

7



LA REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE HEMO
en *Kluyveromyces lactis*: regulación transcripcional de los
genes *KlHEM1*, *KlHEM12* y análisis comparativo de los
factores reguladores Hap1p y Srb10p en levaduras.

LAURA NÚÑEZ NAVEIRA

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

La regulación de la biosíntesis de hemo en *Kluyveromyces lactis*:
regulación transcripcional de los genes *KIHEM1*, *KIHEM12* y análisis
comparativo de los factores reguladores Hap1p y Srb10p en levaduras.

Memoria para aspirar al grado de
Doctor en Biología
presentada por

Laura Núñez Naveira

Abril 2005

Modelo del dominio quinasa
de *K/Srb10p* obtenido
mediante FUGUE (acceso
concreto en Expasy)

El presente trabajo, **La regulación de la biosíntesis de hemo en *Kluyveromyces lactis*: regulación transcripcional de los genes *KIHEM1*, *KIHEM12* y análisis comparativo de los factores reguladores Hap1p y Srb10p en levaduras**, presentado por Dña. Laura Núñez Naveira para aspirar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Cerda', is written over a large, light blue oval scribble.

La Coruña, a 11 de abril de 2005

VºBº

LA DIRECTORA DEL TRABAJO

Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva

Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular

FE DE ERRATAS

- Páginas 27, 35, 79, 83, 95, 129, 135, 139, 140, 166, 184, 185 y 198. Donde pone "Y1140", debería aparecer "NRRL-Y1140".

- Página 78, línea 2 comenzando por abajo. Donde pone "esquema de la figura 4", debería aparecer "esquema de la figura 5".

- Página 87, figura 9. La secuencia que debería aparecer es la siguiente:

```
CCCTCAACTA TGCAGTGGAA GGCTTCAWAA ACTGCATACT CTTCTATAAC AGCACCGGTA
TGAACAACAT GTTCAGTTAT ATGGATGTGC TTTTGTGCGCC CACCTGCTTG GACGTGCGGAC
ATCGTGCTTT ACAGTTTATC GTTTGCCTAA TTTTGCGGGC TAAATGTGGC CCTTTAACAG
GTATGGGTGA ATCCCCAGCT ATAGGTAACC AAAATAACAC TGTACTAGC AGCAGCGAAG
ATGAAACAGA CCAAATGAAG AGAGATTCAT CCCCATCTCC AGGAAACGTC CTTACAGATG
TCAGTCTGGA TGCAGGTGAA AACTTAGCCG AAGTTCCTCT CGCAAGAATG ATCTTATTTT
ACAAGTTGAC AAAACAAATC TCTGCCAAAT ATAACTATGC CGTAAGAATG ACGAAATCCA
CAGGTTTCTT TATCACTTTA CTTAAGAAAC CTTCCCTCGAA ATCCAAAACCT AACTCTAAAA
ACAAAAACCT ACCACGTTTG CATCAACATC CAAATATTGC AAATATGACG AGTTTCTTCA
AAAACGTTCC ATCATTGGTA CTTTCAGCAG GAGGGGATCA AATTAGACGT TGCCCGGTTT
ATCAGGACGC AGTTGGGTTT TTGCCTTCGA AAGTAACAAG CGGAACCTTC AACTCGATTT
TTCACTCCAC TGCTCCTCCT TCTTTCAACT CTGCCGTTAC ACAACAATTG CCCCCTACTGA
ATATACAGTA TCAACCAATC ACTTTTAGGG ACACTTTAAG ACGCACATCA GATGTGAGAG
GTACTCCTGA AACTGCGAAA AGAAGGAAAG TAGACACCAC ATCTAAAAAC TTCTCTGAGC
AAAAAGTTGA AGTAAAGGTG GAAAATCCTC AAATATCTTT ACCACCTTCT CCAGCGCAGA
TTTCTGCGGT AACTCCCTTT GAGCCT
```

- Página 162, figura 52. Donde dice "analizar el consenso para Gcr1p", debería aparecer "analizar el **elemento rico en pirimidinas**".

- Página 163, tabla 16. Donde dice "deleciones D1 y D2", debería aparecer "deleciones D1, D2 y **Q3**".

- Página 164, tabla 17. Donde dice "deleciones D1 y D2", debería aparecer "deleciones D1, D2 y **Q3**".

- Página 167, tabla 19. Donde dice "construcción de las deleciones D1 y D2", debería aparecer "construcción de las deleciones **Q2, Q4 y Q5**".

- Página 168, figura 56. Donde dice "dos fuentes de carbono: glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%" debería aparecer "**tres** fuentes de carbono: **glucosa 2%**, glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%".

- Página 192, figura 66. Debería aparecer la letra **A** a la altura de la gráfica correspondiente a *ScSRB10* (esquema inferior) y la letra **B** a la altura de la gráfica correspondiente a *KISRB10* (esquema superior).

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. M^a Esperanza Cerdán Villanueva el haberme introducido en el mundo de la investigación y haberme acompañado durante el periplo de estos años. Su entusiasmo por la bioquímica y su constancia en el trabajo han sido para mí un ejemplo y un objetivo a alcanzar.

También quisiera mostrar mi gratitud al resto de profesores del laboratorio de Bioquímica: Dra. Ana M^a González Torres, Dra. M^a de los Ángeles Freire Picos, Dra. Isabel González Siso, Dra. Esther Rodríguez Belmonte y Dr. Manuel Becerra Fernández, por su compañía, apoyo y por esas valiosas ideas para esos protocolos que de vez en cuando se resisten a funcionar.

A todos los compañeros que ya no están en el laboratorio: Cristina Fernández, Alba Piñeiro, Mónica Lamas, Arturo Rodríguez, Silvia Díaz, Silvia Seoane, Cristina Trillo y Gema Ruíz gracias por haber compartido vuestro tiempo conmigo.

A la tropa actual del laboratorio: Moisés Blanco, gracias por tus risas, tus paranoias mentales y tus incalculables conocimientos informáticos que más de una vez me han sacado de un apuro; Nuria Tarrío, me encanta tu forma de ser y de ver las cosas de color de rosa. He disfrutado mucho con nuestras conversaciones sobre animales; Raquel Castro, mi compañera de poyata y responsable de que tenga un fondo de escritorio diferente cada semana; Ángel Pereira, mi videoteca privada y salvador de archivos perdidos; Marcin Krupka, mi satélite particular, eres la persona con más entusiasmo y ganas de aprender que he conocido nunca. Gracias por compartirlo conmigo.

A los técnicos de laboratorio: Inma Brandón, Mónica Rey, Eva Fortuna, Rosa Díaz y Aida Sánchez por cuyas manos han pasado los comienzos de mis experimentos. Vuestro trabajo ha sido muy valioso para mí.

A los compañeros de otros laboratorios: Alicia Pallas, Viviana Peña, José Manuel Mirás, Santiago de la Peña. Particularmente a Alicia y a Viviana, que comenzaron la carrera conmigo allá por el año 1996. Gracias por vuestra amistad, y por las charlas de madrugada los fines de semana.

De la misma manera, quisiera dedicar unas líneas a mis compañeras de carrera que hicieron más llevadero el estudio: Anabel, Carla, Rosa, Belén, Rebeca, Patricia, Eva. En especial a Sandra, por su amistad a prueba de bombas, me encanta charlar contigo sobre cine y libros.

A MI FAMILIA. Gracias mil por vuestra paciencia y por comprender la pasión que siento por mi trabajo. Papá, mi chofer particular, tu actitud me ha ayudado a perseverar cuando la duda me acechaba. Mamá, mi amiga y modelo de persona. Siempre has estado ahí apoyándome y animándome cuando no sabía que camino seguir. En el reparto de madres a mi me tocó la mejor. Pedro, mi hermano, gracias por tus chistes que hacen más amenos los fines de semana. Siempre supe que eras muy inteligente y al final el tiempo me ha dado la razón. Susana, mi hermana, gracias por llevarte a Pedro y entrar a formar parte de nuestra familia. Patricia, mi risueña hermana pequeña. Gracias por compartir habitación y confidencias conmigo durante años, eres bonita por dentro y por fuera. David, mi hermano, gracias por cuidar de Patricia. Abuela Alfonsa, gracias por los lapiceros y por venir a recogerme, tu sí que eres guapa. Fly, tu ayuda para la elaboración del herbario de botánica resultó indispensable para mi, gracias por cabalgar a recibirme cada noche. A mis primos y tíos, gracias por estar ahí.

Por último, pero no por ello menos importante, un agradecimiento inmenso a mis abuelos Juan Antonio y Carmen por quererme, apoyarme y guiarme mientras estuvisteis aquí. Abuelo, sin ti jamás habría entendido las ecuaciones de primer grado. Gracias por tu humor (contar tus naveiradas se ha convertido en tradición en la familia) y tus consejos. Abuela, gracias por haber sido tan buena con todos nosotros. Siempre presumo de lo maravillosa persona que eras. Un viejo proverbio árabe dice: "Dios juzga al árbol por sus frutos, no por sus raíces". Espero estar a la altura.

Este trabajo TAMBIÉN es de todos vosotros. GRACIAS.

A mis padres, hermanos y abuelos.

ABREVIATURAS

- δALA-S: δ-aminolevulinato sintasa.
- A: absorbancia.
- Ade: adenina.
- ADP: adenosín-difostato.
- AMP: adenosín-monofostato.
- AMPC: adenosín-monofostato cíclico.
- Amp^R: resistencia a la ampicilina.
- APS: persulfato amónico.
- Arg: arginina.
- ATG: metionina, codón de inicio de la traducción.
- BSA: seroalbúmina bovina.
- cm: centímetro.
- CO: monóxido de carbono.
- cpm: cuentas por minuto.
- CTD: dominio carboxilo terminal.
- Cys: cisteína.
- DCbyPCR "*Discriminating clusters by PCR*": discriminación de grupos por PCR.
- dCTP: desoxicitidín-trifostato.
- DD: dominio de dimerización.
- ddNTPs: didesoxirribonucleótidos trifostato.
- DEPC: dietil pirocarbonato.
- dGTP: desoxiguanosín-trifostato.
- DNA: ácido desoxirribonucleico.
- DNAc: ácido desoxirribonucleico complementario.
- DNasa: enzima que degrada DNA.
- dNTPs: desoxinucleótidos trifostato.
- dpIX: deuteroporfirina IX.
- DTT: ditiotreitól.
- dTTP: desoxitimidín-trifostato.
- EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético.
- ESTs: *Expressed Sequence Tags*.
- g: gramo.

Gly: glicina.
GPI: glicosil fosfatidil inositol.
GTF (*General Transcription Factor*): factor general de la transcripción.
HEPES: ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano-sulfónico).
His: histidina.
HMC (*High Molecular Complex*): complejo de alto peso molecular.
HRM (*Heme Responsive Motif*): motivo de respuesta a hemo.
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
Kan^R: resistencia a kanamicina/geneticina.
Kb: kilobase.
KV: kilo voltio.
L: litro.
Leu: leucina.
M: molar.
mBa: milibar.
MCS "*Multiple Cloning Site*": sitio de clonaje múltiple.
Met: metionina.
MF: metabolismo fermentativo.
mg: miligramo.
min: minuto.
mL: mililitro.
mJ: milijulio
mm: milímetro.
mM: milimolar.
MOPS: ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfónico.
MR: metabolismo respiratorio.
mseg: milisegundo.
ng: nanogramos.
nm: nanómetro.
nmol: nanomol.
nt: nucleótido.
°C: grados centígrados.
OD: densidad óptica.
ONPG: o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido.

ORF (*Open Reading Frame*): pauta abierta de lectura, secuencia codificadora.

ori: origen de replicación.

P/V: relación peso/volumen.

pb: pares de bases.

PBG-D: porfobilinógeno desaminasa.

PBG-S: porfobilinógeno sintasa.

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.

PIC: complejo de pre-inicio.

pmol: picomol.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

RNA: ácido ribonucleico.

RNA_m: ácido ribonucleico mensajero.

RNA_r: ácido ribonucleico ribosómico.

RPM (*Repression Module*): módulo de represión.

SDS: dodecil sulfato sódico.

seg: segundos.

Ser: serina.

TAA: codón de terminación de la traducción.

TBP (*TATA Binding Protein*): proteína de unión a la caja TATA.

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

Tet^r: resistencia a la tetraciclina.

TF (*Transcription factor*): factor transcripcional.

Thr: treonina.

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

Trp: triptófano.

Tyr: tirosina.

U: unidad.

UAS (*Upstream Activating Sequences*): secuencias activadoras del promotor.

Ura: uracilo.

URO-D: uroporfirinógeno descarboxilasa.

UV: ultravioleta.

v/v: relación volumen/volumen.

V: voltio.

Vf: volumen final

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

μ F: microfaradio.

μ g: microgramo.

μ L: microlitro.

μ m: micrometro.

μ M: micromolar.

μ mol: micromol.

Ω : ohmio.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. La levadura <i>Kluyveromyces lactis</i>	3
2. Grupo hemo	4
2.1. Estructura.....	4
2.2. Funciones generales.....	5
3. Grupo hemo en levaduras: retrospectiva histórica	6
4. Grupo hemo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
4.1. Biosíntesis de hemo.....	7
4.2. Regulación de la síntesis de hemo.....	8
a) Control por hemo y oxígeno.....	8
b) Control por fuente de carbono.....	9
4.3. Regulación transcripcional de los genes de la síntesis de hemo.....	9
4.4. Papel regulador de hemo en <i>S. cerevisiae</i>	11
a) Hap1p y Hap2/3/4/5p	13
b) Rox1p	14
5. Regulación de genes hipóxicos y <i>SRB10</i>	15
6. Papel regulador de hemo en <i>K. lactis</i>	16
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Material biológico	25
1.1. Líneas bacterianas.....	25
1.2. Líneas de levaduras	26
2. Medios de cultivo	27
2.1. Medios de cultivo para bacterias	27
2.2. Medios de cultivo para levaduras	29
3. Método para la replicación de placas	32
4. Esporulación y separación de tétradas	33
4.1. Inducción de la esporulación	33
4.2. Degradación de la pared celular	33
4.3. Separación de las tétradas.....	33
5. Vectores de clonación y marcadores de tamaño molecular	34
5.1. Vectores de clonación empleados	34
5.2. Marcadores de peso molecular	35
6. Construcciones y genotecas de partida	35
7. Manipulación de ácidos nucleicos	37
7.1. Extracción de DNA en bacterias	37
7.1.1. Método de la lisis alcalina	37
7.1.2. Extracción mediante columnas QIAprep®	39
7.2. Extracción de DNA en levaduras	39
7.2.1. Extracción de DNA plasmídico.....	39
7.2.2. DNA plasmídico con perlas de vidrio	40
7.2.3. DNA de alto peso molecular	41
7.2.4. DNA genómico: protocolo rápido	41
7.3. Extracción de RNA en levaduras	42
7.3.1. Método para <i>northern blot</i>	42
7.3.1. Método para <i>primer extension</i>	43

7.4. Medida de la concentración de ácidos nucleicos.....	44
7.4.1. Concentración de DNA	44
7.4.2. Concentración de RNA.....	44
7.5. Purificación de DNA de geles de agarosa	45
7.6. Concentración de DNA a partir de PCR.....	45
7.7. Manipulación enzimática de DNA	45
7.7.1. Digestiones enzimáticas	45
7.7.2. Reacciones de ligamiento	45
7.7.3. Tratamiento con RNAsa	46
7.7.4. Amplificación por PCR	46
8. Identificación de clones por PCR	47
9. Método de <i>Primer extension</i>	50
9.1. Síntesis de DNAc	50
9.2. Secuenciación manual del promotor	51
9.3. Electroforesis en gel de acrilamida.....	51
9.4. Transferencia, exposición y análisis.....	52
10. Northern blot.....	52
10.1. Condiciones de extracción de RNA	52
10.2. Extracción de RNA en levaduras	53
10.3. El gel de agarosa.....	53
10.4. Las muestras de RNA	53
10.5. La electroforesis	54
10.6. La transferencia	54
10.7. Preparación de las sondas	55
10.8. Separación y cuantificación de isótopo	56
10.9. Reacciones de hibridación y lavado	56
10.10. Cuantificación de los niveles de expresión.....	57
11. Métodos de transformación	58
11.1. Técnicas en bacterias	58
11.1.1. Células competentes y transformación.....	58
11.1.2. Células electrocompetentes. Electroporación.....	60
11.2. Técnicas en levaduras	61
11.2.1. Método del acetato de litio	61
12. Medidas de la actividad β-galactosidasa	62
12.1. Consideraciones iniciales	62
12.2. Ensayo con extracto crudo.....	62
12.2.1. Medida de la concentración de proteína.....	63
12.2.2. Medida de la actividad enzimática	63
12.2.3. Expresión de la actividad enzimática	64
12.3. Ensayo con células permeabilizadas.....	64
12.3.1. Medida de la actividad enzimática	64
12.3.2. Expresión de la actividad enzimática	65
13. Técnicas de secuenciación	65
13.1. Secuenciación automática: cebadores calientes	65
13.2. Secuenciación automática: cebadores fríos	66
13.3. Oligonucleótidos empleados.....	67
14. Técnicas electroforéticas	68
14.1. Preparación de geles de agarosa	68
14.2. Tinción y visualización de los geles	68
15. Soporte informático.....	69

15.1. Análisis de secuencias	69
15.2. Diseño de oligonucleótidos	69
15.3. Análisis de homología de secuencia.....	69
15.4. Búsqueda de secuencias consenso.....	70
15.5. Tratamiento de imágenes.....	71
15.6. Análisis de niveles de expresión.....	71
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
CAPÍTULO 1: CLONACIÓN DE <i>KIHEM12</i>, <i>KIHAP1</i> y <i>KISRB10</i>.....	75
1. Introducción.....	77
2. Clonación de <i>KIHEM12</i>.....	77
2.1. Clonación por <i>DCbyPCR</i>	78
2.2. Subclonación de <i>KIHEM12</i>	83
2.3. Análisis funcional de <i>KIHEM12</i>	84
3. Clonación de <i>KIHAP1</i>.....	85
3.1. Clonación por <i>DCbyPCR</i>	86
3.2. Clonación parcial desde DNA genómico	89
3.3. Comparación con la secuencia de <i>Genolévures</i>	92
3.4. Clonación total desde DNA genómico	95
3.5. Complementación de <i>Schap1</i>	96
a) Curvas de crecimiento	96
b) Expresión de <i>ScCYC1</i>	98
3.6. Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de <i>KIHAP1</i>	99
4. Clonación de <i>KISRB10</i>.....	107
4.1. Clonación por <i>DCbyPCR</i>	107
4.2. Subclonación de <i>KISRB10</i>	111
4.3. Complementación de <i>Scsrb10</i>	111
4.4. Determinación del sitio de inicio de la transcripción	113
5. Discusión.....	115
CAPÍTULO 2: FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE <i>KIHEM12</i>.....	117
1. Introducción.....	119
2. Características estructurales de la URO-D de <i>K. lactis</i>.....	119
3. Obtención de un nulo en <i>KIHEM12</i>	123
4. Fenotipos del mutante nulo <i>Kihem12</i>.....	126
4.1. Crecimiento en ausencia de hemina	126
4.2. Auxotrofia para la metionina.....	126
4.3. Acumulación de porfirinas	127
4.4. Conclusiones del análisis fenotípico.....	128
5. Expresión de <i>KIHEM12</i> en distintas cepas de <i>K. lactis</i>.....	129
6. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>KIHEM12</i>.....	130
6.1. Determinación del sitio de inicio de la transcripción	131
6.2. Análisis de la expresión: fusiones a <i>lacZ</i>	135
6.3. Funcionalidad de las cajas CCAAT	138
a) Deleción interna ΔA	138
b) Deleción interna ΔB	139
c) Deleción interna ΔAB	140
d) Deleción interna ΔC	140
7. Discusión.....	142

CAPÍTULO 3: ESTUDIO DEL PROMOTOR DE <i>KIHEMI</i>	145
1. Introducción	147
2. Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>KIHEMI</i>	148
3. Determinación del sitio de inicio de la transcripción	150
4. Análisis de la respuesta transcripcional	152
4.1. Deleciones seriadas: fusiones a <i>lacZ</i>	154
4.2. Análisis en aerobiosis y distintas fuentes de carbono.....	156
4.3. Funcionalidad del consenso para Hap2/3/4/5p.....	158
4.4. Funcionalidad del elemento rico en pirimidinas.....	161
4.5. Funcionalidad del consenso para Gcr1p.....	162
4.6. Funcionalidad del consenso para Buf1p.....	165
4.7. Análisis del promotor en condiciones de hipoxia.....	168
5. Discusión	171
 CAPÍTULO 4: ANÁLISIS FUNCIONAL DE DOMINIOS DE <i>Srb10p</i>	175
1. Introducción	177
2. Análisis <i>in silico</i> de dominios conservados	179
3. Transcripción de la región entre los residuos 108 y 206	184
4. Construcción de deleciones de dominios conservados	186
4.1. Fenotipos asociados a las deleciones.....	189
a) Formación de flóculos	190
b) Crecimiento en galactosa y alta temperatura.....	193
c) Expresión de genes regulados por <i>SRB10</i>	194
4.2. Interacción con <i>Srb11p</i>	198
4.3. Interacción con <i>Tup1p</i>	201
5. Discusión	203
 CONCLUSIONES	211
 BIBLIOGRAFÍA	215
 ANEXO PUBLICACIONES	237

INTRODUCCIÓN

1.1 LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis*

Alrededor de los años 70, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue empleada por primera vez en un experimento de biología molecular, y ya en los años 80 se utilizó para producir la vacuna contra la hepatitis B. En 1996, por vez primera en un organismo eucariota, su genoma fue totalmente secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996; Dujon, 1996).

Muchas de las funciones celulares están altamente conservadas entre levaduras y mamíferos, y muchos genes de mamíferos, a menudo, pueden complementar mutaciones en levaduras. Este descubrimiento, junto con el conocimiento del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996; Dujon, 1996), ha convertido a esta levadura en una referencia para comparar secuencias genómicas de otros organismos actualmente en estudio. Además, la facilidad de manipulación genética de las levaduras abre la posibilidad de estudiar productos génicos de otros eucariotas en este sistema.

Kluyveromyces lactis está muy relacionada con *S. cerevisiae* tal y como manifiesta su nomenclatura inicial: *Saccharomyces lactis*. Estudiada desde el inicio de los 60 (Herman & Halvorson, 1963a; Herman & Halvorson, 1963b), su interés radica en sus diferentes propiedades fisiológicas comparadas con las de *S. cerevisiae*. Ambas levaduras pertenecen al grupo de los aerobios facultativos, caracterizado por la capacidad de metabolizar la glucosa por medio de vías oxidativas (metabolismo respiratorio, MR) y oxidorreductoras (metabolismo fermentativo, MF). Sin embargo, la importancia de cada una de esas rutas es diferente según la especie. En condiciones aeróbicas, *S. cerevisiae* es principalmente fermentadora, mientras que *K. lactis* es respiradora (Gancedo & Serrano, 1989). Se denomina efecto Crabtree positivo al crecimiento mediante metabolismo fermentativo bajo condiciones aeróbicas (De Deken, 1966) y es consecuencia de la inhibición de la respiración por los sustratos fermentables o de la saturación de la capacidad respiradora de algunas levaduras (Rieger *et al.*, 1983; Käppeli & Sonnleitner, 1986). Siguiendo esta definición, *K. lactis* puede enmarcarse en el grupo de levaduras Crabtree negativas en oposición a *S. cerevisiae* (González-Siso *et al.*, 1996; Kiers *et al.*, 1998). La ausencia en *K. lactis* de represión por glucosa de la respiración está también en consonancia con su metabolismo (MR). Además a *K. lactis* se la considera una levadura *petite*-negativa (Bulder, 1964a; Bulder, 1964b). En medio sólido cuando la glucosa es un factor limitante, *S. cerevisiae* se caracteriza por producir de manera constante mutantes que son estables durante la reproducción vegetativa y que se caracterizan por un tamaño de colonia reducido (de ahí su nombre *petite*) (Ephrussi *et*

al., 1949). *K. lactis* por el contrario es incapaz de generar este tipo de mutantes, por ello es *petite*-negativa.

Por otra parte *K. lactis* puede utilizar la lactosa como fuente de carbono, a diferencia de *S. cerevisiae* (Barnett *et al.*, 1990). También tiene propiedades específicas como el sistema DNA *killer* que ha permitido explorar los mecanismos de competición microbiana (Stark *et al.*, 1990).

Actualmente existen técnicas moleculares que permiten manipular genéticamente a la levadura *K. lactis* casi al mismo nivel que la tradicional *S. cerevisiae*. Además, al igual que sucedió en 1996 con *S. cerevisiae*, el genoma de *K. lactis*, también ha sido completamente secuenciado (Doujon *et al.*, 2004), lo que proporciona una ayuda más a la investigación con esta levadura.

Por todos estos motivos, *K. lactis* presenta interesantes aplicaciones industriales como por ejemplo la producción de β -galactosidasa y proteínas heterólogas como proquimosina de ternera, sero-albúmina humana e interleuquina-1 β humana entre otras (Van der Berg *et al.*, 1990; Fleer *et al.*, 1991; Fleer *et al.*, 1991).

2.GRUPO HEMO

2.1.Estructura

La protoporfirina IX tiene una estructura molecular formada por cuatro anillos pirrólicos y que generalmente aparece, como grupo prostético, en hemos, corrinas, clorofilas y bilinas. Estos compuestos proceden de una ruta metabólica que se inicia con el ácido 5-aminolevulínico para finalmente rendir protoporfirina IX. La capacidad de los tetrapirroles macrocíclicos para quelar iones metálicos es ampliamente utilizada en los sistemas biológicos. El tetrapirrol más abundante es la clorofila que contiene magnesio. Se trata de un grupo esencial en los complejos recolectores de luz y de los centros de reacción fotosintética. En el caso del grupo hemo, el ion metálico central de la protoporfirina IX es el hierro (figura 1).

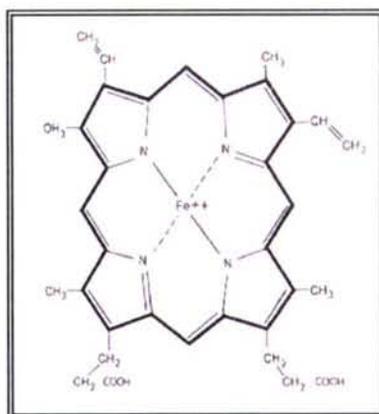


Figura 1. Estructura del grupo hemo b (protoporfirina IX).

En las corrinas aparece como ion central cobalto, mientras que las bilinas son tetrapirroles lineales.

2.2. Funciones generales

El grupo hemo juega un papel central en la señalización y utilización de oxígeno en todos los seres vivos. No sólo sirve como grupo prostético en numerosas enzimas y proteínas que utilizan y transportan oxígeno, sino que también regula varios procesos moleculares y celulares de sistemas que utilizan oxígeno (Padmanaban *et al.*, 1989). Por ejemplo, estimula la diferenciación de las células eritroides, hepáticas y nerviosas (Sassa & Nagai, 1996). También promueve la transcripción de genes que codifican cadenas de globinas en células eritroides y en genes que codifican citocromos en células hepáticas (Charnay & Maniatis, 1983). Controla la síntesis de proteínas en reticulocitos a través del inhibidor regulado por hemo (HRI) (Chen & London, 1995) y regula el ensamblaje y degradación de muchas proteínas y enzimas como la hemoglobina, hemo liasa y δ -aminolevulinato sintasa (δ ALA-S) (Padmanaban *et al.*, 1989). En levaduras, el grupo hemo participa como sensor de los niveles de oxígeno y en la regulación de la transcripción en respuesta a cambios en su concentración (Kwast *et al.*, 1998).

El grupo hemo es también necesario para el crecimiento de las levaduras en anaerobiosis, ya que actúa como cofactor de varias enzimas de la síntesis de ergosterol y de los ácidos grasos insaturados (Daum *et al.*, 1998) que son fundamentales para el mantenimiento de la estructura de las membranas celulares. Una deficiencia de hemo en

anaerobiosis induce una auxotrofia para el ergosterol y los ácidos grasos insaturados y activa, de manera simultánea, los sistemas relacionados con la toma y utilización de esteroides presentes en el medio (Wilcox *et al.*, 2002).

Otra reacción importante en la que participa hemo es la activación de los genes responsables del transporte y acumulación del hierro y del cobre, de manera que una mutación en la ruta de síntesis de hemo conlleva una acumulación de hierro en las mitocondrias (Crisp *et al.*, 2003).

Una deficiencia en la síntesis del grupo hemo en humanos provoca la aparición de un grupo de enfermedades conocidas como porfirias que se caracterizan por la acumulación de intermediarios de la síntesis de tetrapirroles (Ellefson, 1982). Algunos de estos intermediarios son dañinos para los tejidos epidérmicos y el sistema nervioso debido a la reactividad de las porfirinas fotoexcitadas.

3.GRUPO HEMO EN LEVADURAS. RETROSPECTIVA HISTÓRICA

La historia de la ruta de biosíntesis de hemo en levaduras se relaciona estrechamente con el estudio del catabolismo de azúcares. Comenzó en 1876 cuando Pasteur observó que las células de levadura eran capaces de crecer bajo condiciones anaeróbicas, pero que para la misma cantidad de azúcar consumido, la masa celular producida era mucho mayor si las células crecían en aerobiosis. Este fenómeno se produce porque la energía que proporciona la fermentación es mucho menor que la procedente de la respiración. Más tarde, gracias a los experimentos de Keiling en 1925 y Warburg en 1928, se probó la participación de los citocromos (hemoproteínas) en la respiración. Se concluyó de este modo que dichos hemo respiratorios se sintetizaban en aerobiosis.

Los experimentos posteriores se realizaron con células completas y se dedicaron a cuantificar los niveles intracelulares de citocromos y tetrapirroles, dándosele poca importancia al grupo hemo y a su estudio en las levaduras. Posteriormente se utilizaron extractos libres de células para detectar actividades relacionadas con la síntesis de hemo y en 1971 Labbe determinó, tras la realización de estudios de actividad enzimática en extractos de *S. cerevisiae* procedentes de cultivos aerobios y anaerobios, que esta ruta era funcional en ambas condiciones (Labbe & Labbe-Bois, 1990)

El hecho de que *S. cerevisiae* sea un aerobio facultativo hizo que se le considerase un modelo biológico de gran interés para el aislamiento de mutantes respiratorios. Mediante el uso de diferentes métodos de selección, se obtuvieron también mutantes de cada uno de los pasos de la ruta de biosíntesis de hemo (Gollub *et al.*, 1977; Urban-Grimal & Labbe-Bois, 1981).

En el año 1986 se publica la clonación del gen *HEM1* correspondiente a la primera enzima de la ruta: δ -aminolevulinato sintasa (Urban-Grimal *et al.*, 1986), lo que constituyó la base de los estudios posteriores de caracterización de otros genes de la síntesis de hemo en *S. cerevisiae* y otras levaduras.

4.GRUPO HEMO EN *S. cerevisiae*

4.1.Biosíntesis de hemo

La síntesis de hemo en *S. cerevisiae* se encuentra actualmente bastante bien caracterizada (Labbe & Labbe-Bois, 1990). Comienza con la condensación de glicina y succinil-CoA (figura 2), catalizada por la enzima δ -aminolevulinato sintasa (codificada por el gen *HEM1*) para rendir ácido- δ -aminolevulinico. Seguidamente, dos moléculas de δ -aminolevulinico se unen para formar porfobilinógeno, paso catalizado por la enzima aminolevulinico deshidratasa (*HEM2*). A continuación, la porfobilinógeno desaminasa (*HEM3*) cataliza la formación de prourógeno a partir de porfobilinógeno. En un cuarto paso, el prourógeno se cicla convirtiéndose en urógeno III en presencia de la urógeno III sintasa (codificada por *HEM4*). Tras cuatro descarboxilaciones consecutivas, el urógeno III se convierte en coproporfirinógeno III; acción mediada por la uroporfirinógeno descarboxilasa (*HEM12*). El coproporfirinógeno III se oxida a protoporfirinógeno IX mediante catálisis de la coproporfirinógeno oxidasa (*HEM13*). En el siguiente paso el protoporfirinógeno IX se transforma en protoporfirina IX en una reacción catalizada por la protoporfirinógeno oxidasa (*HEM14*) y, finalmente, la ferroquelatasa (*HEM15*) incorpora hierro al macro ciclo pirrólico como última etapa de la biosíntesis de hemo.

Los enzimas que participan en la biosíntesis de hemo se localizan en la mitocondria y en el citoplasma, pero a diferencia de la compartimentación en mamíferos, donde la coproporfirinógeno oxidasa es mitocondrial, en levaduras es citosólica.

4.2.Regulación enzimática de la síntesis de hemo

Aunque la ruta de biosíntesis de hemo es funcional en condiciones aerobias y anaerobias, la producción de hemo en las células de levaduras no se mantiene constante. La regulación más estudiada depende de dos factores: la fuente de carbono y la disponibilidad de oxígeno en el medio.

a) Control de la actividad enzimática por hemo y oxígeno

Dos de los pasos de la ruta de biosíntesis de hemo requieren oxígeno molecular como aceptor de electrones: la formación del protoporfirinógeno IX y la formación de protoporfirina IX. Debido a ello se propuso que las concentraciones celulares de hemo reflejaban el contenido en oxígeno, actuando el grupo hemo como "sensor" de los niveles de oxígeno (Zitomer & Lowry, 1992). Pero para que este modelo de regulación resultase funcional, la etapa limitante de la síntesis de hemo debería ser dependiente de oxígeno, lo que sólo sucede a concentraciones muy bajas de O₂. Efectivamente, en estas condiciones, la actividad de la enzima coproporfirinógeno III oxidasa (que utiliza oxígeno) es probablemente limitante (Miyake & Sugimura, 1968). Lo mismo sucede en cepas con defectos en la síntesis de hemo en varios puntos de la ruta (Labbe-Bois *et al.*, 1980).

En condiciones de aerobiosis, se produce una acumulación de ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA) como consecuencia de la baja afinidad por sustrato de la enzima aminolevulinato deshidratasa. Esto sugiere que en condiciones aerobias la etapa limitante se produce en el segundo paso de la biosíntesis, es decir para una enzima que no utiliza oxígeno como aceptor.

También en condiciones anaeróbicas, el principal producto acumulado de la ruta de biosíntesis de hemo es el δ -ALA generado tras la acción de la aminolevulinato sintasa. El resto de los tetrapirroles acumulados y presentes en estas condiciones proceden de la oxidación espontánea de los intermediarios de la ruta (Chestowska & Ritka, 1993). Ciertamente, en estas condiciones, la actividad de la enzima coproporfirinógeno III oxidasa (que utiliza oxígeno) es probablemente limitante y además, en condiciones próximas a la anoxia, aumenta su actividad oxidasa (Miyake & Sugimura, 1968). Lo mismo sucede en cepas con defectos en la síntesis de hemo en varios niveles de la ruta (Labbe-Bois *et al.*, 1980).

b) Control de la actividad enzimática por fuente de carbono

La importancia de las rutas metabólicas respiratorias *versus* fermentadoras depende, en los organismos aerobios facultativos, de la naturaleza de la fuente de carbono utilizable y de la disponibilidad de oxígeno. Las fuentes de carbono fermentables como la glucosa causan una inactivación de la ruta. En caso de crecer en fuentes no fermentables el efecto es una inducción de la biosíntesis de hemo (Chestowska & Ritka, 1993).

Se ha sugerido que aquellas enzimas que son limitantes para el flujo de metabolitos a través de la ruta son buenas candidatas para ser puntos de regulación, como en el caso de la porfobilinógeno sintasa (PBG-S) cuya baja actividad resulta en una acumulación intracelular de su sustrato δ -ALA (Labbe-Bois & Volland, 1977; Hoffman *et al.*, 2003; Borralho *et al.*, 1983; Borralho *et al.*, 1989). También se han propuesto a la porfobilinógeno desaminasa (PBG-D) y a la uroporfirinógeno III descarboxilasa (URO-D) que catalizan los dos siguientes pasos de la ruta, como posibles puntos de bloqueo en la formación de hemo, aunque no ha sido confirmado por el momento (Hoffman *et al.*, 2003).

Diversos estudios concluyen que la actividad aminolevulinato deshidratasa está sometida a represión catabólica (Borralho *et al.*, 1983; Borralho *et al.*, 1989). Aunque se había sugerido que la protoporfirinógeno oxidasa era otro punto de inactivación por glucosa, posteriormente se demostró que existe enzima en presencia de glucosa, aunque con un nivel de actividad inferior al determinado en ausencia de glucosa.

4.3.Regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de hemo

En *S. cerevisiae*, todos los genes de la ruta de biosíntesis de hemo han sido clonados y su regulación transcripcional estudiada en mayor o menor grado.

La expresión de *HEM1* es constitutiva, pero esta expresión inalterada en condiciones aerobias/anaerobias resulta de un control combinado de activación y represión, en este último caso atribuida al represor *Buflp*. Además se activa a través del complejo regulador multimérico *Hap2/3/4/5p* que es un activador en condiciones de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Keng & Guarente, 1987).

Analizando la secuencia promotora de *HEM2* se ha encontrado que presenta posibles regiones de unión a proteínas reguladoras como son el sitio de unión de *Abf1p*,

Ap1p, Reb1p, elemento de respuesta a AMP cíclico, sitio de unión a Rap1p y varios sitios de unión del complejo regulador Hap2/3/4/5p, lo que sugiere un complejo mecanismo de regulación de *HEM2* si todas estas interacciones resultan ser funcionales (Schlaepfer *et al.*, 1994).

Diversos estudios han mostrado que la transcripción de *HEM3* no se encuentra bajo la regulación de hemo, pese a que presenta en su región *upstream* secuencias de unión del complejo Hap2/3/4/5p (Keng *et al.*, 1992).

Respecto a la regulación transcripcional de *HEM4* no existen estudios individuales de su expresión y la información disponible se basa en la existente en las bases de datos derivadas de los estudios de transcriptoma que incluyen a todos los genes de la levadura. En este sentido los datos más notables son que el gen se reprime de forma leve y transitoria durante el *shift* diauxico, transición de un metabolismo fermentativo a respiratorio (De Risi *et al.*, 1997) y se induce durante la esporulación (Chu *et al.*, 1998).

Investigando la expresión de *HEM12* se encontró que se incrementaba dos veces en fuentes de carbono no fermentables, de lo que se deduce que está regulado por la fuente de carbono. Sin embargo, a diferencia de otros genes de la ruta, no se encuentra bajo la regulación del complejo Hap2/3/4/5p (DiFlumeri *et al.*, 1993).

El gen *HEM13* es un punto clave en la regulación transcripcional de la biosíntesis de hemo en levaduras. Mediante análisis de expresión, se descubrió que en condiciones de abundancia de hemo, su transcripción se ve reprimida por acción de los reguladores transcripcionales Rox1p y Hap1p (Cyp1p) de una manera independiente. En cambio en condiciones de hipoxia, Cyp1p activaba a *HEM13* y reprimía a Rox1p (Amillet & Labbe-Bois, 1995). Además, se vio que su promotor contenía dos regiones con motivos similares al consenso de Rox1p que actuaban como sitios de represión bajo crecimiento en aerobiosis. Dos secuencias más actuaban como activadoras en condiciones de deficiencia de hemo. En conjunto, estos datos sugieren que la inducción hipóxica de *HEM13* sucede en parte por liberación de la represión ejercida por Rox1p y Hap1p, y en parte por activación de Hap1p y otros factores desconocidos. Estudios recientes de la vía de respuesta a estrés HOG, han demostrado que *HEM13* está positivamente regulado por los niveles de AMPc (Bourdineaud, 2000).

La expresión del gen *HEM14* ha sido analizada exclusivamente a nivel de estudios generales sobre el transcriptoma de la levadura y se induce durante la esporulación y el *shift* diauxico (Chu *et al.*, 1998; De Risi *et al.*, 1997).

Respecto a la regulación transcripcional del gen *HEM15* de *S. cerevisiae*, pese a que los experimentos de *northern blot* indican una expresión menor en presencia de glucosa, esta represión catabólica no parece tener importancia funcional. Es más probable una regulación de la enzima por sus sustratos, el ion ferroso y la protoporfirina IX (Labbe & Labbe-Bois, 1990).

