidrogenasas externas se localizan en la membrana mitocondrial interna pero su sitio activo se encuentra mirando hacia el espacio intermembrana de la mitocondria. La existencia de estas deshidrogenasas externas parece consecuente con la aparente ausencia de la lanzadera malato-aspartato en esta levadura (Luttik *et al.*, 1998). Ambos genes fueron identificados en base a sus homologías con la *NDII*. La secuencia de aminoácidos de la proteína Nde1p posee un 48% de identidad con la proteína Ndi1p y la secuencia de aminoácidos de la proteína Nde2p posee un 46% de identidad con la Ndi1p. La identidad de las secuencias peptídicas de Nde1p y Nde2p es del 62%. El alineamiento de las tres secuencias proteicas reveló que las proteínas Nde1p y Nde2p poseen una extensión amino-terminal que está ausente en la proteína Ndi1p (Small y McAlister-Henn, 1998). Esta extensión puede contener señales para dirigir la proteína a la membrana mitocondrial interna y determinar su localización hacia el lado citoplasmático. Hasta ahora, todavía no se han realizado experimentos para demostrar qué partes de las secuencias amino-terminales de las proteínas Nde1p y Nde2p son responsables de dirigir la proteína a la mitocondria.

Otro mecanismo alternativo para la oxidación mitocondrial del NADH citosólico es, además de las NADH deshidrogenasas externas, la lanzadera glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Ambos mecanismos tienen una función metabólica similar y son los más importantes para el mantenimiento del balance redox citosólico durante el crecimiento aeróbico en *S. cerevisiae*. Esta lanzadera consta de dos enzimas, una

citósica soluble que es la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd1p) y la glicerol-3-fosfato: ubiquinona oxidoreductasa (Gut2p) que se encuentra unida a la membrana mitocondrial interna con su sitio catalítico mirando hacia el citosol (Larson *et al.*, 1998; Rosenfeld y Beauvoit, 2003; Rigoulet *et al.*, 2004). El NADH es reoxidado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citósica (Gpd1p) cuando cataliza la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-fosfato. El glicerol-3-fosfato devuelve sus electrones a la cadena respiratoria via Gut2p (Rigoulet *et al.*, 2004). Aunque los dos sistemas, las NADH deshidrogenasas externas y la lanzadera glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, son capaces, en parte, de sustituirse uno al otro, la capacidad de Gut2p no es suficiente para reemplazar la actividad Nde1p/Nde2p cuando el flujo de NADH es alto (Rigoulet *et al.*, 2004). La actividad de las NADH deshidrogenasas externas tiene un efecto inhibitorio sobre la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citósica y también sobre Gut2p. Además, a altas concentraciones de glucosa se inactiva la lanzadera glicerol-3-fosfato deshidrogenasa porque uno de sus componentes, la Gut2p, está sujeta a represión por glucosa (Rigoulet *et al.*, 2004).

Luttik *et al.* (1998) mostraron que las mitocondrias aisladas del mutante *Ande1Ande2* no oxidan NADH exógeno. Small y McAlister-Henn (1998), sin embargo, relataron la existencia de oxidación residual del NADH exógeno por las mitocondrias del mutante *Ande1Ande2*. Esta discrepancia puede ser explicada por el hecho de que los últimos autores usaron NADH comercial, el cual contiene una cantidad sustancial de etanol (0,5 mol de etanol por mol de NADH) (Luttik *et al.*, 1998; Patchett y Jones, 1986). El etanol es oxidado rápidamente por las mitocondrias aisladas de levadura gracias a la alcohol deshidrogenasa intramitocondrial (Adh3p) y la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna. Luttik *et al.* (1998) usaron NADH puro, generado *in situ* a partir de glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium*, glucosa y NAD^+ . Ellos mostraron que toda la oxidación residual del NADH por las mitocondrias del mutante *Ande1Ande2*, medida con NADH comercial, fue debida al etanol. Cuando las células, creciendo en continuo con glucosa como fuente de carbono limitante o en frascos en agitación con etanol, poseen un crecimiento respirador, la delección del gen *NDE2* por sí sola no disminuye sustancialmente la tasa de oxidación mitocondrial de NADH exógeno. Por el contrario, la delección del gen *NDE1* causó un descenso de tres veces en mitocondrias aisladas a partir de estos cultivos (Luttik *et al.*, 1998; Small y McAlister-Henn, 1998). Esto sugiere que el papel fisiológico de la *NDE1* es más

importante que el de la *NDE2*, al menos durante el crecimiento respirador en glucosa o etanol.

En cultivos de cepas salvajes de *S. cerevisiae* en frascos con agitación y con glucosa, se ha observado que los niveles de transcripción de *NDE1* y *NDE2* aumentan después del *shift* diáxico, es decir, cuando la glucosa se consume por completo y las células empiezan a consumir el etanol producido en la primera fase de crecimiento (de Risi *et al.*, 1997). La *NDE2* se induce mucho más fuertemente (siete veces) que la *NDE1* (dos veces). Los niveles de mRNA de la *NDE1* y *NDE2*, cuando las células crecen en glucosa, son aproximadamente idénticos a cuando crecen en galactosa (Small y McAlister-Henn, 1998; Roth *et al.*, 1998). La *NDE1* y *NDE2* son genes típicamente aerobios. En cultivos continuos con glucosa, los niveles de mRNA de la *NDE1* aumentan más de cuatro veces cuando se pasa de condiciones anaerobias a aerobias, mientras que los niveles de la *NDE2* aumentan catorce veces bajo estas condiciones (Ter Linde *et al.*, 1999).

Fisiología del mutante *Ande1Ande2*

En cultivos en agitación con glucosa, la velocidad de crecimiento del mutante *Ande1Ande2* fue aproximadamente similar a la del salvaje (Bakker *et al.*, 2001). Esto no es de extrañar porque el crecimiento de *S. cerevisiae* bajo estas condiciones es predominantemente fermentador (Lagunas, 1993). En un medio con etanol o galactosa el mutante *Ande1Ande2* creció más lentamente que la cepa salvaje (Luttik *et al.*, 1998; Small y McAlister-Henn, 1998). Este descenso en la tasa de crecimiento podría ser atribuido únicamente a la delección de la *NDE1*, puesto que la delección de la *NDE2* no tiene ningún efecto. Esto significa que la *NDE1* es fisiológicamente más importante que la *NDE2*. Además, estos resultados indican que los mecanismos alternativos que podrían acoplar la oxidación del NADH citosólico a la cadena respiratoria mitocondrial (por ejemplo la lanzadera glicerol-3-fosfato) no pueden reemplazar completamente a las NADH deshidrogenasas externas.

En cultivos continuos aerobios con glucosa, el crecimiento de cepas salvajes de *S. cerevisiae* es completamente respirador a bajas tasas de dilución, mientras que el metabolismo respiro-fermentador ocurre a altas tasas de dilución. El crecimiento completamente respirador en glucosa implica que todo el NADH producido en la

glucólisis por la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es oxidado via respiración mitocondrial. La delección de ambos genes *NDE* causa una reducción de la tasa de dilución crítica. A bajas tasas de dilución, el crecimiento del mutante *Ande1Ande2* es casi completamente respirador, con producción de glicerol en cantidades traza. Esto indica que, a bajas tasas de crecimiento específico, el papel de las deshidrogenasas externas puede ser desempeñado por la lanzadera glicerol-3-fosfato u otros sistemas citosólicos que oxiden el NADH (Bakker *et al.*, 2001).

Las deshidrogenasas mitocondriales alternativas de *Yarrowia lipolytica*

La cadena respiratoria de *Y. lipolytica*, levadura aerobia obligada, es más parecida a la de mamíferos que a la de la levadura *S. cerevisiae*. *Y. lipolytica* posee el complejo de tipo I (Kerscher *et al.*, 2002), que está compuesto de 35 o más subunidades (Djafarzadeh *et al.*, 2000). Esta NADH:ubiquinona oxidorreductasa es esencial para la cepa salvaje en esta levadura, es por ello que las delecciones en los genes de las subunidades del complejo I sólo pueden ser generadas en cepas diploides y mantenidas como alelos recesivos letales en estado heterocigoto.

La cadena respiratoria de *Y. lipolytica* contiene también dos enzimas que no están presentes en mamíferos y que se denominan enzimas "alternativas", éstas son las codificadas por los genes *NDH2* y la *AOX*. Kerscher *et al.* (1999) identificaron el gen *YINDH2* como el único gen que codifica para una NADH:ubiquinona oxidorreductasa alternativa en la levadura aerobia obligada *Y. lipolytica*. Por el contrario de lo que ocurre en el complejo I, no acepta deaminoNADH (Matsushita *et al.*, 1987) como donador de electrones. Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae* y *N. crassa*, sólo hay un tipo de NADH deshidrogenasa alternativa presente en *Y. lipolytica*, esta deshidrogenasa alternativa tiene su sitio activo hacia la cara externa de la membrana mitocondrial interna (Kerscher *et al.*, 1999).

Las cepas portadoras de la delección del gen *YINDH2* son completamente viables ya que la cepa parental haploide y el mutante poseen igual tasa de crecimiento e igual rendimiento en medio mínimo o medio completo con glucosa o acetato sódico como fuentes de carbono (Kerscher *et al.*, 1999). Además de la actividad Ndh2p, se piensa que existen otros mecanismos para la oxidación del NADH citoplasmático en esta levadura. Kerscher *et al.* (1999) han demostrado, en mitocondrias aisladas, que el complejo I es la única NADH:ubiquinona oxidorreductasa interna presente en esta

levadura. En otros hongos como por ejemplo en *N. crassa* y en plantas, ya se ha postulado la existencia de múltiples enzimas NADH:ubiquinona oxidorreductasa internas y externas (Weiss *et al.*, 1970; Von Jagow y Klingenberg, 1970; Soole y Menz, 1995; Rasmusson *et al.*, 1998).

La mayoría de las lanzaderas redox mitocondriales descritas para mamíferos y hongos (Overkamp *et al.*, 2000; Bakker *et al.*, 2000), encargadas de transportar el NADH producido en el citosol a la matriz mitocondrial, no son fácilmente reversibles, es por ello que lanzar los equivalentes reducidos desde la matriz mitocondrial al citosol resulte problemático. La orientación externa de la *NDH2* de *Y. lipolytica* implica que ésta no sea capaz de suplir al complejo I oxidando el NADH generado en la matriz mitocondrial. Esto explica porqué el complejo I es esencial en *Y. lipolytica*. La enzima *NDH2* de *Y. lipolytica* transfiere los electrones desde el NADH citoplasmático al "pool" ubiquinona. La delección de *NDH2* no afecta apreciablemente a la viabilidad o tasa de crecimiento en varios medios mínimos y completos, sugiriendo la existencia de rutas redundantes que realizan esta función (Kerscher *et al.*, 1999).

La enzima *AOX*, oxidasa alternativa resistente a cianida, también consta de una única subunidad que lleva a cabo la transferencia de electrones desde el ubiquinol directamente al oxígeno molecular evitando los complejos III y IV (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Esta enzima está en forma inactiva cuando las células entran en fase estacionaria y se activa bajo condiciones de estrés. Esta enzima, responsable de la respiración insensible a cianida, transfiere los electrones desde la ubiquinona reducida (coenzima Q) al oxígeno independientemente de la cadena respiratoria principal de citocromos. Uno de los grandes dilemas con respecto a la oxidasa alternativa era saber si podría competir con la cadena respiratoria de citocromos por los electrones. Medentsev y colaboradores (2002) demostraron que esta enzima es incapaz de competir y que sólo transfiere los electrones que son superfluos para la cadena respiratoria de citocromos. La *AOX* no está presente en *S. cerevisiae* ni en otras levaduras fermentadoras, indicando que en ausencia del complejo I esta enzima resulta ser obsoleta.

Cepas transgénicas de *Y. lipolytica* que poseen una copia de la deshidrogenasa mitocondrial interna I de *S. cerevisiae*, conteniendo una secuencia señal de importe a la mitocondria, y que poseen un complejo I no funcional, pueden crecer en presencia de inhibidores del complejo I, de esta forma se pueden aislar cepas haploides que porten delecciones en las subunidades del complejo I (Kerscher *et al.*, 2001).

El análisis de las relaciones filogenéticas de las proteínas NADH:ubiquinona oxidorreductasa alternativa de *Y. lipolytica*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* y *E. coli* revelaron que la proteína ScNdi1p de *S. cerevisiae* está, en términos de evolución, más distante que las otras dos NADH deshidrogenasas externas de esta misma levadura y que las NADH deshidrogenasas de *Y. lipolytica* y *S. pombe* (figura 16). Es por ello por lo que se especula que originalmente el ancestro común de las NADH:ubiquinonas oxidorreductasas alternativas de hongos tuviesen una orientación externa y que la enzima interna de *S. cerevisiae* tuvo que adquirir la secuencia señal para la matriz mitocondrial y la pérdida del complejo I.

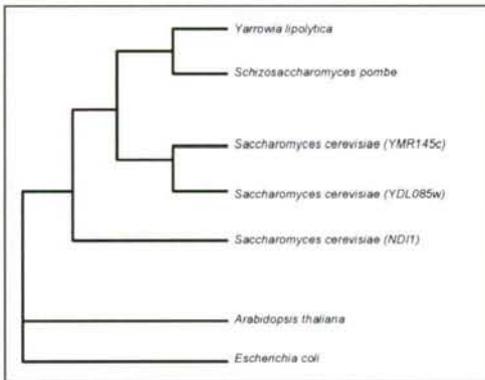


Figura 16: Árbol filogenético de NADH:ubiquinonas oxidorreductasas de diferentes organismos.

Todavía queda pendiente por determinar cuantos genes NADH:ubiquinona oxidorreductasa existen en otras levaduras ascomicetos, especialmente en especies fermentadoras como *S. pombe* y *Kluyveromyces marxianus*. La enzima de *S. pombe*, al igual que la de *Y. lipolytica*, se piensa que podría ser externa (Kerscher *et al.*, 1999). Las levaduras aerobias estrictas *Candida pinus*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula minuta*, *R. mucilagosa* y *Trichosporon beigelii* poseen el complejo I. Las levaduras fermentadoras facultativas tales como *S. cerevisiae* y *K. marxianus* no poseen este complejo y en su lugar poseen NADH: ubiquinonas oxidorreductasas.

Las deshidrogenasas alternativas mitocondriales de *Neurospora crassa*

N. crassa ha sido un modelo genético útil para caracterizar el complejo I. El complejo I de *N. crassa* contiene aproximadamente 35 subunidades polipeptídicas (Weiss *et al.*, 1991), al menos 7 de ellas son codificadas por ADN mitocondrial (Ise *et al.*, 1985; Videira y Werner, 1989), 32 proteínas ya han sido identificadas y la mayoría

de las subunidades codificadas por ADN nuclear ya han sido localizadas en el genoma y clonadas (Videira y Duarte, 2001). Sólo 4 de las proteínas no han sido identificadas con su correspondiente proteína en mamíferos, esto sugiere el alto grado de conservación del complejo I mitocondrial entre las distintas especies. Las 14 subunidades presentes en el complejo I de procariotas ya han sido identificadas con sus proteínas homólogas en *N. crassa* (Sousa *et al.*, 1999).

Existen modelos teóricos que explican la posibilidad de bombear cuatro protones a través de la membrana mitocondrial interna por cada par de electrones transferidos en el complejo I (Friedrich, 2001; Brandt, 1997; Vinogradov, 2001).

Se sabe que el papel que desempeña el complejo I en la célula no es sólo bioenergético. Existen muchas subunidades adicionales constituyentes de esta enzima mitocondrial, que no existen en procariotas, y que se piensa que alguna de ellas intervenga realizando diferentes funciones como por ejemplo evitar el escape de electrones, impidiendo que generen radicales de oxígeno (Robinson, 1998), o uniendo otros complejos respiradores (Budde *et al.*, 2000). Es por ello por lo que el complejo I parece estar implicado en varios procesos biológicos, desde rutas metabólicas en microorganismos hasta el desarrollo de hongos y plantas. En *N. crassa* esta enzima no es esencial durante el crecimiento vegetativo, además, las cepas mutantes pueden crecer gracias a la existencia de NADH deshidrogenasas alternativas. Sin embargo, este complejo I es necesario para el desarrollo sexual. Este complejo I también es esencial para el desarrollo embrionario en *D. melanogaster* (Ragone *et al.*, 1999) y *C. elegans* (de Vries *et al.*, 1992).

Hace más de tres décadas que se propuso la existencia de dos NADH deshidrogenasas alternativas insensibles a rotenona en *N. crassa*, una interna y otra externa (Weiss *et al.*, 1970). Posteriormente se vio que en fase temprana de crecimiento exponencial existía una actividad NAD(P)H externa sensible a calcio y una mayor actividad de la enzima interna (Schwitzgnebel y Palmer, 1982; Moller *et al.*, 1982). Más recientemente se ha caracterizado el gen de una enzima externa *NDE1* (Melo *et al.*, 2001). Comparando las actividades entre la cepa salvaje de *N. crassa* y el mutante nulo para la *NDE1*, estos autores observaron que la enzima codificada por *NDE1* es usada principalmente para la oxidación del NAD(P)H. Esta actividad es dependiente de calcio lo que explica la existencia de un motivo de unión a calcio en la secuencia proteica. Este dominio de unión a calcio también está presente en una NADH deshidrogenasa alternativa de *Solanum tuberosum*, en concreto en la deshidrogenasa externa *NDB*, y en

una supuesta NADH:ubiquinona reductasa de *A. thaliana*. Estos autores postularon que la unión al calcio induce cambios conformacionales que incrementan la afinidad enzima-sustrato. Esta proteína está anclada a la membrana por un dominio transmembrana localizado en la región N-terminal. Además, en su secuencia aminoacídica localizaron la existencia de dos consensos ricos en glicina (GXGXXG) en una estructura secundaria lámina β -hélice α -lámina β . Melo *et al.* (2001) especularon que el primer consenso sería de unión a NAD(P)H y el segundo de unión a FAD, también indicaron la presencia de una segunda NADH deshidrogenasa en la cara externa de la membrana mitocondrial interna de *N. crassa*. En las secuencias genómicas de *N. crassa* liberadas en el año 2001 por el Proyecto de Secuenciación de *Neurospora* del Instituto Whitehead (Centro MIT) para la investigación del genoma (<http://www.genome.wi.mit.edu>) existen tres NADH deshidrogenasas alternativas similares a la enzima *NDE1*. Estas proteínas contienen motivos para su presunta unión a FAD y NAD(P)H y se denominan p13, p36 y p76. Sorprendentemente un análisis informático predijo que las cuatro proteínas muestran un segmento transmembrana en la región N-terminal indicando que su interacción con la membrana está conservada (Videira y Duarte, 2002). Estos fragmentos transmembrana están ausentes en proteínas similares de otros organismos. La proteína p13 parece ser una NADH deshidrogenasa interna insensible a rotenona, la p36 representa una NADH deshidrogenasa externa (Melo *et al.*, 2001) y p76 todavía no está claro si es una proteína mitocondrial. Si lo fuese *N. crassa* tendría cuatro NADH deshidrogenasas alternativas como ocurre en plantas. También en las secuencias genómicas de *Aspergillus nidulans* depositadas en la base de datos de secuencias del *Cereon Microbial* se pueden encontrar cuatro secuencias independientes que codifican para cuatro proteínas similares a las citadas anteriormente.

Más recientemente, Duarte *et al.* (2003) identificaron un gen que codifica para una NADH deshidrogenasa mitocondrial interna de *N. crassa* (*NDI1* que codifica para la proteína p13). Este gen codifica para una proteína precursora de 538 aminoácidos con una masa molecular estimada de 59 kDa. La estructura primaria de la proteína, en su extremo amino-terminal, incluye una secuencia señal de importe a la mitocondria de 31 aminoácidos que no aparece en la proteína madura. Consta de dos secuencias consenso para la unión del dinucleótido NADH o FAD (plegamiento $\beta\alpha\beta$).

Para investigar más acerca del papel específico de la Ndi1p, Duarte *et al.* (2003) interrumpieron el gen y observaron que la tasa de oxidación del NADH y NADPH en

mitocondrias de células salvajes era similar a la de las mitocondrias de las células mutantes. Estas actividades pueden ser debidas a la actuación de las enzimas localizadas en la membrana mitocondrial interna que miran hacia el espacio intermembranal. Si observaron diferencias en las actividades cuando estudiaron la tasa de oxidación del NADH de la matriz mitocondrial. Además, pudieron comprobar que todas las actividades respiradoras medidas tanto en las células salvajes como en el mutante, se bloquearon completamente cuando le añadieron antimicina A. También el hecho de que la actividad respiradora de la mitocondria del mutante *ndi1* sea casi completamente inhibida por rotenona, les sugirieron que la Ndi1p representa la única NADH deshidrogenasa alternativa interna (insensible a rotenona) responsable de la oxidación del NADH de la matriz mitocondrial en la mitocondria de *N. crassa*. Además, han comprobado que el complejo I y la *NDII* tienen funciones complementarias en *N. crassa* pues los mutantes en el complejo I o en la *ndi1* por sí solos son viables pero el doble mutante todavía no lo han podido obtener, lo que sugiere que ambas enzimas se complementan la una a la otra. También comprobaron que la *NDII* de *N. crassa* no es necesaria para el desarrollo vegetativo o sexual, al igual que el complejo I de este hongo, pero sí lo es durante la germinación de las esporas tanto sexuales como asexuales.

Carneiro *et al.* (2004) identificaron un gen que codifica para una NAD(P)H deshidrogenasa mitocondrial externa de *N. crassa* (*NDE2* que codifica para la proteína p36) que actúa oxidando sustratos citosólicos. Este gen codifica para una proteína precursora de 577 aminoácidos con una masa molecular estimada de 64,5 kDa. La secuencia codificadora es interrumpida por dos intrones de 100 y 64 pb. Los primeros 54 aminoácidos del extremo N-terminal son la secuencia de importe a la mitocondria. Esta enzima consta de dos consensos ricos en glicina (GXGXXG) en una estructura secundaria lámina β -hélice α -lámina β . El papel fisiológico que desempeñan estas NAD(P)H deshidrogenasas todavía no está muy claro. Carneiro *et al.* (2004) demostraron que no son proteínas esenciales, al menos en *N. crassa* crecida en condiciones de laboratorio, puesto que ellos fueron capaces de aislar el triple mutante (en las dos externas y en la interna).

2. OBJETIVOS.

1. Diseño de una nueva estrategia basada en la *PCR* para el aislamiento de clones de interés a partir de una genoteca cuando se dispone de un fragmento de la secuencia del gen a clonar. Mejora de las estrategias existentes para aislar clones a partir de un genoteca de levaduras.

2. Aislamiento, caracterización y estudio de la regulación transcripcional del gen *KIFBA1* (fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa).
 - 2.1. Clonación del gen *KIFBA1* a partir de una genoteca de *Kluyveromyces lactis*.
 - 2.2. Secuenciación del gen *KIFBA1* incluyendo las regiones promotora y terminadora.
 - 2.3. Análisis “*in silico*” del gen *KIFBA1*.
 - 2.4. Constatación de la funcionalidad del gen *KIFBA1*.
 - 2.5. Determinación de las regiones del promotor del gen *KIFBA1* que contienen elementos reguladores.
 - 2.6. Estudio de la expresión del gen *KIFBA1* en condiciones seleccionadas.
 - 2.7. Producción de fructosa-1,6-bisfosfato a partir de lactosa.

3. Aislamiento, caracterización y estudio de la regulación transcripcional del gen *KINDII* (NADH:ubiquinona oxidoreductasa).
 - 3.1. Clonación del gen *KINDII* a partir de una genoteca de *K. lactis*.
 - 3.2. Secuenciación del gen *KINDII* incluyendo las regiones promotora y terminadora.
 - 3.3. Análisis “*in silico*” del gen *KINDII*.
 - 3.4. Estudio de la funcionalidad del gen *KINDII* mediante complementación heteróloga.
 - 3.5. Determinación de las regiones del promotor del gen *KINDII* que contienen elementos reguladores.
 - 3.6. Estudio de la expresión transcripcional del gen *KINDII* en condiciones seleccionadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. LINEAS CELULARES

1.1. Cepas de bacterias *Escherichia coli*

A continuación se describen las líneas bacterianas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo (tabla M1) para la amplificación de los plásmidos manejados y de las construcciones creadas.

Tabla M1: Cepas bacterianas empleadas.

LÍNEA	GENOTIPO	REFERENCIA/ PROCEDENCIA
XL1-Blue MRF'	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proAB' lacI^q lacZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene®
DH10B	<i>mcrAΔ(mrrhsdRMS-mcrBC)φ80dlacZΔM15ΔlacX74 deoR recA1 araΔ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ endA1 nupG</i>	GibcoBRL
HB101	<i>supE44 hsdS20(rB⁻ mB⁻)recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Bolivar y Backman, 1979

Las cepas bacterianas se conservaron habitualmente sembradas en estría en placas LB (ver medios de cultivo para bacterias) a 4°C tras haber sido cultivadas a 37°C durante un día. Se resembraron periódicamente cada dos meses. Las cepas transformadas con plásmidos que contenían genes marcadores de resistencia a ampicilina se conservaron en placas de medio LB suplementado con ampicilina. La cepa XL1-Blue MRF' se conservó en placas LB suplementadas con tetraciclina para evitar la pérdida del episoma F'.

Para el mantenimiento de las cepas a largo plazo, las bacterias se inocularon en los mismos medios líquidos y se dejaron crecer en agitación a 37°C, añadiéndose al día siguiente glicerol estéril hasta el 15% y congelando inmediatamente las muestras en tubos de polipropileno de 1,5 mL a -80°C.

1.2. Cepas de levaduras

Las cepas de levaduras (tablas M2 y M3) se conservaron habitualmente sembradas en placas YPD o CM al 2% de glucosa (ver medios de cultivo para levaduras) a 4°C tras haber sido cultivadas a 30°C durante dos o tres días. Se resembraron periódicamente

cada dos o tres meses. Para el mantenimiento de las cepas de levaduras a largo plazo se inocularon en medio YPD o CM, se dejaron crecer en agitación a 30°C, se les añadió glicerol estéril hasta un 50% y se congelaron a -80°C.

Tabla M2: Cepas de *S. cerevisiae* empleadas.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
GHI	<i>MATa trp1-289 leu2-3 leu2-112 gal1Δ152 lys2</i>	Dr. Zitomer, R.
FY73	<i>MATα ura3-52 his3Δ200</i>	Eurofan
SIS0-2B	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3</i>	Dr. Labbe-Bois, Paris.
SIS0-2B <i>hem1</i>	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 hem1Δ</i>	Dr. Labbe-Bois, Paris.
EBY-D9 (ENY.WA <i>fbal</i>)	<i>MATa/α ura3-52/ura3-52 leu2-3 112/leu2-3 112 TRP1/trp1-289 HIS3/his3-Δ1 MAL2-8⁺ MAL3 SUC3 GAL FBA1/<i>fbal</i>Δ::URA3</i>	Boles y Zimmermann, 1993.
BY4743	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4743 <i>fbal</i>	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 YKL060c::kanMX4/YKL060c</i>	Euroscarf
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4741 <i>ndi1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YML120c::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4742 <i>ndi1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YML120c::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>nde1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR145c::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4742 <i>nde1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YMR145c::kanMX4</i>	Euroscarf
FLPZ013-07B(A) (FY <i>nde2</i>)	<i>MATa ura3-52 HIS3 leu2Δ1 LYS2 trp1Δ63 YDL085w(4, 1635)::kanMX4</i>	Euroscarf
FLPZ014-04D(AL) (FY <i>nde2</i>)	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 LEU2 LYS2 TRP1 YDL085w(4, 1635)::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>rox1</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPR065w::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4742 <i>rox1</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YPR065w::kanMX4</i>	Euroscarf
BJ3505/YEpFLAG1- LAC4	<i>pep4::HIS3 prb-Δ1.6R HIS3 lys2-208 trp1-Δ101 ura3-52 gal2 can1</i>	Becerra <i>et al.</i> , 2002a

Tabla M3: Cepas de *K. lactis* empleadas.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
NRRL-Y1140*	<i>MATa</i> salvaje	Dr. Zitomer, R
PM5-3C	<i>MATa uraA Rag^r</i>	Dra. Wesołowski-Lovel, M Lyon.
PM5-2D	<i>MATa uraΔ1-1 metΔ1-1 argΔ1-1 trpΔ1-1 rag2-1</i>	Dra. Wesołowski-Lovel, M Lyon.
MW190-9B	<i>MATa lac4-8 uraA Rag^r</i>	Dra. Wesołowski-Lovel, M Lyon.
MW190-9B <i>hem1</i>	<i>MATa lac4-8 uraA Rag^r hem1Δ</i>	González-Domínguez <i>et al.</i> (1997).
W600B	<i>MATa ade leu</i>	Jong & Edwards (1990)
WM37	<i>MATa his</i>	Jong & Edwards (1990)
WMH7302-D1	<i>MATa leu2 uraA trp1 metA1 ade2 his2-2 hap3::Sc LEU2</i>	Dra Yolanda Blom

2. VECTORES

Se han empleado los siguientes vectores:

pGEM[®]-T-Easy (*Promega*). Contiene el promotor y parte del gen *lacZ*, *amp^r* y el *ori* bacteriano. Está cortado con la enzima de restricción *EcoR* V y presenta una timidina en ambos extremos 3', resultando útil en la clonación de productos procedentes de *PCR* amplificados por la ADN polimerasa *Taq*, ya que esta polimerasa añade una adenina al extremo 3' del fragmento amplificado (figura M1).

YEplac195 (Gietz y Sugino, 1988). Presenta el promotor y 438 pb del gen de la β-galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*) (Sambrook *et al.*, 1989), *amp^r*, *URA3*, *2μm* de la levadura y el *ori* bacteriano (figura M1). Es un vector lanzadera que frecuentemente se emplea para la construcción de genotecas. En el presente trabajo se empleó para la realización de ensayos de complementación.

YEplac24 (Rose *et al.*, 1984; Roberts, 1987). Vector que presenta *amp^r*, *tef*, el *ori* bacteriano, el *2 μm* de la levadura y el marcador de selección *URA3* (figura M1). Vector lanzadera empleado para la construcción de genotecas.

YCplac33 (Gietz y Sugino, 1988). Presenta el promotor y 438 pb del gen de la β-galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*) (Sambrook *et al.*, 1989), *amp^r*, *URA3*, *CEN4* y *ARS1* de la levadura y el *ori* bacteriano (figura M1). En el presente trabajo se empleó para la realización de ensayos de complementación.

pXW2 (Chen *et al.*, 1992a). Plásmido lanzadera empleado para el análisis de promotores fusionados al gen *lacZ* de la β -galactosidasa de *E. coli*. Presenta la *amp^r*, el *ori* bacteriano, el *S11* para la replicación en *K. lactis*, el marcador de selección *URA3*, y los genes *lacY*, *lacA* y *lacZ* que codifican para una permeasa, una tiogalactósido transacetilasa y para la β -galactosidasa de *E. coli*, (figura M1).

Kep6 (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1988). Vector lanzadera que presenta la *amp^r*, la *tel^r*, el *ori* bacteriano, el *S11* para la replicación en *K. lactis* y el marcador de selección *URA3* (figura M1). Vector empleado para la construcción de genotecas.

pAB24 (Botstein *et al.*, 1979). Vector que presenta el 2μ m para la replicación en *S. cerevisiae* (por cuatriplicado), dos repeticiones invertidas “*IR*”, el *LEU2-d*, la *amp^r*, la *tel^r* y el marcador de selección *URA3* (figura M1). Vector empleado para la construcción de genotecas.

pET21d(+) (Novagen). Este vector se ha empleado para la expresión de proteínas en *E. coli* (figura M1). El gen deseado se clona bajo el control del promotor T7, el cual no es reconocido por la ARN polimerasa de *E. coli* y, por tanto, la expresión no tiene lugar hasta que se le proporcione una fuente de T7 ARN polimerasa. Una vez que el plásmido es transferido a un hospedador de expresión, conteniendo una copia cromosomal del gen T7 ARN polimerasa bajo el control de *lacUV5*, la expresión de la proteína es inducida por la adición de IPTG (Isopropil β -D-tiogalactopiranosido).

3. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se describen los medios utilizados en cultivos de bacterias y levaduras. Para la preparación de medios sólidos se adicionó 1,5% de Bacto-Agar al correspondiente medio líquido. Las soluciones se esterizaron en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2Ba de presión.

3.1. Medios de cultivo para bacterias

LB (Luria-Bertani). Medio general de crecimiento de bacterias. Para seleccionar bacterias conteniendo plásmidos con genes de resistencia a antibióticos se suplementó el medio esterilizado con el antibiótico adecuado. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	1%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	0,5%
Glucosa	0,1%

LBA. Medio LB suplementado con ampicilina (suministrada por *Sigma Aldrich*) a una concentración final de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (a partir de una solución patrón 40 mg/mL en agua estéril). El antibiótico se añadió una vez esterilizado el medio, tras alcanzar una temperatura de 60-65°C. Este medio se utilizó para la selección de bacterias que habían sido transformadas con un plásmido conteniendo el gen de resistencia a la ampicilina. El gen que confiere la resistencia a la ampicilina codifica para una enzima que es secretada al espacio periplásmico de la bacteria, donde cataliza la hidrólisis del anillo β -lactámico del antibiótico provocando la pérdida de su toxicidad.

LBA/X-Gal+IPTG. Medio LBA suplementado con X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), un substrato cromogénico. Se utilizó para discriminar entre colonias blancas y azules (productoras de β -galactosidasa), a fin de identificar los plásmidos recombinantes por la pérdida de la actividad β -galactosidasa debida a la integración de un fragmento en el sitio de clonaje múltiple (*MCS*) que interrumpe el gen *lacZ* inactivándolo.

Antes de proceder a la siembra en placa, se extendieron sobre cada una de ellas 50 μL de una solución 20 mg/mL de X-Gal en dimetilformamida y 10 μL de una solución de 0,23 mg/mL de IPTG (Isopropil β -D-tiogalactopiranosido) en agua estéril. El IPTG es un inhibidor del represor *lac* y por lo tanto inductor del gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa en *E. coli*.

SOC. Medio empleado para la preparación de células competentes. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	2%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	0,0584% (10 mM)
KCl	0,0186% (2,5 mM)
Se ajustó el pH a 7 con KOH 1 M.	

YT. Medio empleado para el crecimiento de cepas bacterianas y, en determinadas ocasiones, para la preparación de células competentes. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	0,8%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	0,25%

YT/X-Gal+IPTG. Medio YT suplementado con X-Gal e IPTG a igual concentración final que para el medio de cultivo LBA/X-Gal+IPTG.

Terrific Broth. Medio de cultivo empleado para el crecimiento de bacterias en los experimentos de amplificación de genotecas. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	1,2%
Extracto de levadura	2,4%
Glicerol	0,4 mL

Después del esterilizado y cuando la temperatura del medio descendió a 60°C se añadió:

10xTB Fosfato (0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M $\text{K}_2\text{H PO}_4$)	10 mL
---	-------

3.2. Medios de cultivo para levaduras

Suero de leche. El permeado de suero de leche, variedad dulce, fue suministrado por la empresa QUEGALSA (LEYMA). Una vez traídos de la fábrica, en nuestro laboratorio, los sueros se almacenaron congelados a -20°C en alícuotas de un litro. Como paso previo a su utilización e inmediatamente después de ser descongelados se esterilizaron en autoclave (121°C y 2 Ba durante 20 minutos), provocando la coagulación de una parte de las proteínas. Para separar dichas proteínas, el suero se centrifugó en condiciones estériles (10 minutos a 10.000 r.p.m.). El sobrenadante así obtenido se empleó como medio de cultivo microbiológico. Su composición es la siguiente: 50 mg/mL de azúcares totales, 7,5 mg/mL de proteínas, 5 mg/mL de lípidos totales (Doval, 1992). Estudios previos indican que existe una deficiencia nutritiva en el suero de leche que puede afectar al crecimiento y/o a la secreción de la proteína por la levadura, pero esta deficiencia queda suplida si se suplementa el suero con extracto de levadura al 1% (Becerra, 1995).

En cada una de las alícuotas utilizadas se controló la posible contaminación microbiana, el contenido de lactosa y las variaciones de pH. El pH del permeado de suero de leche, variedad dulce, oscila entre 6 y 7, pero éste puede disminuir durante su almacenamiento. En aquellos casos en los que el pH tenía valores inferiores a 7, se le añadió hidróxido sódico hasta que el pH alcanzó la neutralidad.

YPD aerobio. Su composición es la siguiente:

Bactopeptona	0,5%
Extracto de levadura	1%
Glucosa	2%

En algunos experimentos la concentración de glucosa fue del 0,5% y en otros se cambió la fuente de carbono a lactato (YPL), fructosa (YPF), etanol (YPE) o glicerol (YPG) al 2% en vez de glucosa.

YPD anaerobio. Su composición es la siguiente:

Bactopeptona	0,5%
Extracto de levadura	1%
Glucosa	2%
Tween 80	0,2%

Medio de bioconversión. Este medio permite el crecimiento de levaduras, puede ser YPL o suero de leche (siendo este último el empleado en el presente trabajo), siempre y cuando la lactosa esté presente en un 5%. Además, ha de tener un 10% de NaH_2PO_4 (pH6.0). Este medio permite la hidrólisis de la lactosa y su utilización por las levaduras, para la producción de fructosa-1,6-bisfosfato.

CM (Medio Completo). Medio sintético preparado con variantes en función de la selección que se quería realizar. Así, por ejemplo, un medio CM-URA es un medio sintético completo al que no se le añadió uracilo y un medio CM-TRIP-ADE-HIS es un medio CM al que no se le añadieron los aminoácidos triptófano e histidina ni la base nitrogenada adenina. Habitualmente la fuente de carbono fue la glucosa al 2% pero ocasionalmente ésta fue sustituida por glucosa al 0,5%, glicerol al 2%, lactato 2%, etanol al 2% u otra fuente de carbono generalmente al 2%. Este medio también se le

denomina SC (*Synthetic Complete*). Se preparó según Zitomer y Hall (1976). Este medio sintético completo se compone de:

	Para 1 litro:
Glucosa	20 g
Mezcla de aminoácidos (200X)	5 mL
YNB*	67 mL
Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina, Tirosina	40 mg cada uno
Triptófano	30 mg

* Se añade, en condiciones estériles, después de la esterilización del resto de los componentes, cuando el medio de cultivo alcanza una temperatura de 60°C.

** Se omitió el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico.

Mezcla de aminoácidos (200X):	Para 1 litro:
Arginina, Metionina, Treonina	2 g cada uno
Isoleucina, Fenil-alanina	12 g cada uno
Lisina	8 g

YNB (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)	Para 1 litro:
Mezcla de vitaminas 300X	50 mL
Sales traza 150X	100 mL
Sulfato amónico*	75 g
KH ₂ PO ₄	15 g
MgSO ₄	7,5 g
NaCl	1,5 g
CaCl ₂	1,5 g

*Se añadió después de disolver el resto de los componentes para evitar que precipiten.

Mezcla de vitaminas 300X	Para 1 litro:	Sales Traza 150X	Para 1 litro:
Biotina	0,6 mg	Ácido bórico	75 mg
Pantotenato Cálcico	120 mg	Sulfato cúprico	6 mg
Ácido Fólico	0,6 mg	Ioduro potásico	15 mg
Inositol	600 mg	Cloruro férrico	30 mg
Niacina	120 mg	Sulfato manganoso	60 mg
p-Aminobenzoico	60 mg	Molibdato sódico	30 mg
Piridoxina	120 mg	Sulfato de zinc	60 mg
Riboflavina	60 mg		
Tiamina	120 mg		

En determinados experimentos se utilizó YNB sin sulfato amónico, YNB sin fosfato e YNB sin calcio (se sustituyó el pantotenato cálcico por pantotenato sódico)

Para realizar los ensayos de determinación cualitativa de la actividad β -galactosidasa en levaduras, se emplearon medios sólidos CM-URA/X-Gal, es decir,

medio sintético completo sin uracilo y con un suplemento del sustrato cromogénico X-Gal a igual concentración que para el medio LBA/X-Gal+IPTG.

Para llevar a cabo determinados experimentos de *Northern blot*, las células de levadura se cultivaron en medios líquidos CM-URA suplementados con ácido aminolevulínico (*ALA*) a diferentes concentraciones, 0,5 µg/mL y 100 µg/mL.

Top Agar. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	1%
NaCl	0,5%
Agar	0,65%

Se esterilizó y se conservó sólido, fundiéndolo en un horno de microondas antes de usarlo.

4. MARCADORES DE TAMAÑO MOLECULAR EMPLEADOS

Para calcular los tamaños de los fragmentos de ADN digeridos, de ARN o de proteínas, se han empleado los marcadores que se describen a continuación:

4.1. Marcadores moleculares de ADN

Marcador de 50 a 1000 pb de *BioWhittaker Molecular Applications* (figura M2A).

Marcador de 500 a 5000 pb (figura M2B) de *BioWhittaker Molecular Applications* suministrado por *Iberlabo* y de *Roche* (marcador XVII). Este último, pero marcado con digoxigenina, también se empleó en experimentos de *Southern blot* no radiactivos.

Marcador de 702 a 8454 pb de *New England Biolabs*. Este marcador procede de la digestión del ADN del bacteriófago lambda con la endonucleasa de restricción *BstE II* (figura M2C).

Marcador II de 125 a 23130 pb de *Roche*. Este marcador procede de la digestión del bacteriófago lambda con la endonucleasa de restricción *Hind III*. También se ha empleado, pero marcado con digoxigenina, en experimentos de *Southern blot* no radiactivos (figura M2D).

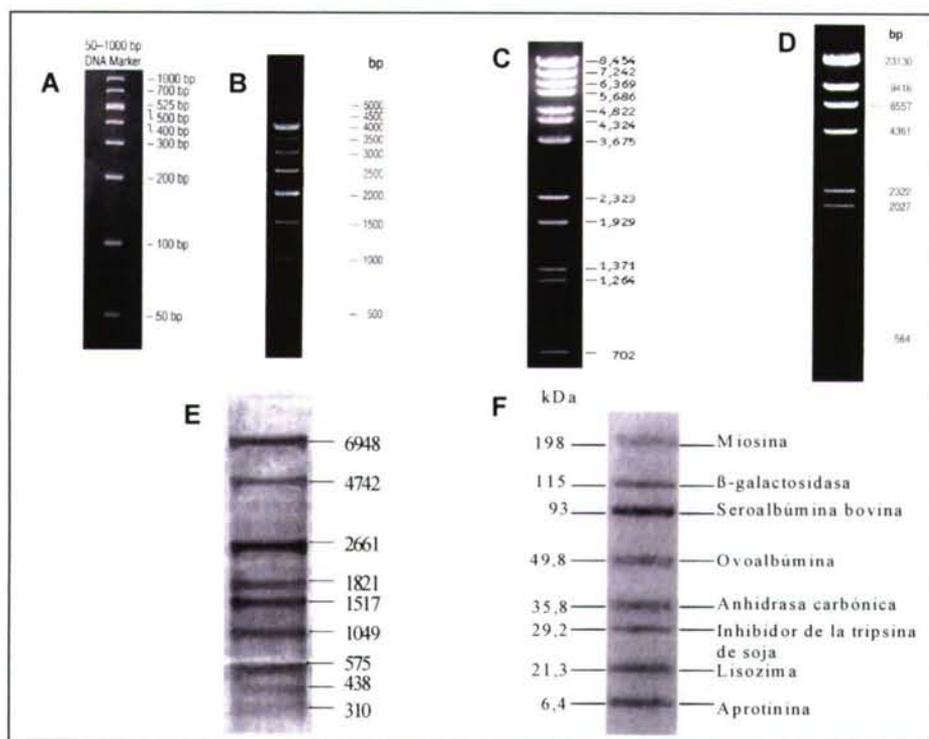


Figura M2: Marcadores de pesos moleculares empleados.

4.2. Marcadores moleculares de ARN

Marcador I marcado con digoxigenina de 310 a 6948 pb de *Roche*. Se ha empleado en experimentos de *Northern blot* no radiactivos (figura M2E).

4.3. Marcadores moleculares de proteínas

Se empleó el marcador de proteínas *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* de *Bio-Rad*, que comprende desde 6,4 a 198 kDa (figura M2F), como referencia de tamaños en electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (*SDS-PAGE*).

5. CEBADORES EMPLEADOS

En la siguiente tabla se muestran los cebadores empleados con sus secuencias correspondientes (tabla M4):

Tabla M4: Secuencia de los cebadores empleados.

CEBADORES	SECUENCIA
TETU	5'CGACCACACCCGTCCTG3'
TETL	5'GATGCGTCCGGGTAGA3'
TETRA1N*	5'GCTTCGCTACTTGGAGCCACT3'
TETRA2N*	5'GGTGATGTCGGCGACATAGGC3'
TETRA1V	5'TTGGAGCCACTATCGAC3'
TETRA2V	5'CCACTACGGCCGGTGTCT3'
TETRA1U	5'TTGGAGCCACTATCGACTACGCGA3'
TETRA2U	5'CCACTACAGCCGCTATATCCG3'
REVERSE	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'
UNIVERSAL	5'CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT3'
17 mer UNI	5'GTAAAACGACGGCCAGT3'
30LacZ	5'Cy5-CAGCTGGCGAAAGGGGGATG3'
70LacZ	5'Cy5-TCGCACTCCAGCCAGCTTCC3'
RIBOSÓMICO25s	5'CTCCGCTATTGATATGC3'
ECV225L	5'TGGAAAGTGGTCAAGAGGG3'
KLACT1-RT	5'CGAAAGATTCAGAGCTCCAG3'
SCALDO-5'	5'ATGGGTGTGAACAAATCTTAAAGAGA3'
SCALDO-3'	5'TTATAAAGTGTAGTGGTACGGAAAGT3'
SCALD-U1	5'CTGCCGTCGCTGCTTAGAAG3'
SCALD-L1	5'GGGTACCAGCTGGGGACATT3'
5' GENFBA1	5'ATATGAAAAAAGTTGTCGTGAATTTCC3'
3' GENFBA1	5'GCACAGCGGATCCCTGCCAATCAT3
KLORFFBAIR	5'TTATTCCAAAGCACCTTAGT3'
KLORFFBAIF	5'ATGCCAGCTCAAGACGTATT3'
OFKLALD1	5'GGACAAAGCTTCGTGGACAGAG3'
OMLKLFB1-1	5'Cy5-CCGTAAGCTGGAGCAATGGATCTG3'
KLALDO-U1	5'CCAAATCTTTGCAAACTCC3'
KLALDO-L1	5'TGATACGGACAAGTAAGCG3'
T7 PROMOTER	5'TAATACGACTACTATAGGG3'
EcopKLFB1	5'CGAATTCGAATGCCAGCTCAAGACGTATTG3'
PFBA-R	5'CTCGAGTTCCAAAGCACCTTAGTACG3'
KLPAF	5'CCAAAGCTTCATTGTAATTTCTTTAC3'
KLPAF2	5'GGGGATCCATATGAAAAAAGTTGT3'
KLPAF3	5'GGGGATCCCATTCATTCATATATAA3'
KLPAF5	5'GGGGATCCGGCCGCGGGAATTCGAT3'
KLRAG5-F	5'CCCGTAGCGAGCTGGAAAAA3'
KLRAG5-R	5'CGAGATGAAAAGGAGATGAGG3'
KLRAG2-F	5'ATCACGTGCCACAATTACCCT3'
KLRAG2-R	5'GGTAAAAAGGAAATTGCATCG3'
KLGA1-F	5'GGGTGGATCTTTTCATTTG3'
KLGA1-R	5'TAGTCTCATCAAAGCGTTCG3'
KLGA1-RT	5'TTAACGGCAACAATTCTAG3'
KLPGK3-F	5'AAGGATTTGGATGTCACCTGGT3'
KLPGK3-R	5'GGACAAGAAAGTGACACCAGG3'
OMLKLND11-1	5'Cy5-GGCAGACCAGCAAAAGCGTTGTCA3'
OMLKLND11-2	5'GCGTTCCTTCTACACTGGTGG3'
OFKLND11-3	5'CAACAACCGTGTCTATTGT3'
OFKLND11-4	5'GTTTGGCAAAGCTTCAACCA3'
OFKLND11-5	5'TTGGTGAACGATAGAAACG3'
OFKLND11-6	5'TGCCAGATCCAGATTC AAGG3'
OFKLND11-7	5'TTGCCAACGAAGTACGAAAAA3'
OFKLND11-8	5'GCGTACACTTGCATAAGGT3'
OFKLND11-9	5'CCCTCTTTTGGATCAATCT3'
OFKLND11-10	5'GCCAATTTCAACCAATCAGC3'
OFKLND11-11	5'CCCTCACTCTTTCGAAATCA3'
OFKLND11-12	5'GCCAAGGACGGTAGCAAGGT3'
OFKLND11-13	5'GCCTTCCGGTCAAACACTGG3'
OFKLND11-14	5'TGGTGTGTGGGTGTGGTGGGG3'
KLPIR	5'CCAAAGCTTCATTGCAAAATGAAATTG3'
KLPIF1	5'GGGGATCCGGAGTTTGCACCCAGGA3'
KLPIF2	5'GGGGATCCCAATATTACCCCGCGTG3'
KLPIF3	5'GGGGATCCACGGCTGTACAGCACACC3'
KLPIF4	5'GGGGATCCAGGTAATAGTCAAGCAG3'

KLPIF5	5'GGGGATCCGACGAATTCAAAAATCA3'
KLPIF6	5'GGGGATCCCTAAAAAGCCTCCGGT3'
KLPIF7	5'GGGGATCCTACCTCTGTTTACAAGAA3'
KLPIF8	5'GGGGATCCTTTAATCAGTTTTTTTTT3'
KLPIF1-8	5'GGGGATCCAAACCCCTACGAGTAAACTACCCACCACCCACACA CCATTTAATCAGTTTTTTTTT3'
KLPIF A	5'GGGGATCCTTACCCCGCCGTGCCGGAGTCTTTAATCAGTTTTTTTTT3'
KLPIF G	5'GGGGATCCACCACCCACACCCACAATAACACAAAAAAGGAAGAT GGTATTTAATCAGTTTTTTTTT3'
KLNDIIF	5'TGAAGAAAGCCAATTTCAACC3'
KLNDIIR	5'TTGAAAGCTTTGCCAAACG3'
SCNDIIF	5'CACGTTTACCCAAGAGAAGAA3'
SCNDIIR	5'TCCTTTTTCCAGAAAAGGGC3'
YIG1C3-R1	5'TGGATATAGACATTCAGACGACTCAA3'
YIG1C3-U1	5'CGTACTTTTAGCAATGACGATCAGAAT3'
YIG1C3RR	5'CAGCTCAAATTCAGGAAGTAGAAG3'
YIG1C3U1	5'GCAGCAGTATCTATATGGCACTC3'
YIG1C3RRR	5'GCACATGAAAAGATAGGGAAAGGAG3'

6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

6.1. Obtención de ácidos nucleicos

6.1.1. Extracción de ADN plasmídico de bacterias (Método de lisis alcalina)

El aislamiento de los plásmidos, a pequeña (1 mL de cultivo inicial) y mediana escala (25-50 mL de cultivo inicial), se realizó según el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.* 1989). Los volúmenes de las disoluciones utilizadas se adaptaron a cada caso.

Minipreparación (para un cultivo de 1 mL)

Las células se inocularon en 1 mL de medio LBA. Tras su crecimiento durante toda la noche a 37°C y en agitación orbital, se centrifugaron las células durante 3 minutos a 8.000 r.p.m. El sedimento se resuspendió en 100 µL de solución I previamente enfriada en hielo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se añadieron 200 µL de la solución II preparada en el momento, se mezcló por inversión 2 ó 3 veces hasta conseguir una viscosidad homogénea y se mantuvo en hielo durante 5 minutos; transcurrido este tiempo se añadieron 150 µL de solución III que se mezcló por inversión suave del tubo, incubando otros 5 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos. Para eliminar restos de proteínas que podrían dificultar posteriores manipulaciones del ADN, el sobrenadante se sometió a una extracción con igual volumen de PCIA, se mezcló la muestra en *vortex* y se centrifugó 5 minutos a 8.000 r.p.m. Se transfirió la fase superior

acuosa a un tubo limpio y se le añadieron dos volúmenes de etanol al 95%, se incubó 5 minutos a -20°C y, posteriormente, los plásmidos se precipitaron por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos. Para eliminar restos de sales, el sedimento se lavó con un volumen de etanol al 70% y se precipitó como en el paso anterior. Las muestras se secaron a vacío por espacio de 5 minutos y posteriormente se resuspendieron en 20-30 μL de 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) o en agua bidestilada dependiendo de su uso posterior. Las preparaciones se conservaron congeladas a -20°C hasta su utilización.

Con este procedimiento, además del ADN se obtiene una considerable cantidad de ARN que se elimina con un tratamiento con *RNAse A* a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 30 minutos a 37°C .

Maxipreparación (para un cultivo de 25-50 mL)

En las preparaciones a mediana escala se procedió de igual modo que en el apartado anterior, pero partiendo de 25-50 mL de cultivo y variando el volumen de las soluciones en la proporción correspondiente.

Preparación de las soluciones

Solución I: Conservada a 4°C

Glucosa	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl pH 8	25 mM

Solución II: Preparada en el momento

NaOH	0,2 M
SDS	1%

Solución III: Conservada a 4°C

Acetato potásico 5M	60 mL
Ácido acético glacial	11,5 mL
Agua destilada	28,5 mL

PCIA (Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico): Conservado a 4°C

Se mezclaron un volumen de fenol fundido a 65°C con un volumen de cloroformo y con dos volúmenes de tampón 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) para equilibrar el pH. Se agitó vigorosamente durante varios minutos, tras los

cuales se dejó la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se separó completamente la fase acuosa que se retiró por aspiración. Se repitió este proceso dos o tres veces. Tras el último equilibrado se añadieron 1/25 volúmenes de alcohol isoamílico a la mezcla. Se conservó en oscuridad a 4°C.

1xTE: Conservado a temperatura ambiente

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

RNAse: Conservada a -20°C

Se preparó una disolución de 5 mg/mL de *RNAse A* en agua bidestilada estéril y se calentó a 100°C durante 10 minutos para eliminar restos de *DNAsas*. Se dejó enfriar lentamente y se conservó congelada en alícuotas a -20°C.

Purificación de ADN para secuenciación

Se realizó una extracción de ADN plasmídico tal y como se describe en el apartado anterior, incluido el tratamiento con *RNAse*. Tras la incubación con *RNAse* se purificó el ADN haciendo dos extracciones sucesivas con PCIA y una con CIA. Se añadió a la fase líquida 1/10 del volumen de acetato potásico 3 M y el doble del volumen de etanol al 95% frío. Se mezcló y se incubó en hielo 5-10 minutos. Se centrifugó el ADN durante 5 minutos a 13.000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se lavó 1 ó 2 veces con etanol al 70% frío.

El ADN precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 80 µL de agua estéril. Se le añadieron 16 µL de NaCl 5 M y se mezcló en *vortex*, tras lo cual se añadieron 100 µL de PEG-6.000 al 13% y se incubó durante 20 minutos en hielo. Se centrifugó la mezcla durante 5-10 minutos a 13.000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante retirándolo por aspiración. El precipitado de ADN, libre de ARN, se secó a vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de agua.

Además de las disoluciones descritas para la primera parte de la extracción se emplearon aquí las que se describen a continuación.

CIA: Se mezclaron cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1. Se guardó a temperatura ambiente.

PEG-6.000 al 13%: Se preparó una disolución de PEG-6.000 al 13% peso/volumen en agua destilada estéril y se agitó en *vortex* durante varios minutos hasta su completa disolución. Se preparó en el momento de uso.

Extracción de ADN plasmídico de bacterias empleando un *kit* comercial suministrado por *Quiagen*

Este método se empleó sólo en aquellas maxipreparaciones en las que se quería obtener un ADN plasmídico de gran calidad y en un volumen final muy pequeño. Es un método bastante rápido puesto que no se requiere hacer extracción con fenol ni tampoco precipitación con etanol.

Se partió de un cultivo de células de 5 mL en LBA que se dejó crecer durante toda la noche a 37°C y en agitación orbital. Al día siguiente se repartió el cultivo en tubos *Eppendorff* y se centrifugaron las células a 8.000 r.p.m. durante 3 minutos. El medio de cultivo se retiró y se resuspendieron las células en 250 µL de tampón P1 (de resuspensión). A continuación se añadieron 250 µL de tampón P2 (de lisis) y 350 µL de tampón N3 (de neutralización), se mezclaron bien invirtiendo los tubos varias veces y se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se pasó a través de una columna, suministrada por el *kit*, mediante centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto. El ADN plasmídico retenido en la columna se trató (sólo en el caso de cepas con altos niveles de actividad nucleasa o con un alto contenido de carbohidratos tales como las JM, HB101 o cualquier cepa de tipo salvaje) con 500 µL de tampón PB (de unión). Posteriormente el ADN plasmídico se lavó con 750 µL de tampón PE (de lavado) mediante una centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto para eliminar cualquier resto de solución de lavado que haya podido quedar, puesto que el etanol contenido en el tampón PE puede inhibir cualquier reacción enzimática posterior. Para recuperar el ADN plasmídico se colocó la columna en un tubo *Eppendorff* limpio, se añadieron 50 µL de agua o de tampón EB (de elución), se dejó reposar 1 minuto y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto. El sobrenadante obtenido contenía el ADN plasmídico.

Tampón P1: Conservado a 4°C pues contiene la *RNAsa* disuelta.

Tampones P2, N3, PB, PE, EB: Conservados a temperatura ambiente.

6.1.2. Extracción de ADN genómico de levaduras

Extracción de ADN de alto peso molecular de levaduras

Este método modificado de Adams *et al.* (1997) se empleó para obtener altas concentraciones de ADN genómico, para ello se partió de cultivos de 100 y 10 mL. El volumen de las soluciones se ajustó a cada caso. Las células de un cultivo de 10 mL en fase estacionaria se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos y se lavaron con una solución 1 M de sorbitol y 0,1 M EDTA.

Para la obtención de protoplastos se resuspendieron en 1 mL de una solución 0,9 M sorbitol, 50 mM EDTA, 50 mM NaPO₄ pH 7,5 y 14 mM β-mercaptoetanol, se añadieron 100 μL de una disolución 5 mg/mL de liticasa, para lisar paredes y se agitó la mezcla suavemente durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente se añadió SDS a una concentración final del 1% y se sometieron a una incubación de 20 minutos a 65°C sin agitación. A continuación se procedió a sucesivas extracciones con PCIA, agitando suavemente para evitar roturas en el ADN, hasta conseguir una interfase libre de proteínas. Se separaron las fases mediante centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos y para completar la extracción se incubó la fase acuosa con acetato potásico 5 M en una proporción 1:5 durante 2-4 horas en hielo. Transcurrido este tiempo se centrifugó 15 minutos a 12.000 r.p.m. y se precipitó el sobrenadante con 1,5 volúmenes de etanol al 95% durante 5 minutos en hielo, apareciendo el ovillo típico que forma el ADN genómico. Se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 5 minutos y se lavó el precipitado con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA).

Extracción rápida de ADN genómico de levaduras

Se empleó el método de Hoffman y Winston (1987) con ligeras modificaciones cuando fue necesario obtener pequeñas concentraciones de ADN genómico en el menor tiempo posible, para ello se partió de un cultivo de 10 mL de levaduras crecido durante una noche. Se centrifugó 5 minutos a 4.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 500 μL de agua y se transfirieron a un tubo *Eppendorff*. Se

centrifugaron durante 10 segundos a 13.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se rompieron las células agitando en *vortex* brevemente. Posteriormente se resuspendieron las células en 200 μ L de tampón *Breaking* (2% v/v Tritón X-100, 1% v/v SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) y 3 μ L de *RNAse* 50 mg/mL (suministrada por *Quiagen*). Se añadieron 0,3 gramos de perlas de vidrio, 200 μ L de fenol-cloroformo y se agitó en *vortex* durante 3 minutos a baja velocidad. Se añadieron 200 μ L de tampón 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) y se agitó en *vortex* brevemente. Se centrifugó 5 minutos a 13.000 r.p.m. a temperatura ambiente, y se transfirió el sobrenadante a un tubo *Eppendorff* limpio. Después de añadir 1 mL de etanol al 100% se mezcló por inversión y se centrifugó durante 3 minutos a 13.000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, se secó el ADN en una bomba de vacío y se resuspendió en 20-100 μ L de 1xTE.

Extracción de ADN genómico de levaduras para su uso en técnicas de PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”)

Se partió de un cultivo de 5-10 mL en fase estacionaria. Se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos y se lavó el precipitado de células con agua estéril. A continuación se volvió a centrifugar y se resuspendieron las células en 1,5 mL de la solución A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,3% β -mercaptoetanol, 0,25-0,5 mg/mL de liticasa), se agitó en el *vortex* y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 200 μ L de SDS al 10%, se agitó en *vortex*, se le añadió 1 mL de acetato amónico 8 M y se volvió a agitar en *vortex*. Se incubó a -20°C durante 15 minutos y se centrifugó a 15.000 r.p.m. a 4°C durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se le añadió el mismo volumen de isopropanol, posteriormente se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se lavaron las células con etanol al 70%, se volvieron a centrifugar y se retiró el sobrenadante. El ADN genómico precipitado se secó en una bomba de vacío y se resuspendió en 200 μ L de 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA). Para realizar una *PCR* de un volumen final de 100 μ L se usaron 1-2 μ L del ADN extraído.

6.1.3. Extracción de ARN de levaduras

La extracción de ARN total se realizó según el método de Zitomer y Hall (1976), el agua con la que se prepararon las soluciones fue previamente tratada con DEPC

(Dietil pirocarbonato) como describen Sambrook *et al.* (1989). Del mismo modo, todo el material empleado, tanto plástico como cristal, fue utilizado en condiciones estériles y previamente lavado con agua bidestilada tratada con DEPC al 1% durante 24 horas, con el fin de evitar posibles contaminaciones de *RNAsas* y esterilizado en autoclave para inactivar totalmente el DEPC.

Se partió de cultivos de levaduras de 100 mL, crecidos en distintas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0,6 y 0,8. Una vez alcanzada la densidad óptica requerida, los cultivos se pararon rápidamente en hielo para impedir la degradación del ARN y asegurar el cese del crecimiento y de la transcripción. Todos los procesos posteriores se realizaron en frío.

Las células se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos, y se lavaron con 50 mL de 1xRE (Tris-HCl 0,1 M, LiCl 0,1 M y EDTA 0,1 mM pH 7,5). En este punto, las células fueron utilizadas inmediatamente para la extracción o congeladas a -20°C durante no más de 24 horas, para su posterior utilización. El precipitado celular se resuspendió en 1,5 mL de 1xRE y se procedió a la rotura de las células por adición de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro hasta aproximadamente 2/3 del volumen final. Se realizaron 9-10 pulsos de agitación vigorosa en *vortex* de 20 segundos, alternados con incubaciones de 20 segundos en hielo, para impedir que la muestra se calentase por la fricción.

A continuación se añadieron 2 mL de 1xRE con un 1% de SDS, se mezcló bien y se realizaron las extracciones necesarias con 7,8 mL de PCIA saturado con 1xRE para la eliminación de proteínas, agitando en *vortex* y centrifugando 10 minutos a 10.000 r.p.m. para separar las fases.

El ARN contenido en la fase acuosa se precipitó con 2,3 volúmenes de etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M, incubando unas horas a -20°C . Se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se lavó 1-2 veces con etanol al 70%. Una vez seco al vacío, el ARN se resuspendió en agua tratada estéril fría y se congeló a -80°C .

6.1.4. Extracción de plásmido de levadura

Método modificado de Adams *et al.* (1997)

Se empleó habitualmente para obtener altas concentraciones de ADN plasmídico, para ello las células de un cultivo de 5 mL, incubado durante toda la noche

a 30°C, se precipitaron a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos y se lavaron con sorbitol 1 M. Para preparar los protoplastos, las células se resuspendieron en 800 µL de una solución sorbitol 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,5 y mercaptoetanol 14 mM y se les añadieron 50 µL de una solución 5 mg/mL de liticasa disuelta en agua. Se incubaron con esta enzima durante 45 minutos a 30°C. Tras la incubación se precipitaron las células, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 µL de EDTA 50 mM pH 8, SDS 0,3%; tras resuspender, se incubó a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadió acetato potásico 3 M pH 4,8 y se incubó en hielo por espacio de 2 horas.

Se centrifugó durante 5 minutos y se añadió al sobrenadante, que contiene el ADN, etanol hasta alcanzar un 40% del volumen. Se dejó precipitar durante 5 minutos a -20°C y se centrifugó durante otros 5 minutos. El precipitado de ADN se lavó una o dos veces con etanol al 70%. Las muestras se secaron, se resuspendieron en 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) y, para eliminar restos de proteína, se sometieron a las extracciones necesarias con PCIA y CIA según el procedimiento habitual. De nuevo se precipitó el ADN y una vez resuspendido en 1xTE se utilizó para transformar *E. coli*. A partir de las colonias transformantes se preparó ADN plasmídico por las técnicas anteriormente descritas.

Este método es aplicable a los plásmidos que son capaces de replicarse en bacterias y levaduras (vectores lanzadera).