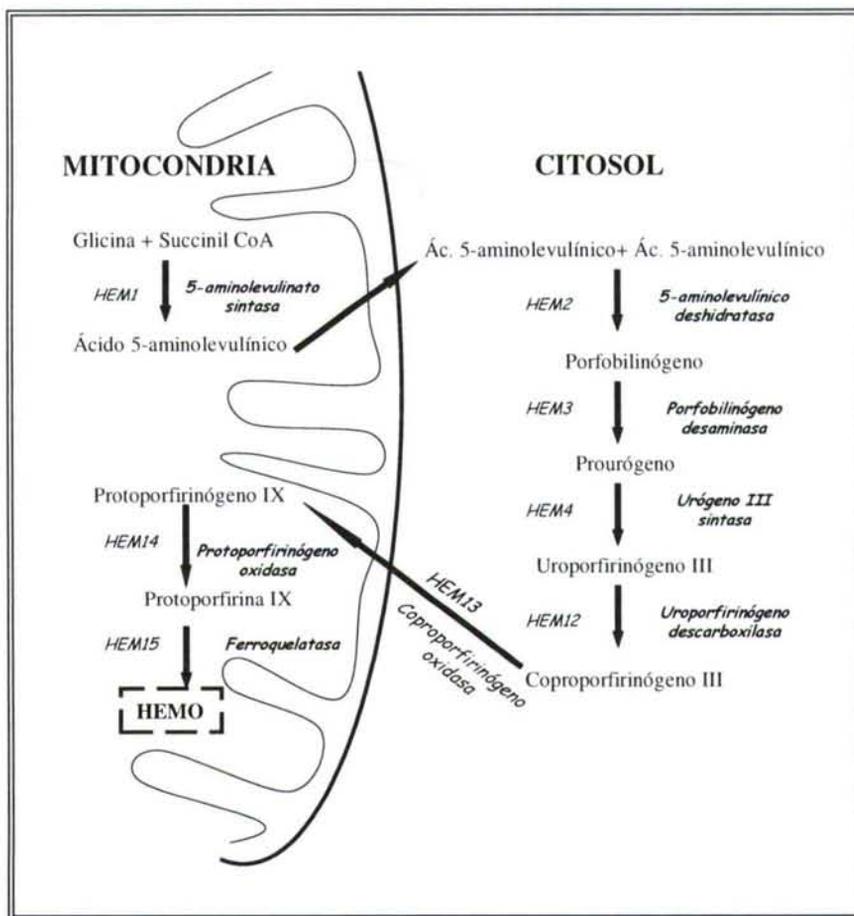


Figura 2. Esquema de la biosíntesis de hemo en *S. cerevisiae*.

4.4. Papel regulador de hemo en *S. cerevisiae*

A excepción de los anaerobios estrictos, todos los organismos dependen del oxígeno y tienen que desarrollar un sistema sensor para medir la disponibilidad de oxígeno así como mecanismos para soportar los períodos de hipoxia (baja

disponibilidad de oxígeno) o anoxia (anaerobiosis o ausencia total de oxígeno). La respuesta hipóxica de la mayoría de los organismos comprende un programa complejo que incluye la expresión diferencial de un gran número de genes (Hochachka *et al.*, 1996; Bunn & Poyton, 1996; Becerra *et al.*, 2002). De esta manera la disponibilidad de oxígeno afecta a los niveles intracelulares y a menudo a las actividades de un gran número de proteínas enzimáticas en la mayoría de los organismos. Actualmente, los mecanismos de detección y señalización de la disponibilidad de oxígeno se han encontrado en diferentes grupos taxonómicos, sin embargo, existe un componente que está presente en casi todos ellos: el grupo hemo (Bunn & Poyton, 1996).

En levaduras, la expresión de los genes relacionados con las funciones respiratorias es activada por la presencia de oxígeno en un proceso mediado por cambios en los niveles de hemo (Zitomer & Lowry, 1992). También se ha propuesto un modelo alternativo hipotético por el que algunos genes responden a la variación en la disponibilidad de oxígeno de un modo independiente de hemo y relacionado con cambios en el estado redox del grupo prostético presente en una hemoproteína reguladora (Verdiere *et al.*, 1991; Kwast *et al.*, 1998). En relación con este segundo modelo, se ha demostrado que el monóxido de carbono (CO) bloquea completamente la expresión inducida por anoxia de los genes hipóxicos *OLE1* y *CYC7*, bloquea parcialmente la inducción de *COX5b* y no tiene efecto en la expresión de otros genes hipóxicos o aeróbicos. Se pueden clasificar así los genes hipóxicos en sensibles o insensibles a CO. Este descubrimiento apoya la existencia de una hemoproteína, capaz de ligar oxígeno o CO, relacionada con el control de la expresión de genes hipóxicos (Kwast *et al.*, 1999). Por el momento la hemoproteína implicada no ha sido caracterizada.

Dentro del grupo de genes regulados por hemo se puede hacer una segunda clasificación en genes activados o genes reprimidos por hemo. Los efectos que provoca el grupo hemo parecen estar mediados en parte por varios factores transcripcionales entre los que se incluyen: Hap1p y el complejo Hap2/3/4/5p que activan la transcripción de muchos genes aeróbicos, y Rox1p que reprime la transcripción, en condiciones aerobias, de muchos genes hipóxicos y anaeróbicos (Pinkham & Keng, 1994). La disponibilidad de oxígeno afecta a los niveles celulares de hemo y de esta manera a los niveles intracelulares o a las actividades de estos factores transcripcionales (Zhang & Guarente, 1995).

a) Regulación mediante Hap1p y el complejo Hap2/3/4/5p

La proteína Hap1p activada por hemo (Creusot *et al.*, 1988) es un regulador clave de la expresión de genes que se requieren para la respiración y para el control del daño oxidativo. En ausencia de hemo, Hap1p se encuentra asociado a las proteínas Hsp70p (Ssa1p), Hsp90p, Ydj1p y Sro9p formando un complejo de alto peso molecular denominado HMC (Hon *et al.*, 1999; Hon *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002). Tras la unión de hemo se produce un cambio conformacional que genera la activación de Hap1p (Lee *et al.*, 2003).

Hap1p contiene un dominio de unión a DNA con un motivo en dedo de zinc con 6 cisteínas y un dominio de dimerización típico de los miembros de la familia Gal4 de levaduras (Hach *et al.*, 2000). También tiene un dominio ácido de activación.

La regulación por hemo de Hap1p y de otras proteínas parece estar mediada por un pequeño motivo de unión de hemo denominado: motivo de respuesta a hemo (HRM: *Heme Responsive Motif*) (Zhang & Guarente, 1995). Hap1p contiene 7 HRMs de los cuales los HRM del 1 al 6 se localizan cercanos formando un cluster (Zhang & Guarente, 1995; Hon *et al.*, 2000) y juegan un papel auxiliar en la activación por hemo (Hach *et al.*, 1999). El motivo HRM7, se localiza cerca del dominio de activación y su papel en la activación por hemo es fundamental (Hon *et al.*, 2000) ya que en conjunto, la interacción con Hsp90p y la unión de hemo al HRM7 provocan un cambio conformacional del HMC que permite la activación de Hap1p (Lee *et al.*, 2003).

Entre los genes activados por Hap1p se encuentran los que codifican para las dos isoformas de citocromo *c* (*CYC1* y *CYC7*), citocromo *c1* (*CYT1*), catalasa (*CTT1*) y flavohemoglobina (*YHB*) (Buisson & Labbe-Bois, 1998; Guarente *et al.*, 1984; Guarente & Mason, 1983; Lodi & Guiard, 1991; Lowry & Zitomer 1988; Pfeifer *et al.*, 1987; Schneider & Guarente, 1991; Winkler *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 1996). Hap1p también activa la transcripción del gen *ROX1* tal y como se describe en el siguiente apartado (Lowry & Zitomer, 1988). Todos ellos se caracterizan por tener en su región promotora el consenso CGG NNNTAN CGG NNNTA.

El complejo multimérico Hap2/3/4/5p está formado por cuatro subunidades de las cuales Hap2p, Hap3p y Hap5p son suficientes para permitir la unión a los promotores de los genes regulados por el complejo (McNabb *et al.*, 1995), mientras que Hap4p interacciona directamente con el trímero (McNabb *et al.*, 1997) y no con el DNA. Hap4p constituye la clave para la regulación de la actividad del complejo en

respuesta a la fuente de carbono como se deduce del incremento de su transcripción al pasar de un medio con glucosa a otro con etanol o tras un crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Forsburg & Guarente, 1989; DeRisi *et al.*, 1997).

La unión a DNA se produce a través del consenso ACCAA(T/C)NA denominado caja CCAAT (Olesen *et al.*, 1987). Entre los genes regulados por el complejo Hap2/3/4/5p se encuentran *CYT1* (Oechsner & Bandlow, 1996), *SOD2* (Flattery-O'Brien *et al.*, 1997) y *COX6* (Wright & Poyton, 1990) entre otros.

b) Regulación mediante Rox1p

Hasta hace relativamente poco tiempo, Rox1p era el único factor transcripcional conocido de genes inducidos en anaerobiosis en *S. cerevisiae* (Kastaniotis & Zitomer, 2000). Se trata de una proteína de unión específica a DNA que se encuadra dentro de la clase SOX de las proteínas HMG (Deckert *et al.*, 1999) y que se une a la secuencia consenso YYYATTGTTCTC en DNA bicatenario (Balasubramanian *et al.*, 1993). La represión dependiente de Rox1p requiere la acción del complejo co-represor Tup1-Ssn6p (Deckert *et al.*, 1999), el cual interacciona con un número de factores reguladores de unión específica a DNA (Smith & Johnson, 2000). La represión se propone que ocurre a través de dos mecanismos: o por cambio de fase del nucleosoma, o por interacción directa del complejo co-represor Tup1-Ssn6p con la maquinaria transcripcional básica a través de Srb10p (Kuchin & Carlson, 1998). Aunque Rox1p no une hemo de forma directa, su transcripción es dependiente de hemo a través del efecto activador de Hap1p sobre su promotor (Keng, 1992). De esta manera, mientras los niveles de oxígeno no caigan por debajo del límite que posibilita la biosíntesis de hemo (Labbe-Bois & Labbe, 1990), *ROX1* no dejará de transcribirse (Zitomer & Lowry, 1992). Cuando los niveles de oxígeno disminuyan, los niveles de proteína Rox1p disminuirán también y los genes que regula serán desreprimidos (Zitomer *et al.*, 1997). Muchos de los genes regulados por Rox1p codifican para proteínas relacionadas con las rutas dependientes de oxígeno, como la respiración, *COX5b* y *CYC7* (Lowry & Zitomer, 1988; Trueblood *et al.*, 1988), la biosíntesis de hemo, *HEM13* (Keng, 1992), la biosíntesis de esteroides, *HMG2*, *ERG11* y *NCPI* (Thorsness *et al.*, 1989; Turi & Loper, 1992), y la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, *ATF1* y *OLE1* (Choi *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998). La expresión de casi todos estos genes regulados por Rox1p, incrementa a medida que las concentraciones de oxígeno caen a niveles próximos a la

anoxia (Kwast *et al.*, 1998). Su activación podría servir de este modo para mantener o activar el flujo de rutas esenciales incrementando los niveles de enzimas clave, aumentando la eficiencia de uso del oxígeno, por ejemplo mediante la expresión de isoformas hipóxicas. Otros genes regulados por Rox1p son *ACC3* y *ANB1* (Sabova *et al.*, 1993; Lowry *et al.*, 1990) o el factor transcripcional *SUT1* (Regnacq *et al.*, 2001).

En general, Rox1p controla casi un tercio de los genes inducidos por anaerobiosis en las levaduras, incluyendo a muchos relacionados con el metabolismo de lípidos, isoprenoides y esfingolípidos. Recientemente se han caracterizado otros reguladores relacionados con la respuesta a la disponibilidad de hemo. Por ejemplo Upc2p, juega un papel importante en el control del programa genético que controla la respuesta fisiológica de *S. cerevisiae* frente a la carencia de oxígeno (Kwast *et al.*, 2002; Becerra *et al.*, 2002).

5.REGULACIÓN DE GENES HIPÓXICOS Y *SRB10*

Recientemente se han encontrado algunos puntos de conexión entre la regulación mediada por Rox1p y Srb10p (Becerra *et al.*, 2002). Srb10p parece jugar un importante papel en la represión de *CYC7* en condiciones aeróbicas ya que fue clonado en nuestro laboratorio por su capacidad de complementar una mutación en la que se producía sobre-expresión de la construcción reportera *CYC7/lacZ* (Cadahía, 1996). Srb10p está asociada con el complejo mediador de la RNA polimerasa II (Liao *et al.*, 1995) y forma un subcomplejo estable: Srb8/9/10/11p (Borggreffe *et al.*, 2002; Samuelsen *et al.*, 2003). Srb10p está relacionada con la regulación transcripcional de una amplia variedad de genes y ha sido implicada tanto en mecanismos de activación como de represión de la transcripción. Respecto al papel de Srb10p en los procesos de represión transcripcional, se ha demostrado *in vivo* la relación de Srb10p en el mecanismo de acción del complejo co-represor Tup1p-Ssn6p (Kuchin & Carlson, 1998; Zaman *et al.*, 2001; Schüller & Lehming, 2003) que es dirigido hacia los promotores hipóxicos por el factor transcripcional Rox1p (Mennella *et al.*, 2003). La proteína Srb10p también participa en los mecanismos que desencadenan la degradación de la proteína Msn2 que activa determinados genes como respuesta a estrés (Green & Johnson, 2004; Bose *et al.*, 2004). A este respecto cabe señalar que el gen *CYC7*, además de presentar elementos de respuesta a hipoxia presenta elementos de respuesta a estrés (Evangelista *et al.*, 1996).

6. PAPEL REGULADOR DE HEMO EN *Kluyveromyces lactis*

Como ya se ha comentado, las levaduras *K. lactis* y *S. cerevisiae* difieren en su metabolismo respiratorio y estas diferencias han sido atribuidas a varios factores (González-Siso *et al.*, 2000). Uno de ellos podría basarse en diferencias que afecten a la regulación de la síntesis de hemo o su degradación. Otro de estos factores pudiera ser el control que los factores transcripcionales relacionados con hemo ejercen sobre los promotores de los genes relacionados en este tipo de metabolismo en *K. lactis*.

Respecto a los estudios realizados sobre la regulación por hemo en *K. lactis* de momento aparece limitada a un pequeño número de genes. En la región promotora de *KICYC1* se han localizado dos secuencias, CCG(N)₆CCG y TTGGTTTGTT, que muestran una alta homología con el consenso para Hap1p y para Hap2/3/4/5p respectivamente; se ha demostrado que este gen está regulado por hemo en *K. lactis* y responde a la activación por el factor Hap1p de *S. cerevisiae* (Freire-Picos *et al.*, 1995; González-Domínguez *et al.*, 2000).

También en el caso de *KIHEM1* se ha observado que la expresión de este gen se ve incrementada débilmente en fuentes de carbono no fermentables (González-Domínguez *et al.*, 1997). Existe una fuerte regulación por oxígeno como se deduce del incremento de la expresión de *KIHEM1* en condiciones de hipoxia, y una dependencia de hemo, ya que su expresión disminuye al añadir hemina al medio de cultivo en condiciones de hipoxia (González-Domínguez *et al.*, 1999). Estos resultados contrastan con los de *ScHEM1* cuya expresión es independiente de hemo (Keng & Guarente, 1987). Además, el grupo hemo ejerce un papel inhibitorio en el importe de la enzima δ -aminolevulinato sintasa (codificada por *KIHEM1*) hacia las mitocondrias (González-Domínguez *et al.*, 2001). En resumen, *KIHEM1* se encuentra bajo una doble regulación por el producto final hemo, a nivel transcripcional y a nivel del importe de la proteína a la mitocondria (González-Domínguez *et al.*, 2001). Del mismo modo, se ha analizado la expresión de *KIHEM13* que codifica para enzima coproporfirinógeno oxidasa que cataliza el sexto paso de la síntesis de hemo. Se observa una inducción en hipoxia que desaparece tras la adición de hemo (González-Domínguez *et al.*, 2000).

También se ha analizado la regulación por hemo/oxígeno de los genes *KICYT1*, *KIQCR7*, *KIQCR8* y *KIACC* que codifican respectivamente el citocromo *c1* (Gbelska *et al.*, 1996), la subunidad VII del complejo *bc1* (Mulder *et al.*, 1994c), la subunidad VIII del complejo *bc1* (Mulder *et al.*, 1994b) y el transportador mitocondrial ADP/ATP

(Viola *et al.*, 1995). El patrón de expresión de *KICYT1* coincide con el de *KICYC1*, de lo que se deduce que ambos genes están sometidos a una fuerte regulación por oxígeno y hemo. Estos datos sugirieron que la alta capacidad respiradora de *K. lactis* en aerobiosis no es simplemente el resultado de una alta expresión constitutiva de genes que codifican para funciones mitocondriales (González-Domínguez *et al.*, 2000).

Con respecto a los factores codificados por *KIHAP2*, *KIHAP3* y *KIHAP4* que ya han sido clonados en *K. lactis*, no parece que regulen de forma general el sistema respiratorio de esta levadura en contraste con lo que sucede en *S. cerevisiae*, ya que su delección no produce una deficiencia respiratoria (Nguyen *et al.*, 1995; Mulder *et al.*, 1994a; Bourgarel *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

A fin de profundizar en el estudio de algunos de los genes implicados en la biosíntesis de hemo y su regulación en la levadura *Kluyveromyces lactis* se propusieron los siguientes objetivos concretos:

Objetivo 1.- Clonar y caracterizar a nivel funcional algunos genes de *K. lactis* relacionados con la biosíntesis de hemo o con la regulación mediada por hemo. Se seleccionó un gen de la ruta de biosíntesis, *KIHEM12*, un gen que codifica para un factor transcripcional que responde a hemo, *KIHAPI*, y finalmente el gen *KISRB10* por estar relacionado con la respuesta transcripcional a hipoxia.

Para conocer los mecanismos de regulación transcripcional que afectan a los genes de la ruta de biosíntesis de hemo en *K. lactis* se decidió analizar la regulación transcripcional y los elementos *cis* de las regiones promotoras responsables de dicha regulación en los genes *KIHEM12* y *KIHEM1*, previamente clonado. Para ello se planteó:

Objetivo 2.- Estudiar la regulación transcripcional de *KIHEM12* en respuesta a hemo, estrés oxidativo y a fuentes de carbono fermentables y no fermentables. Para mejor caracterización de la región promotora se consideró también necesario determinar los puntos de inicio de la transcripción y el análisis de la funcionalidad de determinadas regiones del promotor, detectadas por análisis *in silico*, mediante deleciones y/o mutaciones.

Objetivo 3.- Puesto que ya se sabía que el gen *KIHEM1* presenta una regulación transcripcional en respuesta a hemo y a la fuente de carbono, se propuso también caracterizar qué elementos del promotor están implicados en esta respuesta y determinar los puntos de inicio de la transcripción de este gen.

Puesto que son todavía muy numerosas las incógnitas sobre el papel de la proteína Srb10p en la regulación transcripcional y sus mecanismos de acción parecen ser muy variados en respuesta a distintas señales, distintos reguladores transcripcionales y en distintos promotores pareció interesante plantear un análisis comparativo de las proteínas *KISrb10p* y *ScSrb10p*, para ello se abordó el último objetivo:

Objetivo 4.- Análisis comparativo de dominios altamente conservados en *KISrb10p* y *ScSrb10p* y estudio de su papel funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Líneas bacterianas

A continuación se describen las líneas bacterianas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo para la amplificación de los plásmidos manejados y de las construcciones creadas (tabla 1).

Tabla 1. Listado de las líneas bacterianas empleadas.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
DH10B	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL nupG</i>	GibcoBRL
MC1061	<i>F araD139 Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Str^r) hsdR2 (r_k m_k) mcrA mcrB1</i>	Casadaban & Cohen, 1980
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c</i>	Stratagene Cloning Systems
HB101	<i>supE44 hsdS20 (rB mB) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Bolívar & Backman, 1979
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac- proAB)</i>	Promega, Madison, WI

Las cepas bacterianas se conservaron habitualmente sembradas en estría en placas LB 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.

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. Líneas de levaduras

Las cepas de levaduras tanto de *Saccharomyces cerevisiae* (tabla 2) como de *Kluyveromyces lactis* (tabla 3), se conservaron 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 sembraron 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.

Las cepas de levaduras empleadas son las descritas a continuación:

Tabla 2. Listado de cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
BWG7a	<i>MAT a leu2-3 leu2-112 his4-519 ade1-100 ura3-52</i>	Zhang & Guarente, 1994.
LPY22	<i>MAT a leu2-3 leu2-112 his4-519 ade1-100 ura3-52 HAP1ΔLEU2 CYC1ΔUAS2.</i>	Zhang & Guarente, 1994.
aGH1	<i>MATa trp1-289 leu2-3 leu2-112 gal1Δ152.</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1991.
FY1679	<i>MAT a/α ura3-52/ura3-52 trp1Δ63/wt leu2Δ1/wt his3Δ200/wt GAL2+/GAL2+</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
PJ69-4A	<i>MAT a trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996.
hem6-1B	<i>MAT a leu2-3 leu2-112 ura3-52 ade1-100 his4-419]</i>	Dra. Teresa Keng. Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, Quebec H3A 2B4, Canada
hem12-1A	<i>MAT? his3Δ1 leu2Δ0 LYS2 MET15 ura3Δ0 HEM12::KAN^r</i>	Obtenida en el desarrollo de la presente Tesis mediante separación de tétradas de un diploide procedente de Euroscarf.
BY4741 (Y00000)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Obtenida de Euroscarf
BY4741 Δsrb10 (Y02786)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPL042c::kanMX4</i>	Obtenida de Euroscarf
BY4743 Δhem12 (Y23983)	<i>MAT a/α his3Δ1/ his3Δ1 leu2Δ0/ leu2Δ0 lys2Δ0/LYS2 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ ura3Δ0 YDR047w::kanMX4/YDR047w</i>	Brachmann <i>et al.</i> , 1998 (Obtenida de Euroscarf)
Z768	<i>MATa ura3-52 his3_200 leu2-3,-112 rpb1_187::HIS3 srb10_1::hisG [L14(LEU2 CEN RPBI)]</i>	Proporcionada por el Dr. Richard A. Young (Hengartner <i>et al.</i> , 1998).
Z26	<i>MATa ura3-52 his3_200 leu2-3,-112 rpb1_187::HIS3</i>	Proporcionada por el Dr. Richard A. Young (Hengartner <i>et al.</i> , 1998).

Euroscarf <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>

Tabla 3. Listado de cepas de *K. lactis* empleadas en este trabajo.

Cepas de <i>Kluyveromyces lactis</i>		
Y1140	<i>MATa wt</i>	Proporcionada por el Dr. R. Zitomer
MW190-9b	<i>MATa lac4-8 uraA Rag⁺</i>	Proporcionada por la Dra. Micheline Wesolowski-Louvel. <i>Université Claude Bernard</i> , Lyon, Francia.
W600b	<i>MAT αade⁻ leu⁻</i>	ATCC32143 Mas <i>et al.</i> , 1974
WM37	<i>MAT a his⁻</i>	ATCC32144 Mas <i>et al.</i> , 1974
PM5-3C	<i>MAT a uraA Rag⁺</i>	Dra. Micheline Wesolowski-Louvel. <i>Université Claude Bernard</i> , Lyon, Francia.
MW190hem1	<i>MAT a lac4-8 uraA Rag⁺ HEM1::URA3</i>	González-Domínguez <i>et al.</i> , 1997.
SAY529	<i>MAT αade1 trp1 leu2 metA1 uraA1 nej1::hisG.</i>	Proporcionada por el Dr. Sydney Carter.
MWH7302-D1 hap3::LEU2	<i>MAT a leu2 uraA trp1 metA1 ade2 his2-2 hap3::ScLEU2</i>	Proporcionada por el Dr. L. Grivell
MW270-7b	<i>MAT a leu2 uraA metA101 pKDi</i>	Billard <i>et al.</i> , 1996.
MW98-8C	<i>MAT a rag1 rag2 uraA metA1 argA Killer</i>	Bianchi <i>et al.</i> , 1989.

2.MEDIOS DE CULTIVO

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

2.1.Medios de cultivo para bacterias

LB (Luria-Bertani).

Se trata de un medio general para crecimiento de bacterias y se compone de:

- 1% Bacto triptona
- 0,5% Extracto de levadura
- 0,5% Cloruro Sódico
- 0,1% Glucosa

LBA (Luria-Bertani suplementado con ampicilina)

Se trata de un medio suplementado con una solución de ampicilina (6-[D(-)-alpha-Aminophenylacetamido]-penicillanic acid sodium salt. Roche Diagnostics Corporation) para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que les proporcionan la resistencia a este antibiótico gracias a que son portadores del gen que lo permite.

La solución de ampicilina se prepara a una concentración final de 40 mg/mL con agua destilada estéril y se conserva en alícuotas a una temperatura de -20°C . La concentración final de ampicilina en el medio LBA es de 40 $\mu\text{g/mL}$.

El gen que confiere la resistencia a este antibiótico codifica para un enzima que es secretado al espacio periplásmico de la bacteria, donde cataliza la hidrólisis del anillo β -lactámico del antibiótico provocando la destrucción de la toxicidad de esta droga.

LBA/ X-Gal/IPTG

Son placas LBA suplementadas con X-Gal e IPTG (Roche Diagnostics Corporation). Para su preparación, tras esterilizar en el autoclave el medio LBA, se le añaden 2 mL de una solución 20 mg/mL de X-Gal en N,N-dimetil-formamida y 400 μL de una disolución de IPTG 0,23 mg/mL en agua destilada estéril (Rose & Botstein, 1983). Estas placas fueron empleadas para la selección de colonias bacterianas transformadas con las construcciones del promotor de *KIHEM1* y de *KIHEM12*, de modo que aquellas que llevaban el promotor in frame con el gen *lacZ*, aparecían con una coloración azul. Este suceso se debe a que la actividad de la beta galactosidasa hidroliza el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido) dando lugar a un precipitado de color azul índigo muy peculiar. El IPTG (isopropil-beta-D-galactósido) es un inductor de la producción de beta-galactosidasa en bacterias. Se trata de un análogo químico de la galactosa que no puede ser cortado por el enzima beta-galactosidasa. De este modo sirve como inductor de la actividad del operón *lac* de *E. coli*.

SOC

Se trata de un medio líquido empleado para la obtención de bacterias competentes. Su composición es:

2%	Bacto triptona
0,5%	Extracto de levadura
0,0584%	NaCl
0,0186%	ClK

2.2. Medios de cultivo para levaduras

Medio de esporulación

Es un medio que se empleó para provocar la esporulación de las células de levaduras. Se compone de:

1%	Extracto de levadura
2%	Bacto peptona
2%	Acetato potásico
2%	Bacto agar

YPD

Consiste en un medio general para el crecimiento de levaduras. Su composición es:

1%	Extracto de levadura
0,5%	Bacto peptona
2%	Dextrosa

YPD-Geneticina (Medio YPD suplementado con geneticina)

Consiste en un medio YPD al que le ha sido adicionado por cada litro de medio, 1,5 mL de una solución de geneticina (G 481)(Roche Diagnostics Corporation) 40mg/mL preparada con agua destilada estéril y conservada en alícuotas a una temperatura de -20°C. Este antibiótico se caracteriza por ser inhibidor ribosomal de muchas células eucariotas.

YPD-Hemina (Medio YPD suplementado con hemina)

Se trata de un medio YPD suplementado por cada litro de medio con 2,5 ml de una solución de hemina (Sigma®) 20mg/ml. Esta solución *stock* se prepara con los siguientes compuestos:

Hemina	100 mg
NaOH 0,2 N	2 mL
H ₂ O	2,5 mL
Tris-HCl	0,5 mL

Tras mezclar bien, se pasa la suspensión por un filtro de acetato de celulosa (ALBET®) con un diámetro de poro de 0,2 µm y se mantiene a 4°C y en oscuridad (cubierta con papel de aluminio) ya que se trata de un compuesto que se degrada con la luz. La hemina es un precursor del grupo hemo, lo que una vez añadida a un medio de cultivo, permite que aquellas cepas que sean mutantes en la ruta de biosíntesis de este grupo prostético, puedan crecer con normalidad.

YPD-Hemina-metionina (Medio YPD suplementado con hemina y metionina)

Se trata de un medio YPD-hemina suplementado con un 0,2% de metionina.

YPD-Hemina-Geneticina

Consiste en un medio YPD al que se le ha añadido por cada litro de medio, 2,5 mL de solución de hemina 20mg/mL y 1,5 mL de una solución de geneticina (G481) 40mg/mL.

CM (Medio Completo)

También llamado SC (*Synthetic Complete*). Se preparó según Zitomer & Hall en 1976. Se trata de un medio sintético preparado de diferente modo en función de la selección que se vaya a realizar. De este modo, un medio CM-Ura es un medio sintético completo al que no se le añadió uracilo. Habitualmente la fuente de carbono empleada fue glucosa al 2% aunque ocasionalmente ésta fue sustituida por glucosa al 0,5% u otras fuentes de carbono distintas de la glucosa pero también a una concentración final del 2% (glicerol, etanol-glicerol, lactato, lactosa, galactosa, fructosa). Para un volumen de 1 litro, se compone de:

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.

La mezcla de aminoácidos 200X para un volumen de un litro, se compone de:

Arginina, Metionina, Treonina	2 g cada uno
Isoleucina, Fenil-alanina	12 g cada uno
Lisina	8 g

El YNB (*Yeast Nitrogen Base*) se compone para un volumen de 1 litro de:

Mezcla de vitaminas 300X	50 mL
Sales traza 150X	100 mL
Sulfato amónico*	75 g
KH₂PO₄	15 g
MgSO₄	7,5 g
NaCl	1,5 g
CaCl₂	1,5 g

*Se añadió después de disolver el resto de los componentes ya que tarda más en resuspenderse.

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		

CM anaerobiosis

La estimulación de la toma de esteroles es vital para la supervivencia de las células en anaerobiosis ya que la entrada de los esteroides externos se encuentra eficientemente bloqueada en el crecimiento en aerobiosis por una síntesis normal de hemo y por un mecanismo denominado exclusión aeróbica de esteroles (Trocha & Sprinson, 1976). Pero la toma de lípidos como suplemento del crecimiento es complicada debido a su hidrofobicidad, es por ello por lo que en los cultivos de laboratorio se emplean detergentes no iónicos a una baja concentración para incrementar su solubilidad (p.e.: Tween, Nonidet P-40, Tyloxapol).

La preparación del medio de cultivo para anaerobiosis es idéntica a la del medio CM, pero debe ser suplementado con ergosterol y con Tween 80 (Verduyn *et al.*, 1992) tal y como se describe a continuación:

- Ergosterol (5, 7, 22-Ergostatrien-3 β -ol; provitamin D₂, Sigma[®]) a una concentración final del 0,002%. Se prepara un *stock* con una concentración de 2mg/mL en etanol al 100%. Conservación a 4°C.
- Tween 80 (Polyoxyethylenesorbitan Monooleate, Sigma[®]) a una concentración final del 0,5%. Se prepara un *stock* con una concentración del 20% en agua bidestilada estéril. Conservación a 4°C.

Para generar un ambiente anaerobio, se realizaron los cultivos en jarras cerradas herméticamente en las que se introdujeron bolsas de ácido ascórbico de OXOID AnaeroGenTM. Mediante este sistema, el oxígeno presente fue rápidamente absorbido con una generación simultánea de dióxido de carbono. La comprobación de las condiciones anaeróbicas se llevó a cabo empleando el Indicador Anaerobio OXOID (BR55).

3. MÉTODO PARA LA REPLICACIÓN DE PLACAS (*Replica Plating*)(Miller, 1992)

Se colocó la placa con las colonias a replicar sobre un terciopelo (sin presionar, sólo apoyándola), a continuación se retiró y en su lugar se colocó una placa fresca repitiendo el mismo procedimiento y se cultivó el tiempo necesario.

4. ESPORULACIÓN Y SEPARACIÓN DE TÉTRADAS

4.1. Inducción de la esporulación

Se preparó un cultivo en placa YPD para el mutante *hem12* diploide derivado de BY4742 y se incubó durante 2 días a 30°C para tener un cultivo fresco en el comienzo de la esporulación. Transcurridos los dos días se sembró en placas de esporulación. En concreto, en este experimento el medio de esporulación utilizado llevaba acetato como fuente de carbono para provocar altos niveles de respiración que induce a las células diploides a esporular.

El período de incubación osciló entre 7 y 9 días a 30°C. Durante este periodo, cada núcleo diploide sufre una meiosis típica generando 4 núcleos haploides, cada uno de los cuales se encapsula en una espora. Las cuatro esporas permanecen dentro de lo que era la pared de la célula diploide y que ahora pasa a denominarse **asca**. Cada espora recibe el nombre de **ascóspora** y el conjunto de las cuatro **tétrada**.

4.2. Degradación de la pared celular

A fin de obtener las esporas en forma libre y proceder a su separación, se degradó enzimáticamente la pared de la levadura mediante la actuación de la enzima β -glucuronidasa (Roche®). Se emplearon 250 unidades de enzima durante 8 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añadió 1 mL de agua destilada y se colocó el tubo en hielo.

4.3. Separación de las tétradas

Para realizar la separación de las ascósporas de cada tétrada se utilizó un micromanipulador: Singer MSM, adosado a un microscopio: Singer MSM. El objetivo utilizado fue de 20 aumentos (20x) y el binocular de 15 aumentos (15x) dando un total de 300 aumentos (300X).

5. VECTORES DE CLONACIÓN Y MARCADORES DE TAMAÑO MOLECULAR

5.1. Vectores de clonación empleados

pGEM[®]-TEasy (Promega). Contiene el promotor y parte del gen *lacZ*, *Amp^R* y el *ori* bacteriano. Está cortado con la enzima de restricción *EcoRV* y presenta una timidina en ambos extremos 3', resultando útil en la clonación de productos procedentes de PCR amplificados por la DNA polimerasa *Taq*, ya que esta polimerasa añade una adenina al extremo 3' del fragmento amplificado (figura 3).

YEplac195 (Gietz & 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*, $2\mu m$ de la levadura y el *ori* bacteriano (figura 3). 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.

YCplac33 (Gietz & 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 3). En el presente trabajo se empleó para la realización de ensayos de complementación.

YIplac204 (Gietz & Sugino, 1988). Presenta el promotor y 438 pb del gen de la β -galactosidasa de *E. coli* (*lacZ*) (Sambrook *et al.*, 1989), *Amp^R*, *TRP1* y el *ori* bacteriano (figura 3).

pXW1 (Chen *et al.*, 1992). Plásmido lanzadera empleado para el análisis de promotores fusionados al gen *lacZ* de la β -galactosidasa de *E. coli*. Presenta el marcador de selección bacteriano *Amp^R*, el *ori* bacteriano, el *S11* para la replicación en *K. lactis*, el marcador de selección en levaduras *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 3).

pSK1 (Prior *et al.*, 1993). Vector lanzadera que presenta dos marcadores de selección en bacterias, *Amp^R* y *Tet^R*, el *ori* bacteriano, el *S11* para la replicación en *K. lactis*, $2\mu m$ para la replicación en *S. cerevisiae* y el marcador de selección en levaduras *URA3* (figura 3). Vector empleado para la construcción de genotecas.

pAB24 (Botstein *et al.*, 1979). Vector que presenta el $2\mu m$ para la replicación en *S. cerevisiae*, los marcadores de selección en levaduras *LEU2-d* y *URA3* y los

marcadores de selección en bacterias *Amp^R* y *Tet^R* (figura 3). Vector empleado para la construcción de genotecas.

pGAD-C2 (James *et al.*, 1996). Vector de expresión para ensayos de doble híbrido. Contiene el promotor y el terminador de *ADHI* flanqueando al dominio de activación de *GAL4*. Posee también el origen de replicación en bacterias *ori* y el marcador de resistencia a ampicilina para selección en bacterias *Amp^R*. Lleva el marcador de selección en levaduras *LEU2* y el origen de replicación $2\mu m$ para *Saccharomyces* (figura 3).

pGBD-C2 (James *et al.*, 1996). Vector de expresión para ensayos de doble híbrido. Contiene el promotor y el terminador de *ADHI* flanqueando al dominio de unión a DNA de *GAL4*. Posee también el origen de replicación en bacterias *ori* y el marcador de resistencia a ampicilina para selección en bacterias *Amp^R*. Lleva el marcador de selección en levaduras *TRP1* y el origen de replicación $2\mu m$ para *Saccharomyces* (figura 3).

5.2. Marcadores moleculares

Para calcular los tamaños de los fragmentos de DNA digeridos, empleamos como marcador el DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción *BstEII* (Daniels *et al.*, 1983) (BioLabsTM) (figura 3).

6. CONSTRUCCIONES Y GENOTECAS DE PARTIDA

Genoteca de *K. lactis* (*Chiron Library*)

Esta genoteca fue construida por Anthony Brake a partir de DNA genómico de la cepa Y1140 de *K. lactis*, parcialmente digerido con la enzima *Sau3A* para obtener fragmentos de un tamaño aproximado de 9 Kb. Dichos fragmentos fueron clonados en el sitio *BamHI* de la porción pBR322 del vector pAB24 tal y como describen Mylin & *col.* (1991). Fue amablemente cedida por el Dr. Robert Dickson (Departamento de Bioquímica de la Universidad de Kentucky) y por Jeffrey R. Shuster (CHIRON Corporation).

Construcción YI-11

Para la construcción de las deleciones del promotor de *KIHEMI*, se utilizó como molde para las reacciones de PCR, la construcción YI-11 que se caracteriza por tener insertado el promotor de *HEMI* (946 pb) de *K. lactis* en el vector integrativo YIp356R entre los puntos de corte de los enzimas *KpnI* y *SphI* (González-Domínguez, 1999).

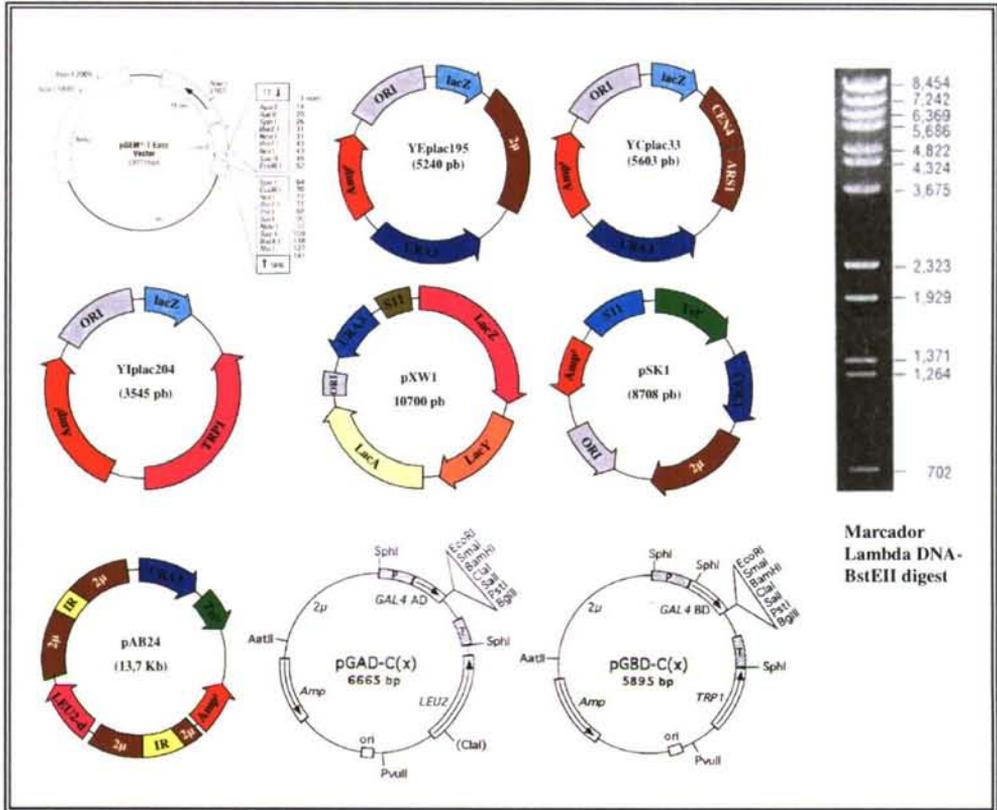


Figura 3. Esquemas de los vectores empleados y del marcador de tamaños moleculares de DNA.

7. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7.1.Extracción de DNA en bacterias

7.1.1.Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* (Sambrock *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995). Extracción mediante el método de la lisis alcalina

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña (*miniprep*) y a gran escala (*maxiprep*) se empleó el mismo procedimiento, partiendo de un cultivo de 1 mL en el primer caso y de 25 mL en el segundo. Los volúmenes de las disoluciones utilizadas se adaptaron en cada caso a la escala de extracción.

Para un cultivo de 25mL:

Las células se inocularon en 25 mL de medio adecuado conteniendo el antibiótico apropiado y se dejaron crecer toda la noche a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ aproximada de 0,8, las células se precipitaron a 8.000 r.p.m. durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1,5 mL de Solución I agitando en el vortex. Se incubó 5 min a temperatura ambiente con el tubo abierto. Tras este tiempo, se añadieron 3 mL de la Solución II y se mezcló invirtiendo el tubo de 5 a 6 veces. Se incubó 5 min en hielo para seguidamente, añadir 2,5 mL de Solución III. Se mezcló de nuevo el tubo mediante agitación en el vortex y se dejó durante 5 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 10 min, se recogió el sobrenadante y se transfirió a un tubo limpio. Para la eliminación de proteínas se añadieron 5 mL de PCIA (mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico), se mezcló en el vortex y se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 5 min. Se recogió la fase superior acuosa y se pasó a un tubo nuevo al que se le adicionaron 10 mL de etanol al 95% para precipitar el DNA. Se agitó el tubo en el vortex y se incubó a -20°C durante 10 min para seguidamente centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 15 min. Se lavó el precipitado con 10 mL de etanol 70% y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante otros 15 min. Para finalizar, se secó el sedimento al vacío y se resuspendió en 250 µL de agua bidestilada.

Soluciones empleadas:**Solución I**

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

Se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Solución II

NaOH	0,2 M
SDS	1%

Se preparó en el momento de ser utilizada a partir de soluciones estériles de NaOH 0,2M y SDS al 20%.

Solución III

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

Se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

PCIA

Se mezcló fenol líquido en una proporción 1:1 con cloroformo y se equilibró con IxTE en una proporción 3:1 agitando vigorosamente durante varios minutos, tras los cuales se dejó la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se separó la fase acuosa completamente. La fase acuosa se retiró por aspiración y se repitió el proceso 2-3 veces. Tras el último equilibrado se añadió 1/25 volumen de alcohol isoamílico a la mezcla. Se conservó en oscuridad a 4°C.

7.1.2.Extracción mediante columnas de QIAprep[®] (kit comercial suministrado por Quiagen)

Las células se inocularon en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado y se dejaron crecer toda la noche en agitación a 37°C. El cultivo se repartió en tubos *Eppendorff*. Se centrifugó durante 2 min a 4.000 r.p.m. y se eliminó el líquido. Las células se resuspendieron en 250 µL de *buffer* P1 agitando en el vortex y posteriormente se añadieron 250 µL de *buffer* P2. Se mezcló el tubo por inversión y se añadieron 350 µL de *buffer* N3 para agitar nuevamente en el vortex. Seguidamente se precipitaron las células durante 10 min a 13.000 r.p.m. El sobrenadante fue transferido a la columna del *kit* para centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 1 min. Se eliminó el líquido residual, y se lavó la columna con 1 mL de *buffer* PB. Tras una centrifugación de 1 min a 13.000 r.p.m. y eliminación de nuevo del líquido restante, se añadieron 750 µL de *buffer* PE. Centrifugación de 1 min a 13.000 r.p.m., eliminación del *buffer* residual y nueva centrifugación de 1 min a 13.000 r.p.m. para descartar los restos de *buffer*. Las columnas se colocaron sobre un *Eppendorff* limpio y se añadieron 50 µL de agua. Tras 2 min de espera, se centrifugó 1 min a 13.000 r.p.m. y se recogió la suspensión de DNA.

7.2.Extracción de DNA en levaduras

7.2.1.Extracción de DNA plasmídico de levaduras (Método modificado de Adams *et al.*, 1997)

Para la extracción del DNA plasmídico, se inoculó un cultivo de 5 mL en medio selectivo y se dejó toda la noche en agitación a 30°C. Se precipitaron 1,5 mL de las células a 3.000 r.p.m. durante 3 min. Posteriormente las células se lavaron con 1 mL de Sorbitol 1 M y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Se resuspendió el botón celular en 800 µL de Solución I y se añadieron 50 µL de liticasa (Sigma[®])(5 mg/mL) para, seguidamente, incubar a 37°C durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 5 min a 3.000 r.p.m. y el sobrenadante fue eliminado. Se adicionó al sedimento 500 µL de Solución II y se agitó en el vortex. Se dejó a continuación durante 20 min a 65°C y se enfrió en hielo. Se añadieron 100 µL de acetato potásico 3M a pH 4,8 y se incubó a -20°C un mínimo de 2 horas.

Se realizó una centrifugación de 5 min a 15.000 r.p.m. para separar el sobrenadante, al que se le agregaron 0,4 mL de etanol 95%. Se dejó precipitar a -20°C

durante al menos 5 min, se centrifugó y se lavó con etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo y se secó el sedimento al vacío, para disolverlo finalmente en 0,4 mL de 1xTE. Se extrajo el DNA con PCIA con el fin de eliminar los restos de proteína, y se centrifugó durante 5 min a 8.000 r.p.m. Se precipitó nuevamente con etanol según el procedimiento habitual, se secó el precipitado al vacío y se resuspendió en 10 µL de 1xTE cuando ya estaba seco.

Soluciones empleadas:

Solución I

Sorbitol	0,9 M
NaPO ₄	50 mM pH 7,5
Mecaptoetanol	14 mM (dil 1/1000)

Solución II

EDTA	50 mM pH 8,0
SDS	0,3 %

7.2.2.Extracción de DNA plasmídico empleando perlas de vidrio

Este método se empleó para obtener pequeñas cantidades de DNA 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 DNA plasmídico se resuspendió en 5 µL de agua destilada y fue

empleado para transformar bacterias de *E. coli* mediante electroporación para obtener un mayor número de transformantes.

7.2.3.Extracción de DNA de alto peso molecular de levaduras

Este método modificado de Adams *et al.* (1997) se empleó para obtener altas concentraciones de DNA genómico. 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.

Las células se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 3 min y se lavaron con 1 mL de Sorbitol 1 M, EDTA 0,1 M. Se precipitaron a 5.000 r.p.m. durante 5 min y se resuspendió el pellet en 1 mL de la solución de extracción (Sorbitol 0,9 M, EDTA 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,5, 14 mM β-mercaptoetanol). A la mezcla se le añadieron 0,05 mL de liticasa, previamente disuelta a una concentración de 5 mg/mL en agua estéril y se agitó suavemente durante 30 min a 30°C. Tras este período de incubación, se añadió SDS hasta una concentración final del 1% y se mezcló suavemente. Se incubó durante 20 min a 30°C sin agitación y se hizo un lavado con 1,5 veces el volumen de PCIA, agitando suavemente, para evitar roturas en el DNA. Las fases se separaron por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 min para conseguir una fase acuosa lo más limpia de proteínas posible. Para completar la extracción de proteínas, la fase acuosa se incubó durante 2-4 horas en hielo con acetato potásico 5 M (pH 4,8) en una proporción 1:5, tras lo cual se centrifugó 15 min a 10.000 r.p.m. Se recogió el sobrenadante, descartando así el posible precipitado que se produce cuando quedan restos de proteína. Una vez purificado, el DNA genómico se precipitó con 1,5 volúmenes de etanol al 95%, mezclándolo suavemente. Se dejó en hielo unas dos horas y transcurrido este tiempo se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 5 min. El DNA se lavó con etanol al 70% para eliminar los restos de sales y tras una nueva centrifugación de 2 min a 5.000 r.p.m. se secó el precipitado a vacío y se resuspendió en agua estéril.

7.2.4.Extracción rápida de DNA genómico de levaduras

Se empleó el método de Hoffman & Winston (1987) cuando fue necesario obtener pequeñas concentraciones de DNA 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 μL 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 μL de RNAsa 50 mg/mL (suministrada por *Quiagen*). Se añadieron 0,3 gramos de perlas de vidrio, 200 μL de fenol-cloroformo y se agitó en vortex durante 3 minutos a baja velocidad. Se añadieron 200 μL de tampón 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) y se agitó en el 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 DNA en una bomba de vacío y se resuspendió en 20-100 μL de 1xTE.

7.3.Extracción de RNA en levaduras

7.3.1.Método para los experimentos de *northern blot*

La extracción de RNA total se realizó según el método de Zitomer & Hall (1976), el agua con la que se prepararon las soluciones fue previamente tratada con DEPC (Diethyl 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 RNA y asegurar el cese del crecimiento y de la transcripción. Todos los procesos posteriores se realizaron en frío.

La 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 RNA 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 RNA se resuspendió en agua tratada estéril fría y se congeló a -80°C .

7.3.2. Método para los experimentos de *primer extension*

Se siguió el método explicado por Chomczynski & Sacchi en 1987 con algunas modificaciones. Se inocularon 200 mL de medio de cultivo que se mantuvo a 30°C y en agitación hasta que alcanzó una OD_{600} de 0,8-1. A continuación se precipitaron las células durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL del mismo medio de cultivo al que se le añadieron perlas de vidrio de 2 mm de diámetro hasta aproximadamente 2/3 del volumen final. Se llevaron a cabo 15 pulsos de 20 segundos de agitación vigorosa en el vortex para romper las células. Entre pulso y pulso, se mantuvieron los tubos en hielo durante 20 segundos.

Seguidamente se añadieron 10 mL de Trizol (TRIZol[®] Reagent. Life Technologies) y se agitó la mezcla durante 1 minuto en el vortex, para luego mantener otros 5 minutos a temperatura ambiente. Entonces se agregaron 2 mL de cloroformo para a continuación agitar 15 segundos en el vortex y mantener entre 3 y 10 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 r.p.m. y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo teniendo cuidado de no llevar nada de la interfase en la que se encuentra el DNA y las proteínas. Se añadieron 5 mL de isopropanol, se mezcló en el vortex y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a una centrifugación de 10 minutos a 10.000 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante

con cuidado, y se lavó con 2 mL de etanol al 70% en agua. Se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones y se repitió el proceso una vez más.

A continuación se resuspendió el pellet en 500 μ L de agua tratada con DEPC, se transfirió a un tubo *Eppendorf*, se añadieron 500 μ L de *Buffer* LiCl (4M LiCl, 20mM Tris-ClH pH 7,5) y se mantuvo durante una noche a -20°C .

Al día siguiente se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C . Se lavó dos veces con etanol al 70% el precipitado, se secó al aire rápidamente y se resuspendió en 80 μ L de agua tratada.

7.4. Medida de la concentración de ácidos nucleicos

7.4.1. Medida de la concentración de DNA

Se tomaron 5 μ L de la preparación de DNA, libre de RNA, 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 DNA 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 RNA 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. Se empleó para ello el programa *Quantity One*[®] de BIORAD.

7.4.2. Medida de la concentración de RNA

Las medidas de la concentración de RNA se realizaron del mismo modo que las de DNA, utilizando 4 μ L 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 RNA. La relación óptima A_{260}/A_{280} toma, en este caso, un valor de 2 (Sambrook *et al.*, 1989).

7.5. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA plasmídico generados por la actuación de las endonucleasas de restricción, fueron migrados en un gel de agarosa 1-1,5% (según el tamaño del fragmento a rescatar). Una vez desarrollada la electroforesis, se purificaron las fracciones de DNA empleando el kit *Ultrafree[®]-DA de Millipore*.

7.6. Concentración de DNA a partir de PCR o de rescate de gel

Para aquellos casos en los que el DNA rescatado iba a ser empleado para la clonación en un vector, tras purificar el DNA con los tubos *Ultrafree[®]-DA de Millipore*, se emplearon los tubos *Microcon[®] PCR de Millipore* para concentrar el volumen obtenido en 20 μ L de agua bidestilada. También fueron empleados los tubos *SpinClean[™] PCR Purification Kit* de Mbiotech Inc.

7.7. Manipulación enzimática del DNA

7.7.1. Digestiones enzimáticas

Tanto el DNA plasmídico como el genómico fueron digeridos con endonucleasas de restricción de diversas casas comerciales siguiendo sus recomendaciones en cuanto al tampón y a la temperatura utilizadas. Los tiempos de digestión variaron entre las 2 y 14 horas según la cantidad de DNA a digerir y las enzimas empleadas.

7.7.2. Reacciones de ligamiento

Se emplearon la DNA ligasa T4 de Roche[®], GibcoBRL e Invitrogen[™], con el tampón suministrado con la enzima. Los ligamientos se realizaron en un volumen de 10 μ L añadiendo un volumen variable de DNA (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[®]-TEasy Vector System* de Promega. El ligamiento se realizó en un volumen final de 10 μ L, añadiendo 3 μ L del producto de la PCR, 5 μ L del *rapid* tampón 2x de la DNA ligasa T4, 1 μ L del vector pGEM[®]-TEasy (50 ng/ μ L) y 1 μ L de la DNA ligasa T4 (3U/ μ L). Se mezcló la

reacción con la micropipeta y se dejó incubar durante toda la noche a 14°C o a temperatura ambiente durante 1 hora. Como el vector posee el gen *lacZ* 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 el producto de PCR clonado.

7.7.3.Tratamiento con RNAsa

Para las reacciones de PCR de reconocimiento de clones y para la visualización de las reacciones de digestión en un gel, el DNA empleado fue tratado con 0,4 μ L de RNAsa (25 mg/mL) por cada 20 μ L (concentración aproximada 0,5-0,8 μ g/ μ L) de DNA. Se dejó actuar la enzima durante 5 min a temperatura ambiente.

La dilución de la RNAsa se preparó a partir de un *stock* 100 mg/mL de RNAsa A de *Quiagen* mediante una dilución con *buffer* 1xTE (Tris 0,5M, 0,01M EDTA). Se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

7.7.4.Amplificación de ácidos nucleicos por PCR

Consideraciones generales sobre la técnica

El principio de la PCR se basa en utilizar de manera repetitiva una de las propiedades de las DNA polimerasas: la capacidad de sintetizar una hebra complementaria de DNA a partir de un iniciador o DNA cebador y un molde de hebra simple. Para ello se utilizó *Taq* DNA polimerasa[®].

Productos empleados

Mezcla de PCR:

- 32 μL de H_2O destilada
- 5 μL de *buffer* de la Taq Polimerasa 10x
- 2 μL de MgCl_2 25mM
- 4 μL de mezcla de dNTPs 2,5 mM
- 2 μL de DNA molde (las extracciones de DNA de cada caso)
- 2,5 μL de cada cebador 0,01 nm/ μL
- 0,5 μL de Taq DNA polimerasa de Roche.

Los programas empleados para realizar las amplificaciones de DNA por PCR variaron tanto en la temperatura de hibridación como en el tiempo de elongación dependiendo de:

- La temperatura de fusión de los oligonucleótidos empleados.
- La longitud en pares de bases del fragmento a amplificar: se toma como referencia 1 minuto por cada 1000 pares de bases.

El esquema general de los ciclos fue el siguiente:

Ciclos de PCR:

1	ciclo	95°C	3 minutos	desnaturalización inicial
30	ciclos	95°C	30 segundos	desnaturalización
		X°C	45 segundos	hibridación cebador-DNA molde
		72°C	2 minutos	elongación
1	ciclo	72°C	10 minutos	elongación final
		12°C	infinito	

8. IDENTIFICACIÓN DE CLONES POR PCR

Aunque todavía son pocos los genomas microbianos que han sido secuenciados completamente, para la mayoría se está usando la estrategia de secuenciar el genoma parcialmente y de modo aleatorio (Feldman, 2000). Las bases de datos contienen abundantes secuencias RSTs (“*Random Sequenced Tags*”) que se pueden utilizar para clonar genes completos. Una aproximación clásica en estos casos es la hibridación de colonias, sin embargo esta técnica es tediosa y con frecuencia da lugar a muchos

candidatos positivos que posteriormente resultan ser falsos positivos. La estrategia *DCbyPCR* (Díaz-Prado *et al.*, 2004) y la disponibilidad de una genoteca de *K. lactis* en el vector de clonación pAB24, conocida como genoteca *Chiron* (materiales y métodos), permite la identificación del clon de interés en una semana. La técnica consiste en la identificación de un clon por PCR en un “*pool*”. 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.

Para optimizar la técnica se realizó una transformación de prueba por electroporación de la línea DH10B de *E. coli* con 1 μ L de DNA de la genoteca de *K. lactis* en el vector pAB24. Esta transformación sirvió para determinar la eficacia de la transformación y por tanto, el número de transformaciones que era necesario realizar para conseguir los como mínimo 20.000 transformantes que asegurasen 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 se está buscando, pueda ser rescatada y aislada de la placa. Por este motivo, el tiempo de crecimiento en placa después de la transformación debe ser 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 DNA, guardando la placa con las colonias originales en la nevera a 4°C para su posterior utilización.

Descripción de la técnica paso a paso

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. 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. Además, se empleó DNA genómico como molde de una reacción de PCR que se utilizaría como control positivo.

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, se obtuvieron 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 paños de terciopelo (Miller, 1992). El tercer día se extrajo el DNA 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 DNA plasmídico por cada placa Petri.

3. Las alícuotas procedentes de las minipreparaciones se mezclaron en ocho grupos que se utilizaron como DNA molde en reacciones de PCR con cebadores específicos. Se identificó de este modo el grupo portador del clon de interés.

4. Se realizaron nuevas reacciones de PCR con los mismos cebadores pero usando como DNA molde las minipreparaciones individuales que previamente se habían mezclado en el grupo 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.

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 DNA 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 DNA 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.

6. Las colonias bacterianas individuales de este sector de la placa Petri original se sembraron individualmente y se les hicieron extracciones individuales de DNA plasmídico. El quinto día se realizaron reacciones de PCR utilizando el DNA 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.

7. El paso final, consistió en aislar colonias (Miller, 1992) a partir del candidato seleccionado, posteriormente fue verificado nuevamente por PCR y secuenciado.

9. MÉTODO DE *PRIMER EXTENSION*

El método de *primer extension* se emplea tanto para realizar un mapa y cuantificar la región terminal 5' del RNAm como para detectar precursores e intermediarios del procesamiento del RNAm. El RNA a analizar es hibridado con un exceso de oligonucleótido en presencia de $^{32}\text{P}\alpha\text{-dATP}$ y posteriormente se emplea una transcriptasa reversa para extender a partir de este cebador la molécula de DNacomplementario (DNAc) al molde de RNA. La longitud resultante del DNAc, se mide por electroforesis en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes junto con una reacción de secuenciación del gen a estudio realizada con el mismo cebador. De esta manera, se refleja la distancia existente entre el nucleótido final marcado del cebador y el extremo 5' terminal del RNA, determinando de este modo el punto de inicio de la transcripción.

9.1. Síntesis de DNacomplementario (DNAc) a partir de RNAmensajero (RNAm)

Se empleó este protocolo para la obtención de DNAc para experimentos de *primer extension*.

Tras la obtención de RNA por el método de TRIZOL, se mezclaron 12 μL de la suspensión que contenían aproximadamente 60 μg de RNA total, con 2 μL del oligonucleótido específico (500 ng). Se incubó la mezcla durante 10 minutos a -70°C . Se enfrió brevemente en hielo durante 10 minutos y se añadieron 6 μL de *buffer 1st strand 5X* de InvitrogenTM, 3 μL de DTT 0,1M, 1 mL de mezcla de nucleótidos (16mM dCTP, dGTP, dTTP y 100 μM dATP), 5 μL de $^{32}\text{P}\alpha\text{-dATP}$ (50 μCi) y 2 μL (200U) de *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* de InvitrogenTM. Se incubó a 43°C durante 1 hora. A continuación se sometió la mezcla a un proceso de hidrólisis alcalina del RNA restante añadiendo 1 μL de SDS al 1%, 1 μL de EDTA 0,5M pH 8,0 y 3 μL de NaOH 3M. Se incubó durante 30 minutos a 65°C y durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron a continuación 10 μL de Tris-HCl pH 8,0 1M y 3 μL de HCl 2N. Seguidamente, se precipitó el DNAc agregando 5 μL de NaOAc pH 5,3, 5 μL de RNA transferente 10 mg/mL (favorece el proceso de precipitado del DNAc) y 60 μL de isopropanol. Se mantuvo durante 2 horas a -80°C y se precipitó a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos. Se resuspendió el pellet de DNAc en 10 μL de agua bidestilada.

9.2. Secuenciación manual de la región promotora del gen

Al mismo tiempo, empleando el mismo oligonucleótido que en el apartado anterior, se procedió a realizar una reacción de secuenciación del promotor en estudio. Se empleó el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), utilizando *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit* de *USB corporation*. Se utilizó DNA plasmídico extraído con las columnas de *Qiagen*. A continuación se siguieron las indicaciones del kit para llevar a cabo la secuenciación empleando el nucleótido marcado $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP de Amersham Life Science Inc.

El producto final fue desnaturalizado durante 5 minutos a 65°C antes de ser cargado en un gel de poli-acrilamida en un sistema de secuenciación manual de BIORAD.

9.3. Electroforesis en gel de acrilamida

Se preparó una disolución de acrilamida y bis-acrilamida al 45% que se mantuvo como *stock* en oscuridad y a 4°C. A partir de ella se preparó la mezcla del gel al 7% que se mantuvo en las mismas condiciones. La composición de las soluciones empleadas fue la siguiente:

Disolución stock al 45% (500 mL)

Acrilamida	217,5 g
Bis-Acrilamida	7,5 g

10xTBE (500 mL)

Tris (900mM)	54 g
Ácido bórico (900mM)	27,5 g
EDTA (40mM)	7,4 g

Mezcla de gel al 7% (500 mL)

Urea	210 g
Disolución <i>stock</i> al 45%	78,1 mL
10xTBE	50 mL

Se tomaron 80 mL de mezcla del gel al 7% y se añadieron 80 μ L de TEMED (Sigma[®]) y 360 μ L de una solución al 10% de APS (Sigma[®]) para catalizar la polimerización. La mezcla resultante se inyectó entre dos cristales separados una distancia de 0,4 mm, uno de los cuales estaba tratado con una disolución al 5% de dicloro-dimetil-silano en cloroformo. Una vez polimerizado, el gel se montó en el sistema de secuenciación BIORAD y se sometió a una pre-electroforesis (sin carga de muestra) durante 30 minutos a 1.500 V, hasta que se alcanzó una temperatura entre 50-55°C. Antes de comenzar con la carga de las muestras, se limpiaron los pocillos con el *buffer* empleando una pipeta *Pasteur* para eliminar la urea precipitada. Se conectó de nuevo la fuente de alimentación y se dejó que la electroforesis se desarrollase hasta la salida por la parte inferior del gel de la segunda banda del azul de carga (3-4 horas).

Terminada la electroforesis, se separaron los dos cristales con cuidado, de manera que el gel se quedó adherido al cristal que no estaba silanizado.

9.4. Transferencia, exposición y análisis

Una vez separados los cristales, se colocó un papel de filtro encima del gel de poliacrilamida para que se pegase a él. De este modo se pudo despegar el gel del cristal sin que se rompiese. Seguidamente se colocó sobre una nueva hoja de papel de filtro, y se sometió a secado durante 1 hora a 80°C en un desecador de geles a vacío. Después de terminar la transferencia, el gel se introdujo en una funda de plástico y se expuso durante 3-4 días a una pantalla de fósforo del sistema *PhosphorImager SITM*. Transcurrido este periodo de tiempo, las pantallas fueron escaneadas en el *PhosphorImager SITM Scanning Instrument 425* de *Molecular Dynamics*, y las imágenes capturadas con el *software Image Quant* versión 5.0. de *Molecular Dynamics*.

10. NORTHERN BLOT

10.1. Condiciones de extracción de RNA

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) de Sigma[®], 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 RNA, 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(hidroxi)metil-1-3-propanodiol equilibrado con ácido clorhídrico.

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

(3) **SDS**: Dodecil Sulfato Sódico.

10.2.Extracción de RNA de levaduras

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

10.3.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 polimerizado el gel, se guardó en la nevera o cámara fría hasta el momento de ser utilizado evitando así que se resecase.

10.4.Las muestras de RNA

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

10.5.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 RNA 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 aclaró, 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.

10.6.La transferencia

En las transferencias, se utilizaron membranas de nylon (tamaño del poro 0,45µm) 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 RNA 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 RNA 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 RNA a la membrana con luz UV, mediante el dispositivo *UV Cross Linker 500* de *Hofer*, aplicando una energía de 120 mJ/cm² de membrana o, alternativamente, 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.

10.7. Preparación de las sondas

Las sondas se marcaron por el método del “*random-primed*” (cebadores aleatorios) (Feinberg & 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 DNA en 14 µL de agua, se hirvieron durante 5 minutos para su desnaturalización, y se enfriaron rápidamente en hielo. Al DNA 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	x 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).

(1) **BSA**: Seroalbúmina bovina.

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

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

Para rectificar la pequeña heterogeneidad resultante de defectos de carga del RNA entre los distintos pocillos del gel, se hibridaron posteriormente los filtros con una sonda del gen del RNAr 25S, constitutivo en las condiciones de ensayo (o alternativamente *SNR17A*). Se sintetizó una sonda oligonucleotídica (5'-CTCCGCTTATTGATATGC-3') a partir de la secuencia de DNA que codifica el RNAr 25S y se marcó mediante marcaje terminal con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Lillehaug & Kleppe, 1975) utilizando T4 polinucleótido quinasa.

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

- 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.

10.8. Separación y cuantificación de la incorporación de isótopo

Para poder valorar la incorporación de isótopo en el DNA, 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 DNA 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 DNA con el mayor número de cuentas.

10.9. 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 & 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) y se añadió la sonda marcada y desnaturalizada (400 µL) 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. Para las hibridaciones con la sonda de RNAr 25S se procedió de la misma manera excepto que la temperatura de hibridación fue de 42°C.

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 (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 RNAr 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.

10.10. 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 RNAm se cuantificaron y se normalizaron los valores obtenidos respecto a la carga relativa inicial.

11. INTRODUCCIÓN DE DNA EN LAS CÉLULAS. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

11.1. Técnicas en bacterias

11.1.1. Preparación de células competentes y transformación.

Método con cloruro de rubidio (Kushner, 1978)

Preparación de bacterias competentes

Se inoculó medio SOC (ver medios de cultivo) con un volumen adecuado de preinóculo. Se recomienda empezar añadiendo 1/100 del volumen del medio, por ejemplo 3 mL de preinóculo en 300 mL de medio SOC. Se mide la OD₆₀₀ en el espectrofotómetro.

Se incubó el cultivo a 37°C y agitación (300 r.p.m.) hasta alcanzar la OD deseada (OD₆₀₀ ≈ 0,5-0,6). En ese momento, se introdujo el cultivo en hielo durante 10 min para detener la división celular. Transcurrido ese tiempo, se vertió el cultivo en tubos de centrifuga estériles y previamente enfriados y se realizó una precipitación durante 7 min a 5.000 r.p.m. en una centrifuga refrigerada. Es importante que en todo momento las células se encuentren en un medio frío, por lo que se mantuvieron en un baño de hielo.

Descartado el sobrenadante, se añadió una pequeña cantidad de solución TFB-1* en cada tubo de centrifuga. Se resuspendieron las células hasta que no se observó ningún grumo y se completó el volumen de TFB-1 hasta los 40 mL. Se mantuvo la suspensión en hielo durante 5 min para permitir la actuación del TFB-1. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 7 min. Se descartó el medio dejándose únicamente las células y se añadió una pequeña cantidad de TFB-2** (también previamente enfriado). Se resuspendieron las células hasta que no quedaron grumos y se completó el volumen con el TFB-2 restante.

Finalmente se repartió la mezcla celular en alícuotas de 100 µL en tubos *Eppendorff* (previamente enfriados) que se mantuvieron en hielo seco hasta su almacenamiento definitivo a -80°C.

- 80 ml de **TFB-1** compuesto por:

Cl₂Rb	0,964 g
Cl₂Mn	0,788 g
CH₃COOK	0,232 g (pH 5,8)
Cl₂Ca	0,116 g
Glicerol	12 mL

Enrasar a 80 mL con agua bidestilada. Esterilizar en el autoclave.

- ** 15 ml de **TBF-2** compuesto por:

Cl₂Rb	0,02 g
Cl₂Ca	0,2 g
Glicerol	2,28 mL

Enrasar a 15 mL con agua bidestilada. Esterilizar en el autoclave.

Transformación de las células

La transformación se llevó a cabo utilizando alícuotas de 100/200 µL de células competentes recién descongeladas a las que se añadió el volumen necesario de DNA plasmídico y se incubaron a 0°C durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 5 min para luego añadirles 1 mL de medio LB e incubarlas a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, las células se precipitaron a 6.000 r.p.m. durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en un volumen de 100 µL de LB para sembrar finalmente en placa selectiva LBA.

11.1.2.Preparación de células electrocompetentes y transformación.

Método de electroporación

Preparación de bacterias electro-competentes

Se inocularon 10 mL de medio LB con las células bacterianas y se dejó crecer en agitación a 37°C durante una noche. Al día siguiente se inoculó 1 litro de LB con ese pre-inóculo y se incubó en agitación hasta alcanzar una $OD_{600} \approx 0,5-0,6$ para que el cultivo se encontrara en la fase logarítmica de crecimiento.

En ese momento, se introdujo el cultivo en un recipiente con hielo durante 10 min para detener el crecimiento. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las células a 5.000 r.p.m. durante 5 min para lavarlas a continuación con 50 mL de agua estéril fría. Se centrifugaron de nuevo y se volvieron a lavar de modo que se eliminasen todos los restos de medio de cultivo o sales que pudieran interferir en la electroporación provocando descargas eléctricas y la muerte de las células.

Se realizaron dos nuevos lavados en glicerol al 10% frío. Finalmente se resuspendieron las células en 2 mL de glicerol al 10%. Esta suspensión celular fue repartida en alícuotas de 50 μ L en tubos *Eppendorff* previamente enfriados, y que se mantuvieron en hielo seco hasta su almacenamiento definitivo a -80°C .

Transformación de las células electro-competentes

La transformación se llevó a cabo tomando una alícuota de 50 μ L recién descongelada a la que se le añadió el volumen de la suspensión de DNA transformante. Se mezcló suavemente y se introdujeron las células en una cubeta especial para el electroporador (*Electroporation Cuvette* 1mm. EQUIBIO). La cubeta se introdujo en el electroporador *GENE PULSER*[®] de *BIORAD* y se sometieron las células a un pulso eléctrico en las siguientes condiciones:

Voltaje 2,5 KV

Capacitancia 25 μ F

Resistencia 200 Ω

Tiempo 4,8 mseg

Tras lo cual se añadió 1 mL de LB y se incubaron durante 30 min a 37°C. Transcurrida la incubación, se centrifugaron las células a 6.000 r.p.m. durante 10 min se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en el volumen deseado de LB (100 μ L por placa de siembra) y se sembraron en placas selectivas LBA.

11.2. Técnicas en levaduras

11.2.1. Método de acetato de litio

Para la transformación de levaduras por este método (Ito *et al.*, 1983), se tomó un cultivo de 10 mL a una $OD_{600} \approx 0,6$ y se centrifugó a 5.000 r.p.m. durante 3 min. Las células precipitadas se lavaron con 5 mL de agua estéril y se centrifugaron de nuevo. El sedimento se resuspendió en 1 mL de *buffer* LiAc-1xTE 0,1M (preparado a partir de soluciones *stock* 1xTE y LiAc 1M pH 7,5) y se pasó a un tubo *Eppendorff* estéril. Se centrifugó 15 segundos a 13.000 r.p.m. y las células se resuspendieron en un volumen adecuado (100 μ L – 1 mL) de *buffer* TE-LiAc.

Para cada transformación se preparó la siguiente mezcla:

100 μ L de células resuspendidas en TE-LiAc

5 μ L de DNA de salmón (*carrier*) sonificado de Sigma a una concentración de 10 mg/mL

30 μ L de DNA transformante

Se mezcló todo en el vortex y se añadieron 600 μ L de una solución estéril de PEG 4000 al 50% (P/V). Se agitó nuevamente en el vortex y se incubó 30 min a 30°C y con agitación. Transcurrido este tiempo se efectuó una nueva incubación de 15 min a 42°C sin agitación para inducir un choque térmico. Se precipitaron las células mediante centrifugación y se lavaron en 1 mL de agua estéril. Se centrifugó nuevamente para eliminar el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 100 μ L de agua bidestilada estéril para ser sembradas en las placas selectivas adecuadas.

En el caso de la transformación para la obtención del nulo de *KIHEM12*, el protocolo fue modificado añadiendo un período de incubación en medio no selectivo durante 6 horas, antes del sembrado final en placa selectiva.

Preparación del *buffer* LiAc-1xTe 0,1 M:

1xTE estéril	9 mL
Acetato de Litio 1M a pH 7,5	1 mL

12.MEDIDAS DE ACTIVIDAD BETA-GALACTOSIDASA

12.1.Consideraciones iniciales

El gen *lacZ* de *E. coli*, primero del operón *lac*, codifica la beta-galactosidasa, que hidroliza de manera natural a la lactosa para rendir glucosa y galactosa. Comúnmente, también se emplea en biología molecular para la hidrólisis de una amplia variedad de beta-D-galactósidos que incluyen a los sustratos cromogénicos sintéticos incoloros que dan lugar a un producto coloreado cuando son hidrolizados.

Los genes de levaduras cuyo producto natural no es fácilmente medible, a menudo son fusionados con una porción funcional del gen *lacZ* de modo que se pueda observar cuantitativa o cualitativamente la regulación de la expresión del gen en cuestión. Como sustrato cromogénico se emplea el o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) (Sigma®), compuesto incoloro que tras la hidrólisis rinde galactosa (también incolora) y o-nitrofenol, de color amarillo. El incremento de la absorbancia a 420 nm con el tiempo es una medida de la actividad del gen.

Existen dos métodos básicos para los ensayos *in vitro* de beta-galactosidasa en levaduras, y se diferencian principalmente en el método de preparar el material para el ensayo. En un procedimiento se prepara un extracto crudo de proteínas y la actividad se normaliza respecto a la proteína total ensayada. En el otro, las células son permeabilizadas para permitir que el sustrato penetre en ellas, y la actividad se normaliza respecto del número de células utilizadas. Ya que en este trabajo se han empleado ambas técnicas, se realiza una descripción de cada una de ellas.

12.2.Ensayo con extracto crudo (Rose & Botstein, 1983)

Se preparó un cultivo de 10 mL de las células a analizar, se dejó crecer en agitación y a 30°C hasta una OD a 600 nm de 0,8. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 4.000 r.p.m. Se mantuvieron los tubos en hielo desde este punto en adelante. A continuación se lavó el precipitado con 1 mL de tampón Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM) y se centrifugó de nuevo. Posteriormente se añadieron 250 μL de tampón Z y 0,5 gr de perlas de vidrio (Acid-Washed Glass Beads, 425-600 microns. Sigma®), se realizaron tres pulsos de 30 segundos en el vortex manteniendo los tubos medio minuto en hielo antes del siguiente pulso. Se recogió el sobrenadante con una pipeta *Pasteur* y se pasó a un tubo *Eppendorff*; se lavaron con 750 μL de tampón Z las perlas empleadas y se

añadió este volumen a los 250 μL anteriores. Se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 4.000 r.p.m. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. Se transfirió de nuevo el sobrenadante a otro tubo. El extracto proteico obtenido, se mantuvo en hielo hasta la medida de la actividad beta-galactosidasa.

12.2.1. Medida de la concentración de proteína (Bradford, 1976)

Se preparó para cada medida, un tubo *Eppendorff* con 990 μL de agua y se añadieron 10 μL del extracto obtenido. Se retiraron 400 μL de la mezcla y se agregaron 200 μL de reactivo colorante (Bio-Rad Protein Assay. Dye Reagent Concentrate: Phosphoric acid and Metanol. Bio-Rad[®]). Se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 595 nm.

Para preparar la recta patrón se empleó una solución de proteína de concentración conocida: Sero-albúmina Bovina (Sigma[®]) 1 mg/mL. Se prepararon una serie de tubos a concentraciones de 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 12,5 etc... $\mu\text{g/mL}$ añadiendo 2,5 - 5 - 7,5 ... μL de solución proteica en 997,5 - 995 - 992,5 ... μL de agua. Se trataron los tubos del mismo modo que los del extracto experimentado. Finalmente se representó en una gráfica los valores obtenidos de absorbancia a 595 nm frente a las concentraciones conocidas. Se obtuvo además una recta de regresión que permite conocer las concentraciones de las muestras a partir de su valor de absorbancia.

12.2.2. Medida de la actividad beta-galactosidasa

Se preparó un tubo de ensayo por cada muestra en el que se añadieron 900 ó 950 μL de tampón Z, junto con 100 ó 50 μL de extracto, según la actividad esperada sea baja o alta (es aconsejable realizar una prueba inicial con las dos cantidades para decidir cual de ellas es la más apropiada para el experimento). Se añadieron 400 μL de ONPG (4mg/mL en tampón Z) y se introdujeron los tubos en un baño a 30°C con agitación moderada. Se incubaron de este modo hasta observar un cambio en la tonalidad de la mezcla que pasó de transparente a amarillenta. Se anotó el tiempo transcurrido en minutos. En este momento se paró la reacción de hidrólisis mediante la adición de 400 μL de Na_2CO_3 1,25 M. Se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 420 nm.

12.2.3. Expresión de la actividad enzimática

La actividad enzimática se calcula por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \left(\frac{A_{420}}{0,0045 \times T \times P \times V} \right) \times 16 \left(\frac{\text{nmol ONPG}}{\text{mg Proteína} \times \text{min}} \right)$$

Donde:

A₄₂₀: es el valor obtenido de la medida a 420 nm

T: es el tiempo transcurrido en minutos desde que se introduce el tubo a 30°C hasta que se detiene la reacción con Na₂CO₃.

P: es el valor de concentración de proteína total.

V: es el volumen ensayado para la medida en mL (50 ó 100 µL normalmente).

12.3. Ensayo con células permeabilizadas (Guarente, 1983)

Se preparó un pre-inóculo de la levadura desecada y se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 11 mL de un nuevo cultivo y se dejaron crecer a 30°C y con agitación hasta una OD a 600 nm de 0,8-1.

Se tomó 1 mL de células para medir con un espectrofotómetro su OD a 600 nm; se anotó y conservó esta medida.

12.3.1. Medida de la actividad beta-galactosidasa

Los 10 mL restantes se centrifugaron a 4.000 r.p.m durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 mL de tampón Z (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM y β-mercaptoetanol 50 mM). Se centrifugó de nuevo 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 mL de tampón. Se añadieron 110 µL de cloroformo y 175 µL de SDS al 0,1%. Se agitó fuertemente en el vortex durante 15 segundos. A continuación, se incubaron los tubos a 30°C con agitación, de 5 a 10 minutos. Seguidamente, se añadieron 440 µL de ONPG (4 mg/mL en agua bidestilada). Se dejó transcurrir el tiempo hasta que se observó un ligero cambio de tonalidad hacia el amarillo; se tomó en este momento una muestra de 1 mL que se vertió en un tubo marcado como T1 que contenía 500 µL de Na₂CO₃ 1M para detener la reacción de hidrólisis del ONPG.

Cuando se observó un cambio mayor de coloración, se tomó una segunda medida marcada como T2.

Se centrifugaron a continuación los tubos T1 y T2 durante 5 minutos a 13.000 r.p.m y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se midió la densidad óptica a 420 nm para cada tubo.

12.3.2. Expresión de la actividad enzimática

La actividad enzimática queda expresada por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \left(\frac{\Delta A_{420}}{OD_{600} \times V \times T} \right) \left(\frac{nm \text{ ONPG}}{mL \times \text{min}} \right)$$

Donde:

ΔA_{420} : es el incremento de absorbancia por unidad de tiempo (min^{-1})

T: es el tiempo de reacción en minutos

V: es el volumen de cultivo en mL (10 mL).

13. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN

13.1. 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 se añadió 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 DNA y 1.5 μL del cebador marcado con una concentración de 1,2 pmol/ μL , completada con agua destilada hasta un volumen final de 26 μL . A continuación, estos 4 tubos se sometieron a una reacción de PCR 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) específica y calculada según la secuencia de los cebadores. 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*.

13.2. Secuenciación automática empleando oligonucleótidos sintéticos no marcados “cebadores fríos”

Para la secuenciación automática empleando cebadores no marcados se empleó el kit comercial *Terma 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 DNA

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 de secuenciación fue el siguiente:

- 30 ciclos 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 específica previamente calculada. 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 min. El precipitado se lavó con 200 μL de etanol al 70% frío y se volvieron a centrifugar durante 5 min a 13.000 r.p.m. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10-15 min 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 min 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*.

Las secuenciaciones automáticas descritas se llevaron a cabo a través de los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de A Coruña. En algunos casos se acudió directamente a la empresa *Sistemas Genómicos* (Paterna-Valencia).

13.3.Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos específicos empleados en los distintos experimentos aparecen descritos a lo largo del apartado de resultados de la presente Tesis.

Para secuenciar los insertos de la genoteca de *K. lactis* presentes en el vector pAB24 (materiales y métodos) se diseñaron los oligonucleótidos Tetra1 (GCTTCGCTACTTGGAGCCACT) y Tetra2 (GCTTCGCTACTTGGAGCCACT) que hibridan específicamente en las posiciones +242 y +372 de dicha secuencia. A partir de este momento las posiciones de todos los cebadores se describen en relación al ATG, considerando como posición +1 la A.

Para la secuenciación de las construcciones de las deleciones del promotor en el vector pXW1 se diseñó el oligonucleótido 70LacZ (TCGCACTCCAGCCAGCTTTCC) que hibrida en la posición +227 del gen *lacZ* de dicho vector.

14. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

14.1. Preparación de los geles de agarosa

Para el análisis de los productos de PCR y de las digestiones se prepararon geles de agarosa de SERVA a porcentajes entre 1-1,2 % en *buffer* 1xTAE (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 0,1 mM y Ácido Acético 30 mM). 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). El voltaje utilizado fue de 80-100 V y el tiempo de migración dependió de la concentración del gel y de su tamaño.

Azul de carga

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

14.2. Tinción de los geles y visualización de los mismos

Para observar el DNA se procedió a la tinción de los geles con bromuro de etidio (10 mg/mL) y a la visualización tras exposición a luz ultravioleta en un transiluminador *Vilber Lourmat*. Las fotografías de los geles fueron obtenidas con una cámara digital Kodak DC40. El análisis de la imagen para su cuantificación se hizo mediante el programa Kodak Digital Science 1D.