Extracción empleando perlas de vidrio

Este método se empleó para obtener pequeñas cantidades de ADN plasmídico, para ello se partió de un cultivo de 1,5 mL de levaduras transformadas creciendo en medio selectivo o también, en ocasiones, se partió directamente de masa celular equivalente tomada de una placa fresca. Para el primer caso se centrifugaron las células a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos, tras lo cual se resuspendieron en 100 µL de una solución 2,5 M LiCl₂, 50 mM Tris-HCl pH 8, 4% Tritón X-100 y 62,5 mM EDTA. A continuación se les añadió a las células igual volumen de PCIA y 0,2 g de perlas de vidrio de 425-600 micrones, se agitaron vigorosamente en *vortex* durante 2 minutos y se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 1 minuto. La fase acuosa se transfirió a un tubo *Eppendorff* limpio y se le añadió 100 µL de isopropanol y 10 µL de acetato sódico 3 M, se incubó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos. El precipitado se lavó tres veces con etanol al 70% y finalmente se secó en una

bomba de vacío. El ADN plasmídico se resuspendió en 5 μ L de agua destilada y fue empleado para transformar bacterias de *E. coli* mediante electroporación para obtener un mayor número de transformantes.

Extracción rápida

Este método de Adams y *et al.* (1997) se empleó para obtener altas concentraciones de ADN plasmídico en poco tiempo, para ello se partió de un cultivo de células de 10 mL crecidas hasta saturación (1 noche o más). Se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1 mL de sorbitol 1M, Na₂EDTA 0,1 M pH 7,5, se añadieron 50 μ L de liticasa 10 mg/mL y se incubó a 37°C durante 60 minutos. A continuación se centrifugaron las células a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de Tris-HCl pH 7,4 50 mM, Na₂EDTA 20 mM, se añadieron 50 μ L de SDS al 20% y se incubó a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente se añadieron 400 μ L de acetato potásico 5M, se mantuvo en hielo durante 1 hora y se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se repartió en dos tubos *Eppendorff* a los cuales se les añadió 750 μ L de isopropanol 100% a cada uno de ellos, se mezcló bien, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó 10-20 segundos a 13.000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y el ADN plasmídico resultante se secó en una bomba de vacío, resuspendiéndolo en 200 μ L de 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA). Los 400 μ L totales obtenidos se incubaron con 6 μ L de *RNAsa* 50 mg/mL (suministrada por *Quiagen*) a 37°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron 40 μ L de acetato sódico 3M y para precipitar se añadieron 300 μ L de isopropanol 100%. Se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 10-20 segundos. Se eliminó el sobrenadante, se secó el ADN plasmídico en una bomba de vacío y se resuspendió en 20-30 μ L de 1xTE. Antes de tratar este ADN con endonucleasas de restricción, fue necesario centrifugar la solución final a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar el material insoluble que podría inhibir la digestión.

Extracción de alta eficacia

Este método sólo se empleó en aquellos casos en los que no se pudo extraer ADN plasmídico por los métodos anteriormente descritos, pues este protocolo además de ser el más largo implica una incubación durante toda una noche. Para realizar este

protocolo se partió de un cultivo de 10 mL crecido en medio selectivo a 30°C durante toda la noche que se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 3 minutos. El sobrenadante se descartó y se le añadió 5 mL de sorbitol 1 M, se agitó en *vortex* y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante se descartó, se añadieron 800 µL de solución de lisis (sorbitol 0,9 M, Na₂HPO₄ 50 mM pH 7,5 y 1 µL de 2-mercaptoetanol por cada mililitro de solución) preparada en el momento, se resuspendieron las células, se les añadieron 50-75 µL de liticasa 5-7,5 mg/mL, se agitó en *vortex* y se incubó a 37°C en agitación durante al menos 1 hora y 15 minutos. A continuación se centrifugaron las células a 4.000 r.p.m. durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 500 µL de una solución EDTA 50 mM pH 8 y SDS 0,3%, se agitó vigorosamente en *vortex* y se incubó durante 20 minutos sin agitación a 65°C. Transcurrido este tiempo se enfriaron las muestras en hielo durante 20 minutos, se les añadieron 100 µL de una solución (acetato potásico 5 M y 11,5% v/v de ácido acético glacial) y se incubaron en hielo durante 2 horas. A continuación se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo *Eppendorff* limpio, se añadieron 400 µL de etanol al 95% y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se le añadió 1 mL de etanol al 70%, se agitó en *vortex* y se centrifugó durante 3 minutos a 13.000 r.p.m. El sobrenadante se descartó y las muestras se secaron en una bomba de vacío. El ADN plasmídico se resuspendió en 400 µL de 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA), se incubó a 65°C durante 5 minutos, se añadieron 400 µL de PCIA, se agitó en *vortex* y se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 3 minutos. La fase superior se transfirió a un tubo *Eppendorff* limpio, se añadieron 800 µL de etanol al 95% junto con 40 µL de acetato sódico 3 M, se agitó en *vortex* y se incubó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron las muestras durante 20 minutos en frío a 13.000 r.p.m. El precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se agitó en *vortex* y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 r.p.m. en frío. El ADN precipitado se secó en una bomba de vacío y se resuspendió en 10 µL de agua estéril (no se resuspendió en 1xTE porque las sales que contiene dificultan la electroporación posterior).

6.2. Medida de la concentración de ácidos nucleicos

6.2.1. Medida de la concentración del ADN

Se tomaron 5 μL de la preparación de ADN, libre de ARN, y se llevaron a un volumen final de 1 mL con agua bidestilada. Se eligió siempre esta dilución para facilitar los cálculos posteriores pues de este modo el valor de absorbancia obtenido se multiplicó por un factor de 10 para expresar así la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las mediciones se efectuaron en un espectrofotómetro *Cecil CE 2041* utilizando cubetas de cuarzo de 1 mL. Se midió la absorbancia de las muestras a dos longitudes de onda, 260 y 280 nm. La concentración real se calculó estableciendo la equivalencia entre una unidad de A_{260} y una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN de doble hebra.

La relación A_{260} / A_{280} es un índice del grado de impurezas que contiene la muestra. La relación ideal se ajusta a un valor aproximado de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989).

La concentración de aquellas muestras que contenían ARN fue estimada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, comparando la intensidad de fluorescencia de las bandas de las muestras con un marcador de concentración conocida.

6.2.2. Medida de la concentración de ARN

Las medidas de la concentración de ARN se realizaron del mismo modo que las de ADN, utilizando 4 μL de muestra llevados a 1 mL en agua bidestilada estéril y teniendo en cuenta que una unidad de A_{260} equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN. La relación óptima A_{260}/A_{280} toma, en este caso, un valor de 2 (Sambrook *et al.*, 1989).

6.3. Modificación enzimática del ADN

6.3.1. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

El ADN (plasmídico o lineal) fue digerido con endonucleasas de restricción suministradas por los proveedores habituales, *Roche* y *New England Biolabs*. Para cada enzima se utilizó el tampón y la temperatura recomendados por la casa comercial. Los tiempos de digestión variaron, según la cantidad de ADN a digerir, entre 2 y 4 horas.

6.3.2. Desfosforilación del ADN

Esta técnica se empleó para eliminar los grupos fosfato 5' en vectores digeridos con endonucleasas de restricción, para evitar el autoligamiento. Para ello se trató el ADN con la enzima fosfatasa alcalina.

La fosfatasa cataliza la eliminación de los extremos 5'-fosfato del ADN, ARN, rNTP y dNTP. En el tratamiento se utilizó 1U de fosfatasa alcalina (*Roche*) junto con 1 μ L del tampón 10x suministrado por la casa comercial, para un volumen final de digestión de 10 μ L. Se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C y, transcurrido ese tiempo, la fosfatasa se inactivó por calor a 75°C durante 10 minutos, añadiéndole previamente 10 μ L de EGTA 0,1 mM.

Tras la inactivación, se realizó una extracción con un volumen de PCIA, tras lo cual el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y se lavó con etanol al 70%. Se secó al vacío y se resuspendió en agua bidestilada.

Con este mismo propósito se empleó también una fosfatasa alcalina procedente de una especie de camarón, suministrada también por *Roche*. Esta enzima presentó una gran ventaja con respecto a la anterior pues no necesitó un paso posterior de purificación, por tanto el vector desfosforilado se empleó directamente para la reacción de ligamiento. Para este último caso a 7 μ L de la digestión del vector se le añadieron 0,9 μ L del tampón 10x suministrado por la casa comercial y 1 μ L de la fosfatasa alcalina. Se incubó durante 10 minutos a 37°C para desfosforilar extremos cohesivos y 1 hora a 37°C para desfosforilar extremos romos. Posteriormente se inactivó la enzima durante 15 minutos a 65°C y se utilizó directamente y sin purificar para la reacción de ligamiento.

6.3.3. Ligamiento de fragmentos de ADN

Se emplearon la ADN ligasa T_4 de *Roche* y de *GibcoBRL* con el tampón suministrado con la enzima. Los ligamientos se realizaron en un volumen de 10 μ L añadiendo un volumen variable de ADN (generalmente una proporción 1:10 de vector e inserto a clonar) y 1 U de ligasa. Se incubó 2-4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C cuando el ligamiento era de extremos cohesivos. Cuando el ligamiento era de extremos romos se incubó a 14-18°C toda la noche.

Para clonar productos de *PCR* se empleó el *kit* comercial *pGEM-T Easy Vector System* de *Promega*. El ligamiento se realizó en un volumen final de 10 μL , añadiendo 3 μL del producto de la *PCR*, 5 μL del *rapid* tampón 2x de la ADN ligasa *T₄*, 1 μL del vector *pGEM-T Easy* (50 ng/ μL) y 1 μL de la ADN ligasa *T₄* (3U/ μL). Se mezcló la reacción con la micropipeta y se dejó incubar durante toda la noche a 4°C si el ligamiento era de extremos cohesivos, a 14°C si era de extremos romos o a temperatura ambiente durante 1 hora independientemente de que fuesen extremos romos o cohesivos. Como el vector posee el gen *lac Z* que codifica para la β -galactosidasa de *E. coli*, cuando se clona el inserto se interrumpe el gen y por tanto, sólo las colonias de color blanco que aparezcan en las placas de transformación (placas LBA suplementadas con el substrato cromogénico X-Gal y el inductor IPTG del gen *lacZ*) serán las que contengan nuestro producto de *PCR* clonado.

6.3.4. Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de restricción de ADN plasmídico generados por digestión con endonucleasas fueron aislados individualmente y purificados empleando cualquiera de los siguientes *kits* comerciales:

- El *kit* “*Gene-Clean*” (BIO-100), basado en una matriz de sílice denominada *glass-milk*⁽¹⁾ a la que se adhiere el ADN y no otros contaminantes, que se extraen mediante un proceso de lavados sucesivos con una solución de cloruro sódico, etanol y agua (*New Wash*⁽²⁾).

Para ello, una vez digerido el ADN se hizo migrar en un gel de agarosa al 0,7-1% y tras la tinción, se cortó la banda del gel correspondiente al fragmento de ADN que se pretendía aislar, usando cuchilla estéril y guantes. A continuación se disolvió el trozo de gel que contenía el ADN en una solución de INa 6 M a 55°C, se añadió el *glass-milk* y se incubó durante 5 minutos en hielo. Seguidamente se centrifugó para precipitar el complejo *glass-milk*-ADN y éste se sometió a sucesivos lavados con la disolución *New Wash*, para eliminar los restos de gel. Para liberar el ADN de la matriz se incubó a 55°C en agua bidestilada estéril y posteriormente se centrifugó a 13.000 r.p.m., recogiendo el sobrenadante.

(1) *Glass-milk*: conservado a 4°C.

(2) *New Wash*: conservado a -20°C.

- El *kit Ultrafree-DA* de *Millipore*, basado en una columna que consta de un nebulizador que rompe la agarosa en trozos muy pequeños, una membrana que purifica el ADN y un tubo *Eppendorff* en el que se recoge el ADN purificado.

Para ello, una vez digerido el ADN se hizo migrar en un gel de agarosa al 0,7-1% preparado en un tampón TAE modificado (40 mM Tris-acetato pH 8,0, 0,1 mM Na₂EDTA), siendo este mismo tampón el empleado para llevar a cabo la electroforesis. Tras la tinción del gel con bromuro de etidio, se cortó la banda del gel correspondiente al fragmento de ADN que se pretendía aislar, usando cuchilla estéril y guantes. A continuación se introdujo la banda del gel en el nebulizador de la columna, se cerró el tubo *Eppendorff* y se centrifugó a 9.000 r.p.m. durante 10 min. La centrifugación hizo pasar a la agarosa a través del gel nebulizador convirtiéndola en finos hilos. El ADN se purificó a su paso por la membrana y se recogió en el tubo *Eppendorff* resuspendido en el tampón de electroforesis.

El hecho de que en este *kit* se emplease un tampón TAE modificado es debido a que:

a.- El tampón TBE (empleado habitualmente) inhibe reacciones de secuenciación de ADN mientras que el TAE modificado no.

b.- El tampón TAE modificado tiene 0,1 mM de Na₂EDTA mientras que el tampón TAE normal tiene 1 mM de Na₂EDTA. El EDTA a una concentración de 0,1 mM Na₂ no interfiere ni con la concentración de magnesio en las reacciones de secuenciación ni con otros tratamientos enzimáticos, algunos de los cuales son dependientes del magnesio.

6.3.5. Amplificación del ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El principio de la *PCR* se basa en utilizar de manera repetitiva una de las propiedades de las ADN polimerasas: la capacidad de sintetizar una hebra complementaria de ADN a partir de un iniciador o ADN cebador y un molde de hebra simple.

La *Taq* ADN polimerasa (*GibcoBRL*, *Roche* o *Perkin Elmer*) fue aislada originalmente de *Thermus aquaticus*. Tiene una actividad polimerasa 5'→3' y carece de actividad exonucleasa 3'→5'. Es estable en incubaciones prolongadas a elevadas

temperaturas y puede, por tanto, ser empleada para amplificar fragmentos de ADN mediante reacciones en cadena de la polimerasa (*PCR*). Tras la síntesis deja extremos cohesivos en el fragmento de ADN amplificado.

La *Pwo* ADN polimerasa (*Roche*) se aisló originalmente de la archaebacteria *Pyrococcus woesei*. Posee actividad polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 3'→5' por lo que se usa para amplificar fragmentos de ADN mediante *PCR*. Esta polimerasa posee una fidelidad 10 veces mayor que la *Taq* polimerasa. Esta polimerización deja extremos romos.

La *Vent* ADN polimerasa (*New England Biolabs*) se aisló de *Thermococcus litoralis*, posee actividad polimerasa 5'→3' y actividad exonucleasa 3'→5' por lo que se usa para amplificar fragmentos de ADN mediante *PCR*. Esta polimerasa posee, según sus proveedores, una fidelidad de entre 10 y 15 veces mayor que la *Taq* polimerasa además de ser unas 5 veces más estable a altas temperaturas.

La amplificación del ADN por *PCR* fue realizada en un termociclador *Gene Cycler™* de *Bio-Rad* o *GeneAmp PCR System 2400* de *Perkin Elmer*; este instrumento que proporciona automáticamente variaciones rápidas y cíclicas de temperatura se programó para realizar 30 ciclos de amplificación.

En teoría, después de 20 ciclos, una molécula de ADN se amplifica alrededor de un millón de veces, pero en la práctica, la amplificación no es exponencial, especialmente después de 20 ciclos, debido al consumo parcial de los cebadores y a una cierta desnaturalización térmica de la *Taq*, *Vent* o *Pwo* polimerasa.

Se mezclaron 20 ng de ADN molde (evitando contaminar la reacción con ADN extraño que también podría amplificarse) con otros componentes de la reacción que vienen descritos a continuación.

Mezcla de reacción de la *PCR*

Cebador 1 (sintetizado por <i>Roche</i>)	30 pmol
Cebador 2 (sintetizado por <i>Roche</i>)	30 pmol
dNTPs (desoxi-nucleósidos trifosfato) (<i>Roche</i>)	25 mM
Tampón 10x (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM)(<i>Roche</i>)	1/10V _f
<i>Taq</i> , <i>Vent</i> o <i>Pwo</i> polimerasa (<i>Roche</i>)	2U

Se enrasó con agua bidestilada estéril hasta el volumen final deseado y se agitó en vortex.

Programación de la PCR

- 1 ciclo \longrightarrow 2 min. a 94°C (desnaturalización inicial).

Adición de la ADN polimerasa a la mezcla de reacción.

- 30 ciclos \longrightarrow $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ seg. a } 94^{\circ}\text{C (desnaturalización).} \\ 30 \text{ seg. a } 50^{\circ}\text{C (hibridación).} \\ 2 \text{ min. a } 72^{\circ}\text{C (elongación).} \end{array} \right.$
- 1 ciclo \longrightarrow 2 min. a 72°C (elongación final)
- Enfriamiento de las muestras a 4°C.

La temperatura de hibridación varió según los cebadores empleados en cada reacción de PCR. Durante la hibridación a 50°C el 90% de los cebadores se unen al ADN molde. La duración de la fase de alargamiento (72°C) en el último ciclo se extendió a 2 minutos para darle tiempo a la *Taq*, *Vent* o a la *Pwo* polimerasa de finalizar la síntesis de todos los fragmentos.

Tras la finalización de la PCR, se comprobó el ADN obtenido en un gel de agarosa al 0,7%.

Purificación del ADN amplificado por PCR

El ADN amplificado mediante la PCR fue purificado antes de ser utilizado para otras aplicaciones. Esta purificación permitió no solo la concentración de la muestra sino también la eliminación de los cebadores y los dNTPs no incorporados. Para ello se utilizó el *kit* comercial *Microcon-PCR* de *Millipore*.

La muestra se llevó con agua o tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) a un volumen final máximo de 0,5 mL. Se introdujo en el depósito de la columna (sin tocar la membrana con la punta de la micropipeta) y se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante, se añadieron 20 μ L de agua destilada o tampón TE muy cuidadosamente, se invirtió el depósito en donde habíamos introducido la muestra y se colocó en un tubo *Eppendorff* limpio que se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 2 minutos. El sobrenadante obtenido contenía el ADN purificado.

PCR a partir de células enteras de levadura

Las levaduras a analizar crecieron en placa durante uno o dos días. Transcurrido este tiempo se recogió una pequeña cantidad de células con la ayuda de un palillo estéril, se mezclaron con 50 μ L de una solución de liticasa (20 U/mL) en tubos de 0,2 mL y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para que actuase la enzima. A continuación se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 2-3 minutos, se descartó el sobrenadante (con mucho cuidado) y las células se desnaturalizaron a 94°C durante 10 minutos antes de enfriarlas rápidamente en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se añadió la mezcla de PCR (tampón 10x, dNTPs, cebadores, magnesio, *Taq*, *Vent* o *Pwo* polimerasa y agua destilada hasta un volumen final de 50 μ L), se agitaron en *vortex* y se metieron en el termociclador. Una vez transcurrida la PCR, se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 2-3 minutos, se pasó el sobrenadante a un tubo limpio y se cargaron entre 5-10 μ L en un gel de agarosa al 0,7%.

6.4. Métodos de transformación

6.4.1. Transformación de bacterias (*E. coli*)

Se utilizaron dos técnicas para transformar células de *E. coli*. Las líneas JM101, JM109 y HB101 se transformaron utilizando un método basado en la inducción de “competencia” mediante tratamiento con cloruro cálcico (Cohen *et al.*, 1972); mientras que para transformar las líneas DH-5 α y XII-Blue se empleó una técnica basada en la inducción de “competencia” por tratamiento con cloruro de rubidio (Kushner, 1978). Todas las soluciones y el material se utilizaron fríos y estériles.

Método de transformación con cloruro cálcico (Cohen *et al.*, 1972)

Preparación de células competentes

Con este procedimiento se prepararon las células competentes de las cepas JM101, JM109 y HB101. Se partió de un cultivo de 100 mL de YT inoculado con 1 mL de un cultivo fresco previo. Se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6 (2-3 horas). Se recolectaron las células centrifugando a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C, se lavaron en 50 mL de NaCl 10 mM frío, se volvieron a centrifugar, se resuspendieron en 50 mL de Cl₂Ca 100 mM frío y se incubaron en hielo durante 20

minutos. Este tratamiento las induce a un estado de “competencia” transitorio, durante el cual las células son capaces de captar ADN. Tras una centrifugación a 5.000 r.p.m. se resuspendieron en 3 mL de Cl_2Ca 100 mM. Para conservar las células congeladas a -80°C se añadió igual volumen de una disolución de glicerol al 30% en Cl_2Ca 100 mM y se repartieron en alicuotas.

Transformación

En el momento de la transformación, 100 μL de células competentes recién descongeladas se incubaron en hielo con 400 μL de Cl_2Ca 100 mM y 1-2 μg del ADN transformante. Al cabo de 30 minutos, las células fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 2 minutos, tras lo cual se añadió 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 60 minutos antes de sembrarlas en placas selectivas con ampicilina para obtener colonias aisladas, o en placas con X-Gal si queremos seleccionar clones recombinantes en vectores con *lac Z*.

Método de transformación con cloruro de rubidio (Kushner, 1978)

Preparación de células competentes

Se utilizó este protocolo para las cepas DH5 α y X11-Blue. Las células se cultivaron en 100 mL de medio SOC hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 0,6 (a las 3 horas aproximadamente), momento en el que se paró el crecimiento enfriando el matraz en hielo durante unos 10 minutos. A continuación se centrifugaron a 4°C a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. Al sedimento celular se le añadieron 30 mL del tampón Tfb-1 en frío. Se volvió a centrifugar, se resuspendieron las células en 4 mL de tampón Tfb-2 y se repartieron en alicuotas en tubos *Eppendorff* para congelarlas a -80°C .

Preparación de las soluciones:

Tfb-1: Conservar a 4°C

Cl_2Rb	100 mM
Cl_2Mn	50 mM
Acetato potásico	30 mM
Cl_2Ca	75 mM
Glicerol	15%

Se ajusta a pH 5,8 con ácido acético diluido. No se esteriliza en autoclave, se filtra a través de membranas de acetato de celulosa (0,20 μm) suministradas por la casa comercial *Iwaki*.

TfB-2: Conservada a 4°C

MOPS pH 7	10 mM (Se ajusta el pH con NaOH 5N)
Cl ₂ Rb	10 mM
Cl ₂ Ca	75 mM
Glicerol	15%

No se esteriliza en autoclave, se filtra igual que la solución anterior.

Transformación

Se descongeló una alícuota de 100 μL de células competentes y se añadió 1-2 μg de ADN plasmídico. Se incubó 20 minutos en hielo y se le dio un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, tras los cuales se incubó 3 minutos en hielo. A continuación se añadieron 400 μL de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las células transformadas se centrifugaron a 3.000 r.p.m. y se sembraron en placas selectivas.

Transformación de bacterias por electroporación

Preparación de células competentes

Un litro de células crecido en medio YT a una densidad óptica a 600 nm de 0,6 (4-5 horas aproximadamente) se centrifugó durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. para recoger la masa celular. Posteriormente se lavaron dos veces con agua estéril fría y una vez con glicerol al 10%. Finalmente se resuspendió en 2 mL de glicerol al 10% y se repartieron en alícuotas que se congelaron a -80°C.

Electroporación

Se utilizó el *Gene Pulser® II* de la casa comercial *Bio-Rad*. En una cubeta de electroporación estéril y fría de 0,2 cm (EQUIBIO) con una capacidad de 1 mL se añadieron 40 μL de células competentes y 1 μL de ADN transformante. Se sometieron a un pulso de 1,5 kV a 50 μF y 150 Ω de resistencia. Inmediatamente se añadió 1 mL de YT y se transfirió a un *Eppendorff* estéril y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos, se resuspendieron las células en 100 μL de YT, se sembraron en placas con ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.4.2. Transformación de levaduras

Transformación de levaduras por el método de Klebe (Klebe *et al.*, 1983)

Este método se basa en la inducción de la transformación por tratamiento con polietilenglicol. Un cultivo de 10 mL de células de levadura a una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6 se sedimentó por centrifugación durante 5 minutos a 4.000 r.p.m. y se lavó el precipitado con 5 mL de solución A. Las células se resuspendieron en 0,2 mL de esta solución, a continuación se congelaron en nieve carbónica por espacio de 10-15 minutos, en este tiempo se les añadió el ADN plasmídico transformante en un volumen de 50 μ L; posteriormente fueron sometidas durante 5 minutos a un choque térmico a 37°C con agitación intensa. Pasado este tiempo, se añadieron 1,5 mL de solución B y se incubaron en este medio a 30°C durante 1 hora, tras lo cual se centrifugaron y lavaron en 1,5 mL de solución C. Las células se sembraron en placas selectivas adecuadas.

Preparación de las soluciones:

Solución A: Conservada a 4°C

Sorbitol	1 M
Bicina	10 mM
Etilénglicol	3%
KCl	1,25 M
Cl ₂ Ca pH 8,35	30 mM
Dimetilsulfóxido	5%

Solución B: Conservada a -20°C

Polietilénglicol-1000	40%
Bicina pH 8,35	200 mM

Solución C: Conservada a 4°C

NaCl	0,15 M
Bicina pH 8,35	10 mM

Transformación de levaduras por el método de Ito (Ito *et al.*, 1983)

Se basa en el tratamiento de las células con sales de litio. Un cultivo de 10 mL de células de levadura con una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6 se precipitó por centrifugación durante 5 minutos a 4.000 r.p.m. y se lavó el botón celular

con 5 mL de acetato de litio 0,1 M. Tras una nueva centrifugación se resuspendieron las células en 100 μ L de acetato de litio 0,1 M y se incubó a 30°C durante 1 hora. Se añadieron 5 mL de ADN de salmón 10 mg/mL desnaturalizado (*carrier*) junto con el ADN transformante y se incubó la mezcla a 30°C durante 30 minutos. Se añadieron 0,7 mL de una mezcla con PEG al 44% y 1/10 de acetato de litio 0,1 M y se realizó una nueva incubación durante 1 hora a 30°C. El siguiente paso consistió en la inducción de un choque térmico sometiendo las células a 42°C durante 10 minutos. Tras el choque térmico se centrifugó y se lavó con 1 mL de 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA). Se volvió a centrifugar, se resuspendió el botón celular en 400 μ L de 1xTE pH 7,5 y se sembró en placas selectivas adecuadas.

Transformación de *S. cerevisiae* por electroporación (Ausubel *et al.*, 1995)

Preparación de células competentes

Medio litro de células crecido en medio YPD a una densidad óptica a 600 nm de 1,3-1,5 se centrifugó durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. a 4°C y se resuspendió en 80 mL de agua destilada estéril fría. Para incrementar la electrocompetencia se incubaron con 10 mL de 10xTE (100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 10 mM EDTA) y 10 mL de acetato de litio 1 M pH 7,5 durante 45 minutos a 30°C y agitación suave. Posteriormente se añadieron 2,5 mL de DTT (Ditiotreitol) 1 M y se incubó 15 minutos a 30°C. Al finalizar la incubación se diluyó la suspensión celular con 400 mL de agua destilada estéril fría y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se hizo un segundo lavado con 250 mL de agua destilada, se centrifugó y se resuspendió el botón celular en 20 mL de sorbitol 1 M frío. Tras una última centrifugación, se resuspendió en 0,5 mL de sorbitol 1M frío.

Electroporación

Se utilizó el *Gene Pulser® II* de la casa comercial *Bio-Rad*. En una cubeta de electroporación estéril y fría de 0,2 cm (*EQUIBIO*) con una capacidad de 1 mL se añadieron 40 μ L de células y 100 ng de ADN. Se sometieron a un pulso de 1,5 kV a 25 μ F y 200 Ω de resistencia. Inmediatamente se añadió 1 mL de Sorbitol 1 M frío y se sembró en placas selectivas conteniendo sorbitol 1 M, el cual actúa como protector osmótico, aumentando la supervivencia de las levaduras transformadas.

Método de alta eficiencia para la transformación de *K. lactis*

Preparación de células competentes

Las células competentes de *K. lactis* se prepararon según Gietz y Woods (1994). Se inocularon 5 mL de medio de cultivo YPD al 0,5% para iniciar un precultivo a partir de una colonia aislada y se incubó toda la noche a 30°C en agitación. Al día siguiente se determinó la densidad óptica a 600 nm del cultivo y, a partir de él, se inoculó un nuevo cultivo de tal forma que su densidad óptica a 600 nm fuese de 0,1. Cuando el cultivo llegó a una densidad óptica de 0,6, después de aproximadamente 6 horas (aunque puede variar dependiendo de la cepa de *K. lactis* que se utilice), se centrifugaron las células a 3.500 r.p.m. durante 5 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada estéril y se transfirió a un tubo *Eppendorff* estéril. Las células se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en acetato de litio 100 mM. Una vez resuspendidas, las células fueron incubadas a 30°C durante 30 minutos sin agitación.

Transformación

Tras la preparación de las células competentes, se llevó a cabo la transformación añadiendo 5 µL de ADN de salmón (10 mg/mL), previamente desnaturalizado durante 10 minutos a 95°C, y 1-5 µg de ADN plasmídico lineal, a cada tubo *Eppendorff* que contenía 50 µL de células competentes. Se mezcló bien y se incubó a 30°C durante 30 minutos sin agitación. Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 µL de una disolución de acetato de litio 100 mM y PEG-3.350 al 40%, preparada en el momento a partir de acetato de litio 1M y PEG-3.350 al 50% (p/v). Se mezcló bien y se incubaron las células a 30°C durante 30 minutos sin agitación antes de proceder a un choque térmico a 42°C durante 20 minutos. Las células se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos en una microcentrífuga, se descartó el sobrenadante de PEG/acetato de litio y las células se resuspendieron en 2 mL de medio selectivo líquido, para un periodo de recuperación de 1,5-2 horas a 30°C en agitación antes de sembrarlas en placas selectivas.

Método para la transformación de *K. lactis* por electroporación

Preparación de células competentes

Se partió de un cultivo de 100 mL en medio completo. Cuando las células alcanzaron la fase estacionaria o lo que es lo mismo, cuando la densidad celular fue de

10^7 células/mL se recogieron mediante centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. Las células se lavaron con tampón de electroporación (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, sacarosa 270 mM y $MgCl_2$ 1 mM), se resuspendieron en 1/10 de medio completo conteniendo DTT 25 mM y HEPES 20 mM y se incubaron a 30°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las células se lavaron con tampón de electroporación y se resuspendieron en 1 mL de este tampón. Posteriormente se añadieron 2-4 μ L de ADN (100-200 ng) a 100 μ L de células.

Electroporación

Se utilizó el *Gene Pulser II* de la casa comercial *Bio-Rad*. En una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm se añadieron los 100 μ L de células conteniendo el ADN. Se sometieron a un pulso de 0,25 kV a 25 μ F y 200 Ω de resistencia durante 20 mseg. Inmediatamente se añadió 1 mL de medio completo frío y se recuperaron las células durante 1 hora a 30°C. Posteriormente se sembraron en medios selectivos.

Método de transformación de levadura en fase estacionaria "ONE STEP" (Chen *et al.*, 1992b)

Las células se crecieron en YPD hasta que el cultivo llegó a la fase estacionaria, aproximadamente 2×10^8 células/mL. Se centrifugan 250 μ L del cultivo y se resuspenden en un volumen final de 100 μ L de tampón *One Step* (0,2M Acetato de Litio, PEG 3350 40%, 100 mM Ditiotreitól), siempre teniendo en cuenta la cantidad de ADN que se va a añadir posteriormente. A continuación se añadieron entre 50 ng y 1 μ g de plásmido y entre 5 μ g y 50 μ g de ADN de esperma de salmón. La mezcla se incubó a 45°C durante 30 minutos y se sembró en placas selectivas.

Método para la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con una genoteca

Preparación de células competentes

Se partió de un cultivo de 100 mL que se dejó crecer durante toda la noche hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6. Las células se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en 1 mL de agua para pasarlas a un tubo *Eppendorf*. Las células se

centrifugaron y se lavaron con una solución de 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) y acetato de litio que se preparó en el momento a partir de las siguientes soluciones frescas:

- 10xTE (100 mM Tris-HCl pH 7,5 y 10 mM EDTA)
- acetato de litio 1M a pH 7.5 ajustado con ácido acético

posteriormente, las células se resuspendieron en 300-1000 μ L de la solución anterior (en función de la cantidad de células) y se incubaron a 30°C durante 30 minutos en agitación.

Transformación

Para cada transformación se mezclaron 100 μ L de células, 50-70 μ g de ADN de la genoteca y la misma cantidad de ADN *carrier* (ADN de salmón sonificado) y se dejaron en agitación durante 30 minutos a 30°C. Posteriormente se añadieron 700 μ L de PEG-4000 al 50%, se mezcló suavemente y se volvió a incubar en agitación a 30°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se pasó a un baño a 42°C durante 15 minutos. Las células se centrifugaron, se lavaron con agua destilada estéril ó 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) y se resuspendieron en un volumen final adecuado para su siembra en placas selectivas.

En las transformaciones tanto de bacterias como de levaduras, se realizó una transformación sin ADN transformante, como control negativo.

Método para transformar *Kluyveromyces marxianus* mediante el acetato de litio (Antunes *et al.*, 2000)

Este método se ha empleado para transformar *Kluyveromyces lactis*. Las células crecieron en medio completo (medio YPD) durante toda la noche, se recogieron 1,5 mL del cultivo y se centrifugó. Las células se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en 20 μ L (200 μ g) de ADN monocatenario de esperma de salmón, el ADN con el que se desea transformar resuspendido en el menor volumen posible, 0,4 mL de la solución PEG (40% de PEG 4000, acetato de litio 0,1 M, Tris-HCl pH 7,5 10 mM y EDTA 1 mM) y DTT a una concentración final de 10 mM. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se sometió a un choque térmico de 47°C durante 15 minutos. Finalmente las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1

mL de agua destilada estéril antes de sembrarlas en placas selectivas (200 μ L de células por placa).

6.5. Eliminación de plásmidos a partir de células de levadura

Se inocularon varias colonias aisladas de la cepa de levadura que portaba el plásmido en alicuotas individuales de 10 mL de medio no selectivo y se crecieron durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente se sembró para obtener colonias aisladas en medio no selectivo y se incubaron las placas durante 2 días a 30°C. Se examinaron aproximadamente entre 200 y 300 colonias aisladas. Se hizo una réplica en placas selectivas que son las que iban a identificar aquellas colonias que no portaban el plásmido (pues no llevaban el marcador de selección y por tanto no crecían en medio selectivo). Las placas se incubaron a 30°C durante toda la noche. Las colonias que crecieron en el medio completo (no selectivo) pero no crecieron en el medio selectivo habían perdido el plásmido.

6.6. Replicado de placas (*Replica-plating*; Miller, 1992)

Este procedimiento requiere un bloque de réplica que generalmente suele ser un cilindro de madera o metálico y terciopelos estériles. El bloque debe encajar perfectamente dentro de la placa Petri. Además, se precisa de un aro metálico que se utiliza para asegurar los terciopelos encima del bloque. Los terciopelos se deben cortar en cuadrados y tienen que cubrir totalmente la base (generalmente un diámetro de 14 cm). Los terciopelos se pueden lavar, esterilizar en autoclave y reutilizar. Para poder realizar este procedimiento es necesario que las colonias de las placas estén bien separadas. En primer lugar se coloca la placa con las colonias a replicar sobre el terciopelo (sin presionar, sólo apoyándola), a continuación se retira y en su lugar se coloca una placa fresca repitiendo el mismo procedimiento y se deja la placa Petri incubando el tiempo necesario.

6.7. Preparación de extractos proteicos de levaduras

Se partió de un cultivo de 200 mL en el medio apropiado para cada caso. Cuando éste llegó a una densidad óptica a 600 nm próxima a 2-3 se paró el cultivo. Las células

se recogieron mediante precipitación a 7.000 r.p.m. durante 10 minutos y a 4°C. A continuación se pesaron las células, se lavaron una vez con agua destilada fría y una vez con tampón de lisis (50 mM K₂HPO₄, 10 mM β-mercaptoetanol y 2 mM de PMSF (*Phenylmethyl sulfonyl fluoride*)) según Compagno *et al.*, (1993b). Las células se resuspendieron en tampón de lisis, añadiendo 1mL de tampón por gramo de células. Las células se rompieron usando diferentes procedimientos:

1. Mediante agitación vigorosa con *vortex* durante pulsos de 20 segundos y pausas de otros 20 segundos en hielo y añadiendo 0,2 g. de perlas de vidrio de 425-600 micrones.
2. Utilizando un *dismembrator* a 2.000 r.p.m. durante 2 min.

Tras finalizar la rotura mecánica, se centrifugaron las células a 8.000 r.p.m. durante 15 minutos y a 4°C. El sobrenadante se congeló en N₂ líquido en alicuotas de 500 µL y se guardó a -80°C hasta su utilización. Estos extractos proteicos de levadura se utilizaron para la determinación de la concentración de proteína total del extracto por el método de Bradford (1976) y para la determinación de la actividad aldolasa según Richards y Rutter (1961).

6.8. Técnicas electroforéticas

6.8.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Geles no desnaturizantes

La agarosa en solución acuosa, fundida y posteriormente enfriada, genera un gel por formación de puentes de hidrógeno. Los geles de agarosa no desnaturizantes se utilizaron para la separación de fragmentos de ADN generados por digestión con endonucleasas de restricción, comprobación de nuevas construcciones y productos de *PCR* y purificación de fragmentos concretos por rescate a partir del gel.

Los geles se prepararon con agarosa entre un 0,7 y 2% en tampón 1xTAE, dependiendo del tamaño molecular de los fragmentos a separar, según describen Sambrook *et al.* (1989). Tras añadir a las muestras 1/10 del volumen de azul de carga, éstas se cargaron con el gel sumergido en el tampón de electroforesis (1xTAE). La electroforesis se efectuaron a 50-100 V por espacio de 1-4 horas dependiendo del tamaño y concentración del gel y del tamaño de los fragmentos a separar. Para

determinar el peso molecular de los distintos fragmentos, se hicieron migrar al mismo tiempo que las muestras marcadores de pesos moleculares.

1xTAE:

Tris	0,04 M
EDTA	1 mM
Acetato sódico	20 mM
Ácido acético	30 mM

Azul de carga:

H ₂ O ó 1xTAE	7 mL
Glicerol	3 mL
Azul de bromofenol	2,5 mg
Xilen-cianol	2,5 mg

Geles desnaturalizantes

La separación del ARN en función de su tamaño requiere la utilización de agentes desnaturalizantes como el formaldehído, así como una mayor concentración de agarosa. (Véase gel de agarosa de *Northern blot*).

Tinción de geles de agarosa y visualización de las muestras

Los geles se tiñeron por inmersión en una disolución de agua destilada (tratada con DEPC, en el caso de geles de ARN) o en tampón de electroforesis con 0,01% (v/v) de una disolución *stock* de bromuro de etidio 5 mg/mL durante 5-10 minutos. Posteriormente, se destiñeron en agua destilada durante otros 5 minutos.

Las muestras se visualizaron exponiendo los geles a la luz UV en un transiluminador *Vilber Lourmat TFX-20M*. El bromuro de etidio es un fluorocromo intercalante que se une específicamente al ADN o ARN y, por tanto, permite la visualización de estos ácidos nucleicos al UV. Esta tinción no daña excesivamente el ADN y permite la escisión de las bandas del gel para su posterior purificación, además de permitirnos en algunos casos hacer una primera valoración de la homogeneidad de carga entre los distintos pocillos.

6.8.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE)

Geles desnaturizantes SDS-PAGE

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida a una concentración fija de acrilamida del 10% siguiendo el método descrito por Laemmli *et al.*, (1970). Se utilizó la célula de electroforesis *Mini Protean II* de *Bio-Rad*. Los geles separador y concentrador se prepararon según el siguiente esquema (tabla M5).

Tabla M5: Composición de los geles desnaturizantes SDS-PAGE de proteínas.

Solución	Separador	Concentrador
Acrilamida 45%	2,2 mL	0,55 mL
Tris 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	0,63 mL
SDS 10%	0,1 mL	0,05 mL
APS 10%	0,1 mL	0,05 mL
TEMED	0,004 mL	0,005 mL
H ₂ O	5,1 mL	3,68 mL

Se mezclaron todos los reactivos y en el momento de verter se añadió el TEMED y el APS (persulfato amónico). Se vertió la solución de acrilamida entre los cristales, dejando espacio para colocar el peine. Sobre la superficie libre del gel se dejaron resbalar unas gotas de agua, para evitar el contacto entre el gel y el oxígeno del aire que impide la polimerización. Una vez polimerizado el gel separador (20-30 minutos) se eliminó la capa de agua y se rellenó el espacio superior restante del molde con gel concentrador, introduciéndose un peine para la formación del número de pocillos adecuado donde se colocaron las muestras. Tras la gelificación se retiró el peine y se recubrió con la solución tampón.

Se utilizó un tampón Tris-HCl-glicina: Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% pH 8,3.

Las muestras de proteínas se diluyeron al 50% con tampón de carga (Tris-HCl 0,12 M pH 6,8, SDS 6%, glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol 15% y azul de bromofenol 0,0025%) y seguidamente se calentaron a 100°C durante 2-5 minutos, procediéndose a continuación a aplicar la muestra en cada pocillo del gel.

Las electroforesis se llevaron a cabo manteniendo el voltaje constante a 100 V durante el paso de la muestra por el gel concentrador, incrementándose este valor a 120 V durante su transcurso a través del gel separador.

Cuando el frente, coloreado con azul de bromofenol, llegó al extremo inferior de la placa, se detuvo la electroforesis y se procedió a la extracción del gel del molde para la posterior fijación y tinción de las proteínas del mismo.

Como referencia de tamaños se utilizó el siguiente marcador de pesos moleculares de proteínas: *Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range* de *Bio-Rad* (de 6,4 kDa a 198 kDa).

Tinción de los geles SDS-PAGE

Una vez concluida la electroforesis se procedió al lavado de los geles con agua bidestilada, con el fin de eliminar el exceso de SDS. A continuación las proteínas se tiñeron con *Coomassie brilliant blue (CBB)* de *Bio-Rad* durante 2 horas o más a temperatura ambiente y en agitación. El lavado se realizó con agua. La sensibilidad es de 0,05-0,1 µg por banda.

6.9. Técnicas de secuenciación de ADN

Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el método de terminación de la cadena con 2,3-didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddNTPs) de Sanger *et al.* (1977) de forma automática. En muchos casos se utilizaron los cebadores *Reverse* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' y *Universal* 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'.

6.9.1. Preparación del ADN molde

El ADN para secuenciación se obtuvo tal y como se describe en el apartado dedicado a la extracción de ADN plasmídico y su purificación para secuenciación. Los moldes se prepararon a partir de ADN bicatenario mediante una desnaturalización alcalina, en la que 5 µg de ADN se incubaron durante 30 minutos a 37°C en 10 µL de una solución NaOH 2 M, EDTA 2 mM. Una vez desnaturalizado, el ADN se precipitó con 1,1 µL de acetato sódico 3 M y 2-3 volúmenes de etanol al 95% durante unos 30

minutos a -70°C . Tras la precipitación, el ADN se lavó con etanol al 70% y se secó al vacío. Se guardó seco en congelador a -20°C .

6.9.2. Secuenciación automática

Secuenciación automática empleando oligonucleótidos sintéticos marcados “cebadores calientes”

Para la secuenciación automática empleando cebadores marcados se utilizó el *kit* comercial *7-deaza-d-GTP* de *Amersham® Biosciences*. En este caso se prepararon 4 tubos (A, C, G y T) por cada muestra a secuenciar y le añadimos a cada tubo 2 μL de cada una de las mezclas A, C, G y T y 6 μL de una mezcla compuesta por 8 μg de ADN y 1,5 μL del cebador marcado con una concentración de 1,2 $\text{pmol}/\mu\text{L}$, completada con agua destilada hasta un volumen final de 26 μL . A continuación, estos 4 tubos se sometieron a una reacción de *PCR* (“*Polymerase Chain Reaction*”) empleando el siguiente programa:

- 1 ciclo \longrightarrow 3 min. a 95°C (desnaturalización inicial).
- 30 ciclos \longrightarrow $\left\{ \begin{array}{l} 30 \text{ seg. a } 95^{\circ}\text{C} \text{ (desnaturalización).} \\ 30 \text{ seg. a } X^{\circ}\text{C} \text{ (hibridación).} \\ 30 \text{ seg. a } 72^{\circ}\text{C} \text{ (elongación).} \end{array} \right.$
- 1 ciclo \longrightarrow mantener a 4°C (hasta añadir solución de parada)

En donde “X” es la T_m (*melting temperature* o temperatura de fusión). Finalmente se le añadieron 4 μL de solución de parada (“*formamide loading dye*”) a cada uno de los tubos y se guardaron a -20°C antes de ser desnaturalizadas durante 3 minutos a 95°C y ser cargadas en un gel de poliacrilamida *Ready mix gel, A.L.F.™ grade* al 6% de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida proporcionado por *Amersham-Pharmacia-Biotech*.

Secuenciación automática empleando oligonucleótidos sintéticos no marcados “cebadores fríos”

Para la secuenciación automática empleando cebadores no marcados se empleó el *kit* comercial *Termo Sequenase™ Cy™ 5 Dye Terminator Kit* de *Amersham® Biosciences*. En esta técnica en vez de utilizar oligonucleótidos marcados se emplearon desoxinucleótidos marcados. La mezcla general de secuenciación contenía:

4-5 pmol de cebador
 3,5 μL de tampón 150 mM Tris-HCl pH 9,5, 35 mM MgCl_2
 2-4 μg de ADN
 1 μL de *sequenase* 10U/ μL
 agua destilada hasta completar un volumen de 27 μL .

Posteriormente se prepararon 4 tubos (para cada nucleótido A, C, G y T) por cada muestra a secuenciar en los que se añadió:

0,4 μL de la mezcla de nucleótidos de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno a una concentración final de 1,1 mM
 1,4 μL de agua destilada
 0,2 μL del ddNTP correspondiente a cada tubo

El programa de la PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) de secuenciación fue el siguiente:

- 30 ciclos \rightarrow

}	30 seg. a 95°C (desnaturalización).
	30 seg. a X°C (hibridación).
	80 seg. a 72°C (elongación).

En donde “X” es la T_m (*melting temperature* o temperatura de fusión). Una vez finalizada la reacción, se le añadió a cada tubo:

2 μL de AcNH_4 7,5 M
 2 μL de solución de glucógeno 10 mg/mL
 30 μL de etanol al 100% frío

Se mantuvo durante una noche a -20°C . Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. El precipitado se lavó con 200 μL de etanol al 70% frío y se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos y se resuspendió en 8 μL de solución *stop* y se mantuvo a -20°C hasta el momento en que las muestras se desnaturalizaron a 72°C durante 2 minutos para ser cargadas en un gel de secuenciación de poliacrilamida *Ready mix gel, A.L.F.™ grade* al 6% de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida proporcionado por *Amersham-Pharmacia-Biotech*.

La secuenciación se llevó a cabo a través de los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña. En algunos casos para la secuenciación de determinados clones se empleó un sistema de secuenciación mediante electroforesis capilar a través de la empresa *Sistemas Genómicos* (Paterna-Valencia).

6.9.3. Diseño de oligonucleótidos (cebadores) sintéticos

Se diseñaron cebadores sintéticos para ser utilizados como sondas en las reacciones de *PCR* (“*Polymerase Chain Reaction*”) y en la secuenciación automática.

Para poder utilizar como cebadores los oligonucleótidos sintéticos en la secuenciación automática éstos deben reunir ciertas características: un tamaño aproximado de 20 nucleótidos, hibridar con una sola secuencia de ADN molde, no presentar complementariedad interna que origine estructuras secundarias y poseer una T_m o temperatura de fusión superior a 40°C.

La T_m puede calcularse según la fórmula:

$$T_m = (4^\circ\text{C} \times n (G + C)) + (2^\circ\text{C} \times n (A + T))$$

Donde n representa el número de bases GC ó AT.

Para el diseño de cebadores sintéticos se empleó el programa informático OLIGO (*Go-Oli-GoTM versión 1.0. Pharmacia Biotech*). Este programa tiene en consideración ciertas características a la hora de diseñar cebadores:

- 1) La T_m se determina siguiendo la fórmula: $T_m = \Delta H / \Delta S + R \ln (C/4)$ en donde ΔH es la variación de la entalpía, ΔS es la variación de la entropía de formación del dúplex, R es la constante de los gases y C la concentración de la muestra.
- 2) La posibilidad de que se formen horquillas en el ADN monohebra.
- 3) La estabilidad del dúplex molde/cebador.
- 4) La autocomplementariedad del cebador.

6.10. Cuantificación del mARN usando “*Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*”

Se empleó esta técnica para realizar estudios de expresión génica pues la *PCR* a Tiempo Real permite cuantificar y comparar los niveles de mARN de muestras de ARN sometidas a diferentes condiciones de cultivo (Bustin, 2002). Todo ello es posible gracias a la detección y cuantificación de un reportero fluorescente cuya señal incrementa en proporción directa con la cantidad de producto de *PCR* en la reacción. Registrando la fluorescencia emitida en cada ciclo, es posible monitorizar la reacción de *PCR* durante la fase exponencial en donde el primer incremento significativo en la

cantidad del producto de *PCR* se correlaciona con la cantidad de un determinado molde. Para llevar a cabo este protocolo se realizaron los siguientes pasos:

- 1) Extracción de ARN: Una vez crecidos los cultivos de levadura en las condiciones seleccionadas, se recogieron las células por centrifugación a 4°C. Para la manipulación de las muestras se emplearon guantes protectores para evitar su contaminación con *RNAsas*. Para extraer el ARN de las células se empleó el kit comercial “*Perfect RNATM, Eukaryotic, Mini*” suministrado por *Eppendorff* siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente el ARN extraído se cuantificó en un espectofotómetro *GENios* (de *TECAN*).
- 2) *RT-PCR* (*Reverse Transcription PCR*): Se realizó una reacción de *PCR* en la cual a partir de ARN se amplificó cADN gracias a la acción de una transcriptasa inversa. Se empleó el kit comercial “*iScript cDNA Synthesis*” suministrado por *Bio-Rad*. Se realizó una *Reverse Transcription PCR* por cada muestra, siendo cada reacción de un volumen final de 20 µL, la mezcla de reacción de la *RT-PCR* fue la siguiente:

COMPONENTE	VOLUMEN
Mezcla de reacción <i>iScript</i> 5X	4 µL
Transcriptasa reversa <i>iScript</i>	1 µL
Agua libre de nucleasas	13 µL
ARN molde (100 fg a 1 µg de ARN total)	2 µL
Volumen total	20 µL

Las reacciones se incubaron durante 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C en un termociclador *GeneAmp PCR System 2700* de la casa comercial *Applied Biosystems*. La cantidad de ARN empleada para cada reacción fue de 1 µg.

- 3) *PCR* Cuantitativa o en Tiempo Real: La expresión génica relativa se cuantificó en el sistema de detección de *PCR* en Tiempo Real *iCycler iQ* de la casa comercial *Bio-Rad* y la detección de los amplicones se hizo con un *Sybr Green*, utilizando el kit comercial *iQ SYBR Green Supermix* de *Bio-Rad*. Cada reacción contenía 1X *iQ SYBR Green Supermix* (*Bio-Rad*), 100 nM de cada cebador y 2,5 µL de cADN resuspendidos en un volumen final de 50 µL. El protocolo para la amplificación y detección de la *PCR* en Tiempo Real consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de

amplificación: 95°C 30 segundos, 50°C 30 segundos y 72°C 1 minuto. De cada muestra se realizaron cuatro reacciones por duplicado que consistieron en cuatro diluciones diferentes de la muestra conteniendo 100, 10, 1 y 0,1 ng de cADN. Como controles se emplearon los genes de la actina y de la gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de la levadura *K. lactis* (cebadores empleados ECV225L, KLACT1-RT, KLGAP1-F y KLGAP1-RT, ver tabla M4 de Materiales y Métodos).

- 4) Análisis de los resultados: Los datos fueron analizados con el *software iCycler* (versión 3.0a). La expresión relativa se calculó utilizando el método comparativo Ct (Livak *et al.*, 2001) de la siguiente forma: para cada muestra se calculó la diferencia de los valores Ct (ΔCt), utilizando la media Ct de las réplicas y restándole la media Ct de las réplicas del ARN de referencia (actina, GAPDH)

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen X}) - Ct(\text{actina ó GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{condición 1}) - \Delta Ct(\text{condición 2 ó 3})$$

Como se realizaron cuatro diluciones, el $\Delta\Delta Ct$ se calculó para cada gen en cada muestra de ARN, $\Delta\Delta Ct$ [100 ng], $\Delta\Delta Ct$ [10 ng], $\Delta\Delta Ct$ [1 ng] y $\Delta\Delta Ct$ [0,1 ng]. La media de estos $\Delta\Delta Ct$ se utilizó posteriormente para estimar la expresión génica relativa:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Estos cálculos asumen que todas las reacciones de *PCR* han funcionado con un 100% de eficiencia. La eficiencia de la *PCR* fue superior al 95%, por lo que los errores introducidos en los cálculos son mínimos.

La *Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction* se llevó a cabo a través de los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña.

6.11. Northern blot

6.11.1. Condiciones de extracción de ARN

La presencia de *RNAsa* disminuye el rendimiento de la extracción; para prevenir este problema se tomaron las siguientes precauciones:

- El agua y las disoluciones salinas usadas se trataron con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1%, se agitaron toda la noche a 37°C y, al día siguiente, se

esterilizaron en autoclave para eliminar el DEPC remanente. Alguna solución, como el tampón Tris⁽¹⁾-EDTA⁽²⁾, no se trató con DEPC ya que éste modificaría covalentemente los grupos amino que contiene. Se preparó directamente usando agua tratada y reactivos libres de *RNAsas*. El SDS⁽³⁾, que no puede ser esterilizado en autoclave, se preparó de igual modo.

- El material de plástico se enjuagó en cloroformo aclarándolo posteriormente con agua tratada.
- Se usaron guantes en las operaciones de extracción de ARN, ya que las manos son la mayor fuente de *RNAsas* contaminantes.
- Todas las operaciones de extracción se realizaron a 4°C.

(1) **Tris-HCl**: 2-Amino-2(hidroximetil)-1-3-propanodiol equilibrado con ácido clorhídrico.

(2) **EDTA**: Ácido etilenodiaminotetraacético.

(3) **SDS**: Dodecil Sulfato Sódico.

6.11.2. Extracción de ARN de levaduras

La extracción de ARN total se realizó según el método de Zitomer y Hall (1976), véase extracción de ARN de levaduras en el apartado de extracción de ácidos nucleicos.

6.11.3. El gel de agarosa

Para preparar el gel de agarosa al 1,5% se pesaron 1,8 g de agarosa y se mezclaron con 6 mL de tampón 20xMOPS (ácido 3-[N-Morfolino]-propano-sulfónico 0,2 M, acetato sódico 0,05 M pH 7, EDTA 0,01 M, conservado en oscuridad) y 94 mL de agua tratada con DEPC al 0,1%. Se disolvió la agarosa en un microondas y se dejó enfriar en un baño a 65°C. Justo antes de verterla en la base de la electroforesis, se añadieron 20 mL de formaldehído al 37%, se mezcló y tras verter, se dejó 30 minutos en una campana de extracción para eliminar los vapores tóxicos del formaldehído. Una vez solidificado el gel, se guardó en la nevera o cámara fría hasta el momento de ser utilizado evitando así que se reseca.

6.11.4. Las muestras de ARN

Se mezclaron 20-40 µg de ARN (en un volumen final de 10 µL), 1,44 mL de formamida desionizada, 225 µL de tampón 20xMOPS, 576 µL de formaldehído al 37%

y 160 μL de agua tratada estéril. Se desnaturalizó la mezcla, incubando 5 minutos a 65°C y enfriándola rápidamente en hielo, se le añadió 1,5 μL de tampón “azul de carga” (glicerol 50%, azul de bromofenol 0,25%, xileno-cianol 0,25%) y se mantuvo en hielo hasta cargar el gel.

6.11.5. La electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta de electroforesis *HE100 Super SubTM Horizontal Unit* de *Hofer* que posee un circuito de refrigeración para evitar la degradación térmica del ARN y un sistema de mezcla del tampón de electroforesis que permite una separación uniforme de las muestras. El tampón de electroforesis fue 1xMOPS.

Después de cargar las muestras, se conectó la fuente a 100-105 V durante unas 2-3 horas, hasta que el primer frente (azul de bromofenol) recorrió aproximadamente 10 centímetros. Se tiñó el gel con bromuro de etidio (1/10) durante 5 minutos y se destiñó, 2 veces, durante 10 minutos en agua tratada y en agitación moderada. Se fotografió el gel y a continuación se transfirió a una membrana de nylon mediante vacío.

6.11.6. La transferencia

En las transferencias, se utilizaron membranas de nylon (tamaño del poro 0,45 μm) con cargas positivas (*Roche*) que se cortaron a medida y que, inmediatamente después de humedecerlas en agua tratada, se sumergieron en una solución de 10xSSC (NaCl 1,5 M, citrato sódico 0,15 M) durante 10 minutos antes de realizar la transferencia.

Se transfirió el ARN a la membrana utilizando una solución de 10xSSC a una presión de vacío de 50 a 60 mBa durante 1 hora, se retiró el gel (comprobándose en el transiluminador que todo el ARN había sido transferido) y tras un lavado rápido de la membrana en 10xSSC para eliminar los fragmentos de agarosa y el exceso de sales, se fijó el ARN a la membrana con luz UV, aplicando mediante el dispositivo *UV Cross Linker 500* de *Hofer*, una energía de 120 mJ/cm^2 de membrana o en un transiluminador UV durante 5 minutos. Finalmente se etiquetó la membrana, se selló en una bolsa de plástico y se conservó en la nevera a 4°C hasta la hibridación.

6.11.7. Preparación de las sondas

Las sondas se marcaron por el método del “*random-primed*” (cebadores aleatorios) (Feinberg y Vogelstein, 1983) utilizando los reactivos suministrados en el kit *Prime-a-Gene Labeling System (Promega)*. Para ello, se disolvieron entre 30 ng y 3 µg de ADN en 14 µL de agua, se hirvieron durante 5 minutos para su desnaturalización, y se enfriaron rápidamente en hielo. Al ADN desnaturalizado se le añadió:

Mezcla de marcaje	7 µL
$\alpha^{32}\text{P}$ dATP*	3 µL
Klenow 5U/µl	1 µL
H ₂ O hasta V _f =	25 µL

* Suministrado por la casa comercial *Amersham Pharmacia Biotech*.

Mezcla de marcaje: Tampón de marcaje 5x*	300 µL
dCTP (1,5 mM)	20 µL
dGTP (1,5 mM)	20 µL
dTTP (1,5 mM)	20 µL
BSA ⁽¹⁾ (10 mg/mL)	60 µL

*Tampón de marcaje 5x: (Tris-HCl 250 mM pH 8,0, MgCl₂ 25 mM, DTT 10 mM, HEPES⁽²⁾ 1M pH 6,6, 26 unidades de A₂₆₀/mL de hexadesoxirribonucleótidos aleatorios).

Se incubó durante un mínimo de 1 hora a 37°C.

(1) **BSA**: Seroalbúmina bovina.

(2) **HEPES**: Ácido (4-(2-Hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico).

Para rectificar la pequeña heterogeneidad resultante de defectos de carga del ARN entre los distintos pocillos del gel, se hibridaron posteriormente los filtros con un control de carga representado por el gen del rARN 25S. Se sintetizó una sonda oligonucleotídica (5'-CTCCGCTTATTGATATGC-3') a partir de la secuencia de ADN que codifica el rARN 25S y se marcó mediante marcaje terminal con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Lillehaug y Kleppe, 1975).

En este caso se mezclaron en un volumen final de reacción de 15 µL:

- 5-10 pmol del oligonucleótido

- 1 μ L de tampón 10x (Tris-HCl 500 mM, MgCl₂ 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 50 mM, espermidina 1 mM, pH 8,2)
- 1 μ L de γ^{32} PATP*
- 1 μ L de T₄-polinucleótido quinasa 10U/ μ L (*Roche*)

* Suministrado por la casa comercial *Amersham Pharmacia Biotech*.

Se dejó incubando la reacción a 37°C durante 30 minutos y se añadió posteriormente a la solución de hibridación.

6.11.8. Separación y cuantificación de la incorporación de isótopo

Para poder valorar la incorporación de isótopo en el ADN, se prepararon columnas de exclusión con Sephadex G-50 saturado con STE (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM y SDS 1%). Una vez empaquetada, se equilibró la columna con STE, se añadió el ADN marcado y se recolectaron 6 fracciones al final de la columna en tubos *Eppendorff*, haciendo pasar por la columna 400 μ L de STE para la primera fracción y luego cinco veces 200 μ L de STE para las siguientes. El isótopo no incorporado se quedó retenido en las columnas.

A continuación, se localizaron las fracciones con mayor incorporación de radioactividad con el sensor de un contador *Geiger (mini-monitor G-M tube serie 900 de Morgan)*, posteriormente, se determinaron las cuentas por minuto (cpm) de cada una de estas fracciones utilizando un contador de centelleo de radiaciones β (*Wallac System 1410TM liquid scintillation counter de Pharmacia*) y se recogieron aquellas muestras de ADN con el mayor número de cuentas.

6.11.9. Reacciones de hibridación y lavado

Se introdujeron las membranas en botellas de hibridación e inmediatamente después de añadir 20 mL de solución de hibridación (Na₂HPO₄ 1 M a pH 7,2, SDS 20% y EDTA 0,5 M) (Church y Gilbert, 1984), se dejó prehibridando 1 hora a 60-65°C en un horno de hibridación (*Minihybridisation oven de APPLIGENE e Hybridization oven Model 1004 de SHEL-LAB*) con el fin de eliminar posibles uniones inespecíficas durante la hibridación. Transcurrido este tiempo, se renovó la solución de hibridación (10 mL) a los que se añadió la sonda marcada y desnaturalizada (400 μ L) cuidadosamente para que no tocara la membrana antes de que se diluyese en la solución

de hibridación. La hibridación se realizó durante una noche a la misma temperatura. Al día siguiente, por la mañana, se retiró la solución de hibridación y se procedió al lavado.

Para las hibridaciones con la sonda de rARN 25S se procedió de la misma manera excepto que la temperatura de hibridación fue de 42°C.

Tras la hibridación se eliminó la sonda no unida mediante una serie de lavados con 20 mL de una solución de lavado (2xSSC y SDS 0,1%) a 60-65°C. Por lo general, se realizaron del siguiente modo: un lavado de 10 minutos a la temperatura de hibridación, seguido de dos lavados de 10 minutos a temperatura ambiente; aunque el número y duración de los lavados varió dependiendo del grado de emisión de las membranas. Para la sonda oligonucleotídica de rARN 25S los lavados se hicieron a 42°C.

Después de retirar la solución de lavado, las membranas radioactivas se introdujeron en una bolsa de plástico para poder exponerlas a la pantalla de fósforo del sistema *PhosphorImager SITM* en unos casos y en otros a las películas de autorradiografía, para su análisis posterior.

Las membranas ya hibridadas con una determinada sonda se lavaron, en algunos casos, con una solución 0,1xSSC y SDS 0,1% durante 2-3 horas a 80°C para proceder a una nueva hibridación con una sonda distinta.

6.11.10. Cuantificación de los niveles de expresión

Para analizar las señales radiactivas de hibridación sobre la membrana de nylon se usó un escáner (*PhosphorImager SITM Scanning Instrument 425* de *Molecular Dynamics*) para el caso de las pantallas de fósforo y un densitómetro *Personal Densitometer SITM* (*Molecular Dynamics*) para las películas de autorradiografía. Las cuantificaciones de las señales se realizaron empleando el programa informático *Image Quant* versión 5.0. de *Molecular Dynamics*). Las señales correspondientes a los mARN se cuantificaron y se normalizaron los valores obtenidos respecto a la carga relativa inicial.

En la mayoría de los *northern*s realizados en la presente memoria, una vez normalizados los valores con respecto al control de carga, estos valores se normalizaron al 100%, dándole al mayor valor de cuantificación de un mismo *blot* el valor 100%. Se puede observar que en algunos *northern*s normalizados al 100%, ninguna condición ensayada tiene el valor del 100%, esto es debido a que al hacer media entre los datos de

cuantificación obtenidos en las distintas réplicas esa condición no siempre es el 100%. En el caso de que, en las distintas réplicas de un mismo *northern*, una condición ensayada siempre tenga el valor 100%, esto implicará que para esta muestra la media sea del 100% y que no tenga desviación estándar o error estándar.

6.12. Southern blot

Para los experimentos de *Southern blot* se utilizó el kit *Digoxigenin labeling and detection* (Roche), variando algunas de las recomendaciones del vendedor en los casos en los que fue necesario. Fundamentalmente estas variaciones se refieren a los tiempos y temperaturas de hibridación, así como a los lavados de las membranas, hasta conseguir el óptimo de señal en cada caso.

6.12.1. El gel de agarosa

Tanto en el caso de *Southern blot* de ADN genómico como plasmídico, el ADN digerido con diferentes endonucleasas de restricción se separó mediante electroforesis en geles de agarosa (*Véase geles no desnaturalizantes*).

6.12.2. La electroforesis

(*Véase geles no desnaturalizantes*). Para determinar el peso molecular de los distintos fragmentos se hicieron migrar, al mismo tiempo que las muestras, diferentes marcadores de pesos moleculares marcados con digoxigenina.

Una vez realizada la electroforesis se fotografió el gel y a continuación se transfirió el ADN del gel a una membrana de nylon.

6.12.3. La transferencia

En las transferencias se utilizaron membranas de nylon (tamaño del poro 0,45µm) cargada positivamente (Roche) que se cortaron a medida y que se sumergieron durante 5 minutos en una solución de neutralización (Tris-HCl 0,5 M pH 7,8, NaCl 1,5 M) antes de realizar la transferencia.