15.SOPORTE INFORMÁTICO

Se utilizaron los siguientes programas como apoyo al diseño de experimentos y análisis de resultados.

15.1.Análisis de secuencias

DNAsis HITACHI™

Utilizado para analizar secuencias de DNA 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 DNA.

15.2.Diseño de oligonucleótidos sintéticos

OLIGO(Molecular Biology Insights Inc. Colorado-USA)

Permite el diseño de oligonucleótidos sintéticos para luego ser sintetizados y empleados como cebadores en reacciones de secuenciación y de PCR.

También se utilizaron las siguientes bases de datos y accesos a páginas de análisis.

15.3.Análisis de homología de secuencias de genes

NCBI (National Center for Biotecnology Information)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

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 DNA, proteínas, ESTs (Expressed Sequene Tags),... de diversos organismos y realizar análisis de búsquedas de homología y alineamientos entre distintas secuencias.

SGD (*Saccharomyces Genome Database*) <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

Base de datos de la levadura *S. cerevisiae*, permite consultar información acerca de cualquier gen de esta levadura y hacer análisis de secuencias comparándolas con las de su base de datos.

GENOSCOPE <http://www.genoscope.cns.fr/>

Base de datos de genoma de distintos organismos, entre ellos levaduras (*Genolévures*), donde se encuentra el de *K. lactis*.

ExpPASy (*Expert Protein Analysis System*) <http://us.expasy.org/>

Servidor de biología molecular del SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*) donde se encuentran alojadas una gran variedad de herramientas para el análisis de secuencias. Algunas de las empleadas en este trabajo son el CLUSTAL W de EBI (*European Bioinformatics Institute*) (Thompson *et al.*, 1994), *PredictProtein* (Rost, 1996).

15.4. 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:

MATCH www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/match.cgi

TFSEARCH Search Result™ <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>

TRANSFAC™ MatInspector versión 2.2. <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/matSearch/matsearch22.pl>

RSA TOOLS <http://www.ucmb.ulb.ac.be/bioinformatics/rsa-tools/>

15.5.Tratamiento de imágenes

Kodak Digital Science 1D

Programa informático que no sólo permitió fotografiar el DNA ó RNA de los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio sino que también permitió la cuantificación del DNA.

Quantity One[®] versión 4.5.2

Software informático de análisis de imagen de BIORAD Laboratories Inc. Permite adquirir imágenes, editarlas y cuantificar bandas y objetos.

15.6.Análisis cuantitativo de los niveles de expresión

Image Quant versión 5.0

Programa informático empleado para la cuantificación de los niveles de expresión obtenidos tras escanear las pantallas de fósforo de los experimentos de *northern blot* radiactivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1:
CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DE LOS GENES *KIHEM12*, *KIHAP1* y
KISRB10

1. INTRODUCCIÓN

Como primer objetivo de esta Tesis de doctorado se propuso clonar una serie de genes de *Kluyveromyces lactis* que reunían dos características. La primera de ellas es que estuviesen relacionados con la biosíntesis de hemo o su regulación. La segunda es que su clonación pudiese llevarse a cabo partiendo de información parcial de sus secuencias, disponible por aquel entonces, en las bases de datos. En el año 2.000 se publicó la primera información sobre la secuencia parcial de una serie de genes de *K. lactis* obtenida mediante secuenciación al azar (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000). Esta fuente de información incentivó y permitió a Silvia Díaz Prado, que en esos momentos desarrollaba su investigación en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de A Coruña, a poner a punto una estrategia de clonación, que resultó muy útil para nuestros propósitos. Esta técnica ha sido posteriormente publicada con la denominación de *DCbyPCR* y se describe en la sección de materiales y métodos (Díaz-Prado *et al.*, 2004).

Entre los genes seleccionados para su clonación en este trabajo se encuentra *KIHEM12* de la ruta de biosíntesis de hemo. De los genes restantes, *KIHEM1* ya había sido previamente clonado en el laboratorio (González-Domínguez *et al.*, 1997) y de los otros 6 no existían datos sobre su secuencia. Como potencial regulador de la biosíntesis de hemo se seleccionó al gen *KIHAP1* que es un regulador transcripcional que responde a hemo (Zhang & Hach, 1999). Se incluyó también *KISRB10* ya que se sabía que el gen *SRB10* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica para una quinasa dependiente de ciclina (Liao *et al.*, 1995) que interviene en distintas rutas de regulación transcripcional. Además, datos de nuestro laboratorio lo habían relacionado con la regulación hipóxica (Cadahía-Rodríguez, 1996; Becerra *et al.*, 2002).

2. CLONACIÓN DE *KIHEM12*

El grupo hemo tiene una gran importancia en las funciones biológicas dependientes de oxígeno. Existen numerosas proteínas encargadas del transporte de oxígeno, prevención del daño oxidativo y del transporte de electrones, que utilizan hemo como grupo prostético. Además, el grupo hemo también regula la expresión de varios genes a través de su acción sobre factores transcripcionales de regulación específica (Zitomer & Lowry, 1992; Pinkham & Keng, 1994).

La biosíntesis de hemo en levaduras no convencionales, como *K. lactis*, no está todavía completamente estudiada. A continuación se describe la clonación del gen *KIHEM12* que no había sido previamente caracterizado.

2.1.Descripción de la clonación de *KIHEM12* mediante la técnica de *DCbyPCR*

En *S. cerevisiae*, la enzima uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D) está codificada por el gen *HEM12* (YDR047W) y cataliza el quinto paso de la síntesis de hemo, convirtiendo el uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III. Se encuentra localizado en el brazo derecho del cromosoma IV a una distancia de 4.232 nt del gen *ScHEM13*, que codifica la enzima implicada en el siguiente paso de la ruta de síntesis de hemo. El creciente interés por la levadura *K. lactis*, ha generado la aparición de numerosos trabajos relacionados con esta levadura. Entre ellos destaca el proyecto *Genolévures*, cuyo objetivo ha sido la obtención de la secuencia completa del genoma de varias levaduras no convencionales, entre ellas *K. lactis*. En las primeras publicaciones relativas a este proyecto (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000) se encontraron dos secuencias de *K. lactis* homólogas a la de *ScHEM12*, de 854 y 767 pb respectivamente, (BA0AB029H03 y BA0AB011A07) y que se solapaban. Superponiendo ambas, se obtuvo una secuencia de 1.391 pb que no contenía una región codificadora completa (ver figura 4) pero que resultó útil como molde para el diseño de los cebadores ECV76 y ECV77, cuya secuencia aparece descrita en la tabla 4 y su posición señalada en la figura 4.

Estos cebadores amplifican por PCR un fragmento de 489 pb a partir de DNA genómico de *K. lactis* y se utilizaron en todas las reacciones de PCR que se describen en el esquema de la figura 4. La temperatura de hibridación elegida entre el DNA molde y los cebadores fue de 45°C.

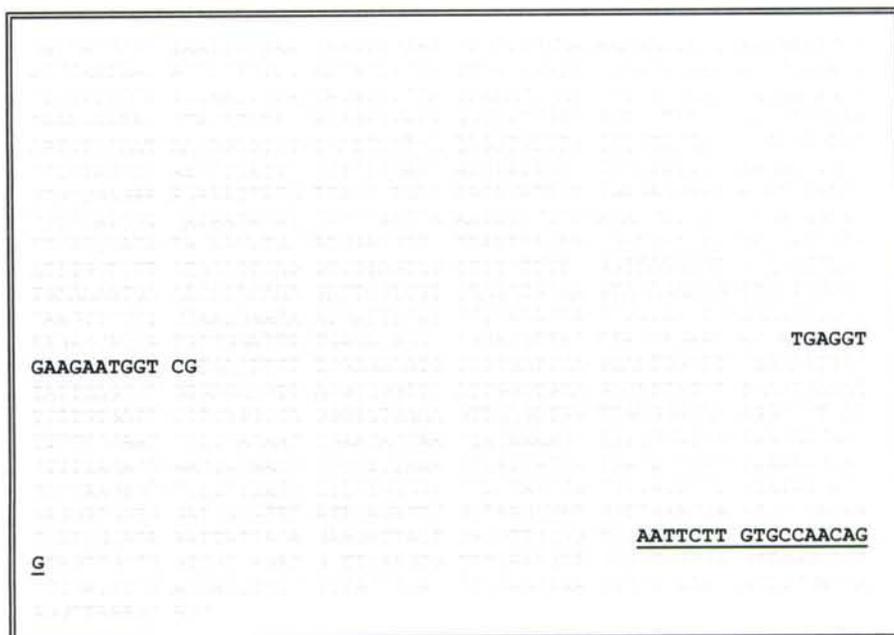


Figura 4. Secuencia parcial de *KIHEM12* obtenida tras unificar las secuencias parciales BA0AB029H03 y BA0AB011A07. El oligonucleótido ECV76 aparece en negrita y ECV77 (secuencia complementaria) aparece en negrita y subrayado.

Tabla 4. Listado de los oligonucleótidos empleados para el método de *DCbyPCR* y secuenciación mediante *Primer Walking* del clon pAB24*KIHEM12*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra
ECV76	TGAGGTGAAGAATGGTTCG	Watson
ECV77	CCTGTTGGCACAGAATT	Crick
ECV106	TTGATCGCTCCAAGTTTCG	Watson
ECV107	CTGGTAAATAACGTCCAGCCT	Crick
ECV108	GAAGATTACTGACGTTGCGGT	Watson
ECV109	GGGATCATGGTACGCACTAGA	Watson
ECV112	TAAACCAGCCTGGTTCGG	Watson
ECV112-bis	GATGAATCGTTGAAAACGTCC	Watson
ECV113	TGCAAAGAAGAAAGGATTCAT	Crick
ECV113-bis	CAATCATAGACGTACAAGTCATTC	Crick
ECV126	GCTCAAAGAAGTGTGGATTCC	Watson
ECV144	TTGATTCAATGGGCATTCA	Crick
ECV145	CCAAGAATTTTTTCGGGGC	Watson

Mediante el uso de la técnica *DCbyPCR* (Díaz-Prado *et al.*, 2004) descrita con detalle en la sección de materiales y métodos, se llegó a la obtención de un clon de *KIHEM12*. Como material de partida se empleó una genoteca de *K. lactis* construida a partir de DNA genómico de la cepa Y1140 en el vector pAB24 y que se denominó genoteca Chiron (materiales y métodos).

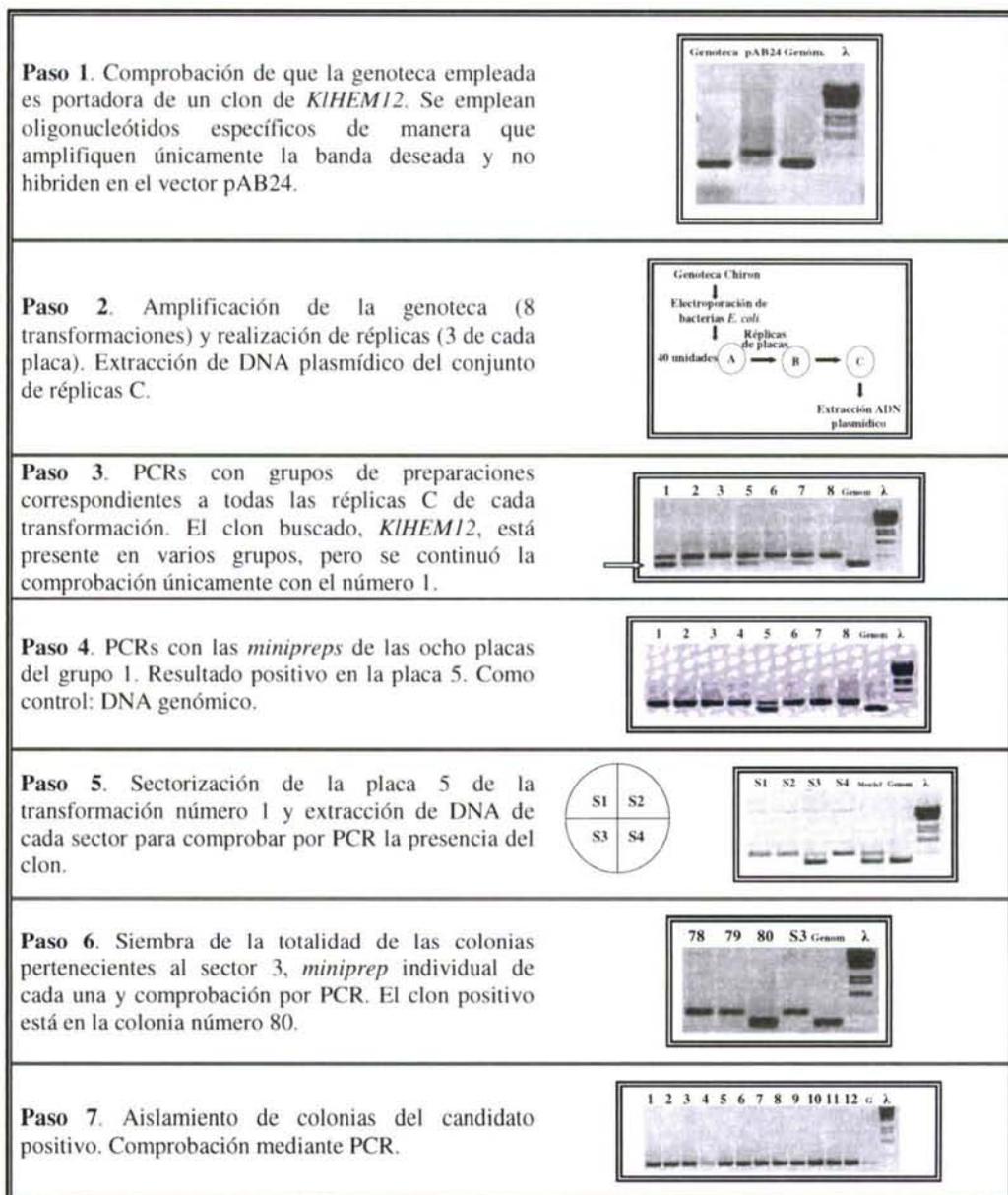


Figura 5. Esquema de la estrategia *DCbyPCR* mostrando la clonación del gen *KIHEM12*. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Como marcador de tamaños de los fragmentos se empleó el DNA del fago λ digerido con *BstEII* (Lambda DNA-*BstEII* digest de BioLabs citado en Daniels *et al.*, 1983).

El clon obtenido fue denominado pAB24*KIHEM12* y el procedimiento seguido para su aislamiento e identificación aparece esquematizado en la figura 5.

Las dos hebras del clon pAB24*KIHEM12* fueron secuenciadas empleando la estrategia de *primer walking* (McBride *et al.*, 1989) por secuenciación automática utilizando el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) hasta obtener una secuencia de *KIHEM12* completa. Dicha secuencia, de 2.939 pb, fue enviada a la base de datos de EMBL con el número de acceso AJ496574. Contiene una región codificadora de 1.110 pb, una región 5' de 989 pb y una región 3' de 840 pb (figura 6).

Mediante BLAST2 *sequences* (Tatusova & Madden., 1999), se realizaron análisis de la región codificadora traducida a proteína que revelaron una alta similitud con otras proteínas URO-D. Los mejores resultados se exponen en la tabla 5. Se observa que la URO-D de *K. lactis* no sólo es similar a otras URO-D de hongos, sino también de vertebrados, aunque la similitud más alta (82%) la presenta al compararla con la de *S. cerevisiae*, tal y como se puede ver en la tabla 5.

Tabla 5. Homología entre URO-D de *Kluyveromyces lactis* y otras URO-D de diferentes orígenes.

Fuente	Proteína	Solapamiento	% Identities	% Positivos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	URO-D	359	82	90
<i>Neurospora crassa</i>	ORF hipotética	363	59	74
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	probable URO-D	371	54	71
<i>Danio rerio</i>	URO-D	359	54	69
<i>Homo sapiens</i>	URO-D	367	50	68
<i>Ovis aries</i>	URO-D	355	51	68

GACACCATTA	GCAGAATCAT	CAGATACCTC	AATAAACTTT	GACTTTTTTCG	ATATCTGCTC	-930
GACTCTTTGC	AACAAATAGT	CATGTACATT	ATCATTGAAA	TGAGAAGTGT	AAGGATGAGG	-870
TTTCTCGGTA	ATGACTTGTA	AATCATGCCA	AGCTGCATCT	AACAATGAAT	TTGATGACTT	-810
ATCATCTGGT	AAGTTTGACT	TATATTTATT	AGCATCGAAC	CATGTCAGTA	TACTAATAAC	-750
CAAAACAGTA	AGCACAAACA	AGGTGCTAAC	GGTGGTCTTC	CTAAACTTGA	AAGTAGACCG	-690
AAAATAATTG	GCCATCATA	TAGTTGGACC	AGGGAAAGAA	AGAGCAGCCC	TGAACGATCA	-630
CCCGCTAATT	TCTAAGAAAT	TGTAGGTGCT	TGTCAAACAC	TTATTAATAA	AACGAATGGA	-570
ATAATACCTC	TCTTTATCAG	TTCTATTGAT	TTATTGTGAC	TGAAAACCCCT	TAAGTCTGTT	-510
TTGGTTTTAA	TTGTACATAT	TTCGATTATA	CTCATCTTCT	CGAATGATAA	CTAGATAAAG	-450
AAAACGTACA	TATACACAGA	GAAAAGGGCA	TTGACGAAGC	TTTGCAGCCT	TTAAAAGTCT	-390
CCAATAACAG	AGTATTCATT	AATCATAGGT	ATGTGCGTGT	TCTACTCTTG	TCTATCTCTGT	-330
AGCTCATCCT	TATTCCTTCT	CGAGCATGTA	TTGGCGTCTT	ATTTGAAGAA	CTCACGTGCC	-270
GAGAAAGAAA	TTATGTTACC	CTGAAAATAG	ATACTGGAGA	GGAAAACATC	AAACCCGTGC	-210
ATGGTGATAA	CAGATGTGCC	ATGCAAATTT	CCTCGAGACC	TTTTGGGGAC	AATAGTTTCT	-150
GCATATACGA	CCTGCATGGA	CGTTCTTAAT	AACAACGATT	ATCTGTACCA	TTGAAAATTTG	-90
CTCTTCTACA	TTCAGGTCTT	AGTAGTTTTT	TTTTCGGTTA	AGAGTGCAGG	TTTACTGAAA	-30
AAAGTAAACAT	ACAAAGACTC	GTCGTCAAGA	TGCAAGTACA	GAATGTTGAT	CGCTCCAAGT	+31
TCGCTCCAAT	GAAGAATGAT	TTGATGTCTA	GAGCAGCTTT	AGGTGAGAAG	GTTGAAAGAC	+91
CACCATGTTG	GATTATGAGA	CAGGCTGGAC	GTTATTTACC	AGAATACCAT	GAGGTGAAGA	+151
ATGGTCGTGA	CTTTTTTCGAG	ACATGTCGTG	ATGCAGAAAT	TGCTTCAGAA	ATTACTATTC	+211
AGCCCGTGAG	ACGTTACGCC	GGTTTATTGG	ATGCAGCCAT	TATCTTCAGT	GATATTTCTG	+271
TGATCCCTCA	GGCCATGGGT	ATGAAAAGTTG	AGATGGTTGA	GGGGAAAGGC	CCTCATTTC	+331
CGGAACCGTT	GAGAACTGAA	GAGCAAACCTA	AAAAGGTATT	GGATTATAAG	GTCACGTTTT	+391
TAGACGAACT	AGAATGGGCC	TTTAAAGCTA	TCACTATGAC	TCGTAATAA	TTGGACGGCC	+451
AAGTGCCTTT	GTTAGGTTTT	TGTGGTGCTC	CATGGACGTT	ATTGGTTTTT	ATGACCGAGG	+511
GTGGTGGATC	CGTTTATTTC	AGATTCGCTA	AGCAAATGGTT	AAACGAATCG	CACGAATCAT	+571
CGCATAAATT	ATTACAGAAG	ATTACTGACG	TTGCGGTCTGA	ATTCTTGTGC	CAACAGGTAG	+631
TTGCTGGTTG	TCAGATGCTT	CAAGTGTTTG	AAAAGTTGGGG	TGGCGAGTTA	GGCTCTCGTG	+691
ATTTTCGACGA	GTTCTCTTTA	CCGTACCTAA	AGCAAATTCG	GGAAAGAGTT	CCACCAAGGT	+751
TAAAGCAGCT	GGGTATCGAA	GAACGTGTTT	CAATGGTAGT	ATTCGCCAAG	GGATCATGGT	+811
ACGCACTAGA	CAAACTATGT	GACAGTGGCT	ATAATGCAGT	TTCTTTAGAT	TGGTCATGGG	+871
ACCCTGCAGA	GGCAGTAAAG	ATCAACAGTG	ACCGTGTTC	CTTACAGGTT	AATTTGGACC	+931
CTGGTGTAAT	TACGGTTTCG	GATGAGATTA	TTACCAAGAG	AGTCACTGAA	ATGGTTCATG	+991
GTTTCGGCGG	AGGTAAAGCAA	CATTACATTG	TAAACTTTGG	ACATGGTACC	CATCCATTCA	+1051
TGGATCCAGA	GAAGATCAAA	TTCTTTTTTG	AGGAATGTCA	CAGAGTCGGT	AGTCAAT AAA	+1111
TCTATCAAAA	ATCGGAAATA	GACTACTACC	TTTCTGCATC	CAATTTATTT	CATGTATATA	+1171
CCATTTCAAT	CTGTTTAATA	CATACTGATG	TCAGTAAATC	CATTTTTTTA	CCCTGCCTAG	+1231
TTGATCAAGT	CTGGTCATGT	ATGGTTTTTT	ACTTCAATGT	ACTTTATTTA	TAGTGAACC	+1291
TTGATATTTT	AAAGTTTGTT	ACTTCAATAA	ATCTTCTTCA	TTCATGAAAA	CTTGCCATCA	+1351
CACAGTAAAA	CGTTTTAAAA	GAGGTGTTAA	AGAGCTCAAA	GAAGTGTGGA	TCCCTGAAC	+1411
TGATGTCCGA	CAGAATACAA	AAGAATGACT	TGTACGTCTA	TGATTTGTCT	GATGAGATCC	+1471
TTTCTTCTTT	GCAGTTGATA	TCTTTCGACT	CTGATATGAA	TGAGGTTAAA	GTGGTCCATT	+1531
CTGATGTAGA	AATCGAAAAC	AAAAGGAAA	TTGAGGTTAA	AACAGTACCT	TCATGTGCTT	+1591
CATGTGGTAT	TAATGCATTT	CCTAATGATA	ATTCGTATCC	TCGATATCAT	TTTAAAACCTG	+1651
ATTTACACAA	ATTCACACATA	AAAAGAAGAG	TTTACGGTTT	ATCTCCAGTC	GATGAGCAAG	+1711
AGTTTAGGCA	GTTGATTTAA	AGTAAAGAAA	CAGCCACTGC	AGAAGATTCT	GACAGTGATT	+1771
CTTTATCTGG	TGAGGATGAT	GAGACAGATG	AAATAGAAGA	AGATGATATT	TCTACAAGAG	+1831
GAGGAGAGCA	GTTGACAGCA	ATCTCGAGC	ATGAACTCCA	GGATTTGATG	ATCAATGAGA	+1891
ACCAAACGGG	ACCCGTTTCT	CATTTAAACA	CACAATCTCC	TTTAAATATTC	ATGCATTCT	+1951

Figura 6. Secuencia de *KIHEM12* enviada a la base de datos con el número de acceso AJ496574. Los codones de inicio y terminación aparecen resaltados en negrita y subrayados.

En figura 7 se recoge un alineamiento CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) entre la proteína URO-D de *S. cerevisiae* y la región codificadora de *KIHEM12* traducida a secuencia de aminoácidos



Figura 7. CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) entre las secuencias proteínicas de ScHem12p (URO-D de *S. cerevisiae*) y KIHem12p (URO-D de *K. lactis*).

2.2.Subclonación de *KIHEM12*

La secuenciación realizada permitió conocer que el clon pAB24*KIHEM12* contenía, además del gen *KIHEM12*, otras regiones adyacentes, por ello se decidió subclonar una región de 2.665 pb, que incluyese la región codificadora, promotora y terminadora, en otros vectores que fuesen útiles para el análisis funcional del gen. La subclonación se llevó a cabo mediante PCR. Se utilizaron los oligonucleótidos ECV168 (CATCATTATAGTTGGACCAGG) y ECV169 (ATAAGCCCCGAAAAATTCTTG) que hibridan en las posiciones -678 y +1.987. La temperatura de hibridación seleccionada fue de 50°C.

Tras realizar una PCR con estos oligonucleótidos empleando *Taq* DNA polimerasa de elevada fidelidad y como molde de la reacción, DNA genómico de la cepa Y1140, el fragmento amplificado fue clonado en el vector comercial pGEM[®]-TEasy denominándose a esta construcción TEasy*KIHEM12*. A partir de este plásmido,

se liberó el clon de *KIHEM12* mediante una digestión con *SpeI* y *NotI* que cortan en el MCS del vector pGEM[®]-TEasy. El fragmento liberado fue clonado (ver materiales y métodos) con posterioridad en los sitios *NheI* y *XmaIII* (compatible con *NotI*) del vector pSK1, vector de expresión en *K. lactis* y en *S. cerevisiae*, denominándose a esta construcción pSK*KIHEM12*.

2.3. Análisis funcional de *KIHEM12* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Complementación de mutaciones *hem12* de distintas cepas de *S. cerevisiae*

Ya que el porcentaje de similitud entre las proteínas URO-D de *S. cerevisiae* y *K. lactis* era tan alto, se decidió comprobar la funcionalidad del gen *KIHEM12* en *S. cerevisiae*. Para ello se tomaron dos cepas de *S. cerevisiae* mutantes en *hem12*. Se trata de *hem6-1B* con una mutación puntual y *hem12-1A* con el gen deletado y sustituido por el marcador Kan^R. Esta última fue obtenida en nuestro laboratorio a partir de la cepa diploide de EUROSCARF BY473 (*MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ/leu2Δ lys2Δ/LYS2 MET15/met15Δ ura3Δ/ura3Δ HEM12/HEM12::Kan^R*) mediante esporulación y disección de tétradas. Ambos mutantes eran incapaces de crecer en un medio no suplementado con hemina (precursor de hemo). Se procedió entonces a la transformación mediante el método del acetato de litio, de cada uno de los mutantes con el clon pSK*KIHEM12*, seleccionando posteriormente en medio CM-Ura sin hemina añadida. En ambos casos el clon fue capaz de complementar la mutación tal y como se observa en la figura 8.

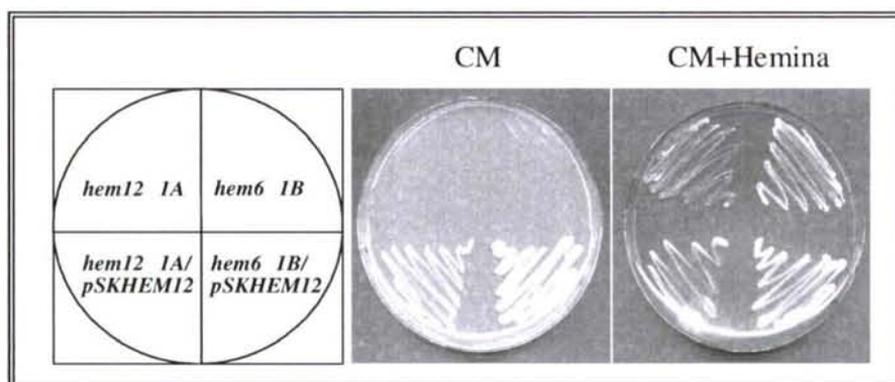


Figura 8. Complementación de dos mutaciones *hem12* (puntual: *hem6-1B* y nulo: *hem12-1A*) de *S. cerevisiae* con el clon en pSK*KIHEM12*.

También cuando se procedió a realizar las mismas transformaciones con el clon original en pAB24 se obtuvo el mismo resultado (datos no mostrados). Además, en este caso particular y para demostrar que la recuperada capacidad de crecimiento en ausencia de suministro de hemo era dependiente del plásmido, se sometió a las levaduras transformadas a un proceso de curación (pérdida del plásmido). Se mantuvieron los transformantes en crecimiento en medio no selectivo (CM suplementado con hemo a una concentración final de 50 µg/mL) durante 1 semana para favorecer la pérdida del plásmido. Transcurrido este tiempo, se sembraron algunas colonias en medio CM con hemo y se hicieron réplicas en CM-Ura con hemo y en CM sin hemo añadida. Todas las colonias incapaces de crecer en CM-Ura con hemo (habían perdido el plásmido) también se veían imposibilitadas para crecer en medio sin hemo añadida. Se demostraba de este modo que el fenotipo era dependiente del plásmido portador del clon.

3. CLONACIÓN DE *KIHAPI*

Se ha demostrado que el grupo hemo, cuya ausencia mimetiza la deficiencia en oxígeno, y que precisa de oxígeno molecular para su síntesis (Labbe-Bois & Labbe, 1990), es el mediador de la regulación por oxígeno de algunos promotores a través del factor transcripcional Hap1p (Cyp1p) (Hon *et al.*, 2003).

El gen *HAPI* de *S. cerevisiae* (YLR256W) fue identificado inicialmente como *CYP1* en una búsqueda de mutaciones responsables de un incremento de la actividad de la enzima iso-2-citocromo *c* (Clavilier *et al.*, 1969). Posteriormente, se identificó como *HAPI* en la búsqueda de genes responsables de la regulación de la expresión del gen que codifica para la iso-1-citocromo *c* (Guarente *et al.*, 1984). Años más tarde se concluyó que se trataba del mismo gen (Verdiere *et al.*, 1986) y la denominación *HAPI* pasó a hacerse más común. El gen *ScHAPI* se localiza en el brazo derecho del cromosoma XII.

En *S. cerevisiae*, la proteína Hap1p, activada por hemo, juega un papel importante en la activación de genes que codifican para proteínas requeridas en la respiración y en el control del daño oxidativo como respuesta al oxígeno y a hemo (Creusot *et al.*, 1988; Pfeifer *et al.*, 1989; Zhang & Hach, 1999). Los genes activados por Hap1p incluyen a *CYC1* (iso-1-citocromo *c*), *CYC7* (iso-2-citocromo *c*), *CYT1* (citocromo *c1*), *CTT1* (catalasa) y *YHB1* (flavohemoglobina) (Buisson & Labbe-Bois, 1998; Guarente *et al.*, 1984; Guarente & Mason, 1983; Lodi & Guiard, 1991; Lowry &

Zitomer, 1988; Pfeifer *et al.*, 1987; Schneider & Guarente, 1991; Winkler *et al.*, 1988; Zhao *et al.*, 1996). Hap1p también activa la transcripción del gen *ROX1* (Lowry & Zitomer, 1988) que codifica para la proteína Rox1p que reprime la expresión aerobia de genes de función asociada con el crecimiento en hipoxia o anaerobiosis, como es el caso de *ANB1* (Ushinsky & Keng, 1994). Además, en ausencia de hemo, Hap1p participa en la represión de *ERG11* que está relacionado con el metabolismo de esteroides (Verdiere *et al.*, 1991; Defranoux *et al.*, 1994). En ausencia de hemo, Hap1p está asociado con chaperonas formando un complejo de alto peso molecular (HMC) (Zhang *et al.*, 1998). Hap1p forma un gran complejo inactivo con los factores Ssap (Hsp70), Ydj1p y Sro9p. Tanto las actividades de unión a promotores como de regulación de transcripción mediadas por Hap1p están reprimidas en este complejo. La activación se produce en presencia de hemo tras la unión del complejo con la chaperona Hsp90p (Fytlovich *et al.*, 1993; Zhang & Guarente, 1994; Lee *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2004). La presencia de hemo provoca cambios conformacionales, de manera que se rompen estas interacciones inhibitorias de las chaperonas sobre Hap1 en el HMC. En consecuencia, Hap1p puede unirse como dímero al DNA diana con una alta afinidad lo que activa la transcripción. Además, Hap1p puede actuar también como represor transcripcional en ausencia de hemo. La formación y disociación del HMC son eventos clave en la regulación mediada por Hap1p en respuesta a hemo (Hon *et al.*, 1999).

Hap1p se une como dímero a dos tipos diferentes de elementos reguladores en los promotores, de los que podemos considerar como ejemplos los elementos UASI (*Upstream Activation Sequence*) del promotor del gen *CYC1* (UASI/CYC1, CGGGGTTTACGGACGAC) y el UAS del promotor de *CYC7* (UAS/CYC7, CGCTATTATCGCTATTA) (Pfeifer *et al.*, 1987; Schneider & Guarente, 1991).

3.1. Clonación de *KIHAPI* mediante la técnica de *DCbyPCR*

Gracias a la técnica de *DCbyPCR*, a partir de la genoteca Chiron ya descrita, se obtuvo un clon parcial del gen *HAPI* de *K. lactis*, *KIHAPI*, en pAB24 que se denominó pAB24*KIHAPI*. El proceso de obtención de dicho clon aparece esquematizado en la figura 10. Para las PCRs realizadas con el fin de reconocer el clon en cuestión, se diseñaron los oligonucleótidos ECV70 y ECV71 (tabla 6) que daban lugar a la amplificación de un fragmento de 892 pb a partir de la secuencia parcial BA0AB037D04 de 926 nt (figura 9) resultante de un proyecto de secuenciación al azar

del genoma de *K. lactis* (Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000). La temperatura de hibridación seleccionada para las reacciones de PCR fue de 50°C.

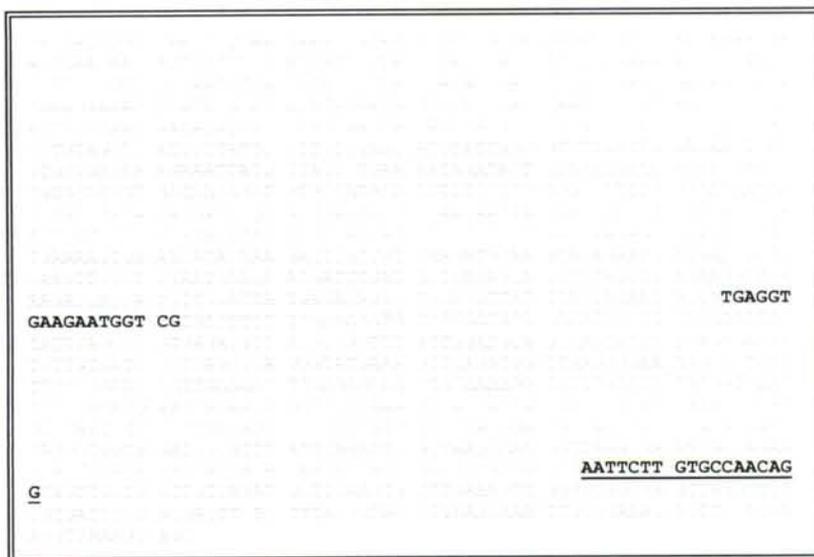


Figura 9. Secuencia parcial de *KIHAP1* correspondiente a la secuencia BA0AB037D04. El oligonucleótido ECV70 aparece en negrita y ECV71 aparece en negrita y subrayado.

Tabla 6. Listado de los oligonucleótidos empleados para el método de *DCbyPCR*, secuenciación mediante *primer walking* y comprobación del clon *KIHAP1*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra
ECV70	CAACTATGCAGTGGGAAGGCTTC	Watson
ECV71	CGCTGGAGAAGGTGGTAAAGAT	Crick
ECV101	TTTCATCTTCGCTGCTGC	Crick
ECV102	GCGGAACCTTCAACTCGA	Watson
ECV117	AATAATGATGGCTTGAACGAA	Watson
ECV118	CAGAAGGGTCATCAGCC	Watson
ECV122	AAAACAAGCTCTTGTGGTGG	Crick
ECV123	TTACCTCCGCTTTCACTTACA	Watson
ECV124	CCGACGAATGATGTTGTCAAT	Crick
ECV211	TGAACATCAAGTGAGACAATA	Crick
ECV212	ACTACGTTTAATTCATTTCC	Watson
ECV218	GCCCCTCGATGTTGTAGC	Watson
ECV219	CGGGAACGCTTTTCATAA	Crick
ECV222	TTTCGTCATTTTTTAACTA	Watson
ECV223	TTCGCGAAACCATTGAT	Crick
ECV227	TGGATTTGACAAGACAGTTC	Watson
ECV228	ACATCTCCGGCACTACACT	Crick
ECV235	CGATGCTATACTGATGCTC	Crick

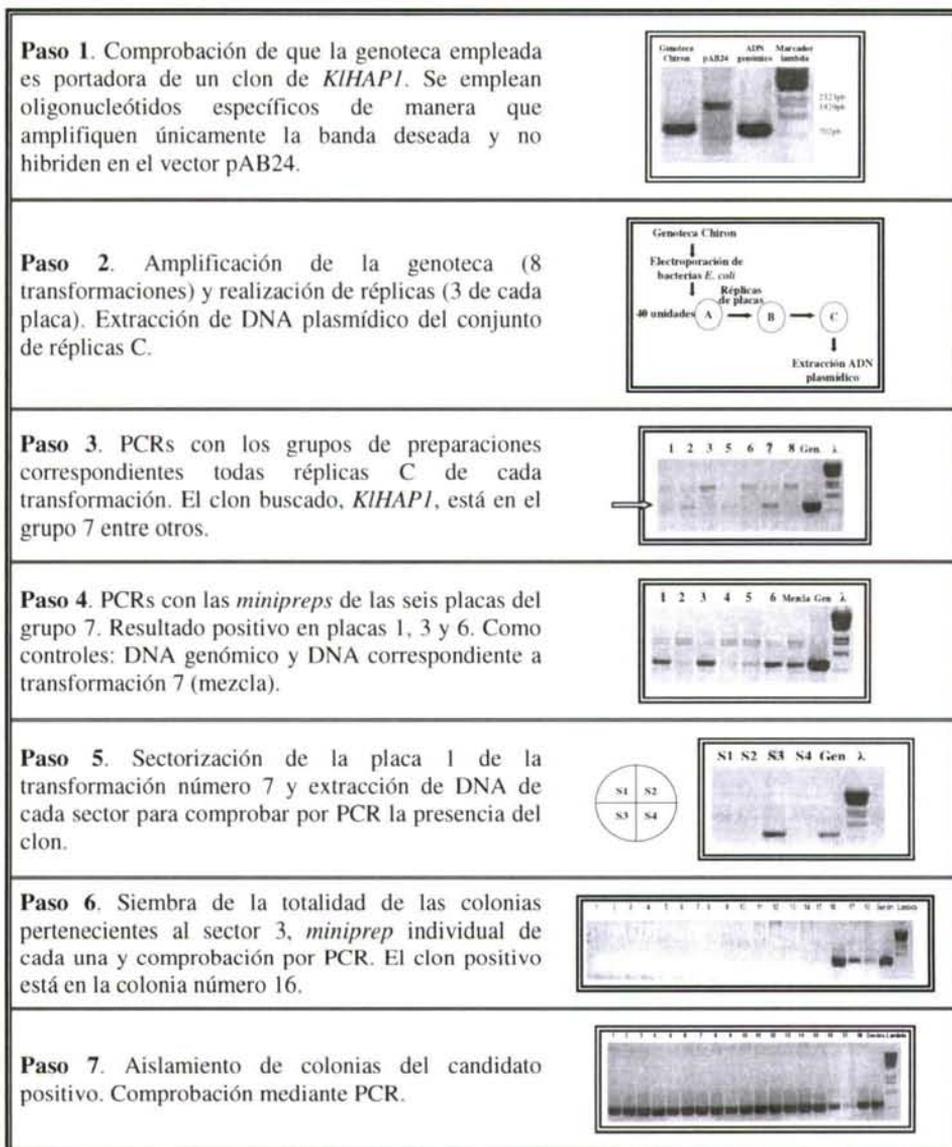


Figura 10. Esquema de la estrategia *DCbyPCR*, Discriminación de grupos por PCR (Díaz Prado *et al.*, 2004), mostrando la clonación parcial del gen *KIHAPI*. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Como marcador de tamaños de los fragmentos se empleó el DNA del fago λ digerido con *BstEII* (Lambda DNA-*BstEII* digest de BioLabs citado en Daniels *et al.*, 1983).

Tras los análisis por secuenciación del clon pAB24*KIHAPI* se concluyó que contenía aproximadamente un 50% de la ORF de *KIHAPI*, correspondiente a la región

próxima al terminador. *HAP1* es un gen de gran tamaño en *S. cerevisiae*, y ya que faltaba la mitad inicial de la ORF así como su región promotora, se abordó de nuevo la clonación de esta región para completar el gen.

3.2. Clonación parcial de *KIHAP1* a partir de DNA total de levadura

Se sabe que la sintenia, ordenamiento secuencial coincidente de los genes de dos especies próximas evolutivamente, es un hecho bastante frecuente en levaduras (Fischer *et al.*, 2001). Suponiendo la existencia de sintenia entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* en las regiones cromosómicas donde se localiza el gen *HAP1* en ambas levaduras, se decidió aprovechar esta característica para la clonación del gen. Para ello se amplificó a partir de DNA genómico un fragmento de PCR utilizando un cebador localizado en el clon parcial y otro basado en la ORF situada en posición 5' respecto de *HAP1* en *S. cerevisiae*. Esta alternativa era necesaria para poder obtener el clon completo ya que se pudo comprobar que no existían otros clones parciales solapantes con el obtenido en las distintas genotecas de *K. lactis* disponibles en el laboratorio. En la región 5' de *HAP1* en *S. cerevisiae* se encuentra la ORF YLR253W cuya función molecular y biológica son aún desconocidas (figura 11).

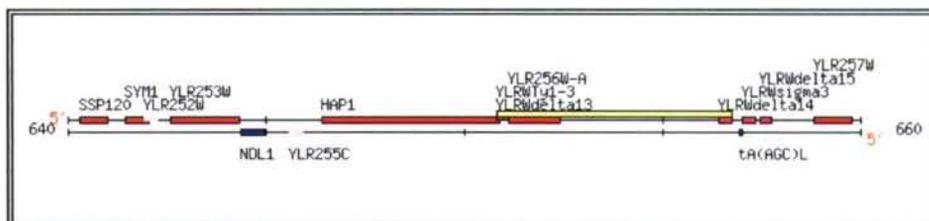


Figura 11. Mapa físico del gen *ScHAP1* y alrededores. YLR253W se toma como molde para el diseño de un oligonucleótido destinado a clonar la región 5' de *KIHAP1*.

A fin de diseñar un cebador que se localizase en una región conservada de YLR253W, se analizó por un BLASTP (Gish & States, 1993) las similitudes de esta ORF de *S. cerevisiae* con otras secuencias disponibles de hongos y levaduras. Las mayores se encontraron para *Neurospora crassa* (40%) y *Schizosaccharomyces pombe* (45%). A continuación se llevó a cabo un alineamiento múltiple tipo CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) entre estas tres secuencias para luego buscar aquellas zonas más altamente conservadas; se diseñó de este modo el oligonucleótido ECV140 (figura 12) que hibrida en la posición 1.267 de YLR253W de *S. cerevisiae* y que está orientado hacia la ORF de *HAP1*.



Figura 12. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de YLR253W de *S. cerevisiae* y sus homólogos en *N. crassa* y *S. pombe*. Diseño de ECV140 para la clonación de la región 5' del gen *KIHAPI*.

Asimismo, se diseñó el oligonucleótido ECV122 en la hebra complementaria de la región clonada en pAB24*KIHAPI*. De esta manera, empleando como molde DNA genómico de la cepa diploide W600B/WM37 de *K. lactis*, se amplificó por PCR un fragmento de 5.300 pb que contenía la región 5' de la ORF y el promotor. La temperatura de hibridación seleccionada fue de 50°C. El fragmento amplificado fue clonado en el vector de clonación pGEM[®]-TEasy y se sometió posteriormente a reacciones de secuenciación, de modo que se pudo determinar la secuencia que faltaba para completar la ORF de *KIHAPI* completa y la región 5'. Se denominó a este nuevo clon TEasy*KIHAPI*. Solapando las secuencias de ambos clones parciales (la de pAB24*KIHAPI* y la del TEasy*KIHAPI*) se obtuvo la secuencia completa de la ORF de *KIHAPI*. Un problema inesperado se reveló al analizar dicha secuencia ya que aparecía interrumpida por una ORF correspondiente a una transposasa bacteriana. El origen de esta secuencia pudo haber sido la recombinación con algún DNA contaminante del kit del pGEM[®]-TEasy. También podría ser que el gen en la cepa de la que se tomó el DNA genómico para la construcción estuviese ya interrumpido de esta manera.

Una vez conocida la secuencia total de *KIHAPI*, ésta fue enviada a la base de datos quedando registrada bajo el código AJ577612. La proteína codificada presentaba una similitud del 46% con Hap1p de *S. cerevisiae* mediante BLASTP (Gish & States, 1993). En la figura 13 se muestra un alineamiento CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) de estas dos secuencias.

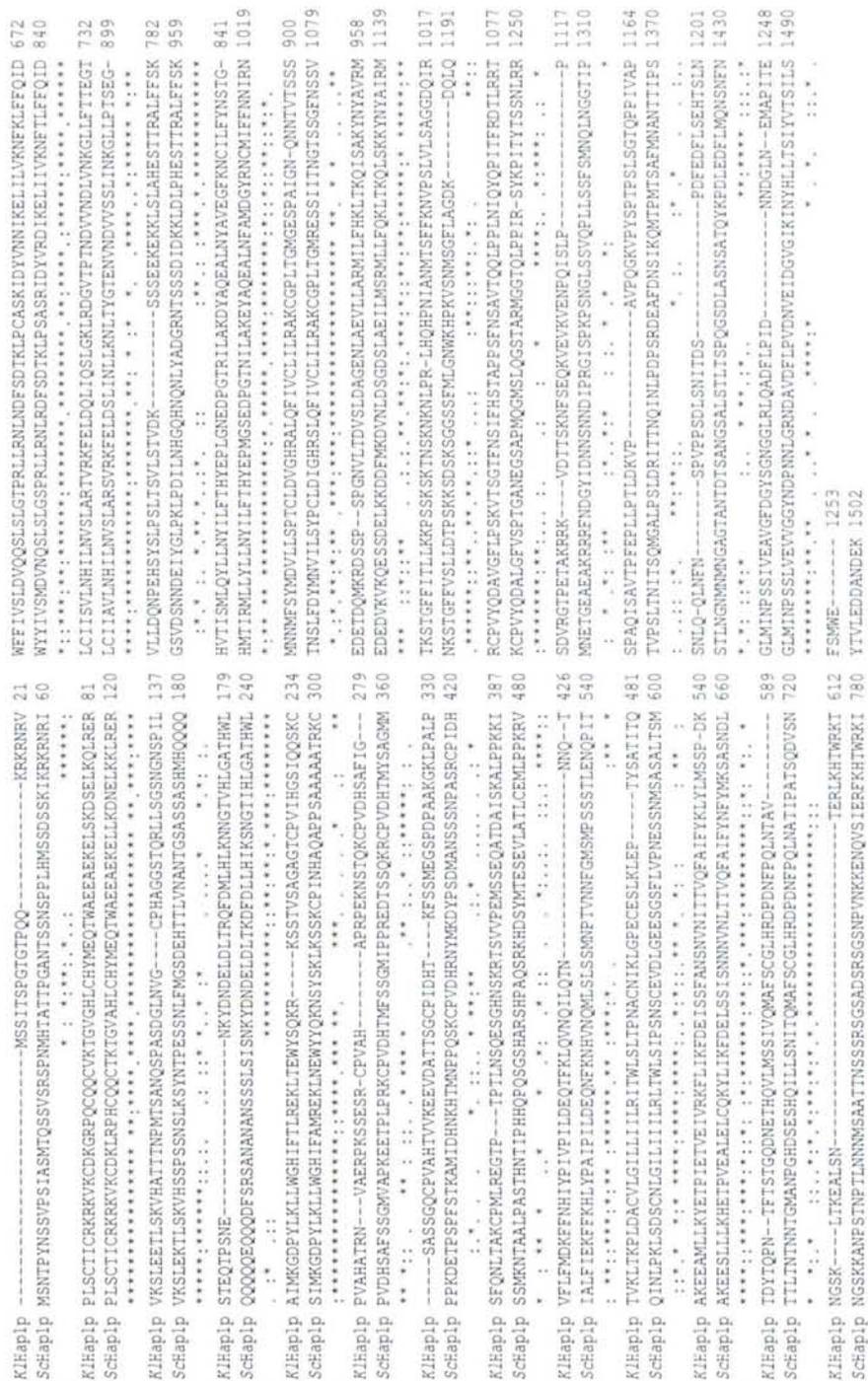


Figura 13. Alineamiento mediante CLUSTAL W de la secuencia obtenida para K/Hap1p frente a ScHap1p. Presentan una homología del 46%.

3.3.Comparación de la secuencia de *KIHAP1* obtenida frente a la del proyecto *Genolévures*

Los diversos problemas surgidos en la clonación de *KIHAP1* que se acaban de comentar retrasaron la consecución del primer objetivo que era clonar el gen para posteriormente poder estudiarlo y caracterizarlo. Al mismo tiempo diversos laboratorios franceses estaban implicados en el proyecto *Genolévures* de secuenciación al azar de los genomas de varias especies de levaduras, entre ellas *K. lactis*. Unos meses después de remitir la secuencia completa de *KIHAP1* a la base de datos, se tuvo también acceso público a la secuencia del genoma de *K. lactis* obtenida por *Genolévures* (Sherman *et al.*, 2004) y se pudieron comparar ambas observándose una coincidencia del 100%. Un alineamiento CLUSTAL W entre la secuencia obtenida en nuestro laboratorio y la liberada por *Genolévures* se muestra en la figura 14.

Genolevures	ATGAGCTCTATTACCTCACCTGGAACAGGCACCCCGCAGCAGAAGCGGAAGAGAAACAGA	60
<i>KIHAP1</i>	ATGAGCTCTATTACCTCACCTGGAACAGGCACCCCGCAGCAGAAGCGGAAGAGAAACAGA	60
Genolevures	GTACCCCTGAGCTGTACAATATGTCGAAAGAGGAAAGTTAAGTGTGACAAAGGACGGCCT	120
<i>KIHAP1</i>	GTACCCCTGAGCTGTACAATATGTCGAAAGAGGAAAGTTAAGTGTGACAAAGGACGGCCT	120
Genolevures	CAGTGCCAGCAATGTGTCAAGACTGGTGTGGTCATCTATGCCATTATATGGAACAGACG	180
<i>KIHAP1</i>	CAGTGCCAGCAATGTGTCAAGACTGGTGTGGTCATCTATGCCATTATATGGAACAGACG	180
Genolevures	TGGGCTGAAGAAGCCGAGAAAGAGCTGTCGAAGGATTTCGGAGTTGAAGCAGCTTAGAGAA	240
<i>KIHAP1</i>	TGGGCTGAAGAAGCCGAGAAAGAGCTGTCGAAGGATTTCGGAGTTGAAGCAGCTTAGAGAA	240
Genolevures	CGTGTGAAGCTTTTGAAGAACTCTTTCAAAGTTCATGCCACTACGACGAATCCTATG	300
<i>KIHAP1</i>	CGTGTGAAGCTTTTGAAGAACTCTTTCAAAGTTCATGCCACTACGACGAATCCTATG	300
Genolevures	ACCAGTGCTAACAGAGTCCAGCGTCAGATGGTTTGAATGTCGGTTGTCCTCATCGAGGT	360
<i>KIHAP1</i>	ACCAGTGCTAACAGAGTCCAGCGTCAGATGGTTTGAATGTCGGTTGTCCTCATCGAGGT	360
Genolevures	GGCAGTACTCAACGGCTGTTATCCGGATCCAATGGAAATTCACCTATTCTAAGTACGGAA	420
<i>KIHAP1</i>	GGCAGTACTCAACGGCTGTTATCCGGATCCAATGGAAATTCACCTATTCTAAGTACGGAA	420
Genolevures	CAAAACCCATCCAATGAGAATAAGTATGATAACGATGAGTTGGATTGACAAGACAGTTC	480
<i>KIHAP1</i>	CAAAACCCATCCAATGAGAATAAGTATGATAACGATGAGTTGGATTGACAAGACAGTTC	480
Genolevures	GATATGTTACATTTGAAAAATAATGGTACTGTGCATCTTGGAGTACCCATTGGTTGGCA	540
<i>KIHAP1</i>	GATATGTTACATTTGAAAAATAATGGTACTGTGCATCTTGGAGTACCCATTGGTTGGCA	540
Genolevures	ATAATGAAAGGTGATCCTTACTTAAACTTCTCTGGGGTCATATCTTACATTAAAGAGAG	600
<i>KIHAP1</i>	ATAATGAAAGGTGATCCTTACTTAAACTTCTCTGGGGTCATATCTTACATTAAAGAGAG	600
Genolevures	AAGCTCACGGAATGGTATTCTCAGAAACGAAATCTAGTACCGTCTCCGGTGGTGCAGGT	660
<i>KIHAP1</i>	AAGCTCACGGAATGGTATTCTCAGAAACGAAATCTAGTACCGTCTCCGGTGGTGCAGGT	660
Genolevures	ACATGTCCCGTCAATTCATGGCTCAATACAACAATCCAAATGTCAGTTGCACATGCAACT	720
<i>KIHAP1</i>	ACATGTCCCGTCAATTCATGGCTCAATACAACAATCCAAATGTCAGTTGCACATGCAACT	720
Genolevures	AGGAACGTTGCAGAGAGACCGAAGAGCTCTGAGTCACGTTGCCCTGTAGCACATGCTCCT	780
<i>KIHAP1</i>	AGGAACGTTGCAGAGAGACCGAAGAGCTCTGAGTCACGTTGCCCTGTAGCACATGCTCCT	780
Genolevures	AGGCCCGAGAAAAACTCCACACAAAAATGCCCTGTGACCATAGTGCTTTCATCGGTCT	840
<i>KIHAP1</i>	AGGCCCGAGAAAAACTCCACACAAAAATGCCCTGTGACCATAGTGCTTTCATCGGTCT	840
Genolevures	GCTAGCTCGGGTCAATGCCCGTGGCACATACCGTGTCAAGGAAGAAGTTGACGCAACT	900
<i>KIHAP1</i>	GCTAGCTCGGGTCAATGCCCGTGGCACATACCGTGTCAAGGAAGAAGTTGACGCAACT	900
Genolevures	ACTTCTGGATGTCCAATAGACCACAAAAGTTTTCTCTATGGAAGGTTCTCTGATCCT	960
<i>KIHAP1</i>	ACTTCTGGATGTCCAATAGACCACAAAAGTTTTCTCTATGGAAGGTTCTCTGATCCT	960
Genolevures	GCAGCTAAGGGAAAGCTCCGGCTTTGCCGCTCTTCCAAAATTTGACAGCGAAATGTCCA	1020
<i>KIHAP1</i>	GCAGCTAAGGGAAAGCTCCGGCTTTGCCGCTCTTCCAAAATTTGACAGCGAAATGTCCA	1020
Genolevures	ATGCTTCGCGAGGGAACCTCAACCCCAACGTTGAACAGCCAGGAATCTGGGCATAAATTCG	1080
<i>KIHAP1</i>	ATGCTTCGCGAGGGAACCTCAACCCCAACGTTGAACAGCCAGGAATCTGGGCATAAATTCG	1080
Genolevures	AAACGCCTAGTGTAGTCCGGAGATGTCATCAGAGCAGGCCACTGATGCCATAAGCAAG	1140
<i>KIHAP1</i>	AAACGCCTAGTGTAGTCCGGAGATGTCATCAGAGCAGGCCACTGATGCCATAAGCAAG	1140
Genolevures	GCCTTGGCCACAAAAAATCGTATTCCTTTTCATGGATAAAATCTTTAATCACATTTAC	1200
<i>KIHAP1</i>	GCCTTGGCCACAAAAAATCGTATTCCTTTTCATGGATAAAATCTTTAATCACATTTAC	1200
Genolevures	CCAATCGTACCTATCTTGTGAGCAGACCTTCAAACACAGGTAATCAAATTTTGCAA	1260
<i>KIHAP1</i>	CCAATCGTACCTATCTTGTGAGCAGACCTTCAAACACAGGTAATCAAATTTTGCAA	1260
Genolevures	ACAAATAATAACCAAACTGTCAAATGACGAAGCCGTAGATGCTTGTGTTTTGGGG	1320
<i>KIHAP1</i>	ACAAATAATAACCAAACTGTCAAATGACGAAGCCGTAGATGCTTGTGTTTTGGGG	1320

Figura 14. Comparación de las secuencias de *KIHAP1* obtenidas en nuestro laboratorio y en el proyecto *Genolevures*.

Genolevures <i>KIHAP1</i>	AATACCGAGAGATTGAAACATACATGGAGGAAAACCTGGTCTTTATTGTCTCACTTGAT	1860
	AATACCGAGAGATTGAAACATACATGGAGGAAAACCTGGTCTTTATTGTCTCACTTGAT	1860
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GTTCACAGTCTCTATCACTAGGTACACCCAGATTATTACGTAATCTAAATGACCTCAGT	1920
	GTTCACAGTCTCTATCACTAGGTACACCCAGATTATTACGTAATCTAAATGACCTCAGT	1920
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GACACTAAACTTCCTGTGCATCGAAGATCGATTATGTGAACAATATCAAGGAACCTATC	1980
	GACACTAAACTTCCTGTGCATCGAAGATCGATTATGTGAACAATATCAAGGAACCTATC	1980
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	CTGGTCAAGAATTTCAAATTTGTTCTTCCAAATTTGACTTATGTATCATCTCTGTTTTGAAT	2040
	CTGGTCAAGAATTTCAATTTGTTCTTCCAAATTTGACTTATGTATCATCTCTGTTTTGAAT	2040
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	CATATTTTGAATGTTTCTTCTTGAAGGACAGTTAGAAAATTTGAGCTTGACCAACTAATA	2100
	CATATTTTGAATGTTTCTTCTTGAAGGACAGTTAGAAAATTTGAGCTTGACCAACTAATA	2100
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	CAAAGCTTAGGTAAACTACGTGATGGTGTACTCCGACGAATGATGTTGTCATGATCTT	2160
	CAAAGCTTAGGTAAACTACGTGATGGTGTACTCCGACGAATGATGTTGTCATGATCTT	2160
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GTTAATAAAGGCCTATTATTTACCACAGAAGGAACCTGTGCTTTGGACCAAAACCCAGAG	2220
	GTTAATAAAGGCCTATTATTTACCACAGAAGGAACCTGTGCTTTGGACCAAAACCCAGAG	2220
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	CATTCTATTTCGTTACCATCCTTAACATCCGTTCTTCAACAGTAGATAAAAGCTCTTCA	2280
	CATTCTATTTCGTTACCATCCTTAACATCCGTTCTTCAACAGTAGATAAAAGCTCTTCA	2280
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GAAGAAAAGGAAAAGAACTCAGTCTCGCCACGAATCCACCACAGAGCTTTGTTTTTC	2340
	GAAGAAAAGGAAAAGAACTCAGTCTCGCCACGAATCCACCACAGAGCTTTGTTTTTC	2340
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	TCAAAACATGTCACAATTAGCATGCTACAATTTTGTAAACTACATCTTATTACAGCAT	2400
	TCAAAACATGTCACAATTAGCATGCTACAATTTTGTAAACTACATCTTATTACAGCAT	2400
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	TACGAACCGTTAGGTAACGAAGACCCGGCACAAGAATTTAGCTAAAGATTATGCACAA	2460
	TACGAACCGTTAGGTAACGAAGACCCGGCACAAGAATTTAGCTAAAGATTATGCACAA	2460
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GAAGCCCTCAACTATGCAGTGGAGGCTTCAAAAACCTGCATCTTCTATAACAGCACC	2520
	GAAGCCCTCAACTATGCAGTGGAGGCTTCAAAAACCTGCATCTTCTATAACAGCACC	2520
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GGTATGAACAACATGTTTCAGTTATATGGATGTGCTTTTGTGCGCCACCTGCTTGGACGTC	2580
	GGTATGAACAACATGTTTCAGTTATATGGATGTGCTTTTGTGCGCCACCTGCTTGGACGTC	2580
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GGACATCGTGCTTACAGTTTATCGTTTGCCTAATTTTGGCGGCTAAATGTGGCCCTTTA	2640
	GGACATCGTGCTTACAGTTTATCGTTTGCCTAATTTTGGCGGCTAAATGTGGCCCTTTA	2640
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	ACAGGTATGGGTGAATCCCAGCTATAGGTAACCAAATAACACTGTTACTAGCAGCAGC	2700
	ACAGGTATGGGTGAATCCCAGCTATAGGTAACCAAATAACACTGTTACTAGCAGCAGC	2700
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GAAGATGAACAGACCAAAATGAAGAGAGATTATCCCCTATCCAGGAAACGTCCTTACA	2760
	GAAGATGAACAGACCAAAATGAAGAGAGATTATCCCCTATCCAGGAAACGTCCTTACA	2760
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GATGTCAGTCTGGATGCAGGTGAAAACCTAGCCGAAGTCTCCTCGCAAGAATGATCTTA	2820
	GATGTCAGTCTGGATGCAGGTGAAAACCTAGCCGAAGTCTCCTCGCAAGAATGATCTTA	2820
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	TTTCAACAAGTTGACAAAACAAATCTCTGCCAAATATAACTATGCCGTAAGAATGACGAAA	2880
	TTTCAACAAGTTGACAAAACAAATCTCTGCCAAATATAACTATGCCGTAAGAATGACGAAA	2880
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	TCCACAGGTTTCTTTATCACTTTACTTAAGAAACCTTCCCTCGAAATCCAAAACCTACTCT	2940
	TCCACAGGTTTCTTTATCACTTTACTTAAGAAACCTTCCCTCGAAATCCAAAACCTACTCT	2940
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	AAAAACAAAACCTACCAGTTTGCATCAACATCCAAATATTGCAAAATAGACGAGTTTC	3000
	AAAAACAAAACCTACCAGTTTGCATCAACATCCAAATATTGCAAAATAGACGAGTTTC	3000
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	TTCAAAAACGTTCCATCATTGGTACTTTCAGCAGGAGGGATCAAAATAGACGTTGCCG	3060
	TTCAAAAACGTTCCATCATTGGTACTTTCAGCAGGAGGGATCAAAATAGACGTTGCCG	3060
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	GTTTATCAGGACGCAGTTGGGTTTTTGCCTTCGAAAGTAAACAGCGGAACCTTCAACTCG	3120
	GTTTATCAGGACGCAGTTGGGTTTTTGCCTTCGAAAGTAAACAGCGGAACCTTCAACTCG	3120
	
Genolevures <i>KIHAP1</i>	ATTTTCACTCCACTGCTCCTCTTCTTCAACTCTGCGGTTACACACAATTTGCCCCCA	3180
	ATTTTCACTCCACTGCTCCTCTTCTTCAACTCTGCGGTTACACACAATTTGCCCCCA	3180
	

Figura 14 (continuación). Comparación de las secuencias de *KIHAP1* obtenidas en nuestro laboratorio y en el proyecto *Genolevures*.

3.4. Clonación de *KIHAPI* completo a partir de DNA genómico de la levadura *K. lactis*

Como se carecía de un clon completo útil para análisis funcionales, y la secuencia obtenida mediante solapamiento de los clones parciales presentaba una interrupción por el gen de una transposasa bacteriana se decidió obtener un clon completo a partir de DNA genómico de la cepa Y1140. Precisamente la cepa utilizada en el proyecto *Genolévures* (Souciet *et al.*, 2000). Para ello se desarrolló la estrategia que se describe a continuación.

Se procedió al diseño de dos oligonucleótidos ECV248 y ECV249 (GGGGTCGACAGAATGCCAGAACGCTTGC y CGCAGATCACATCTTCAATTCCTTCCAACTTCG) que se caracterizan por hibridar en las posiciones -1.690 y +4.750 de *KIHAPI*. La temperatura de hibridación elegida fue de 58°C. El DNA amplificado por PCR, utilizando como molde DNA genómico de la cepa Y1140, se digirió con las enzimas *XbaI* y *EcoRI* con sitios de reconocimiento en las posiciones -1.205 y en +4.544 de la secuencia de *KIHAPI*. El fragmento de 5.749 pb se clonó en el vector YEplac195 denominándose la construcción YEpl195*KIHAPI*.

Conociendo los antecedentes en la clonación de este gen, se planteó la duda de si pese a clonar de nuevo el gen a partir de una cepa silvestre, Y1140, también se presentaba interrumpido por una transposasa, lo cual invalidaría estudios posteriores. Para comprobar este hecho, se llevaron a cabo una serie de reacciones de PCR con oligonucleótidos que hibridan en distintas posiciones de la ORF de *KIHAPI*, de manera que se pudo comprobar que los fragmentos amplificados correspondían a los tamaños reales del gen y ninguno presentaba un aumento de tamaño consecuencia de una inserción (figura 15). Cuando se emplearon cebadores que hibridan en el gen de la transposasa, no se observó producto de PCR. Los oligonucleótidos seleccionados fueron ECV222/ECV228 cuya amplificación corresponde a 1.190 pb; ECV227/ECV223 que amplifican 1.056 pb en caso de estar presente la transposasa bacteriana; ECV227/ECV211 que rinden 1.409 pb; ECV227/ECV101 con 2.255 pb; ECV70/ECV71 con 892 pb; ECV102/ECV235 con 950 pb. Por tanto el gen parecía estar completo y sin inserciones.

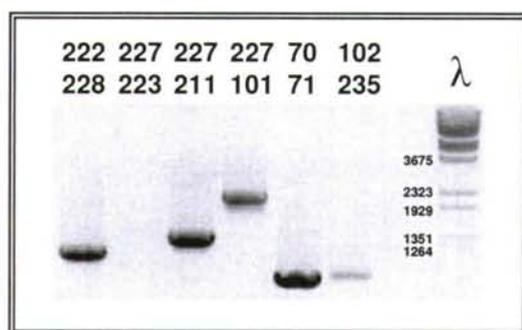


Figura 15. Comprobación mediante PCR de la no interrupción del clon YEp195*KIHAPI* por inserciones. Los números encima de cada línea indican las parejas de cebadores empleados. Como marcador de tamaños moleculares se empleó el fago lambda digerido con *Bst*EII (Daniels *et al.*, 1983) del que se señalan los tamaños de algunas de las bandas.

Esta construcción fue verificada también mediante análisis de restricción y secuenciación, tras lo cual se procedió a comprobar si este clon de *K. lactis* era capaz de complementar una mutación *hap1* en *S. cerevisiae*.

3.5. Ensayos de complementación de cepas mutantes *hap1* de *S. cerevisiae* por *KIHAPI*

a) Curvas de crecimiento

La mutación *hap1* provoca un fenotipo de deficiencia en la respiración, por lo que los mutantes desarrollan un fenotipo peculiar de crecimiento denominado *petite*, que consiste en la formación de colonias de menor tamaño en medios de cultivo en los que la fuente de carbono fermentable es limitante (Ephrussi *et al.*, 1949). Al contrario que *S. cerevisiae*, que produce de forma espontánea mutantes *petite* a una alta tasa, la mayoría de las especies de levaduras son *petite* negativas. No dan lugar a células *petite*, incluso tras un tratamiento con bromuro de etidio que convierte de forma masiva las células de *S. cerevisiae* ρ^+ , con DNA mitocondrial, en ρ^0 , sin DNA mitocondrial.

Una de las formas de comprobar si el gen *KIHAPI* es funcional en *S. cerevisiae* consistía en demostrar si era capaz de revertir por complementación el fenotipo *petite* de una mutación *hap1* de *S. cerevisiae*. Para ello se transformó la línea LPY22 (*MATA leu2-2, 112 his4-519 ade1-100 ura3-52 hap1Δ::LEU2*) que posee el gen *HAPI* interrumpido por el marcador *LEU2* con el clon YEp195*KIHAPI* seleccionando los transformantes en placas CM-Ura.

El estudio de la morfología de las colonias en la placa de transformación no indicaba la complementación del fenotipo *petite*. Para verificar si existía en cierta medida una complementación de la mutación, se llevó a cabo un estudio de crecimiento en medio líquido (figura 16). Para este estudio se utilizó la cepa BWG1-7a (*MATa leu2-2, 112 his4-519 adel-100 ura3-52*) como control silvestre, la cepa LPY22 mutante en *hap1* y la cepa mutante LPY22 transformada con el clon YEp195*KIHAP1*. El medio de cultivo elegido fue CM etanol-glicerol 2% ya que la mutación *hap1* afecta a la respiración, y en este medio, solo aquellas levaduras que puedan respirar crecerán con facilidad. En primer lugar se iniciaron unos pre-cultivos de 10 mL para cada levadura. Una vez alcanzada una OD₆₀₀ de 1-2, se preparó un cultivo de 100 mL a una OD₆₀₀ inicial de 0,1. Posteriormente se realizaron medidas de OD₆₀₀ a distintos tiempos.

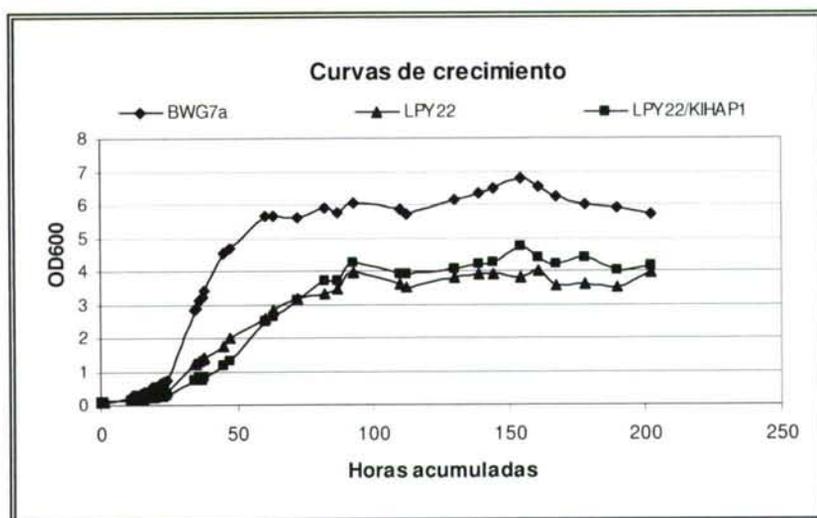


Figura 16. Curvas de crecimiento correspondientes a la cepa silvestre BWG7a, la cepa mutante en *ScHAP1* LPY22 y la cepa mutante transformada con el clon de *KIHAP1*. *KIHAP1* es incapaz de complementar la mutación *hap1* en *Saccharomyces*.

Los resultados obtenidos indicaron la incapacidad de complementación por parte del clon YEp195*KIHAP1* de la mutación *hap1* en la cepa LPY22 de *S. cerevisiae*.

b) Estudio de complementación mediante análisis de la expresión de un gen regulado por Hap1p

Otro modo de comprobar la complementación fue mediante el estudio por *northern blot* de la expresión del gen *ScCYC1*. En condiciones de suficiencia de hemo, Hap1p activa una serie de genes relacionados con la respiración, como es el caso de *CYC1* que codifica para una de las dos isoformas de citocromo *c* existentes en *S. cerevisiae* (Creusot *et al.*, 1988; Pfeifer *et al.*, 1989). Cepas de *S. cerevisiae* mutantes *hap1* presentan una disminución de la expresión de *CYC1* (Mattoon *et al.*, 1990). Se llevaron a cabo 3 extracciones de RNA total de las cepas BWG7a, LPY22 y LPY22/*KIHAPI* tras un crecimiento en medio CM y empleando el método del fenol (ver materiales y métodos). Para amplificar por PCR la sonda de *ScCYC1* se diseñaron los oligonucleótidos ECV259 (GACTGAATTCAAGGCCGGT) y ECV260 (TTACTCACAGGCTTTTTCAAGTAG) que hibridan a una temperatura de 50°C en las posiciones +2 y +330, amplificando un fragmento de 328 bp. La temperatura de hibridación elegida para el *northern blot* fue de 60 °C.

Como resultado de estos análisis (figura 17) se confirmaron los datos obtenidos mediante el estudio de las curvas de crecimiento. En el caso de la cepa silvestre BWG7a, se observa una alta expresión de *ScCYC1* como era de esperar ya que es un gen activado por *HAPI*. La expresión de *ScCYC1* disminuye drásticamente (del orden de 10 veces) en el caso del mutante LPY22 como consecuencia de la mutación de su activador *HAPI*. Finalmente, en el caso del mutante transformado con el clon de *K. lactis* no se observa ninguna diferencia con respecto a la cepa sin transformar, lo que pone en evidencia la incapacidad de *KIHAPI* para complementar la actividad de *ScHAPI* como regulador transcripcional en *S. cerevisiae*.

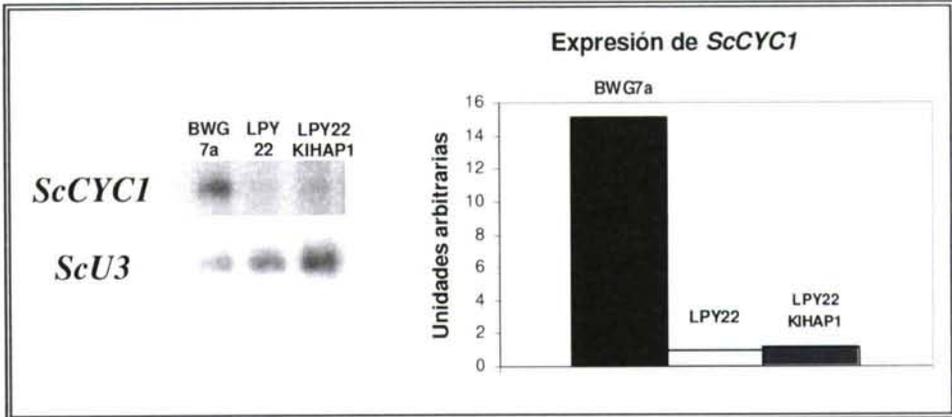


Figura 17. Medidas de la expresión del gen *ScCYC1* regulado por *ScHAP1* en la cepa silvestre BWG7a, la mutante en *ScHAP1* LPY22 y la mutante transformada con el homólogo de *HAP1* en *K. lactis*. *KIHAP1* no es capaz de complementar la mutación en *S. cerevisiae*. La hibridación con *ScU3* fue utilizada como control de carga. Los datos fueron normalizados frente a la señal obtenida con el control *ScU3* (*snRNA17A*). Después de la normalización y cuantificación de la intensidad de la señal de cada banda, la intensidad más baja fue considerada como valor 1 en unidades arbitrarias y se empleó como referencia para las otras señales.

3.6. Análisis *in silico* de la secuencia de *KIHAP1*

Al realizar una búsqueda de similitudes mediante BLASTP (Gish & States, 1993) de la secuencia obtenida para *K/Hap1p*, se observó que las secuencias más semejantes eran las de *S. cerevisiae*, con un 53% de similitud, y *Ashbya gossypii* con un 61% (figura 18).

En *S. cerevisiae*, la proteína Hap1p contiene 1.483 aminoácidos que forman un número interesante de motivos: dominio en dedo de zinc (del residuo 55 al 95), dominio de dimerización (DD)(del residuo 105 al 244), dominio de activación (residuos 1.309-1.483), siete motivos de respuesta a hemo (HRM1(278-283), HRM2(297-302), HRM3(323-328), HRM4(347-352), HRM5(389-394), HRM6(414-419) y HRM7(1.192-1.197) y tres módulos de represión (RPM1(245-278), RPM2(1.061-1.185) y RPM3(204-244) (Hach *et al.*, 1999 & 2000; Vuidepot *et al.*, 1997).

Al llevar a cabo un alineamiento múltiple de las tres secuencias (figura 18) se pudo comprobar el alto grado de conservación de una serie de dominios. Ya que la mayor parte de los estudios estructurales sobre la proteína Hap1p se han realizado en *S. cerevisiae*, su secuencia se empleó como base para un estudio comparativo entre *K/Hap1p* y *ScHap1p*. Todos los dominios determinados experimentalmente en *ScHap1p* se conservan en *K/Hap1p* (ver figura 19).

Se realizó un análisis comparativo mediante el programa BLAST2 *sequences* (Tatusova & Madden.,1999) de *KIHap1p* y *ScHap1p*. Con este análisis se obtuvo el porcentaje de identidades y sustituciones equivalentes (positivos) entre las regiones conservadas (ver tabla 7). Es destacable que en todas ellas se alcanzó un valor bastante alto, lo que pone de manifiesto la importancia de dichas regiones.

Tabla 7. Porcentajes de homología de los dominios conservados señalados entre las secuencias proteínicas de *KIHap1p* y *ScHap1p*. Los resultados fueron obtenidos empleando el programa BLAST2 *sequences* (Tatusova & Madden.,1999).

Dominio	Identities %	Positivos %
Dedo de zinc	88	90
Dimerización	44	59
RPM3	81	97
RPM1	84	87
HRM1	-	-
HRM2	83	83
HRM3	80	80
HRM4	83	100
HRM5	66	83
HRM6	16	33
HRM7	71	100
RPM2	46	68
Activación	55	67

KIHap1p	TWFFIVSLDVQQSLSLGTPrLLRNLDNDFSDTKLPcASKIDYVNNIKELILVKNFKLFFQI	671
AgHap1p	MWYF ILSLD IQQSLSLGSPRLRNHKDFSDTKLPfASKIDYVQDIKELVVVKNFTLFFQI	574
ScHap1p	IWYIVSMVDVQQSLSLGSPrLLRNLRDFSDTKLPsASRIDYVRDIKELIVKNFTLFFQI	839
KIHap1p	DLCLISVLNHLNLSLARTVRKfELDQLIQSLGKLRDGVTPNDVVNDLVNKGLLFTTEG	731
AgHap1p	DLCVAVVLNHLNVSTAKTVRKHELDsLIEALKSLANGGCNLDLVASLVGQGLLFTTEG	634
ScHap1p	DLCLIAVLNHLNLSLARSVRKfELDSLINLLKNLTyGTENVNDVSSLINKGLLPTSEG	899
KIHap1p	TVLLDQNPehSYSLPSLTSVLST-----VDKSSSEeKkKLSLAHESSTRALFFS	781
AgHap1p	--FIDQNDVAYSLPSMEHLLS-----SHTTVPEKDKKfFLPHELTTRSLFFS	680
ScHap1p	G-SVDSNNDIYGLPKLPDILNHGQHnQLYADGRNTSSSDIDKkLDLPHESTRALFFS	958
KIHap1p	KHVTISMLQYLLNYILFTHyEPLGNEDpGTRILAKDYAQEALNYAVEGfKNCILFYNSTG	841
AgHap1p	KHITLRLLLYLLNYILFVHYEPKGNEDpGTRSLARsYAQEAmyAIDGYHSLFFNSFK	740
ScHap1p	KHMTIRMLLYLLNYILFTHyEPmGSEDPGTNILAKeYAQeALNFAMdGYRNCMLFFNNIR	1018
KIHap1p	MNN----MFSYMDVLLSPTCLDVGHRAlQfIVCLILRAKCGPLTGmGESPAIG----NQ	892
AgHap1p	SDYKNTSIFTHMQVLLAPCLDMGHRAlQfMVCLILRAKCGPLTGISDFSIvGSMAPSS	800
ScHap1p	NTN----SLFDYMNVLISYPLCLDIGHRSLQfIVCLILRAKCGPLTGmRESSIITN----GTS	1072
KIHap1p	NNTVTSSEDETDQMKRDS--SPSPGNVLDVSLDAGENLAEVLLARMIlfHKLTKQISAK	951
AgHap1p	DEDDSSGSEDRASSGKELSGALQDfTSIPYISLTAGDHLADTLMEKMAlfHKLAKQLSSK	860
ScHap1p	SGFNSSVEDEDVKVKQESSDELKkDDfMKDVNLDsGDSLAEILMSRMLLQfKLTkQLSKK	1132
KIHap1p	YNYAVRMtKSTGfFLTLKkPSSKSKTNSKKNLPR-LHQHPNIANMTSfPKNVPLSVLS	1010
AgHap1p	YAYATKLCKSTGfFLTLKkPSSGSHAKQARQNSLP-RIQDLGIASMTGfPKNVPLSVFS	919
ScHap1p	YNYAIRMKtKSTGfFLVLLDTPSKKSDSKSGGSPfMLGNWkHPKvSNMGSfLAGDK----	1187
KIHap1p	AGGDQIRRCfPVYQDAVGLPSKvTSGTfNSIFHSTAPPfSNSAVTQQLPPLNIQYQPITF	1070
AgHap1p	ATGESITRCfPVYQDAMDLLPpKEPRASSN-MTATVNSGSDVTFLNGLPPIR-PYQPITY	977
ScHap1p	---DQLQKCPVYQDALGFVSPfIGANEgSAPMQGMSLQGSARMGQTQLPPIR-SYKPIITY	1243
KIHap1p	RDT-LRRTSDVRGTPETAKRRK---VDITSKN-----FSEQ	1102
AgHap1p	NVNGFHKTSDIR-EPSSGSKRRR---ISANVIT-----PTSS	1009
ScHap1p	TSSNLRMMETG-EAEAKRRRFNDGYIDNNSNNDIPRGISPKPSNGLSSVQPLLSSFSM	1302
KIHap1p	KVEVKVENQISLPPSPAQISAVTPfEPLLPfLDKVP-----AV	1141
AgHap1p	---ALPPPPLSLCSPYQCfTSVPDfTGDSIQfQEP-----HI	1044
ScHap1p	QLNGGTIPfVPSLNTITSQMGALPSLDRITfTNQINLPDPSRDEAFDfNSIKQMTfPMTSAFM	1362
KIHap1p	PQGKVPYSPTPS-----LSGTQPPfIVAPSNLQQLNFNSVPfPpSDLSNITDSfDFEDF	1193
AgHap1p	NGN----SHTPS-----SRGANDGKGmGNSAFSLSSPNAEISSGS-AQYTPDFEEF	1091
ScHap1p	NANTTIPSSTLNGNVMNMGAGTANTfDSANGSALSTLTSPOGSDLASNSATQYKPDLEDF	1422
KIHap1p	LSEHTSLNGLMINPSSIVEAVGfDGYSGNGGLR--LQADfLPIDNND-----	1238
AgHap1p	LMENSNFNGLIINP SGIAEAVGMDQfGHAGDINGLLGADLLPIDN-----	1137
ScHap1p	LMQNSNFNGLMINPSSLVEVVG--GYNDPNNLGRNDAVDFLPVDNVEIDGVGIKINYHLL	1480
KIHap1p	GLNEMAPITfESfMWE-----	1253
AgHap1p	CMIEVPQSGDLSAFL-----	1152
ScHap1p	TSIYVTSILSYTVLEDDANDEK	1502

Figura 18 (continuación). Alineamiento de las secuencias proteínicas de *KIHap1p*, *AgHap1p* y *ScHap1p*. Se observa la conservación de una serie de dominios fundamentales para la función reguladora de *Hap1p*.