Se transfirió el ADN del gel a la membrana a una presión de vacío de 50 a 60 mBa durante 45 minutos y utilizando una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M) que se añadió al gel durante los primeros 5 minutos de transferencia a vacío, durante los 40 minutos siguientes se añadió solución de neutralización. Se retiró el gel, comprobándose en el transiluminador que todo el ADN había sido transferido, y se fijó el ADN a la membrana con luz UV, aplicando mediante el dispositivo *UV CrossLinker 500* de *Hoefer*, una energía de 120 mJ/cm² de membrana o en un transiluminador UV durante 5 minutos. Finalmente se etiquetó la membrana, se selló en una bolsa de plástico y se conservó en la nevera a 4°C hasta la hibridación.

6.12.4. Preparación de las sondas

Las sondas se marcaron por el método del “*random-primed*” (cebadores aleatorios) (Feinberg y Vogelstein, 1983) utilizando los reactivos suministrados en el kit *Dig DNA Labeling and Detection* (Roche). Para ello, se disolvieron entre 0,5 y 3 µg de ADN en 15 µL de agua, se hirvieron durante 10 minutos a 94°C para su desnaturalización, y se enfriaron rápidamente en hielo o nieve carbónica. Al ADN desnaturalizado se le añadió:

Mezcla de hexanucleótidos 10x	2 µL
Mezcla de dNTPs 10x (1mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP pH 7,5)	2 µL
Klenow 2U/µL	1 µL
H ₂ O hasta V _f	25 µL

Se mezcló bien y se incubó durante un mínimo de 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, se paró la reacción añadiendo 2 µL de EDTA 0,2 M pH 8,0. Posteriormente se precipitó el ADN añadiendo 2,5 µL de LiCl 4 M, 75 µL de etanol al 95%, dejándolo durante 30 minutos a -70°C o durante 2 horas a -20°C y centrifugándolo en una microcentrífuga durante 15 minutos. A continuación se lavó el botón celular con 50 µL de etanol al 70%, se secó en una bomba de vacío y se disolvió en 50 µL de 1xTE (Tris-HCl 1 M pH 7,5, EDTA 0,5 M pH 8,0).

6.12.5. Comprobación del marcaje de las sondas

Para comprobar si el marcaje de la sonda había sido bueno se realizó un *Dot-blot*. Esta técnica consistió en dispensar a modo de punto, sobre una membrana de nylon cargada positivamente (*Roche*), 1 μ L de varias soluciones control; una solución que contiene un ADN no marcado con la digoxigenina (control -), una solución que contiene un ADN marcado con la digoxigenina (control +) y nuestra sonda recién marcada. Generalmente se suelen hacer varias diluciones de los controles y de nuestra sonda. Los controles los suministra el kit. Después de secar la membrana en la estufa a 37°C durante 10-15 minutos se llevó a cabo la detección inmunológica.

6.12.6. Detección inmunológica

La membrana se lavó con una solución de lavado (Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 1M) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de incubarla durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de bloqueo (suministrada en el kit) y otros 30 minutos con el anticuerpo conjugado Anti-digoxigenina-PA, se lavó dos veces durante 10 minutos con solución de lavado a temperatura ambiente. Posteriormente, se equilibró la membrana durante 2 minutos en una solución de detección (Tris-HCl 1 M pH 9,5, NaCl 1 M, MgCl₂ 1 M) y se incubó con la solución sustrato-color (NBT y BCIP suministrada en el kit) hasta que se completó la reacción (aproximadamente después de 16 horas). La membrana no puede agitarse durante la reacción de color y tampoco puede ser expuesta a la luz, sólo durante pequeños períodos de tiempo para observar si la reacción colorimétrica finalizó. Cuando se visualizaron las bandas, se paró la reacción lavando la membrana durante 5 minutos con 50 mL de agua. Los resultados fueron documentados mediante el fotocopiado o fotografiado de la membrana húmeda.

6.12.7. Reacciones de hibridación y lavado

Se introdujeron las membranas en botellas de hibridación e inmediatamente después de añadirle 20 mL de solución de hibridación (20xSSC pH 7,0, SDS 20%, solución de bloqueo), se dejó prehibridando 1 hora a 50-55°C en un horno de hibridación (*Minihybridisation oven* de APPLIGENE e *Hybridization oven Model 1004* de SHEL-LAB) con el fin de eliminar posibles uniones inespecíficas durante la

hibridación. Transcurrido este tiempo, se renovó la solución de hibridación (5 mL) a los que se añadió la sonda marcada y desnaturalizada (50 μ L) cuidadosamente para que no tocara la membrana antes de que se diluyese en la solución de hibridación. La hibridación se realizó durante una noche a la misma temperatura. Al día siguiente, por la mañana, se retiró la solución de hibridación y se procedió al lavado.

Tras la hibridación se eliminó la sonda no unida mediante una serie de lavados con 20 mL de una solución de lavado (20xSSC, SDS 20%) a 50-55°C. Por lo general, se realizaron del siguiente modo: un lavado de 10 minutos a la temperatura de hibridación, seguido de un lavado de 10 minutos a temperatura ambiente.

Después de retirar la solución de lavado, las membranas se sometieron a la detección inmunológica (descrita anteriormente).

6.13. Inmunotransferencia (*Western-blot*)

Una vez realizada la electroforesis en *SDS-PAGE* (véase geles desnaturalizantes *SDS-PAGE*) se lavó el gel en agua destilada para eliminar el tampón de electroforesis. Posteriormente, se sumergió el gel en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%) al igual que la membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,2 μ m). Para la transferencia se utilizó un aparato *Trans-Blot* húmedo (*Bio-Rad*), se colocaron desde el polo negativo al positivo, una esponja, 2 trozos de papel de filtro previamente embebidos en tampón de transferencia, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, otros 2 trozos de papel de filtro, y finalmente una esponja. Las proteínas se electrotransfirieron acoplando el *trans-blot* a una fuente de alimentación. Las condiciones de la transferencia fueron: voltaje constante de 100 V durante una hora. Al finalizar la transferencia, se retiró la membrana de nitrocelulosa y se lavó con agua destilada. A continuación se tiñó la membrana durante unos 10 minutos con *Ponceau S* al 0,2% y ácido tricloroacético al 3% para verificar la transferencia de las proteínas. Seguidamente, se lavó con agua destilada hasta que se eliminó el fondo rojo y se pudieron observar perfectamente las bandas polipeptídicas.

Para evitar las uniones inespecíficas de anticuerpos a la membrana a la que se transfirieron, las proteínas se incubaron durante 2 horas en tampón TBS (Tris-HCl 0,3% pH 8, NaCl 0,8%, KCl 0,02%) con Tween 20 al 0,2% y 5% de leche descremada. Se incubó la membrana con el primer anticuerpo: anti-His (C-terminal), *Invitrogen*, diluido 1:5000, durante 90-120 minutos con agitación a temperatura ambiente.

Tras la incubación se lavó 5 veces con TBS Tween 20 0,2%, 5 minutos cada lavado y a continuación se trató con el segundo anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa (*Dakopatts*) a una dilución 1/1.600 en TBS Tween 20 al 0,2% durante 90 minutos. Se procedió a un nuevo lavado con TBS y se reveló. El color de la reacción se desarrolló utilizando, como sustrato de la peroxidasa, H₂O₂ al 0,03% en presencia de diaminobencidina disuelta en Tris-HCl 50 mM pH 7,6 y cloruro de níquel al 0,03%, durante 2-5 minutos. La reacción se detuvo introduciendo la membrana en tampón TBS o añadiendo abundante agua destilada.

7. TÉCNICAS ANALÍTICAS

7.1. Determinación de proteínas de un extracto (método de Bradford)

El método de Bradford (1976) es un método colorimétrico que nos permitió detectar pequeñas cantidades de proteínas, hasta 1 µg.

Se preparó 1 mL de la muestra problema convenientemente diluida, de ahí se tomaron 800 µL y se llevaron a 1 mL con el reactivo *Protean-assay* de *Bio-Rad*. Las muestras se agitaron vigorosamente con la ayuda de un *vortex* y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Antes de transcurrida 1 hora se determinó su absorbancia a 595 nm. La recta de calibrado se elaboró con albúmina de suero bovino 2,5 mg/mL (BSA) suministrada por *New England Biolabs*, en cantidades comprendidas entre 1 y 25 µg. El blanco se preparó con 800 µL de agua destilada y se llevó a 1 mL con el mismo reactivo.

Se empleó el programa informático *StatGraphics Plus* para calcular la ecuación de la recta de calibrado y a partir de la ecuación se determinó la concentración de proteína de cada extracto.

7.2. Determinación de la actividad β-galactosidasa en levaduras

Los ensayos de actividad β-galactosidasa se realizaron sobre levaduras de *K. lactis* transformadas con el vector pXW2 que posee la secuencia codificadora del gen *lacZ* de *E. coli* y sobre levaduras de *S. cerevisiae* transformadas con el plásmido YEpFLAG1-LAC4 que contiene el gen de la β-galactosidasa de *K. lactis*.

7.2.1. Determinación cualitativa de la actividad β -galactosidasa

Se emplearon placas CM omitiendo el uracilo utilizado como marcador auxotrófico (véase medios de cultivo) suplementadas con 1 mL por cada 500 mL de placas del compuesto cromogénico X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-Galactopiranosido) al 2% en dimetilformamida.

Las colonias que poseían actividad β -galactosidasa se identificaron por la aparición de color azul en el medio.

7.2.2. Determinación cuantitativa de la actividad β -galactosidasa

Se emplearon dos métodos diferentes pero ambos están basados en el método de Guarente (1983). El primero que se describe a continuación fue el empleado en el apartado de la producción de la fructosa-1,6-bisfosfato a partir de lactosueros. El segundo se empleó para el estudio de las regiones promotoras de los genes *KIFBA1* y *KINDII*.

MÉTODO 1:

Este método se modificó para adaptarlo a los diferentes preparados enzimáticos utilizados. La actividad enzimática se midió siguiendo la liberación de o-nitrofenol (ONP) a partir del sustrato sintético o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG).

Para medir la actividad en células libres, se dosificó en tubos de ensayo una cantidad de suspensión celular entre 1-5 mL, se centrifugó 5 minutos a 3.000 r.p.m., se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con tampón Z (pH 7), cuya composición es la siguiente:

Na ₂ HPO ₄	100 mM/L
NaH ₂ PO ₄	40 mM/L
KCl	10 mM/L
MgSO ₄	1,6 mM/L
B-mercaptoetanol	2,7 mL/L

Posteriormente se resuspendió en 2 mL del mismo y se le añadieron 110 μ L de cloroformo y 170 μ L de SDS al 0,1%. Se agitó fuertemente en *vortex* durante 15 segundos y se preincubó a 30°C durante 5 minutos al cabo de los cuales se añadieron 440 μ L de la solución de sustrato (4 mg/mL de ONPG en agua destilada) y se dejó que

la reacción se desarrollase, a la misma temperatura, en un baño con agitación hasta la aparición del color amarillo característico del producto.

A partir de este momento, se sacaron dos alícuotas de 1 mL a intervalos de tiempo controlados desde la adición del sustrato. La reacción se detuvo añadiendo dichas alícuotas sobre 0,5 mL de carbonato sódico 1 M contenidos en un tubo *Eppendorff*.

La mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos para separar las células. En el sobrenadante, se determinó espectrofotométricamente el o-nitrofenol liberado, por medida de la absorbancia a 420 nm. La concentración se calcula usando un coeficiente de extinción molar de 4.500 L/mol x cm (Inchaurredo *et al.*, 1994).

Para la cuantificación de la actividad en un medio sin células, se procedió del mismo modo que para las células libres pero, en este caso, en lugar de la suspensión celular, se añadió un volumen de 100-300 μ L de medio de cultivo libre de células directamente sobre el tampón Z y se prescindió de añadir los agentes permeabilizantes cloroformo y SDS.

Cuando en el presente trabajo se habla de actividad β -galactosidasa intracelular se hace referencia a la actividad β -galactosidasa del citoplasma y del periplasma (espacio entre la membrana plasmática y la pared celular) de la célula y cuando se habla de actividad β -galactosidasa extracelular se hace referencia a la actividad β -galactosidasa en el medio de cultivo.

Se definió la Unidad Enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que libera un μ mol de o-nitrofenol por minuto en las condiciones de ensayo. Las unidades se dan como U.E./mL de medio de cultivo.

MÉTODO 2:

Las células crecidas hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5-0,6 (10^6 - 10^7 células/mL) se centrifugaron durante 5 minutos a 4.000 r.p.m. El sobrenadante (5-30 mL) se descartó, a continuación se añadió 1 mL de tampón Z (Na_2HPO_4 30 mM, NaH_2PO_4 20 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM y 2-mercaptoetanol 2,7 mL en un volumen final de 1 litro), 55 μ L de cloroformo y 87,5 μ L de SDS al 0,1%. Se agitó vigorosamente en *vortex* durante 15 segundos y se incubaron las muestras a 30°C durante 5 minutos. La reacción comenzó al añadirle 0,2 mL de ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) 4mg/mL. Se dejó que la reacción se desarrollase hasta la aparición de un color amarillo, en este momento se anotó el tiempo transcurrido y se paró la

reacción recogiendo 1 mL de la muestra y añadiéndole 0,5 mL de Na_2CO_3 . Se centrifugaron las muestras a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos y el sobrenadante se empleó para medir su absorbancia a 420 nm frente a un blanco que contenía 1 mL de tampón Z y 0,5 mL de Na_2CO_3 . Los valores de actividad β -galactosidasa se expresan en unidades calculadas según Adams *et al.* (1997) mediante la siguiente fórmula: $(A_{420}/\text{DO}_{600} \times V \times T) \times 1000$ en donde:

$A_{420\text{nm}}$: es la absorbancia del producto o-nitrofenol.

$\text{DO}_{600\text{nm}}$: es la densidad óptica del cultivo cuando se recogen las células para realizar el ensayo.

V: es el volumen de cultivo empleado para hacer el ensayo expresado en mililitros.

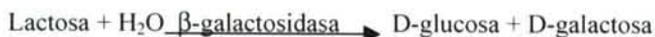
T: es el tiempo que tarda en transcurrir la reacción de color expresado en minutos.

En algunos casos, los valores de actividad β -galactosidasa se normalizaron al 100%, dándole al mayor valor de actividad β -galactosidasa obtenido de un mismo experimento el valor 100%. Se puede observar que en los experimentos normalizados al 100%, ninguna deleción ensayada tiene el valor del 100%, esto es debido a que al hacer media entre los datos de actividad β -galactosidasa obtenidos en las distintas réplicas realizadas de una misma deleción, tan sólo una de las réplicas de la misma deleción es la que va a dar el mayor valor que es el que se va a considerar como el 100%.

7.3. Determinación de la lactosa/D-galactosa

Se utilizó un test comercial (Boehringer-Mannheim) basado en la medida espectrofotométrica del NADH formado a partir de la D-galactosa, mediante las siguientes reacciones enzimáticas:

La lactosa es hidrolizada a D-glucosa y D-galactosa en presencia del enzima β -galactosidasa.



La D-galactosa es oxidada por el dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD^+) a ácido galactónico en la presencia del enzima β -galactosidasa deshidrogenasa.



La cantidad de NADH formada en la reacción es estequiométrica con la cantidad de lactosa y D-galactosa, respectivamente. El incremento de NADH se determina a partir de su absorbancia a 340 nm.

La concentración de lactosa y D-galactosa, en la muestra, debe estar comprendida entre 0,05 y 0,5 g/L.

Procedimiento:

Se pipetearon, directamente en cubetas de 1 cm de recorrido óptico, cuatro para cada ensayo (blanco y muestra de lactosa, blanco y muestra de galactosa), 0,20 mL de una disolución de 5 mg/mL de NAD^+ en tampón citrato pH 6,6 con sulfato magnésico.

Se añadieron 0,05 mL de la suspensión de β -galactosidasa en las cubetas correspondientes al blanco y a la muestra de lactosa.

A continuación se adicionaron 0,10 mL de la muestra, convenientemente diluida, en las cubetas de lactosa y galactosa.

Se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió 1 mL de tampón difosfato pH 8,6 tanto a las muestras como a los blancos.

Las mezclas se llevaron, con agua destilada, hasta el mismo volumen final, empleando para ello 2 mL y 2,05 mL en los blancos de lactosa y galactosa, respectivamente y 1,90 y 1,95 mL para las muestras.

Se mezclaron y tras dos minutos se leyó la absorbancia de las soluciones (A_1).

A continuación, se inició la reacción al adicionar 0,05 mL de la suspensión del enzima β -galactosidasa deshidrogenasa a todas las cubetas.

Se mezclaron y aproximadamente a los 20 minutos, cuando la reacción ya finalizó, se leyó la absorbancia de las soluciones (A_2).

Se determinó la diferencia de absorbancias ($A_2 - A_1$) para cada muestra y su blanco correspondiente. A continuación se restó el incremento de absorbancia del blanco del de la muestra. Con los valores obtenidos se hicieron los cálculos.

$$\begin{aligned} \Delta A_{L+G} &= \Delta A_{\text{muestra lactosa}} - \Delta A_{\text{blanco lactosa}} \\ \Delta A_G &= \Delta A_{\text{muestra D-galactosa}} - \Delta A_{\text{blanco D-galactosa}} \end{aligned}$$

Debido a que la muestra de lactosa puede contener además galactosa libre, para calcular la concentración de lactosa se utilizó la diferencia de absorbancias:

$$\Delta A_L = \Delta A_{L+G} - \Delta A_G$$

$$\text{Concentración lactosa o D-galactosa (g/L)} = (V \times P_m / \epsilon \times d \times v \times 1000) \times (\Delta A_L \text{ o } \Delta A_G)$$

V = volumen final (3,30 mL)

P_m = peso molecular: lactosa (342,3 g/mol)

D-galactosa (180,16 g/mol)

ε = coeficiente de absorción molar del NADH a 340 nm (6,3 L/mmol . cm)

v = volumen de muestra (0,1 mL)

d = recorrido óptico (1 cm)

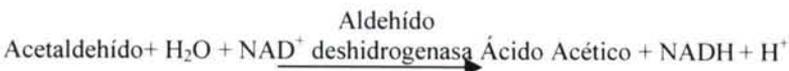
7.4. Determinación de etanol

Se utilizó un test comercial (Boehringer-Mannheim) basado en la medida espectrofotométrica del NADH formado a partir del etanol mediante las siguientes reacciones enzimáticas:

El etanol es oxidado a acetaldehído en presencia del enzima alcohol deshidrogenasa por el dinucleótido de nicotinamida-adenina(NAD⁺).



El equilibrio de esta reacción tiende al lado del etanol y el NAD⁺, pudiendo ser completamente desplazado a la derecha en condiciones alcalinas y por atrapamiento del acetaldehído formado. El acetaldehído es oxidado en presencia de aldehído deshidrogenasa cuantitativamente a ácido acético.



El NADH se determina a partir de su absorbancia a 340 nm.

Procedimiento:

Se disolvió una tableta que contiene 4 mg de NAD⁺ y 0,8 unidades de aldehído deshidrogenasa, en 3 mL de tampón difosfato potásico pH=9. La mezcla se pipeteó directamente en cubetas de 1 cm de recorrido óptico, dos para cada ensayo (muestra y blanco).

En la cubeta correspondiente a la muestra se añadió 0,1 mL de la misma, convenientemente diluida. En la cubeta del blanco, se sustituyó el volumen de la muestra por agua destilada. Se mezclaron, se esperó aproximadamente 3 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia de las soluciones (A_1) frente a un blanco de agua destilada.

A continuación se añadieron 0,05 mL de suspensión del enzima, alcohol deshidrogenasa, a cada cubeta. Se mezclaron, se incubaron de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y, tras completarse la reacción, se leyeron las absorbancias de las soluciones (A_2).

Se determinó la diferencia de absorbancias ($A_2 - A_1$) para muestra y blanco. A continuación se restó el incremento de absorbancia del blanco del de la muestra. Con el valor obtenido se hicieron los cálculos.

$$\Delta A = \Delta A \text{ muestra} - \Delta A \text{ blanco}$$

$$\text{Concentración etanol} = (V \times P_m / \epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000) \times \Delta A$$

V = Volumen final (3,15 mL)

P_m = Peso molecular del etanol (46,07 g/mol)

ϵ = Coeficiente de absorción molar del NADH a 340 nm (6,3 L/mmol . cm)

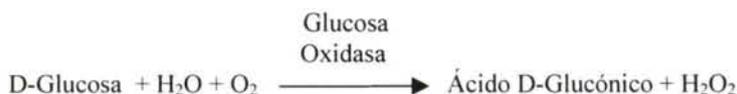
v = volumen de muestra (0,1 mL)

d = recorrido óptico (1cm)

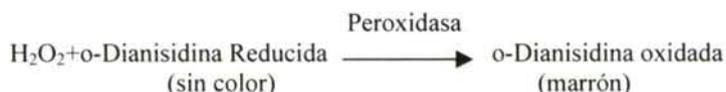
7.5. Determinación de glucosa

Se utilizó un test comercial (Sigma) basado en la medida espectrofotométrica de la o-Dianisidina oxidada formada a partir de la D-Glucosa mediante las siguientes reacciones enzimáticas:

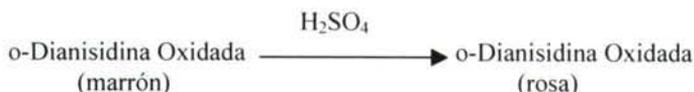
La Glucosa es oxidada a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por la glucosa oxidasa:



El peróxido de hidrógeno reacciona con la o-Dianisidina en la presencia de peroxidasa para formar un producto coloreado:



La o-Dianisidina oxidada reacciona con ácido sulfúrico para formar un producto coloreado más estable:



La intensidad del color rosa medida a 540 nm es proporcional a la concentración de glucosa original.

Procedimiento:

Se necesitaron tres tubos de 18 mm x 150 mm por cada ensayo (blanco, muestra y control). El blanco constó de 1 mL de agua destilada, la muestra constó de 1 mL de la solución cuya concentración de glucosa queríamos calcular y el control constó de 0,950 mL de agua desionizada y 0,05 mL de una solución estándar de glucosa de concentración conocida.

A continuación se inició la reacción añadiendo 2 mL de reactivo de ensayo (que resulta de la mezcla de la o-Dianisidina con la Glucosa Oxidasa/Peroxidasa) a cada uno de los tubos, blanco, muestra y control.

Se dejaron los tubos incubando a 37°C durante exactamente 30 minutos. La reacción se paró añadiendo 2 mL de H₂SO₄ 12N a cada tubo. Se mezcló cuidadosamente cada uno de los tubos y se midió la absorbancia frente al blanco a 540 nm.

Con los valores de absorbancia así obtenidos, se hicieron los siguientes cálculos:

$$\text{mg de Glucosa} = \frac{(\Delta A_{540} \text{ muestra}) (0,05)}{\Delta A_{540} \text{ control}}$$

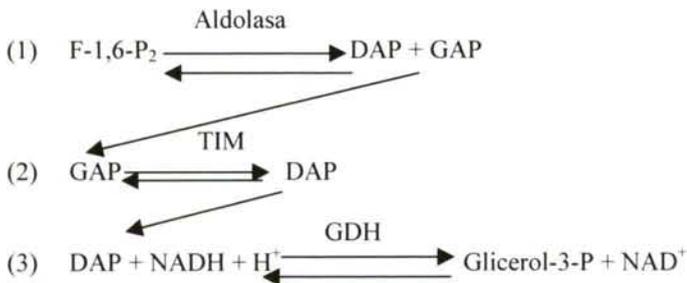
7.6. Producción y determinación de la fructosa-1,6-bisfosfato (F-1,6-P₂)

Las células de levadura crecidas en suero de leche fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas, hasta una concentración de 500 g/L, en 40 mL de medio de bioconversión. Las células se permeabilizaron por adición de tolueno al 10% o etanol al 70% con agitación vigorosa de la suspensión durante 1 minuto, para el caso del tolueno, y agitación moderada durante 5-10 minutos para el caso del etanol. La suspensión se mantuvo en agitación moderada a 30°C durante toda la bioconversión sin retirar el agente permeabilizante en el caso del tolueno al 10% y retirándolo mediante centrifugación y resuspensión de las células en medio fresco en el caso del etanol al 70%. Las muestras de la suspensión tomadas a diferentes tiempos se centrifugaron, los

sobrenadantes se desproteinizaron añadiendo 1 mL de ácido perclórico 1M a 1 mL de la muestra y dejándolos 15 minutos en hielo, posteriormente se neutralizaron con 0,5 mL de carbonato potásico 2,5 M durante 15 minutos en hielo. A continuación, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se usaron para la determinación de fructosa -1,6-bisfosfato.

La F-1,6-P₂ se determinó por el método de Michal y Hans-Otto Beutler (1974). Este método sirve para la determinación espectrofotométrica de la dihidroxiacetona fosfato, la fructosa-1,6-bisfosfato y el gliceraldehido-3-fosfato debido a que usa la misma reacción. Los tres sustratos pueden ser determinados cuantitativamente en sucesión por un único procedimiento. La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa escinde la fructosa-1,6-bisfosfato en gliceraldehido-3-fosfato (GAP) y dihidroxiacetona fosfato (DAP). La triosafosfato isomerasa (TIM) cataliza el equilibrio entre la GAP y la DAP. La glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDH) cataliza la reducción de la DAP con el dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH).

Principio:



La sucesión de la reacción procede rápidamente con un exceso adecuado de NADH y concentraciones de enzima adecuadas. Este método mide el descenso en la extinción a 340nm asociado a la oxidación del NADH. Se oxidan 2 moles de NADH por mol de F-1,6-P₂. La inclusión de la reacción triosafosfato isomerasa (2) incrementa la sensibilidad de la determinación. Uniendo las reacciones (1)-(3) se obtiene la siguiente ecuación:



Reactivos:

- Carbonato potásico (K₂CO₃) 2,5 M

- Ácido perclórico 1 M
- Tampón trietanolamina 0,4 M; pH 7.6
- Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (NADH-Na₂)
- Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GDH)
- Triosafosfato isomerasa (TIM)
- Aldolasa

Procedimiento:

Se pipetearon, directamente en cubetas de 1 cm de recorrido óptico, 1,5 mL de tampón trietanolamina y 1,5 mL de la muestra desproteinizada, a continuación se ajustó a cero el espectrofotómetro. Posteriormente se añadieron 0,01 mL de la solución de NADH-Na₂, se mezcló bien, se mantuvo a temperatura ambiente y se leyó la extinción inicial E₁ dos o más veces a intervalos de tiempo de 3 minutos. La primera reacción comenzó cuando se añadió 0,01 mL de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, se mezcló bien, se mantuvo a temperatura ambiente y después de que la reacción terminó, al cabo de 5-7 minutos, se leyó la extinción E₂ varias veces a intervalos de 3 minutos. En el caso de que se quisiera determinar la dihidroxiacetona fosfato (DAP), habría que hacer los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned}\Delta E_{\text{DAP}} &= E_1 - E_2 \\ \text{DAP } (\mu\text{mol/mL}) &= \Delta E_{\text{DAP}} \times 0,324 \\ \text{DAP } (\text{mg/mL}) &= \Delta E_{\text{DAP}} \times 0,550\end{aligned}$$

La segunda reacción tuvo lugar cuando se añadieron 0,01 mL de la enzima triosafosfato isomerasa, se mezcló bien, se mantuvo a temperatura ambiente y después de que la reacción terminó, al cabo de 3-5 minutos, se leyó la extinción E₃ varias veces a intervalos de 2 minutos. Si se desea determinar el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) hay que hacer los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned}\Delta E_{\text{GAP}} &= E_2 - E_3 \\ \text{GAP } (\mu\text{mol/mL}) &= \Delta E_{\text{GAP}} \times 0,325 \\ \text{GAP } (\text{mg/mL}) &= \Delta E_{\text{GAP}} \times 0,0552\end{aligned}$$

La tercera y última reacción comenzó al añadirle 0,01 mL de la enzima aldolasa, se mezcló bien, se mantuvo a temperatura ambiente, y, después de que la reacción hubiese transcurrido, después de 6-9 minutos, se leyó la extinción E₄ varias veces a intervalos de 3 minutos. A continuación, se realizaron los siguientes cálculos para determinar la fructosa-1,6-bisfosfato (F-1,6-P₂):

$$\Delta E_{F-1,6-P_2} = E_3 - E_4$$

$$F-1,6-P_2 (\mu\text{mol/mL}) = \Delta E_{F-1,6-P_2} \times 0,163$$

$$F-1,6-P_2 (\text{mg/mL}) = \Delta E_{F-1,6-P_2} \times 0,0554$$

7.7. Determinación de la actividad aldolasa

El test colorimétrico de Roe según Richards y Rutter (1961) permitió detectar la fructosa-1,6-bisfosfato formada a partir de la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato en presencia de la aldolasa. Se preparó una mezcla que contenía 25 μmoles de glicilglicina, 0,5 mg de BSA (seroalbúmina bovina), 2 μmoles de dihidroxiacetona fosfato, 0,7 μmol de gliceraldehído-3-fosfato, 50 μmoles de acetato potásico y cantidades variables del extracto proteico en un volumen total de 0,5 mL. La reacción se inició por la adición del extracto proteico. Después de incubar la reacción durante 1 minuto a 25°C se paró añadiéndole 1,75 mL de HCl al 30%. A continuación, se añadieron 0,25 mL del reactivo tiourea resorcinol (0,1% resorcinol y 0,25% tiourea en ácido acético glacial) resultando un volumen total de 2,5 mL. Las muestras se calentaron a 80°C durante 10 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente. La absorbancia a 520 nm fue medida utilizando como blanco un control no incubado y frente a una recta patrón de 0,015 a 0,15 μmol de fructosa-1,6-bisfosfato. Se empleó el programa informático *StatGraphics Plus* para calcular la ecuación de la recta de calibrado y a partir de la ecuación se determinó la actividad aldolasa de cada muestra. La actividad aldolasa se expresó como los μmoles o nmoles de fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa producida en 1 minuto por μg de proteína en las condiciones de ensayo.

8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó la purificación de la proteína *KIFba1p* de la levadura *K. lactis* expresada en la cepa *BL21(DE3)* de la bacteria *E. coli* basada en la afinidad existente entre la secuencia de histidinas del vector *pET21d* (que deben estar “*in frame*” con la secuencia codificadora de la proteína a expresar) y un metal iónico inmovilizado (generalmente Ni^{2+}). El agente quelante más empleado es el ácido nitriloacético (*NTA*, *Novagen*) que tiene cuatro sitios disponibles para la interacción con los iones metálicos. Para la preparación de la resina Ni^{2+} -*NTA* se empleó aproximadamente 1 mL de resina por litro de medio de cultivo bacteriano. La resina se centrifugó durante 30 segundos en

la microcentrifuga, se eliminó el sobrenadante y se lavó una vez con tampón de lisis (50mM NaH₂PO₄ pH8,0; 300 mM NaCl; 5 mM β-mercaptoetanol; inhibidores de proteasas: 5mg/mL Aprotinina, 5mg/mL Antipaina, 1mg/mL Antipaina (sin EDTA) y 0,1% Tritón X-100). El precipitado celular procedente de un litro de medio de cultivo se resuspendió en 80-100 mL de tampón de lisis y se lisó empleando un sonicador. Las células se centrifugaron a 15.000 r.p.m. durante 1 hora. El sobrenadante se filtró, se retiró una alícuota para su análisis posterior y se le añadió la resina. Se agitó suavemente durante 1 hora a 4°C. Posteriormente se añadió la mezcla de lisado soluble y resina a una columna y se recogió el sobrenadante. Se lavó la columna con 10 mL de tampón I (1M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0) y se recogió el sobrenadante. Se lavó con tampón II (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0) y se recogió el sobrenadante. La proteína se eluyó con 2 mL de tampón de elución E1 (20 mM Imidazol pH7,5; 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0; 300 mM NaCl), E2 (100 mM Imidazol pH7,5; 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0; 300 mM NaCl), E3 (250 mM Imidazol pH7,5; 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0; 300 mM NaCl) y E4 (500 mM Imidazol pH7,5; 50 mM NaH₂PO₄ pH8,0; 300 mM NaCl). Los sobrenadantes y eluidos recolectados se emplearon para la determinación de la actividad aldolasa o se guardaron congelados a -20°C en glicerol al 20% para la realización de experimentos de cristalización.

9. CRECIMIENTO DE CRISTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE LA GOTA COLGANTE

Este método se empleó para el crecimiento de cristales a partir de la proteína *K/Fba1p* purificada. Se mezclaron, sobre un cubreobjetos (previamente silanizado con diclorometilsilano al 2% en 1,1,1-tricloroetano y lavándolos con agua y metanol al 70%), 2,5 µL de la solución proteica con un volumen igual de la solución del reservorio, con lo que la concentración del precipitante en la gota es igual al 50% de la concentración óptima para cristalizar la proteína. Es importante asegurarse de que no se forman burbujas en la gota, ya que éstas pueden impedir la aparición de cristales. Rápidamente para evitar la evaporación, se invierte el cubreobjetos (permitiendo que la gota quede “colgando”) y se coloca sobre un reservorio de solución precipitante, sellando el conjunto con grasa de silicona. Como el precipitante es el soluto mayoritario en la solución del reservorio, la difusión de vapor en este sistema cerrado resulta en una

transferencia neta de agua desde la solución de proteína (gota) a la solución del reservorio, hasta que la concentración del precipitante se iguale en ambas soluciones.

A medida que entre ambas soluciones se establece el equilibrio, la proteína pasa gradualmente a condiciones de sobresaturación en la gota, lo que le lleva a precipitar. El tiempo necesario para que alcance el equilibrio entre las dos soluciones tiene una gran influencia sobre el resultado final, que puede ir desde un precipitado amorfo o de microcristales a la aparición de un monocristal de buen tamaño, así como a una amplia variedad de situaciones intermedias.

La proteína debe ser lo más pura posible, ya que la presencia de contaminantes puede inhibir la formación del cristal, limitar su crecimiento o empeorar su calidad. Preferentemente debe usarse a una concentración de 10 mg/mL en un tampón en el que sea soluble y estable. El tampón será lo más diluido posible para que afecte poco a la concentración salina final.

Las gotas han de examinarse cuidadosamente con una lupa binocular una vez al día durante la primera semana, y una vez a la semana en el tiempo posterior.

10. MÉTODOS ESTADÍSTICOS: DISEÑO DE PLANES FACTORIALES

Frente a los enfoques experimentales basados en la búsqueda de condiciones óptimas por comparación de las respuestas que se obtienen al realizar series de experimentos variando en cada una de ellas los valores de sólo una de las variables que intervienen en el proceso, los diseños formalizados presentan no sólo la ventaja de economizar experimentación, sino también la de proporcionar una ecuación que permite describir cuantitativamente los efectos combinados y las posibles interacciones de las diversas variables relevantes. En nuestro laboratorio y a lo largo del desarrollo del presente estudio, se han aplicado diseños factoriales completos de primer orden a la optimización de la producción extracelular de β -galactosidasa por *S. cerevisiae* en cultivos en suero de leche. Se estudió la influencia de cuatro variables (temperatura de incubación, aireación del cultivo, concentración de NaCl y tiempo de incubación), y sus interacciones sobre la respuesta. Una vez elegidas las variables, establecidos sus ámbitos experimentales (dominios) y codificados sus valores extremos como $+1$ y -1 (tabla M6), se construyó una matriz experimental en la que:

1. El número de elementos de cada columna es igual al número de experiencias (2^H , siendo H el número de variables).
2. Cada variable debe tomar únicamente los valores extremos (+1 y -1) y, en cada columna, el número de valores en +1 y -1 deben de ser iguales (es decir, cada variable debe de presentar igual número de valores en sus niveles superior e inferior).
3. Debe de cumplirse la condición de ortogonalidad: el producto escalar de todos los vectores columna ha de ser igual a cero.

Además de los experimentos implicados en dicha matriz, se realizaron asimismo al menos cuatro réplicas del punto central (todas las variables en cero), a fin de determinar la variabilidad intrínseca del sistema. A continuación, los resultados obtenidos se utilizaron para la determinación de la ecuación del sistema y el análisis de su significación mediante el módulo de diseño experimental del programa *Statgraphics Plus*:

Tabla M6: Dominios experimentales de las variables y su codificación. Ejemplo para un diseño de tres variables.

Valor codificado	V1	V2	V3
-1	$V_{1n}-dV_{10}$	$V_{2n}-dV_{20}$	$V_{3n}-dV_{30}$
0	V_{1n}	V_{2n}	V_{3n}
+1	$V_{1n}+dV_{10}$	$V_{2n}+dV_{20}$	$V_{3n}+dV_{30}$
Incrementos:			
1	dV_{10}	dV_{20}	dV_{30}

Codificación: $V_c = (V_n - V_0) / dV_n$

Descodificación: $V_n = V_0 + (dV_n * V_c)$

V_c : Valor codificado

V_n : Valor natural

V_0 : Valor natural en el centro del dominio experimental

dV_n : Incremento del valor natural correspondiente a un incremento unidad del valor codificado

La respuesta se visualiza representando la superficie definida por la ecuación (superficie de respuesta) a través de sus proyecciones sobre planos definidos por pares de variables.

11. SOPORTE INFORMÁTICO

Además del *Microsoft Office XP Edition 2002*, se emplearon los programas informáticos que se citan a continuación.

11.1. Análisis de secuencias de ADN

DNAsis HITACHI™. Programa utilizado para analizar secuencias de ADN resultando de gran utilidad para realizar mapas de restricción, búsquedas de estructuras secundarias o de regiones codificadoras.

CHROMAS versión 1.45 (Conor McCarthy, School of Healter Science. Griffith University, Gold Coast Campus, Southport Queensland, Australia). Programa empleado para el análisis de los cromatogramas obtenidos en las reacciones de secuenciación automáticas del ADN.

PICDI (Rodríguez-Belmonte *et al.*, 1996). Programa informático que permite calcular el uso de codones a través del índice ICDI (*Intrinsic Codon Deviation Index*) sin necesidad de conocer los codones óptimos de la especie.

11.2. Diseño de oligonucleótidos sintéticos

OLIGO (Go-Oli-Go™ versión 1.0. Pharmacia Biotech). Permite el diseño de oligonucleótidos sintéticos para luego ser sintetizados y empleados como cebadores en reacciones de secuenciación y de *PCR*.

11.3. Análisis de homologías de secuencias de genes

NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Dentro de esta página de internet se encuentra alojado *PubMed*, una base de datos de publicaciones que permite hacer búsquedas bibliográficas por tema, autor, palabra clave,... Esta página permite además buscar secuencias de ADN, proteínas, *ESTs* (*Expressed Sequence Tags*),... de diversos organismos y realizar análisis de búsquedas de homología y alineamientos entre dichas secuencias y otras secuencias que nosotros le introduzcamos. La dirección de internet de esta página es la siguiente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

SGD (*Saccharomyces Genome Database*). Base de datos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, permite consultar información acerca de cualquier gen de esta levadura y hacer análisis de secuencias comparándolas con las de su base de datos. Su dirección de internet es la siguiente: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>.

GENOSCOPE. Base de datos del genoma de una gran cantidad de organismos, entre ellos levaduras (*Genolévures*), donde se encuentra el de *Kluyveromyces lactis*. Su dirección de internet es la siguiente: <http://www.genoscope.ens.fr/>.

Candida DB. Base de datos de *SGD* donde se almacenan datos de interés acerca de la levadura *Candida albicans*, al igual que en *SGD*, permite realizar análisis comparativos de una secuencia que propone el usuario con las secuencias de su base de datos. Su dirección de internet es la siguiente: <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/>.

ExPASy (*Expert Protein Analysis System*). Servidor de biología molecular del *SIB* (*Swiss Institute of Bioinformatics*) donde se encuentran alojadas una gran variedad de herramientas para el análisis de proteínas. Algunas de las empleadas en este trabajo son el *ClustalW* de *EBI* (*European Bioinformatics Institute*), *ProtParam Tool*, *PSORT II*, *iPSORT*,... Su dirección *on line* es la siguiente: <http://us.expasy.org/>.

PDB (*Protein Data Bank*). Base de datos de proteínas donde aparecen programas que permiten analizar la estructura secundaria de la proteína problema y ofrecen la estructura tridimensional de la proteína más homóloga a ella que haya sido cristalizada y pertenezca a su amplia base de datos. El programa empleado en este trabajo fue el 123D+. Su dirección de internet es la siguiente: <http://www.rcsb.org/pdb/>.

11.4. Búsqueda de secuencias consenso de factores transcripcionales

La predicción de las secuencias consenso de unión a factores transcripcionales en promotores de genes se realizó empleando los siguientes programas informáticos:

TFSEARCH Search Result™. Su dirección en internet es la siguiente: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>.

TRANSFAC™ MatInspector versión 2.2. Su dirección en internet es la siguiente: <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch22.pl>.

YEAST TOOLS. Su dirección en internet es la siguiente: <http://www.ucmb.ulb.ac.be/bioinformatics/rsa-tools/>.

11.5. Tratamiento de imágenes

Adobe® Photoshop versión 5.0. LE. Programa informático que permite el tratamiento de las imágenes escaneadas, en este trabajo se empleó para las

autoradiografías escaneadas de los experimentos de *Northern blot* y para las placas Petri escaneadas en las que se habían resembrado las levaduras.

Kodack Digital Science 1D. Programa informático que no sólo permitió fotografiar el ADN ó ARN de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio sino que también permitió la cuantificación del ADN.

ImageMaster Total Lab, ver.2.00. Programa informático de *Amersham Biosciences* que permitió realizar análisis de densitometría a partir de geles *SDS-PAGE*.

11.6. Análisis estadístico

StatGraphics Plus para *Windows (Statistical Graphics Corporation)* versión 2.1. Programa informático que permitió el análisis estadístico de los datos de cuantificación de los estudios de *Northern blot* y de los ensayos de actividad enzimática y determinación de concentraciones proteicas. Además, permitió construir las matrices experimentales de los planes factoriales y, a partir de los resultados obtenidos, elaborar una ecuación que definió el comportamiento del sistema estudiado, el ajuste del modelo al sistema y crear una superficie definida por la ecuación (superficie de respuesta).

GraphPad Instat. Programa informático que permitió el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

11.7. Análisis gráfico

Los programas informáticos empleados para el análisis gráfico de los resultados fueron el **Microcal Origin versión 5.0.** y el **FpWin versión 2.2.a.**

11.8. Análisis cuantitativo de los niveles de expresión

Image Quant versión 5.0. Programa informático empleado para la cuantificación de los niveles de expresión de las pantallas de fósforo de los experimentos de *Northern blot* radiactivos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Clonación de genes a partir de una genoteca empleando la técnica de *DChyPCR*

La estrategia que se describe a continuación se ha desarrollado en nuestro laboratorio (Díaz-Prado *et al.*, 2004) para el aislamiento de clones de interés a partir de una genoteca cuando sólo se disponía de una parte de la secuencia. Realmente hemos desarrollado esta estrategia porque otras técnicas clásicas de clonación de genes como son la hibridación de colonias, la clonación por complementación o la clonación por *PCR* a partir de cebadores diseñados en base a las secuencias de genes homólogos de otros organismos, resultaron infructuosas previamente. Por ello, en nuestro grupo de trabajo, surgió la necesidad de desarrollar un método o una estrategia nueva para poder solventar este problema. En este sentido se desarrolló la estrategia (*DChyPCR*) que nos permitió clonar de forma rápida varios genes que eran objeto de estudio.

Esta estrategia, denominada *DChyPCR* (discriminación de grupos por *PCR*), es una alternativa no radiactiva a la hibridación de colonias. A partir de la implementación de la tecnología del ADN recombinante, clonar genes de interés constituye el primer paso crucial para su uso con fines básicos y aplicados. Si un determinado gen no puede ser clonado por complementación de un mutante o por técnicas de hibridación usando como sonda genes afines, entonces es esencial tener disponible alguna información acerca de su secuencia, no obstante esta información puede estar restringida. Hoy en día, aunque todavía son pocos los genomas microbianos que han sido secuenciados completamente, para la mayoría se está usando la estrategia de secuenciar parcialmente y al azar el genoma (Feldman, 2000), las bases de datos contienen abundantes *RSTs* ("*Random Sequenced Tags*"). Generalmente las únicas fuentes disponibles para clonar genes son estos *RSTs* de los genes de interés o genes homólogos de especies afines. Una aproximación clásica en estos casos es la hibridación de colonias con sondas marcadas de secuencias conocidas o de regiones conservadas. Sin embargo, esta técnica es tediosa y con frecuencia da origen a muchos candidatos positivos que posteriormente resultan ser falsos positivos.

La estrategia *DChyPCR* y la disponibilidad de una genoteca permite el aislamiento de clones que contienen el gen de interés en menos de una semana. Nosotros empleamos esta estrategia para genotecas de levaduras en plásmidos, en concreto se empleó una genoteca de la levadura *K. lactis* en el vector KEp6, pero este

procedimiento puede ser generalizado a otros organismos y a otros tipos de genotecas. Básicamente, usando la *PCR*, la presencia de un clon de interés se determina en grupos de extracción de ADN plasmídico a partir de un “*pool*” de colonias bacterianas que portan los clones de la genoteca. En cada caso, el grupo que da una banda positiva por *PCR* es seleccionado y luego los componentes de este grupo son usados separadamente como moldes para nuevas reacciones de *PCR* hasta llegar al clon aislado de interés. Una ventaja importante de este método es que no requiere una reamplificación de la genoteca, es decir, la genoteca se siembra en placa una vez y luego se analizan las placas que se han replicado, esto es mejor que realizar varias veces aislamiento de ADN plasmídico, análisis por *PCR*, diluciones seriadas y retransformación. La efectividad del método *DCbyPCR* fue demostrada en nuestro grupo de investigación llegando a aislar hasta once clones de genes distintos (de los cuales he participado activamente en siete de ellos) a partir de tres genotecas diferentes. Previamente se habían realizado intentos para clonar varios de estos genes por otros procedimientos pero habían fracasado.

Para optimizar la técnica se realizó una transformación de prueba por electroporación de la línea DH10B de *E. coli* con 1 μ l de ADN de la genoteca de *K. lactis* en el vector KEp6. Esta transformación sirvió para determinar la eficacia de la transformación y por tanto, el número de transformaciones que es necesario realizar para conseguir los como mínimo 20.000 transformantes que aseguran la presencia de al menos una copia de cada uno de los clones representados en la genoteca (James *et al.*, 1996). A partir de los resultados obtenidos y, tras los cálculos correspondientes, se decidió llevar a cabo ocho transformaciones y cada una de ellas se sembró en cinco placas. Posteriormente, una vez obtenidos los transformantes, se realizaron dos réplicas, mediante la técnica del *replica-plating*, ver sección materiales y métodos (Miller, 1992), de cada una de las placas.

Cabe destacar que en este método, es de gran importancia que las colonias crezcan aisladamente dentro de la placa, tanto para que las réplicas sean representativas como para que en días posteriores la colonia de interés, es decir, la que porte el clon con el gen que estamos buscando, pueda ser rescatada y aislada de la placa. Por este motivo, el tiempo de crecimiento en placa después de la transformación es el mínimo necesario, con el fin de evitar el solapamiento de unas colonias con otras. Las réplicas de la placa se emplearon para llevar a cabo las sucesivas extracciones de ADN, guardando la placa con las colonias originales en la nevera a 4°C para su posterior utilización. En la figura 1.1 se muestra un esquema de esta estrategia.

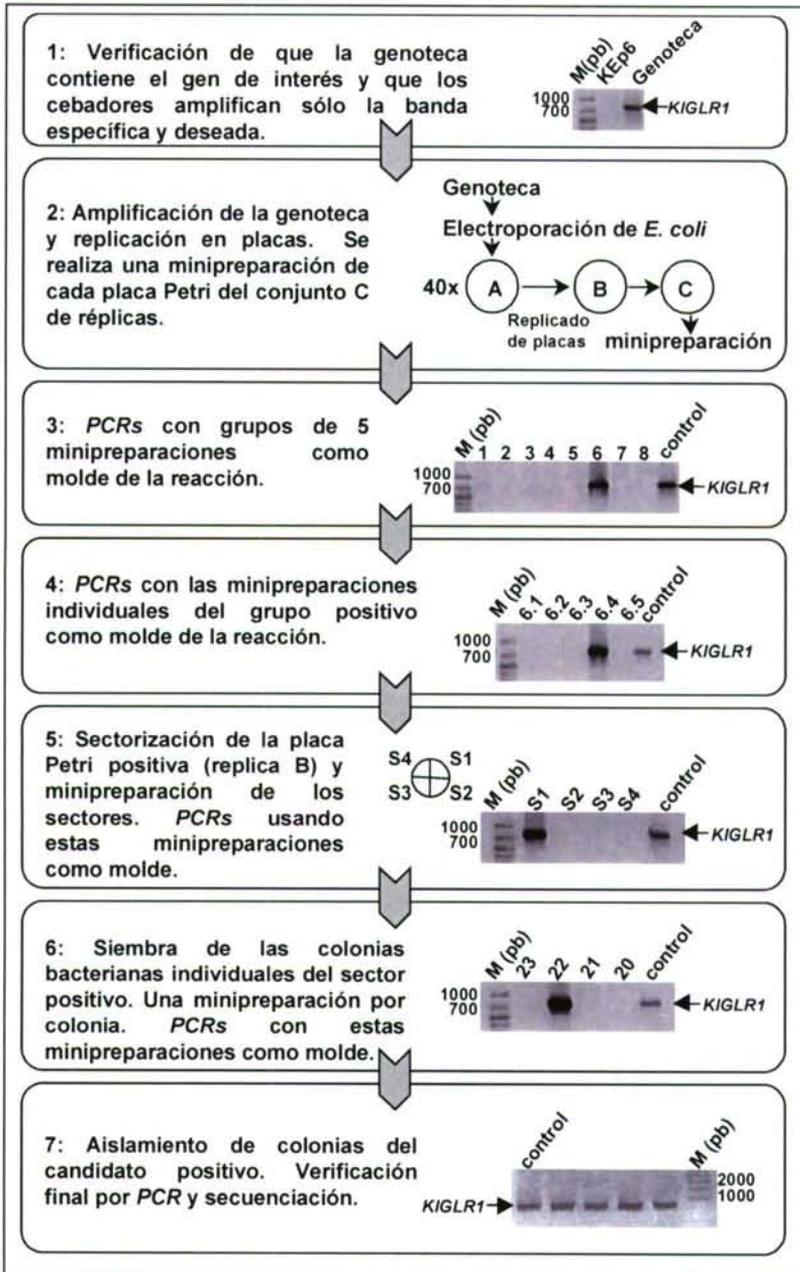


Figura 1.1: Esquema de la estrategia *DCbyPCR*. Discriminación de grupos por *PCR* (Díaz Prado *et al.*, 2004), mostrando la clonación del gen *KIGLR1* como ejemplo. Los productos de *PCR* fueron visualizados en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se muestran también los candidatos negativos en los que no se produjo reacción. M es el marcador de 50 a 1000 pb de pesos moleculares de *BioWhittaker Molecular Applications* en pares de bases excepto en el apartado 7 en donde se empleó el marcador XVII de *Roche*.

1. Es necesario empezar con una genoteca que contenga el gen de interés y un par de cebadores diseñados para amplificar por *PCR* una parte de la secuencia de este gen. En este ejemplo, se empleó una secuencia parcial de *K. lactis* que es homóloga al gen *GLRI* de *S. cerevisiae* para diseñar un par de cebadores que amplificaban una banda de 789 pb. Esta secuencia está disponible en la base de datos de nucleótidos (Números de Acceso: AL429479, AL429280 y AL427879) sometida por *Genoscope* como una parte del programa de secuenciación al azar del genoma de la levadura *K. lactis* (www.genoscope.cns.fr). La amplificación tiene que ser específica. La primera precaución es verificar si los cebadores hibridan en el vector usado para construir la genoteca en cuyo caso se obtendrían bandas inespecíficas por *PCR* (figura 1.1.1). Además, se empleó ADN genómico como molde de una reacción de *PCR* que se utilizaría como control positivo. Adicionalmente, la banda del tamaño esperado que se obtuvo por *PCR* cuando se empleó la genoteca como molde se secuenció.

2. El primer día la genoteca se amplificó para obtener colonias bacterianas individuales. El número de colonias depende del tamaño del genoma y de los insertos de la genoteca. En este ejemplo, obtuvimos aproximadamente 40.000 colonias bacterianas individuales por electroporación, distribuidas en 40 placas Petri. El segundo día las placas Petri individuales que contenían las colonias bacterianas se replicaron dos veces con terciopelos (Miller, 1992). El tercer día se extrajo el ADN plasmídico - minipreparación (Sambrook *et al.*, 1989)- a partir del segundo conjunto de réplicas (C), es decir, a partir del conjunto de colonias bacterianas encontradas en cada placa Petri. Se realizó una minipreparación de ADN plasmídico por cada placa Petri (figura 1.1.2).

3. Las alicuotas procedentes de cinco minipreparaciones se mezclaron y los ocho grupos, cada uno de los cuales contienen las cinco minipreparaciones, se usan como ADN molde en reacciones de *PCR* con los cebadores que amplifican específicamente una parte de nuestro gen de interés. En este ejemplo, se obtuvo una banda positiva del tamaño esperado en el grupo 6 (figura 1.1.3).

4. Se realizaron nuevas reacciones de *PCR* con los mismos cebadores pero usando como ADN molde las cinco minipreparaciones individuales que previamente se habían mezclado en el grupo 6 y que había dado la banda positiva. La minipreparación que dio la banda del tamaño esperado permitió la identificación de la placa Petri que contenía el clon de interés. En este ejemplo fue la placa Petri 6.4 (figura 1.1.4).

5. El cuarto día la placa Petri fue analizada por sectores, es decir, se dividió en varias partes, a las cuales se les extrajo el ADN plasmídico, mezclando todos los clones bacterianos de un mismo sector. La primera réplica (B) fue la que se usó para este propósito. Las reacciones de *PCR* se llevaron a cabo usando cada minipreparación de cada sector de la placa como ADN molde. La minipreparación que dio la banda del tamaño esperado permitió la identificación del sector de la placa Petri que contenía el clon de interés. En este ejemplo, hemos dividido la réplica B de la placa Petri 6.4 en cuatro sectores, la banda positiva se obtuvo en el sector 1 (figura 1.1.5).

6. Las colonias bacterianas individuales de este sector de la placa Petri original (6.4 S1) se sembraron individualmente y se hicieron extracciones individuales de ADN plasmídico. El quinto día se realizaron reacciones de *PCR* utilizando el ADN de estas minipreparaciones individuales como molde. La minipreparación que dio la banda del tamaño esperado permitió la identificación de la colonia bacteriana que contenía el clon de interés. En este paso, si en el sector positivo de la placa Petri hay muchas colonias, se sigue la estrategia de agrupamiento de minipreparaciones para las reacciones de *PCR*. En el ejemplo, había aproximadamente 200 colonias en el sector positivo. La banda positiva se obtuvo en la minipreparación de la colonia 22 (figura 1.1.6).

7. El paso final, que se realizó el sexto y séptimo día, consistió en aislar colonias (Miller, 1992) a partir del candidato seleccionado, posteriormente fue verificado nuevamente por *PCR* y secuenciado. En este ejemplo, todas las colonias aisladas a partir de la colonia 22 que fueron analizadas dieron la banda positiva por *PCR* (figura 1.1.7). La secuenciación de uno de estos clones confirmó que contenía el gen que estábamos buscando: *KIGLRI*.

Durante la realización del presente trabajo, empleando este método, se han aislado y secuenciado varios clones. En concreto he participado en la clonación y secuenciación de los siguientes genes de interés que se han depositado en la base de datos *EMBL* con los números de acceso que se citan:

[1] El gen *FBAI* de *K. lactis* que codifica para la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa. Clave de Acceso: AJ272114.

[2] El gen *NDII* de *K. lactis* que codifica para una NADH deshidrogenasa mitocondrial interna (ubiquinona). Clave de Acceso: AJ496545.

- [3] El gen *TRRI* de *K. lactis* que codifica para la tiorredoxina reductasa. Clave de Acceso: AJ504413.
- [4] El gen *XYLI* de *K. lactis* que codifica para la xilosa reductasa. Clave de Acceso: AJ504413.
- [5] El gen *NDEI* de *K. lactis* que codifica para una NAD(P)H deshidrogenasa mitocondrial externa. Claves de Acceso: AJ496546.
- [6] El gen *GLRI* de *K. lactis* que codifica para la glutatión oxidoreductasa. Clave de Acceso: AJ504414.
- [7] El gen *RPS6* parcial de *K. lactis* que codifica para una proteína ribosomal S6 (40S). Clave de Acceso: AJ504414.

A continuación, en la presente memoria, se abordará un estudio más exhaustivo de los genes *KIFBA1* y *KINDI1* que codifican para la fructosa-1,6-bisfosfato y para la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna (ubiquinona) respectivamente. En la actualidad los genes *KITRRI*, *KIGLRI* y *KINDEI* están siendo objeto de estudio en nuestro laboratorio.

2. ESTUDIO DEL GEN *FBA1* DE *Kluyveromyces lactis*

2.1. Clonación y secuenciación del gen *FBA1* de *Kluyveromyces lactis*

La creciente utilización de la levadura *K. lactis*, en investigación e industria, ha generado interés por la obtención de la secuencia completa de su genoma con el fin de disfrutar de una base de datos como la que ya existe para *S. cerevisiae*. Pero además de ello, nuestro interés por estudiar el gen de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa radica en el papel clave de esta enzima en el metabolismo respiro-fermentativo de las levaduras, así como en la posibilidad de interrumpir el gen, debido a que las características metabólicas de la levadura *K. lactis* permiten bloquear pasos de la primera parte de la vía glucolítica sin comprometer la viabilidad celular. El bloqueo de la transformación de fructosa-1,6-bisfosfato en triosas, catalizada por la enzima aldolasa, permitiría la acumulación de este producto de grandes aplicaciones farmacológicas. La clonación del gen *FBA1* de *K. lactis* se abordó empleando la estrategia de la *DChyPCR* (Díaz Prado *et al.*, 2004) descrita en el capítulo anterior. Cuando se empezó este trabajo no disponíamos de datos de la secuencia del gen de *K. lactis* pues todavía no se había puesto en marcha el proyecto *Genoscope* de secuenciación al azar de genomas de levaduras. Por tanto, en un primer lugar, se diseñaron dos cebadores (SCALD-U1 y SCALD-L1, tabla M4 Materiales y Métodos) tomando como referencia la secuencia de *S. cerevisiae*. Estos cebadores permitieron amplificar por *PCR*, empleando ADN genómico de *S. cerevisiae* como molde, un fragmento del tamaño esperado, 826 pb, del correspondiente gen *FBA1* de esta levadura, el cual ya había sido clonado por Schwelberger *et al.* (1989). Este fragmento se corresponde con una región interna de la *ORF* (*YKL060c*). Estos cebadores también amplificaron un fragmento con un tamaño muy similar, 787 pb, cuando se empleó ADN genómico de *K. lactis* como molde (figura 2.1). Los ADNs así obtenidos se marcaron con digoxigenina y se utilizaron como sonda en experimentos de *Southern blot* con ADN genómico de *K. lactis* digerido con diferentes enzimas de restricción. Una vez que se pusieron a punto las condiciones en función del grado de estringencia, se comprobó que se producía una hibridación heteróloga específica, lo que es indicativo de la existencia de homología entre los genes de ambas levaduras (figura 2.2). Este fragmento de 787 pb se clonó en el vector comercial pGEM-T-Easy y se secuenció. En la figura 2.3 se muestra la secuencia nucleotídica de este fragmento clonado por *PCR*.

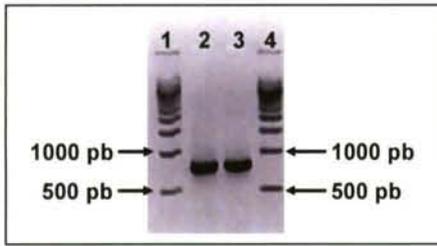


Figura 2.1: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. 1 y 4 son el marcador de pesos moleculares de 500 a 5000 pb de *BioWhittaker Molecular Applications*. 2 es el fragmento de ADN de 826 pb amplificado a partir de ADN genómico de la cepa aGH1 de *S. cerevisiae*. 3 es el fragmento de ADN de 787 pb amplificado a partir de ADN genómico de la cepa Y1140 de *K. lactis*.

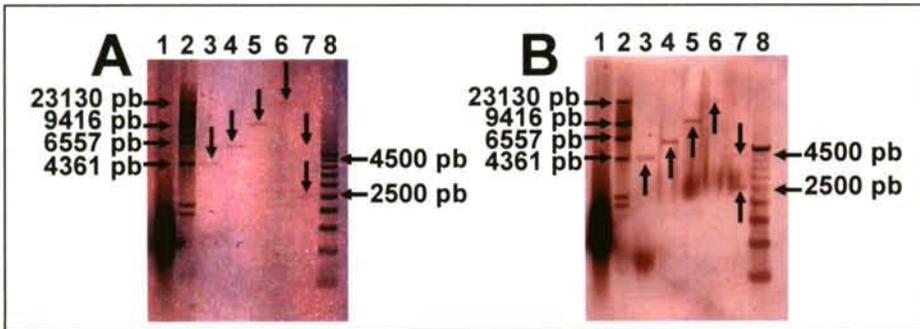


Figura 2.2: *Southern blots*. En la hibridación se utilizó una sonda de 826 pb correspondiente a una región interna de la *ORF* del gen *FBA1* de la levadura *S. cerevisiae* en A y una sonda de 787 pb correspondiente a una región interna de la *ORF* del gen *FBA1* de la levadura *K. lactis* en B. 1 es un control positivo de la hibridación (la sonda no marcada), 2 y 8 son el marcador II y XVII de pesos moleculares marcados con digoxigenina de *Roche*. Del 3 al 7 ADN genómico de la cepa Y1140 de la levadura *K. lactis* digerido con diferentes endonucleasas de restricción, *EcoR* I, *BamH* I, *Sal* I, *Xho* I y *Cla* I respectivamente. Las sondas se marcaron empleando los reactivos suministrados con el *kit Dig DNA Labeling and Detection* (*Roche*).

```

AAGTAGTCCCTTCTGTGTTCAAGACGCTAGTCTCTGATACCGGACAAGTAAGCGAATTGACAGTCAGTAT
CCAAGTTGACCTTTACGACACCGAAATCGATGGCAGTATGGAAGTCCTTGGTGGAGGAACCGGAACC
ACCGTGGAAAGACCAAGTACAATGGCTTGTCTTCTGCTTCTTGTGTTAATTGCTTAGCAGCGTAGTCT
TGGAAAGTACCCAACAATTCGTTTTAGGGCAGCGCGATCTTGTAACACCGTGGACGTTACCGA
AAGCACTGGCAATGGAGAAGTTGGAGAGATCTGGACAAAGCTTCGTGGACAGAGAAAACAGTTTC
TGGAGTGGTGTAAAGTTTGTGCTTAGAAGTACCTTCGTTGTTGACACCATCTTCTTACCACCGGTG
ATACCGATTTCCATTTCCAACCATTTGGTGGATCTTGGCCATTCTGGTGAAGTATTTGACACATAGAC
CAATGTTTTCTCATCAGTTTCTTCGGACAAATCCAACATGTTGGGAGGAGAACAATGGTTTACCCTG
CTTAGCGAAGTATTTCTCGTCAGCCTTTAGCATACCATCGAACCATGGTAGCAACTTCTTAGCACAA
TGATCGGTGTGTAGAACAACCTGGGATACCGTAAGCTGGAGCAATGGATCTGATGTAGTGAGCAGCAG
CGATAGAACCCTCTGATAGAAGCATTTGGCCCTCGTTGGAAACACCCCTTACCAGCAAAGTAAGCAGC
ACCACCGTTGGAAGTTTGCAAATGATTGGAGATTTGTTGTCTCTAGCAG
    
```

Figura 2.3: Secuencia del fragmento de 787 pb clonado (a partir de ADN genómico de una cepa salvaje de *K. lactis*) por *PCR* en el vector comercial *pGEM-T-Easy*. En esta secuencia no se incluyen los cebadores usados para la *PCR* pues son específicos de la levadura *S. cerevisiae*.

Con la secuencia obtenida se realizó un análisis de *tBlastX* en la base de datos *EMBL*, obteniéndose un 77% de identidad y un 86% de positivos con la proteína *KIFba1p* de *S. cerevisiae*. También se realizó un análisis de *BlastN* obteniéndose un 84% de homología con el gen *FBA1* de *S. cerevisiae* y homologías elevadas con genes

de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de otros organismos como *Schizosaccharomyces pombe* (70%), *Euglena gracilis* (67%), *Neurospora crassa* (69%) o *Escherichia coli* (64%). Estos datos confirmaron que el fragmento génico clonado se correspondía a un gen codificante de la enzima fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *K. lactis* que se denominó *KIFBA1*. Además, dado el tamaño del gen en *S. cerevisiae* (1077 pb), se estimó que dicho fragmento abarcaba alrededor del 75% de una región interna de la *ORF* del gen *KIFBA1* de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Esta secuencia se envió a las bases de datos de *EMBL/GenBank/DDBJ* (Número de Acceso: AJ272114).

Esta *ORF* parcial del gen *FBA1* de *K. lactis* que se acababa de clonar, se empleó como sonda en experimentos posteriores. En análisis de *Northern blot*, esta sonda hibridó con una única especie de ARN mensajero de aproximadamente 1 kb correspondiente al ARN de *FBA1* de *K. lactis* (figura 2.4). Se pudo observar también la existencia de hibridación cruzada entre esta sonda del gen *FBA1* de *K. lactis* y ARN y ADN genómico de *S. cerevisiae* y entre una sonda del gen *FBA1* de *S. cerevisiae* de la región equivalente y ARN y ADN genómico de *K. lactis*. El resultado más destacado del análisis realizado empleando técnicas de *Southern blot* con ADN genómico de *K. lactis* fue que esta sonda hibridó con un único fragmento *EcoR* I-*EcoR* I de 4,3 kb (figura 2.2). Este resultado nos hizo pensar que era bastante probable que la enzima de restricción *EcoR* I no cortase dentro de la *ORF* del gen *KIFBA1*.