Figura 19. Alineamiento de las secuencias proteínicas de *KIhap1p* y *Schhap1p*. Se han marcado los dominios fundamentales para la función de Hap1p.

Los mayores valores de similitud fueron para el dominio en dedo de Zinc (90%) destacando el hecho de que las 6 cisteínas fundamentales para la unión con el Zinc a la secuencia consenso en el DNA están perfectamente conservadas. El dominio en dedo de Zinc (también conocido como *cluster* binuclear de Zinc) posee una secuencia consenso (CX₂CX₆CX₅₋₉CX₂CX_{6,8}C) con seis cisteínas que se unen a dos átomos de Zinc que coordinan el plegamiento del dominio.

El alto grado de conservación del dominio de unión a DNA (dominio en dedo de Zinc) permite emplear programas informáticos de modelado por homología para obtener una predicción de su estructura terciaria. De esta manera se obtuvo una predicción de este dominio de la proteína *K/Hap1p* (figura 20.B) muy semejante a la determinada experimentalmente para *S. cerevisiae* (figura 20.A), lo que sugiere un mismo modo de actuación de *K/Hap1p* en la unión a DNA y activación de los genes regulados.

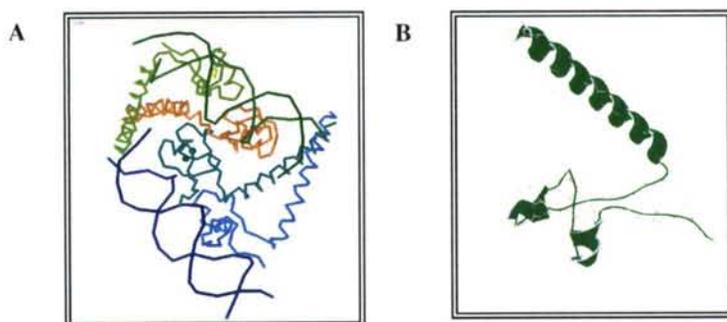


Figura 20. A Modelo del dominio en dedo de Zinc de *ScHap1p* unido a la doble hebra de DNA. B Predicción informática del dominio en dedo de Zinc de *K/Hap1p*

ScHap1p es capaz de reconocer a través de este dominio el triplete CGG (Timmerman *et al.*, 1996).

La dimerización es un mecanismo común para regular la actividad de numerosas macromoléculas biológicas como receptores de la hormonas (Kelly *et al.*, 1994), señales celulares (Salzmann & Bachmann, 1998) y numerosos factores transcripcionales (Lamb & McKnight, 1991). Los activadores transcripcionales de la familia Gal4p de levaduras que incluye al menos 52 factores transcripcionales, entre ellos Hap1p, y que controlan procesos que van desde la utilización de la fuente de carbono y el tipo de metabolismo o la resistencia frente a drogas (Johnston *et al.*, 1987) también están regulados por dimerización (Gardner *et al.*, 1995; Hon *et al.*, 1999).

Aunque previamente se había definido el DD de ScHap1p entre los residuos 105-244, el elemento mínimo de dimerización para ScHap1p está entre los aminoácidos 105-135 (King *et al.*, 1999) y es suficiente para permitir la dimerización y la unión a DNA tal y como se ha demostrado por ensayos de movilidad electroforética y análisis de estructura por rayos X (Pfeifer *et al.*, 1989). Algunos de estos dominios tienen mayor importancia para la regulación de unos promotores que de otros. Se sabe que la eliminación del DD no disminuye severamente la unión a DNA y la activación transcripcional de UAS1/*CYC1* pero impide completamente la activación transcripcional de UAS/*CYC7*. Aunque ScHap1p se une con igual afinidad a los sitios reguladores de *CYC1* y *CYC7*, existían evidencias que sugerían que Hap1p activaba la transcripción de modos diferentes en cada uno (Cerdán & Zitomer, 1988; Turcotte & Guarente, 1992), se ha demostrado que el dominio de dimerización es responsable de la activación transcripcional diferencial en UAS1/*CYC1* y UAS/*CYC7* (Hach *et al.*, 2000). El dominio de dimerización (DD) también está altamente conservado en *K. lactis* (59%) sugiriendo que también en esta levadura Hap1p actúa como dímero.

En *S. cerevisiae* los RPMs y HRMs son dos clases distintas de elementos de Hap1p esenciales para la regulación por hemo (Hon *et al.*, 2000). Los RPMs median la inactivación de Hap1p en ausencia de hemo, de modo que la delección o interrupción de cualquiera de los RPMs causa que Hap1p alcance unos niveles altos de actividad incluso en ausencia de hemo (Hach *et al.*, 1999). Los HRMs, en particular HRM7, permiten la unión a hemo y median la activación de Hap1p en respuesta a este grupo prostético (Zhang *et al.*, 1998). Recientemente se ha demostrado que la interacción entre Hsp90p y HRM7 es necesaria para promover los cambios conformacionales que son necesarios para la activación de Hap1p, causando una activación mediada por hemo de la transcripción de los genes diana de Hap1p (Lee *et al.*, 2003).

Al comparar los módulos de represión de Hap1p con regiones homólogas existentes en *K/Hap1p* se ve que los tres módulos de represión, RPM1, RPM2 y RPM3 presentan unas homologías del 87%, 68% y 97% cada uno. Este grado de conservación sugiere también un estado inactivo de *K/Hap1p* en ausencia de hemo.

De los 7 dominios de respuesta a hemo, HRM1 no presenta ninguna similitud y HRM6 presenta un porcentaje del 33% que es bajo si se compara con los del resto de HRMs. De todas formas, el hecho de que el HRM7, que es el fundamental para la unión a hemo y la función transcripcional de Hap1p, tenga una identidad del 100%, apunta a que realice la misma función en *K. lactis*.

El dominio de activación transcripcional situado entre los residuos 1309 y 1483, presenta también una alta homología, lo que sugiere su funcionalidad en *K. lactis* aunque no lo es en *S. cerevisiae* en los experimentos de complementación realizados.

4. CLONACIÓN DE *KISRB10*

El gen *SRB10* ha sido ampliamente estudiado en la levadura *S. cerevisiae* debido a su relación con el complejo RNA polimerasa II. En *S. cerevisiae*, *ScSRB10* se sitúa en el brazo izquierdo del cromosoma XVI (ORF YPL042C) a 50 Kb del locus *RAD1*.

El carácter pleiotrópico de las mutaciones de este gen se pone de manifiesto en el hecho de que ha sido clonado por varios equipos de investigación independientes. Las clonaciones se realizaron mediante complementación de mutaciones que afectan a procesos diferentes del ciclo de vida de la levadura. Es por ello por lo que *ScSRB10* se caracteriza por ser conocido con múltiples nombres que hacen referencia a las mutaciones a partir de las cuales fue clonado. Las mutaciones *ume5* (incremento de la expresión de un gen relacionado con la esporulación durante la fase vegetativa; Surosky *et al.*, 1994), *are1* (expresión de genes α -específicos en células alfa; Wahi & Johnson, 1995), *srb10* (supresor de mutaciones en el dominio CTD de la subunidad mayor de la RNA polimerasaII; Liao *et al.* 1995), *ssn3* (defectos en la represión por glucosa de algunos genes; Kuchin *et al.*, 1995) y *gig2* (incapacidad de crecimiento en galactosa como única fuente de carbono; Balciunas & Ronne, 1995). Cada una de estas mutaciones fue complementada con diversas genotecas de *S. cerevisiae*, obteniéndose en todos los casos la misma secuencia de DNA para el clon obtenido. En nuestro laboratorio, el gen *SRB10* (*ROX6*) de *S. cerevisiae* fue clonado por complementación a partir de un mutante *rox6* que sobre-expresaba el gen hipóxico *ScCYC7* en condiciones aeróbicas (Cadahía-Rodríguez, 1996).

4.1. Clonación de *KISRB10* mediante la técnica de *DCbyPCR*

Gracias a dos publicaciones de trabajos relacionados con el proyecto de secuenciación del consorcio *Genolévures* se dispuso de las secuencias de dos pequeños fragmentos correspondientes al gen *SRB10* de *K. lactis* (Ozier-Kalogeropoulos *et al.*, 1998; Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000). Analizando las dos secuencias se comprobó que se solapaban (figura 21), lo que permitió unificarlas en una sola de un total de 985 pb. Tomando como referencia esta secuencia parcial, se diseñaron los oligonucleótidos

ECV45 (CACAAAGTGCATGCAGAGAGA) y ECV46 (GTTATCGTTTGTGTGAATGCG) que permitan amplificar una región específica de 875 pb. La temperatura de hibridación elegida fue de 46°C.

CACAAAGTGC	ATGCAGAGAG	ATGTCAC TTT	GTAGAGAAATT	GGATAATAAAC	CATTTAACGA
AATTAGTTGA	AATATTCCTA	GAGAAGAAGA	GCATCTACAT	GGTCTCAGAG	TTTGCTGAAC
ATGATCTTTT	ACAAATTATC	CATTTTCATT	CGCATCCTGA	AAAGAGACTA	ATACCGCCAA
GGATGCTCAA	ATCAAATAATG	TGGCAAATTC	TTGATGGTGT	TTCTTATTTG	CATCAGAACT
GGATTTCTCA	TAGAGACTTA	AAGCCCGCTA	ACATTATGGT	TACCGTGAT	GGCTGCGTCA
AGATCGGTGA	TCTTGGTCTA	GCGAGAAAAT	TCAAATACAT	GGTACAGACT	TTATACACTG
GTGATAAAGGT	TATTGTAACA	ATTTGGTATC	GTGCCCCAGA	ACTTATACTT	GGAGCTCGAC
ATTATACTCC	TGCAATAGAT	CTTTGGGCTG	TTGGTGTAT	TTTTGCAGAA	CTCATCGGTT
TAAGGCCAAT	CTTTAAAGGT	GAAGAGGCCA	AGATGGAGTC	CAAGAAGAGT	GTTCTGTTTC
AAGCTAATCA	GTTTCAAAAA	ATATTGGAAG	TCATGGGTTT	GCCAGATCAT	AAAATATGTC
CGAATATCGA	CAGTTATCCA	GAATATCTTC	AGTTGGCAAA	AATGCCAAAA	TATCGTGACA
ATTTAACAGC	ATGGTATCAG	ACCGCTGGCG	GTAAGGACAA	GACTGCTTTA	GACATTCTTT
ACCGICTATT	GCAGTATGAT	CCTATCAAGA	GAATCGATGC	AATCGACGCT	TTAGACCATG
TCTATTTTAC	CAACGGGCAG	CCTCCTGTCT	GTGAAAATGT	GTTCGAGGGT	CTCAACTACA
AATACCCACC	AAGG <u>CGCATT</u>	CACACAAACG	ATAAC GACAT	TACGAAATGTC	GGCAATGATA
ATAATCAAGC	TAATCACTCT	CAAAAACAAC	CAATGCATGG	TAACAATAAT	AATAAAGAAATG
GGAACATGAA	CGGATTAGGT	GTAAA			

Figura 21. Secuencia parcial de *KISRB10* obtenida tras unificar las secuencias parciales de Bolotin-Fukuhara (2000) y Ozier-Kalogeropoulos (1998). El oligonucleótido ECV45 aparece en negrita y ECV46 aparece en negrita y subrayado.

Empleando la técnica *DCbyPCR* (Díaz-Prado *et al.*, 2004) desarrollada en nuestro laboratorio se llegó a la obtención de un clon de *KISRB10*, a partir de la genoteca Chiron en el vector pAB24 (ver materiales y métodos). Se denominó a esta construcción pAB24*KISRB10*. El procedimiento, similar al descrito en apartados precedentes, aparece esquematizado en la figura 22.

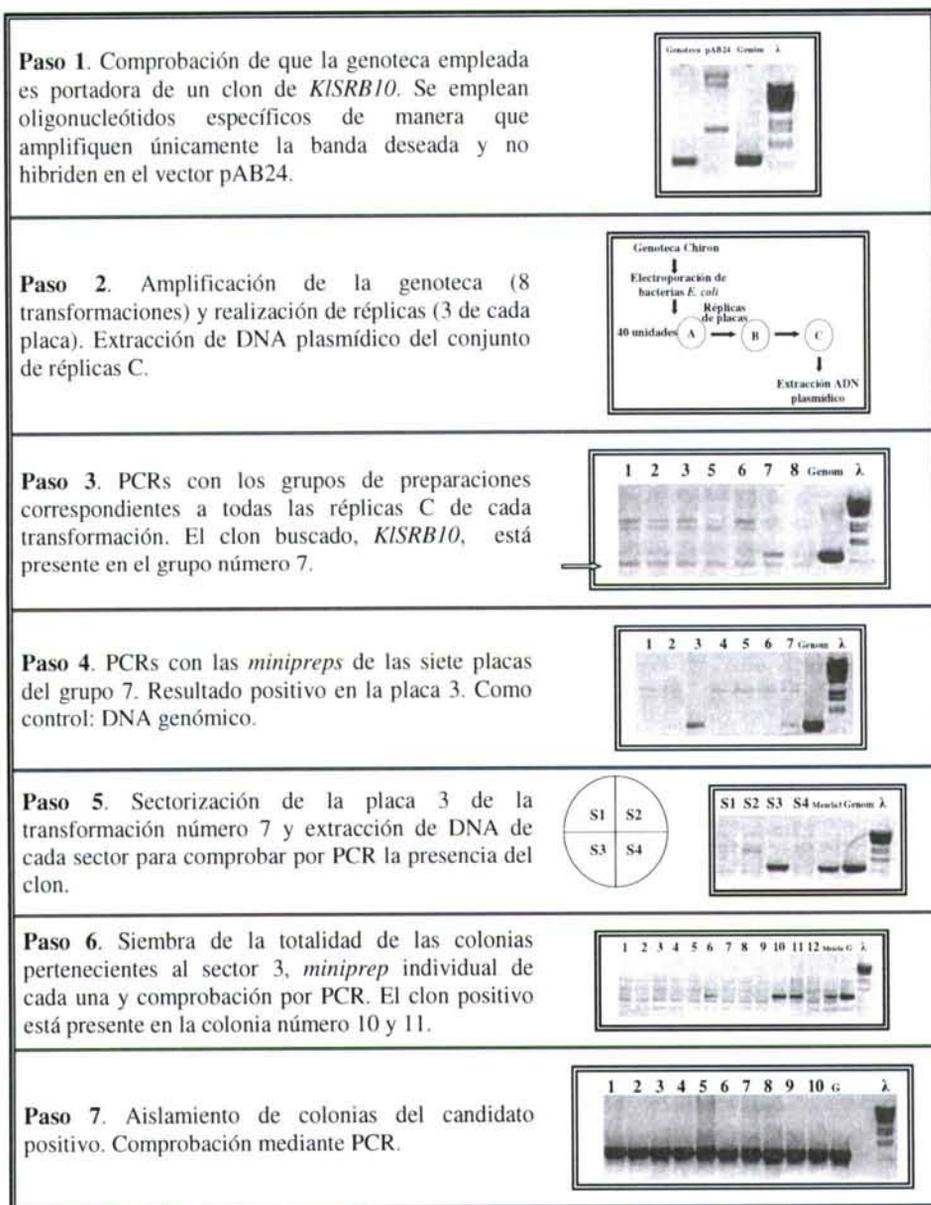


Figura 22. Esquema de la estrategia *DCbyPCR*. Discriminación de grupos por PCR (Díaz Prado *et al.*, 2004), mostrando la clonación parcial del gen *KISRB10*. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Como marcador de tamaños de los fragmentos se empleó el DNA del fago λ digerido con *BstEII* (Lambda DNA-*BstEII* digest de BioLabs citado en Daniels *et al.*, 1983).

Tras la identificación del clon deseado, se realizó una secuenciación del mismo, hasta ensamblar un contig de 3.757 pb de alta homología con *ScSRB10*. Dicha secuencia fue depositada en la base de datos de EMBL bajo el número de acceso AJ532841.

Tras la obtención del clon *KISRB10* y su proceso de secuenciación se observó que no solo se había clonado *KISRB10* sino también las ORF anterior y posterior (un fragmento) que mantenían la misma disposición que en *S. cerevisiae*, manifestando de nuevo sintenia y la proximidad evolutiva entre las dos levaduras (figura 23).

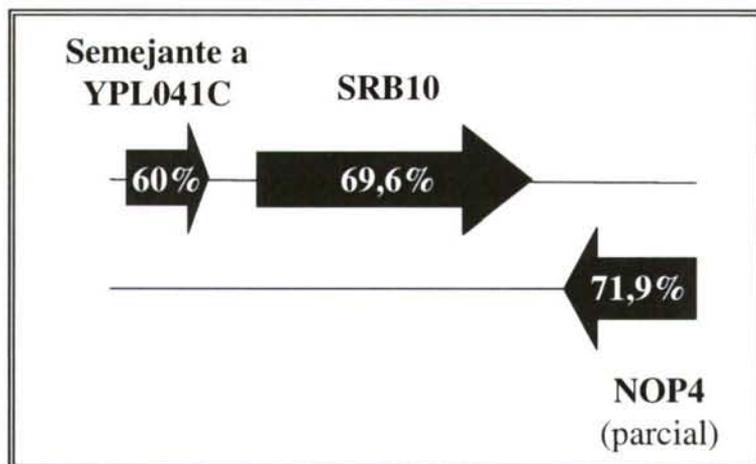


Figura 23. Mapa físico de las ORF identificadas en el clon pAB24*KISRB10* secuenciado de la genoteca de Chiron. Los porcentajes de homología con *S. cerevisiae* mostrados han sido calculados mediante FASTA (Pearson & Lipman, 1988).

Se encontró un gen con una similitud del 60% (calculado mediante FASTA; Pearson & Lipman, 1988) con la ORF YPL041C de *S. cerevisiae* localizada 5' en la misma hebra. Esta ORF no tiene una función conocida por el momento, aunque su delección resulta viable pero provoca una ralentización del crecimiento (Tong *et al.*, 2004). En posición 3' a *KISRB10* y en la hebra complementaria, se localizó una ORF conocida y la secuencia parcial obtenida para ella mostraba una similitud del 71,9% con *ScNOP4* (YPL043W). Se trata de una proteína nucleolar, esencial para el procesamiento y maduración del RNA 27S y la biogénesis de la subunidad mayor de los ribosomas. Contiene cuatro motivos de reconocimiento de RNA (RRMs) (Sun & Woolford, 1997). El nulo resulta inviable ya que causa una acumulación de subunidades 60S debido a la falta de producción de RNAr maduro 25S a partir del RNAr precursor 27S (Giaever, *et al.* 2002).

4.2. Subclonación de *KISRB10*

Una vez conocida la secuencia completa de *KISRB10* se procedió a su clonación (sin las regiones flanqueantes que presentaba en pAB24) en otros vectores más adecuados para estudios posteriores. Para ello se diseñaron los oligos ECV199 y ECV200 (tabla 8) que hibridan en las posiciones -996 y en +2.546 (la posición +1 es la adenina del ATG) amplificando un total de 3.542 pb. La temperatura de hibridación seleccionada fue de 50°C.

Tabla 8. Listado de los oligonucleótidos empleados para la subclonación del gen *KISRB10*. Los sitios de reconocimiento para *Bam*HI y *Sall* aparecen en negrita.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra
ECV199L	GGGGG GATCC ATCCATTGCCAGGGCTTG	Watson
ECV200L	GGGG TGCAC CGATGACTAGATTGGCTATCAGAA	Crick

Ambos oligonucleótidos se caracterizan por tener en su extremo 5' unos sitios de reconocimiento de corte para las enzimas *Bam*HI y *Sall* respectivamente. En un primer paso, se clonó este fragmento en el vector comercial pGEM®-TEasy, llamándose a esta construcción TEasy*KISRB10*. A continuación, y tras una digestión con *Bam*HI y *Sall*, se clonó el gen en el vector pSK1 (de expresión en *S. cerevisiae* y *K. lactis*). Se denominó a esta construcción pSK1*KISRB10*. Así mismo, se clonó el mismo fragmento en los vectores YEplac195 (denominándose la construcción YEp195*KISRB10*) y en YIplac340 (denominándose en este caso YIp340*KISRB10*).

4.3. Análisis funcional de *KISRB10* en *S. cerevisiae*.

Complementación de la mutación *Scsrb10*

Tras la obtención del clon de pSK1*KISRB10*, para comprobar su funcionalidad, se procedió a la transformación de un mutante *srb10* de *S. cerevisiae*, Z768 (*MATa ura3-52 his3Δ200 leu2-3, 112 rpb1 Δ187::HIS3 srb10Δ1::hisG [LI4(LEU2 CEN RPB1)]*). En *S. cerevisiae* los mutantes *srb10* se caracterizan por tener una pérdida parcial de represión por glucosa (Kuchin *et al.*, 1995), crecimiento con floculación (Holstege *et al.*, 1998), expresión desprogramada de genes de la meiosis (Ohkuni & Yamashita, 2000), termosensibilidad (Thompson & Young, 1995) y pobre crecimiento en medios con galactosa limitada (Hirst *et al.*, 1999).

Se realizó la selección de los transformantes en placas de CM-Ura. Como resultado, se observó que *KISRB10* era capaz de revertir el crecimiento con formación

de flóculos de la cepa Z768 (*srb10*⁻) en medio líquido tal y como se observa en la figura 24.

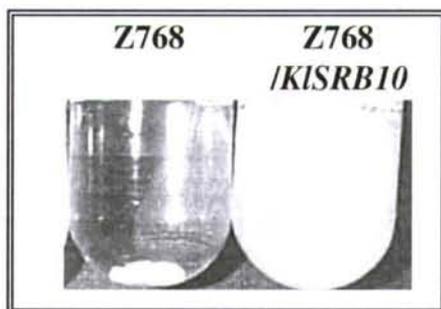


Figura 24. Complementación de la mutación del gen *SRB10* en *S. cerevisiae*. El mutante Z768 presenta crecimiento con formación de flóculos que desaparecen cuando se transforma con el gen *KISRB10* obtenido en este trabajo.

Otro de los fenotipos resultantes de una mutación en *SRB10* en *S. cerevisiae* se traduce en termosensibilidad a altas temperaturas. Para comprobar si el clon obtenido también revertía este patrón, se procedió a la transformación del mutante Z768 con pSK1*KISRB10* y posterior sembrado en placas CM-Ura glucosa al 2%, que se incubaron a dos temperaturas diferentes: 30 y 40°C.

Como resultado (figura 25) se observa que el mutante transformado recupera la capacidad de crecimiento a 40°C, lo que pone de manifiesto que *KISRB10* es capaz de revertir el fenotipo de termosensibilidad, al igual que sucedía con la formación de flóculos.

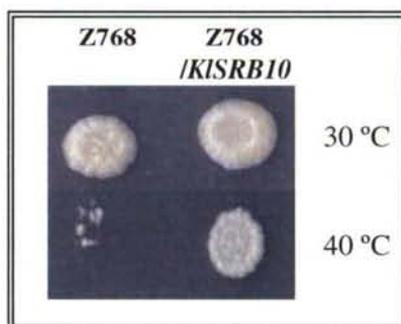


Figura 25. Complementación del fenotipo de termosensibilidad a 40°C del mutante *srb10* de *S. cerevisiae*.

4.4. Determinación del sitio de inicio de la transcripción mediante *primer extension*

Los análisis mediante *primer extension* se emplean para cuantificar los niveles de RNAm, y para detectar especies de RNAm de baja abundancia. Además, también pueden ser utilizados para la caracterización de los extremos 5' de los transcritos y determinar los puntos exactos de inicio de la transcripción.

Con el fin de conocer la funcionalidad del gen *KISRB10* se llevó a cabo una síntesis de DNAc a partir del RNAm para así poder comprobar su expresión y al mismo tiempo se determinaron los puntos de inicio de la transcripción.

Para la realización del experimento se diseñó el oligonucleótido ECV125 (GCCCGCTAACATTTCTGATG) que hibrida en la posición +126. Este oligonucleótido fue empleado paralelamente en una reacción de síntesis de DNA a partir de RNAm y en una reacción de secuenciación tomando como DNA molde la construcción pSKSRB10 (ver materiales y métodos).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 26. Los puntos de inicio se han localizado en las posiciones -39, -35, -30, -21 y -17, aunque la posición -17 aparece con mayor intensidad lo que podría estar indicando una preferencia por este punto de inicio.

Se han localizado además dos supuestas cajas TATA, una en las posiciones -24/-20 y otra en -67/-63 que determinarían la selección de los puntos de inicio de la transcripción. En *S. cerevisiae*, el inicio de la transcripción ocurre dentro de una región situada entre 40 y 120 pb en dirección 3' de la caja TATA, y a menudo con múltiples sitios de inicio (Struhl, 1987). De esta manera el promotor mínimo de *KISRB10*, definido como la región mínima del promotor capaz de unir TBP queda determinado desde la posición -67.



	GCTAAAAC	CTGATCTICC	ATTGGCACTG	ATGTAATAG	ACTAATTTAT	-361
	ATATAGACTC	GCAITTCATCT	TATTATTATA	AACTTCATG	GATCATATTT	ATGAAGACAA -301
	CCTACGATTA	GTTTACAGTT	AGTGTCTCAA	ATCCTTGATA	ATAGTAATAA	ATTCAGCTAC -241
	GGACTAACTA	TTTATTTCATG	ATACAACGAC	ATATCAGGCC	AGAGTTGGCT	ACTTTATTAT -181
	CTAATGACTC	TTTCTTCACA	GAACAACGAA	TGGTTCITAT	ATTGACGTTT	TTATAAGAAT -121
	TTAAAGCGAA	GTGATCCATT	AGAAAAATGA	TTAAACGTTG	AACGCTTTGA	GAATATAAAG -61
	ACAAGCTCTC	GGCGGATACA	GCAATCTATC	ACTTTTATA	GACTGCGAAT	TACTGCTGTA -1
ATG						+3

Figura 26. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción del gen *KISRBI0*. Las cuatro primeras líneas muestran los resultados de la secuenciación del gen *KIHEM12* en el orden G A T C. La quinta línea muestra los resultados del experimento de *primer extensión*, indicando para cada caso la posición ocupada en la secuencia del promotor, donde parecen remarcadas en rojo y señalizadas con una flecha aquellas de mayor intensidad; las de menor intensidad están señaladas con un punto.

Tras la obtención del clon de *KISRBI0* y comprobación de su funcionalidad en *S. cerevisiae* y *K. lactis*, se proyectó un análisis de diversos dominios de *Srb10p* conservados en varias especies de levaduras. El desarrollo de este estudio aparece recogido en un capítulo posterior de esta Tesis.

5.DISCUSIÓN

Mediante la técnica de *DCbyPCR* se han clonado los genes *KIHEM12*, relacionado con la biosíntesis de hemo, *KIHAPI* que codifica un factor transcripcional relacionado con la regulación de genes implicados en el metabolismo respiratorio y *KISRBI0*. *Srb10p* es un componente del complejo *Srb8/9/10/11p* que a su vez interactúa con el complejo mediador de la RNA polimerasa II.

La técnica ha resultado muy adecuada en todos los casos partiendo de una genoteca de *K. lactis* excepto en el caso de *KIHAPI*. Las dificultades asociadas a la clonación de este gen han surgido del hecho de que la proteína tiene carácter tóxico cuando se expresa en bacterias, con lo cual las genotecas con las que se trabajó carecían de clones completos y además pudimos comprobar posteriormente que uno de los fragmentos del clon se encontraba ausente en todas las genotecas disponibles. Para superar este inconveniente se utilizó una estrategia basada en la alta sintenia que existe entre especies de levadura relacionadas (Fischer *et al.*, 2001) y de este modo en dos rondas sucesivas de PCR pudo obtenerse un clon completo partiendo de DNA genómico de *K. lactis*.

Los clones obtenidos para *KIHEM12* y *KISRBI0* son funcionales en *S. cerevisiae*, complementando las mutaciones correspondientes, *hem12* o *srb10*, en dicha levadura. Este alto grado de conservación no resulta sorprendente dada la cercanía evolutiva de estas levaduras y el hecho de que son genes presentes en copia única en *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>).

Por el contrario, el clon *KIHAPI* no resulta funcional en *S. cerevisiae* como quedó demostrado por el hecho de que no es capaz de restaurar el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables del mutante *hap1* de *S. cerevisiae* ni tampoco es capaz de restaurar la expresión del gen aeróbico *CYC1* en el mismo mutante. Este resultado resulta sorprendente si tenemos en cuenta el elevado grado de conservación que existe en todos los motivos que son funcionalmente importantes para la acción de Hap1p como regulador transcripcional en *S. cerevisiae*. La proteína *KIHap1p* presenta bastante conservados el dominio en dedo de Zn para la interacción con el DNA, el dominio de dimerización y los dominios necesarios para la activación transcripcional y la represión en ausencia de hemo. Tal vez la ausencia de complementación pudiera achacarse a que hay dos dominios de respuesta a hemo poco conservados (HRM1 y

HRM6) que han sido citados como importantes para activar a Hap1p en presencia de hemo (Hach *et al.*, 1999)

Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado además que, a pesar de que *K. lactis* y *S. cerevisiae* son levaduras diferentes desde el punto de vista del metabolismo respiratorio o fermentativo de los hidratos de carbono, en *K. lactis* hay respuesta transcripcional mediada por hemo (González-Domínguez *et al.*, 2000). También se había podido demostrar la interacción de ScHap1p con el promotor del gen *KICYC1* (González-Domínguez *et al.*, 2000) mediante ensayos EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*). Tal vez el hecho de que *KIHAP1* no sea funcional en *S. cerevisiae* se deba a que el gen no puede transcribirse correctamente en esta levadura cuando está bajo el control de su propio promotor. Existen precedentes de esta situación para otros genes de estas levaduras que codifican reguladores transcripcionales. Por ejemplo el gen *KIHAP4* expresado bajo el control de su propio promotor en un plásmido centromérico no es capaz de complementar el fenotipo de deficiencia de crecimiento en lactato del mutante *hap4* de *S. cerevisiae*; sin embargo sí es capaz de hacerlo cuando se expresa bajo el control del promotor de *ScHAP4* (Bourgarel *et al.*, 1999). Los factores que controlan la transcripción de *HAP1* en *S. cerevisiae* no son todavía conocidos, de hecho sólo muy recientemente han comenzado a estudiarse encontrando que existe una autorepresión del gen *ScHAP1* por la proteína ScHap1p (Hon *et al.*, 2005). Esta autorepresión mantiene unos niveles adecuados en condiciones aeróbicas. También en condiciones anaeróbicas o hipóxicas, ScHap1p parece tener un papel regulador sobre la transcripción de muchos genes (Chantrel *et al.*, 1998) pero en estas condiciones los mecanismos que regulan los niveles de ScHap1p son totalmente desconocidos.

El estudio comparativo de la expresión de *HAP1* en *S. cerevisiae* y *K. lactis*, así como de los elementos que controlan su expresión en cada una de las levaduras y en condiciones de oxígeno suficiencia o deficiencia resulta muy atractivo. Sin embargo, los problemas surgidos durante el proceso de clonación retrasaron la obtención del clon, lo que imposibilitó realizar dicho estudio durante el transcurso de esta Tesis. Diversos experimentos están actualmente en marcha y serán de utilidad para resolver muchas de las preguntas planteadas.

Un análisis más detallado sobre la caracterización funcional de los genes *KIHEM12* y *KISRB10*, junto con un análisis del promotor del gen *KIHEM1* previamente clonado (González-Domínguez *et al.*, 1997) se presenta en los siguientes capítulos.

CAPÍTULO 2:
FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE
KIHEM12

1. INTRODUCCIÓN

Una vez clonado el gen *KIHEM12* de *Kluyveromyces lactis* y demostrada su funcionalidad en *Saccharomyces cerevisiae*, ya que *KIHEM12* es capaz de complementar las mutaciones del gen homólogo, se decidió abordar una caracterización de su función y regulación en *K. lactis* con tres objetivos. El primero de ellos comparar las secuencias de la proteína uroporfirinógeno descarboxilasa (URO-D), codificada por *KIHEM12*, con otras proteínas homólogas, a fin de poder deducir información sobre las relaciones estructura-función. En segundo lugar comprobar la funcionalidad del gen en *K. lactis* y averiguar si se trata de un gen único o existen otros genes que codifican para iso-formas de la proteína; con este fin se planteó la consecución de una cepa haploide con el gen deletado e interrumpido por el marcador Kan^R. La cepa obtenida tiene también interés para estudiar la regulación transcripcional de otros genes de la ruta de biosíntesis de hemo en ausencia del producto final de la ruta. Finalmente también se propuso abordar el estudio de su regulación transcripcional y la caracterización de los elementos reguladores de su promotor.

2. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA PROTEÍNA URO-D DE *K. lactis*

La proteína resultante de la traducción de *KIHEM12* está estructuralmente relacionada con otras proteínas uroporfirinógeno descarboxilasas (URO-D) tal y como se observa en las homologías de la tabla 5 mostrada en el capítulo anterior.

Cuando se realiza un alineamiento múltiple entre la proteína de URO-D de *K. lactis* y proteínas URO-D de otras levaduras, de *Nicotiana tabacum* y de humanos, son destacables una serie de coincidencias (figura 27).

Función y regulación de *KIHEM12*

<i>K. lactis</i>	-----MQVQNVDRSKFAPMKNDLMLRAALGE	26
<i>S. cerevisiae</i>	-----MGNFPAKNDLILRAAKGE	19
<i>S. castelli</i>	-----MENMRDEFPPLKNDLLRVLRLGE	23
<i>S. pombe</i>	-----MKNDLILRAAKGE	13
<i>H. sapiens</i>	-----MEANGLGPGQGFPELKNDFLRAAWGE	26
<i>N. tabacum</i>	MMSQNYSPSSISPSKSAFTSPSNFNLPRLICCSAGGTVAEPKAINATQPLLLDVAVRGK	60
	: : * * * * :	
<i>K. lactis</i>	KVERPPCWIMR--QAGRYLP-----EYHEVKNGRDFEFETCR-DAEIAASEITII	70
<i>S. cerevisiae</i>	KVERPPCWIMR--QAGRYLP-----EYHEVKNNRDFEQTCR-DAEIAASEITII	63
<i>S. castelli</i>	EVERPPCWLMR--QAGRYLP-----EYHEAKGGRDFEFETCR-DAEIAASEITII	67
<i>S. pombe</i>	EVERPPVWIMASWKISSWYVHDNLNLIVCTNETIEYHKLRAKQSFEMCO-TPETACELTLL	72
<i>H. sapiens</i>	ETDYPVWCMR--QAGRYLP-----EFRETRAQQDFEFSTCR-SPEACCELTLL	70
<i>N. tabacum</i>	EVERPPVWLMR--QAGRYMK-----SYQLLCEKYPFLFRDRSENVDLVVEISL	105
	: : . * * * * : : * * * * : : * * * * :	
<i>K. lactis</i>	QPVRRYAGLLDAAIIFSDILVLPQAMGMKVMVEGKGFHFPEPLRTEEQQLQKVLVDYKVVN	130
<i>S. cerevisiae</i>	QPVRRYRGLLDAAIIFSDILVLPQAMGMKVMVEGKGFHFPEPLRNPEDLQTVLDYKVDV	123
<i>S. castelli</i>	QPILHFQGLLDAAIIFSDILVLPQAMGMKVMVEGKGFHFPEPLRREVSVDVIEVLDYKVDV	127
<i>S. pombe</i>	QPVTRFKGLLDAAIIFSDILVLPQALGMQVVMLEKQKGFHFPEPLVVPEDIDLLEKTPN-I	131
<i>H. sapiens</i>	QPLRRF--LLDAAIIFSDILVVPQALGMEVTVMPGKGFHFPEPLREQLDLERLRDPEV-V	127
<i>N. tabacum</i>	QPKWVER--PDGVIIFSDILVPLSGMNIFFDIKKGKGVVIFDPLRTAADVEKVFREPI--	161
	* * : : * * * * * : : : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * :	
<i>K. lactis</i>	LDELEWAFKAITMTRIKLDGQVPLLGFQCGAPWTLVYMTTEGGGSRFRFAKQWLNESPES	190
<i>S. cerevisiae</i>	LKELDWAFKAITMTRIKLDGQVPLLGFQCGGPWTLVMVYMTTEGGGSRFRFAKQWLNINYPPEL	183
<i>S. castelli</i>	LKELDWAFKISINLIRWKLNGEVPVLFQCGGPWTLVYMTTEGGGSRFRFRYAKQWINEHPDL	187
<i>S. pombe</i>	SAKLGVMDAISLITREKLDGQVPLMGFSGAPWTIMAYMIEGGGSKTFAKAKSWLFRFPDE	191
<i>H. sapiens</i>	ASELGYVFQAITLIRQLRQLAGRVPLIGFAGAPWTLMTYVMEGGGSSSTMAQAKRWLYQRQA	187
<i>N. tabacum</i>	EKSVYVYGEALTLRKEVNNQAAVLGFGVAPFTLASVYVEGGSSKNFTKIKRLAFAPKPV	221
	: : . : : : * : : * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * :	
<i>K. lactis</i>	SHKLLQKITDVAVEFLCQOVVAGCQMLQVFEVSWGGELGSRDFDEFSLPYLKQIAERVPPR	250
<i>S. cerevisiae</i>	SHKLLQKITDVAVEFLSQOVVAGAQILQVFEVSWGGELSSVDFDEFSLPYLRQIAERVPPR	243
<i>S. castelli</i>	CKRLLQKITDVAVEFLSQOVVAGAVLQVFEVSWGGELSSLDDEFSLPYLKQIVSKVPPR	247
<i>S. pombe</i>	SHKLLKITDVAVSYLIQOVVAGAQQLQIFDQSWAGELSPDEFTEYAYPYLVRIQEVKQIH	251
<i>H. sapiens</i>	SHQLLRITLDALVPLVGVQVAVAGAQALQVFEVSHAGHLGQPLFNKALPYIRVAKQVKAR	247
<i>N. tabacum</i>	LHALLQKFAATSMAKYIRYQADSGAQAVQIFDQSWATELSPVDFEFLPYLKQIVDSVKLIT	281
	: * * : : : : * : : * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * :	
<i>K. lactis</i>	LKQLGIEERVPMVVFAGKSWYALDKLQCDSGYNAVSLDWSWDPAEAVKINS-DRVTLQGNL	309
<i>S. cerevisiae</i>	LQELGIMEQIPMIVFAKGSWYALDKLQCSGFDVSLDWSWDPREAVKINS-NRVTIQGNL	302
<i>S. castelli</i>	LQELGITEKIPMIVFAKGSWYALDKLQCSGFDVSLDWTWDPKAEVINS-GRVTLQGNL	306
<i>S. pombe</i>	LKKKRRDE-VPMIVFAKAWAYIDQLQCDSGYDVIGLDWTVSPKAEVIRIGNRVRFQGNL	310
<i>H. sapiens</i>	LREAGLAP-VPMIIFAKDGHFALELAQAGYEVVGLDWTVAPKKARECVG-KTVTIQGNL	305
<i>N. tabacum</i>	HPN-----LPLILYASGSGGLLERLPLTGVDDVSLDWTVDMDGRRRLG-PNVAIQGNV	334
	: : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * :	
<i>K. lactis</i>	DPGVYIGSDEIITKRVTMVMHGFGGGKQHYIVNFGHGTHPFMDPEKIKFFLQECHRVGSQ----	369
<i>S. cerevisiae</i>	DPGVYIGSKEVITKKVKQMIKFAFGGKSRIVNFGHGTHPFMDPDVVKFFLEECHRIGSKS----	362
<i>S. castelli</i>	DPGVYIGSKEVITKTEEMIKRFGGKKNYIVNFGHGTSPFMDPEQIRFFLEECHRIGSKS----	367
<i>S. pombe</i>	DPNIIYGTREIIEARTKEMIQDFGGGKQGYIINLGHGIPGPNDDVRFLEKCHQYGS-----	370
<i>H. sapiens</i>	DPICALYASEEIEGLVKQMLDDFG--PHRYIANLGHGLYPMDEHVGAFVDAVHHRSLRLRQN	367
<i>N. tabacum</i>	DPGVLFSGKEFITNRINDTVKKAG--KGHILNLGHGIVKGTPEENFAHFFETAKGLRY-----	391
	* * : : : * * : : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * :	

Figura 27. Alineamiento mediante CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) de proteínas URO-D de levaduras, tabaco y humanos. Para una mejor localización, las Cys están sombreadas y las His están en negrita. Los residuos cuyas mutaciones afectan a la actividad catalítica en *S. cerevisiae*, están indicados mediante una flecha y subrayados cuando están conservados. Los residuos que pueden estar de manera directa o indirecta relacionados con la unión a sustrato o con la catálisis en la URO-D de humanos, están indicados por una estrella y subrayados cuando están conservados.

Al analizar los resultados del alineamiento realizado se observa que cinco de las siete Cys encontradas en la URO-D de *K. lactis* alinean con las Cys presentes en otras proteínas URO-D procedentes de hongos (las Cys aparecen sombreadas en la figura 27). La His en la posición 345 de la proteína de *K. lactis* (en negrita en la figura 27 y doblemente marcada con una flecha y una estrella) está también muy conservada y experimentalmente se ha determinado que esta His es necesaria para la actividad del sitio catalítico en la URO-D de *S. cerevisiae* (Félix & Brouillet, 1990) y también en la URO-D de origen humano (Whitby *et al.*, 1998). Otros dos aminoácidos aparecen conservados en la proteína de *K. lactis*, Asp en la posición 81 y Tyr en la posición 167 (indicado mediante estrellas en la figura 27). Estos aminoácidos han sido relacionados, directa o indirectamente, con la función catalítica en la URO-D de humanos (Whitby *et al.*, 1998). Otras mutaciones que afectan a la actividad enzimática fueron identificadas en *S. cerevisiae* (Garey *et al.*, 1992; Chelstowska *et al.*, 1992). En la figura 27 están indicadas mediante flechas y es posible observar que incluyen a varios aminoácidos conservados en *K. lactis* (Gly40, Gly307, Ser66, Thr69, Leu114 y Ser222).

La estructura cristalina de la URO-D humana fue determinada por Whitby *et al.* (1998) mostrando que la proteína de 40,8 kDa está compuesta de un dominio que se pliega en una estructura terciaria en barril (β/α)₈ (figura 29). El sitio activo se localiza en una hendidura formada por los lazos de los extremos C terminales de las láminas del barril (L1-L2-L3-L4). Muchos residuos conservados en otras URO-D de diferentes orígenes coinciden en esta zona de los lazos (marcado con una estrella en la figura 27). Los aminoácidos conservados son dos Arg y una His que están probablemente relacionados con la unión al sustrato o con la catálisis. Una estructura similar fue determinada para la URO-D de *Nicotiana tabacum* (Martins *et al.*, 2001). La conservación de estos aminoácidos importantes para la actividad en la URO-D de *K. lactis* y en otras URO-D fúngicas, así como la conservación de las posiciones de las Pro, sugiere un patrón de plegamiento similar para las URO-D de levaduras, cuyas estructuras cristalinas aún no han sido resueltas.

La estructura secundaria que puede predecirse a partir de la secuencia de *K. lactis*, empleando el programa *PredictProtein* (Rost, 1996) a través del servidor EXPASY, permite proponer un diagrama topológico para la URO-D (figura 28), que es compatible con la estructura de barril (β/α)₈ encontrada para la enzima de *N. tabacum* y *H. sapiens*. Las principales diferencias entre la enzima de *K. lactis* y estas otras dos son, según el modelo propuesto:

- El lazo L2, en el que se incluye únicamente un elemento beta y una hélice alfa en lugar de las dos hélices alfa presentes en la URO-D de humanos.
- La falta de estructuras secundarias en hélice alfa en los lazos L4 y L7.

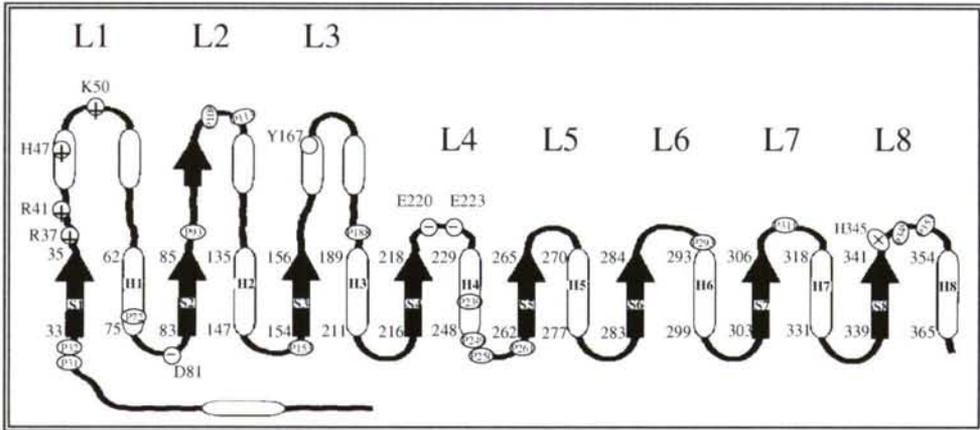


Figura 28. Diagrama topológico de *K/Hem12p* de acuerdo con la estructura secundaria que puede precedirse a partir de la secuencia de aminoácidos.

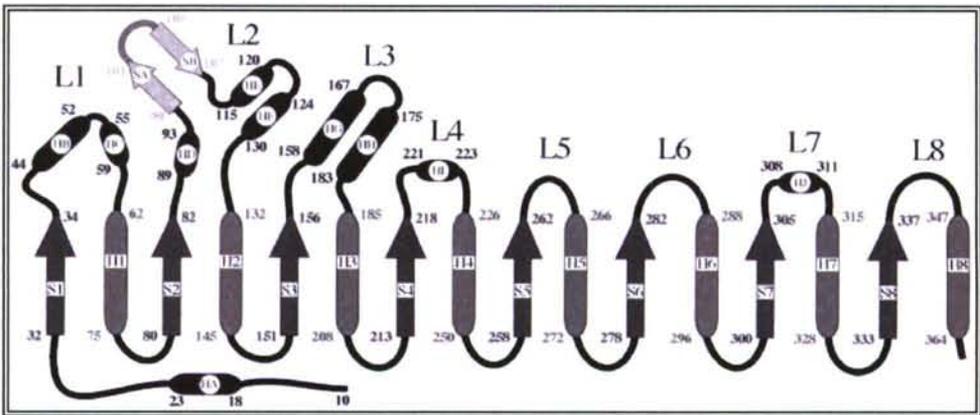


Figura 29. Diagrama topológico de URO-D de *Homo sapiens* (Whitby *et al.*, 1998). Las hélices se muestran como óvalos alargados y las láminas como flechas. El primer y último residuo de cada estructura secundaria está numerado.

3.OBTENCIÓN DE UNA CEPA DE *K. lactis* CON EL GEN *KIHEM12* DELECIONADO

Se planeó obtener una cepa haploide de *K. lactis* con un alelo nulo para el gen *KIHEM12*. El método empleado fue el de *one-step* descrito por Rothstein en 1991 y la cepa de levadura seleccionada fue PM5-3C; como marcador se utilizó Kan^R que proporciona resistencia al antibiótico kanamicina/geneticina.

El fragmento lineal que se empleó en la transformación se caracteriza por tener una deleción interna de la ORF entre las posiciones +52 y +1.074, reemplazada por el marcador Kan^R obtenido a partir del casete KANMX4 (Wach *et al.*, 1994).

En la figura 30 se puede observar un esquema de los pasos realizados para la obtención del fragmento para la interrupción.

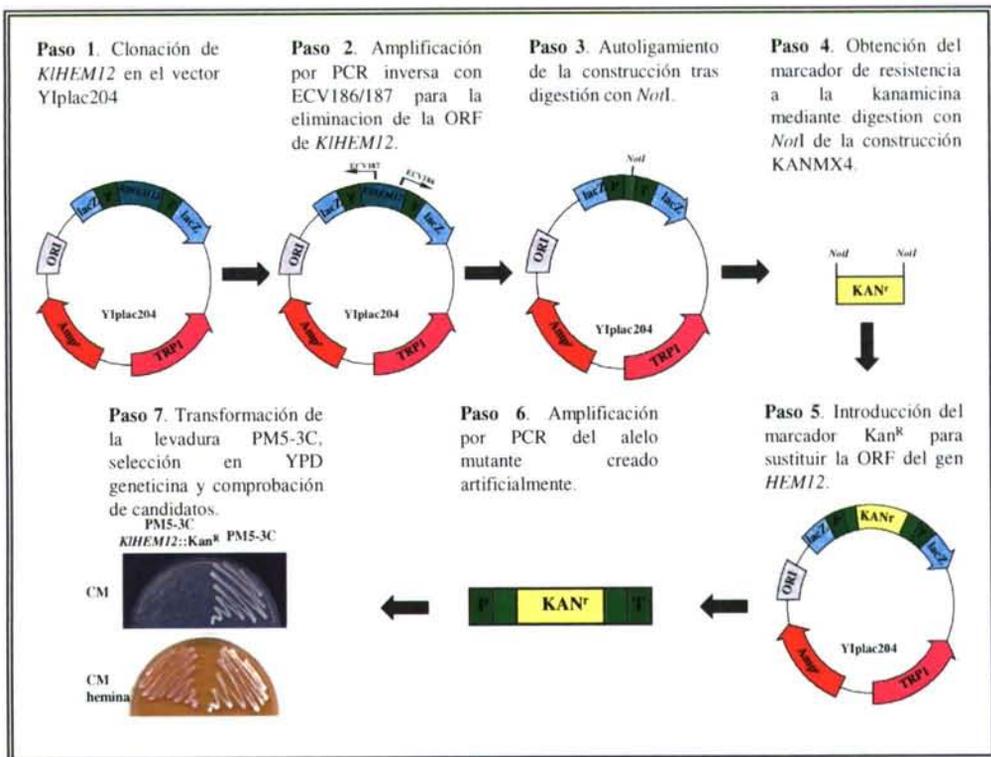


Figura 30. Esquema de la obtención del nulo para el gen *KIHEM12* en la cepa PM5-3C.

En primer lugar (paso1) se procedió a la clonación del gen *KIHEM12* en un vector de pequeño tamaño. Esta condición resulta fundamental para los pasos siguientes, ya que se va a realizar una PCR inversa, de manera que cuanto más pequeño

sea el vector, menos pares de bases se han de amplificar y por lo tanto la reacción de PCR será más eficaz. Se seleccionó el vector YIplac204 (Gietz & Sugino, 1988) de 3.545 pb. Tomando como construcción de partida TEasy*KIHEM12*, se realizó una digestión con *SphI* y *SaII* (que cortan en el MCS del pGEM®-TEasy) y se clonó en estos mismos sitios de restricción del MCS de YIplac204. Se denominó a la construcción YIp204*KIHEM12*. Se caracteriza porque contiene 678 pb de región promotora, 1.110 pb de región codificadora y 877 pb de región terminadora.

Seguidamente (paso 2) se diseñaron los oligonucleótidos ECV186 y ECV187 que se caracterizan por hibridar en las posiciones +22 de la hebra de Watson y en +1.147 de la hebra de Crick respectivamente (tabla 9). Ambos oligos se caracterizan por tener en su extremo 5' un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NotI*. Tras realizar la PCR a una temperatura de 50°C, el fragmento de DNA se corresponde con el vector YIp204 más las regiones promotora y terminadora de *KIHEM12* clonadas en el mismo.

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados para la obtención de la construcción necesaria para lograr la anulación de *KIHEM12*. El sitio de reconocimiento de corte para *NotI* aparece en negrita.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV186	GGGGCGGCCGC TTTTTGCAGGAATGCACAGA	Watson	+22
ECV187	GGGGCGGCCG CAAATCATTCTTCATTGGAGCG	Crick	+1.147
ECV168	CATCATTATAGTTGGACCAGG	Watson	-678
ECV169	ATAAGCCCCGAAAA ATTCTTG	Crick	+1.987
ECV106	TTGATCGCTCCAAGTTCG	Watson	+17
ECV202	GGGGTCGACTGAAATAA ATTGGATGCAGAAAG	Crick	+1.163

Tras una digestión enzimática con *NotI* y una posterior reacción de ligamiento, se recuperó la estructura circular del plásmido (paso 3) denominándose a esta construcción YIp*nuloSRB*. A continuación, se obtuvo el fragmento Kan^R (paso 4) a partir de una digestión enzimática con *NotI* del cassette KANMX4 (Wach *et al.*, 1994) y se clonó en el sitio *NotI* de la construcción YIp*nuloSRB* obteniendo de este modo el plásmido denominado YIp*nuloSRBKan* (paso 5).

Una vez conseguida la construcción, se procedió a realizar amplificaciones por PCR con los oligonucleótidos ECV168 y ECV169 (tabla 9) que amplificaban la secuencia del gen interrumpido con el marcador de resistencia a la kanamicina (paso6) para seguidamente transformar la cepa PM5-3C mediante el método del acetato de litio modificado, con un período de incubación de 6 horas en medio no selectivo tras el choque a 42°C.

Con posterioridad, se realizó una siembra en placas YPD-hemina- geneticina (ver materiales y métodos) y los candidatos obtenidos fueron analizados por su incapacidad de crecer en ausencia de hemina.

La correcta interrupción del gen fue comprobada mediante PCR empleando los oligonucleótidos ECV106/ECV202 (tabla 9) y como molde DNA total de levadura extraído de la cepa original, PM5-3C, y del candidato a nulo. ECV106 hibrida en la posición +17 de la hebra de Watson, mientras que ECV202 lo hace en la posición +1.163 de la hebra de Crick.

En el caso del gen intacto, el fragmento amplificado por PCR fue de 1.146 pb. En el caso del gen interrumpido, ya que se habían eliminado 1.125 pb internos de la ORF y se habían sustituido por 1.900 pb del marcador Kan^R, el tamaño obtenido fue de 1.921 pb, lo que ponía de manifiesto la obtención del nulo (figura 31).

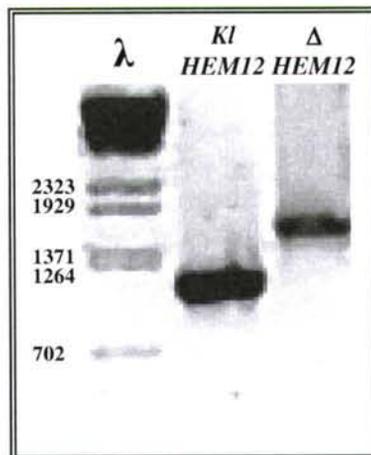


Figura 31. Amplificación por PCR del gen *KIHEM12* a partir de un DNA genómico de PM5-3C y del candidato PM5-3C Δ *HEM12::Kan^R*. Se señalan los tamaños en pares de bases de algunas bandas del marcador empleado: fago lambda digerido con *BstEII* (Daniels *et al.*, 1983).

4.FENOTIPOS DEL MUTANTE NULO PM5-3C $\Delta HEM12::Kan^R$

Tras la obtención del mutante se procedió a realizar un estudio fenotípico del mismo analizando una serie de características:

- 4.1. Crecimiento en ausencia de hemina
- 4.2. Auxotrofia para la metionina
- 4.3. Acumulación de porfirinas

4.1.Crecimiento en ausencia de hemina

Tal y como se observa en la fotografía de la figura 30, la cepa PM5-3C $\Delta HEM12::Kan^R$ portadora del alelo nulo para *KIHEM12* es capaz de crecer únicamente en presencia de hemina.

4.2.Auxotrofia para la metionina

El uroporfirinógeno III, que es el sustrato de la URO-D, es un precursor común tanto para la síntesis de hemo como para la de sirohemo. Además, el uroporfirinógeno III conecta la biosíntesis de hemo con la de la metionina. Esto es así, ya que la biosíntesis de la cisteína y la metionina en *S. cerevisiae* dependen de la captación de sulfato y su posterior reducción a sulfito. Esta reacción está catalizada por la sulfito reductasa, y el sirohemo actúa como grupo prostético de la enzima (Labbe & Labbe-Bois, 1990).

En *S. cerevisiae* está descrito que el alelo nulo de *hem12* provoca una auxotrofia para la metionina (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/>), aunque en nuestro laboratorio no se ha podido reproducir este resultado.

Por ello se decidió analizar si en el caso de *K. lactis* se cumplía la misma característica.

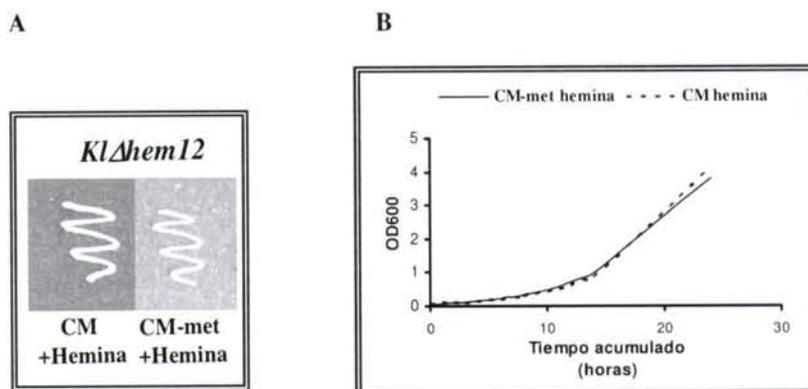


Figura 32. Exploración del fenotipo de auxotrofia para la metionina del nulo de *KIHEM12*.

Como se puede deducir del crecimiento en placa (figura 32A) en medios completos (CM) con metionina (0,004%) y hemina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en medios deficitarios en metionina (CM-Met +hemina), no se observan diferencias de crecimiento para la cepa PM5-3C $\Delta\text{HEM12}::\text{Kan}^{\text{R}}$, y lo mismo sucede cuando se realiza un seguimiento del crecimiento a lo largo del tiempo (ver gráfica 32B). Por lo tanto en el caso de *K. lactis*, la mutación de *KIHEM12* no genera una auxotrofia para la metionina.

4.3. Cuantificación de la acumulación de porfirinas en varios mutantes *hem12*

Un cambio fenotípico observable a simple vista al comparar la cepa PM5-3C y la PM5-3C $\Delta\text{HEM12}::\text{Kan}^{\text{R}}$ es que la primera es de color blanco y la segunda es rosada. Está descrito que los mutantes en distintos pasos de la ruta de biosíntesis de hemo, acumulan porfirinas en su interior (Gollub *et al.*, 1977) de manera que se genera fluorescencia cuando se somete a las células a una iluminación con luz ultravioleta. Por ello, se decidió cuantificar la acumulación de porfirinas de los mutantes *hem12* de que se disponía en el laboratorio para las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*, mediante la exposición a luz UV de una masa celular crecida durante 4-5 días en placas CM con hemina. Los mutantes seleccionados fueron hem6-1B para *S. cerevisiae* que se comparó con su silvestre: BWG-7a y en el caso de *K. lactis* se empleó el mutante obtenido PM5-3C $\Delta\text{HEM12}::\text{Kan}^{\text{R}}$ y su silvestre PM5-3C.

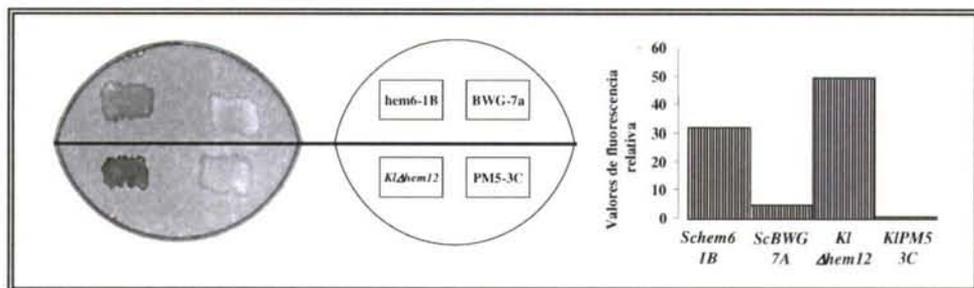


Figura 33. Cuantificación de la acumulación de porfirinas en los mutantes *hem12* de *S. cerevisiae* y *K. lactis* tras iluminación con luz ultravioleta.

Las cuantificaciones se llevaron a cabo mediante análisis de imagen tras iluminar la placa con la luz ultravioleta de un transiluminador. Se empleó para ello el programa *ImageQuant* (materiales y métodos). Como resultado, se observa que en los mutante *hem12* de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*, se produce fluorescencia atribuida a la acumulación de porfirinas (figura 33). En el caso de *K. lactis* esta acumulación es mucho mayor, lo que podría explicarse por su metabolismo energético fuertemente basado en la respiración dependiente de hemo, frente al fermentador de *S. cerevisiae*. En condiciones de respiración, la necesidad de producción de hemo es mayor que en fermentación, ya que actúa como grupo prostético de los citocromos (Salemme, 1977).

4.4. Conclusiones del análisis fenotípico realizado con la cepa PM5-3C- Δ HEM12::Kan^R

El análisis fenotípico realizado sobre la cepa de *K. lactis* PM5-3C- Δ HEM12::Kan^R revela que el gen se encuentra en el genoma haploide en una copia única. Por otra parte los efectos sobre la biosíntesis de hemo son los esperados en esta circunstancia, lo que origina incapacidad respiratoria en ausencia de un precursor de hemo y acumulación de porfirinas. Sin embargo, la biosíntesis de metionina no se ve afectada. Probablemente la auxotrofia por metionina descrita en SGD (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/>) se corresponde con efectos adicionales a los de la propia eliminación del gen *HEM12* ya que está descrito (Gollub *et al.*, 1977) que sólo las mutaciones en los genes *HEM1*, *HEM2*, *HEM3* y *HEM4* presentan auxotrofia para la metionina. Estos genes son necesarios para la producción de uroporfirinógeno III que es precursor para la síntesis del sirohemo que a su vez actúa como grupo prostético

de una sulfito reductasa necesaria para la síntesis de metionina. En cambio no cabe esperar que otras mutaciones *downstream* de *HEM4* en la ruta de biosíntesis de hemo afecten a la síntesis de sirohemo, a no ser por efectos indirectos que puedan producir una disminución del flujo de metabolitos en las primeras reacciones de la ruta y así causar una producción deficitaria de uroporfirinógeno III.

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *KIHEM12* EN DISTINTAS CEPAS DE *K. lactis*

Analizando la bibliografía disponible sobre la expresión y regulación del gen *HEM12* en *S. cerevisiae* se pudo comprobar que los niveles de expresión varían notablemente en función de la cepa analizada. En algunas cepas estos niveles son bajos y únicamente detectables empleando preparaciones de RNA poli-A o RNA extraído de células transformadas con el gen clonado en un plásmido multicopia (Zoladek *et al.*, 1995). Sin embargo, se han descrito niveles de expresión de *HEM12* comparables con los de actina cuando se analizó la cepa BWG7a y sus derivados (DiFlumeri *et al.*, 1993). Como causa de estas discrepancias puede sugerirse la existencia de mutaciones extragénicas que afectan a la expresión de *HEM12* (Zoladek *et al.*, 1995).

Con estos precedentes, se decidió comprobar en primer lugar si existían diferencias de expresión de *KIHEM12* entre las distintas cepas de *K. lactis* disponibles en nuestro laboratorio. Se realizaron varias extracciones de RNA total de las cepas Y1140, MW270-7b, MW98-8c, PM5-3C y W600 y se analizó mediante *northern blot* la expresión del gen. Los cultivos celulares se realizaron utilizando como fuente de carbono una mezcla etanol-glicerol a una concentración del 2%. Los resultados del *northern blot* se muestran en la figura 34. Las intensidades de las señales obtenidas, una vez normalizadas respecto a la carga en el gel, utilizando como control interno la señal correspondiente al RNA ribosómico 25S, muestran que la expresión de *KIHEM12* es detectable en todas las cepas analizadas, aunque la mayor expresión (5 veces) se detecta en PM5-3C.

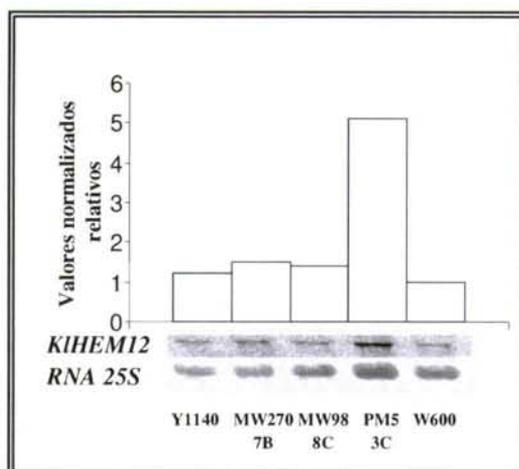


Figura 34. Expresión de *KIHEM12* en distintas cepas de la levadura *K. lactis* crecidas en CM etanol-glicerol al 2%.

6. ANÁLISIS *in silico* DEL PROMOTOR DE *KIHEM12*

Con la finalidad de hacer una primera aproximación a los posibles mecanismos de regulación que pudieran operar sobre el promotor de *KIHEM12* se realizó una búsqueda de secuencias consenso para la unión de factores transcripcionales específicos de función conocida. El análisis *in silico* (figura 35) mostró la presencia de dos consensos degenerados para el factor transcripcional Gcr1p en las posiciones -713/-709 y -325/-321 y otros dos sitios de unión del complejo Hap2/3/4/5p (CCAAT) en las posiciones -667/-663 y -389/-385.

No se localizó, por el contrario, ningún consenso para la caja TATA. Esta secuencia puede estar bastante degenerada en levaduras, muchos promotores contienen consensos TATA, pero otros muchos presentan secuencias alejadas del consenso o carecen totalmente de él (Martínez *et al.*, 1994; Pugh & Tjian, 1991). Se ha estimado que aproximadamente sólo un 17% de todos los genes de levaduras contienen un elemento TATA canónico en su promotor (Kim & Iyer, 2004).

La proteína Gcr1p es un componente del complejo transcripcional Rap1p/Gcr1p/Gcr2p, que activa la transcripción de dos grupos de genes diana: los genes relacionados con componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas y los genes glicolíticos en *S. cerevisiae* (Santangelo & Tornow, 1990; Zeng *et al.*, 1997). La activación de cada clase de genes diana ocurre por distintos mecanismos. El mecanismo general que es específico para los componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas

(incluyendo la mayoría de las proteínas ribosomales), ocurre en ausencia de Gcr2p y requiere del principal dominio de homodimerización de Gcr1p (dominio de cremallera de leucinas) (Deminoff *et al.*, 1995). El mecanismo especializado que estimula la transcripción de genes glicolíticos, es independiente del dominio de cremallera de leucinas, pero requiere a Gcr2p. La suma de los genes diana de ambos circuitos representa una fracción muy importante de todos los genes transcritos por la RNA polimerasa II y además incluye a los que tienen una importancia cuantitativa mayor. Se ha demostrado que 26 de los 30 genes más expresados en levaduras son o componentes de la maquinaria de síntesis de proteínas o genes glicolíticos (Velculescu *et al.*, 1997). Recientemente se ha demostrado que Gcr1p es también responsable de la represión mediada por glucosa de algunos genes como *SUC2* (Turkel *et al.*, 2003)

En el caso del complejo Hap2/3/4/5p, se encarga de la activación dependiente de hemo y/o por fuentes de carbono no fermentables. Existen numerosos genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales, que muestran una regulación a nivel transcripcional de la respiración dependiendo de la fuente de carbono. En *S. cerevisiae* este control transcripcional está mediado por este complejo, que además regula un gran número de genes nucleares cuyos productos están relacionados con la conservación de la energía y el metabolismo oxidativo de los carbohidratos (Grivell, 1995).

6.1.Determinación del sitio de inicio de la transcripción mediante primer extensión

El inicio exacto de la transcripción por la RNAPolimerasa II requiere no solo de su presencia, sino también de un grupo de factores generales de la transcripción GTFs (*General Transcription Factors*), que incluyen a la proteína de unión a TATA (TBP), TFIIB (*Transcriptional Factor IIB*), TFIIE, TFIIIF y TFIIH (Hampsey, 1998). La existencia de análogos para los GTFs en diferentes especies de eucariotas sugiere que la transcripción mediada por la RNAPolII es un proceso altamente conservado. Sin embargo, existe un rasgo peculiar que diferencia a *S. cerevisiae* de los otros eucariotas: la determinación del sitio de inicio de la transcripción. En los eucariotas superiores, la transcripción comienza generalmente a una distancia fija de unas 30 pb en posición 3' a la caja TATA (Giardina & Lis, 1993) y empleando un único sitio de inicio. En *S. cerevisiae*, por el contrario, el inicio de la transcripción ocurre dentro de una región

situada entre 40 y 120 pb en dirección 3' de la caja TATA, y a menudo con múltiples sitios de inicio (Struhl, 1987).

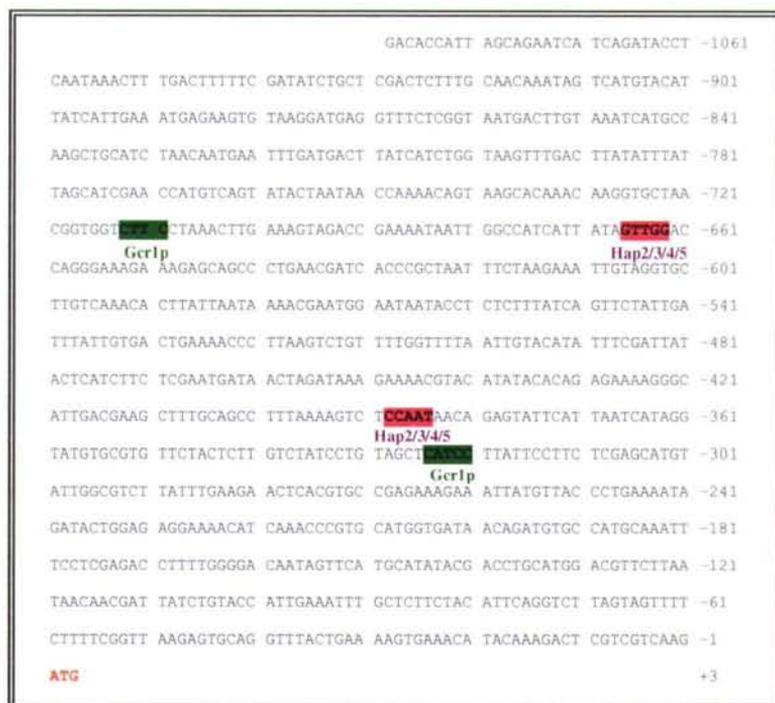


Figura 35. Secuencia del promotor de *KIHEM12* con los supuestos consensos localizados para Hap2/3/4/5p y Ger1p.

A fin de conocer la estructura básica del promotor de *KIHEM12*, antes de pasar a analizar los posibles sitios reguladores existentes en él, realizamos un estudio de las posiciones de los sitios de inicio de la transcripción mediante *primer extension*. Para la realización del experimento se diseñó el oligonucleótido ECV107 (CTGGTAAATAACGTCCAGCCT) que hibrida en la posición +133. Este oligonucleótido fue empleado paralelamente en una reacción de síntesis de DNA a partir de RNAm y en una reacción de secuenciación tomando como DNA molde la construcción pSKKIHEM12 (ver materiales y métodos).

Como se puede observar existen varios sitios de inicio de la transcripción (figura 36) que se han localizado en las posiciones -61, -44, -33, -27, -20, -10 y -8, aunque las posiciones -8, -20 y -27 aparecen con menor intensidad. El hecho de que existan múltiples sitios de inicio en el promotor de *KIHEM12* y ninguno de ellos muestre una

preferencia notable sobre los demás podemos relacionarlo con los datos obtenidos en el análisis *in silico* del promotor que no revela unos claros consensos para la caja TATA. En cualquier caso se ha demostrado recientemente que la inexistencia de dicho consenso en los genes de levadura denominados *TATA-less* no implica una menor unión de TBP al promotor o unos niveles de RNAm menores en condiciones de transcripción basal (Kim & Iyer, 2004). Si se ha observado sin embargo una menor tendencia a la transcripción inducida en los genes *TATA-less* frente a los genes que presentan claros consensos TATA en sus promotores (Kim & Iyer, 2004).



CAATAAACTT	TGACTTTTTC	GATATCTGCT	CGACTCTTTG	CAACAAATAG	TCATGTACAT	-901
TATCATTGAA	ATGAGAAGTG	TAAGGATGAG	GTTTCTCGGT	AATGACTTGT	AAATCATGCC	-841
AAGCTGCATC	TAACAATGAA	TTTGATGACT	TATCATCTGG	TAAGTTTGAC	TTATATTTAT	-781
TAGCATCGAA	CCATGTCAGT	ATACTAATAA	CCAAAACAGT	AAGCACAAAC	AAGGTGCTAA	-721
CGGTGGTCTT	CCTAAACTTG	AAAGTAGACC	GAAAATAATT	GGCCATCATT	ATAGTTGGAC	-661
CAGGGAAAGA	AAGAGCAGCC	CTGAACGATC	ACCCGCTAAT	TTCTAAGAAA	TTGTAGGTGC	-601
TTGTCAAACA	CITATTAATA	AAACGAATGG	AATAATACCT	CTCTTTATCA	GTTCATTGA	-541
TTTATTGTGA	CTGAAAACCC	TTAAGTCTGT	TTTGGTTTTA	ATTGTACATA	TTTCGATTAT	-481
ACTCATCTTC	TCGAATGATA	ACTAGATAAA	GAAAACGTAC	ATATACACAG	AGAAAAGGGC	-421
ATTGACGAAG	CITTTGCAGCC	TTTAAAAGTC	TCCAATAACA	GAGTATTCAT	TAATCATAGG	-361
TATGTGCGTG	TTCTACTCTT	GTCTATCCTG	TAGCTCATCC	TTATTCGTTT	TCGAGCATGT	-301
ATTGGCGTCT	TATTTGAAGA	ACTCACGTGC	CGAGAAAAGAA	ATTATGTTAC	CCTGAAAATA	-241
GATACTGGAG	AGGAAAACAT	CAAACCCGTG	CATGGTGATA	ACAGATGTGC	CATGCAAATT	-181
TCCTCGAGAC	CITTTGGGGA	CAATAGTTC	TGCATATACG	ACCTGCATGG	ACGTTCTTAA	-121
TAACAACGAT	TATCTGTACC	ATTGAAATTT	GCTCTTCTAC	ATTCAAGTCT	TAGTAGTTTT	-61
CITTTTCGGTT	AAGAGTGCAG	GTTTACTGAA	AAGTGAAACA	TACAAAGACT	CGTCGTCAAG	-1
ATG						+3

Figura 36. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción del gen *KIHEM12*. Las cuatro primeras líneas muestran los resultados de la secuenciación del gen *KIHEM12* en el orden G A T C. La quinta línea muestra los resultados del experimento de *primer extensión*, indicando para cada caso la posición ocupada en la secuencia del promotor, donde parecen remarcadas en rojo y señalizadas con una flecha aquellas de mayor intensidad; las de menor intensidad están señalizadas con un punto.

6.2. Análisis de expresión mediante la fusión del promotor de *KIHEM12* al gen reportero *lacZ*

Puesto que en el promotor existían señales consenso para la regulación dependiente de fuente de carbono por Gcr1p y Hap2/3/4/5p (Zeng *et al.*, 1997) y hemo por Hap2/3/4/5p (Grivell, 1995), se decidió verificar si el promotor respondía a la regulación por fuente de carbono y hemo. Había datos indirectos que indicaban que la actividad enzimática de la URO-D de origen humano puede ser inhibida por especies que producen oxígeno reactivo (Pinelli *et al.*, 2002), por lo que también se analizó si la adición de H₂O₂ podía tener efecto a nivel transcripcional sobre el gen *KIHEM12*.

Se procedió a la amplificación del promotor completo a partir del DNA genómico de la levadura Y1140 para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos ECV138 y ECV139 (tabla 10) que amplifican un total de 1.011 nucleótidos desde la posición -988 a +23. El DNA amplificado fue clonado en *Bam*HI-*Sal*I del vector pXW1 (Chen *et al.*, 1992) que permite realizar análisis de expresión en *K. lactis*. En esta construcción, denominada pXW*KIHEM12*, el promotor de *KIHEM12* fue fusionado al octavo codón del gen reportero *lacZ*.

Tabla 10. Listado de los oligonucleótidos empleados para la clonación del promotor de *KIHEM12* en el vector pXW1 (Chen *et al.*, 1992). Los sitios de reconocimiento para *Bam*HI y *Sal*I aparecen resaltados en negrita. La temperatura de hibridación seleccionada fue de 50°C.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV138L	GGGGG GATCC CACACCATTAGCAGAATCA	Watson	-988
ECV139L	GGGG TCCGAC CGATCAACATTCTGTACTTG	Crick	+23

Una vez comprobada la construcción mediante análisis de restricción y secuenciación se utilizó para transformar la cepa de *K. lactis* MW190-9b y se procedió a analizar la expresión del promotor mediante medida de la actividad β-galactosidasa empleando extractos proteínicos (materiales y métodos).

En primer lugar, se realizó un ensayo en anaerobiosis para comprobar si la expresión de *KIHEM12* era o no dependiente de los niveles de oxígeno. Se preparó un pre-inóculo en medio CM-Ura glucosa 2% con una mezcla de seis candidatos de la cepa MW190-9b transformada con la construcción del promotor. Se inoculó un cultivo a una OD₆₀₀ de 0,4 y se dejó crecer hasta una OD₆₀₀ de 0,8. En ese momento se tomó una muestra para realizar la primera medida de actividad enzimática (O₂ inicio). A continuación se añadió al medio de cultivo Tween 80 y Ergosterol para permitir el

crecimiento en anaerobiosis, y se introdujo en una jarra de anaerobiosis (materiales y métodos), donde se mantuvo durante 5 horas a 30°C y agitación. Transcurrido este período de tiempo, se detuvo el crecimiento manteniendo la jarra durante 30 min a -20°C para seguidamente tomar la segunda muestra de cultivo y medir su actividad (N_2 5 horas). El cultivo se puso de nuevo a crecer en aerobiosis durante dos períodos de 1 hora y 30 minutos, de los cuales también se tomaron dos muestras para medir las actividades beta-galactosidasa (O_2 1,5 horas y O_2 3 horas). Los resultados obtenidos (figura 37) muestran que la expresión de *KIHEM12* no está regulada por los niveles de oxígeno.

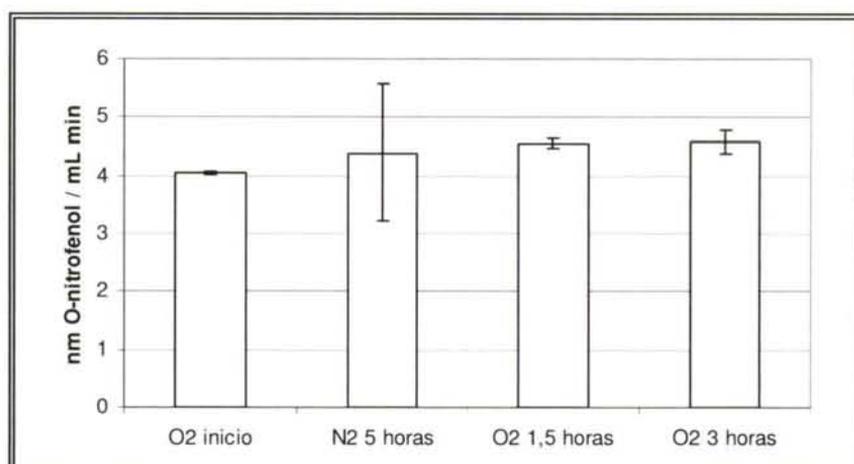


Figura 37. Análisis del promotor completo mediante fusiones a *lacZ*. Ensayo de actividad beta-galactosidasa mostrando la influencia de los niveles de oxígeno.

Los siguientes ensayos se realizaron a partir de células que habían crecido en medios con distintas fuentes de carbono: glucosa 2%, glucosa 0,5%, fructosa 2%, glucosa-lactato 2%, etanol-glicerol 2%. También se realizaron cultivos en medios suplementados con hemina o con H_2O_2 en las concentraciones que se indican en la figura 38.

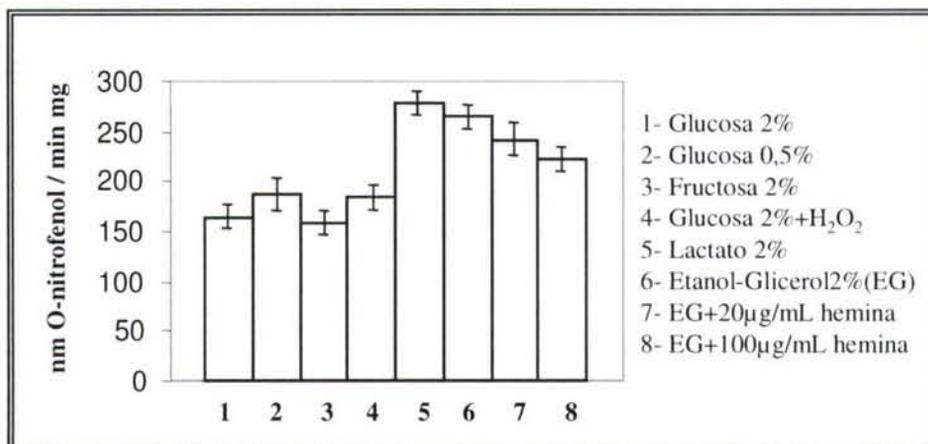


Figura 38. Análisis del promotor completo mediante fusiones a *lacZ*. Ensayo de actividad beta-galactosidasa mostrando la influencia de los niveles de carbono y de hemo.