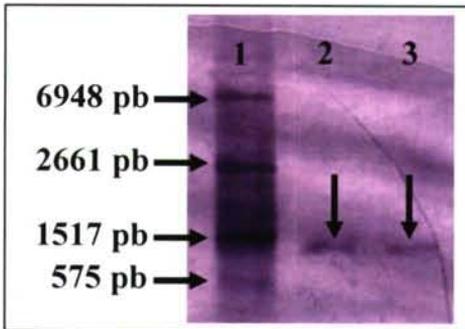


Figura 2.4: *Northern blot*. ARN total de *K. lactis* hibridado con una sonda de 787 pb correspondiente a una región interna de la *ORF* del gen *FBA1* de la levadura. La sonda se marcó empleando los reactivos suministrados con el kit *Dig DNA Labeling and Detection* (Roche). 1 es el marcador 1 de pesos moleculares marcado con digoxigenina de Roche. 2 y 3 contienen 40 µg de ARN de la cepa Y1140 de la levadura *K. lactis* crecida en medio YPD con glucosa al 2% como fuente de carbono.

Durante nuestras investigaciones en el laboratorio para obtener un clon genómico con el gen entero que codifica para la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de la levadura *K. lactis* se emplearon varias técnicas diferentes que resultaron ser infructuosas, entre ellas la hibridación de colonias bacterianas (en la cual se llegó a emplear hasta seis genotecas diferentes de *K. lactis*), la *PCR* anclada (utilizando como cebadores complementarios a los específicos del gen, secuencias del *MCS* "Multiple

Cloning Site" o sitio de clonaje múltiple de los plásmidos de las genotecas), la subclonación en el vector pUC18 de una banda única de 4,3 kb que se obtuvo mediante experimentos de *Southern blot* empleando ADN genómico de la levadura *K. lactis* digerida con la endonucleasa de restricción *EcoR* I (figura 2.2) y la *PCR* para ampliar (a partir de diferentes genotecas y utilizando como cebadores un oligo que anillaba dentro del fragmento de 787 pb que acabábamos de clonar y una mezcla de pequeños oligos degenerados), el clon *KIFBA1*.

En enero de 2001, mientras se realizaba esta investigación, y como resultado del desarrollo del proyecto *Genoscope* de secuenciación al azar (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000), se liberaron dos *RSTs* (*Random Sequenced Tags*) de *K. lactis* (Números de Acceso: AL425074 y AL428787) que presentaban una gran similitud con la *ORF* de *FBA1* de *S. cerevisiae* (*YKL060c*). Solapando las tres secuencias parciales disponibles de *K. lactis*, es decir, los dos *RSTs* y el fragmento de 787 pb que habíamos clonado, se obtuvo una secuencia que contenía una región promotora de 288 pb, una *ORF* de 1086 pb y una región terminadora de 142 pb. En este momento fue de gran importancia el hecho de disponer de la secuencia del fragmento de 787 pb pues nos permitió poder unir los dos *RSTs* y obtener una secuencia continua del gen *KIFBA1*.

En la figura 2.5 se muestra un alineamiento de tres secuencias que se corresponden con los dos *RSTs* ya solapados ($AL_s = AL425074 + AL428787$), el fragmento de 787 pb del gen *KIFBA1* clonado en este trabajo mediante técnicas de *PCR* y la *ORF* del gen *ScFBA1*.

Con los cebadores *KLORFFBA1F*, *KLORFFBA1R*, *5'GENFBA1* y *3'GENFBA1* (tabla M4 Materiales y Métodos) se amplificó, empleando ADN genómico de *K. lactis*, la *ORF* completa de 1086 pb y la secuencia entera, incluida la región promotora y terminadora, de 1516 pb del gen *KIFBA1*. Ambas secuencias se clonaron en el vector comercial pGEM-T-Easy (figura 2.6).

La reacción en cadena de la polimerasa o *PCR* permite clonar genes de una manera bastante rápida pero presenta un riesgo ya que las ADN polimerasas pueden introducir errores. Por ejemplo, se ha estimado que la *Taq*, por término medio, introduce un cambio de base cada 9.000 pb y un cambio en la pauta de lectura cada 40.000 pb, y el número total de errores aumenta con el número de ciclos. Como consecuencia de esto, y también para ampliar la secuencia del promotor y del terminador se decidió clonar el gen a partir de una genoteca, empleando la estrategia de la *DCbyPCR* (Díaz

Prado *et al.*, 2004) y dos cebadores (KLORFFBA1F y KLORFFBA1R, tabla M4 Materiales y Métodos) como se describe en el siguiente apartado.

ALs	ATGCAGCTCAAGACGTATTGACCAGAAAGACCGGTGCATGTGGTGAAGATGTCAG	60
PCR		
Sc	ATGGGTGTGGAAACAATCTAAAGAGAAAGACCGGTGCATGTTGGTGAAGATGTCAC	60
ALs	GCTTGTGGACTACGCTAAGGAACAAGTTTGCATTCCAGCTATCAAGTGAAGCTCT	120
PCR		
Sc	AACATTACTACTAGCGTAAGGAACAAGTTTGCATTCCAGCTATTAAGTCAAGCTCT	120
ALs	TCTTCCACTGTTGTGCTGCTTGGAAAGCTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	180
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	TCTTCTACTGCGGTGCTGCTTAAAGAGCTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	180
ALs	CAAACTTCCAACGGTGGTGTGCTGCTTACTTTTGTGGTAAGGTGTTTCCAAGGAGCCAA	240
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	CAAACTTCCAACGGTGGTGTGCTGCTTACTTTTGTGGTAAGGTGTTTCCAAGGAGCCAA	240
ALs	AATGCTTCTATCAGAGGTTCTATCGCTGCTGCTACTACATCAGATCCATTGCTCCAGCT	300
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	AATGCTTCTATCAGAGGTTCTATCGCTGCTGCTACTACATCAGATCCATTGCTCCAGCT	300
ALs	TACGGTATCCCAAGTGTGCTTACACACCGATCATTTGCTAAGAAATGGTACCATTGGTTC	360
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	TACGGTATCCCAAGTGTGCTTACACACCGATCATTTGCTAAGAAATGGTACCATTGGTTC	360
ALs	GATGGTATGCTAAGGCTGACGAAGAATACTCGCTAAGCAGGTTGAACATTGTTCTCC	420
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	GATGGTATGCTAAGGCTGACGAAGAATACTCGCTAAGCAGGTTGAACATTGTTCTCC	420
ALs	TCCACATGTTGGATTGTCGGAAGAACTGATGAGGAAGACATTGGTCTATGTTGTCAAA	480
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	TCCACATGTTGGATTGTCGGAAGAACTGATGAGGAAGACATTGGTCTATGTTGTCAAA	480
ALs	TACTTCCACGAATGGCCAGATCCACCAATGGTTGGAAATGGAAATGGGTATCACCGGT	540
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	TACTTCCACGAATGGCCAGATCCACCAATGGTTGGAAATGGAAATGGGTATCACCGGT	540
ALs	GGTGAAGAGATGGTGTCAACAACGAAGTACTTCAACGACAACTTTACACCCTCCA	600
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	GGTGAAGAGATGGTGTCAACAACGAAGTACTTCAACGACAACTTTACACCCTCCA	600
ALs	GAAACTGTTTCTGTGCCAGGAGCTTGTCCAAAGTCTCTCAAACTTCCGATTGGC	660
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	GAAACTGTTTCTGTGCCAGGAGCTTGTCCAAAGTCTCTCAAACTTCCGATTGGC	660
ALs	AGTGCCTTGGTAAGTCC-ACGGTGTTTACAAGATCCCGCTGCCCTAAACACAGAATT	719
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	AGTGCCTTGGTAAGTCC-ACGGTGTTTACAAGATCCCGCTGCCCTAAACACAGAATT	719
ALs	GTTGGTACTTCCAAAGTACCGTGTCAAGCAATTAAACAAGAGGCGAGAGCAAGCC	779
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	GTTGGTACTTCCAAAGTACCGTGTCAAGCAATTAAACAAGAGGCGAGAGCAAGCC	779
ALs	ATTGTACTTGGTCTTCCAGGTTGCCGGTTCCTCCACCAAGGACTTCCACTGCCAT	839
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	ATTGTACTTGGTCTTCCAGGTTGCCGGTTCCTCCACCAAGGACTTCCACTGCCAT	839
ALs	CGATTTCGGTGTCTAAAGGTCACCTGGGACTGACTGTCAATTCGCTACTTGTCCGG	899
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	CGATTTCGGTGTCTAAAGGTCACCTGGGACTGACTGTCAATTCGCTACTTGTCCGG	899
ALs	TATCAGAGACTACGTCTTGAACAAGAGGACTTGTATGACCCAGTGGTAAACCAAC	959
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	TATCAGAGACTACGTCTTGAACAAGAGGACTTGTATGACCCAGTGGTAAACCAAC	959
ALs	CGGTGAAGACTCTCAACAGAAAGTACTACGACCAAGAGTCTGGGTAGAGAGGTGA	1019
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	CGGTGAAGACTCTCAACAGAAAGTACTACGACCAAGAGTCTGGGTAGAGAGGTGA	1019
ALs	AAAGACATGAGCAGAGAAATCACTCAAGCTTTGGAAATCTCCGTAACAAGGGTCTTT	1079
PCR	-----CTGTAGAGACAACAATCTCCAATCATTTTG	32
Sc	AAAGACATGAGCAGAGAAATCACTCAAGCTTTGGAAATCTCCGTAACAAGGGTCTTT	1079
ALs	GGATAA 1086	
PCR	-----	
Sc	ATAA--- 1080	

Figura 2.5: Alineamiento de tres secuencias nucleotídicas en donde ALs se corresponde con los dos *RSTs* ya solapados (ALs=AL425074+AL428787), PCR es el fragmento de 787 pb del gen *KIFBA1* clonado mediante técnicas de *PCR* y Sc es la *ORF* del gen *ScFBA1*.

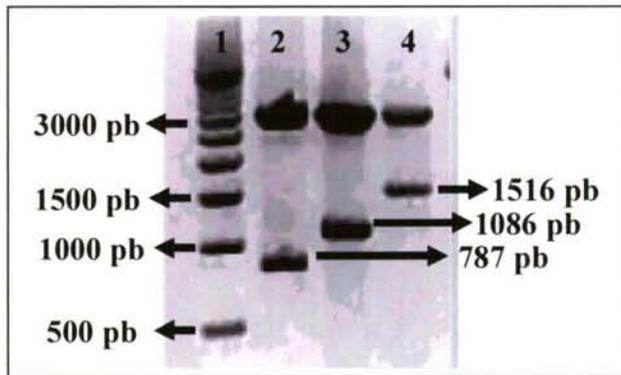


Figura 2.6: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. 1 es el marcador XVII de pesos moleculares de Roche. 2, 3 y 4 son fragmentos de ADN obtenidos por PCR (empleando como molde de la reacción ADN genómico de la cepa Y1140 de la levadura *K. lactis* y las siguientes parejas de cebadores: KLALDO-U1 y KLALDO-L1, KLORFFBA1R y KLORFFBA1F, y 5'GENFBA1 y 3'GENFBA1 respectivamente), clonados en el vector comercial pGEM-T-Easy y digeridos con la endonucleasa de restricción *EcoR* I. La banda de mayor tamaño (3018 pb) se corresponde con el vector, las de menor tamaño se corresponden con las distintas secuencias del gen *KIFBA1* clonadas.

2.1.1. Aislamiento de un clon de *KIFBA1* en la genoteca KEp6 mediante *DCbyPCR*

Como paso previo, se comprobaron diferentes genotecas de *K. lactis* para determinar si entre sus numerosos clones existía alguno que portase el gen *KIFBA1*. Para llevar a cabo este estudio se procedió a realizar unas reacciones de PCR con los cebadores específicos de *KIFBA1* mencionados previamente (KLORFFBA1F y KLORFFBA1R). Las genotecas comprobadas están construidas en los vectores pAB24 (cedida por Dr. Dikson), YEp24 (cedida por Dr. Zitomer), YEplac 195 (cedida por el Dr. Grivell) y KEp6 (cedida por el Dr. Heinisch). Se demostró la presencia del clon en la genoteca construida en el vector KEp6 (figura 2.7.1).

En primer lugar se realizaron 8 transformaciones de bacterias (DH-10B) con la genoteca en KEp6, sembrando 40 (8x5) placas que se replicaron dos veces. A continuación, se extrajo el ADN de cada una de las placas réplica C y se realizaron reacciones de PCR usando como molde la mezcla de cinco minipreparaciones pertenecientes a una misma transformación para comprobar la presencia del clon. Se obtuvo un clon positivo en la mezcla número 6 (figura 2.7.3).

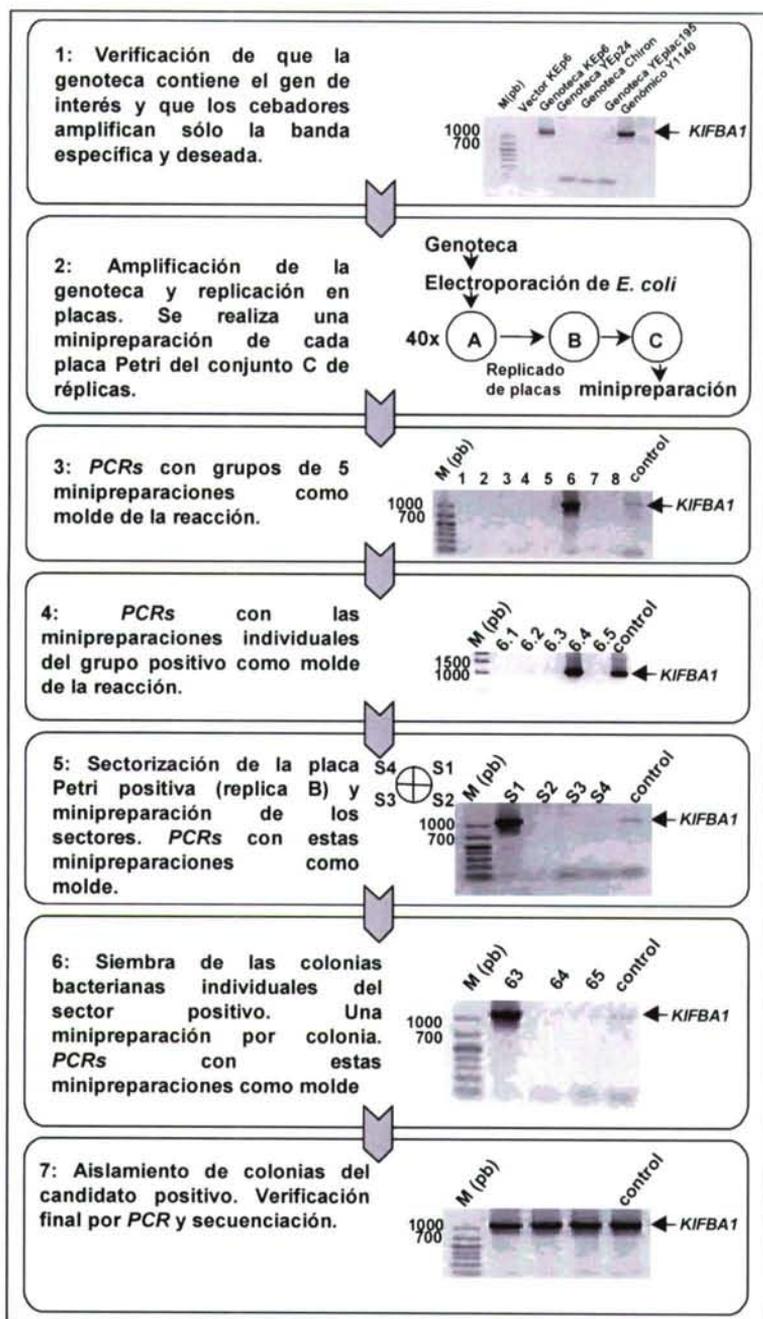


Figura 2.7: Esquema de la estrategia *DCbyPCR*, Discriminación de grupos por *PCR* (Diaz Prado *et al.*, 2004), mostrando la clonación del gen *KIFBA1*. Los productos de *PCR* fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se muestran también los candidatos negativos en los que no se produjo reacción. M es el marcador de 50 a 1000 pb de pesos moleculares de *BioWhittaker Molecular Applications* en pares de bases excepto en el apartado 4 en donde se empleó el marcador XVII de *Roche*.

Posteriormente se realizaron reacciones de *PCR* con las minipreparaciones individuales pertenecientes al grupo que dio positivo en el paso anterior y se observó que dio positivo en la placa 6.4. de un total de 5. La réplica B de la placa positiva del paso anterior, se dividió en cuatro sectores y se realizó una minipreparación de cada uno, el ADN resultante sirvió nuevamente como ADN molde de una nueva serie de reacciones de *PCR* y se comprobó que el clon positivo se localizaba en el sector S1 de la placa 6.4. A continuación se sembraron las colonias del sector S1 y se realizaron minipreparaciones de cada una de ellas que sirvieron nuevamente para realizar más reacciones de *PCR* y poder comprobar finalmente cuál era la colonia que portaba el clon con la *ORF* de *KIFBA1*. Para mayor seguridad se procedió a realizar un aislamiento de colonias del candidato positivo, se extrajo el ADN plasmídico y se volvió a comprobar por *PCR* que todas las colonias aisladas daban positivo. Para ello se emplearon tres parejas de cebadores que amplificaron tres fragmentos de 787, 1086 y 1516 pb (figura 2.8). También, basándonos en un mapa de restricción del clon obtenido a partir de la secuencia, se procedió a digerir los fragmentos de *PCR* con endonucleasas de restricción que ya se sabía que cortaban dentro, verificando una vez más la presencia del gen *KIFBA1* en el clon (datos no mostrados).

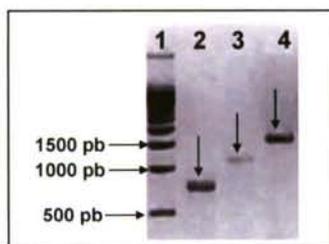


Figura 2.8: Comprobación por *PCR* de que el clon positivo obtenido mediante la estrategia de la *DCbyPCR* (Díaz Prado *et al.*, 2004) se corresponde con el gen *KIFBA1*. 1 es el marcador XVII de pesos moleculares de *Roche*. 2, 3 y 4 son fragmentos de ADN obtenidos por *PCR* empleando como molde de la reacción ADN plasmídico del posible clon positivo utilizando las siguientes tres parejas de cebadores: KLALDO-U1 y KLALDO-L1, KLORFFBAIR y KLORFFBAIF, y 5'GENFBA1 y 3'GENFBA1 respectivamente.

2.1.2. Digestiones enzimáticas del clon *KIFBA1* y secuenciación

Una vez que se aisló el clon de interés, se secuenció utilizando un cebador marcado con fluorescencia que hibridaba dentro de la secuencia conocida. Esta comprobación fue completamente necesaria para asegurarse de que este clon contenía el gen de interés. La prueba fue positiva y se realizó con el cebador OMLKLFBA1-1 (tabla M4 Materiales y Métodos). También, con el fin de obtener información del tamaño del inserto en el vector KEp6, se realizaron una serie de digestiones con endonucleasas de restricción *EcoR* I, *BamH* I, *Sal* I, *Nhe* I, *Sph* I y digestiones dobles

con *Sal I* y *Hind III*, *Nco I* y *Cla I*, *Nhe I* y *Sph I* y *Nhe I* y *Sal I*. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) sugirieron que el tamaño del clon no era muy superior al del clon ya disponible.

A partir de este momento, se comenzó a secuenciar el inserto completo utilizando la técnica del *DNA-walking* y para ello se diseñaron una serie de cebadores con el programa informático OLIGO. Se secuenció el gen completamente por las dos hebras, tanto la pauta abierta de lectura como las regiones promotora y terminadora. En la figura 2.9 se puede observar el fragmento secuenciado con todos los cebadores empleados para tal fin. Esta secuencia fue usada para actualizar la que se había enviado previamente a la base de datos *EMBL Nucleotide Sequence Database* (Clave de Acceso: AJ272114).

Los resultados de la secuenciación y las digestiones mostraron que el inserto del clon positivo tenía 33 pb más que el obtenido previamente por *PCR*.

```

GGCCGCGGGAATTCGATTATATGAAAAAAGTTGTTTCGTGAATTTTCCT
CCATFCAATTCATATATAATAAGAACAATGAATTGCATACTCCCAAAT
CTTGATAATTCGTTTTAATATCTATCAGTAGTTGTTTATATTC AATTAT
ATCTTGTGTATACAAAACCATCATCCAAAACCAATCCAAGTTTCGTTT
GACTTATAACCAATAGTACCAAAAATTAACCTTAATTTGAAGTACTT
TATAATTTAACTTAATACGAATTAACCAAAAAACCCACAACACGTAA
AAGAAATTACAATGCGCAGCTCAAGACGTATTGACCAGAAAGACCGGTGT
CATTGTCGGTGACGATGTCAAGGCTTTGTTTCGACTACGCTAAGGAAC
AAGTTTGCCATTCAGCTATCAACGTGACCTCTTCTCCACTGTTGTTG
CTGCTTTGGAAGCTGCTAGAGACAACAAATCTCCCAATCATTTTCAGAA
TTCC AACGGTGGTGCTGCTTACTTTGCTGGTAAGGGTGTTC CAACGAA
GGCCAAAATGCTTCTATCAGAGTTCTATCGCTGCTGCTCACTACATCA
GATCCATTGCTCCAGCTTACGGTATCCCGAGTTGTTCTACACACCGATCA
TTGTGCTAAGAAGTTGCTACCATGGTTCGATGGTATGCTAAAGGCTGAC
GAAGAATACTTCGCTAAGCACGGTGAACCATTTGTTCTCTCCACATGT
TGGATTTGTCCGAAGAAGAACTGATGAGGAAAACATTTGGTCTATGTGTCAA
ATACTTCACCAGAATGGCCAAGATCCACCAATGGTTGGAAATGGAAATC
GGTATCACCGGTGGTGAAGAAGATGGTGTCAACAACGAAGGTA CTCTA
ACGACAACTTTACACCCTCCAGAACTGTTTTCTCTGTCCACGAAGC
TTTTGTTCAAGATCTCTCCAACTTCTCCATTGCCAGTGCCTTCGGTAAAC
GTCCACGGTGTTTACAAGATCGCCGTGCCCTAAAACAGAAATTTGTTGG
GTACTTTCCAAGACTACGCTGCTAAGCAATTAACAAGAAGCGCAGAGA
CAAGCCATGTACTTGGTCTTCCACGGTGGTTCGGTTCCTCCACCAAG
GACTTCCTACTGCCATCGATTTCCGGTGTGCTAAAGGTCAACTTGGATA
CTGACTGTCAATTCGCTTACTTTGTCGGTATCAGAGACTACGCTTTGAA
CAAGAAGGACTACTTGATGACCCAGTCCGGTAACCCAACCGGTGAAGAC
TCTCCAAACAAGAAGTACTACGACCCAAGAGTCTGGGTTAGAGAAGGTG
AAAAGACCATGAGCAAGAGAATCACTCAAGCTTTGGAAATCTTCCGTAC
TAAGGGTGTCTTGGAAATAAAGTTCTTTGTTTAGTACCATTATCCCAA
CAATTTAACTTATAATTTCTATATACAATTTAAATACCAGAACCGCATG
AAATGATCAAATGAAGACATCTGAACCATTAGTTACAAAATGATTGGCA
GGGATCCGCTGTGCAATCACTAGTGAATTC
    
```

Figura 2.9: Secuencia completa del gen *KIFBA1* con su promotor, la *ORF* (pauta abierta de lectura) y el terminador. A lo largo de toda la secuencia se muestran los cebadores (en diferentes colores) utilizados para la secuenciación. En negrita se representan los codones de inicio (ATG) y de terminación (TAA) de la traducción.

2.2. Análisis “*in silico*” de la secuencia

La *ORF* del gen *KIFBA1* de 1086 pb se tradujo a proteína empleando el programa informático DNAsis (ver materiales y métodos). La proteína resultante presentó un tamaño de 361 aminoácidos. Con la secuencia de la proteína *KIFba1p* se realizó una búsqueda de homología con el programa informático *BlastP* que aparece en la página de internet del *NCBI*. El mayor índice de homología se obtuvo con la proteína que codifica el gen *FBA1* de *S. cerevisiae* (75% identidad y 86% positivos), pero además también obtuvimos homologías elevadas con la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *Schizosaccharomyces pombe* (66% identidad y 77% positivos), *Euglena gracilis* (60% identidad y 73% positivos), *Neurospora crassa* (61% identidad y 74% positivos) y *Haemophilus influenzae* (53% identidad y 71% positivos) entre otras (tabla 2.1).

Tabla 2.1: Porcentaje de identidad entre la proteína *KIFba1p* de *K. lactis* y la de otros organismos del *BlastP*.

Primer organismo	Segundo organismo	Identidad
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	66%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Neurospora crassa</i>	61%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Euglena gracilis</i>	60%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	56%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	53%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>	52%

La mayoría de los alineamientos se obtuvieron con la familia de aldolasas de la clase II (figura 2.10). Esta familia está formada por aldolasas bacterianas y de hongos que unen zinc como cofactor. Los cuatro aminoácidos (His-108, His-111, Cys-112 y His-142) que en la aldolasa de *E. coli* han sido identificados como los que forman el sitio de unión a zinc (Berry y Marshall, 1993) están conservados en las proteínas de *K. lactis* y *S. cerevisiae*.

Mediante la aplicación del programa de alineamiento múltiple ClustalW alojada en ExPASy (ver materiales y métodos), se ha realizado un análisis comparativo múltiple de la *ORF* del gen *KIFBA1* traducida a proteína con las secuencias de las proteínas aldolasas de otros organismos (figura 2.10).

De esta proteína se pudo determinar además, mediante el uso de la aplicación ProtParam Tool de ExpASY (ver materiales y métodos) que su pI (punto isoeléctrico) es 5,91, su Pm (Peso molecular) es de 39,6 kDa y su vida media *in vivo* estimada es de más de 20 horas. El índice de uso de codones (*ICDI* "*Intrinsic Codon Deviation Index*") es bastante alto, 0,62 (Rodríguez-Belmonte *et al.*, 1996), lo que sugiere que esta enzima podría ser bastante abundante en células de tipo salvaje. Empleando el programa ExpASY también se predijo que la proteína *KIFba1p* es una proteína citoplasmática con una probabilidad del 94,1%.

En la figura 2.11 se puede observar la predicción de la estructura secundaria de *KIFba1p* que se obtiene de la base de datos de proteínas cristalizadas en la página de internet *PDB* ("*Protein Data Bank*"). En esta página hay un programa denominado *Structure Explorer* que analiza la secuencia problema que se le introduce, definiendo su estructura secundaria y posteriormente busca, dentro de su base de datos de proteínas cristalizadas, cual es la que más se puede identificar con la que se somete. En este caso, la que aparece en primer lugar, con un 50% de identidad y 356 aminoácidos alineados de los 361 aminoácidos totales (figura 2.12), es la aldolasa de clase II de *E. coli* (Blom *et al.*, 1996).

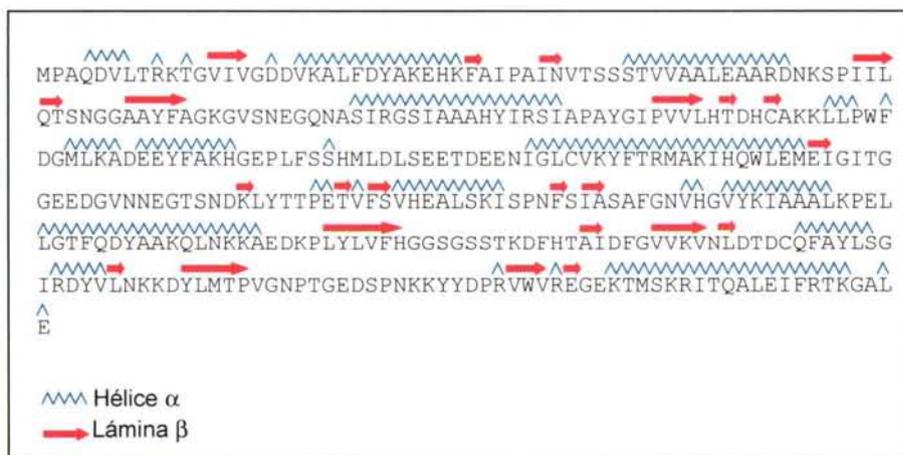


Figura 2.11: Estructura secundaria de la proteína *KIFba1p* que predicen diferentes programas informáticos alojados dentro de la página de internet del *PDB* ("*Protein Data Bank*").

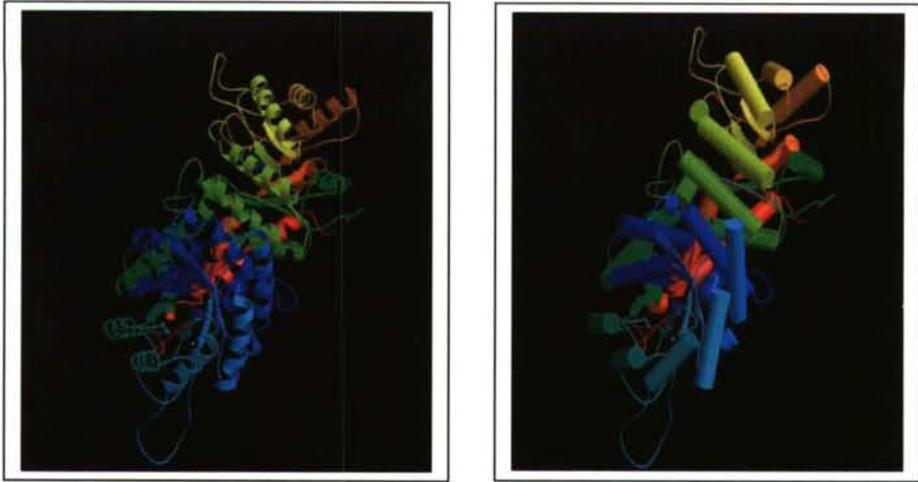


Figura 2.12: Estructura tridimensional de la proteína cristalizada más parecida a la proteína *KFba1p* según el programa informático *Structure Explorer* que se obtuvo en la página de internet *PDB* ("*Protein Data Bank*"). Esta proteína es la aldolasa de clase II de la bacteria *E. coli* expresada en *E. coli*.

2.3. Constatación funcional del gen *KIFBA1*

2.3.1. Clonación del gen *KIFBA1* de *Kluyveromyces lactis* en el vector pUK-S11 y posterior expresión en *Kluyveromyces lactis*

Una vez clonado el gen *KIFBA1*, el paso siguiente consistió en intentar demostrar que este gen realmente codifica para la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de la levadura *K. lactis*. Alefounder *et al.*, (1989) y Schwelberger *et al.*, (1989) entre otros, sobre expresaron el gen que codifica para la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de clase II de *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente. En ambos casos, empleando un vector de alto número de copias, los niveles de actividad aldolasa fueron mayores en la cepa transformada con el vector conteniendo el gen a expresar que en la cepa que contenía el vector vacío. En este sentido, se procedió a la clonación del gen entero *KIFBA1* con su región promotora y terminadora en un vector específico para su posterior expresión en la levadura *K. lactis*. El vector elegido fue pUK-S11 (Chen y Fukuhara, 1988). El gen *KIFBA1* se obtuvo tras digerir la construcción pGEM-T-Easy+*KIFBA1* con la enzima de restricción *EcoR* I. Este fragmento se clonó en el sitio de clonaje múltiple *EcoR* I del vector pUK-S11 (figura 2.13).

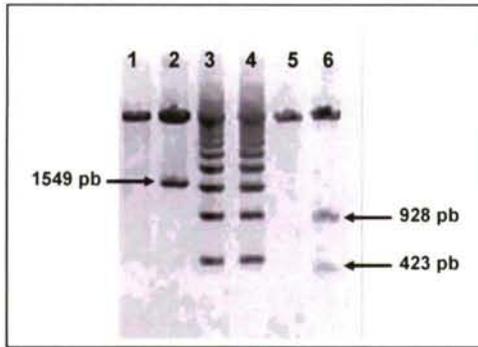


Figura 2.13: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. 1 es el vector pUK-S11 y 2 es la construcción pUK-S11+ *KIFBAI* ambos digeridos con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. 3 y 4 el marcador XVII de pesos moleculares de *Roche*. 5 es el vector pUK-S11 y 6 es la construcción pUK-S11+ *KIFBAI* ambos digeridos con la endonucleasa de restricción *HindIII*.

Una vez obtenida la construcción pUK-S11+*KIFBAI*, se utilizó para transformar la cepa MW190-9B de la levadura *K. lactis*. Como control, se utilizó el vector vacío pUK-S11 para transformar la misma cepa de levadura. Al cabo de tres días, se recogieron los transformantes capaces de crecer en medio CM-URA y se les extrajo el ADN plasmídico. Este ADN plasmídico se digirió con diferentes endonucleasas de restricción hasta que se comprobó que contenían la construcción pUK-S11+*KIFBAI* o el vector pUK-S11 (sólo en el caso del control). Las levaduras transformantes se cultivaron en medio CM-URA. Este experimento se realizó por duplicado pero recogiendo los cultivos a diferentes densidades ópticas. De cada cultivo se realizaron tres extracciones proteicas independientes; a partir de cada una de ellas se realizaron determinaciones de concentración de proteína y actividad aldolasa por triplicado. Los valores obtenidos de las actividades aldolasa son los que se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Valores obtenidos de las actividades aldolasa expresados en $\mu\text{mol F-1,6-P}_2/\mu\text{g}$ proteínas x min como media \pm desviación estándar en medio CM-URA, en donde n es el tamaño de la muestra (nº de repeticiones).

	MW190-9B: pUK-S11 (CONTROL)			MW190-9B: pUK-S11+ <i>KIFBAI</i>		
	$A_{600\text{nm}}$ cultivo	Actividad aldolasa	n	$A_{600\text{nm}}$ cultivo	Actividad aldolasa	n
1ª RÉPLICA	0,544	0,092 \pm 0,108	9	0,432	0,011 \pm 0,001	9
2ª RÉPLICA	3,73	0,008 \pm 0,002	9	2,00	0,005 \pm 0,001	9

Al transformar la cepa MW190-9B de la levadura *K. lactis* con la construcción pUK-S11+*KIFBAI*, era de esperar que el gen *KIFBAI* se sobre expresase y, por tanto, que se obtuviese mayor actividad aldolasa que en el control. Pero como se observa en la tabla 2.2, la actividad no se incrementó por sobre expresión del gen.

Debido a que al sobre expresar el gen *KIFBA1* no se pudo constatar su funcionalidad, posteriormente se procedió a su clonación en un vector de expresión en bacterias con el fin de poder purificar la proteína *KIFba1p* y verificar si tiene actividad aldolasa. La funcionalidad de este gen se demostró mediante purificación enzimática y no mediante ensayos de complementación porque la obtención de un haploide viable con esta mutación es muy difícil ya que es letal en *S. cerevisiae* (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>).

2.3.2. Clonación del gen *KIFBA1* de *Kluyveromyces lactis* en el vector de expresión pET21d y posterior expresión en *Escherichia coli*

En la actualidad, ya se han purificado numerosas aldolasas de diferentes organismos; las aldolasas de clase I de *E. coli*, *Synechocystis* sp. (cianobacteria), *Spermophilus lateralis* (mamífero) (Thomson *et al.*, 1998; Nakahara *et al.*, 2003; MacDonald y Storey, 2002) y las aldolasas de clase II de *E. coli*, *Synechocystis* sp., *Thermus aquaticus* (Plater *et al.*, 1999; Nakahara *et al.*, 2003; Sauve y Sygusch, 2001) entre otras. Muchas proteínas han sido purificadas con una secuencia señal de seis histidinas en el extremo C-terminal, entre ellas; la β -galactosidasa de *K. lactis* (Kim *et al.*, 2003), la NADH:ubiquinona oxidorreductasa (complejo I) de *Yarrowia lipolytica* (Drose *et al.*, 2002), la NADH deshidrogenasa de *E. coli* (Bjorklof *et al.*, 2000) o los genes *rnf* (esenciales para la fijación del nitrógeno) de *E. coli* (Jouanneau *et al.*, 1998).

En la presente memoria, para probar si el gen clonado expresa una proteína con la correspondiente actividad enzimática, *KIFba1p* se expresó con una señal de 6 histidinas en el extremo C-terminal adecuada para su purificación mediante cromatografía de afinidad en Ni-NTA (*Novagen*). Para ello, a partir de la secuencia completa del gen que codifica para la proteína *KIFba1p*, se diseñaron dos cebadores (PFBA-R y EcopKIFBA1) que nos permitieron amplificar la *ORF* del gen *KIFBA1* con dos sitios de restricción en ambos extremos de la *ORF*, *EcoR* I y *Xho* I. Como se muestra en la figura 2.14, este fragmento amplificado por técnicas de *PCR* se clonó en el vector comercial pGEM-T-Easy y se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoR* I y *Xho* I para su posterior integración en el vector pET21d(+) (*Novagen*). Este vector se empleó como vector de clonaje y expresión. Con esta construcción se transformó la cepa BL21(DE3) (*Novagen*) de *E. coli* que se usó como huésped para expresar la proteína *KIFba1p*. A los transformantes resistentes a la canamicina se les

extrajo el ADN plasmídico que se analizó por técnicas de *PCR* y por digestión con las endonucleasas de restricción *EcoR* I y *Xho* I para su confirmación. Además también se comprobó, por técnicas de secuenciación empleando el cebador T7 PROMOTER (tabla M4 Materiales y Métodos), que la *ORF* estaba en pauta de lectura con la secuencia señal de 6 histidinas en su extremo C-terminal.

Para la expresión de la construcción pET21d-*K/Fba*1p en la cepa BL21(DE3) (*Novagen*) de *E. coli* y con el fin de determinar en qué condiciones se obtiene más proteína *K/Fba*1p, se ensayaron cuatro condiciones de cultivo. Se estudió el efecto de dos variables: concentración de IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosido) y el tiempo de inducción. Las condiciones ensayadas fueron las de la tabla 2.3, como control se empleó un cultivo sin inducir, es decir, sin añadirle IPTG.

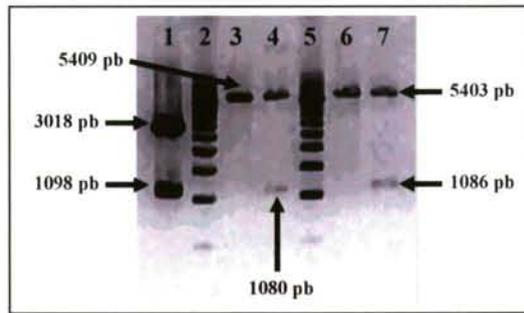


Figura 2.14: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado al U.V. 1 es la construcción pGEM-T-Easy-*K/Fba*1p digerida con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Xho* I, 2 y 5 son el marcador XVII de pesos moleculares de *Roche*, 3 y 4 son el vector pET21d y la construcción pET21d-*K/Fba*1p digeridos con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Xho* I. Por último, 6 y 7 son el vector pET21d y la construcción pET21d-*K/Fba*1p digeridos con las enzimas de restricción *Ava* I y *Bam*HI. Las bandas de mayor tamaño se corresponden con los vectores pGEM-T-Easy (3018 pb) y pET21d (5409 y 5403 pb), las de menor tamaño se corresponden con la *ORF* (sin los codones ATG y TAA de inicio y terminación de la traducción) del gen *KIFBA1*.

Tabla 2.3: Condiciones de cultivo ensayadas para la expresión del gen *KIFBA1* de *K. lactis* en la bacteria *E. coli*.

CONDICIÓN	CONCENTRACIÓN IPTG	TIEMPO DE INDUCCIÓN	TEMPERATURA DE INDUCCIÓN
1	1 mM	4 h.	30°C
2	0,1 mM	4 h.	30°C
3	1 mM	2 h.	30°C
4	0,1 mM	2 h.	30°C

Células de la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, transformada con el vector de expresión pET21d-*K/Fba*1p se cultivaron en 100 mL de medio LB conteniendo 20 µg de canamicina/mL a 37°C con una agitación de 250 r.p.m. hasta que la D.O. a 600 nm

fue de 0,6. En este momento se retiró una alícuota de 1mL de cultivo (que sirvió de control no inducido, sin tratar con IPTG) y se dividió el cultivo en cuatro cultivos distintos cada uno de 25 mL. A cada uno de los cultivos se le ensayó una de las cuatro condiciones de inducción, mencionadas en la tabla 2.3, y se continuó la incubación a 30°C durante 2 ó 4 horas, según la condición ensayada. Bajo estas condiciones, y mediante el análisis *SDS-PAGE* (figura 2.15), la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa recombinante de *K. lactis* fue expresada mayoritariamente en la cuarta condición de inducción, es decir, a una concentración de IPTG de 0,1 mM durante 2 horas (figura 2.15 pocillo 4).

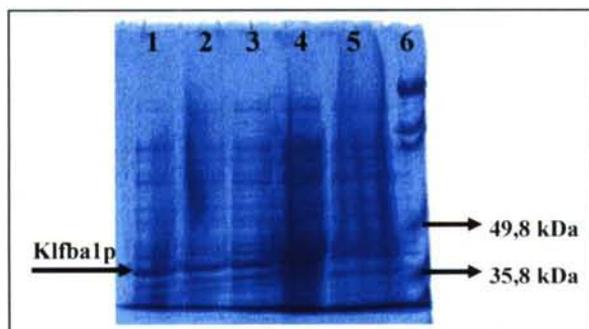


Figura 2.15: Electroforesis en *SDS-PAGE*, teñido con azul *Coomassie* "Coomassie brilliant blue (CBB)", de los distintos extractos proteicos crudos obtenidos a partir de las diferentes condiciones ensayadas para determinar en qué condiciones se obtiene más proteína *Klfba1p*. 1 es el extracto crudo obtenido del cultivo sometido a una concentración de IPTG de 1mM durante 4 horas, 2 sometido a 0,1 mM durante 4 horas, 3 sometido a 1 mM durante 2 horas, 4 sometido a 0,1 mM durante 2 horas, 5 es el control sin inducir (sin IPTG) y 6 es el marcador de pesos moleculares de proteínas (*Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* de *Bio-Rad*).

A continuación se procedió a la expresión a gran escala de la proteína *Klfba1p* mediante su inducción a 0,1 mM de IPTG durante 2 horas. Para ello se inoculó, con las células BL21(DE3) de *E. coli* transformadas con el vector de expresión pET21d-*Klfba1p*, 1 litro de medio de LB conteniendo 20 µg de canamicina/mL. El cultivo se realizó a 37°C con una agitación de 250 r.p.m. hasta que la D.O. a 600 nm fue de 0,6. En este momento se retiró una alícuota de 1 mL de cultivo (que sirvió de control sin inducir) y se añadió IPTG a una concentración final de 0,1 mM y se continuó incubando a 30°C durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo, se retiró otra alícuota y se recogieron las células inducidas mediante centrifugación. Las células se rompieron mediante sonicación y se centrifugaron (ver materiales y métodos). El sobrenadante filtrado se empleó para la

purificación de la enzima recombinante por cromatografía de afinidad empleando la agarosa Ni-NTA (*Novagen*).

Purificación de la proteína *K/Fba1p* como un polipéptido soluble que contiene una secuencia de 6 histidinas en el extremo C-terminal

Durante los diferentes pasos del protocolo de purificación se fueron retirando muestras que posteriormente fueron analizadas por *SDS-PAGE* (figura 2.16). Como se observa en esta figura, se obtuvo proteína recombinante en las cuatro fracciones eluidas ($E1_2$, $E2_2$, $E3_2$ y $E4_2$ que son las que se observan en la figura) de las ocho totales ($E1_1$, $E1_2$, $E2_1$, $E2_2$, $E3_1$, $E3_2$, $E4_1$ y $E4_2$) aunque los eluidos $E2_2$, $E3_2$ y $E4_2$ son los que contienen mayor cantidad de proteína. El hecho de que se obtenga proteína purificada en todos los eluidos puede ser debido a que se haya obtenido tanta proteína *K/Fba1p* que la cantidad de agarosa Ni-NTA empleada no hubiese sido suficiente y que por tanto tengamos mucha proteína que no pueda unirse a la columna. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que en el segundo lavado de la columna (pocillo 6 de la figura 2.16), antes de recoger los eluidos de la proteína purificada, aún sigue habiendo mucha proteína *K/Fba1p* no unida a la columna, y también por el hecho de que, como se expondrá más adelante, al aumentar la cantidad de agarosa empleada disminuye la cantidad de proteína no unida que sale en el lavado de la columna.

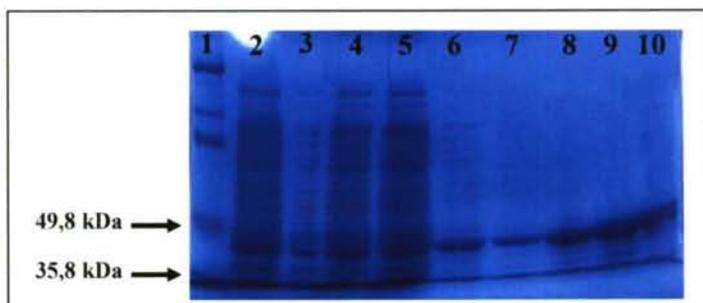


Figura 2.16: Electroforesis en *SDS-PAGE*, teñido con azul *Coomassie* “*Coomassie brilliant blue* (CBB)”, de los distintos extractos proteicos crudos y los distintos eluidos con la proteína *K/Fba1p* purificada obtenidos a partir de los diferentes pasos realizados durante el protocolo de purificación. 1 es el marcador de pesos moleculares de proteínas (*Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* de *Bio-Rad*), 2 es el control sin inducir (sin IPTG), 3 es el extracto crudo obtenido tras crecer las células a una concentración final de IPTG de 0,1 mM durante 2 horas, 4 es el sobrenadante (no filtrado) obtenido por centrifugación tras la sonicación celular, 5 es el eluido obtenido tras el empaquetado de la columna, 6 es eluido obtenido después del segundo lavado de la columna, 7 es eluido $E1_2$, 8 es el eluido $E2_2$, 9 es el eluido $E3_2$ y 10 es el eluido $E4_2$.

Los niveles de expresión de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *K. lactis*, como proteína recombinante soluble en *E. coli*, se monitorizaron también mediante medida de actividad aldolasa (tabla 2.4). Las ocho fracciones totales eluidas se utilizaron directamente, sin concentrar y sin eliminar el imidazol de la muestra proteica, para medir la actividad aldolasa (Richards y Rutter, 1961) de cada una de ellas. Los valores de actividades aldolasa obtenidos se muestran en la tabla 2.4.

El eluido E1₂ es el que mostró tener una mayor actividad fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa específica, a pesar de que la banda en el gel *SDS-PAGE* correspondiente a la proteína *KIFba1p* purificada es menos intensa que en otras fracciones. Este hecho puede ser debido a que la proteína esté más purificada en esa fracción o a que el imidazol tenga un efecto inhibitor sobre la actividad aldolasa. Este efecto inhibitor del imidazol ya se ha demostrado en la actividad β -galactosidasa cuando el gen *LAC4* de *K. lactis*, que codifica para la β -galactosidasa, se expresa en la bacteria *E. coli* (Kim *et al.*, 2003). En este caso, la actividad β -galactosidasa desciende exponencialmente a medida que se incrementa la concentración de imidazol, en concreto, al cabo de 2 horas a una concentración 50 mM de imidazol desciende un 50% la actividad, al cabo de 8 horas a 150 mM y 3 horas a 200 mM se pierde completamente la actividad (Kim *et al.*, 2003).

Tabla 2.4: Valores de las actividades aldolasa obtenidos en las diferentes fracciones eluidas de la columna. Las concentraciones protéicas se estimaron mediante el método de Bradford (1976).

ELUÍDO	ACTIVIDAD ALDOLASA (nmol F-1,6-P ₂ /μg proteína x min)
E1 ₁	3,45
E1 ₂	3,85
E2 ₁	1,23
E2 ₂	0,64
E3 ₁	0,4
E3 ₂	0,38
E4 ₁	0
E4 ₂	0

Empleando el programa informático *ImageMaster Total Lab*, ver.2.00 de *Amersham Biosciences*, se cuantificó la banda de la proteína purificada *KIFba1p* del pocillo 7 de la figura 2.16 a partir de una imagen del gel mediante un análisis de densitometría (figura 2.17).

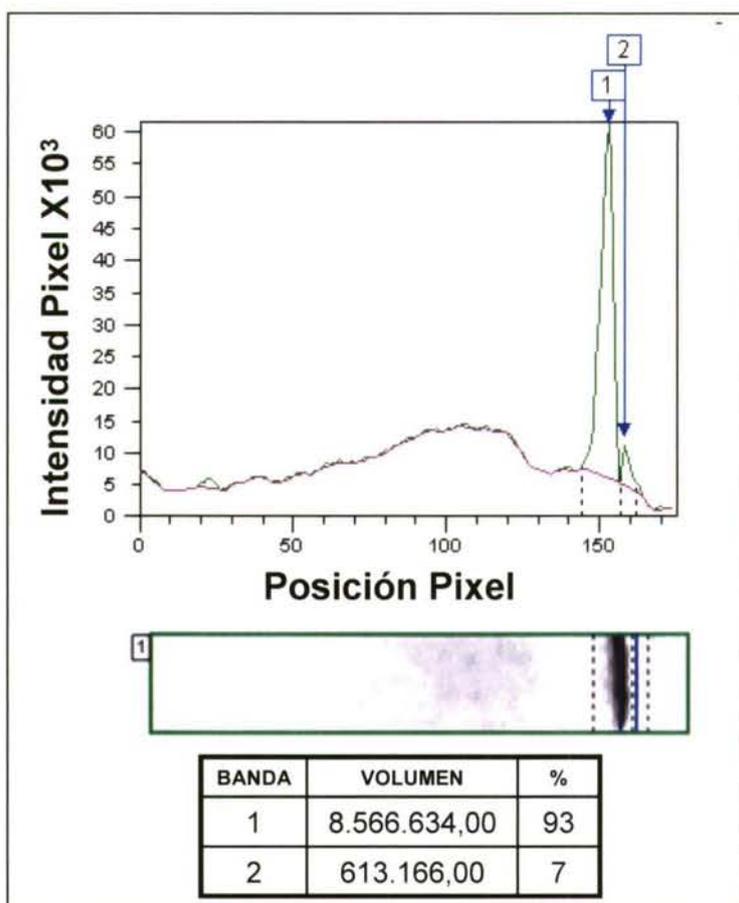


Figura 2.17: Análisis densitométrico del pocillo 7 de la figura 2.16 que se corresponde con el eluido E1₂ que es el que tiene mayor actividad fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa específica.

A partir del análisis densitométrico y de *SDS-PAGE* se pudo estimar que la fracción E1₂ contiene la proteína *K/Fba1p* con un 93% de pureza y que la masa molecular coincide con la masa molecular estimada a partir de la secuencia, 39,6 kDa. Estos resultados confirmaron que el gen clonado *KIFBA1* codifica para una proteína funcional fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.

En la figura 2.18 se muestran los diferentes pasos del protocolo de purificación de la proteína *K/Fba1p* pero empleando una mayor cantidad de agarosa Ni-NTA para hacer la columna. De hecho se observa que sólo eluye proteína *K/Fba1p* en las fracciones E3 y E4, además, en el eluido obtenido después del segundo lavado de la columna, no se recupera tanta proteína porque la mayor parte de ésta está unida a la agarosa.

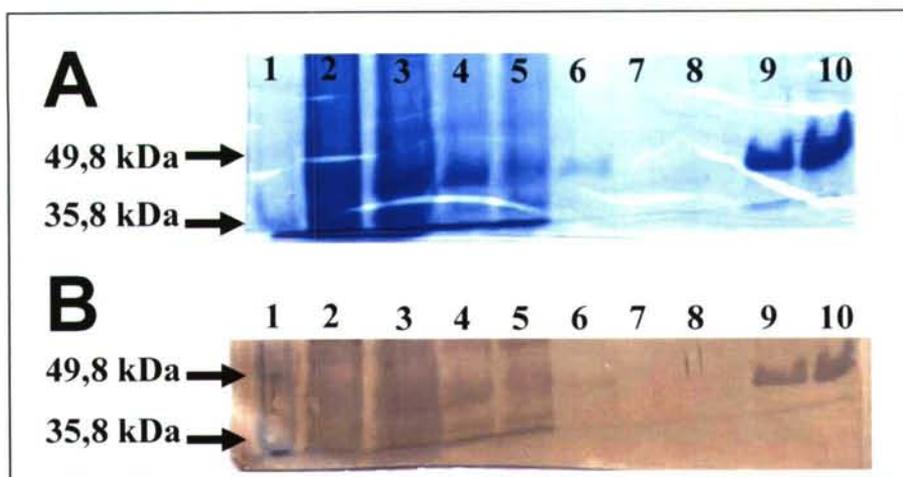


Figura 2.18: A es una electroforesis en *SDS-PAGE*, teñido con azul *Coomassie* “*Coomassie brilliant blue (CBB)*”, y B es un *Western-blot* (hidridado con los anticuerpos anti-His de *Invitrogen* y anti-Ig de ratón de *Dakopatts*) los distintos extractos proteicos crudos y los distintos eluidos con la proteína *KIFba1p* purificada obtenidos a partir de los diferentes pasos realizados durante el protocolo de purificación. 1 es el marcador de pesos moleculares de proteínas (*Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* de *Bio-Rad*), 2 es el control sin inducir (sin IPTG), 3 es el extracto crudo obtenido tras crecer las células a una concentración final de IPTG de 0,1 mM durante 2 horas, 4 es el sobrenadante (no filtrado) obtenido por centrifugación tras la sonicación celular, 5 es el eluido obtenido tras el empaquetado de la columna, 6 es eluido obtenido después del segundo lavado de la columna, 7 es eluido E1, 8 es el eluido E2, 9 es el eluido E3 y 10 es el eluido E4 de los cuatro eluidos proteicos totales.

La proteína purificada se guardó congelada a -20°C para posteriormente realizar experimentos de crecimiento de cristales (experimentos de cristalización de la proteína *KIFba1p*). Para ello se estudiaron diferentes condiciones de sobresaturación mediante la adición de agentes precipitantes y/o mediante la modificación de otros parámetros tales como pH y temperatura. Los precipitantes usados fueron sales y polietilenglicoles (PEG). Hay otros factores que influyen en el proceso de cristalización: la concentración de proteína, la temperatura, la presencia de cationes y de ligandos específicos que estabilizan ciertas conformaciones de las proteínas, y por supuesto, la pureza de la muestra. La presencia de contaminantes puede ser extremadamente importante para impedir la obtención de cristales adecuados para estudios de difracción de rayos X. En una primera aproximación se ensayaron diferentes condiciones observándose en algunos casos, (con una concentración final en la gota y en el reservorio de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 3,5% PEG 4.000 y 2,5 mM de MgCl_2 y con una concentración final en la gota y en el reservorio de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 3,5% PEG 4.000 y 2,5 mM de RbCl), gotas transparentes que indican que no se ha alcanzado la sobresaturación, es decir, la concentración del precipitante es demasiado baja o la gota aún no ha completado el

equilibrio con el depósito. En un futuro se ensayarán más detenidamente estas mismas condiciones para poder cristalizar la proteína *KIFbalp* y realizar estudios cristalográficos.

2.4. Localización de las posibles secuencias reguladoras *cis* dentro de la región promotora del gen *FBA1* de *K. lactis*

El resultado de la búsqueda de posibles secuencias consenso para la unión de factores transcripcionales en el promotor del gen *KIFBA1* se muestra en la figura 2.19. Estas regiones reguladoras se encontraron empleando los programas informáticos TFSEARCH y TRANSFAC (ver materiales y métodos).

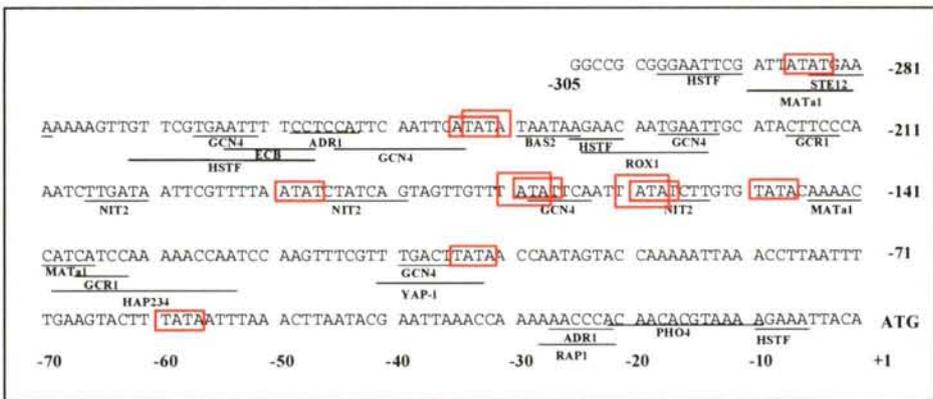


Figura 2.19: Posibles consensos encontrados para la unión de factores transcripcionales en la región promotora del gen *KIFBA1* con un *threshold* de 85 puntos. En rojo se señalan las supuestas cajas TATA.

2.4.1. Fusión del promotor de *KIFBA1* al gen *lacZ* de *E. coli*

Para analizar la funcionalidad de la región promotora se construyó una fusión del promotor entero y una serie de deleciones unidireccionales sobre el promotor de *KIFBA1* mediante *PCR* (ver condiciones en materiales y métodos) que se fusionaron al gen reportero *lacZ* para poder visualizar la actividad promotora mediante la medida de la actividad β -galactosidasa. Para ello se eligieron cebadores que permitieron eliminar progresivamente las distintas secuencias consenso de interés como se muestra en la figura 2.21. Los cebadores utilizados para estas amplificaciones poseían colas con secuencias de corte para las enzimas de restricción *Hind* III y *Bam*H I (tabla 2.5). En un

primer lugar los fragmentos amplificados se clonaron en el vector comercial pGEM-T-Easy (vector apto para el clonaje de productos amplificados por *PCR*), posteriormente las construcciones resultantes se digirieron con estas dos endonucleasas de restricción. Se rescató la banda correspondiente al promotor deletado y se clonó finalmente en el plásmido pXW2 (Chen *et al.*, 1992a) para su expresión en *K. lactis*, proporcionando el ATG del gen *KIFBA1* y manteniendo la pauta de lectura con el octavo codón del gen *lacZ* de *E. coli* del vector. Las construcciones se nombraron como PAF5, PAF1, PAF3 y PAF2 (figura 2.20). Posteriormente, se secuenciaron todas las fusiones empleando los cebadores 30LacZ y 70LacZ (tabla M4 Materiales y Métodos) que hibridaban dentro del gen *lacZ* de *E. coli*, comprobando que la amplificación por *PCR* había sido correcta, que no se había producido ninguna mutación en las secuencias consenso ni se había variado la pauta de lectura.

CEBADOR	POSICIÓN
KLPAF1	-287 W
KLPAF2	-217 W
KLPAF3	-255 W
KLPAF5	-305 W
KLPAR	-15 C

Tabla 2.5: Cebadores utilizados para la obtención de las deletiones de la región promotora del gen *KIFBA1*. W es la hebra de Watson y C es la hebra de Crick. La secuencia completa de los cebadores se encuentra en la tabla M4 de Materiales y Métodos.

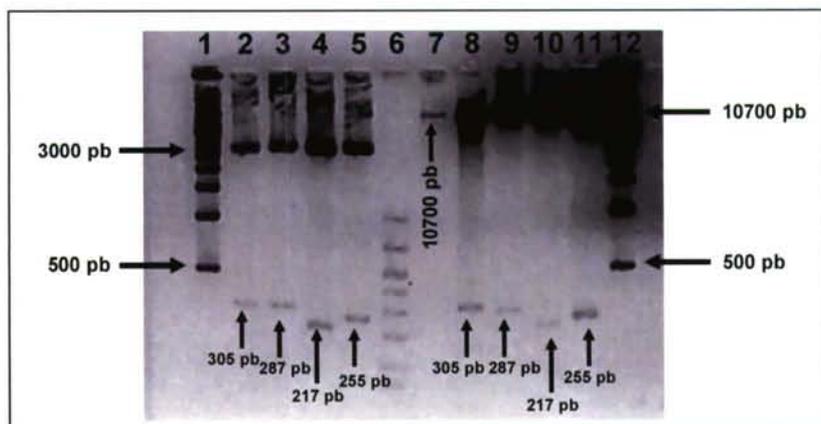


Figura 2.20: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. 1 y 12 son el marcador XVII de pesos moleculares de *Roche*. 6 es el marcador de 50 a 1000 pb de *BioWhittaker Molecular Applications*. 2, 3, 4 y 5 son las deletiones PAF5, PAF1, PAF2 y PAF3 respectivamente clonadas en el vector pGEM-T-Easy y digeridas con las endonucleasas de restricción *BamH I* y *Hind III*. 8, 9, 10 y 11 son las mismas deletiones clonadas en el vector pXW2 y digeridas con las mismas endonucleasas de restricción.

2.4.2. Estudios de expresión mediante fusiones al gen *lacZ* de *E. coli*

Con cada una de las cuatro delecciones y utilizando el vector pXW2 (Chen *et al.*, 1992a) como control negativo, se transformó la línea MW190-9B de *K. lactis* deficiente en β -galactosidasa y Ura⁻, seleccionando los transformantes en placas CM-URA. A cada uno de los transformantes se les extrajo el ADN plasmídico que se utilizó para transformar la cepa DH-10B de *E. coli* con el fin de comprobar por análisis de restricción y técnicas de *PCR* que portaban la construcción deseada.

Medidas de actividad β -galactosidasa cualitativa

En una primera aproximación, para valorar la actividad β -galactosidasa de las levaduras transformadas con las distintas construcciones conteniendo las diferentes delecciones del promotor, se sembraron tres transformantes independientes (para cada una de las construcciones) en placas CM-URA con diferentes fuentes de carbono (glucosa al 0,5% y 2%, etanol, glicerol y lactato al 2%). A estas placas se les adicionó el compuesto cromogénico X-Gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- β -D-Galactopiranosido). Dicho compuesto proporciona una coloración azul al ser hidrolizado por la β -galactosidasa permitiendo, de este modo, realizar medidas cualitativas de la actividad β -galactosidasa entre los diferentes transformantes en las distintas fuentes de carbono.

Tanto para la construcción PAF1 como para la PAF5, que son las que contienen un promotor de 287 y 305 pb, se observa que existe actividad β -galactosidasa en todas las fuentes de carbono ensayadas. En las siguientes delecciones, PAF2 y PAF3, se observa un descenso de la actividad. Como control negativo se ensayaron tres transformantes independientes que contenían el vector pXW2 vacío y, por tanto, no mostraron actividad β -galactosidasa, pues al no llevar insertado ningún fragmento de promotor no se expresa el gen *lacZ* de *E. coli* (datos no mostrados).

Medidas de actividad β -galactosidasa cuantitativa

Para medir la actividad β -galactosidasa se emplearon entre 3 y 5 transformantes independientes de cada construcción (a su vez de cada transformante se realizó un

triplicado de la medida) y tres transformantes con el vector vacío como control negativo (también se realizó un triplicado de la medida de cada transformante).

Como se muestra en la figura 2.21 no hay diferencias significativas de actividad entre una fuente de carbono fermentable y no fermentable. Este resultado se comprobó posteriormente mediante ensayos de *Northern blot* que se expondrán más adelante en la presente memoria y que confirman que la transcripción del gen *KIFBA1* no está sometida a represión por glucosa.

UAS	Actividad β -galactosidasa (U.E.)			
	Glucosa 2%		Glicerol 2%	
	Media \pm E.E.	n	Media \pm E.E.	n
PAF5(-305 -lacZ)	69,27 \pm 3,59	12	-	-
PAF1(-287 -lacZ)	62,44 \pm 2,97	14	55,97 \pm 5,48	9
PAF3(-255 -lacZ)	0,74 \pm 0,02*	15	-	-
PAF2(-217 -lacZ)	0,69 \pm 0,01*	15	0,61 \pm 0,06*	15
CONTROL: pXW2	0,39 \pm 0,04*	9	0,65 \pm 0,07*	9

Figura 2.21: Análisis de las deleciones de la región promotora de *KIFBA1*. E.E. es el error estándar y n el tamaño de muestra. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con PAF1 en glucosa. No hay diferencias estadísticamente significativas entre PAF3, PAF2 y el control en glucosa o glicerol.

Las fusiones que se extienden desde la posición -305 hasta la -287 pb (PAF5 y PAF 1) no influyen significativamente los niveles de expresión. Delecionando los 32 pb siguientes hacia el extremo 3' (hasta -255 pb, deleción PAF3) se reduce drásticamente la expresión hasta valores similares a los del control sin promotor. La siguiente deleción que se extiende hasta la posición -217 pb, que elimina el consenso para el represor Rox1p mientras que se mantienen los dos supuestos sitios de unión de Gcr1p y Rap1p, no restaura los niveles de expresión. Los sitios de unión de Rap1p (cajas RPG) en el promotor de genes glucolíticos de levaduras se encuentran con frecuencia adyacentes a uno o más sitios de unión de Gcr1p (cajas CT) y la presencia de estos elementos ha sido relacionado con una activación transcripcional eficiente (Uemura *et al.*, 1997; López y Baker, 2000).

De hecho, la única región *UAS* presente en el promotor del gen *FBA1* de *S. cerevisiae* contiene sitios de unión para la proteína multifuncional Rap1p y dos cajas CT (Compagno *et al.*, 1991). Los homólogos Rap1p y Gcr1p de *K. lactis* han sido aislados

recientemente y se ha propuesto un mecanismo similar de regulación de genes glucolíticos para *S. cerevisiae* y *K. lactis* ya que las cajas RPG y CT también están presentes en el promotor de varios genes glucolíticos de *K. lactis* (Haw *et al.*, 2001; Neil *et al.*, 2004). Sin embargo, los sitios Gcr1p de la región del promotor de *KIFBA1* que tenemos no parecen ser funcionales. La causa podría ser que están localizados cerca de las cajas TATA, como ya se ha relatado previamente para genes de levadura relacionados (Stanway *et al.*, 1989; Compagno *et al.*, 1991). Además, el sitio de unión de Rap1p no está adyacente al sitio de unión de Gcr1p sino que se localiza cerca del ATG. Los datos anteriormente expuestos limitan una región reguladora positiva (*UAS*) entre las posiciones -287 y -255 pb en el promotor analizado de *KIFBA1*. La secuencia de esta región no contiene ni cajas RPG ni cajas CT, en contraste con el *UAS* del promotor del gen *FBA1* de *S. cerevisiae*. Dicha región contiene, en su lugar, supuestos sitios de unión para factores transcripcionales implicados en la respuesta a feromonas (STE12), control general (GCN4), ciclo celular (ECB), de-represión en ausencia de glucosa (ADR1) y choque por calor (HSTF).

2.5. Expresión transcripcional del gen *FBA1* de *Kluyveromyces lactis* en condiciones seleccionadas

En el presente trabajo se estudió la expresión del gen *FBA1* de *K. lactis* bajo diferentes condiciones. La disponibilidad de la secuencia completa de ADN de *S. cerevisiae* y de un mayor número de datos del transcriptoma y proteoma en respuesta a un amplio rango de condiciones experimentales está contribuyendo a un mejor entendimiento de los mecanismos reguladores de esta levadura. Asumir que los genes de *K. lactis* tienen una regulación similar a la de los genes homólogos de *S. cerevisiae* basándose solamente en la similitud de los consensos en las regiones promotoras no es posible, puesto que ya se ha postulado la existencia de una regulación divergente para una serie de genes homólogos en *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Becerra *et al.*, en prensa; Breunig *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2000; González Siso *et al.*, 2000; Lamas-Maceiras *et al.*, 1999). Por ello, se ha realizado un análisis, mediante *Northern blot*, de la regulación transcripcional del gen *KIFBA1* en condiciones seleccionadas sugeridas a partir de datos disponibles de su levadura homóloga *S. cerevisiae* y/o por algunas supuestas señales reguladoras encontradas en la región promotora del gen *KIFBA1* que hemos secuenciado (figura 2.19).

2.5.1. Influencia de la fuente de carbono en la expresión del gen *KIFBA1*

En la región promotora del gen *KIFBA1* se encontraron supuestos sitios de unión para los factores transcripcionales Hap2/3/4/5p y Adr1p, que en *S. cerevisiae* median la des-represión de genes diana en ausencia de glucosa (Ramil *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2002), siendo necesarios para inducir la transcripción de un gran número de genes implicados en el metabolismo oxidativo en fuentes de carbono no fermentables. La acción coordinada de Adr1p y Hap2/3/4/5p en la regulación de la transcripción génica ya se ha descrito para el gen del citocromo b_2 (Ramil *et al.*, 2000). Sin embargo, en la figura 2.22.A y B se observa que *KIFBA1* no muestra represión catabólica, puesto que los niveles de expresión son similares en glucosa al 0,5% y glucosa al 2%, ni inducción por lactato (fuente de carbono no fermentable).

El gen *FBA1* de *S. cerevisiae* tampoco está regulado por la fuente de carbono (Compagno *et al.*, 1991), como hemos corroborado en nuestro laboratorio (figura 2.22.A y C), aunque los datos del análisis global del transcriptoma (Gasch *et al.*, 2000) mostraron un ligero aumento de la expresión en glucosa y un descenso en etanol. Los resultados aquí expuestos apoyan la idea de que el gen *KIFBA1* parece escaparse del control de los factores de transcripción Hap2/3/4/5p y Adr1p. Esta misma conclusión se extrajo tras determinar las actividades enzimáticas específicas fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (tabla 2.6) mostrando también la ausencia de mecanismos de regulación post-transcripcional relacionados con la fuente de carbono. Además, en las delecciones del promotor fusionadas al gen *lacZ* ensayadas no se encontró ninguna diferencia en la actividad β -galactosidasa en glucosa (fermentable) *versus* glicerol (no fermentable) (figura 2.21).

Cepa	Medio	Actividad enzimática F-1,6-B ₂ aldolasa	n
KI Y1140	Glucosa 0,5%	1,522±0,245	4
KI Y1140	Glucosa 2%	1,365±0,365	2
KI Y1140	Lactato 2%	1,85±0,314	4
Sc aGH1	Glucosa 0,5%	1,822±0,359	3
Sc aGH1	Glucosa 2%	2,558±0,677	3
Sc aGH1	Lactato 2%	2,774±0,529	4

Tabla 2.6: Actividades fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (nmol Fructosa-1,6-bisfosfato/ μ g proteína x min; media \pm error estándar) de las cepas salvajes aGH1 de *S. cerevisiae* e Y1140 de *K. lactis*. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la misma cepa en las diferentes fuentes de carbono o de las dos cepas en la misma fuente de carbono.

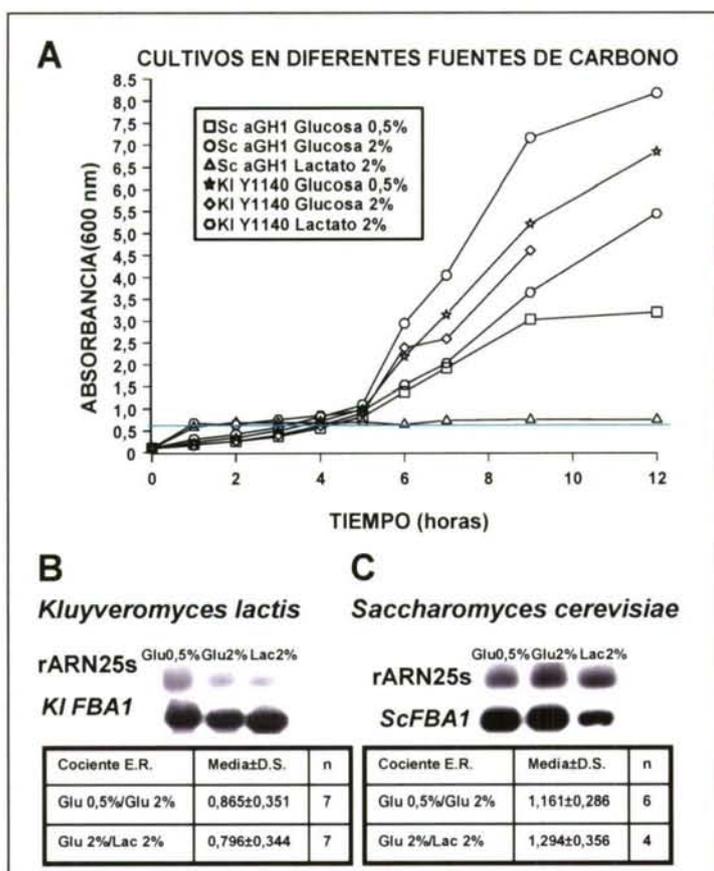


Figura 2.22: Influencia de la fuente de carbono en la expresión del gen *FBA1*. A: Curvas de crecimiento de las cepa aGH1 de *S. cerevisiae* (Sc aGH1) y la cepa Y1140 de *K. lactis* (KI Y1140) en glucosa al 0,5 y 2 %, y en lactato al 2%. Los cultivos se recogieron a una densidad óptica a 600 nm de 0,6 señalado en la figura con una línea horizontal. B y C: influencia de la fuente de carbono en la expresión del gen *FBA1* de *K. lactis* (B) y de *S. cerevisiae* (C) en glucosa al 0,5% y 2% y en lactato al 2%. En las tablas se representan los cocientes entre los valores relativos de expresión (E.R). D.S. es la desviación estándar y n el tamaño de muestra. Tanto en B como en C, rARN25s representa el control interno de carga.

2.5.2. Expresión del gen *KIFBA1* en el mutante *rag2*

Para investigar la posible relación entre la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa y la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en *K. lactis*, se ensayó la expresión del gen *KIFBA1* en glucosa *versus* fructosa usando una cepa mutante *rag2*, es decir, defectuosa en la fosfoglucoisomerasa, en comparación con la cepa salvaje Y1140. La cepa mutante *rag2* necesita la ruta de las pentosas fosfato para crecer en glucosa pero no en fructosa (González Siso *et al.*, 1996a). Los niveles de transcripción fueron similares para cada cepa en ambas fuentes de carbono (figura 2.23.A y B).

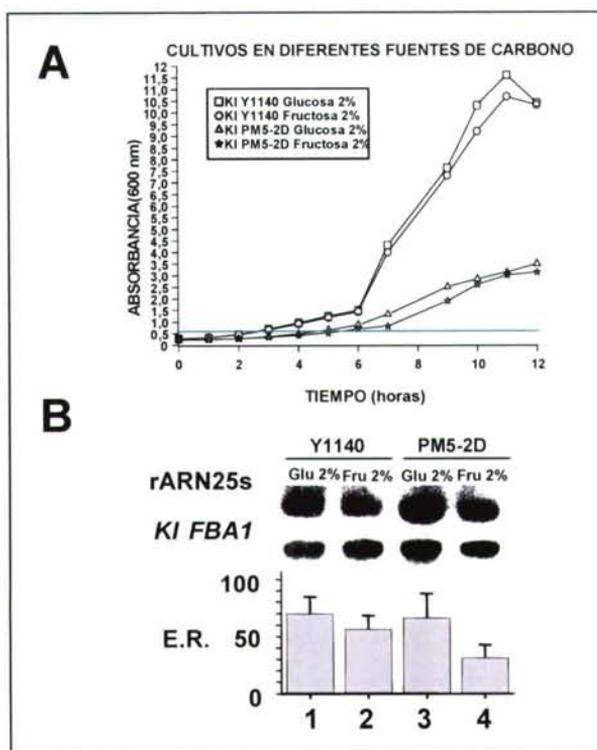


Figura 2.23: Influencia de la fuente de carbono en la expresión del gen *KIFBA1* de *K. lactis* en una cepa salvaje (Y1140) con respecto a una cepa mutante en la fosfoglucosa isomerasa (*rag2*) de *K. lactis*. A: Curvas de crecimiento de las cepas salvaje Y1140 y mutante PM5-2D de *K. lactis* en glucosa y fructosa al 2%. Los cultivos se recogieron a una densidad óptica a 600 nm de 0,6 señalado en la figura con una línea horizontal. B: Valores relativos de expresión (E.R.) del gen *KIFBA1* normalizados (media±desviación estándar de 4 muestras en 1, 3 muestras en 2, 3 muestras en 3 y 2 muestras en 4) en glucosa y fructosa al 2%. rARN25s representa el control interno de carga.

Esta misma conclusión también se extrajo de la determinación de las actividades específicas fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa mostrando también la ausencia de mecanismos de regulación post-transcripcional (tabla 2.7). Por tanto, no se ha encontrado ninguna conexión entre la expresión del gen fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa y la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en *K. lactis*.

Cepa	Medio	Actividad enzimática F-1,6-B ₂ aldolasa	n
KI Y1140	Glucosa 2%	1,365±0,365	2
KI Y1140	Fructosa 2%	1,187±0,259	4
KI PM5-2D	Glucosa 2%	0,724±0,118	4
KI PM5-2D	Fructosa 2%	0,718±0,114	4

Tabla 2.7: Actividades fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (nmol Fructosa-1,6-bisfosfato/μg proteína x min; media±error estándar) de la cepa salvaje Y1140 y de la cepa mutante PM5-2D (*rag2*) de *K. lactis* en glucosa versus fructosa al 2%. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la misma cepa en las dos fuentes de carbono.

2.5.3. Influencia del calcio en la expresión del gen *KIFBA1*

La expresión transcripcional de *KIFBA1* no está regulada por los niveles de calcio (figura 2.24.A y B), al contrario de lo que ocurre en su homóloga *S. cerevisiae* que es ligeramente inducida durante la falta de calcio según datos de transcriptoma (Lombardia *et al.*, 2002).

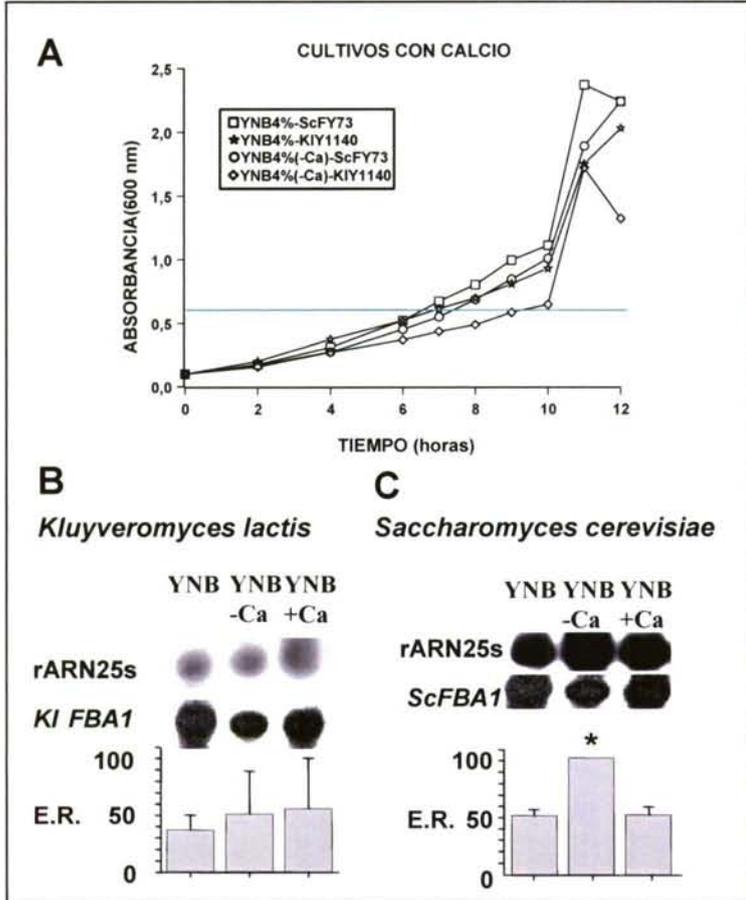


Figura 2.24: Influencia del calcio en la expresión del gen *FBA1*. A: Curvas de crecimiento de las cepas salvajes FY73 de *S. cerevisiae* (*Sc* FY73) e Y1140 de *K. lactis* (*Kl* Y1140) en medio CM con YNB al 4% (YNB), con YNB al 4% sin calcio (en el que se sustituyó el pantotenato cálcico por pantotenato sódico) (YNB-Ca²⁺) e YNB al 4% con exceso de calcio (YNB+Ca²⁺) que es el mismo medio YNB al 4% crecido hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6 que se sometió a un choque de calcio (con cloruro cálcico a una concentración de 50 mM en el medio de cultivo) durante 45 minutos. En los tres casos la fuente de carbono empleada fue glucosa al 0,4%. Los cultivos se recogieron a una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,6 señalado en la figura con una línea horizontal. B: influencia del calcio en la expresión del gen *FBA1* de *K. lactis*. C: influencia del calcio en la expresión del gen *FBA1* de *S. cerevisiae*. Las gráficas representan los valores relativos de expresión (E.R.) normalizados (media±D.S. de 4 muestras en B y 2 en C). rARN25s representa el control interno de carga. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (YNB).

Según los resultados de *S. cerevisiae* obtenidos en nuestro laboratorio, se ha observado una disminución de la transcripción en presencia de calcio que es significativa si se aplica un *test* de *Student* (figura 2.24.A y C). Esta misma conclusión también se extrajo de la determinación de las actividades específicas fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa mostrando también la ausencia de mecanismos de regulación post-transcripcional (tabla 2.8).

Cepa	Medio	Actividad enzimática F-1,6-B ₂ aldolasa	n
KI Y1140	CM YNB 4%	2,897±0,479	4
KI Y1140	CM YNB 4%-Ca ²⁺	2,643±0,305	4
KI Y1140	CM YNB 4%+Ca ²⁺	1,966±0,361	4
Sc FY73	CM YNB 4%	2,312±0,240	4
Sc FY73	CM YNB 4%-Ca ²⁺	2,195±0,355	4
Sc FY73	CM YNB 4%+Ca ²⁺	1,544±0,288	4

Tabla 2.8: Actividades fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (nmol Fructosa-1,6-bisfosfato/µg proteína x min, media±error estándar) de las cepas salvajes Y1140 y FY73 de *K. lactis* en CM (YNB 4%), CM (YNB 4% sin calcio) y CM (YNB 4% con choque de calcio). No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la cepa Y1140 de *K. lactis* en los diferentes medios, pero si existe una diferencia significativa entre las medias de la cepa FY73 de *S. cerevisiae* en CM YNB 4% y CM YNB 4%+Ca²⁺.

2.5.4. Influencia de la temperatura en la expresión del gen *KIFBA1*

El gen *FBA1* de *S. cerevisiae*, cuyo promotor contiene cuatro supuestos sitios de unión de HSTF, se ha postulado que es un gen *LOT* (inducido por un descenso en la temperatura) (Zhang *et al.*, 2001). Se decidió estudiar con mayor detalle la influencia de la temperatura de crecimiento en la expresión de *KIFBA1*. En la figura 2.25.B se muestran los niveles de mRNA del gen *KIFBA1* después del descenso de la temperatura (desde 30 a 14°C) y en la figura 2.25.C después del aumento de la temperatura (desde 30 °C a 40°C).

Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la transcripción desciende ligeramente durante 2-4 horas después del descenso de temperatura, pero después de 6-8 horas a 14°C los niveles de mRNA del gen *KIFBA1* no fueron significativamente diferentes a los iniciales (figura 2.25.A y B). Por tanto, el gen *KIFBA1* no es un gen *LOT*. Para el caso del choque a 40°C (figura 2.25.A y C), se produjo un descenso en los niveles de expresión desde los 15 minutos de comenzar el choque térmico, llegando a descender los niveles de expresión hasta 2,8 veces al cabo de 2 horas.

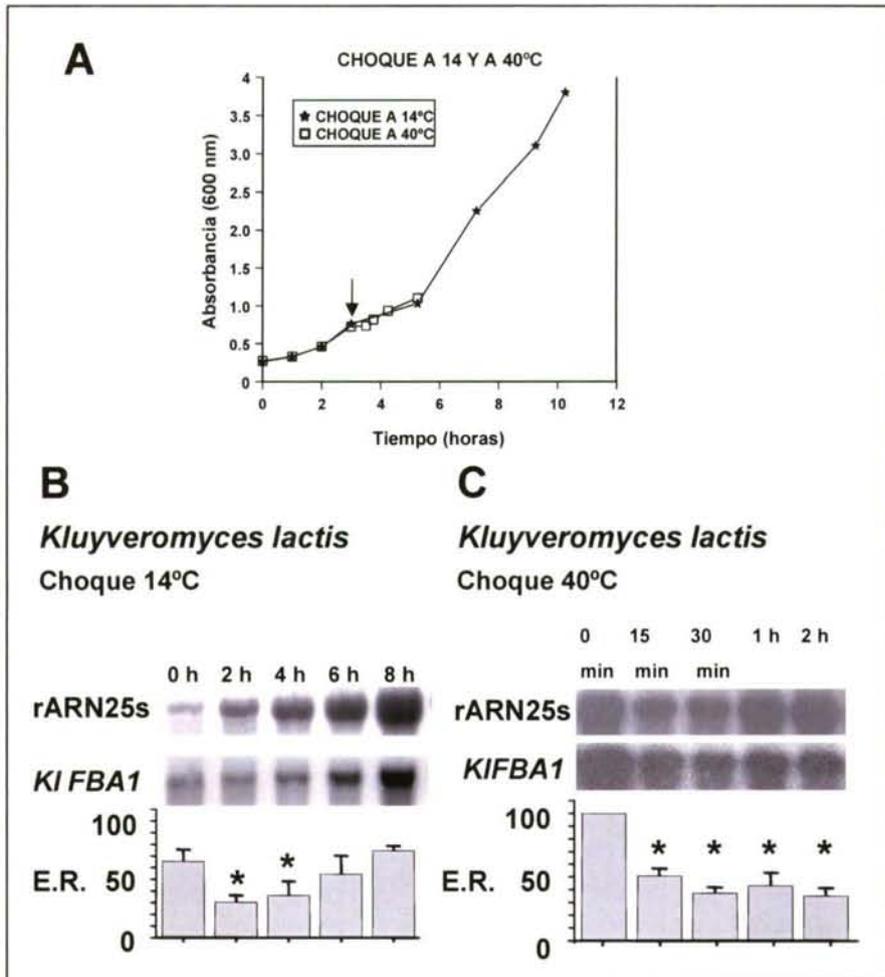


Figura 2.25: Influencia del descenso y aumento de la temperatura de crecimiento en la expresión del gen *KIFBA1* en una cepa salvaje (Y1140) de *K. lactis* crecida en medio YPD a 30°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6, posteriormente se dieron dos choques térmicos, uno de 14°C durante 8 horas y otro a 40°C durante 2 horas. A: Curvas de crecimiento de la cepa salvaje Y1140 de *K. lactis* crecida hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6. (↓), momento a partir del cual se sometieron las células al choque térmico. B: Valores relativos de expresión (E.R.) del gen *KIFBA1* normalizados (media±desviación estándar de 2 muestras) a diferentes tiempos después de descender la temperatura de crecimiento hasta 14°C. C: Valores relativos de expresión (E.R.) del gen *KIFBA1* normalizados (media±error estándar de 2 muestras) a diferentes tiempos después de aumentar la temperatura de crecimiento hasta 40°C. Tanto en B como en C: * Indica una diferencia estadísticamente significativa con el control (la muestra a tiempo cero) y rARN25s representa el control interno de carga.

2.5.5. Influencia de la fase de cultivo en la expresión del gen *KIFBA1*

El gen *FBA1* de *S. cerevisiae* aumenta su expresión en la fase post-diáuxica de crecimiento (Gasch *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1997) por lo que se decidió ensayar la

influencia de la fase de crecimiento en la expresión de *KIFBA1*. En la región promotora del gen *KIFBA1* se encontró un supuesto elemento ECB (“early cell cycle box”) (Mai *et al.*, 2002). La figura 2.26 muestra que la expresión del gen *KIFBA1* es invariable hasta una absorbancia a 600 nm de 2, en contraste con el homólogo de *S. cerevisiae* los niveles de expresión disminuyen a mayores densidades celulares.

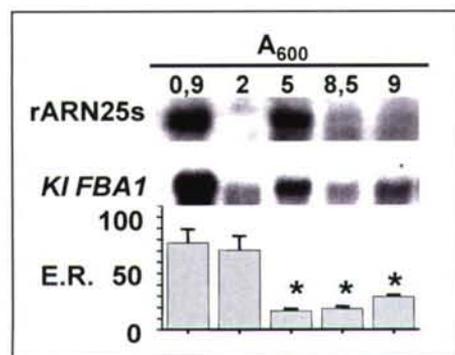


Figura 2.26: Influencia de la fase de crecimiento en la expresión del gen *KIFBA1* en una cepa salvaje (Y1140) de *K. lactis* crecida en medio YPD. Desde $A_{600}=8.5$ a $A_{600}=9$ las células estuvieron en fase estacionaria. En la gráfica se muestran los valores relativos de expresión (E.R.) del gen *KIFBA1* normalizados (media±desviación estándar de 3 muestras) a diferentes fases de crecimiento del cultivo. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a $A_{600}=0,9$ y $A_{600}=2$ y rARN25s representa el control interno de carga.

2.5.6. El gen *KIFBA1* no se induce por choque térmico, por estrés oxidativo ni por ausencia de aminoácidos

En el promotor del gen *KIFBA1* se han encontrado posibles consensos para la unión de diferentes factores transcripcionales relacionados con el estrés. Entre ellos destacan HSTF (factor de transcripción por choque térmico, clonado en *K. lactis* por Jakobsen y Pelham, 1991), Ap1p (estrés oxidativo, activador transcripcional a través del elemento de respuesta a Ap1 (ARE) cuando las células están expuestas a H_2O_2 , clonado en *K. lactis* por Billard *et al.*, 1997), Gcn4p (ausencia de aminoácidos; Devlin *et al.*, 1991; Natarajan *et al.*, 2001), Bas2p(Pho2p)/Pho4p (ausencia de fosfato; Bhoite *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 2000), Rap1p (implicación en el control de la transcripción mediada por otros factores como Gcn4p o Bas2p; Devlin *et al.*, 1991; el homólogo de *RAP1* clonado en *K. lactis* por Larson *et al.*, 1994) y Nit2p (limitación de la fuente de nitrógeno; Marzluf, 1997). Como se muestra en la figura 2.27, la transcripción del gen *KIFBA1* no está inducida por las siguientes condiciones de estrés ensayadas: choque térmico a 45°C durante 30 minutos (en el promotor existen cuatro supuestos sitios de unión a HSTF), estrés oxidativo creado por la adición de H_2O_2 (en el promotor existe un supuesto sitio de unión a Yap-1) y finalmente ausencia de los aminoácidos triptófano e histidina (en el promotor hay cinco supuestos sitios de unión a Gcn4p), fosfato (en el

promotor hay un supuesto sitio de unión a Bas2p y otro a Pho4p) o amonio (en el promotor existen tres supuestos sitios de unión a Nit2p). Después del choque térmico o la adición de H_2O_2 , se observó una ligera reducción de la expresión de *KIFBA1*; las medidas de actividad enzimática específica también mostraron este mismo comportamiento (tabla 2.9). Para el caso del estrés oxidativo, los niveles de expresión transcripcional descendieron 2,2 veces y los valores de las actividades enzimáticas 2,8 veces. Los resultados obtenidos contrastan con la presencia en el promotor de supuestos sitios de unión para factores transcripcionales que son reguladores positivos en respuesta a varias señales de estrés y también con la verificación de que varios de estos factores reguladores existen en *K. lactis*. Esta ausencia de inducción por estrés es compartida con el gen *FBA1* de *S. cerevisiae* como se extrae de los datos del proteoma y transcriptoma (Gasch *et al.*, 2000; Godon *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 2000). En concreto, a pesar de que el promotor del gen *FBA1* de *S. cerevisiae* tiene cinco consensos Nit2p, no es activado en carencia de fuente de nitrógeno (Gasch *et al.*, 2000). De igual modo, al adicionar 0,3 mM de H_2O_2 se produce una ligera represión del gen *FBA1* de *S. cerevisiae* (Gasch *et al.*, 2000).

Estas mismas conclusiones también se extrajeron de la determinación de las actividades específicas fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa mostrando igualmente la ausencia de inducción por estrés que incluso causa un descenso de la actividad (tabla 2.9).

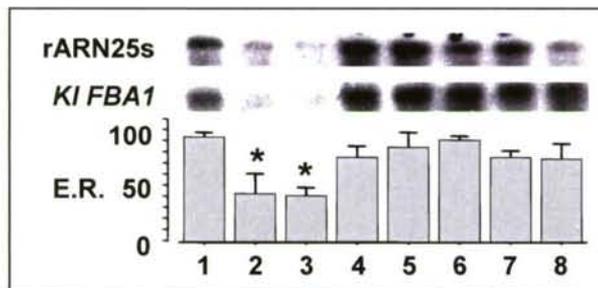


Figura 2.27: Influencia de diferentes condiciones de estrés en la expresión de *KIFBA1* en medio sintético completo (CM): el choque térmico (línea 2) se realizó, una vez crecidas las células hasta $A_{600nm}=0,6$ a $30^{\circ}C$, a $45^{\circ}C$ durante 30 minutos; el estrés oxidativo (línea 3) por la adición de H_2O_2 a una concentración final de 2 mM durante 1 hora (Billard *et al.*, 1997) una vez crecidas las células hasta $A_{600nm}=0,6$; ausencia de aminoácidos (línea 4: sin triptófano, línea 5: sin triptófano y sin la base nitrogenada adenina, línea 6: sin triptófano, sin histidina y sin la base nitrogenada adenina), ausencia de fosfato (línea 7), ausencia de amonio (línea 8). La línea 1 es el control (células de *K. lactis* Y1140 en medio CM a $30^{\circ}C$ hasta $A_{600nm}=0,6$). E.R. son los valores de expresión relativos normalizados (media \pm D.S. de 2 muestras). * Indica una diferencia estadísticamente significativa con el control y rARN25s es el control interno de carga.

Cepa	Medio	Actividad enzimática F-1,6-B ₂ aldolasa	n
KI Y1140	CM	1,70±0,13	4
KI Y1140	CM choque 45°C 30 min.	0,43±0,06	4
KI Y1140	CM+ H ₂ O ₂	0,60±0,11	4
KI Y1140	CM-trip	0,61±0,14	3
KI Y1140	CM-trip-ade	0,49±0,08	4
KI Y1140	CM-trip-ade -his	0,58±0,10	4
KI Y1140	CM-fosfato	0,51±0,14	2
KI Y1140	CM-sulfato	0,97±0,13	4

Tabla 2.9: Actividades fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (nmol Fructosa-1,6-bisfosfato/μg proteína x min; media±error estándar) de la cepa salvaje Y1140 de *K. lactis* sometida a diferentes condiciones de estrés: choque térmico (CM choque 45°C durante 30 minutos), estrés oxidativo (adición de H₂O₂ a una concentración final de 2 mM, Billard *et al.*, 1997), ausencia de aminoácidos (CM-trip: sin triptófano, CM-trip-ade: sin triptófano y sin adenina, CM-trip-ade-his: sin triptófano, sin adenina y sin histidina), ausencia de fosfato (CM-fosfato) y ausencia de amonio (CM-sulfato). Como control se usó la misma cepa crecida en CM (medio sintético completo). En todos los casos existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

En resumen, el gen *KIFBA1* se comporta como el homólogo de *S. cerevisiae*, en lo referido a la regulación transcripcional en respuesta a la fuente de carbono, choque térmico, daño oxidativo y falta de nutrientes. Sin embargo, tampoco responde a otras regulaciones operativas en el gen de *S. cerevisiae*: falta de calcio, choque térmico a bajas temperaturas o fase estacionaria.

2.5.7. Regulación del gen *KIFBA1* por oxígeno/hemo

Teniendo en cuenta la necesidad de la glucólisis para las vías de fermentación y respiración, se ensayó la influencia de los niveles de oxígeno disuelto en la expresión de *KIFBA1* (figura 2.28). El ARN se extrajo de células cultivadas a diferentes proporciones de oxígeno/nitrógeno obtenidas al cambiar de aerobiosis a hipoxia y *viceversa*. Nuestro objetivo fue detectar la respuesta transcripcional de *KIFBA1* durante la fase de adaptación ya que las células responden gradualmente a cambios en la tensión de oxígeno.

En el caso de *K. lactis*, aunque el ARN extraído de cultivos crecidos totalmente bajo burbujeo de nitrógeno muestra niveles de expresión de *KIFBA1* similares a los crecidos en condiciones totalmente aerobias (figura 2.28.A), la expresión génica incrementa significativamente (entre 2,6 y 3,4 veces) después de 10-30 minutos de burbujear nitrógeno en un cultivo inicialmente aeróbico (cuando los niveles de oxígeno disuelto descienden desde 85 hasta 43-18%) y descienden a partir de entonces hasta casi los niveles iniciales (figura 2.28.B). Parece como si la inducción del gen fuese causada

por el cambio de oxígeno a nitrógeno. Del mismo modo, cuando la condición inicial del cultivo es hipóxica, la expresión génica de *KIFBA1* desciende significativamente después de 20-90 minutos de burbujear aire (los niveles de oxígeno disuelto alcanzaron el 62-71%) y a partir de entonces vuelve a incrementar (figura 2.28.C).

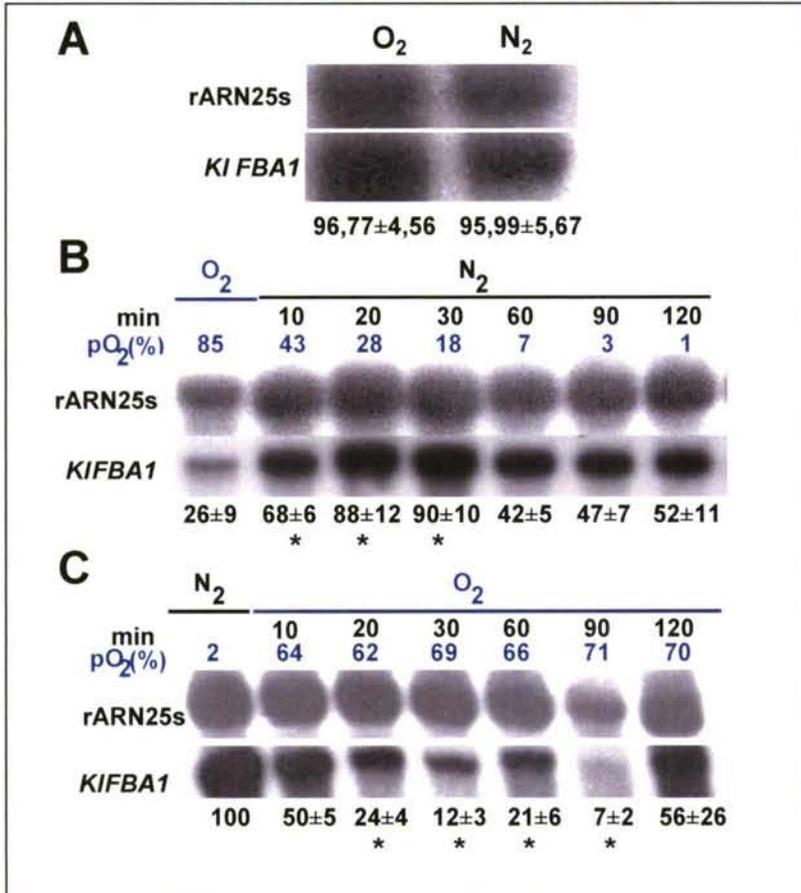


Figura 2.28: A: Expresión del gen *KIFBA1* en condiciones aerobias (O₂) e hipóxicas (N₂) de la cepa salvaje Y1140 crecida en fermentador y burbujear el medio de cultivo con aire (O₂) o nitrógeno (N₂). B y C: Expresión del gen *KIFBA1* en respuesta a un cambio de condiciones aerobias (O₂) a hipóxicas (N₂) y *viceversa* de la cepa salvaje Y1140 crecida en fermentador y burbujear el medio de cultivo con aire (O₂) o nitrógeno (N₂). En A, B y C se expresan los valores relativos de expresión normalizados como media±desviación estándar de 2 muestras en A, 3 en B y 2 en C. rARN25s es el control interno de carga. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con la condición inicial antes del cambio (en donde min expresa el tiempo en minutos y pO₂(%) expresa el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo medido con un electrodo polarográfico. Para A, B y C, las células crecieron en una cubeta del fermentador de 2 litros (*Biostat MD: Braun-Biotech, Alemania*) con un volumen de trabajo de 1,5 litros de medio YPD y una temperatura de 30°C. El flujo del aire fue de 180 l/h esparcido a través del cultivo con una velocidad de agitación de 300 r.p.m. El nitrógeno (con una pureza del 99,95%, Carburos Metálicos, España) se burbujear a una presión constante de 0,15 bares. Las células crecieron bajo flujo de nitrógeno o aire hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5, posteriormente el aire se reemplazó por nitrógeno y viceversa. Las muestras se tomaron a diferentes intervalos de tiempo hasta 2 horas para extraer el ARN. Para el crecimiento en condiciones hipóxicas se suplementó el medio con ergosterol al 0,002%.

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

ESTUDIO DE LOS GENES *KIFBA1* (Fructosa-1,6-Bisfosfato Aldolasa) y *KIND11* (NADH: Ubiquinona Oxidorreductasa) DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*.

Memoria para aspirar al grado de
Doctor en Biología
presentada por

Silvia M^a Díaz Prado

Julio de 2004

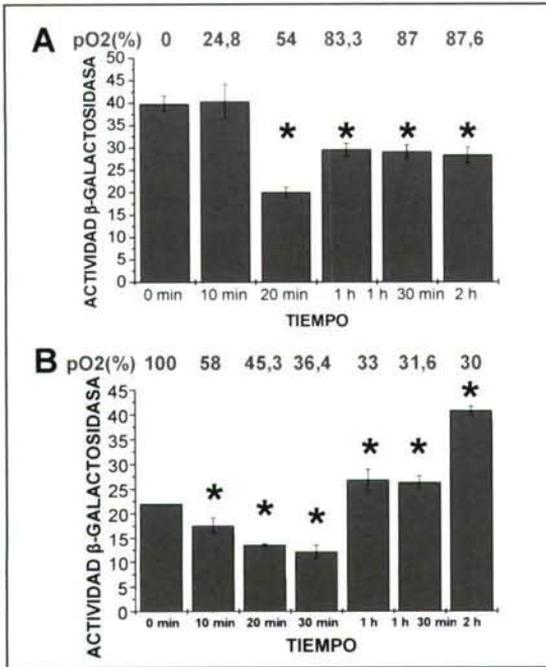


Figura 2.29: Valores de actividad β-galactosidasa (expresados como U.E.) de la levadura MW190-9B de *K. lactis* transformada con la construcción que contiene el promotor del gen *KIFBA1* de 305 pb (PAF5) fusionado al gen *lacZ* de *E. coli*. A: El cultivo se creció en fermentador en medio CM-URA con glucosa al 2% como fuente de carbono y se sometió a un cambio de condiciones hipóxicas a aerobias. B: El cultivo se creció en fermentador en medio CM-URA con glucosa al 2% como fuente de carbono y se sometió a un cambio de condiciones aerobias a hipóxicas. En las gráficas se representan los valores como media±error estándar de 3 muestras. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Los valores de actividad β-galactosidasa del transformante que contiene el promotor entero de 305 pb del gen *KIFBA1* (fusión PAF5) fusionado al gen *lacZ*, medidos en las mismas condiciones pero en medio CM-URA, también mostraron un descenso significativo en la actividad después de 20 minutos de burbujear aire en un cultivo inicialmente hipóxico cuando los niveles de oxígeno disuelto ascendieron desde 0% a 54% o más (figura 2.29.A) y un incremento significativo de la actividad después de burbujear nitrógeno en un cultivo inicialmente aerobio cuando los niveles de oxígeno disuelto descendieron desde el 100% hasta el 30% (figura 2.29.B).

Este comportamiento no se observó para los genes glucolíticos *RAG5* (hexoquinasa), *RAG2* (fosfoglucoasa isomerasa), *GAP1* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *PGK* (fosfoglicerato quinasa) de *K. lactis*. Como se observa en la figura 2.30 existen algunas diferencias significativas de expresión en determinados intervalos de tiempo en los cuatro genes ensayados pero en ningún caso se puede concluir un aumento de actividad en respuesta al cambio de condiciones aeróbicas a hipóxicas como el observado para *KIFBA1*.

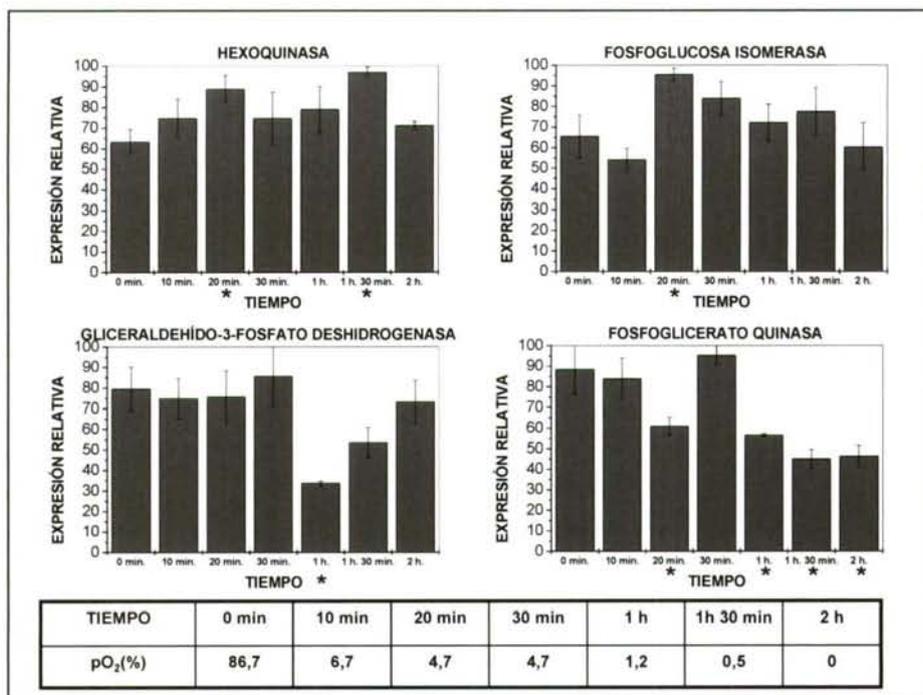


Figura 2.30: Expresión de los genes glucolíticos *RAG5* (hexoquinasa), *RAG2* (fosfoglicosa isomerasa), *GAP1* (Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *PGK* (fosfoglicerato quinasa) en respuesta a un cambio de condiciones aerobias (O₂) a hipóxicas (N₂) de la cepa salvaje Y1140 crecida en una cubeta del fermentador de 2 litros (*Biostat MD; Braun-Biotech*, Alemania) con un volumen de trabajo de 1,5 litros de medio YPD y una temperatura de 30°C. El flujo del aire fue de 180 l/h esparcido a través del cultivo con una velocidad de agitación de 300 r.p.m. El nitrógeno (con una pureza del 99,95%, Carbuos Metálicos, España) se burbujeó a una presión constante de 0,15 bares. Las células se crecieron bajo flujo de aire hasta una A_{600nm}=0,5 posteriormente el aire se reemplazó por nitrógeno. Las muestras se tomaron a diferentes intervalos de tiempo hasta 2 horas para extraer el ARN. En las gráficas se representan los valores relativos de expresión, previamente normalizados como media±error estándar de 3 muestras en *RAG5*, *RAG2*, *GAP* y 2 muestras en *PGK*. La tabla expresa el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo pO₂(%) medido con un electrodo polarográfico. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control.

Por tanto, en resumen, el gen *KIFBA1* es muy probablemente expresado por igual en condiciones aerobias o condiciones hipóxicas a largo plazo pero hay una respuesta transitoria a corto plazo que consiste en un descenso de la expresión cuando incrementan los niveles de oxígeno disuelto y viceversa, es decir, un incremento de la expresión al disminuir los niveles de oxígeno disueltos. La búsqueda de elementos reguladores implicados en este patrón de expresión mostró el consenso TTCATTGTTTC para la unión de Rox1p en la región promotora del gen *KIFBA1*. Rox1p, regula genes que codifican para proteínas que son importantes durante la anaerobiosis (Ter Linde y Steensma, 2002), es un represor transcripcional dependiente de hemo de genes hipóxicos bajo condiciones aerobias (Zitomer y Lowry, 1992) en *S. cerevisiae*. Este

consenso no se encontró en el promotor del gen *FBA1* de *S. cerevisiae*. Para comprobar si el sitio de unión de Rox1p en el promotor de 305 pb del gen *KIFBA1* es funcional, se transformaron dos cepas de *S. cerevisiae* mutantes para el gen *ROX1*, la BY4741 *rox1* (Y05484, *mat a*) y la BY4742 *rox1* (Y15484, *mat a*) procedentes del *Euroscarf* ("*European Saccharomyces cerevisiae archives functional analysis*") y las correspondientes cepas salvajes, con la construcción que contiene el promotor del gen *KIFBA1* de 305 pb fusionado al gen *lacZ* de *E. coli* en pXW2 y con el plásmido sin promotor. Posteriormente se realizaron ensayos de actividad en medio CM-URA con glucosa al 2%. Los resultados obtenidos (figura 2.31) revelaron que no existen diferencias significativas en los niveles de actividad β -galactosidasa entre las cepas salvajes y las mutantes transformadas con la construcción. Esto en principio podría ser atribuido a que el fragmento de promotor disponible sea pequeño y que se necesite más secuencia para la unión de otros factores transcripcionales (pues se sabe que la represión génica dependiente de Rox1 requiere la presencia del complejo represor Tup1/Ssn6, el cual interacciona con otros factores de unión a ADN (Ter Linde y Steensma, 2002; Kwast *et al.*, 2002)), o tal vez sea necesaria la presencia de más sitios de unión para Rox1p. Recientemente se ha tenido acceso a una mayor región promotora (1098 pb) del gen *KIFBA1* (Cedida por Dra. Bolotin-Fukuhara) y se ha podido comprobar que sólo existe un posible sitio de unión a Rox1p que se corresponde con el que previamente se había identificado en la región promotora de 305 pb. Además por el momento todavía en *K. lactis* no se ha clonado ningún homólogo de *ROX1* de *S. cerevisiae* y en la base de datos de *Genoscope* no existe ninguna proteína homóloga entre las liberadas. Por ello creemos poco probable que el sitio Rox1p presente en el promotor de *KIFBA1* sea funcional.

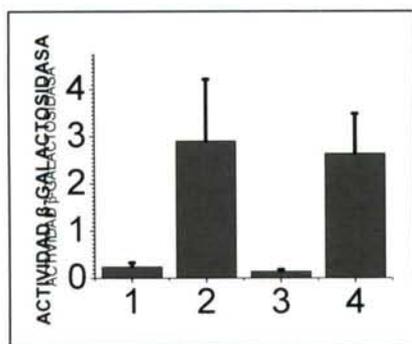


Figura 2.31: Valores de actividad β -galactosidasa (expresados como U.E.) de las cepas salvajes y mutantes para el gen *ROX1* de *S. cerevisiae* transformadas con la construcción que contiene el promotor del gen *KIFBA1* de 305 pb (PAF5) fusionado al gen *lacZ* de *E. coli* y con el vector vacío. 1 y 2 son las cepas salvajes transformadas con el vector vacío y con la construcción respectivamente. 3 y 4 son las cepas mutantes transformadas con el vector vacío y con la construcción respectivamente. Los cultivos crecieron en CM-URA con glucosa al 2%. En la gráfica se representan los valores como media \pm desviación estándar de 6 muestras (2 transformantes independientes) en 1 y 3, 9 muestras (3 transformantes) en 2 y 18 muestras (6 transformantes) en 4.

Para estudiar si esta regulación por oxígeno del gen *KIFBA1* era dependiente de hemo o no, se ensayó su expresión en una cepa hemo-deficiente de *K. lactis* obtenida por interrupción del gen *KIHEM1* (González-Domínguez *et al.*, 1997) en comparación con una cepa de *S. cerevisiae* mutante en el mismo gen y las correspondientes cepas salvajes. El efecto negativo de hemo en la transcripción de *KIFBA1* es evidente, como se deduce de los datos obtenidos del mutante *hem1* crecido a diferentes concentraciones de ALA, en comparación con el gen *FBA1* de *S. cerevisiae* que no es regulado por hemo (figura 2.32). El gen *FBA1* de *S. cerevisiae* no ha sido incluido entre los genes diana de Rox1p en los estudios del transcriptoma global (Becerra *et al.*, 2002b; Ter Linde y Steensma, 2002) y se ha relatado que es expresado por igual en condiciones aerobias y anaerobias en glucosa (Ter Linde *et al.*, 1999) pero inducido anaeróbicamente en galactosa (Kwast *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* no tenemos conocimiento de que se hayan realizado estudios de expresión en las condiciones semiaerobias producidas por cambios en la disponibilidad de oxígeno que suelen ser frecuentes en el medio ambiente natural de la levadura. Sin embargo, se ha postulado que las aldolasas glucolíticas de eucariotas superiores se inducen por hipoxia (Kietzmann *et al.*, 1996; Michiels *et al.*, 2002).

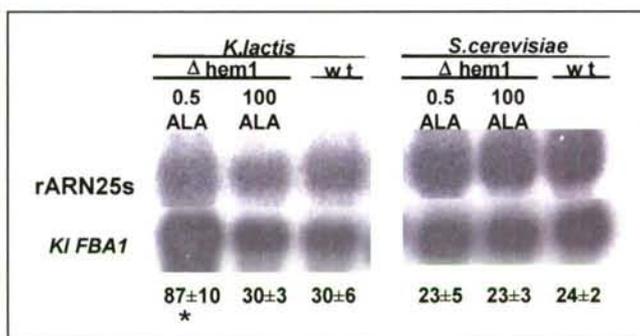


Figura 2.32: Influencia del hemo en la transcripción de *KIFBA1*. El mutante *hem1* se creció en Erlenmeyer hasta una $A_{600nm}=0.6$ en medio CM (sin uracilo, CM-URA, sólo en el caso de *K. lactis*), pero suplementado con ácido 5-aminolevulinico (ALA), a 0,5 μ g ALA/mL o 100 μ g ALA/mL, para reproducir condiciones hemo-deficientes y hemo-suficientes, respectivamente, como se ha descrito previamente (González Domínguez *et al.*, 2000). La cepa wt es la cepa salvaje a partir de la cual se obtuvo el mutante *hem1*, crecida en medio sintético completo CM. Los valores relativos de expresión, previamente normalizados se expresan como media±error estándar de 2 muestras en el caso de *S. cerevisiae* y 4 muestras en el caso de *K. lactis*. rARN25s es el control interno de carga. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con el resto de las condiciones. En *S. cerevisiae* no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias.

En experimentos de PCR en Tiempo Real, también se pudo comprobar que hemo ejerce un efecto negativo en la transcripción del gen *KIFBA1*, que se expresó

entre 1,7 y 3 veces más en condiciones hemo-deficientes que hemo-suficientes (tabla 2.10).

Tabla 2.10: Expresión relativa del gen *KIFBA1* en la cepa salvaje y en un mutante *KLΔhem1* ambos de la levadura *K. lactis* (crecida a diferentes concentraciones de ALA) mediante experimentos de PCR en Tiempo Real. El análisis de los datos se realizó empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Se emplearon dos controles, el gen de la actina y el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *K. lactis*. En la tabla se muestra la media de 8 réplicas, 4 de ellas normalizadas frente al gen de la actina y las otras 4 normalizadas frente al gen GAPDH. Para la amplificación del gen *KIFBA1* se emplearon los cebadores KLALDO-UI y KLALDO-LI (ver tabla M4 de Materiales y Métodos).

Condición ensayada	Expresión relativa
Cepa salvaje (<i>KI</i>) en medio CM	1
Mutante <i>KLΔhem1</i> en medio CM-URA 0,5 ALA	1,68±0,36
Mutante <i>KLΔhem1</i> en medio CM-URA 100 ALA	0,57±0,02

2.6. Producción de fructosa-1,6-bisfosfato a partir de lactosa

Un mercado indiscutible para cualquier derivado obtenido por biotransformación de lactosueros es la industria farmacéutica. En los últimos años han empezado a desarrollarse bioprocesos para la conversión de la glucosa en fructosa-1,6-bisfosfato.

La F-1,6-P₂ desempeña metabólicamente muchas funciones que la hacen utilizable en Farmacología en sus formas salinas de sodio, calcio y bario. Entre las funciones farmacológicas atribuidas a este producto cabe destacar: a.- su papel como inhibidor de la agregación plaquetaria (Cavallini *et al.*, 1992), b.- activador de la capacidad fagocítica del sistema retículo endotelial (Markov *et al.*, 1991), c.- protector frente a la toxicidad causada por la ciclosporina A, habitualmente empleada en tratamientos a enfermos transplantados (Hutcheson *et al.*, 1995, Cardoso *et al.*, 1996), d.- mejora de la contractibilidad miocárdica (Munger *et al.*, 1994), e.- protector hepático (Markov *et al.*, 1991), f.- incrementa la preservación hipodérmica del corazón (Niu *et al.*, 1999), g.- actúa como neuroprotector preservando la concentración de ATP celular y previene incrementos en los niveles de calcio durante la hipoxia (Donohoe *et al.*, 2001; Romsí *et al.*, 2003), h.- atenúa la formación del edema pulmonar inhibiendo la producción de radicales libres de oxígeno (Markov *et al.*, 2002), i.- disminuye los efectos de la isquemia, de hecho, se ha empleado para la conservación de órganos (Ehringer *et al.*, 2002; Sola *et al.*, 2003), j.- actúa como cardioprotector (Riedel *et al.*, 2004) y como antiinflamatorio (Alves *et al.*, 2004).

Tan variadas funciones tienen seguramente su base molecular en el papel de la F-1,6-P₂ en la transmisión de señales (Loguercio *et al.*, 1996; Markov *et al.*, 1991;

Cavallini *et al.*, 1992; Munger *et al.*, 1994; Hutcheson *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 1996; Niu *et al.*, 1999). Además de estas aplicaciones actualmente en desarrollo, podemos encontrar F-1,6-P₂ en preparados comerciales a la venta en farmacias: medicamentos contra vómitos acetonémicos como el SUGARCETON, tónicos y reconstituyentes como el PLEON, o asociaciones antianémicas sin hierro como el HEPATOCOMPLET B12 TRIPLE entre otros.

En este sentido se propuso la utilización de sueros lácteos empleando la levadura *K. lactis* para la obtención de F-1,6-P₂. Las características metabólicas de esta levadura permiten bloquear pasos de la primera parte de la vía glucolítica sin comprometer la viabilidad celular, dado el importante papel que desempeña la vía de las pentosas (Jacoby *et al.*, 1993; González Siso *et al.*, 1996a). De esta forma el bloqueo de la transformación de fructosa-1,6-bisfosfato en triosas, catalizada por la enzima aldolasa, permitiría la acumulación de este producto con grandes aplicaciones farmacológicas.

Con el fin de obtener un mutante para la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa en la levadura *K. lactis*, se desarrollaron tres construcciones que contenían un fragmento del gen *KIFBA1*, interrumpido con el gen marcador URA3 y otra interrumpida con el gen de la canamicina, clonado en el vector comercial pGEM-T-Easy. Dos construcciones consistieron en el fragmento de 787 pb del gen *KIFBA1*, clonado por PCR en el presente trabajo, interrumpido con el marcador URA3 en el sitio de corte para la enzima de restricción *Hind* III sin eliminar ningún nucleótido (dejando una secuencia para la recombinación de 307 pb hacia el extremo 5' y 480 pb hacia el extremo 3'), y en los sitios de corte *Cla* I y *Bgl* II eliminando 202 pb (dejando una secuencia para la recombinación de 93 pb hacia el extremo 5' y 492 pb hacia el extremo 3'). Otra construcción contenía toda la ORF del gen *KIFBA1* interrumpida con el marcador URA3 en los sitios *Bgl* II y *Bal* I eliminando 141 pb (dejando una secuencia de recombinación de 494 pb hacia el extremo 5' y 451 pb hacia el extremo 3'). La última construcción consistió en el fragmento de 787 pb del gen *KIFBA1* interrumpido con el gen de la canamicina en los sitios de corte *Bal* I y *Bgl* II eliminando 141 pb (dejando una secuencia de recombinación de 295 pb hacia el extremo 5' y 351 pb hacia el extremo 3').

Después de varios intentos fallidos de transformación para la obtención del nulo por el método del *One-Step* (Chen *et al.*, 1992b) se pensó que el gen *KIFBA1* podría ser esencial para la levadura *K. lactis* y que por ello no se hubiese obtenido ningún nulo hasta ese momento. Debido a ello, por un lado se construyó una cepa diploide de *K.*

lactis, a partir de las cepas haploides ATCC 32143 W600B y ATCC 32144 WM37, con el fin de interrumpir una sola copia y de este modo solventar el problema. Paralelamente se clonó el gen *KIFBA1* en el vector pUK-S11 y se transformó la levadura MW190-9B para mantener una copia extra del gen dentro de la levadura y poder anular así la copia genómica. A pesar de ello, todos los posibles candidatos a nulo obtenidos fueron falsos positivos.

Una justificación posible a la no obtención del mutante en la aldolasa puede ser debido a que las colas de recombinación en las construcciones eran demasiado pequeñas. Además, ya se ha descrito que *K. lactis*, con relación a la levadura tradicional *S. cerevisiae*, tiene una menor tasa de recombinación dificultando la interrupción de genes por recombinación homóloga (Wesolowski-Louvel *et al.*, 1996, Becerra *et al.*, en prensa). Estos autores postulan la existencia de divergencia entre los genes relacionados con la recombinación en ambas levaduras.

Debido a la imposibilidad de obtener este mutante y, puesto que nuestro objetivo inicial era la producción de F-1,6-P₂ a partir de lactosueros, se ensayó la posibilidad de producir este compuesto a partir de cepas recombinantes de *S. cerevisiae*.

Una de las vías de síntesis industrial de F-1,6-P₂ está basada en la fosforilación enzimática de la glucosa utilizando células de *S. cerevisiae* permeabilizadas como fuente de las enzimas necesarias: hexoquinasa, 6P-glucosa isomerasa y fosfofructoquinasa. Este proceso se ha puesto a punto a escala de laboratorio para la utilización de melazas con un alto contenido en glucosa (Compagno *et al.*, 1992a y 1992b). La levadura *S. cerevisiae* no se puede utilizar directamente para el tratamiento de sueros lácteos porque el principal azúcar presente en los sueros es el disacárido lactosa, y esta levadura carece de la actividad lactasa o β -galactosidasa necesaria para escindirlos en sus monosacáridos componentes glucosa y galactosa. Los mismos autores preocupados en la reutilización de melazas, pensaron que los sueros lácteos eran un buen subproducto utilizable como sustrato para la obtención de F-1,6-P₂ y desarrollaron un sistema utilizando células de *S. cerevisiae* transformadas con el gen β -galactosidasa procedente de la bacteria *E. coli* y permeabilizadas con tolueno a fin de que liberasen la enzima al medio (Compagno *et al.*, 1993a). Estos autores lograron la utilización total de la lactosa, aunque una parte importante se transformaba en etanol. La F-1,6-P₂ procedía fundamentalmente de la glucosa, quedando parte de la galactosa sin transformar.

No sólo para la obtención de F-1,6-P₂, sino también con otros objetivos relacionados con la bioconversión del lactosuero en productos de interés comercial,

varios autores han ensayado la construcción de cepas de *S. cerevisiae* que son capaces de crecer en medios con lactosa (Sreekrishna y Dickson, 1985; Russell, 1986; Vanoni *et al.*, 1989; Jeong *et al.*, 1991; Porro *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1992; Compagno *et al.*, 1993a; Rubio-Teixeira *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 1999a y 1999b; Tahoun *et al.*, 2002). En este sentido, en nuestro laboratorio, Becerra *et al.*, (2001a y 2001b) transformaron diferentes cepas de *S. cerevisiae* con plásmidos que contenían la β -galactosidasa de *K. lactis* fusionada a distintas secuencias señal de secreción. Todas las cepas transformadas resultaron ser capaces de metabolizar la lactosa mostrando diferentes velocidades de crecimiento en medios con este disacárido como fuente de carbono. El grado de utilización de la lactosa se correlacionó con los niveles de secreción de β -galactosidasa, ya que *S. cerevisiae* también carece de la lactosa-permeasa, el transportador del disacárido al interior de la célula, con lo cual la hidrólisis debe tener lugar en el medio de cultivo o en el periplasma, pues al periplasma la lactosa puede entrar por difusión.

La cepa BJ3505/YEpFLAG1-LAC4 mostró los mayores niveles de secreción de β -galactosidasa y de consumo de lactosa, por ello fue la elegida para mejorar sus niveles de secreción obtenidos en permeado de suero de leche, y en consecuencia la utilización de lactosa, en función de las condiciones del cultivo, así como valorar la posible utilización de dicha cepa para producir F-1,6-P₂ a partir de lactosueros, como una vía para el aprovechamiento de este subproducto. La expresión de proteínas a partir del vector YEpFLAG1 utilizado en este trabajo no requiere la adición de inductores, cambio de temperatura o cambio de medio de cultivo. El promotor de la alcohol deshidrogenasa de la levadura (ADH2) se reprime cuando la levadura huésped BJ3505 crece en presencia de glucosa. Las cepas recombinantes consumen lactosa y glucosa al mismo tiempo. De hecho, no existe glucosa en el medio de cultivo y, como la expresión tiene lugar cuando no hay glucosa, el promotor está desreprimido. Los niveles de expresión alcanzados son frecuentemente 10 mg de proteína fusionada a FLAG por litro de cultivo de levadura o mayores. La elección del tiempo óptimo del crecimiento del cultivo y que medio usar para la expresión de proteínas fusionadas a FLAG a partir de la cepa de levadura BJ3505, es una decisión que se debe determinar experimentalmente para cada proteína.

2.6.1. Estudio del efecto de los factores medioambientales sobre la secreción de β -galactosidasa por cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* en permeado de suero de leche

En levaduras, algunas proteínas son fácilmente secretadas, mientras que otras parecen no ser adecuadas para la secreción. En este sentido Rossini *et al.*, (1993) estudiaron los efectos de varios parámetros medioambientales en la secreción heteróloga de la β -galactosidasa de *E. coli*, proteína intracelular y difícilmente secretada mediante la manipulación del gen, por *S. cerevisiae*. Estos autores observaron que una mayor temperatura de crecimiento, la utilización de medios ricos y la presencia de agentes reductores mejoraban la secreción de dicha enzima. En estas condiciones de cultivo, las células en fase estacionaria fueron las que mostraron los mayores niveles de expresión.

Por otra parte, se ha descrito que la producción extracelular de la proteína híbrida β -glucanasa de *Bacillus amyloliquefaciens* por *E. coli* depende de distintas variables, tales como la concentración de sales (NaCl) y el suplemento de oxígeno (Miksch *et al.*, 1997). En cultivos en *Erlenmeyer* el grado de oxigenación puede modificarse en función del volumen del cultivo y la velocidad de agitación (Miksch *et al.*, 1997).

Uno de los objetivos perseguidos en el presente trabajo consiste en la hidrólisis del componente mayoritario del permeado de suero de leche, la lactosa, mediante la enzima β -galactosidasa, la cual es secretada por la cepa BJ3505/YEpFLAG1-LAC4. Es de esperar, que cuanto mayor sea la cantidad de enzima que se libera al medio de cultivo, mayor será la cantidad de lactosa que se hidroliza a glucosa y galactosa. Se realizó un estudio de la influencia de cuatro variables (temperatura, aireación, concentración de NaCl y tiempo de incubación) y sus interacciones sobre la producción extracelular de β -galactosidasa por dicha cepa en permeado de suero de leche suplementado (Becerra *et al.*, 2002a), mediante un diseño experimental consistente en un plan factorial completo, cuyos dominios y criterios de codificación se recogen en la tabla 2.11.

Tabla 2.11: Dominios experimentales de las variables y su codificación para el plan factorial en permeado de suero de leche con cuatro variables.

Valor codificado	Valores naturales			
	Temperatura (T: °C)	Aireación (A: r.p.m./mL)	Concentración (C: % NaCl)	Tiempo (t: horas)
-1	23	100/50 = 2	0	30
0	30	200/50 = 4	1	51
+1	37	300/50 = 6	2	72

Los valores de actividad β -galactosidasa extracelular determinados en el medio de cultivo se recogen en la tabla 2.12. En la tabla 2.13 se muestra el análisis de la varianza para la respuesta (actividad β -galactosidasa extracelular) en donde ya se han eliminando los coeficientes no significativos.

Matriz experimental				A.E. ($\mu\text{mol}/\text{min.mL}$)
T	A	C	t	
1	-1	-1	-1	0
1	-1	1	1	0,6
-1	-1	1	-1	0
1	1	1	1	0
1	1	-1	-1	0
0	0	0	0	1,8
1	-1	1	-1	0
-1	-1	-1	1	8,44
-1	-1	1	1	2,07
1	-1	-1	1	0,6
1	1	-1	1	2,37
0	0	0	0	1,8
-1	1	1	-1	0,28
0	0	0	0	1,33
-1	1	-1	-1	0,01
-1	1	1	1	1,04
1	1	1	-1	0
-1	-1	-1	-1	0,21
0	0	0	0	1,55
-1	1	-1	1	2,81

Tabla 2.12: Resultados del plan factorial en permeado de suero de leche con cuatro variables. Se muestra la matriz experimental y los valores de actividad β -galactosidasa extracelular observados, de acuerdo con el dominio experimental de la tabla 2.11.

Tabla 2.13: Análisis de la varianza para la respuesta (actividad β -galactosidasa extracelular) del plan factorial en permeado de suero de leche con cuatro variables, de acuerdo con el dominio experimental de la tabla 2.11, y eliminando los coeficientes no significativos.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _{calculada}	Valor P
T: Temperatura	7,96651	1	7,96651	155,39	0,0011
A: Aire	1,82926	1	1,82926	35,68	0,0094
C: NaCl	6,82516	1	6,82516	133,13	0,0014
t: Tiempo	18,9878	1	18,9878	370,37	0,0003
TA	3,75391	1	3,75391	73,22	0,0034
TC	2,03776	1	2,03776	39,75	0,0081
Tt	6,61776	1	6,61776	129,08	0,0015
At	1,93906	1	1,93906	37,82	0,0086
Ct	6,98281	1	6,98281	136,21	0,0014
TAC	3,46891	1	3,46891	67,66	0,0038
TAt	3,91051	1	3,91051	76,28	0,0032
TCt	2,12431	1	2,12431	41,44	0,0076
TACt	2,63251	1	2,63251	51,35	0,0056
Falta ajuste	1,35166	3	0,450555	8,79	0,0537
Error puro	0,1538	3	0,0512667		
Total	70,5817	19			

$R^2=97,8671$ %; R^2 ajustado= $93,2457$ %; Error estándar estimado= $0,50091$; Error absoluto medio= $0,22385$; Estadístico Durbin-Watson= $2,43428$.

El sistema es susceptible de definirse mediante la siguiente ecuación, en donde todas las variables individuales y las interacciones temperatura-aire, temperatura-concentración de NaCl, temperatura-tiempo, aire-tiempo, concentración de NaCl-tiempo, temperatura-aire-concentración de NaCl, temperatura-aire-tiempo, temperatura-concentración de NaCl-tiempo y temperatura-aire-concentración de NaCl-tiempo presentaron influencia significativa en la respuesta:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = 1,2455 - 0,705625.T - 0,338125.A - 0,653125.C + 1,08937.t + 0,484375.T.A + 0,356875.T.C - 0,643125.T.t - 0,348125.A.t - 0,660625.C.t - 0,465625.T.A.C + 0,494375.T.A.t + 0,364375.T.C.t - 0,405625.T.A.C.t$$

Algunas de las superficies de respuesta más ilustrativas correspondientes a la ecuación obtenida están representadas en la figura 2.33.

Como se puede observar en la figura 2.33, la respuesta aumenta en el dominio experimental cuando el tiempo de incubación se incrementa (coeficiente positivo) y la temperatura, aireación y concentración de NaCl se reducen (coeficientes negativos). El efecto del tiempo de cultivo es mayor cuando la temperatura, aireación y concentración

de NaCl son bajas. Del mismo modo, a los menores tiempos de cultivo ensayados no se observa influencia sobre la secreción por las otras variables analizadas.

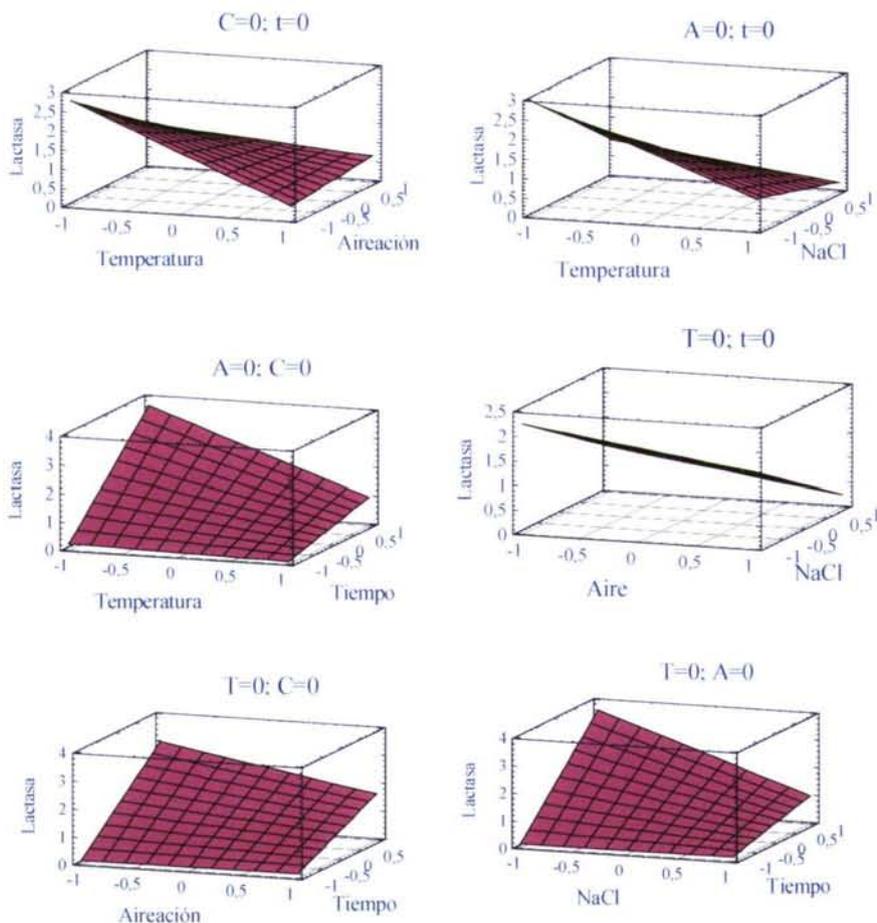


Figura 2.33: Superficies de respuesta obtenidas en los cultivos en permeado de suero de leche realizados de acuerdo con el plan experimental con cuatro variables definido en la tabla 2.12. La respuesta lactasa es la actividad β -galactosidasa extracelular. Los valores y nomenclatura de las variables pueden verse en la tabla 2.11.

2.6.2. Estudio de la producción de fructosa-1,6-bisfosfato por cepas de *S. cerevisiae* recombinantes a partir de lactosa

El siguiente objetivo del presente trabajo consiste en analizar la posibilidad de producir fructosa-1,6-bisfosfato a partir de lactosueros por la cepa recombinante de *S. cerevisiae* BJ3505/YEpFLAG1-LAC4 (Becerra *et al.*, 2002a). En las mejores condiciones determinadas según el plan factorial ($T=23^{\circ}\text{C}$, $A=200$ r.p.m., $t=72\text{h}$. y

NaCl=0%) se realizaron tres cultivos de dicha cepa y tres cultivos de una cepa silvestre de *K. lactis* NRRL-Y1140 (utilizada como control dado que es capaz de metabolizar la lactosa) en permeado de suero de leche. Una vez crecidas las células y antes de introducirlas en el medio de bioconversión para la posterior producción de la fructosa-1,6-bisfosfato, se determinó que la actividad β -galactosidasa intracelular de la cepa recombinante era de 888 U.E./mL. Esta actividad resulta no sólo de la enzima que ha sido secretada (y que permanece retenida en el periplasma) sino también de la enzima citoplasmática. La levadura puede crecer en lactosa gracias a que secreta parte de la enzima al medio de cultivo. A su vez, la parte de esta enzima que queda dentro de la levadura permite que una vez que las células se introduzcan en el medio de bioconversión se pueda producir la fructosa-1,6-bisfosfato. Cada cultivo con la misma cepa difirió en el tratamiento que recibieron las células para permeabilizarlas. En el primer cultivo las células se permeabilizaron por adición de tolueno al 10%, en el segundo por adición de etanol al 70% (0,4 mL/mg biomasa) y en el tercero las células no se permeabilizaron. Se tomaron muestras de cada uno de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo para posteriormente determinar el consumo de lactosa y la producción de etanol, glucosa, galactosa y fructosa-1,6-bisfosfato.

La permeabilización con tolueno libera la enzima al medio. Un problema de la utilización de células permeabilizadas con tolueno es que una parte de la fuente de carbono se transforma en etanol, lo que ha sido comprobado con glucosa, lactosa y sacarosa (Compagno *et al.*, 1992a, 1992b y 1993a). Esto se trató de evitar en este trabajo permeabilizando las células con etanol, pues se ha demostrado que las células de *Kluyveromyces lactis* así permeabilizadas hidrolizan la lactosa a glucosa y galactosa sin fermentar los monosacáridos a etanol (Siso *et al.*, 1992; Siso & Doval, 1994).

En la figura 2.34 se representan los resultados obtenidos con la cepa silvestre de *K. lactis* NRRL-Y1140. En esta figura se observa que la producción de fructosa-1,6-bisfosfato es 2 veces mayor en las células permeabilizadas con tolueno que en las permeabilizadas con etanol. Aún así, las células permeabilizadas con etanol producen 7 veces más fructosa-1,6-bisfosfato que las células sin permeabilizar. Las células permeabilizadas con etanol produjeron menores concentraciones de etanol y mayores concentraciones de galactosa y glucosa que en los otros dos casos, lo que corrobora los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Siso *et al.*, 1992; Siso & Doval, 1994). Sin embargo, los rendimientos de producción de fructosa-1,6-bisfosfato

en base a la lactosa consumida, calculados en el momento de máxima concentración de fructosa-1,6-bisfosfato, oscilaron entre el 6-8% para las levaduras permeabilizadas con etanol y sin permeabilizar, alcanzando el 40% en el caso de las levaduras permeabilizadas con tolueno.

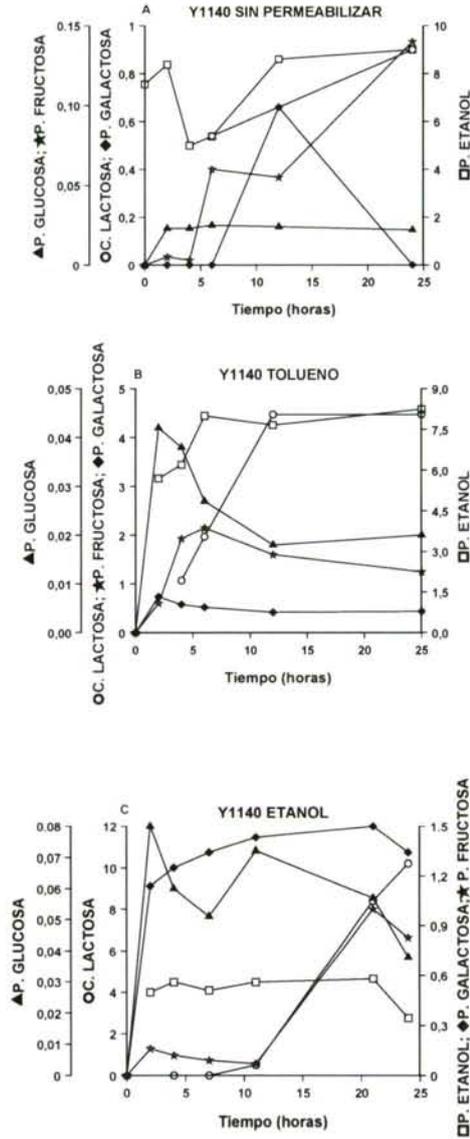


Figura 2.34: Consumo de lactosa y producción de glucosa, galactosa, etanol y fructosa-1,6-bisfosfato (g/L) por la cepa silvestre de *K. lactis* Y1140. (A) células sin permeabilizar, (B) células permeabilizadas con tolueno y (C) células permeabilizadas con etanol.

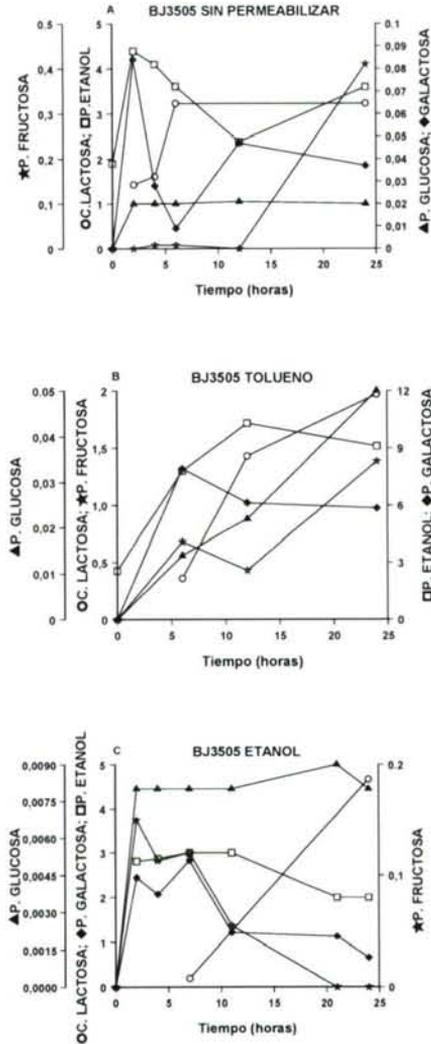


Figura 2.35: Consumo de lactosa y producción de glucosa, galactosa, etanol y fructosa-1,6-bisfosfato (g/L) por la cepa recombinante de *S. cerevisiae* BJ3505/YEpFLAG1-LAC4. (A) células sin permeabilizar, (B) células permeabilizadas con tolueno y (C) células permeabilizadas con etanol.

En el caso de la cepa recombinante de *S.cerevisiae* BJ3505/YEpFLAG1-LAC4 (figura 2.35), las células permeabilizadas con tolueno, al igual que ocurrió con la cepa silvestre de *K. lactis* Y1140, fueron las que produjeron una mayor concentración de fructosa-1,6-bisfosfato. Las células permeabilizadas con etanol rindieron menores concentraciones de etanol que las células permeabilizadas con tolueno y las células sin

permeabilizar, pero también los rendimientos en producción de fructosa-1,6-bisfosfato en base a la lactosa consumida fueron menores, no alcanzando el 2%, frente al 6% conseguido con las células sin permeabilizar y el 35% con las células permeabilizadas con tolueno. Compagno *et al.* (1993a) lograron, optimizando las condiciones de la bioconversión, un 54% de transformación de lactosa en fructosa-1,6-bisfosfato con otra cepa recombinante de *S.cerevisiae*. Este rendimiento fue inferior al conseguido con cepas silvestres de la misma levadura en glucosa o melazas (Compagno *et al.*, 1992a y 1992b).

Comparando ambas cepas, Y1140 y BJ3505/YEpFLAG1-LAC4 sin permeabilizar, se observó que a las 24 horas de cultivo era cuando más cantidad de fructosa-1,6-bisfosfato existía en el medio, siendo la concentración de este azúcar mayor en las células recombinantes de *S.cerevisiae* que en la cepa silvestre Y1140. Este resultado es de relevancia, ya que a partir de una cepa que no es capaz, en principio, de crecer en medios con lactosa se ha obtenido casi 3 veces más fructosa-1,6-bisfosfato que con una cepa silvestre que sí es capaz de crecer naturalmente en presencia de lactosa. Este hecho puede explicarse en base a que la cepa recombinante secreta parte de la β -galactosidasa al medio de cultivo, con lo cual la hidrólisis de la lactosa es más rápida que en el caso de la cepa silvestre de *K.lactis* cuya enzima es intracelular debiendo ser transportada la lactosa al interior de la célula para su hidrólisis.

En base a los resultados expuestos, la cepa recombinante de *S. cerevisiae* construida en nuestro laboratorio y permeabilizada con tolueno, podría utilizarse para la bioconversión de la lactosa de lactosueros en fructosa-1,6-bisfosfato, obteniéndose $0,06 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de fructosa-1,6-bisfosfato frente a $0,36 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ obtenidos en la cepa salvaje de *K. lactis*, si bien es necesario optimizar las condiciones a fin de mejorar los rendimientos.

3. ESTUDIO DEL GEN *NDI1* DE *Kluyveromyces lactis*

3.1. Clonación y secuenciación del gen *NDI1* de *Kluyveromyces lactis*

En este trabajo se planteó la clonación del gen que codifica para la NADH deshidrogenasa interna de la cadena respiratoria mitocondrial de *K. lactis* con tres objetivos: i) explicar las bases moleculares de la elevada capacidad respiratoria de la levadura *K. lactis* frente a la levadura *S. cerevisiae*; ii) la conexión existente entre los elevados niveles de actividad de la ruta de las pentosas fosfato y la necesaria actividad de la cadena respiratoria; iii) para poder aportar nuevos datos que permitan explicar mecanismos alternativos para la reoxidación mitocondrial de los coenzimas.

La clonación de la deshidrogenasa mitocondrial interna de *K. lactis* se abordó mediante tres estrategias diferentes. En un principio, cuando se comenzó este trabajo y mientras se realizaban las dos primeras estrategias de clonación de este gen, no se disponía de información del proyecto *Genoscope* de secuenciación al azar del genoma de la levadura *K. lactis*, por lo que no se conocía ningún fragmento de la secuencia de este gen.

En una primera aproximación, se intentó clonar el gen *KINDI1* a partir de una genoteca de *K. lactis* mediante experimentos de complementación de dos cepas de la levadura *S. cerevisiae* mutantes para el gen *ScNDI1*. Estas cepas procedentes del *Euroscarf* ("*European Saccharomyces cerevisiae archives functional analysis*"), denominadas *BY4741ndi1* (Y06521, *mat a*) y *BY4742ndi1* (Y16521, *mat a*), tienen la *ORF YML120c* que codifica para la deshidrogenasa mitocondrial interna 1 de *S. cerevisiae* reemplazada por el casete *kanMX4*. Estas cepas mutantes presentan un crecimiento deficiente en lactato como fuente de carbono (Small y McAlister-Henn, 1998).

Las genotecas de *K. lactis* empleadas fueron las basadas en los vectores *YEplac195* y *pAB24*. Como paso previo, se transformaron las levaduras mutantes con ADN plasmídico de los vectores *YEplac195* y *pAB24* (ambos portadores del marcador auxotrófico *URA3*) y se sembraron en placas CM-URA con lactato como fuente de carbono. Esta transformación sirvió para asegurarse de que los vectores por sí solos son incapaces de complementar la falta de crecimiento en lactato de los mutantes, concluyendo que estos mutantes son aptos para su uso en experimentos de

complementación. Posteriormente se transformaron los dos mutantes con las dos genotecas de *K. lactis*.

Los transformantes se crecieron en placas CM-URA lactato y, de todos los transformantes que crecieron en lactato, se hizo una extracción de ADN plasmídico de levadura que a su vez se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* competentes con el fin de poder amplificar este ADN plasmídico. Los transformantes bacterianos se analizaron por análisis de restricción (para averiguar los tamaños de los insertos) resultando ser todos iguales. Como última comprobación, se re-transformaron los mutantes y, además, también se realizaron estudios de eliminación plasmídica para asegurarse de que la capacidad de crecimiento en lactato era conferida por el plásmido. De entre todos los clones obtenidos, se eligió el Y1G1C3, resultante de transformar el mutante BY4742*ndi1* (Y16521, *mat α*) con la genoteca de *K. lactis* basada en el vector YEplac195. A partir de los análisis de restricción realizados, se pudo elaborar un mapa de restricción bastante aproximado del clon seleccionado que se muestra en la figura 3.1.

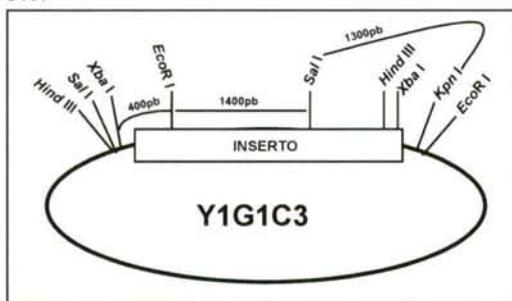


Figura 3.1: Mapa de restricción del candidato Y1G1C3 que complementa la falta de crecimiento en lactato del mutante *ScNDI1::kanMX4*. Los tamaños son aproximados.

Se calculó que el tamaño del inserto era de aproximadamente 3.100 pb. Se procedió a la secuenciación del inserto del clon utilizando la técnica del *DNA-walking* y para ello se diseñaron una serie de cebadores con el programa informático OLIGO que son los que se recogen en la tabla 3.1.

CEBADORES	SECUENCIA
<i>REVERSE</i>	5' CAGGAAACAGCTATGAC3'
Y1G1C3-RI	5' TGGATATAGACATTCCAGACGACTCAA3'
Y1G1C3RR	5' CAGCTCAAATTCAGGAAGTAGAAG3'
Y1G1C3RRR	5' GCACATGAAAAAGATAGGGAAAGGAG3'
Y1G1C3-UI	5' CGTACTTTTAGCAATGACGATCAGAAT3'
Y1G1C3UI	5' GCAGCAGCTATCTATATGGCACTC3'
UNIVERSAL	5' CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT3'

Tabla 3.1: Secuencias de los cebadores empleados para la secuenciación del clon Y1G1C3.

Una vez finalizada la secuenciación y traducida la secuencia a proteína, se realizó una búsqueda de homología con el programa informático *BlastX* en la base de datos *EMBL*, obteniéndose un 89% de identidad y un 94% de positivos con el gen que codifica para el factor de inicio de la transcripción (*TFIIB*) de la levadura *S. cerevisiae*, un 92% de identidad y un 92% de positivos con el gen que codifica para el factor de inicio de la transcripción (*TFIIB*) de la levadura *K. lactis*. Además, este inserto contenía otro gen que presentó un 44% de identidad y un 55% de positivos con el gen que codifica para una nucleósido difosfatasa (*Ynd1p*) de la levadura *S. cerevisiae* y un 38% de identidad y un 53% de positivos con el gen que codifica para una nucleósido fosfatasa de la levadura *S. pombe*.

Posteriormente se emplearon los cebadores de la tabla 3.1 para comprobar mediante técnicas de *PCR* que los otros clones obtenidos a partir de las genotecas de *K. lactis* basadas en los vectores *YEplac195* y *pAB24* contenían la misma secuencia. Estos resultados pusieron de manifiesto que transformando por complementación dos mutantes distintos para el gen *ScNDI1* (*mat a* y *mat α*) con dos genotecas diferentes (basadas en los vectores *YEplac195* y *pAB24*) y en diferentes ocasiones, siempre se obtiene que los genes de *K. lactis* homólogos a *ScYND1* y *ScTFIIB* complementan reiteradamente la falta de crecimiento en lactato de los mutantes *ndi1* de *S. cerevisiae*. Nuestra hipótesis para explicar el hecho de que se clonase el gen *KITFIIB* mediante complementación del fenotipo de ausencia de crecimiento en lactato del mutante en el gen *ScNDI1*, consiste en que la sobre expresión de *KITFIIB* permitió la unión y la activación de *Adr1p* y por tanto la activación de genes, regulados a su vez por este activador transcripcional, relacionados con el metabolismo del lactato como son *JEN1* y *CYB2*. *JEN1* es una permeasa encargada de transportar el lactato al interior celular (Bojunga y Entian, 1999; Alberti *et al.*, 2000) y *CYB2* es la L-lactato ferricitocromo c oxidorreductasa que cataliza la oxidación del L-lactato (Young *et al.*, 2003).

En la levadura *S. cerevisiae*, el activador transcripcional *Adr1p* es necesario para la expresión del gen *ADH2* (alcohol deshidrogenasa 2) bajo condiciones no fermentativas (Chiang *et al.*, 1996). También regula genes necesarios para el metabolismo del etanol, el metabolismo del glicerol, el funcionamiento y biogénesis del peroxisoma (Chiang *et al.*, 1996; Young *et al.*, 2003). *Adr1p* es una proteína de unión a ADN. La presencia de cuatro *TADs* (dominios de activación de la transcripción) sugiere que *Adr1p* puede establecer múltiples contactos proteicos con cofactores transcripcionales y/o con componentes transcripcionales del núcleo (Chiang *et al.*,

1996). Estudios genéticos han implicado a varios factores generales de la transcripción como posibles mediadores de la función activadora *Adr1p*. Chiang *et al.* (1996) demostraron que TFIIB podía unirse a los *TADs* I y IV a partir de su región C-terminal.

Más tarde, al aplicar la técnica de la *DCbyPCR* se pudo comprobar además que el gen *KINDII* no estaba representado en las genotecas empleadas en los ensayos de complementación y que por tanto resultaba inviable clonarlo a partir de ellas.

Como una segunda aproximación a la clonación de la deshidrogenasa mitocondrial interna de la levadura *K. lactis*, se procedió a la creación de cepas de *S. cerevisiae* dobles mutantes para la deshidrogenasa mitocondrial externa 1 y la deshidrogenasa mitocondrial interna 1 y también para la deshidrogenasa mitocondrial externa 2 y la deshidrogenasa mitocondrial interna 1, con el fin de poder encontrar algún fenotipo asociado a estos dobles mutantes que nos permitiese clonar por complementación la deshidrogenasa mitocondrial interna de *K. lactis*. En este sentido, para la creación de los dobles nulos, se emplearon cuatro cepas mutantes para la deshidrogenasa mitocondrial externa 1 y para la deshidrogenasa mitocondrial externa 2 de la levadura *S. cerevisiae* que son las que se recogen en la tabla 3.2.

CEPA	GENOTIPO	FUENTE
BY4741 <i>nde1</i> (Y00726)	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>YMR145c::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4742 <i>nde1</i> (Y10726)	<i>MATα</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>YMR145c::kanMX4</i>	Euroscarf
FLPZ013-07B(A) (FY <i>nde2</i>), (10194A)	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>HIS3</i> , <i>leu2Δ1</i> , <i>LYS2</i> , <i>trp1Δ63</i> , <i>YDL085w(4, 1635)::kanMX4</i>	Euroscarf
FLPZ014-04D(AL) (FY <i>nde2</i>), (10194B)	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>LEU2</i> , <i>LYS2</i> , <i>TRP1</i> , <i>YDL085w(4, 1635)::kanMX4</i>	Euroscarf

Tabla 3.2: Genotipo y procedencia de las cepas empleadas para la creación de dobles mutantes para la deshidrogenasa mitocondrial externa 1 y la deshidrogenasa mitocondrial interna 1 y también para la deshidrogenasa mitocondrial externa 2 y la deshidrogenasa mitocondrial interna 1 de la levadura *S. cerevisiae*.

Como paso previo a la transformación para la obtención de los dobles mutantes, se diseñó una construcción que contenía el gen *ScNDII* de la levadura *S. cerevisiae* interrumpido. Para ello, empleando los cebadores SCNDIIF y SCNDIIR (tabla M4 Materiales y Métodos) y ADN genómico de la levadura *S. cerevisiae* como ADN molde, se amplificó por técnicas de *PCR* un fragmento de 1609 pb que se corresponde con toda la *ORF YML120c* del gen *ScNDII*. Este fragmento se clonó en el vector comercial pGEM-T-Easy, el cual se analizó por digestión con endonucleasas de

restricción y mediante secuenciación. A continuación, se digirió esta construcción con la endonucleasa de restricción *Hind* III que corta una única vez dentro de la *ORF* del gen *ScNDII* y se interrumpió con el gen marcador *URA3* obtenido tras la digirir el vector YEp24 también con la enzima *Hind* III (figura 3.2). Esta construcción, así interrumpida con el marcador auxotrófico *URA3*, se usó como molde en reacciones de *PCR* con los cebadores SCNDII F y SCNDII R, el fragmento amplificado de 2775 pb se usó para transformar las cepas mutantes de la tabla 3.2, con el fin de obtener los dobles nulos.

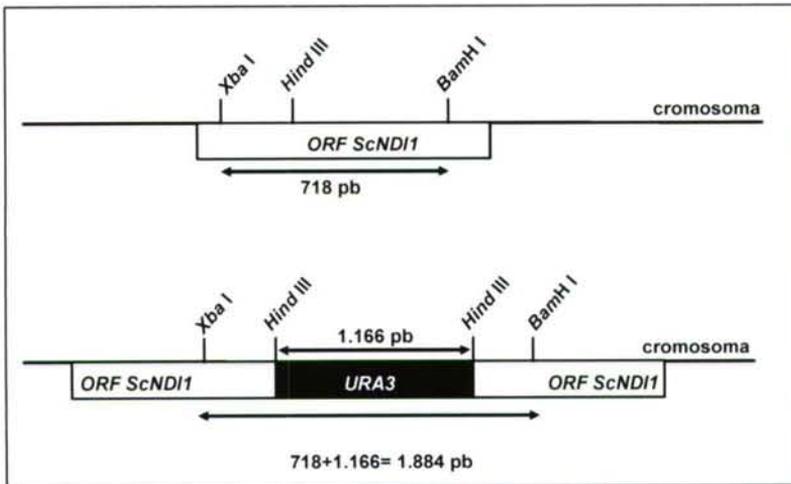


Figura 3.2: Esquema explicativo de cómo se realizó la interrupción de la copia genómica del gen *ScNDII* en las diferentes cepas mutantes sencillas.

Las levaduras transformantes se sembraron en placas CM-URA glucosa, obteniendo transformantes con las cepas BY4742 *nde1* (Y10726, *mat a*) y FL PZ013-07B(A) (FY *nde2*, 10194 A, *mat a*). En ambos casos se obtuvieron candidatos buenos que eran dobles mutantes en los genes *ScNDE1* y *ScNDII* y en los genes *ScNDE2* y *ScNDII*, que fueron analizados no sólo por técnicas de *PCR* sino también por técnicas de *Southern* y *Northern blot*.

En los análisis de *PCR* usando los cebadores SCNDII F y SCNDII R y ADN genómico de los dobles mutantes y de los mutantes sencillos, se comprobó que con los mutantes dobles se obtenía una banda de 2.775 pb (1.609 pb del gen *ScNDII* + 1.166 pb del gen *URA3* = 2.775 pb) y con los mutantes sencillos una banda de 1.609 pb correspondiente a la *ORF* del gen *ScNDII*. Además, los candidatos a dobles mutantes en los genes *ScNDE1* y *ScNDII*, y en los genes *ScNDE2* y *ScNDII* se comprobaron sembrándolos en placas CM-URA lactato, pues como se ha mencionado anteriormente,

el mutante sencillo en la deshidrogenasa mitocondrial interna 1 de *S. cerevisiae* presenta un crecimiento defectivo en lactato como fuente de carbono (Small y McAlister-Henn, 1998). Como se observa en la figura 3.3, los tres candidatos a dobles nulos *ScNDE1* y *ScNDII* chequeados no crecieron en lactato por lo que se analizaron posteriormente por técnicas de *Southern* y *Northern blot*. Estos mismos resultados fueron obtenidos para el caso del doble mutante *ScNDE2* y *ScNDII*.

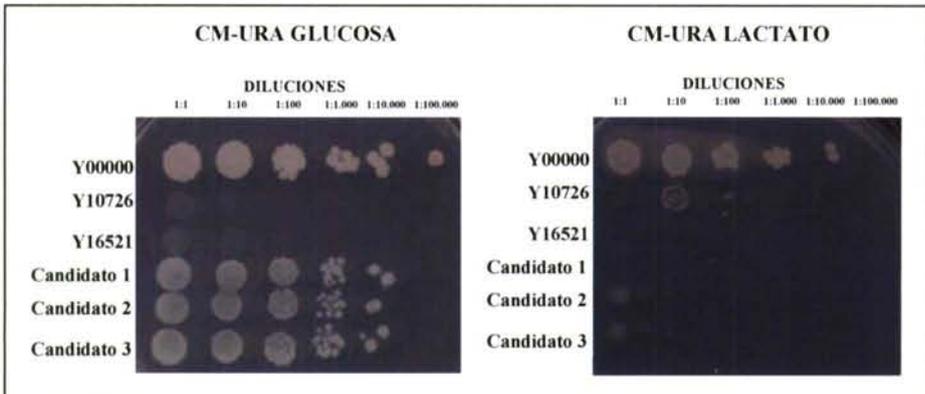


Figura 3.3: Resiembra en placas CM-URA, con glucosa y con lactato como fuente de carbono, de los candidatos a dobles mutantes en los genes *ScNDE1* y *ScNDII*. Y00000 es la cepa parental de Y10726 e Y16521. Y10726 es la cepa mutante para el gen *ScNDE1* e Y16521 es la cepa mutante para el gen *ScNDII*. Los tres candidatos a doble mutante se obtuvieron transformando la cepa Y10726 con la construcción lineal *ScNDII::URA3*. Resultados similares fueron obtenidos con el otro doble mutante *ScNDE2* y *ScNDII*.

Para realizar los experimentos de *Southern blot*, se dirigió el ADN genómico de los candidatos a dobles nulos y el de la cepa mutante sencilla correspondiente con las endonucleasas de restricción *BamH I* y *Xba I* pues ambas cortan dentro de la *ORF* del gen *ScNDII* como se muestra en la figura 3.2. A su vez la enzima *Hind III*, enzima empleada para la interrupción del gen con el marcador *URA3*, corta en el medio de ambas permitiendo reconocer la correcta interrupción de la copia genómica. En este sentido, los candidatos a dobles nulos, después de hibridar el *blot* con una sonda del gen *ScNDII* marcada con digoxigenina, mostraban una banda de 1.884 pb que desaparecía en el mutante sencillo para dar una banda de 718 pb (figura 3.4).

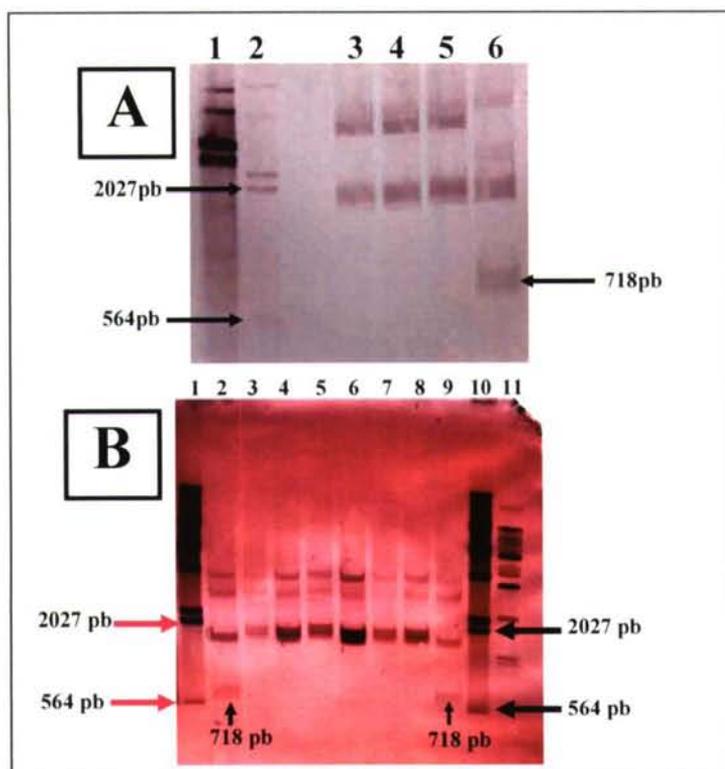


Figura 3.4: Southern blot de los dobles mutantes *ScNDE1::kanMX4*, *ScNDII::URA3* (A) y *ScNDE2::kanMX4*, *ScNDII::URA3* (B) hibridados con una sonda de 1.609 pb correspondiente a la ORF del gen *NDII* de la levadura *S. cerevisiae*. La sonda se marcó empleando los reactivos suministrados con el *kit Dig DNA Labeling and Detection* (Roche). En la parte A, 1 es un control positivo de la hibridación (ADN plasmídico de la construcción pGEM-T-Easy-*ScNDII::URA3* empleada para la interrupción), 2 es un marcador II de pesos moleculares marcado con digoxigenina de Roche, del 3 al 5 son ADNs genómicos de los candidatos a dobles mutantes *ScNDE1::kanMX4*, *ScNDII::URA3* digeridos con las endonucleasas de restricción *BamH I* y *Hind III* y 6 es ADN genómico de la cepa BY4742 *nde1*(Y10726) mutante sencillo para el gen *ScNDE1::kanMX4* digerida también con las endonucleasas de restricción *BamH I* y *Hind III*. En la parte B, 1 y 10 son el marcador II de pesos moleculares y 11 es el marcador XVII de pesos moleculares ambos marcados con digoxigenina de Roche, 2 y 9 son ADNs genómicos de la cepa FLPZ013-07B(A) *nde2* (10194A) mutante sencillo para el gen *ScNDE2::kanMX4* digeridos con las endonucleasas de restricción *BamH I* y *Hind III* y del 3 al 8 son ADNs genómicos de los candidatos a dobles mutantes *ScNDE2::kanMX4*, *ScNDII::URA3* digeridos con las mismas endonucleasas de restricción.

Para realizar los experimentos de *Northern blot*, se extrajo ARN de los candidatos a dobles nulos y de las cepas mutantes sencillas correspondientes. El *blot* se hibridó con una sonda correspondiente al gen *ScNDII* marcada radiactivamente y con una sonda correspondiente a un fragmento del gen que codifica para el rARN 25S de la levadura *S. cerevisiae* con el fin de rectificar la pequeña heterogeneidad resultante de defectos de carga del ARN entre los diferentes pocillos del gel. En la figura 3.5 se aprecia que los candidatos a dobles nulos (*NDE2::kanMX4*, *NDII::URA3*) muestran un

transcrito pero de menor tamaño que en el mutante sencillo. El hecho de que el transcrito no desaparezca sino que tenga un menor tamaño es debido a que se ha interrumpido el gen *ScNDII* en lugar de reemplazar totalmente su *ORF*. Este transcrito pequeño puede que de lugar a una proteína pero truncada y no funcional ya que las cepas no crecen en lactato. Estos mismos resultados fueron obtenidos para el caso del doble mutante *NDE1::kanMX4, NDII::URA3*.

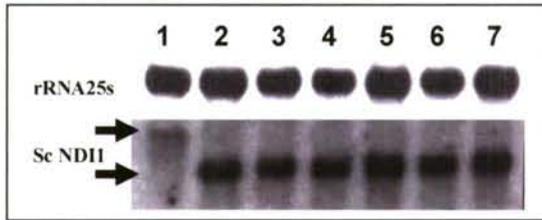


Figura 3.5: Northern blot radiativo, hibridado con una sonda de 1609 pb correspondientes a la *ORF* del gen *ScNDII* de la levadura *S. cerevisiae*. La sonda se marcó empleando los reactivos suministrados por el kit *Prime-a-Gene Labeling System* (Promega). 1 es el ARN total de la cepa de *S. cerevisiae* mutante a10194A (*NDE2::kanMX4*), que en este caso se empleó como control. Del 2 al 7 son el ARN total de diferentes candidatos a dobles nulos en *S. cerevisiae* (*NDE2::kanMX4, NDII::URA3*). rARN25s representa el control interno de carga. Resultados similares fueron obtenidos con el otro doble mutante *NDE1::kanMX4, NDII::URA3*.

Posteriormente, una vez obtenidos y analizados los dobles mutantes, se sembraron en distintas fuentes de carbono para ver si mostraban algún fenotipo que estuviese asociado a la doble interrupción. El doble mutante *ScNDE1::kanMX4, ScNDII::URA3*, al igual que el doble mutante *ScNDE2::kanMX4, ScNDII::URA3*, mostró un fenotipo claro que consistió en la ausencia de crecimiento en lactato (figura 3.3). Este fenotipo es conferido por la interrupción *ScNDII::URA3*. Los dobles mutantes se sembraron en otras fuentes de carbono sin observar diferencias de crecimiento en las distintas fuentes de carbono entre el mutante sencillo *ndi* y los dobles mutantes (figura 3.6). Estos mutantes no se utilizaron para clonar el gen *KINDII* pues no mostraron ningún fenotipo asociado fácil de complementar pero se emplearán en un futuro para realizar estudios fisiológicos.

En Enero del año 2001 al liberarse las secuencias del proyecto *Genoscope* de secuenciación al azar (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000) se encontró un *RST* “*Random Sequenced Tag*” de *K. lactis* (Número de Acceso: AL427909) que presentaba una gran similitud con la *NDII* de la levadura *S. cerevisiae* (*YML120c*) (figura 3.7).

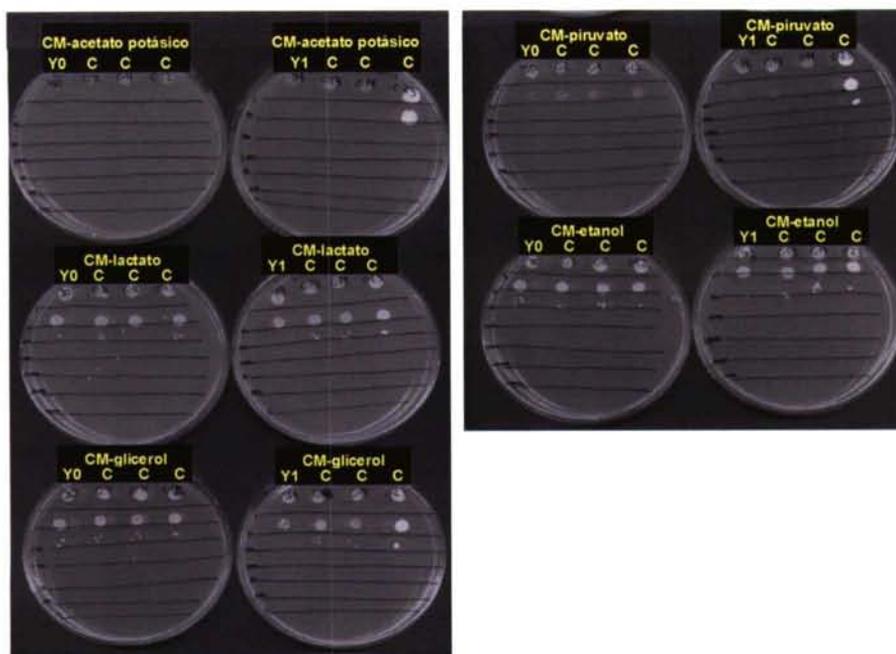


Figura 3.6: Crecimiento en placas CM con diferentes fuentes de carbono de seis candidatos dobles mutantes para los genes *ScNDE2::kanMX4*, *ScNDII::URA3*. Y0 es la cepa (Y00000) parental de los mutantes sencillos Y00726 e Y06521. Y1 es la cepa (Y10000) parental de los mutantes sencillos Y10726 e Y16521 (tabla M2 Materiales y Métodos). C representa los diferentes candidatos dobles nulos. En la fotografía se muestran, de arriba a abajo y dentro de una misma placa petri, las diferentes diluciones seriadas de los cultivos. Resultados similares fueron obtenidos con el otro doble mutante *ScNDE1::kanMX4*, *ScNDII::URA3*.

Tras realizar una búsqueda de homología con el programa informático *tBlastX* que aparece en la página de internet del *NCBI* se encontró que este *RST*, traducido a proteína, presentaba un 74% de identidad y un 87% de positivos con el gen *ScNDII*, un 54% de identidad y un 63% de positivos con una NADH deshidrogenasa mitocondrial de *C. abicans*, un 44% de identidad y un 61% de positivos con el gen *NDH2* de *Y. lipolytica* y, por último, un 48% de identidad y un 72% de positivos con el gen *ScNDE2*.

Al disponer de una secuencia de un fragmento de la *ORF* del gen a clonar, se abordó una tercera estrategia de clonación que consistió en la discriminación de grupos por *PCR* (*DCbyPCR*; Díaz Prado *et al.*, 2004) empleando los cebadores: KLNDIF y KLNDIR (tabla M4 Materiales y Métodos) específicos del gen *KINDII*. Esta estrategia nos permitió identificar los clones que contenían el vector con el gen *KINDII* o un fragmento del mismo insertado. A continuación se describen los pasos realizados para la obtención del clon genómico.

GENOSCOPE SCND11	----- ATGCTATCGAAGATTTGTATAGTAAACAAGAGGTGCTCACCTCGACGAATACCGTAGTC 60
GENOSCOPE SCND11	----- AGATTGCTTCCACCAGATCCACAGGGGTGAAAACTCCGGACAGGTCTACATCTTTT 120
GENOSCOPE SCND11	----- AAGACCATGAAAATCATTGACCTTCAGCACAGCGACAAACCAACGCTGTGATACGGGT 180
GENOSCOPE SCND11	----- TCGGGTGGGGAGCTATTTCTGTTTTAAAGCAATTGACACCAGAAGTACAACGTTTCC 240
GENOSCOPE SCND11	----- ATCATCTCTCTAGAAGCTATTTCTATTACGCCCTTTGTACCTTCGCACCAAGTGGG 300
GENOSCOPE SCND11	----- ACAGTAGACGAAAAGTCAATTATTGAGCCCATCGTTAATTTTGTCTCAAGAAAAAGGGG 360
GENOSCOPE SCND11	----- AACGTTACTTACTATGAGGCAGAAAGCCACTCTATCAATCCGACAGGAATACCGTTACC 420
GENOSCOPE SCND11	----- ATAAAATCATTATCTGCCGTTAGCCAGCTATACCAACTGAAAACCATCTAGGGCTGCAT 480
GENOSCOPE SCND11	----- CAAGCAGAACCCTGCTGAAATTAAGTAUGATTATTTAATCAGTCTGTAGTGGCGAAGCT 540
GENOSCOPE SCND11	-----TGAAGAAAG---CCAAT 14 AACACATTTGGTATTCTCGGGTCACTGATTACGGTCATTTCTCGAAGGAAATCCCAAC 600
GENOSCOPE SCND11	----- TTCAACCAATCAGCAATAACCTTGAATCTGGATCTGGCAGATAGATCATACCAGCAT 74 TCTTTGAAATAGAAAGAACTTTTGGCCGCAATCTAGAGAAGGCTAATTTATTGCCAAG 860 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- AGAACTCTCCAGATGTAGAAGTAAATCAAACCAACCAAGTGTAGAAGGAACGCTTACCG 134 GGTGATC-CCGAAAGAGAAAGACTACTGT-CCATTGTCTGGTGGTGGTGGGCTACTG 718 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	-----TAAGTGTATTTGGCAA---TGGCCTTTTCAGCACCCAAAGTAAAGCAAGGCCAA 187 GTGTAGAGCCGCTGGTGAATACAGGATATGTTTCCAGGACCTGAGAAAATTTCTCC 778 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- ATGGACCTACTTGAATGGCTTGAACCGTTTTCTTGAATA--GCAAGTCGATCTTTTCC 245 CTCGATTGGCCGAAAGAGTCCAAATTCACTTGGTCGAAGCTCTCCCATCGTTTGAATA 838 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- TTTCTGGTAGCCAACTTCTTTGGAAACCTGG--GATTTAGC--CATCTGTTCGAGA 300 TGTTTGAAAAAAGCTTTTCATCATACGCCAATCACATTTAGAAAACCTTGTCTAAG 898 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- CTTAGCCAAATTCAGCTTGTGTAGGCAACTTGGCAGTTGGAGGCA--GACCAG-- 356 TACATCTGGAACCGCTGTCCCAAGTTGAAGAAAAGCAATTTTGGCAAGACCACAA 958 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	-----CAAAGCGTTG---TCACCGA-----TAGCGAAGATG---TTGTTAGGCCCTTGA 401 ACGAAGACGTTAAAATAACCGAAGAACTATTCCATACGCTACTTTGATTTTGGCCAGG 1018 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- CCACAAAGTGTCTCCTCAACGTTCA--AAGCTCTGTGGAAAGCATTTTGTTCAGTGATTT 459 GTAAACAGGCAAGACCGGTAAATCACTGACTTTTCAAGAAAATTCCTGAGCAAAATCGT 1078 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- CTTAACCAAG-TCAGTAACGA-TAGGTCTAGCCTTGTACCGGTAGCCCAATCAAAGTA 517 CCAAAGAGGATTTGGCAGTGAATGACTTTTTCAGGTGAAAGGCCAACACACTTTTCG 1138 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- CCGTATGGGACAGTCTGTCTGGTACATTACCATCAGCATCCTTGGT-----CTTAGCG 571 CCATTGGTGACAAATGCATTTGCTGG-GTTGCCACCAACCGCCCAAGTAGCCACCAAG 1197 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- ATCAAGTGGTCTTTTTCGACCTTACCAACAGCAGTCTCAACATCAAAAT-----GATA 625 GCCGAATATTTGGCCAAGRATTTTGATAAAATGGCTCA-AATACCAAATTTCCAAAAGAA 1256 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	-----TTAGTCTT-----GGACAAAACG---TCTTGAGCCTAAGAGTCAATTT---CTTT 670 TCTATCTTCAAGAAAGGATAAAATTGATCTCTTGTTCG-AGGAGAACAACCTTAAACCTT 1315 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- TCGAAACATG---TTTGAACGTTTGGCAAGCTTCAA-----GAGGAGGACCTTGAACCA 704 TCAATACAAAGATTTAGTGCCCTTAGCATACCTGGATCCGAAAAGGCCATTGCAACCA 1375 * * * * *
GENOSCOPE SCND11	----- TACGTTCCGGTAAAGAAACATTTTACACCGGTGGTGGCTTAATGACCTTCTACTTATGGA 1435
GENOSCOPE SCND11	----- GAATTTGTACTTGTCCATGTTCTATCTGCAAGATCGAGATTAAGGTTCTTTTTCGACT 1495
GENOSCOPE SCND11	----- GGATTAATTAGCATTTTCAAAGAGACTTTTTTAAAGGATTATAG 1542

Figura 3.7: Alineamiento de dos secuencias nucleotídicas en donde Genoscope se corresponde con el *RST* AL427909 de 704 pb que presenta una gran similitud con la *ND11* de *S. cerevisiae* y *ScND11* es la *ORF* entera del gen *ND11* de *S. cerevisiae*.

3.1.1. Aislamiento de un clon de *KINDII* en la genoteca KEp6 mediante *DChyPCR*

Como paso previo, se comprobaron diferentes genotecas de *K. lactis* para determinar si entre sus numerosos clones existía alguno que portase el gen *KINDII*. Para llevar a cabo este estudio se procedió a realizar unas reacciones de *PCR* con los cebadores KLNDIF y KLNDIR específicos de *KINDII*. Las genotecas comprobadas fueron *Chiron* (basada en el vector pAB24, cedida por Dr. Dikson) y las basadas en los vectores YEp24 (cedida por Dr. Zitomer), YEplac 195 (cedida por Dr. Grivell) y KEp6 (cedida por Dr. Heinisch), dando una banda del tamaño esperado en la genoteca construida en el vector KEp6. En estos momentos fue cuando se pudo comprobar que las genotecas que previamente se habían empleado para la clonación por complementación no daban la banda del tamaño esperado. Por tanto se decidió emplear la genoteca de *K. lactis* creada en el sitio *BamH I* del plásmido KEp6 (figura 3.8.1). Esta banda de 704 pb se clonó en el vector comercial pGEM-T-Easy y se secuenció, comprobando que contenía un fragmento del gen *KINDII*. Este fragmento así clonado se usó como sonda en experimentos posteriores.

En el apartado 1 de la figura 3.8 se puede apreciar que con los cebadores específicos de *KINDII* se obtiene (empleando como ADN molde el obtenido a partir de las genotecas basadas en los vectores KEp6, YEp24 y pAB24) una banda inespecífica de aproximadamente 500 pb. Este problema se solventó migrando durante más tiempo las muestras en los geles de agarosa y dejando que los fragmentos amplificados por *PCR* se separasen bien.

A continuación (figura 3.8) se transformaron bacterias con la genoteca, se replicaron las placas, se extrajo el ADN de cada una de las placas réplica C y se realizaron reacciones de *PCR* usando como molde la mezcla de cinco minipreparaciones pertenecientes a una misma transformación para comprobar la presencia del clon en el conjunto. Se comprobó que el clon positivo se obtuvo en la mezcla número 3 de un total de 8. Posteriormente se realizaron reacciones de *PCR* con las minipreparaciones individuales pertenecientes al grupo que dio positivo en el paso anterior y se observó que dio positivo en la placa 3.2. de un total de 5. La réplica B de la placa positiva del paso anterior, se dividió en cuatro sectores y se realizó una minipreparación de cada uno, el ADN resultante sirvió nuevamente como ADN molde de una nueva serie de reacciones de *PCR* y se comprobó que el clon positivo se localizaba en el sector S4 de la placa 3.2.

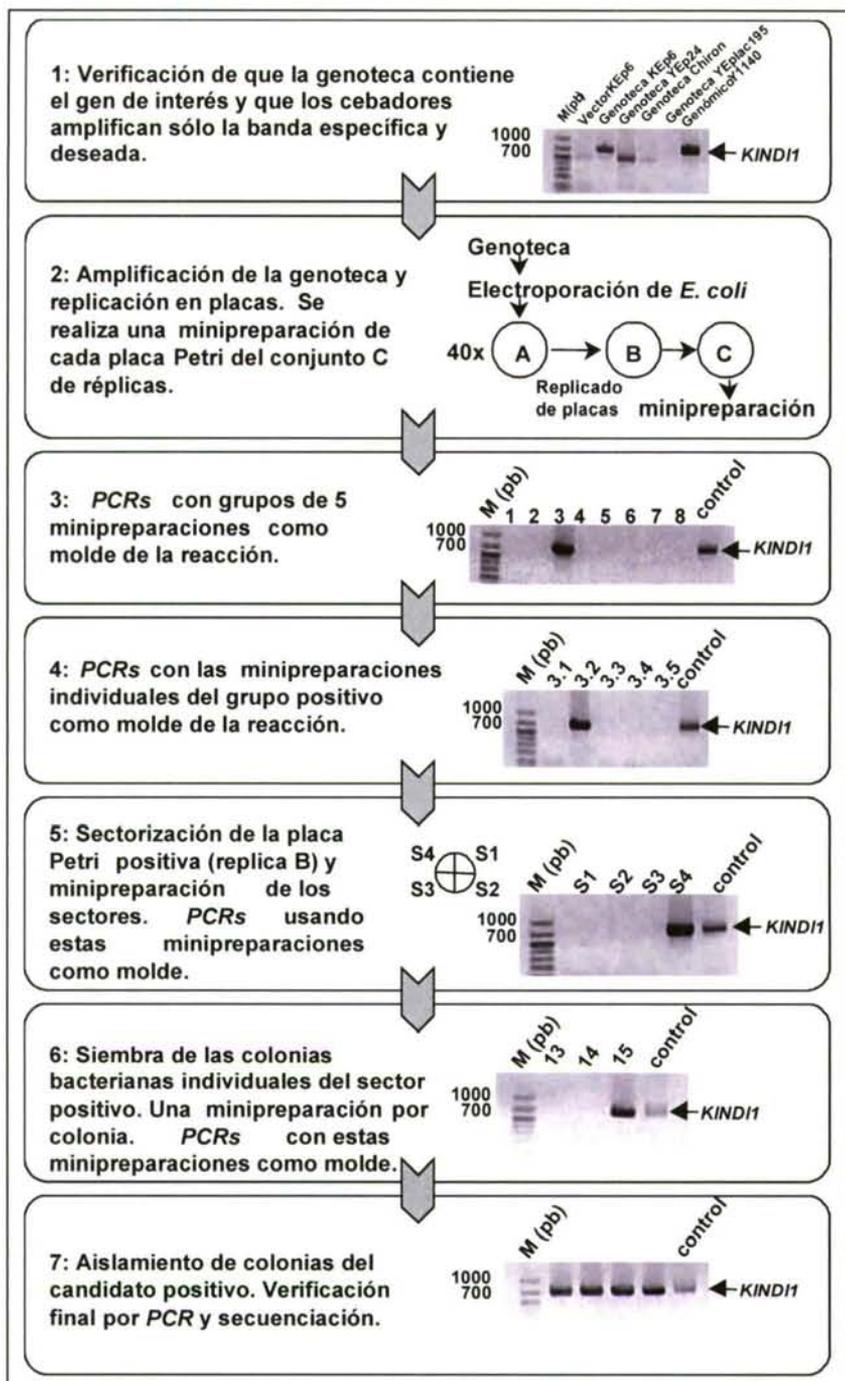


Figura 3.8: Esquema de la estrategia *DCbyPCR*, Discriminación de grupos por *PCR* (Díaz Prado *et al.*, 2004), mostrando la clonación del gen *KIND11*. Los productos de *PCR* fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se muestran también los candidatos negativos en los que no se produjo reacción. M es el marcador de 50 a 1000 pb de pesos moleculares de *BioWhittaker Molecular Applications* en pares de bases.

A continuación se resembraron las colonias del sector S4 que dieron positivo y se realizaron minipreparaciones de cada una de ellas que sirvieron nuevamente para realizar más reacciones de *PCR* y poder comprobar finalmente cuál era la colonia positiva que portaba el clon con el inserto o con la *ORF* de *KINDII*. Para mayor seguridad se procedió a realizar un aislamiento de colonias del candidato positivo, se les extrajo el ADN plasmídico y se volvió a comprobar por *PCR* que todas las colonias aisladas daban positivo.

3.1.2. Digestiones enzimáticas del clon *KINDII*

Con la intención de obtener información del tamaño del inserto en el vector KEp6, se realizó una digestión única con la endonucleasa de restricción *BamH* I, enzima empleada para la construcción de la genoteca de *K. lactis* en el vector KEp6. Además, también se realizó una digestión doble con *Sal* I y *Hind* III. Del estudio de los datos obtenidos con la digestión de *BamH* I se dedujo que el tamaño del inserto era de entre 4.500 y 5.000 pb, y de que al menos cortaba una vez dentro del inserto. Asimismo, se pudo determinar que la digestión doble *Sal* I y *Hind* III muestra un patrón de restricción de cuatro bandas, una de ellas correspondiente al vector KEp6 y las otras tres al inserto, por tanto, esta doble digestión produce dos cortes dentro del inserto además de los dos sitios de corte únicos que ya produce en el vector.

Se realizaron experimentos de *Southern blot* con el clon digerido con diferentes endonucleasas de restricción, tanto digestiones únicas como dobles. De los resultados obtenidos se comprobó que con la digestión *EcoR* I se obtiene un fragmento de aproximadamente 9.000 pb que podría contener toda la *ORF* del gen *KINDII* con su región promotora y terminadora. Lo mismo ocurrió con la digestión *Sph* I obteniéndose un fragmento de 6.000 pb y con la doble digestión *Nhe* I y *Sph* I en la que se obtiene otro fragmento de aproximadamente 5.000 pb (figura 3.9).

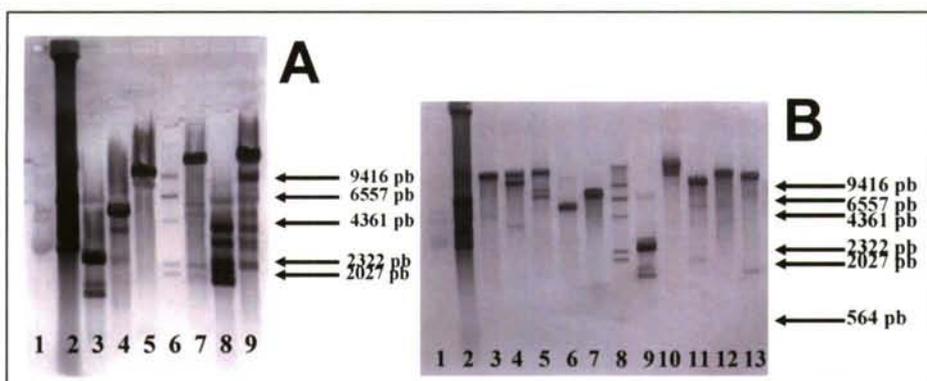


Figura 3.9: Southern blots del clon *KINDII* en el vector KEp6 hibridados con una sonda de 704 pb correspondiente a un fragmento de la *ORF* del gen *NDII* de la levadura *K. lactis*. La sonda se marcó empleando los reactivos suministrados con el kit *Dig DNA Labeling and Detection* (Roche). En el apartado A, 1 es un control negativo de la hibridación (ADN plasmídico del vector KEp6), 2 es ADN plasmídico de la construcción pGEM-T-Easy+*KINDII* 704 pb (sin digerir con edonucleasas de restricción): control positivo, 3 es el clon *KINDII* en KEp6 digerido con *Cla* I y *Sal* I, 4 digerido con *Nhe* I y *Sph* I, 5 digerido con *Eco*R I, 6 es el marcador II de pesos moleculares marcado con digoxigenina de Roche, 7 es el clon digerido con *Bam*H I, 8 digerido con *Sal* I y *Hind* III y 9 digerido con *Bgl* II. En el apartado B, 1 y 2 son los controles negativo y positivo respectivamente, 3 es el clon digerido con *Pvu* I, 4 digerido con *Bal* I (*Mlu*N I), 5 digerido con *Sal* I, 6 digerido con *Sph* I, 7 digerido con *Nhe* I, 8 es el marcador II de pesos moleculares marcado con digoxigenina de Roche, 9 es el clon digerido con *Cla* I, 10 digerido con *Bcl* I, 11 digerido con *Nco* I, 12 digerido con *Ava* I y 13 digerido con *Pvu* II.

3.1.3. Secuenciación de *KINDII*

Una vez que el clon de interés fue aislado, se secuenció con un cebador marcado con fluorescencia que hibridaba dentro de la secuencia conocida. Esta comprobación fue completamente necesaria para asegurarse de que este clon contenía el gen de interés. La prueba fue positiva y se realizó con el cebador OMLKLN_{NDII}-1 (tabla M4 Materiales y Métodos).

A partir de este momento, se comenzó a secuenciar el gen completo utilizando la técnica del *DNA-walking* y para ello se diseñaron una serie de cebadores con el programa informático OLIGO. Se secuenció el gen completamente por las dos hebras, tanto la pauta abierta de lectura como las regiones promotora y terminadora. En la figura 3.10 se puede observar el fragmento secuenciado y los cebadores empleados para tal fin. El clon secuenciado consta de una *ORF* de 1.557 pb, una región promotora de 903 pb y una región terminadora de 1.117 pb. En la figura 3.10 se muestra un alineamiento de la secuencia del *RST* (Número de Acceso: AL427909) homólogo a la *ORF* del gen *ScNDII* (*YML120c*) y el clon entero del gen *KINDII* secuenciado en el

presente estudio. Esta secuencia se envió a la base de datos *EMBL Nucleotide Sequence Database* con la clave de acceso: AJ496545.



Figura 3.10: Alineamiento de dos secuencias nucleotídicas en donde Genoscope se corresponde con el *RST AL427909* de 704 pb que presenta una gran similitud con la *ND11* de *S. cerevisiae* y *KIND11* es el clon entero secuenciado que contiene el gen *ND11* de *K. lactis* con su región promotora y terminadora. En negrita se representan los codones de inicio (ATG) y de terminación (TAA) de la traducción. En color se muestran los diferentes cebadores empleados para la secuenciación.

3.2. Análisis “*in silico*” de la secuencia

La *ORF* del gen *KIND11* de 1.557 pb se tradujo a proteína empleando el programa informático DNAsis. Con la secuencia traducida de la *ORF* completa de 1.557 pb se realizó una búsqueda de homología con el programa informático *BlastP* que aparece en la página de internet del *NCBI* (tabla 3.3). El mayor índice de homología se obtuvo con la proteína que codifica el gen *ND11* de *S. cerevisiae* (72% identidad y 84% de positivos) y con las proteínas que codifican los genes *NDE1* (45% de identidad y 62% de positivos) y *NDE2* (42% de identidad y 58% de positivos) de *S. cerevisiae*. Además, también se obtuvieron homologías elevadas con las NADH deshidrogenasas de *C. albicans* (48% de identidad y 63% de positivos), *Y. lipolytica* (39% de identidad y 58% de positivos), *S. pombe* (40% de identidad y 57% de positivos) y *Arabidopsis thaliana* (36% de identidad y 55% de positivos).

Tabla 3.3: Porcentaje de identidad entre la proteína *KIND11p* de *K. lactis* y la de otros organismos del *BlastP*.

Primer organismo	Segundo organismo	Identidad
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>ND11</i>)	72%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>NDE1</i>)	45%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>NDE2</i>)	42%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida albicans</i> (<i>NDE1</i>)	48%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>NDH2</i>)	39%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (<i>NADH2</i>)	40%
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	36%

El gen *KIND11* codifica para una proteína precursora de 519 aminoácidos que contiene una secuencia N-terminal de 25 aminoácidos (figura 3.12) que le sirve para el importe hacia la mitocondria (probabilidad de importe a la mitocondria del 0,9167, predicciones realizadas con los programas informáticos MitoProt II 1.0 a 4, TargetP V1.0 Prediction e iPSort Prediction de *ExPASy*). En *S. cerevisiae* este gen codifica para una proteína precursora de 513 aminoácidos y la secuencia de importe a la mitocondria consta de 26 aminoácidos (de Vries *et al.*, 1992).

A partir de esta proteína se determinó, mediante el uso de la aplicación ProtParam Tool de *ExPASy* que su pI (punto isoeléctrico) es 9,26, su Pm (peso molecular) es 57,4 kDa y su vida media *in vivo* estimada es de más de 20 horas, y con

un índice de uso de codones (*ICDI* "*Intrinsic Codon Deviation Index*") de 0,42 (Rodríguez-Belmonte *et al.*, 1996).

Mediante la aplicación ClustalW de *EBI* (*European Bioinformatic Institute*) alojada en *ExPASy*, se realizó un análisis comparativo múltiple de la *ORF* del gen *KIND11* traducida a proteína con las secuencias de las proteínas NADH deshidrogenasas de otros organismos de mayor homología (figura 3.12).

En esta figura 3.12 se observa en azul dos consensos ricos en glicina (GXGXXG, en donde X es cualquier aminoácido; Kerscher *et al.*, 1999) altamente conservados entre las diferentes especies empleadas para la elaboración del alineamiento (predicción realizada con el programa *Superfamily 1.61* de *ExPASy*). Este consenso aparece tanto en regiones de unión a NAD(P)H como a FAD⁺ (Matsushita *et al.*, 2001). Aunque se piensa que el consenso más cercano al extremo N-terminal es de unión a FAD⁺ y el situado más al centro el de unión a NAD(P)H, todavía no existen datos experimentales que evidencien esta hipótesis (Matsushita *et al.*, 2001). Estos dos consensos también han sido encontrados en la proteína Ndi1p de *N. crassa* (Duarte *et al.*, 2003).

Además, también se realizó otro ClustalW múltiple entre las regiones N-terminal de las deshidrogenasas mitocondriales tanto de la levadura *S. cerevisiae* como de *K. lactis* (figura 3.11). En él se observa que las proteínas Nde1p y Nde2p de *S. cerevisiae* y Nde1p de *K. lactis* poseen una extensión N-terminal que está ausente en la proteína Ndi1p de *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Small & McAlister-Henn., 1998), indicando una vez más que Ndi1p de *K. lactis* es una deshidrogenasa mitocondrial interna y no externa. En la figura 3.13 se muestra otro ClustalW pero en este caso se realizó solo con *ORFs* que codifican para deshidrogenasas mitocondriales internas.

KLNDE1	MFAS---KSVVASSR--ALNAGASSARFARGARFFSSTKSISN-----IGQKAVVPVK	48
SCNDE1	MIRQSLMKTWANSRFSLSQSKGLVKYAKNRSFHAARNLLEDKKVILQKVAPTGGVAK	60
SCNDE2	MLPR-----LGFAR--TARSIHRFKMTQISKPFHSTEVGKP-----GPQQLSKSY	45
KLNDI1	-----MLSLSQTR	8
SCNDI1	-----MLSKNLYS	8

Figura 3.11: Alineamiento entre las regiones N-terminal de las diferentes deshidrogenasas de la cadena respiratoria mitocondrial de las levaduras *K. lactis* y *S. cerevisiae* en donde *KLNDE1* y *KLNDI1* son la deshidrogenasa mitocondrial externa y la deshidrogenasa mitocondrial interna de *K. lactis* respectivamente y *SCNDE1*, *SCNDE2* y *SCNDI1* son las de *S. cerevisiae*.

SCNDE1	-MIROSLMKTWVANSRFSLSQSKSLVKYAKNRSFHAARNLLEDKVKVILQKVAPTTGVA	59
SCNDE2	-MLPRLGFARTARSIRHFKMTQIS-----KPFHSTVEVG--KPGPOOKLSKSYTAVF	49
KLND1	-----STSTVHSAKD	35
SCNDE1	-----STGVNS	33
CANDE1	-MFRSLIKGGGRATTATRSLVNNS-----TSLVLKQKPKYVSTSTPPKVA	46
YLNDH2	-MLRFAVAVRVARVARSVALTRSLHVSVAKENKIEGTAPAGLPEKVKQTAGHGHQIEIP	59
SPAC	MLFRSRLRGMFKPAGIKPSPLALS-----ASRNLRIANSRFAASDAASSPRSTT	49
SPBC	MSVSKARLQSVVRLSRVTPVYSKTMVR-----SFHVSACVNSGNVPTPRNKSFFSRA	52
SCNDE1	KQSFVKR-----TGKFTLKALLYSALAGTAVVSYSLYREANPSTGVQPSDTEFNGSKRR	113
SCNDE2	KRWVFR-----GLKLFYTTLAGLTYVSYELKESNPKQVQSTAFANGLKRS	98
KLND1	GSKVP-----AGSASFITTKLEN-----WADNP	60
SCNDE1	G-----AGPSTFKTKMVIDP-----QHSDDP	54
CANDE1	KSSTIGK-----MERYTFYAVMSVIGSAGLIGYKIEEESQPVQVQVQKTLPLFNGEKKK	100
YLNDH2	KPDENHPRRKKFHWRLWRLTYLSAISALGYRIVIRNPSDD-----LPADPSK	113
SPAC	SKWKILK-----RTLGLGFATAVWLYGANVYFRHPDPHP-----LPDPSK	92
SPBC	LEMAEVT-----SSLMLGAVALFQSLRRLNNSSPGK-----SGVFK	91
SCNDE1	TLVILGGGWSVSLKLNLDLTLVNVVVVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIELKSIIEPVRSI	173
SCNDE2	ELVLGGGWAISLLKLDLTSLVNVTVSPRSFLETPLLPSTPVGTIELKSIIEPVRSI	158
KLND1	NVVLGGGWAISFLQHDIAKYNVSIIVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIVDEKSIIEPVVNE	120
SCNDE1	NVLLGGGWAISLKHIDTKKYNVSIIVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIVDEKSIIEPVVNE	114
CANDE1	TLVILGGGWSVSLKLNLDLTLVNVVVVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIELKSIIEPVRSI	160
YLNDH2	TLVVLGGGWSVSLKLNLDLTLVNVVVVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIELKSIIEPVRSI	173
SPAC	KPDRITDLSLNFVIVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIELKSIIEPVRSI	152
SPBC	NVVLGGGWAISAAIKLNLDLTLVNVVVVSPRNYLFTPLLPSTPVGTIELKSIIEPVRSI	151
SCNDE1	ARRSHGEVHYEEAEAVDVPENKTIKVKSSAKN-----NDYDL	211
SCNDE2	ARRTPGEVHYIEEAEALDVPKAKVMVQVSED-----EYFVS	196
KLND1	ALKKKGVSYEEAEATINPDRNTVTIKSVSTVSOIYOPEKHLGLS-----QEDTA	171
CANDE1	ALKKKGVSYEEAEATINPDRNTVTIKSVSAVSOIYOPEKHLGLS-----QAEPA	165
YLNDH2	TRKCPGVVITYEAEATINPDRNTVTIKSVSTVSGSKGTSSSKSTVAEYTVG	171
YLNDH2	TRKQAEQVLAGAATMIDHEKSVITRISAVSANSK-----EELT	214
SPAC	LHKSCYVRYEAECTDVAADKKVHIKKTITDG-----VDLEQ	191
SPBC	FKGIDPNSIHQAECTAIDTSAKKVTIRGTTAN-----EGKEA	190
SCNDE1	DLKYDYLVLVVGGAOPNTFGTGVYEEYSSFLKEISDAQEIIRLKMSSIEKAASLSPKDPD	270
SCNDE2	SLSYDYLVLVVGGAOPNTFNGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	270
KLND1	EIKYDYLVLVVGGAOPNTFGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	270
SCNDE1	EIKYDYLVLVVGGAOPNTFGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	270
CANDE1	TLNYDYLVLVVGGAOPNTFGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	279
YLNDH2	EIPFDYLVLVVGGAOPNTFGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	272
YLNDH2	EIKYDYLVLVVGGAOPNTFGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	250
SPAC	VIPYDYLVLVVGGAOPNTFGVYGNANFLKEIEDAONIRMKLMKTIQASFFVNDPE	250
SCNDE1	RARILSLVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	330
SCNDE2	RARILSLVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	315
KLND1	RKRLLTIVVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	290
SCNDE1	RKRLLSIVVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	284
CANDE1	RKRLLSIVVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	339
YLNDH2	RKRLLSIVVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	332
SPAC	RRRYVHTVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	310
SPBC	RARILSIVVVGGGPTGVEFAAELQDYVDODLRKWPPELKEIKVTVLEALPNIIMFDPE	310
SCNDE1	LVDYADLFKEEKIDRLKTMVKVDATITAKTGDG-----IENIPYGVLVWATGNAPR	386
SCNDE2	LKYAEDLFARDEIDLQVNTAVKVVPEYTIKTLQNGT-----NTDIEYGMVWATGNAPR	371
KLND1	LTSYADVLKSNINMLRITAVGKVEKDHIAKTKDADGNVTEOTVPGTLIWTAGNKAR	350
SCNDE1	LSSYADVSLKSNINMLRITAVGKVEKDHIAKTKDADGNVTEOTVPGTLIWTAGNKAR	344
CANDE1	LIDYTEVEFKDNTINMLTMIKKNVNDKSLIANHKRPNPDSKTESLEMPYGTLLIWTAGNAPR	399
YLNDH2	LIDYTEVEFKDNTINMLTMIKKNVNDKSLIANHKRPNPDSKTESLEMPYGTLLIWTAGNAPR	392
SPAC	LIDYTEVEFKDNTINMLTMIKKNVNDKSLIANHKRPNPDSKTESLEMPYGTLLIWTAGNAPR	370
SPBC	LITYTENLKNLNIKIMTKTVVKNVNEKNLIVQAKTNPDSKTESLEMPYGTLLIWTAGNAPR	370
SCNDE1	EVSKNIMTKLEEQDS--RRGLLDNKLQLLGAKGSIFAIGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	445
SCNDE2	DFSKTILMSRIPEQTN--RRGLLDNKLQLLGAKGSIFAIGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	430
KLND1	PVTIDLFKTKIQNASTRALNVDHLLVKGK--NNIFAIGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	408
SCNDE1	PVTIDLFKTKIQNASTRALNVDHLLVKGK--NNIFAIGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	408
CANDE1	DFTDRDLIAKVECKNARRGLLVDRLKVDGT--DNIIFALGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	457
YLNDH2	PVREILMSKIPAKGSRRLGLLVNEYLVEGT--EVIWALGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	450
SPAC	PLTKKIMEGSEBONN--RRGLLVDEYKLGKY--KDIIFALGDCTHFGPLFPPTAQAHAOGEY	427
SPBC	PLTRTILMSSIPESGARKGLVDEFFRVRGV--PEMYAVGDCATF--GLPATAQAHAOGEY	428
SCNDE1	LAQYFKKAYKI---DQLNWKMTHAKDDSE-----VARLKNQIV--KTSQSIED	488
SCNDE2	LAKLIDKKLQI---EQLWDMNLSDETE-----VSRLLQKAVN--LRKSLDK	473
KLND1	LAKVFDKMAQI---PGFOQLA--TRKEK-----IDLLE-----ENGFK	444
SCNDE1	LAKNFDKMAQI---PNFQKNS--SRDK-----IDLLE-----ENNFK	438
CANDE1	LANYFDKLVAV---ESLKYTIANPTPKDN-----VEKLSRKLK--RLEKNLH	500
YLNDH2	LANLNLGIKTI---EDLNNEITNLEKQSEHTFDEQERKNIEAQLSEKSRKLRSRAMP	506
SPAC	LGQLFNKLGSLNFKPSEDRHIALGDEMDS-----STLISLANEKHASTKVFLE	476
SPBC	LAKNLVVGKGFALHRIHQALEKQKGEKAP-----SQVAGLQKQVE-----QLKLEP	476
SCNDE1	FKNYHKGALAYIGSDKAIADLAVGE---AKYRLAGSFTFLFWKSAYLAMCLSFRRNRVIVA	545
SCNDE2	FKNYHKGALAYIGSETAIADLHMGD---SSYQKGMFAFLFWKSAYLAMCLSI RNRLLIA	530
KLND1	FKYVHKGALAYLGAEKAIANI TYGRK--SFYTGGLLITFYIWRVVLVGMILSARSRFKI	502
SCNDE1	FKYVHKGALAYLGSERAIATIRSGKR--TFYTGGLLITFYIWRVVLVGMILSARSRLKVF	496
CANDE1	FTYNYQSSLAYIGSKAVADLVWGDW---SNMSGGNITFLFWRSAVYIMCLSVKNTVTV	528
YLNDH2	FYSYSGSLAYIGSDRAVADLVSEFWGIMMSGGTMTVYFWRSAVYIMCLSVKNTVTV	528
SPAC	FKYSHGSLAYVGEKAIADIEVPVFG--KQLHAGSALAFYFWRSVYLSYLSLRNRTNV	535
SPBC	FKYHHGALAYVGEKAIADLKLPMK--KMLPLOGIVGHTFWRILAYLNELISARSQFMVL	535
SCNDE1	MDWAKVYFLGRDSSI--560	560
SCNDE2	MDWTKVYFLGRDSSV--545	545
KLND1	ADWLKIAFKRDCFKEL213	213
SCNDE1	FTWIKIAFKRDCFKEL213	213
CANDE1	LDWAKVYFGRDCSKE574	574
YLNDH2	IDWMKVYFGRDISRE582	582
SPAC	LDWIRVKLFGDISSL551	551
SPBC	IDWLKTRLFGRYDAKV551	551

Figura 3.12: Alineamiento entre deshidrogenasas de la cadena respiratoria mitocondrial de diferentes especies: SC (*S. cerevisiae*), KL (*K. lactis*), CA (*C. albicans*), YL (*Y. lipolytica*) y SP (*S. pombe*). En rojo se señalan las secuencias señal de importe a la mitocondria para las proteínas Ndi1p de *K. lactis* y *S. cerevisiae* y en azul se señalan los dos consensos ricos en glicina altamente conservados.

En la figura 3.14 se puede observar la presencia de dos hélices transmembrana dentro de la proteína *K/Ndi1p* de *K. lactis* situadas entre las siguientes posiciones aminoacídicas, 61 hasta 78 y 478 hasta 495 (predicción realizada empleando el programa informático TMMTOP1.1). El dominio de unión al coenzima NADH se localizaría dentro de la primera hélice por tanto quedaría dentro de la membrana. Debido a ello se piensa que esta hélice transmembrana sea poco probable que exista, de hecho es la que mostró menor probabilidad. En la figura 3.15 se muestra una predicción de la estructura secundaria de la proteína *K/Ndi1p*, realizada en base a la proteína cristalizada más homóloga (figura 3.16) que se obtiene de la base de datos de proteínas cristalizadas en la página de internet *PDB* (“*Protein Data Bank*”) siendo la que aparece en primer lugar con un 17% de identidad y 171 aminoácidos alineados de los 519 aminoácidos totales, la NADH peroxidasa de los mutantes Cys42Ala y Cys42Ser de *Enterococcus faecalis* expresada en *E. faecalis* (Mande *et al.*, 1995).

MLSLSQTRNL	AVRRLSSVSL	AVRHSSTSTV	HSAKDGSKVP	AGSASFSTTK	50
LIENNADNKP	NVVILGSGWG	AISFLQHIDA	KKYNVSIIVSP	RNYFLFTPLL	100
PSTFVGTVDE	KSIIIEPVVNF	ALKKKGNVSY	YEAEATSINP	DRNTVTIKSV	150
STVSQLYQPE	KHLGLSQEDT	AEIKYDYLLT	AVGAEPNTFG	IPGVEQYGNF	200
LKEIPHSLQI	KKRFLANIEK	ANLLPKGDPE	RKRLLTIVVV	GGGPTGVETA	250
GGGPTGVETA	LKRFPMSIAE	EVQIHLVEAL	PVNLNMFEEK	LTSYAQDVLS	300
KTNINMLRRT	AVGKVEKDHL	IAKTKDADGN	VTEQTVPYGT	LIWATGNKAR	350
PIVTDLFKKI	TEQNASTRAL	NVDEHLLVKG	SNNIFAIGDN	AFAGLPPTAQ	400
VAHQQAELYA	KVFDKMAKIP	GFQQELATRK	EKIDLLFEEN	GFKPFKYVHL	450
GALAYLGAEK	AIANITYGKR	SFYTGGGLIT	FYIWRVLYVG	MILSARSRFK	500
VIADWLKLAFL	FKRDCFEL	519			

Figura 3.14: Presencia de dos hélices transmembrana, representadas con el símbolo *, dentro de la proteína *K/Ndi1p* de *K. lactis* (predicción realizada empleando el programa informático TMMTOP1.1).



Figura 3.15: Estructura secundaria de la proteína *K/Ndi1p* que predicen diferentes programas informáticos alojados dentro de la página de internet del *PDB* (“*Protein Data Bank*”).

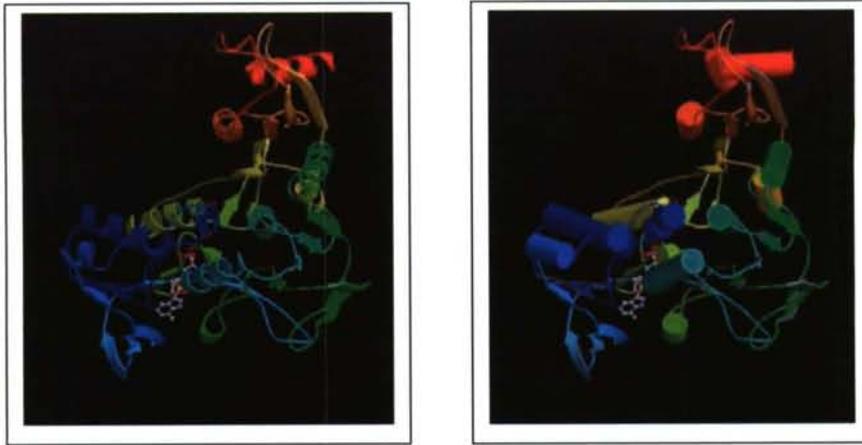


Figura 3.16: Estructura tridimensional de la proteína cristalizada más parecida a la proteína *KNDi1p* según el programa informático *Structure Explorer* que se obtuvo en la página de internet *PDB* ("*Protein Data Bank*"). Esta proteína es la NADH peroxidasa de los mutantes Cys42Ala y Cys42Ser de *Enterococcus faecalis* expresada en *E. faecalis* (Mande *et al.*, 1995).

3.3. Constatación funcional de la proteína *KNDi1p* mediante ensayos de complementación a partir de los mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Los mutantes de *S. cerevisiae* que tienen una delección en la secuencia codificadora del gen *NDI1* son incapaces de crecer o crecen muy poco en lactato, piruvato o acetato (Small y McAlister-Henn, 1998). Se ha empleado el fenotipo de ausencia de crecimiento o reducción del crecimiento en lactato (fenotipo que no es compartido por los mutantes *NDE1* y *NDE2*) para probar la funcionalidad de *KNDi1p* mediante complementación heteróloga.

Para este propósito, y en una primera aproximación, se empleó el clon positivo (conteniendo las secuencias codificadora, promotora y terminadora del gen *KINDI1*) obtenido de la genoteca de *K. lactis* basada en el vector lanzadera KEp6 (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1988). Este clon y el vector vacío KEp6 se emplearon directamente para transformar las cepas BY4741*ndi1* (Y06521, mat a) y BY4742*ndi1* (Y16521, mat a) de la levadura *S. cerevisiae* carentes de la proteína Ndi1p. Los transformantes con el clon entero Ura⁺ fueron seleccionados en CM-URA con lactato al 2% como única fuente de carbono. Los transformantes con el vector vacío Ura⁺ fueron seleccionados en CM-URA con glucosa al 2% como única fuente de carbono. El vector KEp6, aunque no tiene origen de replicación para la levadura *S. cerevisiae*, puede transformar dicha levadura. López *et al.* (2004) han empleado la genoteca de *K. lactis* basada en el vector KEp6 para clonar genes de *K. lactis* por complementación de mutantes de *S. cerevisiae*.

A los transformantes Ura^+ que crecieron en lactato se les hizo una extracción de ADN plasmídico, este ADN se empleó para transformar la cepa DH-10B de la bacteria *E. coli* con el fin de poder amplificar este ADN. Las colonias bacterianas resistentes a ampicilina se sembraron y se les extrajo el ADN plasmídico que se empleó para digerir con endonucleasas de restricción (figura 3.17) y poder comprobar que las levaduras transformantes contenían el clon positivo entero obtenido de la genoteca de *K. lactis* en KEp6 y por tanto demostrar que este clon, que contiene el gen *KIND11*, es capaz de complementar la falta de crecimiento en lactato de los mutantes de *S. cerevisiae* para el gen *ND11*.

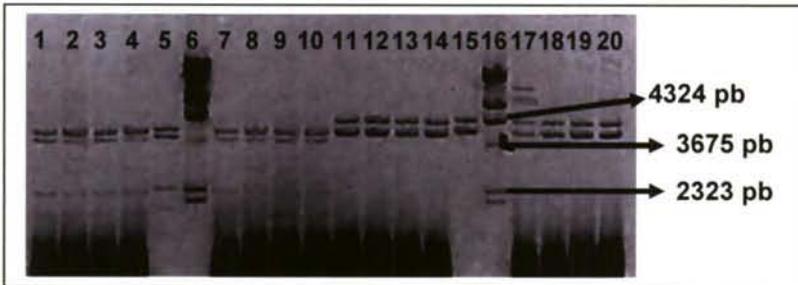


Figura 3.17: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. Ensayo de complementación funcional de la mutación *ndi1* de la levadura *S. cerevisiae* por el gen *KIND11* en el vector KEp6. Del 1 al 4 y del 7 al 10 son los ADN plasmídicos extraídos de los transformantes Ura^+ que crecieron en lactato digeridos con las endonucleasas de restricción *Nhe* I+*Sph* I, del 11 al 14 y del 17 al 20 son los mismos ADN plasmídicos pero digeridos con *Sph* I. 5 y 15 son los controles de la digestión del clon KEp6+*KIND11* (obtenido de la genoteca) con las enzimas *Nhe* I+*Sph* I y *Sph* I respectivamente, y por último, 6 y 16 son el marcador de pesos moleculares de 702 a 8454 pb de *New England Biolabs*.

Dado que esta complementación se realizó con un clon de 4.000-4.500 pb que, además de contener el gen entero *KIND11*, podría contener otros genes anexos, a continuación se clonó la secuencia codificadora del gen *KIND11* flanqueada por una región promotora y terminadora de 400 y 532 pb respectivamente en el sitio *Eco*R I de los vectores YEplac195 (vector episómico multicopia) e YCplac33 (vector centromérico monocopia) (Gietz y Sugino, 1988). Los plásmidos resultantes (verificados empleando técnicas de *PCR*, secuenciación y análisis de restricción) se introdujeron en las cepas BY4741*ndi1* (Y06521, mat α) y BY4742*ndi1* (Y16521, mat α) de la levadura *S. cerevisiae* carentes de la proteína Ndi1p. Los vectores vacíos se introdujeron en las cepas salvajes BY4741 (Y00000, mat α) y BY4742 (Y10000, mat α).

Los transformantes Ura^+ fueron seleccionados en CM-URA con glucosa al 2% como única fuente de carbono. Posteriormente se probó la capacidad de estos transformantes de crecer en el mismo medio pero con lactato como fuente de carbono. Todos los transformantes conteniendo el gen *KINDII*, tanto en el vector con alto número de copias como en el de bajo número de copias, fueron capaces de crecer en lactato, mientras que los transformantes conteniendo los vectores vacíos no crecieron.

Además, se realizaron extracciones de ADN plasmídico a partir de los transformantes capaces de crecer en lactato y se comprobó que contenían el gen *KINDII* en el vector YEplac195 en un caso y en el vector YCplac33 en otro (figura 3.18).

Las células transformadas se crecieron bajo condiciones no selectivas para curar a la levadura del plásmido, es decir, para permitir la pérdida del plásmido. Los dos fenotipos (ura^+ y $lactato^+$) fueron inestables como era de esperar para un fenotipo basado en el plásmido pues aquellas colonias curadas del plásmido que no crecían en CM-URA glucosa tampoco eran capaces de crecer en CM lactato (figura 3.19 A y B).

Estos experimentos demostraron que el gen *KINDII* puede complementar la mutación *ndi1* de *S. cerevisiae* *in vivo* y también que la región promotora de 400 pb del gen *KINDII* es funcional en *S. cerevisiae*. Por tanto, hemos concluido que *KINDII* codifica para una NADH:ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial interna.

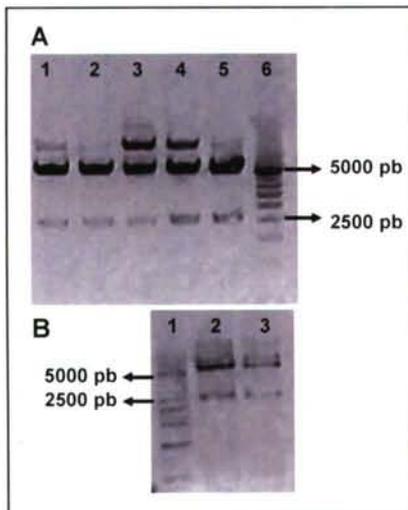


Figura 3.18: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. A: Ensayo de complementación funcional de la mutación *ndi1* de la levadura *S. cerevisiae* por el gen *KINDII* en el vector multicopia YEplac195. Del 2 al 5 son los ADN plasmídicos extraídos de los transformantes Ura^+ que crecieron en lactato digeridos con la endonucleasa de restricción *EcoR* I, 1 es el control de digestión de la construcción YEplac195+*KINDII* digerido con la misma enzima de restricción y 6 es el marcador XVII de pesos moleculares de *Roche*. La existencia de un fragmento de ADN de mayor tamaño que se observa en todos los carriles con mayor o menor intensidad, se debe a una digestión parcial de la enzima pues se corresponde con una banda de aproximadamente 7500 pb. B: Ensayo de complementación funcional de la mutación *ndi1* de la levadura *S. cerevisiae* por el gen *KINDII* en el vector monocopia YCplac33. 1 es el marcador XVII de pesos moleculares de *Roche*, 2 es el control de digestión de la construcción YCplac33+*KINDII* digerido con la enzima de restricción *EcoR* I y 3 es el ADN plasmídico extraído de un transformante Ura^+ que creció en lactato digerido con la misma enzima. En ambos casos, A y B, el fragmento de aproximadamente 5000 pb se corresponde con el vector y el de 2500 pb con el gen *KINDII*.

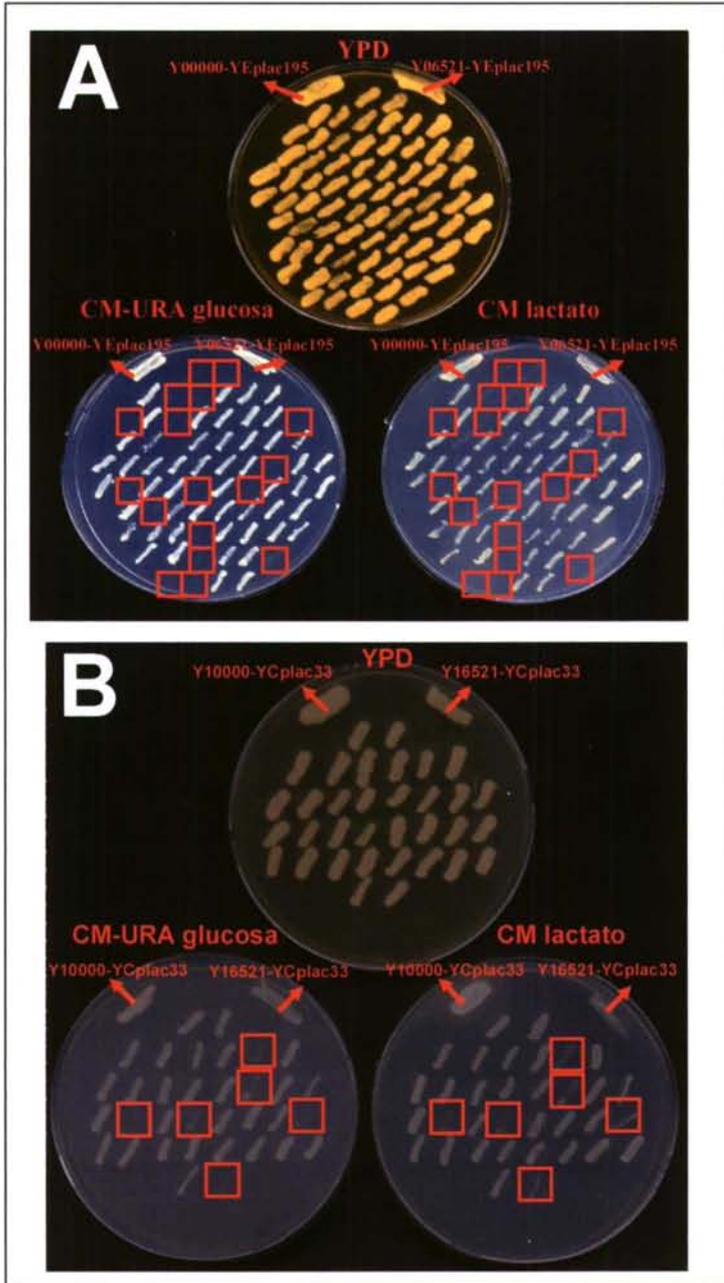


Figura 3.19: Complementación funcional de la mutación *ndi1* de la levadura *S. cerevisiae* por el gen *KIND11*. En la parte A: complementación en multicopia en donde Y00000-YEplac195 es la cepa salvaje transformada con el vector vacío e Y06521-YEplac195 es la cepa mutante *ndi1* transformada con el vector vacío, ambas se usaron como controles. Las colonias restantes son las cepas Y06521 mutantes para la *ndi1* transformadas con el gen *KIND11* clonado en el vector multicopia YEplac195. En la parte B: complementación en monocopia en donde Y10000-YCplac33 es la cepa salvaje transformada con el vector vacío e Y16521-YCplac33 es la cepa mutante *ndi1* transformada con el vector vacío, ambas se usaron como controles. Las colonias restantes son las cepas Y16521 mutantes para la *ndi1* transformadas con el gen *KIND11* clonado en el vector monocopia YCplac33.

3.4. Regulación transcripcional de *KINDII*

Se estudió la regulación transcripcional del gen *NDII* de *K. lactis* por fuente de carbono y diferentes condiciones de estrés. Para ello se han realizado ensayos de actividad β -galactosidasa y, en algunos casos, de *Northern blot* en condiciones seleccionadas sugeridas a partir de algunas supuestas señales reguladoras encontradas en la región promotora del gen *KINDII*.

En una primera aproximación al estudio de la regulación transcripcional del gen *KINDII*, se procedió a la búsqueda de secuencias *cis* para la unión de distintos factores transcripcionales (figura 3.20). Para ello se emplearon dos programas informáticos: TRANSFAC y TFSEARCH, cuyas direcciones de internet se indican en los materiales y métodos.

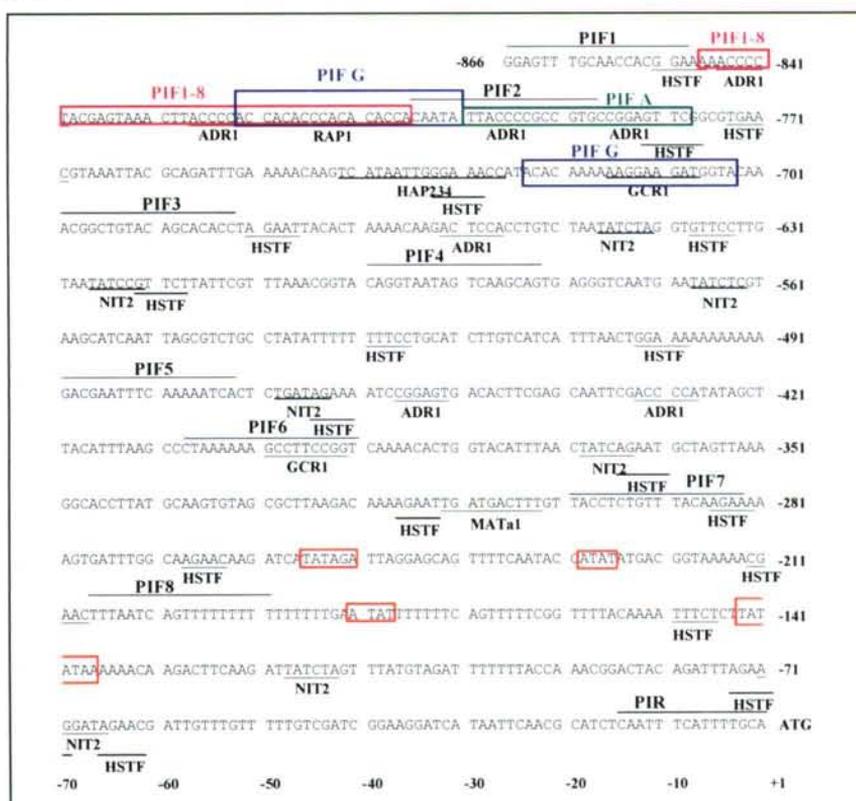


Figura 3.20: Posibles consensos encontrados para la unión de factores transcripcionales en la región promotora del gen *KINDII* con un *threshold* de 85 puntos. Se señalan también los cebadores empleados para la construcción de las delecciones seriadas de esta región promotora (PIF 1 al 8). En color se indican los cebadores empleados para hacer las fusiones al promotor mínimo PIF8 (PIF1-8, PIFA y PIFG). En rojo se señalan las supuestas cajas TATA.

Como resultado de esta búsqueda, se encontraron consensos para la unión de factores transcripcionales de regulación por fuente de carbono como son Adr1p, Hap2/3/4p, Gcr1p y también por estrés como por ejemplo HSTF y NIT. Por ello se decidió ensayar la existencia o no de esta regulación mediante la construcción de delecciones unidireccionales sobre el promotor de *KINDII* utilizando la técnica de la *PCR*. Se escogieron cebadores (tabla 3.4 y figura 3.20) que permitieron eliminar progresivamente las distintas secuencias consenso de interés. Los cebadores empleados para estas amplificaciones poseían colas con secuencias de corte para las endonucleasas de restricción *BamH* I y *Hind* III. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector comercial pGEM-T-Easy, una vez digeridos con estas enzimas, se clonaron en el plásmido pXW2 (Chen *et al.*, 1992a) para su expresión en *K. lactis* (figura 3.21), proporcionando el ATG de *KINDII* y manteniendo la pauta de lectura del gen *lacZ* de *E. coli*. Las construcciones se nombraron como PIF1 hasta PIF8, PIF A y PIF G. Todas las fusiones se secuenciaron empleando los cebadores 30LacZ y 70LacZ (tabla M4 Materiales y Métodos), que hibridan dentro del gen *lacZ* de *E. coli* del plásmido, para comprobar que las amplificaciones por *PCR* habían sido correctas, que no se había producido ningún error en las secuencias consenso ni se había variado la pauta de lectura.

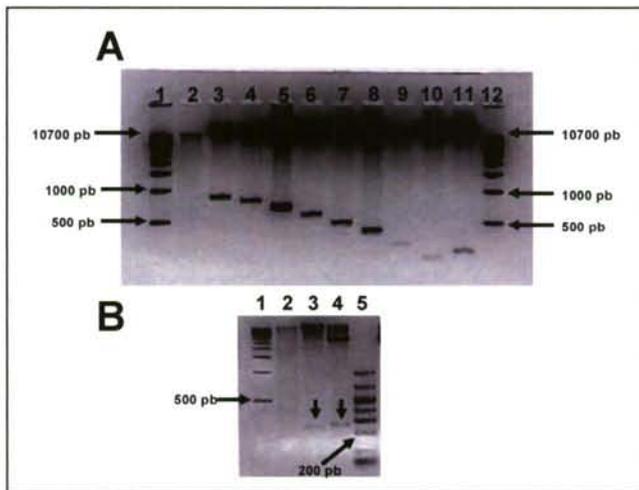


Figura 3.21: Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y visualizado a la luz U.V. A: 1 y 12 son el marcador XVII de pesos moleculares de Roche. 2 es el vector pXW2 digerido con las enzimas de restricción *BamH* I y *Hind* III. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 son las delecciones PIF1 al 8 y PIF1-8 respectivamente clonadas en el vector pXW2 y digeridas con las mismas endonucleasas de restricción. B: 1 es el marcador XVII de Roche y 5 es el marcador de 50 a 1000 pb de pesos moleculares de BioWhittaker Molecular Applications. 2 es el vector pXW2 digerido con las enzimas de restricción *BamH* I y *Hind* III., 3 y 4 son las delecciones PIF A y PIF G clonadas en el vector pXW2 y digeridas con las mismas enzimas.

Tabla 3.4: Cebadores utilizados para la obtención de las delecciones de la región promotora del gen *KINDII*. W es la hebra de Watson y C es la hebra de Crick. La secuencia completa de los cebadores se encuentra en la tabla M4 de Materiales y Métodos.

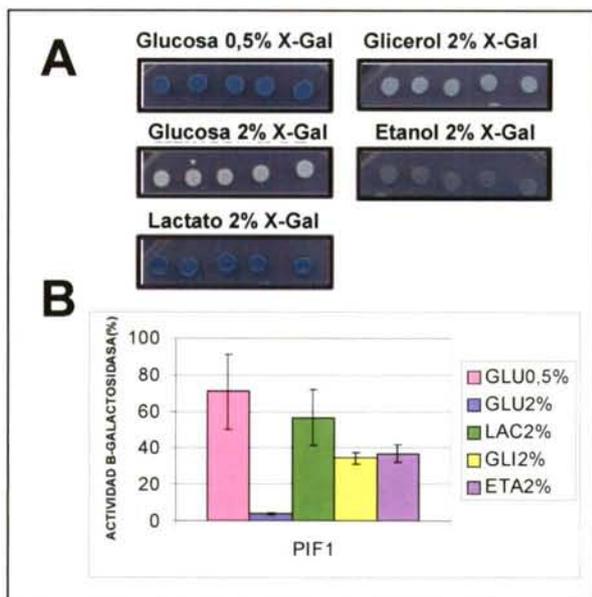
CEBADOR	POSICIÓN
KLPIF1	-866 W
KLPIF2	-805 W
KLPIF3	-700 W
KLPIF4	-600 W
KLPIF5	-490 W
KLPIF6	-408 W
KLPIF7	-300 W
KLPIF8	-207 W
KLPIF1-8	DE -847 HASTA -806 Y -207 W
KLPIF A	DE -800 HASTA -779 Y -207 W
KLPIF G	DE -822 HASTA -801, DE -724 HASTA 704 Y -207 W.
KLPIR	-15 C

3.4.1. Regulación transcripcional de *KINDII* por fuente de carbono

Para comprobar si la transcripción del gen *KINDII* está regulada por la fuente de carbono, se crecieron las levaduras transformantes portadoras de la delección PIF1, de 866 pb, del promotor del gen *KINDII* en placas CM-URA en presencia de X-Gal y en diferentes fuentes de carbono: glucosa al 0,5 y 2%, etanol, glicerol y lactato al 2%. Para ello se sembraron 5 transformantes independientes en cultivos líquidos con las diferentes fuentes de carbono. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 0,6 se lavaron las células dos veces con agua bidestilada estéril, se sembró la misma cantidad de células en cada placa y se incubaron estas placas a 30°C durante 2 días. Como se observa en la figura 3.22.A, las colonias sembradas en glucosa al 2% adquieren una coloración blanca, las colonias sembradas en las otras fuentes de carbono son azules pero en glucosa al 0,5% y lactato al 2% tienen una coloración más intensa.

En la figura 3.22.B se observan los valores de las actividades β -galactosidasa de la fusión que contiene el promotor entero en las distintas fuentes de carbono. Se observa una menor actividad en glucosa al 2% ya que los valores en glucosa al 2% son significativamente más pequeños que en glucosa al 0,5%, lactato, glicerol y etanol al 2%. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en las medidas de actividad cualitativa β -galactosidasa. Este descenso en la transcripción de *KINDII* en medio con glucosa al 2% se pudo comprobar mediante análisis de *Northern blot* y mediante experimentos de *PCR* en Tiempo Real. El gen homólogo de la levadura *S.*

cerevisiae está sujeto a represión por glucosa (de Vries y Grivell, 1988). Los siguientes experimentos se realizaron sólo en glucosa al 0,5% y 2% y en lactato al 2%.



En el análisis de *Northern blot* se extrajo ARN de dos cepas salvajes, una de la levadura *S. cerevisiae* (aGH1) y otra de la levadura *K. lactis* (Y1140), crecidas en medio YPD con glucosa al 0,5% y 2%. Como sonda se empleó un fragmento del gen *KINDII* obtenido por amplificación mediante *PCR* a partir de ADN genómico de la cepa Y1140 de *K. lactis* con dos oligonucleótidos específicos. Esta sonda comprendió el 90% de la secuencia codificadora desde el nucleótido +106 hasta +1513. Los resultados del *Northern blot* mostraron que la glucosa al 2% causa un descenso de 2,26 veces en los niveles de mRNA del gen *KINDII*. Además, también se pudo comprobar la no existencia de hibridación heteróloga entre el gen *KINDII* y su homólogo en *S. cerevisiae* puesto que no se apreció la existencia de transcrito en el *Northern blot* (figura 3.23).

En los experimentos de *PCR* en Tiempo Real, también se pudo comprobar que la glucosa produce un descenso de la transcripción del gen *KINDII*, expresándose en glucosa al 0,5% 4,3 veces más que en glucosa al 2% y 1,7 veces más que en lactato al 2% (tabla 3.5).

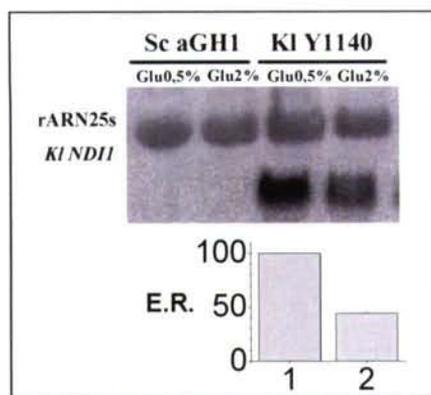


Figura 3.23: Influencia de la fuente de carbono en la expresión del gen *NDII* de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. La gráfica representa los valores relativos de expresión (E.R) del gen *NDII* de *K. lactis* normalizados (media±D.S. de 2 muestras) en donde la línea 1: glucosa 0,5% y línea 2 glucosa 2%. rARN25s es el control interno de carga.

Tabla 3.5.: Expresión relativa del gen *KINDII* en la cepa salvaje Y1140 de *K. lactis* en diferentes fuentes de carbono mediante experimentos de *PCR* en Tiempo Real. El análisis de los datos se realizó empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Se emplearon dos controles, el gen de la actina y el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) de *K. lactis*. En la tabla se muestra la media de 12 réplicas, 6 de ellas normalizadas frente al gen de la actina y las otras 6 normalizadas frente al gen *GAPDH*. Para la amplificación del gen *KINDII* se emplearon los cebadores OFKLNDII-4 y OFKLNDII-11 (ver tabla M4 de Materiales y Métodos).

Fuente de carbono	Expresión relativa
Lactato 2%	1
Glucosa 2%	0,406±0,05
Glucosa 0,5%	1,775±0,77

Como se observa en la gráfica de la figura 3.24, los valores de actividad en glucosa al 0,5% y en lactato al 2% son muy similares en las dos primeras fusiones, PIF1 y PIF2, y mayores que en glucosa al 2%. En este sentido es lógico pensar que existe una secuencia en PIF1 y PIF2 que eliminamos en PIF3 que es la causante de la menor actividad existente en glucosa al 2%, ya que al acortar el promotor hasta el nucleótido -700, aumentan los valores de actividad en glucosa al 2% y desaparece la inducción por lactato con respecto a PIF1.

No existen diferencias importantes de la actividad β -galactosidasa en las deleciones PIF3, PIF4 y PIF5. En estas tres deleciones se alcanzan valores de actividad en glucosa al 2% y 0,5% similares a los valores de PIF1 en glucosa al 0,5%. A su vez, los valores en glucosa son significativamente mayores que en lactato. Esto podría ser atribuido a que ya en la deleción PIF3 se han eliminado la secuencia consenso de Hap2/3/4p que funciona como activador cuando las levaduras crecen en fuentes de carbono no fermentables (Ramil *et al.*, 2000; Brons *et al.*, 2002) y cuatro secuencias

consenso de unión a Adr1p, activador transcripcional de genes requeridos para la utilización de lactato, etanol, glicerol, y ácidos grasos (Young *et al.*, 2002; Grauslund *et al.*, 1999; Gancedo, 1998).

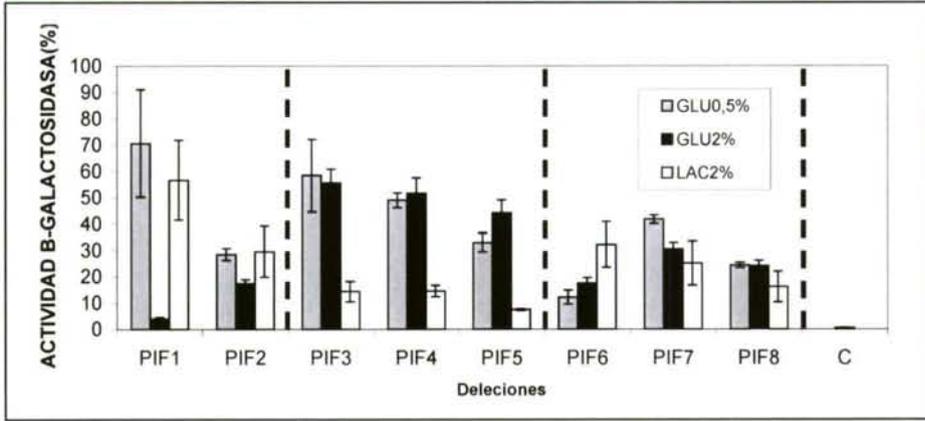


Figura 3.24: Medidas de actividad β-galactosidasa obtenidas a partir de las distintas delecciones seriadas del promotor del gen *KIND11* en las diferentes fuentes de carbono. En la gráfica se representa el valor medio en % normalizado de ensayos realizados por triplicado de entre 3 y 5 transformantes independientes y la desviación estándar correspondiente. La normalización de los datos se realizó asignándole el valor 100% al mayor valor de actividad β-galactosidasa obtenido.

En el promotor de *KIND11*, el complejo Hap2/3/4p podría ser el responsable del descenso de la actividad β-galactosidasa en lactato al 2% a partir de la delección PIF3 y de la menor actividad en glucosa al 2% en las delecciones PIF1 y PIF2. Es decir, la menor actividad en medios con glucosa al 2% puede ser debida a la ausencia de la actividad del complejo Hap2/3/4p en esta fuente de carbono. De hecho, ya se ha propuesto para *S. cerevisiae* que el control de la actividad del complejo Hap2/3/4/5p por la fuente de carbono es asumida por la subunidad Hap4p. Se sabe que la glucosa reprime la transcripción de *HAP4* y ya se ha propuesto que la región C-terminal altamente ácida de Hap4p es la subunidad reguladora que proporciona el dominio de activación transcripcional del complejo. En presencia de glucosa, Hap4p podría estar presente en muy poca cantidad para ser captado por el complejo Hap2/3/5p. Por ello la subunidad Hap4p es al mismo tiempo la subunidad activadora y reguladora del complejo pues es la única subunidad que es regulada por la fuente de carbono (Ramil *et al.*, 2000; Brons *et al.*, 2002). En *K. lactis* ya se han clonado tres componentes de este complejo: *KIHAP2*, *KIHAP3* y *KIHAP4* (Bourgarel *et al.*, 1999).

Este complejo Hap2/3/4/5p regula un gran número de genes en *S. cerevisiae* (Gancedo, 1998). Se ha postulado que este complejo se une al ADN y hace contacto con una secuencia consenso CCAAT común en la mayoría de los genes de mamífero (Gancedo, 1998; Zitomer y Lowry, 1992; Ramil et al., 1998). El promotor del gen *KIND11* muestra esta secuencia consenso de unión para Hap2/3/4p.

A partir de PIF3 hasta PIF8, las actividades en glucosa al 0,5% y 2% son bastante parecidas aunque se observa que a medida que se elimina un fragmento más grande del promotor del gen, los valores de actividad (sobre todo en glucosa) van disminuyendo progresivamente.

La delección PIF6 corresponde con el promotor que complementa la mutación del gen *ScND11* de *S. cerevisiae* en multicopia y en monocopia. En las delecciones PIF6, PIF7 y PIF8 las actividades en glucosa y en lactato se igualan.

La delección más corta, PIF8, muestra una actividad similar en glucosa y lactato, esta actividad está a nivel con PIF6. Por tanto, se consideró que PIF8 era el promotor mínimo.

Si se comparan los resultados de actividad β -galactosidasa mostrados por las delecciones unidireccionales con la posición de las secuencias consenso para la posible unión de factores transcripcionales encontrados en la región promotora de *KIND11*, nosotros observamos que la región desde -866 hasta -700 pb, la cual parece ser responsable de la menor actividad en glucosa al 2% y de la inducción por lactato, no contiene sitios de unión para represores sino que contiene, además de cuatro supuestos sitios de unión para Adr1p y uno para Hap2/3/4p, uno para Rap1p y uno para Gcr1p. Para probar la funcionalidad de estos sitios de unión, hemos fusionado las correspondientes secuencias a PIF8, es decir, las secuencias que aparecen en la figura 3.20 como PIF1-8 (en rosa), PIFG (en azul) y PIFA (en verde) son las que se fusionaron a PIF8. En la tabla 3.4 se señalan los cebadores empleados para la construcción de estas nuevas fusiones.

Se obtuvieron tres delecciones nuevas que se representan en la figura 3.25: PIF1-8 (que contiene las dos primeras secuencias de unión para el factor transcripcional Adr1p presentes en la delección PIF1, fusionadas al promotor mínimo PIF8); PIF A (que contiene las dos primeras supuestas secuencias de unión a Adr1p de la delección PIF2 fusionadas al promotor mínimo) y la delección PIF G (que contiene la secuencia consenso para el factor transcripcional Rap1p junto con la primera secuencia de unión de Gcr1p de la delección PIF2 fusionados al promotor mínimo). Se realizaron, con estas

nuevas deleciones, medidas de actividad β -galactosidasa comparándolas con las deleciones PIF1, PIF8 y con un control negativo que consistía en las células transformadas con el vector pXW2 vacío.

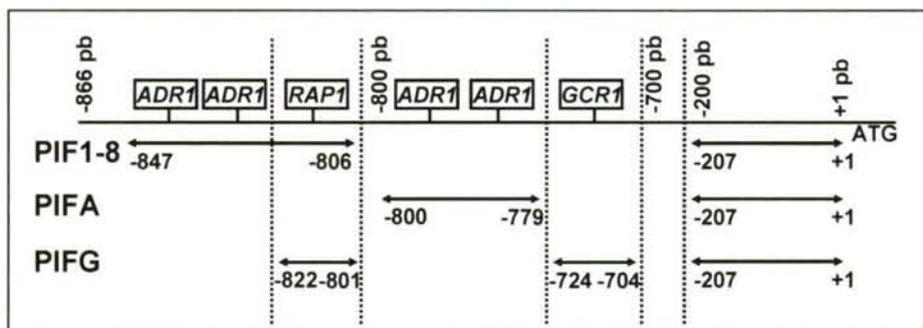


Figura 3.25: Esquema explicativo de las deleciones PIF1-8, PIFA y PIFG construidas sobre el promotor del gen *KIND11* en donde se muestran los consensos que contienen y las posiciones que ocupan.

Como se observa en la figura 3.26, se obtuvo un incremento de la actividad en lactato al 2% que iguala los valores de PIF1 en PIF1-8 respecto a PIF8 pero no en PIFA, sugiriendo que los dos primeros consensos para la unión de Adr1p en conjunto, podrían ser los responsables de la inducción por lactato en PIF1. Por el contrario, los dos primeros consensos Adr1p de PIF2 no parecen ser funcionales.

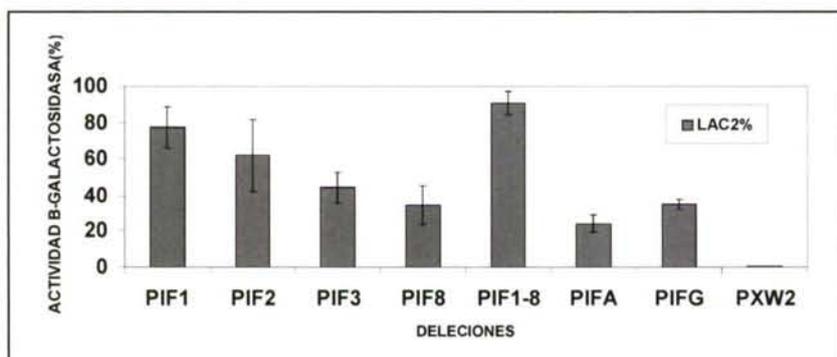


Figura 3.26: Medidas de actividad β -galactosidasa obtenidas a partir de diferentes fusiones del promotor del gen *KIND11* en lactato. En la gráfica se representa el valor medio en % normalizado de ensayos realizados por triplicado de 3 transformantes independientes y la desviación estándar correspondiente. La normalización de los datos se realizó asignándole el valor 100% al mayor valor de actividad β -galactosidasa obtenido.

Gcr1p es un activador transcripcional. Pero este activador no suele actuar por sí solo sino que generalmente actúa conjuntamente con Rap1p. Gcr1p y Rap1p constituyen los elementos UAS (“*Upstream Activating Sequences*”) de la mayoría de los

genes glucolíticos (Haw *et al.*, 2001; Uemura *et al.*, 1997). El principal papel de Rap1p en los promotores de genes glucolíticos es facilitar la unión de Gcr1p (Drazinic *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1998). Los homólogos *RAP1* y *GCR1* de *K. lactis* ya se han aislado (Larson *et al.*, 1994; Neil *et al.*, 2004). *KlGcr1p* se une a la secuencia CTTC o CATCC (denominada caja-CT). En el promotor de *KIND11* se encontraron dos supuestos sitios de unión de Gcr1p y un único sitio Rap1p (denominado caja-RPG). Rap1p suele estar adyacente a Gcr1p y su secuencia consenso es AYCVRTRCAYYW en donde R=A o G, W=A o T e Y=C o T (Larson *et al.*, 1994; Neil *et al.*, 2004). En el promotor de *KIND11* tenemos un solo sitio de unión para Rap1p que está degenerado, pues tenemos una C en lugar de una T como marca el consenso aunque, según Yu *et al.* (2003) una de las múltiples variantes de la secuencia consenso de 13 pb para la unión de Rap1p sería ACACCCRYACAYM. Rap1p desarrolla su papel como regulador de la actividad transcripcional de dos formas distintas. Por un lado, su unión al ADN provoca la apertura local de la estructura de la cromatina en un promotor favoreciendo la unión al ADN de otros activadores y por otro lado ayuda o facilita la unión de Gcr1p en un sitio adyacente en el promotor a través de interacciones físicas (Yu *et al.*, 2003)

Pues bien, como se observa en la figura 3.27, las fusiones PIF1-8 y PIFA no muestran ningún descenso de la actividad β -galactosidasa en glucosa al 2% frente a la glucosa al 0,5%. Con la delección PIF G se observa un aumento de la actividad tanto en glucosa al 0,5% como al 2% con respecto a PIF8. En este sentido, el consenso para la unión de Rap1p de la delección PIF1 junto con el primer consenso de unión de Gcr1p de PIF2 podrían actuar conjuntamente en la fusión PIF G aumentando los niveles de actividad en glucosa al 0,5 y 2%.

Para probar la posible funcionalidad del consenso encontrado en el promotor del gen *KIND11* para la unión de Hap2/3/4p, se realizaron experimentos de PCR en Tiempo Real con una cepa salvaje y una mutante (*Kl Δ hap3*) ambas de *K. lactis* en una fuente de carbono no fermentable (lactato al 2%). Se esperaba que en el mutante desapareciese la inducción por lactato y de hecho se observó que se producía un descenso pequeño en la transcripción del gen *KIND11* en dicho mutante con respecto a la cepa salvaje, expresándose 1,43 veces menos en el mutante que en el salvaje en lactato al 2% (tabla 3.6). Por ello podría ser posible que los factores de transcripción Adr1p (que presuntamente se unirían al motivo contenido en la fusión PIF1) y Hap2/3/4p (que se uniría al motivo contenido en la fusión PIF2) actúen juntos en el promotor de *KIND11*

como ya se ha descrito para otros genes en *S. cerevisiae* (Ramil *et al.*, 2000), siendo los responsables de la inducción por lactato existente en las fusiones PIF1 y PIF2. De hecho, en las fusiones de la figura 3.24 en glucosa al 2% y lactato al 2%, se observa que en PIF1 y PIF2 la actividad es mayor en lactato que en glucosa al 2% ya que hay inducción por Adr1p y Hap2/3/4p. En PIF3, en donde ya se eliminan los motivos de unión de estos factores transcripcionales, desaparece la inducción por lactato siendo la actividad en glucosa mayor que en lactato.

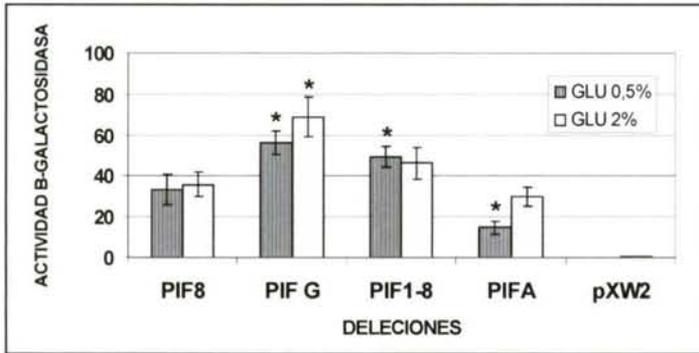


Figura 3.27: Medidas de actividad β -galactosidasa obtenidas a partir de diferentes fusiones del promotor del gen *KIND11* en glucosa. En la gráfica se representa el valor medio (expresado en unidades calculadas según Adams *et al.*, 1997) sin normalizar de ensayos realizados por duplicado de 3 transformantes independientes y la desviación estándar correspondiente. * Indica una diferencia estadísticamente significativa con respecto a PIF8.

Tabla 3.6: Expresión relativa del gen *KIND11* en la cepa salvaje Y1140 y en una cepa mutante *KlΔhap3* ambas de la levadura *K. lactis* (crecidas en lactato al 2%) mediante experimentos de PCR en Tiempo Real. El análisis de los datos se realizó empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Se emplearon dos controles, el gen de la actina y el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *K. lactis*. En la tabla se muestra la media de 18 réplicas, 9 de ellas normalizadas frente al gen de la actina y las otras 9 normalizadas frente al gen GAPDH. Para la amplificación del gen *KIND11* se emplearon los cebadores OFKLND11-4 y OFKLND11-11 (ver tabla M4 de Materiales y Métodos).

Cepa ensayada	Expresión relativa
Salvaje Y1140	1
Mutante <i>KlΔhap3</i>	0,697±0,171

3.4.2. La transcripción de *KIND11* no está regulada por estrés

Entre las posibles secuencias *cis* en el promotor de *KIND11* se encuentra, además, *HSTF* "*Heat Shock Transcriptional Factor*" (factor transcripcional de choque térmico) y secuencias de unión similares a las descritas para el factor transcripcional Nit2p de *N. crassa* y factores de la familia NIT de *S. cerevisiae* relacionados con la activación transcripcional en condiciones de limitación de nitrógeno (Van Helden *et al.*,

1998). Para estos factores se han definido los consensos, GATAAG (Van Helden *et al.*, 1998) y TATCTA (Fu y Marzluf, 1990). Estas regiones de unión son conocidas como secuencias GATA. Por ello, con la fusión con el promotor entero se ensayaron condiciones de choque térmico y limitación de nitrógeno sin obtener, como se observa en la figura 3.28, ningún incremento en la actividad.

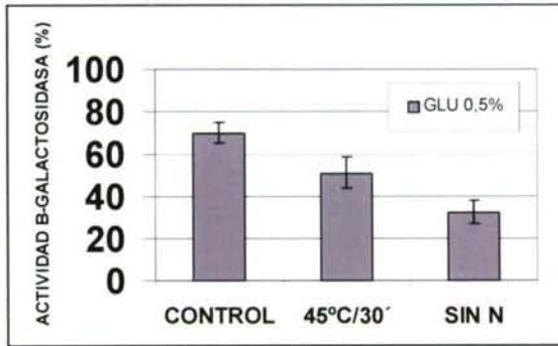


Figura 3.28: Medidas de actividad β -galactosidasa obtenidas a partir de la fusión PIF1 del promotor del gen *KINDII* en YPD con glucosa al 0,5%. En "SIN N" no se le añadió al medio el sulfato amónico para ensayar las condiciones de limitación por nitrógeno. En "45°C/30'" el cultivo se sometió a un choque térmico de 45°C durante 30 min después de que las células alcanzasen una D.O. a 600 nm de 0,5 a 30°C. En la gráfica se representa el valor medio en % normalizado de ensayos realizados por triplicado de 5 transformantes independientes y la desviación estándar correspondiente. La normalización de los datos se realizó asignándole el valor 100% al mayor valor de actividad β -galactosidasa obtenido.

Además, para corroborar la ausencia de activación de la transcripción y por tanto que las secuencias consenso para los *HSTF* no son funcionales, se realizó un ensayo de *Northern blot* en el cual se creció la cepa salvaje Y1140 de la levadura *K. lactis* en glucosa al 2% y 30°C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Posteriormente las células se sometieron a un choque térmico a 40°C durante un máximo de 2 horas recogiendo muestras a diferentes intervalos de tiempo. Como se observa en la figura 3.29 no existen diferencias en los niveles de mRNA del gen *KINDII* a los diferentes tiempos. También se realizó otro experimento de *Northern blot* pero sometiendo a las células a un descenso en la temperatura. En este caso también se crecieron las células hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6 a 30°C y a continuación se sometió el cultivo a un choque a 14°C de hasta 8 horas. En este ensayo no se produce ningún aumento en los niveles de expresión del gen *KINDII* (figura 3.29).

Davidson y Schiesti (2001) han postulado la implicación directa de las NADP(H):ubiquinona oxidoreductasas en el estrés oxidativo inducido por calor. Se ha analizado la respuesta de la transcripción de *KINDII* al estrés oxidativo creado por un

tratamiento con peróxido de hidrógeno. Para ello se realizó un ensayo de *Northern blot* en el cual se crecieron dos cepas, Y1140 y PM5-2D (mutante *rag2*), de *K. lactis* en glucosa y fructosa al 2% como fuente de carbono. Una vez que las células alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,6, se añadió H_2O_2 al cultivo a una concentración final de 0,4 mM durante 25 minutos.

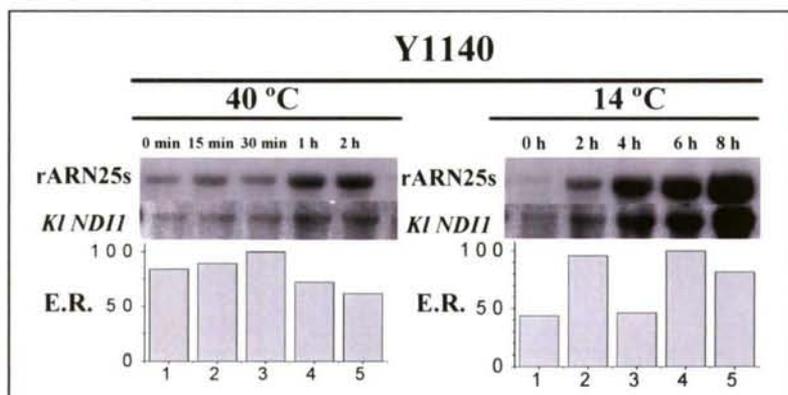


Figura 3.29: Influencia del choque térmico en la expresión del gen *KINDII* en una cepa salvaje (Y1140) de *K. lactis*. E.R. son los valores de expresión relativa normalizados de una única muestra. rARN25s es el control interno de carga.

La figura 3.30 muestra que la transcripción de *KINDII* no incrementa bajo estas condiciones, pues aunque parece que existen diferencias en la cepa Y1140 entre el control sin tratar y el tratado con H_2O_2 , éstas no son significativas.

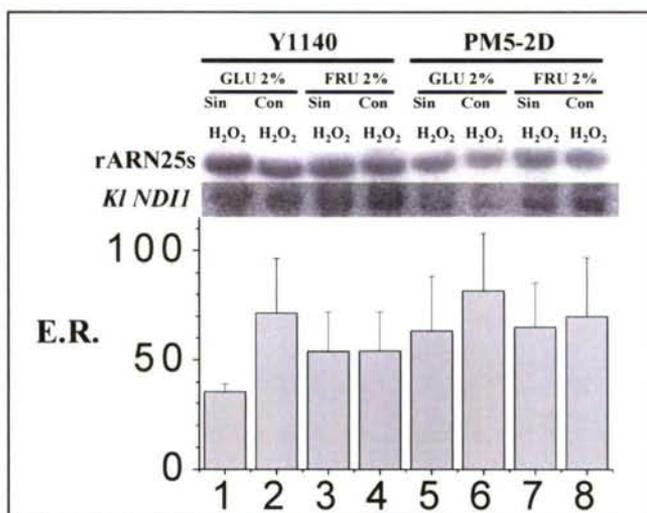


Figura 3.30: Influencia del tratamiento con H_2O_2 en la transcripción del gen *KINDII*. E.R. son los valores de expresión relativa normalizados (media \pm D.S. de 3 muestras). rARN25s es el control interno de carga. No existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes condiciones.

5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Se ha puesto a punto una nueva estrategia basada en la *PCR* para el aislamiento de clones de interés a partir de una genoteca cuando sólo se dispone de la secuencia de un fragmento. Esta estrategia, denominada *DChyPCR* ("discriminación de grupos por *PCR*"), que es una alternativa no radiactiva a la hibridación de colonias, nos permitió el aislamiento de varios clones conteniendo genes de interés a partir de una genoteca de *K. lactis* construida en el vector KEp6.
2. El inserto del clon aislado conteniendo el gen *KIFBA1* se secuenció totalmente determinándose, mediante análisis "*in silico*" de la secuencia que consta de una región promotora de 305 pb, una región terminadora de 158 pb y una *ORF* de 1086 pb que codifican para la proteína fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de clase II de *K. lactis*. Esta proteína, cuyo peso molecular estimado es de 39,6 kDa, consta de 361 aminoácidos y presenta un 75% de identidad y un 86% de positivos con la proteína citoplasmática fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *S. cerevisiae*.
3. Se ha comprobado la funcionalidad del gen *KIFBA1* mediante su expresión en la bacteria *E. coli* y posterior purificación por afinidad de la enzima fusionada a una cola de histidinas. Mediante *SDS-PAGE* y análisis de densitometría se estimó que la proteína tenía un 93% de pureza. La actividad específica fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa fue de $3,85 \pm 0,2$ nmol Fructosa-1,6-bisfosfato / μg proteína x min. Estos resultados confirmaron que el gen *KIFBA1* codifica para una fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa.
4. Mediante ensayos de actividad β -galactosidasa realizados con la cepa MW190-9B (deficiente en β -galactosidasa) de la levadura *K. lactis* transformada con las deleciones unidireccionales del promotor del gen *KIFBA1* fusionadas al gen *lacZ* de *E. coli*, se determinó que la deleción que se extiende desde la posición -305 hasta la -287 pb no influyó significativamente los niveles de expresión. Cuando se deleccionaron los 32 pb siguientes hacia el extremo 3' (hasta -255 pb) se produjo un descenso drástico en la actividad hasta valores similares a los del control sin promotor, tanto en fuente de carbono fermentable como no fermentable. La región que se extiende entre las posiciones -287 y -255 pb no contiene supuestos sitios

de unión para factores transcripcionales conocidos implicados en la activación general de la transcripción de genes glucolíticos.

5. Mediante análisis de *Northern blot* se comprobó que el gen *KIFBA1* no está sometido a represión por glucosa ni a inducción por lactato. También se pudo determinar que no existe ninguna conexión entre la expresión del gen de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa y la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en *K. lactis*. La expresión transcripcional de *KIFBA1* no está regulada por los niveles de calcio ni inducida por estrés térmico, estrés oxidativo o por la ausencia de aminoácidos, fosfato o amonio. Asimismo, el gen *KIFBA1* no es un gen *LOT* (inducido por un descenso de la temperatura), tampoco se induce por un incremento de la temperatura. La expresión de *KIFBA1* es invariable hasta una absorbancia a 600 nm de 2 disminuyendo posteriormente a mayores densidades celulares. La medida de la actividad específica fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa mostró la ausencia de otros mecanismos de regulación post-transcripcional en estas mismas condiciones.

Además, se ha demostrado que el gen *KIFBA1* está regulado por oxígeno, pues se induce cuando se produce un cambio de condiciones iniciales aerobias a hipóxicas. También se observa un descenso de la expresión cuando se pasa de condiciones iniciales hipóxicas a aerobias. Esta regulación se produce sólo durante la fase de adaptación pues a largo plazo el gen *KIFBA1* se expresa por igual en condiciones aerobias o condiciones hipóxicas. Similares resultados se obtuvieron al medir la actividad β -galactosidasa del transformante con el promotor de 305 pb del gen *KIFBA1* fusionado al gen *lacZ* en las mismas condiciones. Esta regulación por oxígeno no se observó para otros genes glucolíticos como *RAG5* (hexoquinasa), *RAG2* (fosfoglucoasa isomerasa), *GAP1* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *PGK* (fosfoglicerato quinasa) de *K. lactis*.

Mediante análisis de *Northern blot* y *PCR* en Tiempo Real se comprobó que la regulación por oxígeno del gen *KIFBA1* es dependiente de hemo, pues la expresión es mayor en un mutante deficiente en la biosíntesis de hemo.

6. Se ha producido fructosa-1,6-bisfosfato a partir de lactosa empleando una cepa salvaje de *K. lactis* Y1140 y una cepa recombinante de *S. cerevisiae* transformada con un plásmido de secreción de β -galactosidasa. Tanto para la cepa salvaje como para la recombinante la mayor concentración de fructosa-

1,6-bisfosfato se produjo en las células permeabilizadas con tolueno. La cepa salvaje de *K. lactis* produjo un máximo de $0,36\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de fructosa-1,6-bisfosfato frente a un $0,06\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de la cepa recombinante de *S. cerevisiae*. En ambos casos también se produjo etanol.

7. El inserto del clon aislado conteniendo el gen *KINDII*, que codifica para la NADH:ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial interna de la levadura *K. lactis*, se secuenció pudiéndose determinar, mediante análisis “*in silico*” de la secuencia, que consta de una región promotora de 903 pb, una región terminadora de 1117 pb y una *ORF* de 1557 pb que codifican para una proteína de 519 aminoácidos. Esta proteína tiene una secuencia N-terminal de 25 aminoácidos que coincide con la señal de importe hacia la mitocondria y dos consensos para la unión de coenzimas (NADH y FAD), su peso molecular estimado es de 57,4 kDa y presenta un 72% de identidad y un 84% de positivos con la proteína NADH:ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial interna de *S. cerevisiae*.
8. Se ha comprobado la funcionalidad del gen *KINDII* en *S. cerevisiae* mediante la complementación *in vivo* de las cepas mutantes BY4741 *NDII::kanMX4* y BY4742 *NDII::kanMX4*, pues el gen *KINDII* fue capaz de complementar la falta de crecimiento en lactato de dichos mutantes tanto en monocopia como en multicopia. Estos resultados confirmaron que el gen *KINDII* codifica para una NADH:ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial interna. También se demostró que la región promotora de 400 pb del gen *KINDII* es funcional en *S. cerevisiae*.
9. Mediante ensayos de *Northern blot* se pudo comprobar la no existencia de hibridación heteróloga entre el gen *KINDII* y su homólogo en *S. cerevisiae* y que el gen *KINDII* disminuye su expresión en medios con 2% de glucosa.
10. Mediante ensayos de actividad β -galactosidasa realizados con diferentes delecciones unidireccionales del promotor del gen *KINDII* fusionadas al gen *lacZ* de *E. coli* se comprobó que las fusiones que comprenden desde -866 y -805 pb del ATG muestran una menor actividad en glucosa al 2% y una inducción por lactato que desaparecen en la fusión que comprende desde -700 pb del ATG. A partir de esta última fusión y hasta la fusión considerada como promotor mínimo, las actividades en glucosa al 0,5% y 2% fueron similares y superiores a la actividad en lactato, a medida que se eliminaba un

fragmento más grande del promotor del gen, los valores de actividad (sobre todo en glucosa) disminuían progresivamente. En las fusiones que comprenden desde -408, -300 y -207 pb del ATG, las actividades en glucosa y lactato se igualaron.

La fusión al promotor mínimo de los dos primeros consensos encontrados en el promotor para la unión de Adr1p mostró un incremento de la actividad en lactato al 2% sugiriendo que dichos consensos podrían intervenir en la inducción por lactato. Del mismo modo se observó un aumento de la actividad en glucosa cuando se fusionó al promotor mínimo el único consenso de unión para Rap1p y el primer consenso de unión para Gcr1p, sugiriendo que podrían ser funcionales en esta fusión. Mediante experimentos de *PCR* en Tiempo Real, se comprobó que la expresión transcripcional del gen *KIND11* en lactato desciende 1,43 veces en una cepa mutante *K1Δhap3* con respecto a la cepa salvaje sugiriendo que el consenso encontrado en el promotor de *KIND11* para la unión del factor transcripcional Hap2/3/4p también podría ser funcional.

Con la fusión del promotor entero se pudo comprobar que el gen *KIND11* no está regulado por choque térmico, por estrés oxidativo ni por limitación de nitrógeno.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- ADAM, A.C., PRIETO, J.A., RUBIO-TEIXEIRA, M. & POLAINA, J. (1999). Construction of a lactose-assimilating strain of baker's yeast. *Yeast*, **15**: 1299-1305.
- ADAMS, A., GOTTSCHLING, D. E. & STEARNS, T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- ADRIAN, G. S., McCAMMON, M. T., MONTGOMERY, D. L. & DOUGLAS, M. G. (1986). Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.*, **6**: 626-634.
- ALBERTI, A., GOFFRINI, P., FERRERO, I. & LODI, T. (2000). Cloning and characterization of the lactate-specific inducible gene *KICYB2*, encoding the cytochrome b₂ of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **16**: 657-665.
- ALEFOUNDER, P. R., BALDWIN, S. A., PERHAM, R. N. & SHORT, N. J. (1989). Cloning, sequence analysis and over-expression of the gene for the class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **257**: 529-534.
- ALEXANDER, M. A. & JEFFRIES, T. W. (1990). Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, **12**: 2-19.
- ALI, M., RELLOS, P. & COX, T. M. (1998). Hereditary fructosa intolerante. *J. Med. Genet.*, **5**: 353-365.
- ALVES, J. C. F., SANTOS, R. C. V., CASTAMAN, T. A. & DE OLIVEIRA, J. R. (2004). Anti-inflammatory effects of fructosa-1,6-bisphosphate on carrageenan-induced pleurisy in rat. *Pharmacol. Res.*, **49**: 245-248.
- ANTUNES, D. F., JUNIOR, C. G. S. & JUNIOR, M. A. M. (2000). A simple and rapid method for lithium acetate-mediated transformation of *Kluyveromyces marxianus* cells. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**: 653-654.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. (1995). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc.
- BAI, Y., HÁJEK, P., CHOMYN, A., CHAN, E., SEO, B. B., MATSUNO-YAGI, A., YAGI, T. & ATTARDI, G. (2001). Lack of complex I activity in human cells carrying a mutation in mtDNA-encoded ND4 subunit is corrected by de *Saccharomyces cerevisiae* NADH-quinone oxidoreductase (*ND1*) gene. *J. Biol. Chem.*, **276**: 38808-38813.

- BAKER, H. V. (1986). Glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence of *GCR1*, null mutants, and evidence for expression. *Mol. Cell. Biol.*, **6**: 3774-3784.
- BAKKER, B. M., BRO, C., KÖTTER, P., LUTTIK, M. A. H., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (2000). The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **182**: 4730-4737.
- BAKKER, B. M., OVERKAMP, K. M., VAN MARIS, A. J. A., KÖTTER, P., LUTTIK, M. A. H., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**: 15-37.
- BAR, D., GOLBIK, R., HÜBNER, G., LILIE, H., MÜLLER, E-C., NAUMANN, M., OTTO, A., REUTER, R., BREUNIG, K. D. & KRIEGEL, T. M. (2003). The unique hexokinase of *Kluyveromyces lactis*. *J. Biol. Chem.*, **278**: 39280-39286.
- BAR, J., SCHELLENBERGER, W. & KOPPERSCHLÄGER, G. (1997). Purification and characterization of phosphofructokinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **13**: 1309-1317.
- BARNETT, J. A., PAYNE, R. W. & YARROW, D. (1990). Yeast: characteristics and identification, second ed., Cambridge University Press, Cambridge.
- BARRIENTOS, A. (2003). Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life*, **55**: 83-95.
- BECERRA, M. (1995). Construcción de un plásmido de secreción de β -galactosidasa y estudio de su expresión en *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña.
- BECERRA, M., DÍAZ PRADO, S., CERDÁN, E. & GONZÁLEZ SISO, M. I. (2001a). Heterologous *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase secretion by *Saccharomyces cerevisiae* super-secreting mutants. *Biotechnol. Lett.*, **23**: 33-40.
- BECERRA, M., DÍAZ PRADO, S., GONZÁLEZ SISO, M. I. & CERDÁN, M. E. (2001b). New secretory strategies for *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Protein Eng.*, **14**: 379-386.
- BECERRA, M., DÍAZ PRADO, S., RODRÍGUEZ-BELMONTE, E., CERDÁN, M. E. & GONZÁLEZ SISO, M. I. (2002a). Metabolic engineering for direct lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, **24**: 1391-1396.

- BECERRA, M., LOMBARDÍA-FERREIRA, L., HAUSER, N. C., HOHEISEL, J. D., TIZÓN, B. & CERDÁN, M. E. (2002b). The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. *Mol. Microbiol.*, **43**: 545-555.
- BECERRA, M., TARRÍO, N., GONZÁLEZ-SISO, M. I. & CERDÁN, E. (2004). Genome-wide análisis of *Kluyveromyces lactis* in wild type and *rag2* mutant strains. *Genome*, en prensa.
- BEHAL, R. H., BROWNING, K. S. & REED, L. J. (1989). Nucleotide and deduced amino acid sequence of the alpha subunit of yeast pyruvate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 941-946.
- BERRUGA, M.I., JASPE, A. & SANJOSE, C. (1997). Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. *Int. Biodeter. Biodeg.*, **40**: 119-123.
- BERRY, A. & MARSHALL, K.E. (1993). Identification of zinc-binding ligands in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **318**: 11-16.
- BHOITE, L. T., ALLEN, J. M., GARCÍA, E., THOMAS, L. R, GREGORY, I. D., VOTH, W. P., WHELIHAN, K., ROLFES, R.J. & STILLMAN, D. J. (2002). Mutations in the *pho2(bas2)* transcription factor that differentially affect activation with its partner proteins *bas1*, *pho4* and *swi5*. *J. Biol. Chem.*, **277**: 37612-37618.
- BIANCHI, M. M., TIZZANI, L., DESTRUELLE, M., FRONTALI, L. & WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. (1996). The "petite negative" yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Mol. Microbiol.*, **19**: 27-36.
- BILLARD, P., DUMOND, H. & BOLOTIN-FUKUHARA, M. (1997). Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.*, **257**: 62-70.
- BJORKLOF, K., ZICKERMANN, V & FINEL, M. (2000). Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues. *FEBS Lett.*, **467**: 105-110.
- BLAISONNEAU, J., FUKUHARA, H. & WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. (1997). The *Kluyveromyces lactis* equivalent of casein kinase I is required for the transcription of the gene encoding the low-affinity glucose permease. *Mol. Gen. Genet.*, **253**: 469-477.

- BLÁZQUEZ, M. A., LAGUNAS, R., GANCEDO, C. & GANCEDO, J. M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.*, **329**: 51-54.
- BLOM, N. S., TETREAULT, S., COULOMBE, R. & SYGUSCH, J. (1996). Novel active site in *Escherichia coli* fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Nat. Struct. Biol.*, **3**: 856-862.
- BOJUNGA, N. & ENTIAN, K-D. (1999). Cat8p, the activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, regulates carbon source-dependent expression of NADP-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase (Idp2p) and lactate permease (Jen1p). *Mol. Gen. Genet.*, **262**: 869-875.
- BOLES, E. & ZIMMERMANN, F. K. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase and fructose bisphosphate aldolase can be replaced functionally by the corresponding enzymes of *Escherichia coli* and *Drosophila melanogaster*. *Curr. Genet.*, **23**: 187-191.
- BOLES, E., GOEHLMANN, H. W. H & ZIMMERMAN, F. K. (1996). Cloning of a second gene encoding 6-phosphofructo-2-kinase in yeast, and characterization of mutant strains without fructose-2,6-bisphosphate. *Mol. Microbiol.*, **20**: 65-76.
- BOLES, E. & HOLLENBERG, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**: 85-111.
- BOLES, E., SCHULTE, F., MIOGA, T., FREÍDLE, K., SCHLUTER, E., SIMMERMANN, F. K., HOLLENBERG, C. P. & HEINISCH, J-J. (1997). Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *J. Bacteriol.*, **179**: 2987-2993.
- BOLES, E. (1998). The role of glucose 6-phosphate in yeast glycolysis. *Trends Microbiol.*, **6**: 472-473.
- BOLIVAR, F. & BACKMAN, K. (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol.*, **68**: 245.
- BOLOTIN-FUKUHARA, M., TOFFANO-NIOCHE, C., ARTIGUENAVE, F., DUCHATEAU-NGUYEN, G., LEMAIRE, M., MARMEISSE, R., MONTROCHER, R., ROBERT, C., TERMIER, M., WINCKER, P. & WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. (2000). Genomic exploration of hemiascomycetous yeast: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett.*, **487**: 66-70.

- BOTSTEIN, D., FALCO, S. C., STEWART, S. E., BRENNAN, M., SCHERER, S., STICHCAMB, D. T., STRUHL, K. & DAVIS, R. W. (1979). Sterile host yeast (*SHY*): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene*, **8**: 17-24.
- BOURGAREL, D., NGUYEN, C.-C., & BOLOTIN-FUKUHARA, M. (1999). HAP4, the glucosa-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.*, **31**: 1205-1215.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BRANDT, U. (1997). Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**: 79-91.
- BRANDT, U. (1999). Proton translocation in the respiratory chain involving ubiquinone: a hypothetical semiquinone switch mechanism for complex I. *Biofactors*, **9**: 95-101.
- BREUNIG, K. D. (2000). Regulation of transcription activation by Gal4p. *Food Technol. Biotechnol.*, **38**: 287-293.
- BREUNIG, K. D., BOLOTIN-FUKUHARA, M., BIANCHI, M. M., BOURGAREL, D., FALCONE, C., FERRERO, I., FRONTALI, L., GOFFRINI, P., KRIJGER, J.-J., MAZZONI, C., MILKOWSKI, C., STEENSMA, H.Y., WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. & ZEEMAN, A.M. (2000). Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**: 771-780.
- BRINDLE, P. K., HOLLAND, J. P., WILLET, C. E., INNIS, M. A. & HOLLAND, M. J. (1990). Multiple factors bind the upstream activation sites of the yeast enolase genes ENO1 and ENO2: ABF1 protein, like repressor activator protein RAP1, binds cis-acting sequences which modulate repression or activation of transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 4872-4885.
- BRONS, J. F., JONG, M., VALENS, M., GRIVELL, L. A., BOLOTIN-FUKUHARA, M. & BLOM, J. (2002). Dissection of the promoter of the *HAP4* gene in *S. cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast*, **19**: 923-932.

- BUCKHOLZ, R.G. & GLEESON, M.A.G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology*, **9**: 1067-1072.
- BUDDE, S. M., VAN DEN HEUVEL, L. P., JANSSEN, A. J., SMEETS, R. J., BUSKENS, C. A., DE MEIRLEIR, L., VAN COSTER, R., BAETHMANN, M., VOIT, T., TRIJBELS, J. M. & SMEITINK, J. A. (2000). Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**: 63-68.
- BUSTIN, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*, **29**: 23-39.
- CARDOSO, L.R., SANTOS, O.F.P., BOIM, M.A., BARROS, E.G., AJZEN, H. & SCHOR, N. (1996) Fructose-1,6-diphosphate: potential protection in cyclosporine-induced renal impairment. *Nephron*, **72**: 67-71.
- CARNEIRO, P., DUARTE, M. & VIDEIRA, A. (2004). The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1608**: 45-52.
- CAVALLINI, L., DEANA, R., FRANCESCONI, M.A. & ALEXANDRE, A. (1992) Fructose-1,6-diphosphate inhibits platelet activation. *Biochem. Pharmacol.*, **43**: 1539-1544.
- CERDÁN VILLANUEVA, M.E., FREIRE PICOS, M.A., GONZÁLEZ SISO, M.I. & RODRÍGUEZ TORRES, A.M. (1997). *Biología Molecular, Avances y Técnicas Generales*. Servicio de publicaciones Universidade da Coruña.
- CHAMBERS, A. (1997). Phosphoglycerate kinase. En: *Yeast sugar metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications* (Zimmermann, F. K. & Entian, k. d., Eds.), pp. 141-156. Technomic. Lancaster.
- CHEN, X. J. & FUKUHARA, H. (1988). A gene fusion system using the aminoglycoside 3'-phosphotransferase gene of the kanamycin-resistance transposon Tn903: use in the yeast *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **69**: 181-192.
- CHEN, X. J., WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. & FUKUHARA, H. (1992a). Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.*, **233**: 97-105.
- CHEN, D. C., YANG, B. C. & KUO, T. T. (1992b). One step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.*, **21**: 83-84.

- CHIANG, Y-C., KOMARNITSKY, P., CHASE, D. & DENIS, C. L. (1996). ADRI activation domains contact the histone acetyltransferase GCN5 and the core transcriptional factor TFIIB. *J. Biol. Chem.*, **271**: 32359-32365.
- CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z. M., LIGHTOWLERS, R. N. & TURNBULL, D. M. (1995). Gene therapy for mitochondrial DNA defects: is it possible?. *Gene Ther.*, **2**: 311-316.
- CHURCH, G.M. & GILBERT, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1991-1995.
- CLIFTON, D. & FRAENKEL, D. G. (1982). Mutant studies of yeast phosphofructokinase. *Biochemistry*, **21**: 1935-1942.
- COHEN, S.N., CHANG, A.C.Y. & HSU, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**: 2110-2114.
- COMPAGNO, C., RANZI, B. M. & MARTEGANI, E. (1991). The promoter of *Saccharomyces cerevisiae* FBA1 gene contains a single positive upstream regulatory element. *FEBS Lett.*, **293**: 97-100.
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B. M. & MARTEGANI, E. (1992a). Highly efficient bioconversion of glucose into fructose diphosphate with fed-batch-grown *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**: 535-537.
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B. M. & MARTEGANI, E. (1992b). Production of fructose diphosphate by bioconversion of molasses with *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Lett.*, **14**: 495-498.
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B.M. & MARTEGANI, E. (1993a). Bioconversion of lactose/whey to fructose diphosphate with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**: 398-400.
- COMPAGNO, C., TURA, A., RANZI, B.M., ALBERGHINA, L. & MARTEGANI, E. (1993b). Copy number modulation in an autoselection system for stable plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.*, **9**: 594-599.
- COMPAGNO, C., BOSCHI, F., DALEFFE, A., PORRO, D. & RANZI, B. M. (1999). Isolation, nucleotide sequence and physiological relevance of the gene encoding triose phosphate isomerase from *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4216-4219.

- COMPAGNO, C., BRAMBILLA, L., CAPITANIO, D., BOSCHI, F., RANZI, B. M. & PORRO, D. (2001). Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast*, **18**: 663-670.
- COOPER, S. J., LEONARD, G. A., McSWEENEY, S. M., THOMPSON, A. W., NAISMITH, J. H., QAMAR, S., PLATER, A., BERRY, A. & HUNTER, W. N. (1996). The crystal structure of a class-II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold. *Structure*, **4**: 1303-1315.
- DALBY, A., DAUTER, Z. & LITTLECHILD, J.A. (1999). Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications. *Protein Sci.*, **8**: 291-297.
- DAVIDSON, J. F. & SCHIESTL, R. H. (2001). Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 8483-8489.
- DE GREY A. D. (2000). Mitochondrial gene therapy: an arena for the biomedical use inteins. *Trends Biotechnol.*, **18**: 394-399.
- DE RISI, J. L., IYER, V. R. & BROWN, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**: 680-686.
- DE VRIES, S. & GRIVELL, L. A. (1988). Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase. from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **176**: 377-384.
- DE VRIES, S. & MARRES, C. A. M. (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **895**: 205-239.
- DE VRIES, S., VAN WITZENBURG, R., GRIVELL, L. A. & MARRES, C. A. M. (1992). Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **203**: 587-592.
- DEVLIN, C., TICE-BALDWIN, K., SHORE, D. & ARNDT, K. T. (1991). RAPI is required for BAS1/BAS2- and GCN4-dependent transcription of the yeast HIS4 gene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 3642-3651.
- DÍAZ PRADO, S., TARRÍO, N., CERDÁN, E. & GONZÁLEZ SISO, M.I. (2004). Cloning genes from a library using a clustering strategy and PCR. *Mol. Biotechnol.*, **26**: 35-38.

- DIDERICH, J. A., RAAMSDONK, L. M., KRUCKEBERG, A. L., BERDEN, J. A. & VAN DAM, K. (2001). Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1587-1593.
- DJAFARZADEH, R., HERSCHER, S., ZWICKER, K., RADERMACHER, M., LINDAHL, M., SCHAGGER, H. & BRANDT, U. (2000). Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**: 230-238.
- DOMINGUES, L., DANTAS, M.M., LIMA, N. & TEIXEIRA, J.A. (1999 a). Continuous ethanol fermentation of lactose by recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol. Bioeng.*, **64**: 692-697.
- DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J.A. & LIMA, N. (1999 b). Construction of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* fermenting lactose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 621-626.
- DOMINGUEZ, A., FERMINAN, E., SÁNCHEZ, M., GONZÁLEZ, F. J. PÉREZ-CAMPO, F. M., GARCÍA, S., HERRERO, A. B., SAN VICENTE, A., CABELLO, J., PRADO, M., IGLESIAS, F.J., CHOUPINA, A., BURGUILLO, F. J., FERNÁNDEZ-LAGO, L. & LÓPEZ, M. C. (1998). Non-conventional yeast as hosts for heterologous protein production. *Int. Microbiol.*, **1**(2): 131-142.
- DONOHUE, P. H., FAHLMAN, C. S., BICKLER, P. E., VEXLER, Z. S. & GREGORY, G. A. (2001). Neuroprotection and intracellular Ca²⁺ modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. *Brain Res.*, **917**: 158-166.
- DOVAL, S.S. (1992). Sacarificación del lactosuero con células inmovilizadas de *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña.
- DRAZINIC, C. M., SMERAGE, J. B., LOPEZ, M. C. & BAKER, H. V. (1996). Activation mechanism of the multifunctional transcription factor repressor-activator protein (Rap1p). *Mol. Cell. Biol.*, **16**: 3187-3196.
- DRÖSE, S., ZWICKER, K. & BRANDT, U. (2002). Full recovery of the NADH:ubiquinone activity of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica* by the addition of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**: 65-72.

- DUARTE, M., PETERS, M., SCHULTE, U. & VIDEIRA, A. (2003). The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem. J.*, **371**: 1005-1011.
- EHRINGER, W. D., SU, S., CHIANG, B., STILLWELL, W. & CHIEN, S. (2002). Destabilizing effects of fructose-1,6-bisphosphate on membrane bilayers. *Lipids*, **37**: 885-892.
- ENTIAN, K. D. (1997). Sugar phosphorylation in yeast. En: yeast sugar metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications. (Zimmermann, F. K. & Entian, K. D., Eds.), pp. 67-80. Technomic, Lancaster.
- ERNANDES, J. R., DE MEIRSMAN, C., ROLLAND, F., WINDERICKX, J., DE WINDE, J., BRANDAO, R. L. & THEVELEIN, J. M. (1998). During the initiation of fermentation overexpression of hexokinase PII in yeast transiently causes a similar deregulation of glycolysis as deletion of Tps1. *Yeast*, **14**: 255-269.
- FEARNLEY, I. M., CARROLL, J., SHANNON, R. J., RUNSWICK, M. J., WALKER, J. E. & HIRST, J. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**: 38345-38348.
- FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**: 6-13.
- FELDMAN, H. (2000). Génolevures - a novel approach to "evolutionary genomics". *FEBS Lett.* **487**: 1-2.
- FINEL, M. (1996). Genetic inactivation of the H(+)-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans* is facilitated by insertion of the *ndh* gene from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **393**: 81-85.
- FLORES, C-L., RODRÍGUEZ, C., PETIT, T. & GANCEDO, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**: 507-529.
- FOURNIER, A., FLEER, R., YEH, P. & MAYAUX, J. F. (1990). The primary structure of the 3-phosphoglycerate kinase (*PGK*) gene from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 365.
- FREIRE-PICOS, M. A., GONZÁLEZ-SISO, M. I., RODRÍGUEZ BELMONTE, E., RODRÍGUEZ TORRES, A. M., RAMIL, E. & CERDÁN, M. E. (1994). Codon usage in *Kluyveromyces lactis* and in yeast cytochrome c-encoding genes. *Gene*, **139**: 35-41.

- FREIRE-PICOS, M. A., HOLLENBERG, C. P., BREUNIG, K. D. & CERDÁN, M. E. (1995). Regulation of cytochrome c expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett.*, **360**: 39-42.
- FRIEDRICH, T. (2001). Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**: 169-177.
- FU, Y-H. & MARZLUF, G. A. (1990). *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad.*, **87**: 5331-5335.
- GANCEDO, J. M. & LAGUNAS, R. (1973). Contribution of the pentose phosphate pathway to glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a critical analysis on the use of labelled glucose. *Plant. Sci. Lett.*, **1**: 193-200.
- GANCEDO, C. & SERRANO, R. (1989). Energy yielding metabolism. En: The Yeast. Ed. A. H. Rose & J. S. Harrison. Academic Press, Reino Unido. pp. 205-259.
- GANCEDO, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**: 334-361.
- GASCH, A. P., SPELLMAN, P. T., KAO, C. M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M. B., STORZ, G., BOTSTEIN, D. & BROWN, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell.*, **11**: 4241-4257.
- GIETZ, R. D. & SUGINO, A. (1988). New yeast *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**: 527-534.
- GIETZ, R.D. & WOODS, R.A. (1994). An high efficiency transformation with lithium acetate. (Johnston, J.R., Eds.). IRL Press, Owford, UK. pp. 121-134.
- GODON, C., LAGNIEL, G., LEE, J., BUHLER, J-M., KIEFFER, S., PERROT, M., BOUCHERIE, H., TOLEDANO, M. B. & LABARRE, J. (1998). The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**: 22480-22489.
- GOFFRINI, P., WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. & FERRERO, I. (1991). A phosphoglucose isomerase gene is involved in the *Rag* phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 401-409.
- GONÇALVES, P. & PLANTA, R. J. (1998). Starting up yeast glycolysis. *Trends Microbiol.*, **6**: 314-319.

- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, M., MÉNDEZ-CARRO, C. & CERDÁN, M. E. (1997). Isolation and characterization of the *KIHEM1* gene in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **13**: 961-971.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I., FREIRE-PICOS, M. A. & CERDÁN, M. E. (1996a). Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Kluyveromyces rag2* mutants. *FEBS Lett.*, **387**: 7-10.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I., RAMIL, E., CERDÁN, E. & FREIRE-PICOS, M. A. (1996b). Respiro-fermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb. Technol.*, **18**: 585-591.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I. (1999). La Biotecnología en el tratamiento de residuos industriales. Servicio de publicaciones Universidade da Coruña.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I., FREIRE-PICOS, M. A., RAMIL, E., GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, M., RODRÍGUEZ TORRES, A. & CERDÁN, M. E. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**: 699-705.
- GRAUSLUND, M., LOPES, J. M. & RONNOW, B. (1999). Expression of *GUT1*, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators *Adr1p*, *Ino2p* and *Ino4p* and the negative regulator *Opi1p* in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Res.*, **27**: 4391-4398.
- GUARENTE, L. (1983). Yeast promoters and *lac Z* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, **101**: 181-191.
- HAW, R., YARRAGUDI, A. D. & UEMURA, H. (2001). Isolation of *GCR1*, a major transcription factor of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **18**: 729-735.
- HEINISCH, J. (1986). Isolation and characterization of the two structural genes coding for phosphofructokinase in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **202**: 75-82.
- HEINISCH, J., KIRCHRATH, L., LIESEN, T., VOGELSANG, K. & HOLLENBERG, C. P. (1993). Molecular genetics of phosphofructokinase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.*, **8**: 559-570.
- HEINISCH, J. J., BOLES, E. & TIMPEL, C. (1996). A yeast phosphofructokinase insensitive to the allosteric activator fructose 2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15928-15933.

- HERRERO, P., GALINDEZ, J., RUÍZ, N., MARTÍNEZ-CAMPA, C. & MORNO, F. (1995). Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXK1*, *HXK2* and *GLK1* genes. *Yeast*, **11**: 137-144.
- HOFFMAN, C. S. & WINSTON, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**: 267-272.
- HOHMANN, S. (1993). Characterization of the *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **241**: 657-666.
- HOHMANN, S. (1997). Pyruvate decarboxylases. En: Yeast sugar metabolism. Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications (Zimmermann, F. K. & Entian, K. D., Eds.), pp. 187-212. Technomic, Lancaster.
- HOLLAND, M. J. & HOLLAND, J. P. (1978). Isolation and identification of yeast messenger nucleic acids coding for enolase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, **17**: 4900-4907.
- HUTCHESON, A.E., RAO, M.R., OLINDE, K.D. & MARKOV, A.K. (1995) Myocardial toxicity of cyclosporin A: inhibition of calcium ATPase end nitric oxide synthase activities and attenuation by fructose-1,6-diphosphate *in vitro*. *Res. Com. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **89**: 17-26.
- INCHAURRONGO, V. A., YANTORNO, O. M. & VOGET, C. E. (1994). Yeast growth and β -galactosidase production during aerobic batch cultures in lactose limited synthetic medium. *Proc. Biochem.*, **29**: 47-54.
- ISE, W., HAIKER, H. & WEISS, H. (1985). Mitochondrial translation of subunits of the rotenone-sensitive NADH:ubiquinone reductase in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, **4**: 2075-2080.
- ITO, H., FUKUDA, Y., MURATA, K. & KIMURA, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**: 163-168.
- JACOBY, J. J. & HEINISCH, J. J. (1997). Analysis of a transketolase gene from *Kluyveromyces lactis* reveals that the yeast enzymes are more related to transketolases of prokaryotic origins than to those of higher eukaryotes. *Curr. Genet.*, **31**: 15-21.
- JACOBY, J., HOLLENBERG, P. & HEINISCH, J. J. (1993). Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Mol. Microbiol.*, **10**, 867-876.

- JAKOBSEN, B. K. & PELHAM, H. R. (1991). A conserved heptapeptide restrains the activity of the yeast heat shock transcription factor. *EMBO J.*, **10**: 369-375.
- JAMES, P., HALLADAY, J. & CRAIG, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**: 1425-1436.
- JEONG, Y.S., VIETH, W.R. & MATSUURA, T. (1991). Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in an immobilized yeast membrane bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**: 587-590.
- JONG, S. C. & EDWARDS, M. J. (1990). American type culture collection. Catalogue of yeasts, 18th ed., Parklawn Drive. Rockville-Maryland.
- JOSEPH-HORNE, T., HOLLOMON, D. W. & WOOD, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**: 179-195.
- JOUANNEAU, Y., JEONG, H. S., HUGO, N., MEYER, C. & WILLISON, J. C. (1998). Overexpression in *Escherichia coli* of the *rnf* genes from *Rhodobacter capsulatus* -characterization of two membrane-bound iron- sulphur proteins. *Eur. J. Biochem.*, **251**: 54-64.
- JURICA, M. S., MESECAR, A., HEATH, P. J., SHI, W., NOWAK, T. & STODDARD, B. L. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*, **6**: 195-210.
- KACSER, H. & BURNS, J. A. (1979). Molecular democracy: who shares the controls?. *Biochem. Soc. Trans.*, **7**: 1149-1160.
- KARINE, B., HELÉNE, B., MOULIN, J. G. & GALZY, P. (1994). Physiological approach to heterologous human serum albumin production by *Kluyveromyces lactis* in chemostat culture. *Yeast*, **10**: 1297-1303.
- KATZ, R., KILPATRICK, L. & CHANCE, B. (1971). Acquisition and loss of rotenone sensitivity in *Torulopsis utilis*. *Eur. J. Biochem.*, **21**: 301-307.
- KERSCHER, S. J., OKUN, J. G. & BRANDT, U. (1999). A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell. Sci.*, **112**: 2347-2354.
- KERSCHER, S. J., ESCHEMANN, A., OKUN, P. M. & BRANDT, U. (2001). External alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase redirected to the internal face of the mitochondrial inner membrane rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell. Sci.*, **114**: 3915-3921.

- KERSCHER, S., DRÖSE, S., ZWICKER, K., ZICKERMANN, V. & BRANDT, U. (2002). *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**: 83-91.
- KIERS, J., ZEEMAN, A-M., LUTTIK, M., THIELE, C., CASTILLO, J. I., STEENSMA, H. Y., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (1998). Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast*, **14**: 459-469.
- KIETZMANN, T., FREIMANN, S., BRATKE, J. & JUNGERMANN, K. (1996). Regulation of the gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase and the glycolytic aldolase A expression by O₂ in rat hepatocyte cultures. Involvement of hydrogen peroxide as mediator in the response to O₂. *FEBS Lett.*, **388**: 228-232.
- KIM, H., CERTA, U., DÖBELI, H., JAKOB, P. & HOL, W.G.J. (1998). Crystal structure of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*, **37**: 4388-4396.
- KIM, C. S., JI, E-S & OH, D-K. (2003). Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, **25**: 1769-1774.
- KITAJIMA-IHARA, T. & YAGI, T. (1998). Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells. *FEBS Lett.*, **421**: 37-40.
- KLEBE, R. J., HARRIS, J. V., SHARP, Z.D. & DOUGLAS, M.G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, **25**: 333-341.
- KOLAROV, J., KOLAROVA, N. & NELSON, N. (1990). A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J. Biol. Chem.*, **265**: 12711-12716.
- KOWAL, J., CREMONA, T. & HORECKER, B. L. (1966). Fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Candida utilis*: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**: 13-23.
- KUMAR, V., RAMAKRISHNAN, S., TEERI, T.T., KNOWLES, J.K.C. & HARTLEY, B.S. (1992). *Saccharomyces cerevisiae* cells secreting an *Aspergillus niger* β -galactosidase grow on whey permeate. *Biotechnology*, **10**: 82-85.

- KUSHNER, S.R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI derived plasmids. En: *Genetic Engineering* (Boyer, H.W. & Nicosia, S., Eds.), Elsevier. Amsterdam. pp. 17-23.
- KWAST, K. E., LAI, L-C., MENDA, N., JAMES, III D. T., AREF, S. & BURKE, P. V. (2002). Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J. Bacteriol.*, **184**:250-265.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-683.
- LAGUNAS, R. (1993). Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **2**: 221-228.
- LAMAS-MACEIRAS, M., CERDÁN, M.E. & FREIRE-PICOS, M.A. (1999). *Kluyveromyces lactis* HIS4 transcriptional regulation: similarities and differences to *Saccharomyces cerevisiae* HIS4 gene. *FEBS Lett.*, **458**: 72-76.
- LARSON, G. P., CASTANOTTO, D., ROSSI, J. J. & MALAFA, M. P. (1994). Isolation and functional analysis of a *Kluyveromyces lactis* RAPI homologue. *Gene*, **150**: 35-41.
- LARSSON, C., NILSSON, A., BLOMBERG, A. & GUSTAFSSON, L. (1997). Glycolytic flux is conditionally correlated with ATP concentration in *Saccharomyces cerevisiae*: a chemostat study under carbon- or nitrogen-limiting conditions. *J. Bacteriol.*, **179**: 7243-7250.
- LARSSON, C., PAHLMAN, I. L., ANSELL, R., RIGOLET, M., ADLER, L. & GUSTAFSSON, L. (1998). The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**: 347-357.
- LARSSON, C., PAHLMAN, I-L. & GUSTAFSSON, L. (2000). The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **16**: 797-809.
- LAWSON, J. E. & DOUGLAS, M. G. (1988). Separate genes encode functionally equivalent carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **263**: 14812-14818.
- LEMAIRE, M., GUYON, A., BETINA, S. & WESOLOWSKI-LOUVEL, M. (2002). Regulation of glycolysis by casein kinase I (Rag8p) in *Kluyveromyces lactis* involves a DNA-binding protein, Sck1p, a homologue of Sgc1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **40**: 355-364.

- LILLEHAUG, J.R. & KLEPPE, K. (1975). Effect of salts and polyamines on T₄ polynucleotide kinase. *Biochemistry*, **14**: 1225-1230.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method. *Methods*, **25**: 402-408.
- LODI, T., GOFFRINI, P., BOLONDI, I. & FERRERO, I. (1998). Transcriptional regulation of the *KIDLD* gene, encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase in *Kluyveromyces lactis*: effect of *Klhap2* and *fog* mutations. *Curr. Genet.*, **34**: 12-20.
- LOGUERCIO, C, NARDONE, G., SICOLO, P., CUOMO, R., BLANCO, C. & BUDILLON, G. (1996) Intravenous load of fructose and fructose 1,6-diphosphate: effects on uricemia in patients with nonalcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **91**: 559-564.
- LOMBARDÍA, L. J., BECERRA, M., RODRÍGUEZ-BELMONTE, E., HAUSER, N. C. & CERDÁN, M. E. (2002). Genome-wide analysis of yeast transcription upon calcium shortage. *Cell. Calcium*, **32**: 83-91.
- LÓPEZ, M. C., SMERAGE, J. B. & BAKER, H. V. (1998). Multiple domains of repressor activator protein 1 contribute to facilitated binding of glycolysis regulatory protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 14112-14117.
- LÓPEZ, M.C. & BAKER, H.V. (2000). Understanding the growth phenotype of the yeast *gcr1* mutant in terms of global genomic expression patterns. *J. Bacteriol.*, **182**: 4970-4978.
- LÓPEZ, M. L., REDRUELLO, B., VALDÉS, E., MORENO, F., HEINISCH, J. J. & RODICIO, R. (2004). Isocitrate lyase of the yeast *Kluyveromyces lactis* is subject to glucosa repression but not to catabolite inactivation. *Curr. Genet.*, **44**: 305-316.
- LUTTIK, M. A. H., OVERKAMP, K. M., KÖTTER, P., DE VRIES, S., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.*, **273**: 24529-24534.
- MacDONALD, A. & STOREY, K. B. (2002). Purification and characterization of fructose bisphosphate aldolase from the ground squirrel, *Spermophilus lateralis*: enzyme role in mammalian hibernation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **408**: 279-285.
- MAI, B., MILES, S. & BREEDEN, L.L. (2002). Characterization of the ECB binding complex responsible for the M/G(1)-specific transcription of CLN3 and SWI4. *Mol. Cell. Biol.*, **22**: 430-441.

- MAITRA, P. K. (1971). Glucose and fructose metabolism in a phosphoglucoseisomeraseless mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **107**: 759-769.
- MANDE, S. S., PARSONAGE, D., CLAIBORNE, A. & HOL W. G. (1995). Crystallographic analyses of NADH peroxidase Cys42Ala and Cys42Ser mutants: active site structures, mechanistic implications, and an unusual environment of Arg 303. *Biochemistry*, **34**: 6985-6992.
- MARKOV, A.K., FARIAS, L.A., BENNETT, W.S., SUBRAMONY, C. & MIHAS, A.A. (1991) Prevention of galactosamine-induced hepatotoxicity in rats with fructose-1,6-diphosphate. *Pharmacology*, **43**: 310-317.
- MARKOV, A. K., CAUSEY, A. L., DIDLAKE, R. H. & LEMOS, L. B. (2002). Prevention of alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary edema with fructose-1,6-diphosphate. *Exp. Lung Res.*, **28**: 285-299.
- MARRES, C. A. M., DE VRIES, S. & GRIVELL, L. A. (1991). Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **195**: 857-862.
- MARSH, J. J. & LEBHERZ, H. G. (1992). Fructose-bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 110-113.
- MARZLUF, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 17-32.
- MATIC, S., WIDELL, S., AKERLUND, H-E. & JOHANSSON, G. (2001). Interaction between phosphofructokinase and aldolase from *Saccharomyces cerevisiae* studied by aqueous two-phase partitioning. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **751**: 341-348.
- MATSUSHITA, K., OHNISHI, T. & KABACK, H. R. (1987). NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*, **26**: 7732-7737.
- MATSUSHITA, K., OTOFUJI, A., IWAHASHI, M., TOYAMA, H. & ADACHI, O. (2001). NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH. *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**: 271-276.

- MAZZONI, C., SALIOLA, M. & FALCONE, C. (1992). Ethanol-induced and glucose-insensitive alcohol dehydrogenase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.*, **6**: 2279-2286.
- McALISTER, L. & HOLLAND, M. J. (1982). The targeted deletion of a yeast enolase structural gene. Identification and isolation of yeast enolase isozymes. *J. Biol. Chem.*, **257**: 7181-7188.
- McALISTER, L. & HOLLAND, M. J. (1985). Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases genes. *J. Biol. Chem.*, **260**: 15019-15027.
- MEADEN, P. G., DICKINSON, F. M., MIFSUD, A., TESSIER, W., WESTWATER, J., BUSSEY, H. & MIDGLEY, M. (1997). The *ALD6* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a cytosolic Mg (2+)-activated acetaldehyde dehydrogenase. *Yeast*, **13**: 1319-1327.
- MEDENTSEV, A. G., ARINBASAROVA, A. Y., GOLOVCHENKO, N. P. & AKIMENKO, V. K. (2002). Involvement of the alternative oxidase in respiration of *Yarrowia lipolytica* mitochondria is controlled by the activity of the cytochrome pathway. *FEMS Yeast Res.*, **2**: 519-524.
- MELO, A. M., DUARTE, M., MOLLER, I. M., PROKISCH, H., DOLAN, P. L., PINTO, L., NELSOR, M. A. & VIDEIRA, A. (2001). The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **276**: 3947-3951.
- MICHAL, G. & BEUTLER, H-O. (1974). D-Fructose-1,6-disphosphate, dihydroxyacetone phosphate and glyceraldehydes-3-phosphate. *Meth. Enzym. Anal.*, **3**: 1315-1319.
- MICHIELS, C., MINET, E., MOTTET, D. & RAES, M. (2002). Regulation of gene expression by oxygen: NF- κ B and HIF-1, two extremes. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 1231-1242.
- MIKSCH, G., NEITZEL, R., FIEDLER, E., FRIEHS, K., & FLASCHEL, E. (1997). Extracellular production of a hybrid β -glucanase from *Bacillus* by *Escherichia coli* under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**: 120-126.
- MILKOWSKI, C., KRAMPE, S., WEIRICH, J., HASSE, V., BOLES, E. & BREUNIG, K. D. (2001). Feedback regulation of glucose transporter gene transcription in *Kluyveromyces lactis* by glucose uptake. *J. Bacteriol.*, **183**: 5223-5229.

- MILLER, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- MIRAN, S. G., LAWSON, J. E. & REED, L. J. (1993). Characterization of the *PDH β 1*, the structural gene for the pyruvate dehydrogenase β subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 1252-1256.
- MOLLER, I. M., SCHWITZGUEBEL, J. P. & PALMER, J. M. (1982). Binding and screening by cations and the effect on exogenous NAD(P)H oxidation in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **123**: 81-88.
- MOLLER, I. M., RASMUSSEN, A. G. & FREDLUND, K. M. (1993). NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductases in plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**: 377-384.
- MORLINO, G. B., TIZZANI, L., FLEER, R., FRONTALI, L. & BIANCHI, M. M. (1999). Inducible amplification of gene copy number and heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Env. Microbiol.*, **65**(11): 4808-4813.
- MULDER, W., SCHOLTEN, I. H., NAGELKERKEN, B. & GRIVELL, L. A. (1994a). Isolation and characterization of the linked genes *FPS1* and *QCR8*, coding for farnesyl-diphosphate synthase and the 11 kDa subunit VIII of the mitochondrial bc1-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**: 713-718.
- MULDER, W., SCHOLTEN, I. H., VAN ROON, H. & GRIVELL, L. A. (1994b). Isolation and characterization of the linked genes *APA2* and *QCR7*, coding for Apa4A phosphorylase II and the 14 kDa subunit VII of the mitochondrial bc1-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**: 719-723.
- MULDER, W., SCHOLTEN, I. H. & GRIVELL, L. A. (1995). Distinct transcriptional regulation of a gene coding for a mitochondrial protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* despite similar promoter structures. *Mol. Microbiol.*, **360**: 39-42.
- MÜLLER, S., BOLES, E., MAY, M. & ZIMMERMANN, F. K. (1995). Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **177**: 4517-4519.
- MÜLLER, S., ZIMMERMANN, F. K. & BOLES, E. (1997). Mutant studies of phosphofructo-2-kinases do not reveal an essential role of fructose-2,6-

- bisphosphate in the regulation of carbon fluxes in yeast cells. *Microbiology*, **143**: 3055-3061.
- MÜLLER, S., SANDAL, T., KAMP-HANSEN, P. & DALBOGE, H. (1998). Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **14**: 1267-1283.
- MUNGER, M.A., BOTTI, R.E., GRINBLATT, M.A. & KASMER, R.J. (1994) Effect of intravenous fructose-1,6-diphosphate on myocardial contractility in patients with left ventricular dysfunction. *Pharmacotherapy*, **14**: 522-528.
- MUTOH, N. & HAYASHI, Y. (1994). Molecular cloning and nucleotide sequencing of *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1183**: 550-552.
- NAKAHARA, K., YAMAMOTO, H., MIYAKE, C. & YOKOTA, A. (2003). Purification and characterization of class-I and class-II fructosa-1,6-bisphosphate aldolases from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.*, **44**: 326-333.
- NAKAJIMA, K., KUNIHIRO, S., SANO, M., ZHANG, Y., ETO, S., CHANG, Y-C., SUZUKI, T., JIGAMI, Y. & MACHIDA, M. (2000). Comprehensive cloning and expression analysis of glycolytic genes from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.*, **37**: 322-327.
- NALECZ, M. J., NALECZ, K. A. & AZZI, A. (1991). Purification and functional characterization of the pyruvate (monocarboxylate) carrier from baker's yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim. Biophys. Acta*, **1079**: 87-95.
- NATARAJAN, K., MEYER, M. R., JACKSON, B. M., SLADE, D., ROBERTS, C., HINNEBUSCH, A. G. & MARTON, M. J. (2001). Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during aminoacid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 4347-4368.
- NEIL, H., LEMAIRE, M. & WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. (2004). Regulation of glycolysis in *Kluyveromyces lactis*: role of *KIGCR1* and *KIGCR2* in glucose uptake and catabolism. *Curr. Genet.*, **45**: 129-139.
- NIU, W.Y., ZHANG, F.T., EHRINGER, W., TSENG, M., GRAY, L. & CHIEN, S. (1999) Enhancement of hypothermic heart preservation with fructose-1,6-diphosphate. *J. Surgical Res.*, **85**: 120-129.

- NIU, X. D., BROWNING, K. S., BEHAL, R. H. & REED, L. J. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the gene for dihydrolipoamide acetyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 7546-7550.
- NOSEK, J. & FUKUHARA, H. (1994). NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J. Bacteriol.*, **176**: 5622-5630.
- OGAWA, N., DERISI, J. & BROWN, P. O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell.*, **11**: 4309-4321.
- OVERKAMP, K. M., BAKKER, B. M., KOTTER, P., VAN TUIJL, A., DE VRIES, S., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (2000). In vivo analysis of the mechanisms for oxidation of cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bacteriol.*, **182**: 2823-2830.
- ÖZCAN, S. & JOHNSTON, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**: 554-569.
- PARK, S. P., SHIBA, S., IJIMA, S., KOBAYASI, T. & HISHINUMA, F. (1993). Comparison of three different promoter systems for secretory α -amylase production in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.*, **41**: 854-861.
- PATCHETT, R. A. & JONES, C. W. (1986). The apparent oxidation of NADH by whole cells of the methylotrophic bacterium *Methylophilus methylotrophus*. A cautionary tale. *Antonie van Leeuwenhoek*, **52**: 387-392.
- PETIT, T., BLÁZQUEZ, M. A. & GANCEDO, C. (1996). *Schizosaccharomyces pombe* possesses an unusual and a conventional hexokinase: biochemical and molecular characterization of both hexokinases. *FEBS Lett.*, **378**: 185-189.
- PETIT, T. & GANCEDO, C. (1999). Molecular cloning and characterization of the gene *HXK1* encoding the hexokinase from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, **15**: 1573-1584.
- PLATER, A.R., ZGIBY, S.M., THOMSON, G.J., QAMAR, S., WHARTON, C.W. & BERRY, A. (1999). Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* class II FBP-aldolase. *J. Mol. Biol.*, **285**: 843-855.
- PLAUMANN, M., PELZER-REITH, B., MARTIN, W. F. & SCHNARRENBERGER, C. (1997). Multiple recruitment of class-I aldolase to chloroplasts and eubacterial origin of eukaryotic class-II aldolases revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*. *Curr. Genet.*, **31**: 430-438.

- PORRO, D., MARTEGANI, E., RANZI, B.M. & ALBERGHINA, L. (1992). Lactose/Whey utilization and ethanol production by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 799-805.
- PRIOR, C., MAMESSIER, P., FUKUHARA, H., CHEN, X. J. & WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. (1993). The hexokinase gene is required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 3882-3889.
- PRIOR, C., TIZZANI, L., FUKUHARA, H. & WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. (1996). *RAG3* gene and transcriptional regulation of the pyruvate decarboxylase gene in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.*, **20**: 765-772.
- PRÖMPER, C., SCHNEIDER, R. & WEISS, H. (1993). The role of the proton-pumping and alternative respiratory chain NADH:ubiquinone oxidoreductases in overflow catabolism of *Aspergillus niger*. *Eur. J. Biochem.*, **216**: 223-230.
- PRONK, J. T., STEENSMA, H. Y. & VAN DIJKEN, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**: 1607-1633.
- RAGONE, G., CAZZI, R., MOSCHETTI, R., BARSANTI, P., DE PINTO, V. & CAGGESE, C. (1999). The *Drosophila melanogaster* gene for the NADH:ubiquinone oxidoreductase acyl carrier protein: developmental expression analysis and evidence for alternatively spliced forms. *Mol. Gen. Genet.*, **261**: 690-697.
- RAMIL, E., FREIRE-PICOS, M. A. & CERDÁN, M. E. (1998). Characterization of promoter regions involved in high expresión of *KICYC1*. *Eur. Biochem.*, **256**: 67-74.
- RAMIL, E., AGRIMONTI, C., SHECHTER, E., GERVAIS, M. & GUIARD, B. (2000). Regulation of the *CYB2* gene expression: transcriptional co-ordination by the Hap1p, Hap2/3/4/5p and Adr1p transcription factors. *Mol. Microbiol.*, **37**: 1116-1132.
- RASMUSSEN, A. G., HEISER, V., ZABALETA, E., BRENNICKE, A. & GROHMANN, L. (1998). Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**: 101-111.
- RICHARDS, O.C. & RUTTER, W.J. (1961). Preparation and properties of yeast aldolase. *J. Biol. Chem.* **236**: 3177-3184.
- RIEDEL, B. J., GAL, J., ELLIS, G., MARANGOS, P. J., FOX, A. W. & ROYSTON, D. (2004). Myocardial protection using fructosa-1,6-diphosphate during coronary artery bypass grafo surgery: A randomized, placebo-controlled clinical trial. *Anesth. Analg.*, **98**: 20-29.

- RIGOLET, M., AGUILANIU, H., AVÉRET, N., BUNOUST, O., CAMOUGRAND, N., GRANDIER-VAZEILLE, X., LARSSON, C., PAHLMAN, I-L., MANON, S. & GUSTAFSSON, L. (2004). Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.*, **256/257**: 73-81.
- ROBERTS, R. J. (1987). Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res.*, **15** Suppl: r189-r217.
- ROBINSON B. H. (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**: 271-286.
- RODRÍGUEZ-BELMONTE, E., FREIRE-PICOS, M. A., RODRÍGUEZ-TORRES, A.M., GONZÁLEZ-SISO, M. I., CERDÁN, M. E. & RODRÍGUEZ-SEIJO, J. M. (1996). PICDI, a simple program for codon bias calculation. *Mol. Biotechnol.*, **5**: 191-195.
- ROMANOS, M. A., SCORER, C. A. & CLARE, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**: 423-488.
- ROMSI, P., KAAKINEN, T., KIVILUOMA, K., VAINIONPAA, V., HIRVONEN, J., POKELA, M., OHTONEN, P., BIANCARI, F., NUUTINEN, M. & JUVONEN, T. (2003). Fructose-1,6-bisphosphate for improved outcome after hypothermic circulatory arrest in pigs. *J. Thorac.Cardiov. Sur.*, **125**: 686-698.
- ROSE, M., GRISAFI, P. & BOTSTEIN, D. (1984). Structure and function of the yeast *URA3* gene: expression in *Escherichia coli*. *Gene*, **29**: 113-124.
- ROSENFELD, E. & BEAUVOIT, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **20**: 1115-1144.
- ROSS, J., REID, G. A. & DAWES, I. A. (1988). The nucleotide sequence of the *LDPI* gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison between eukaryotic and prokaryotic sequences for related enzymes and identification of potential upstream control sites. *J. Gen. Microbiol.*, **134**: 1131-1139.
- ROSSINI, D, PORRO, D., BRAMBILLA, L., VENTURINI, M., RANZI, B.M., VANONI, M. & ALBERGHINA, L. (1993). In *Saccharomyces cerevisiae*, protein secretion into the growth medium depends on environmental factors. *Yeast*, **9**: 77-84.

- ROTH, F. P., HUGHES, J. D., ESTEP, P. W. & CHURCH, G. M. (1998). Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation. *Nat. Biotechnol.*, **16**: 939-945.
- RUBIO-TEXEIRA, M., CASTRILLO, J.I., ADAM, A.C., UGALDE, U.O. & POLAINA, J. (1998). Highly efficient assimilation of lactose by a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**: 827-837.
- RUSSELL, I. (1986). Will a recombinant DNA yeast be able to solve whey disposal problems? *Trends Biotechnol.* **49**: 107-108.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. & FRITSCH, E.F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, J. C., BENLLOCH, T., LEAL, M. A., SAMPER, B., GARCÍA-RIPOLL, I. & FELÍU, J. E. (2002). Molecular analysis of the aldolase B gene in patients with hereditary fructose intolerance from Spain. *J. Med. Genet.*, **39**: e56.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, S.A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- SAUVE, V. & SYGUSCH, J. (2001). Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *thermos aquaticus*. *Protein Expr. Purif.*, **21**: 293-302.
- SAZANOV, L. A., PEAK-CHEW, S. Y., FEARNLEY, I. M. & WALKER, J. E. (2000). Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry*, **39**: 7229-7235.
- SCHAAFF, I., HEINISCH, J. & ZIMMERMANN, F. K. (1989). Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast*, **5**: 285-290.
- SCHAFFRATH, R. & BREUNIG, K. D. (2000). Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet. Biol.*, **30**: 173-190.
- SCHAPIRA, A. H. (1998). Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**: 261-270.
- SCHWELBERGER, H.G., KOHLWEIN, S.D. & PALTAUF, F. (1989). Molecular cloning, primary structure and disruption of the structural gene of aldolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **180**: 301-308.
- SCHWITZGUEBEL, J. P. & PALMER, J. M. (1982). Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **149**: 612-619.

- SEO, B. B., KITAJIMA-IHARA, T., CHAN, E. K. L., SCHEFFLER, I. E., MATSUNO-YAGI, A. & YAGI, T. (1998). Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 9167-9171.
- SEO, B. B., MATSUNO-YAGI, A. & YAGI, T. (1999). Modulation of oxidative phosphorylation of human kidney 293 cells by transfection with the internal rotenone-insensitive NADH-quinone oxidoreductase (*NDII*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1412**: 56-65.
- SEO, B. B., WANG, J., FLOTTE, T. R., YAGI, T. & MATSUNO-YAGI, A. (2000). Use of the NADH-quinone oxidoreductase (*NDII*) gene of *Saccharomyces cerevisiae* as a possible cure for complex I defects in human cells. *J. Biol. Chem.*, **275**: 37774-37778.
- SHERMAN, D., DURRENS, P., BEYNE, E., NIKOLSKI, M. & SOUCIET, J-L. (2004). Génolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.*, **32**: D315-D318.
- SHOFFNER, J. M. & WALLACE, D. C. (1994). Oxidative phosphorylation diseases and mitochondrial DNA mutations: diagnosis and treatment. *Annu. Rev. Nutr.*, **14**: 535-568.
- SHUSTER, J. R. (1990). *Kluyveromyces lactis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase I genes are linked and divergently transcribed. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 4271.
- SIENKIEWICZ, T. & RIEDEL, C-L. (1990). *Whey and Whey Utilization*. Verlag Th. Mann, Germany.
- SISO, M.I.G. & DOVAL, S.S. (1994). *Kluyveromyces lactis* immobilization on corn grits for milk whey lactose hydrolysis. *Enzyme Microb. Technol.*, **16**: 303-310.
- SISO, M.I.G., CERDÁN, E., FREIRE-PICOS, M.A., RAMIL, E., BELMONTE, E.R. AND TORRES, A.R. (1992). Permeabilization of *Kluyveromyces lactis* cells for milk whey saccharification: a comparison of different treatments. *Biotechnol. Letters*, **6**: 289-292.
- SKEHEL, J. M., FEARNLEY, I. M. & WALKER, J. E. (1998). NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria: sequence of a novel 17.2-kDa subunit. *FEBS Lett.*, **438**: 301-305.

- SMALL, W. C. & McALISTER-HENN, H. (1998). Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **180**: 4051-4055.
- SMITH, M. A., FINEL, M., KOROLIK, V. & MENDZ, G. L. (2000). Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.*, **174**: 1-10.
- SOLA, A., PANÉS, J., XAUS, C. & HOTTER, G. (2003). Fructosa-1,6-bisphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. *J. Leukocyte Biol.*, **73**: 74-81.
- SOOLE, K. L. & MENZ, R. I. (1995). Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**: 397-406.
- SOUSA, R., BARQUERA, B., DUARTE, M., FINEL, M. & VIDEIRA, A. (1999). Characterization of the last Fe-S cluster-binding subunit of *Neurospora crassa* complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**: 142-146.
- SREEKRISHNA, K. & DICKSON, R. C. (1985). Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7909-7913.
- STANWAY, C.A., CHAMBERS, A., KINGSMAN, A.J. & KINGSMAN, S.M. (1989). Characterization of the transcriptional potency of sub-elements of the UAS of the yeast *PGK* gene in a *PGK* mini-promoter. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 9205-9218.
- STARK, M. J. R., BOYD, A., MILEHAM, A. J. & ROMANOS, M. A. (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast*, **6**: 1-29.
- STEENSMA, H. Y., HOLTERMAN, L., DEKKER, I., VAN SLUIS, C. A. & WENZEL, T. J. (1990). Molecular cloning of the gene for the E1 α subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **191**: 769-774.
- SVENSSON, A. S. & RASMUSSEN, A. G. (2001). Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *Plant J.*, **28**: 73-82.
- TAHOUN, M. K., EL-NEMR, T. M. & SHATA, O. H. (2002). A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient conversion of lactose in salted and unsalted cheese whey into ethanol. *Nahrung*, **46**: 321-326.
- TER LINDE, J. J. M. & STEENSMA, H. Y. (2002). A microarray-assisted screen for potential Hap1 and Rox1 target genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **19**: 825-840.

- TER LINDE, J. J. M., LIANG, H., DAVIS, R. W., STEENSMA, H. Y., VAN DIJKEN, J. P. & PRONK, J. T. (1999). Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **181**: 7409-7413.
- THOMAS, D., CHEREST, H. & SURDIN-KERJAN, Y. (1991). Identification of the structural gene for glucose-6-phosphate dehydrogenase in yeast. Inactivation leads to a nutritional requirement for organic sulfur. *EMBO J.*, **10**: 547-553.
- THOMSON, G. J., HOWLETT, G. J., ASHCROFT, A. E. & BERRY, A. (1998). The *dhna* gene of *Escherichia coli* encodes a class I fructose biphosphate aldolase. *Biochem. J.*, **331**: 437-445.
- TIZZANI, L., MEACOK, P., FRONTALI, L. & WÉSOLOWSHI-LOUVEL, M. (1998). The *RAG3* gene of *Kluyveromyces lactis* is involved in the transcriptional regulation of genes coding for enzymes implicated in pyruvate utilization and genes of the biosynthesis of thiamine pyrophosphate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **168**: 25-30.
- UEMURA, H., KOSHIO, M., INOUE, Y., LOPEZ, M.C. & BAKER, H.V. (1997). The role of Gcr1p in the transcriptional activation of glycolytic genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **147**: 521-532.
- VAN HELDEN, J., ANDRE, B. & COLLADO-VIDES, J. (1998). Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computacional análisis of oligonucleotide frequencies. *J. Mol. Biol.*, **281**: 827-842.
- VANONI, M., PORRO, D., MARTEGANI, E. & ALBERGHIN, L. (1989). Secretion of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Saccharomyces cerevisiae* using the signal sequence from the glucoamylase encoding *STA2* gene. *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, **164**: 1331-1338.
- VIDEIRA, A. (1998). Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**: 89-100.
- VIDEIRA, A. & DUARTE, M. (2001). On complex I and other NADH:ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**: 197-203.
- VIDEIRA, A. & DUARTE, M. (2002). From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**: 187-191.

- VIDEIRA, A. & WERNER, S. (1989). Assembly kinetics and identification of precursor proteins of complex I from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.*, **181**: 493-502.
- VINOGRADOV, A. D. (2001). Respiratory complex I: structure, redox components and possible mechanism of energy transduction. *Biochemistry (Mosc)*, **66**: 1086-1097.
- VIOLA, A. M., GALEOTTI, C. L., GOFFRINI, P., FICARELLI, A. & FERRERO, I. (1995). A *Kluyveromyces lactis* gene homologue to *AAC2* complements the *Saccharomyces cerevisiae opl* mutation. *Curr. Genet.*, **27**: 229-233.
- VIOLA, A. M., LODI, T. & FERRO, I. (1999). A *Klaac* null mutant of *Kluyveromyces lactis* is complemented by a single copy of the *Saccharomyces cerevisiae AAC1* gene. *Curr. Genet.*, **36**: 29-36.
- VON JAGOW, G. & KLINGENBERG, M. (1970). Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.*, **12**: 583-592.
- WALLACE, D. C. (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**: 1175-1212.
- WALTER, R. A., NAIRN, J., DUNCAN, D., PRICE, N. C., KELLY, S. M., RIGDEN, D. J. & FOTHERGILL-MORE, L. A. (1999). The role of the C-terminal region in phosphoglycerate mutase. *Biochem. J.*, **337**: 89-95.
- WANG, W., NISHIKAWA, T. & ISONO, K. (1997). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes differentially expressed under different growth conditions. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **43**: 217-224.
- WEBSTER, T. D. & DICKSON, R. C. (1988). The organization and transcription of the galactose gene cluster of *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.*, **16**: 8011-8028.
- WEIDNER, U., GEIER, S., PTOCK, A., FRIEDRICH, T., LEIF, H. & WEISS, H. (1993). The gene locus of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.*, **233**: 109-122.
- WEIRICH, J., GOFFRINI, P., KUGER, P., FERRERO, I. & BREUNIG, K. D. (1997). Influence of mutations in hexose-transporter genes on glucose repression in *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.*, **249**: 248-257.

- WEISS, H., VON JAGOW, G., KLINGENBERG, M. E. & BUCHER, T. (1970). Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria prepared with a grind mill. *Eur. J. Biochem.*, **14**: 75-82.
- WEISS, H., FRIEDRICH, T., HOFHAUS, G. & PREIS D. (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondrial. *Eur. J. Biochem.*, **197**: 563-576.
- WENZEL, T. J., TEUNISSEN, A. W. R. H. & STEENSMA, H. Y. (1995). *PDA1* mRNA: a standard for quantitation of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* superior to *ACT1* mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 883-884.
- WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M., TANGUY-ROUGEAU, C. & FUKUHARA, H. (1988). A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **4**: 71-81
- WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M., BREUNIG, K. D. & FUKUHARA, H. *Kluyveromyces lactis*. En: K. Wolf, editor. Non-conventional yeasts in Biotechnology. Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. pp. 139-201.
- WIKSTRÖM, M. (1984). Pumping of protons from the mitochondrial matrix by cytochrome oxidase. *Nature*, **308**: 558-560.
- YAGI, T. (1991). Bacterial NADH-quinone oxidoreductases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **23**: 211-225.
- YAGI, T., Yano, T., DI BERNARDO, S. & MATSUNO-YAGI, A. (1998). Prokaryotic complex I (*NDH-1*), an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**: 125-133.
- YOUNG, I. G., ROGERS, B. L., CAMPBELL, H. D., JAWOROWSKI, A. & SHAW, D. C. (1981). Nucleotide sequence coding for the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. UUG initiation codon. *Eur. J. Biochem.*, **116**: 165-170.
- YOUNG, E. T. & PILGRIM, D. (1985). Isolation and DNA sequence of *ADH3*, a nuclear gene encoding the mitochondrial isozyme of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 3024-3034.
- YOUNG, E.T., KACHEROVSKY, N. & VAN RIPER, K. (2002). Snf1 protein kinase regulated Adr1 binding to chromatin but not transcription activation. *J. Biol. Chem.*, **277**: 38095-38103.
- YOUNG, E. T., DOMBEK, K. M., TACHIBANA, C. & IDEKER, T. (2003). Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J. Biol. Chem.*, **278**: 26146-26158.

3681

2004
TD

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
ÁREA DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDADE DA CORUÑA