Los resultados obtenidos (figura 38) muestran que el gen *KIHEM12* no se encuentra regulado por la concentración de glucosa al 2% o 0,5%, por lo que se descarta el análisis de los consensos localizados para Gcr1p. Sí se observa que se induce ligeramente por fuentes de carbono no fermentables como el lactato y el etanol-glicerol. El gen tampoco se encuentra bajo regulación por hemo en condiciones aerobias, ya que los niveles de expresión no varían cuando se añade hemina (precursor de hemo) hasta una concentración de 100 µg/mL. Este resultado apoya al obtenido tras las medidas en anaerobiosis en las que se deducía que la expresión del gen no dependía de los niveles de oxígeno (del que el grupo hemo actúa como sensor). De la misma manera, al añadir H₂O₂ hasta una concentración 2 mM para generar estrés oxidativo, no se observan variaciones en la expresión de *KIHEM12*.

Puesto que el gen se inducía en presencia de fuentes de carbono no fermentables y está descrito que, en *S. cerevisiae*, esta regulación está mediada por el complejo Hap2/3/4/5p (Pinkham *et al.*, 1997), se decidió comprobar si los consensos hallados en el análisis *in silico* del promotor eran funcionales. Para ello se transformaron dos cepas de *K. lactis*, MW270-7b como silvestre y MWH7302-D1, mutante en el gen *Klhap3*, con la construcción pSK*KIHEM12*. Los análisis de *northern blot* (figura 39) indican que los niveles de *KIHEM12* disminuyen del orden de 1,4 veces en el mutante *hap3*. Este resultado coincide con las proporciones entre 1,7 y 1,5 observadas en la inducción con fuentes de carbono no fermentables frente a la glucosa al 2% (ver figura 38). Estos datos

indican que *K/Hap3p* puede mediar en esta inducción a través del complejo Hap2/3/4/5p. Esta moderada regulación está en consonancia con el hecho de que la interrupción del gen *KIHAP3* causa también un efecto moderado y no produce un fenotipo de deficiencia en la respiración (Mulder *et al.*, 1994a).

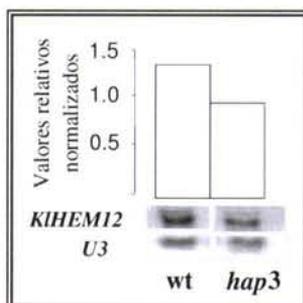


Figura 39. Influencia de la mutación *hap3* sobre la expresión de *KIHEM12* en *K. lactis*.

6.3. Determinación de la funcionalidad de las cajas CCAAT del promotor de *KIHEM12* mediante deleciones internas

Se obtuvieron mediante amplificación por PCR una serie de deleciones del promotor que fueron fusionadas con el gen reportero *lacZ* del plásmido pXW1 de forma similar a como había sido fusionado el promotor completo. Las deleciones internas del promotor se diseñaron para estudiar la posible funcionalidad de las dos supuestas cajas CCAAT que podían mediar la respuesta del complejo Hap2/3/4/5p. Las construcciones diseñadas son:

- ΔA : carente del consenso CCAAT localizado en posición -667/-663.
- ΔB : carente del consenso CCAAT localizado en posición -389/-385.
- ΔAB : carente de los dos.
- ΔC : carente de la región del promotor desde la posición -667 a la -383.

a) Obtención de la deleción interna ΔA

Se diseñaron dos nuevos oligonucleótidos (tabla 11): ECV265: caracterizado por tener un sitio de corte para *Bam*HI en su extremo 5' y por hibridar en la hebra complementaria en la posición -673, exactamente a 5 nucleótidos en dirección 5' del sitio Hap2/3/4/5p (-667/-663). ECV266: caracterizado por tener también un sitio de

corte para *Bam*HI en su extremo 5' y por hibridar en la hebra molde en la posición -660, a 2 nucleótidos en dirección 3' del sitio Hap2/3/4/5p (-667/-663).

Tabla 11. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de las deleciones del promotor de *KIHEM12* ΔA. Los sitios de reconocimiento de *Bam*HI, *Sal*I y *Bgl*II aparecen resaltados en negrita.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV265	GGGGG GATCCT GATGGCCAATTATTTTCG	Watson	-673
ECV266	GCGGG GATCCC CAGGGAAAGAAAGAGCA	Crick	-660
ECV267	GGGGG GATCC CACAGAGTATTCATTAATCATAGG	Crick	-383
ECV268	GGGGG GATCC TAAAGGCTGCAAAGCTTC	Watson	-396
ECV294	GGGG TGACAGATCT CAGGGAAAGAAAGAGCA	Crick	-660
ECV275	GGGG TGACAGGATCC CAGGGAAAGAAAGAGCA	Crick	-660

Para la obtención de esta deleción ΔA se realizó un proceso de dos etapas de amplificación por PCR empleando una temperatura de hibridación de 48°C. En un primer paso, empleando el oligonucleótido ECV266 en combinación con ECV139 (utilizado para la obtención de la deleción con el promotor completo), se amplificaron a partir de DNA genómico de la cepa Y1140, 683 pb correspondientes a la región del promotor que queda 3' respecto del sitio Hap2/3/4/5 (-667/-663) que fueron clonados en *Bam*HI-*Sal*I del vector pXW1. Se denominó a esta construcción pXW266/139. Seguidamente se realizó la segunda fase de amplificaciones por PCR empleando en este caso la combinación ECV138 y ECV265, dando lugar a un fragmento de 315 pb flanqueado por sitios de corte para *Bam*HI que fue clonado con posterioridad en la construcción pXW266/139. De este modo se sustituía el sitio Hap2/3/4/5p (-667/-663) por el sitio de corte de *Bam*HI, denominándose a esta construcción ΔA. La correcta disposición de los fragmentos clonados fue comprobada mediante PCR y secuenciación.

b) Obtención de la deleción interna ΔB

Se diseñaron los oligonucleótidos ECV268 y ECV267 (tabla 11). ECV268 está caracterizado por tener un sitio de corte para *Bam*HI en su extremo 5' y por hibridar en la hebra complementaria en la posición -396, a 6 nucleótidos en dirección 5' del sitio Hap2/3/4/5p (-389/-385). ECV267 se caracteriza por tener también un sitio de corte para *Bam*HI en su extremo 5' y por hibridar en la hebra molde en la posición -383, a 1 nucleótido en dirección 3' del sitio Hap2/3/4/5p (-389/-385).

También en este caso fueron necesarias dos fases de amplificación por PCR a partir de DNA genómico de *K. lactis*; en primer lugar con los oligonucleótidos ECV139/ECV267 se amplificó un fragmento de 406 pb pertenecientes a la región por

debajo del sitio Hap2/3/4/5 (-389/-385) que fue clonado en los sitios *Bam*HI y *Sal*I del vector pXW1 dando lugar a la construcción denominada pXW139/267. En la segunda fase se empleó la combinación ECV138/ECV268 dando un fragmento de 592 pb correspondientes a la región por encima del sitio Hap2/3/4/5p (-389/-385) flanqueado por dos sitios de corte para *Bam*HI que fue seguidamente clonado en el sitio *Bam*HI de la deleción pXW139/267. Se obtuvo de este modo la construcción Δ B. Al igual que en el caso de Δ A, se verificó la construcción mediante PCR y secuenciación.

c) Obtención de la deleción interna Δ AB

Se diseñó el oligonucleótido ECV294 (tabla 11) que hibrida en la posición -660 (igual que ECV266) y se caracteriza por tener en su región 5' dos sitios de corte: *Sal*I seguido de *Bgl*II (cuyos extremos son compatibles con los de una digestión con *Bam*HI). También en este caso el proceso de obtención de la construcción se dividió en dos fases.

En la primera etapa, se realizó una amplificación por PCR empleando como DNA molde la deleción Δ B (pues ya carece del sitio Hap2/3/4/5p de la posición -389) y la combinación de oligonucleótidos ECV139/ECV294. El fragmento de 678 pb de DNA obtenido fue clonado en el sitio *Sal*I del vector pXW1. Se comprobó la correcta disposición de las bases por secuenciación y se denominó a esta construcción pXW139/294. Luego, al igual que en el caso de la obtención de Δ A, se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de la cepa Y1140 y con la ayuda de los cebadores ECV138/ECV265, un fragmento de 315 pb flanqueados por sitios de corte para *Bam*HI que fue clonado en el sitio *Bgl*II de pXW139/294. Se denominó a esta construcción Δ AB y se comprobó su correcta orientación mediante PCR y también por secuenciación.

d) Obtención de la deleción interna Δ C

Se diseñó el oligonucleótido ECV275 (tabla 11) que hibrida en la posición -660 (igual que ECV266 y ECV294) caracterizado por tener en su región 5' los sitios de corte para *Sal*I y *Bam*HI. Igual que en el caso anterior, empleando como molde de PCR a Δ B se amplificaron 678 pb con los cebadores ECV139/ECV275 que fueron clonados en *Sal*I de pXW1 dando lugar a la construcción pXW139/275.

El siguiente paso consistió en la amplificación de la región del promotor de -988 a -667 con ECV138/ECV265 y posterior clonado en *Bam*HI de pXW139/275. Como ya se había introducido un sitio *Bam*HI en la construcción para sustituir al sitio Hap2/3/4/5p (-389/-385), tras la digestión enzimática, se eliminó la región que va desde -667 a -383. De este modo, la construcción ΔC obtenida se compone de la región -988 a -667 unida a la región que va desde -383 a +23. Esta disposición fue comprobada mediante secuenciación.

En la figura 40 se resumen las características de las distintas deleciones obtenidas fusionadas al gen reportero.

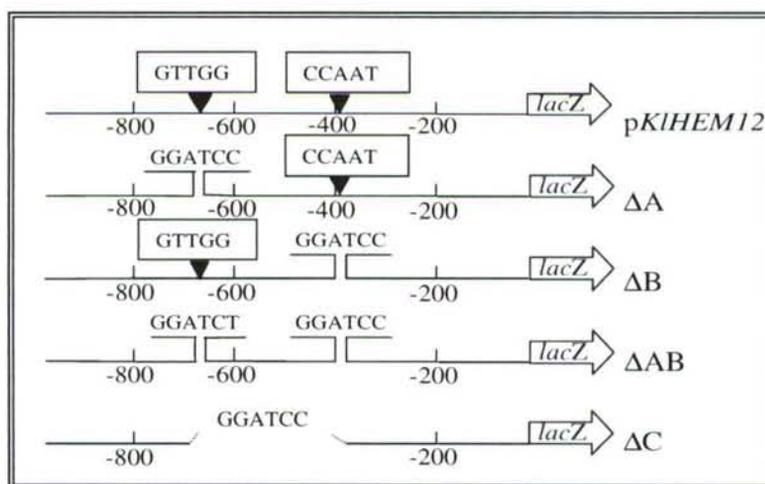


Figura 40. Esquema de las deleciones obtenidas para el estudio del promotor de *KIHEM12*.

Las medidas de actividad β -galactosidasa obtenidas en células de levadura MW190-9b, transformadas con las construcciones recogidas en la figura 40, revelaron que la deleción de las cajas CCAAT localizadas en -389/-385 y en -667/-663 disminuye la actividad del promotor en medios no fermentables (figura 41).

Es destacable el hecho de que cuando se compara el incremento de actividad enzimática experimentado por la deleción ΔA en un medio con etanol-glicerol 2% respecto al medio con glucosa 2% (1,89 veces), con el incremento experimentado por el promotor completo (1,87 veces), no se observan apenas diferencias lo que pondría de manifiesto que el consenso eliminado no es funcional. En cambio al realizar la misma comparación con la deleción ΔB (1,28 veces), si se observa, indicando que este segundo

consenso si es funcional. A estos datos hay que sumar el hecho de que este segundo sitio de unión presenta una secuencia exactamente coincidente con el consenso CCAAT mientras que la secuencia de las posiciones -663/-667 está degenerada respecto del consenso conservado.

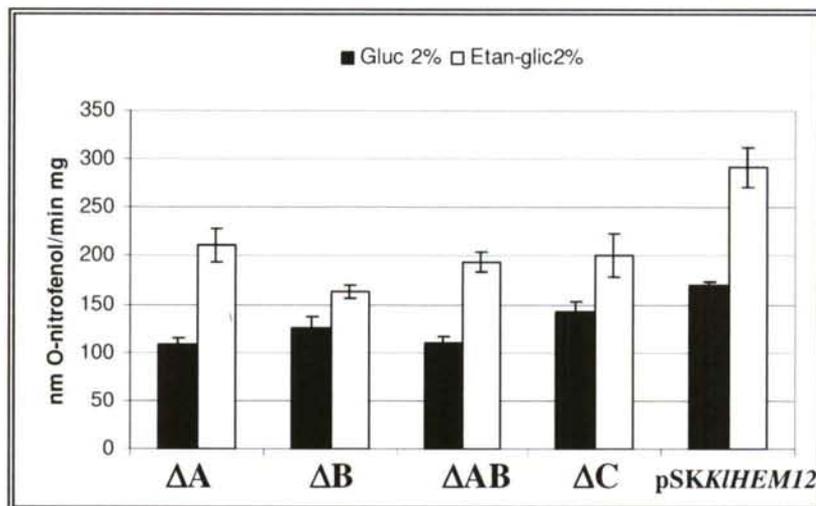


Figura 41. Efecto de las deleciones de las cajas CCAAT en la actividad del promotor de *KIHEM12* en diferentes medios de cultivo.

7.DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que el gen *KIHEM12* es único y funcional en *K. lactis*, ya que el alelo nulo obtenido presenta los fenotipos asociados a la mutación de este gen en otras levaduras, incapacidad de crecimiento en ausencia de hemo y acumulación de porfirinas.

La expresión transcripcional de *KIHEM12* es dependiente de cepa al igual que ocurre en *S. cerevisiae* (Zoladek *et al.*, 1995), correspondiendo el valor mayor a PM5-3C entre las cepas analizadas. Los datos obtenidos respecto a la regulación de este gen indican que no es un punto clave en la regulación de la biosíntesis de hemo. De hecho la transcripción de *KIHEM12* no responde a hemo ni existen en su promotor elementos reguladores que se ajusten a consensos típicos de factores fuertemente regulados por hemo como sería el caso de Hap1p o Rox1p (Hon *et al.*, 2003; Zhang & Hach, 1999). Los datos sobre la regulación del gen homólogo en la levadura *S. cerevisiae* son coincidentes con los resultados obtenidos (DiFlumeri *et al.*, 1993).

Un análisis del promotor mediante fusiones a *lacZ* muestra una ligera activación por fuentes de carbono no fermentables. Otro dato indirecto que señala que no se trata de un gen cuya transcripción pueda ser fuertemente inducida procede de la ausencia de consensos claramente definidos para las cajas TATA de unión a TBP. Efectivamente, recientemente se ha podido demostrar en *S. cerevisiae* por medio de un estudio genómico completo que existe una relación entre la presencia de consensos canónicos TATA en los promotores y el hecho de que se produzca inducción de la transcripción en respuesta a señales externas (Kim & Iyer, 2004).

El hecho de que la activación producida sobre la transcripción de *KIHEM12* en fuentes de carbono no fermentables no sea cuantitativamente muy notable se puede relacionar con el hecho de que en condiciones de suministro de oxígeno adecuado el metabolismo de *K. lactis* es predominantemente de tipo respiratorio (Gancedo & Serrano, 1989) con lo cual su adaptación para utilizar fuentes de carbono no fermentables no requiere grandes reajustes de su patrón de transcripción general. No obstante se decidió comprobar si la inducción observada era mediada por los elementos del promotor relacionados con el complejo regulador Hap2/3/4/5p. Los resultados obtenidos mediante fusiones del promotor al gen reportero *lacZ* y la introducción de deleciones específicas sí permiten confirmar que la caja CCAAT en la posición -389/-385 es funcional. Además también se ha podido comprobar que este efecto es funcional *in vivo* porque se produce una disminución de la transcripción de *KIHEM12* en un mutante *Klhap3*, lo que demuestra la implicación del complejo Hap2/3/4/5p en este sistema de regulación.

CAPÍTULO 3:
ESTUDIO DEL PROMOTOR DE
KIHEM1

1. INTRODUCCIÓN

El gen *KIHEMI*, que codifica para la primera enzima de la ruta de síntesis de hemo en *Kluyveromyces lactis*, fue clonado por González-Domínguez y colaboradores mediante complementación de una mutación *hemI* en *Saccharomyces cerevisiae*, mostrándose su alta homología con *ScHEMI* (González-Domínguez *et al.*, 1997). Se demostró que el gen está sometido a regulación transcripcional. Existe mayor expresión tras una inducción por cambios desde un medio con glucosa a glicerol y sus niveles de expresión disminuyen al pasar de condiciones hipóxicas a condiciones aerobias (figura 42) (González-Domínguez *et al.*, 1997). La adición de hemina a medios hipóxicos también disminuye la expresión del gen (González-Domínguez, 1999). Además, existe una regulación post-transcripcional durante el transporte de la proteína a la mitocondria, que es inhibido por hemo (González-Domínguez *et al.*, 2001).

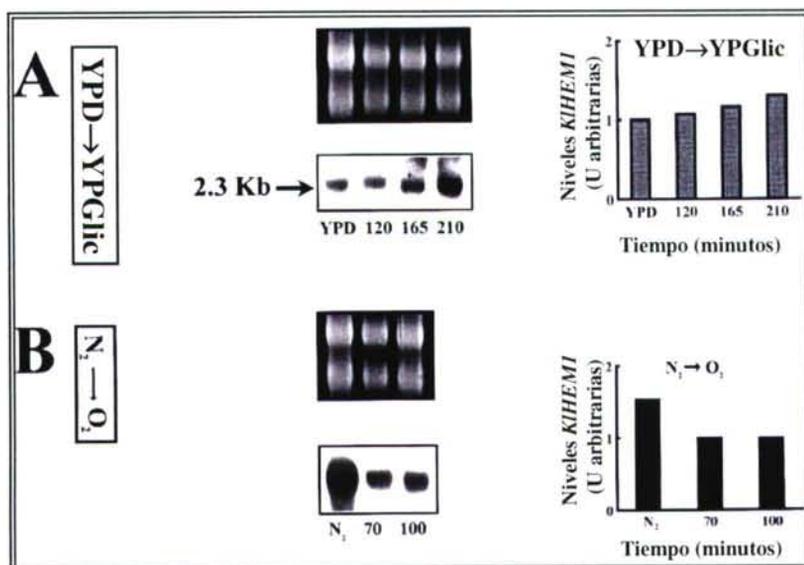


Figura 42. Regulación transcripcional de *KIHEMI* (reproducido de González-Domínguez *et al.*, 1997).

Existen diferencias significativas con respecto a la regulación de *HEMI* entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Mientras que la expresión de *ScHEMI* es constitutiva, en referencia a la disponibilidad de la fuente de carbono o los niveles de hemo (Keng & Guarente, 1987), en *K. lactis* la disponibilidad de oxígeno afecta a los niveles de *KIHEMI* y el gen se expresa más en condiciones de hipoxia que en condiciones de aerobiosis. El incremento de expresión observado en hipoxia podría ser interpretado

como un alivio de una represión en condiciones aeróbicas. En este modelo el producto final de la ruta de biosíntesis, hemo, podría ejercer un control por retro-alimentación en el primer paso de la ruta disminuyendo la transcripción de *KIHEM1* (González-Domínguez, 1999)

Aunque se conocía que la expresión del gen está regulada por los niveles de oxígeno y se había comprobado que dicha regulación dependía de los niveles de hemo (González-Domínguez, 1999), no se habían analizado los elementos reguladores del promotor que controlan la regulación por fuente de carbono y por la disponibilidad de oxígeno. Estos fueron por tanto los objetivos que se plantearon en este apartado de la Tesis.

2. ANÁLISIS *in silico* DEL PROMOTOR

Analizando la región promotora de *KIHEM1* con programas informáticos como el **MATCH** (www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/match.cgi) se obtienen una serie de secuencias que coinciden con consensos conservados para la unión de factores reguladores tanto activadores como represores (figura 43). Así se localiza por ejemplo un sitio de unión del complejo Hap2/3/4/5p entre las posiciones -656/-649 (caja CCAAT). Como ya se ha mencionado en el capítulo anterior al estudiar la regulación transcripcional de *KIHEM12*, en *S. cerevisiae* este complejo activa la transcripción de varios genes cuando la levadura crece en un medio con una fuente de carbono no fermentable (Olesen *et al.*, 1987). Entre las posiciones -475/-460 se encuentra un supuesto sitio de unión para el factor regulador Gcr1p. Como también ha sido comentado anteriormente, Gcr1p activa la expresión de genes de enzimas glicolíticas y reprime la de genes relacionados con la respiración (Huie & Baker, 1996; Sasaki & Uemura, 2005). También aparece un elemento rico en pirimidinas entre los nucleótidos -412 y -378, que es un potente activador transcripcional de muchos genes de levaduras (McNeil, 1988) como por ejemplo *CYC1*, *SUC2*, *PGK*, *GALI*, *ADR2*, *CAR1* y *PYK*. Se propuso que este elemento rico en pirimidinas, en el promotor de *CYC1*, actúa limitando la acumulación de RNA mensajeros con extremos 5' localizados en la región *upstream* de la secuencia rica en pirimidinas.

Aparecen también varios consensos para la unión de represores, entre ellos, en las posiciones -539/-536, se localiza un sitio de unión de Mig1p, importante en la represión por glucosa de muchos genes de *S. cerevisiae* como *GALA* (Griggs &

Johnston, 1991), *FBP1*, *SUC2* (Mercado *et al.*, 1991), *BYPI* (Hohmann *et al.*, 1992). Mig1p también ha sido caracterizado en *K. lactis* (Cassart *et al.*, 1995). Entre las posiciones -530/-525 se localiza un sitio de unión para Ino2p, que en *S. cerevisiae* es un factor transcripcional regulador de los genes relacionados con el metabolismo de los fosfolípidos (Koipally *et al.*, 1996). En -515/-505 se localiza un sitio de unión para el represor Buf1p (Luche *et al.*, 1992). Posteriormente se ha probado que la proteína Buf1p, además de unirse a los sitios de represión transcripcional 5', también es capaz de actuar como activador transcripcional tal y como sucede cuando se une a secuencias del promotor del gen *CARI* (arginasa) (Luche *et al.*, 1993). En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la represión por Buf1p es mucho menor si la levadura crece en concentraciones bajas de glucosa y que desaparece cuando se emplea galactosa como fuente de carbono (Treitel & Carlson, 1995).

También se observa un consenso para el regulador Hap1p en la posición -358/-344 y tres consensos para el represor Rox1p en las posiciones -752/-741, -702/-691 y en -664/-553. Hap1p es por definición una proteína de respuesta a los niveles de hemo, activando genes necesarios para la respiración y controlando el daño oxidativo en la célula (Zitomer & Lowry, 1992). Rox1p es necesaria para la represión de genes hipóxicos en aerobiosis (Lowry & Zitomer, 1988).

Se observa también una secuencia consenso para la unión de TBP en las posiciones -239/-234 y otra en posiciones -81/-76.

Este análisis *in silico* sirvió de punto de partida para planificar los experimentos que demostrasen la funcionalidad de algunos de los elementos identificados como potencialmente reguladores: Hap2/3/4/5p, Mig1p, Buf1p, Gcr1p y elemento rico en pirimidinas; sobre todo de aquellos que se relacionaban con la regulación transcripcional de *KIHEMI* previamente caracterizada de forma experimental mediante *northern blot* en respuesta a la fuente de carbono y los niveles de oxígeno disponibles.

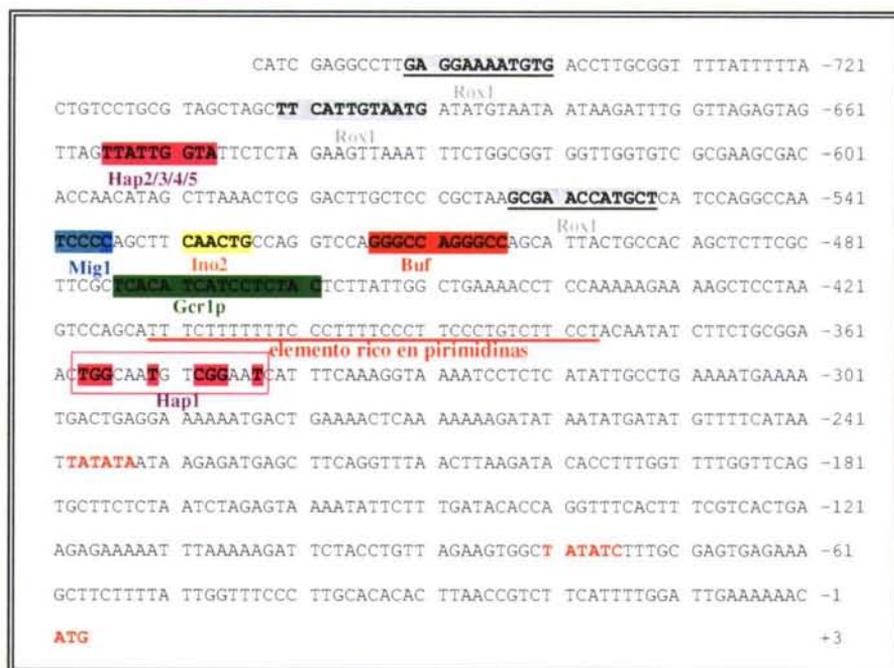
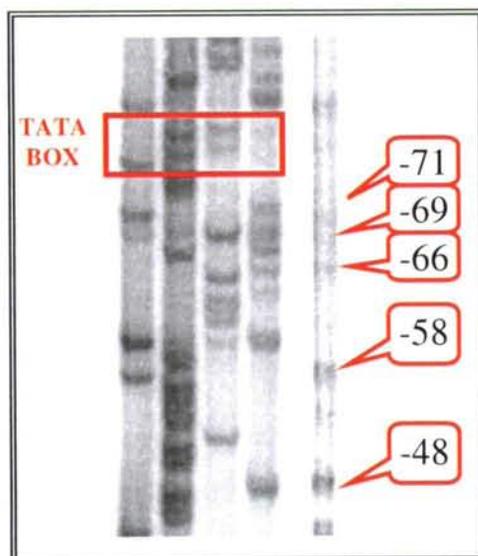


Figura 43. Promotor de *KIHEMI* con los consensos localizados mediante el programa MATCH para varios factores de regulación transcripcional. Tanto las cajas TATA localizadas como el codón de inicio (ATG) aparecen en color rojo.

3.DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE *KIHEMI* MEDIANTE *primer extension*

A fin de conocer con exactitud los puntos de inicio de la transcripción y tener una información sobre la estructura del promotor mínimo que permitiese identificar regiones reguladoras mediante análisis de delección se aplicó la metodología de *primer extension* (materiales y métodos).

Para la realización del experimento se diseñó el oligonucleótido ECV299 (GCCTTGACACTCTGCATTGATCCA) que hibrida en la posición +80 (considerando posición +1 la adenina del ATG). Este oligonucleótido fue empleado paralelamente en una reacción de síntesis de DNA a partir de RNAm y en una reacción de secuenciación tomando como DNA molde la construcción pSKKIHEMI (ver materiales y métodos).



AAATTATCTG	ACGGGAAATT	ACCAAGAGCA	GAGTATGCAT	TAGCAITTTA	CTTGGAGAAA	-841
GGCCTTGGAT	GTCAGCCAAA	CATACAAGAG	GCCAAGGTAC	ACCACGAAAC	TGCTGCTCGT	-781
CTTGGCCATC	CGAAAGCCAT	CGAGGCCTTG	AGGAAAATGT	GACCTTGGCG	TTTTATTTTT	-721
ACTGTCCTGC	GTAGCTAGCT	TCATTGTAAT	GATATGTAAT	AATAAGATTT	GGTTAGAGTA	-661
GTTAGTTATT	GGTATTCTCT	AGAAGTTAAA	TTTCTGGCGG	TGGTTGGTGT	CGCGAAGCGA	-601
CACCACATAG	CTTAAACTCG	GACTTGTCTC	CGCTAAGCGA	ACCATGCTCA	TCCAGGCCAA	-541
TCCCCAGCIT	CAACTGCCAG	GTCCAGGGCC	AGGGCCAGCA	TTACTGCCAC	AGCTCTTCGC	-481
TTGCTCACA	TCATCCICTA	CTCITTATTGG	CTGAAAACCT	CCAAAAAGAA	AAGCTCCTAA	-421
GTCCAGCAIT	TCITTTTTTC	CCITTTCCCT	TCCCIGTCTT	CCTACAATAT	CTTCGCGGA	-361
ACTGGCAATG	TCCGAATCAT	TTCAAAGGTA	AAATCCTCTC	ATATTGCTTG	AAATGAAAA	-301
TGACTGAGGA	AAAAATGACT	GAAAAC TCA	AAAAAGATAT	AATATGATAT	GTITTCATAA	-241
TTATATA TATA	AGAGATGAGC	TTCAGGTTTA	ACITTAAGATA	CACCTTGGT	TTTGGTTCAG	-181
TGCTTCTCTA	ATCTAGAGTA	AAATATTCTT	TGATACACCA	GGTTTCACTT	TCGTCACTGA	-121
AGAGAAAAAT	TTAAAAAGAT	TCTACCTGTT	AGAAGTGGCT	ATATC TTTGC	GAGT GAGAAA	-61
GCTTCTTTTA	TTGTTTCC	TTGCACACAC	TTAACCGTCT	TCATTTTGGTA	TTGAAAAAAC	-1
ATG						+3

Figura 44. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción del gen *KIHEM1*. Las cuatro primeras líneas muestran los resultados de la secuenciación del gen *KIHEM1* en el orden G A T C. La quinta línea muestra los resultados del experimento de *primer extensión*, indicando para cada caso la posición ocupada en la secuencia del promotor, donde parecen remarcadas en rojo y señalizadas con una flecha aquellas de mayor intensidad; las de menor intensidad están señalizadas con un punto.

Como es característico de muchos genes de levaduras (Healy & Zitomer, 1990) existe una multiplicidad de sitios de inicio de la transcripción para *KIHEM1* (figura 44). Los puntos de inicio se han localizado en las posiciones -71, -69, -66, -58 y -48, aunque la posición -48 parece preferente al analizar la intensidad relativa. De esta manera, la caja TATA funcional parece ser la de las posiciones -239/-234.

4. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE FUSIONES DEL PROMOTOR AL GEN REPORTERO *lacZ*

Se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar el promotor completo y los primeros codones de *KIHEMI* y posteriormente fusionar esta secuencia *in frame* al octavo codón de *lacZ* en el plásmido pXW1 (Chen *et al.*, 1992). El oligonucleótido ECV51 (GGGGTCGACTTGGCAGAAGAACGAATAACAGA) hibrida en la posición +29 de la hebra de Crick respecto del ATG y está dirigido hacia el promotor, además tiene un sitio de corte para *SalI* (resaltado en negrita) en posición 5'. El oligonucleótido ECV52 (GGGGGATCCGACGGGAAATTACCAAGAGCA) hibrida en la posición -892 y se caracteriza por tener un sitio de corte para *BamHI* (resaltado en negrita) en el extremo 5'.

Combinando ECV51 y ECV52 en una reacción de PCR a una temperatura de hibridación de 50°C, y utilizando como molde el DNA del plásmido pMD5.5 que contiene el clon de *KIHEMI* (González-Domínguez *et al.*, 1997), se amplificó un fragmento de 921 pb que consideramos como el promotor de *KIHEMI* completo. El fragmento fue inicialmente clonado en el vector comercial pGEM[®]-TEasy con extremos compatibles *A/T* y finalmente digerido con *BamHI-SalI* y clonado en los mismos sitios *BamHI-SalI* del vector pXW1 (Chen *et al.*, 1992). Se caracteriza por contener todos los supuestos sitios de regulación localizados en el promotor: Hap2/3/4/5p, Mig1p, Ino2p, Bui1p, Gcr1p, elemento rico en pirimidinas y TATA. Se denominó a esta construcción pXW5251 y se empleó para transformar la cepa MW190-9b mediante el método del acetato de litio (materiales y métodos) tras lo cual se seleccionaron los candidatos en placas CM-Ura.

En una primera aproximación, se realizaron una serie de medidas en distintas fuentes de carbono: glucosa 2%, glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%, emulando el experimento realizado por González-Domínguez en 1997 mediante *northern blot*. Para ello se tomaron seis candidatos transformados con pXW5251 y se hizo un cultivo conjunto en medio CM-Ura con glucosa al 2% como fuente de carbono. Este cultivo se empleó como pre-inóculo, se dejó crecer a 30°C durante una noche para al día siguiente inocular de nuevo 4 matraces con 100 mL de CM-Ura glucosa al 2% a una OD final medida a 600 nm de 0,4. Se mantuvieron los cultivos durante 2-3 horas en las mismas condiciones, hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de 0,8. En este momento se precipitaron

las células de levadura y se resuspendieron en 100 mL de medio de cultivo nuevo. Uno de los cultivos se resuspendió en CM-Ura glucosa 2%; otro en CM-Ura glucosa 0,5% y otro en CM-Ura etanol-glicerol 2%. Se mantuvieron los cultivos en las mismas condiciones de temperatura y se tomaron muestras a las 2, 5 y 7 horas para realizar medidas de actividad beta-galactosidasa. Las muestras de 10 mL de cultivo se tomaron por duplicado. Las medidas de actividades enzimáticas se realizaron por el método de permeabilización de células (materiales y métodos), y los resultados obtenidos se representan en la figura 45.

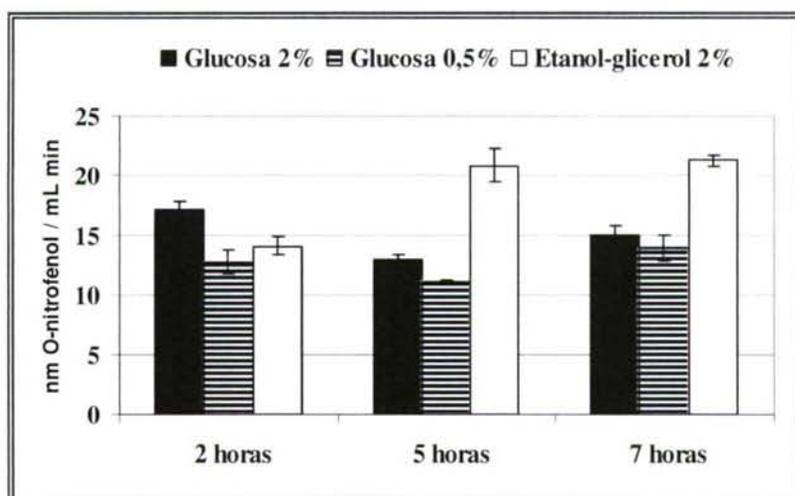


Figura 45. Actividades enzimáticas correspondientes al promotor completo de *KIHEMI* realizadas tras un cultivo durante 2, 5 y 7 horas en 3 fuentes de carbono distintas (glucosa 2%, glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%).

No se observan diferencias destacables entre la expresión medida en las tres fuentes de carbono en la primera muestra (2 horas), los valores de actividad enzimática son prácticamente iguales en los 3 medios. A las cinco horas comienza a verse una ligera inducción por glicerol que se mantiene sin variaciones hasta las siete horas. Este resultado coincide con lo observado a nivel transcripcional (figura 42) por González-Domínguez (1997). Los resultados obtenidos parecen indicar que no hay represión por glucosa, aunque sí existe una inducción por fuente de carbono no fermentable. De todas formas, la inducción es pequeña.

4.1. Análisis de elementos reguladores del promotor mediante deleciones seriadas del promotor de *KIHEMI* fusionado al gen reportero *lacZ*

En una primera aproximación al estudio de secuencias reguladoras del promotor que permitiesen explicar los patrones de regulación encontrados, se diseñaron una serie de deleciones seriadas del promotor que se fusionaron al gen reportero *lacZ* para medir su actividad en células de *K. lactis* transformadas con las construcciones reporteras en distintas condiciones de cultivo.

Se diseñaron unos oligonucleótidos (tabla 12) específicos para amplificar sucesivas deleciones seriadas comenzando desde el extremo 5' y avanzando hasta zonas más próximas el codón de inicio ATG.

Tabla 12. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de las deleciones seriadas del promotor de *KIHEMI*. El sitio de reconocimiento de *Bam*HI aparece resaltado en negrita. La temperatura de hibridación seleccionada fue de 50°C.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV53	GGGGGATCCCATCGAGGCCTTGAGGAAAA	Watson	-764
ECV54	GGGGGATCCCATGCTCATCCAGGCCAAT	Watson	-558
ECV55	GGGGGATCCCTCCAAAAAGAAAAGCTCCTAAG	Watson	-443
ECV56	GGGGGATCCCTCTCATATTGCCTGAAAATGA	Watson	-326
ECV57	GGGGGATCCGGTTCAGTGCTTCTCTAATCTAGAGT	Watson	-187

Para la obtención de estas construcciones se siguió la misma estrategia que la descrita en la fusión del promotor entero a la secuencia de *lacZ* en el vector pXW1. También en este caso se realizó un paso intermedio clonando primero los productos de PCR en pGEM[®]-TEasy (figura 46) y pasando después las construcciones al vector reportero pXW1 mediante una digestión con *Bam*HI-*Sall*.

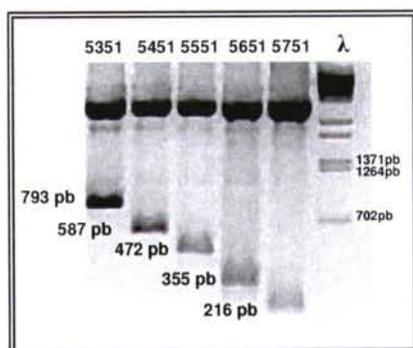


Figura 46. Comprobación mediante digestión con *Bam*HI-*Sall* de la clonación de cada una de las deleciones diseñadas en el vector comercial pGEM[®]-TEasy.

En la siguiente tabla (tabla 13) se recogen las combinaciones de oligonucleótidos empleadas para cada reacción de amplificación, las posiciones de cada uno, los consensos que contienen y los tamaños finales resultantes.

Tabla 13. Resumen de los oligonucleótidos empleados para la creación de las deleciones seriadas para el estudio del promotor de *KIHEMI*.

Delección	Cebadores empleados	Posiciones	Consenso que contiene	Tamaño amplificado
pXW5351	ECV53 ECV51	-764 +29	Hap2/3/4/5/; Mig1; Buf1; Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA	793 pb
pXW5451	ECV54 ECV51	-558 +29	Mig1; Buf1; Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA	587 pb
pXW5551	ECV55 ECV51	-443 +29	Elemento rico en pirimidinas; TATA	472 pb
pXW5651	ECV56 ECV51	-326 +29	TATA	355 pb
pXW5751	ECV57 ECV51	-187 +29	TATA	216 pb

En la figura 47 se recoge el esquema de estas construcciones y se muestran las posiciones de los posibles elementos reguladores, encontrados mediante el análisis *in silico*, resaltando cuales se conservan en cada una de las deleciones.

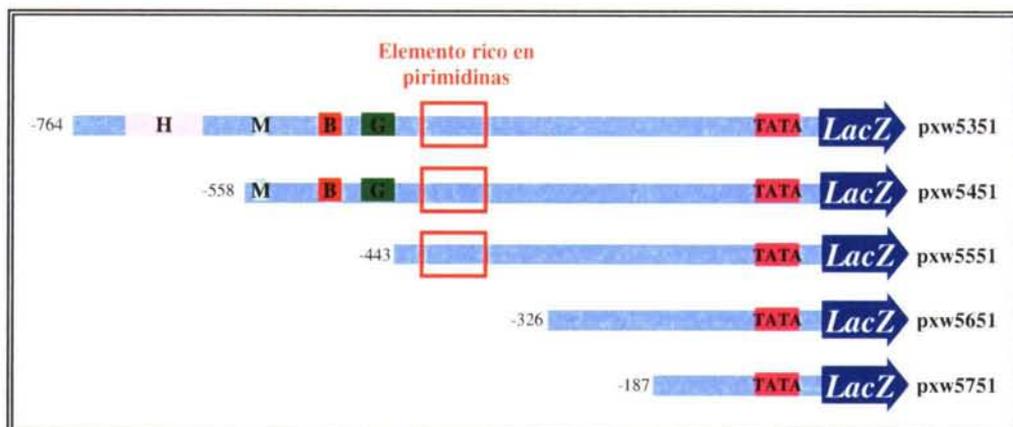


Figura 47. Esquema de las deleciones seriadas diseñadas para el promotor de *KIHEMI* que se encuentran fusionadas al gen *lacZ* del vector pXW1. Las letras H, M, B y G representan respectivamente a los consensos localizados para el complejo Hap2/3/4/5p, Mig1p, Buf1p y Ger1p.

Todas las deleciones obtenidas fueron comprobadas mediante análisis de restricción en el caso del vector pGEM[®]-TEasy, y mediante secuenciación con el oligonucleótido 70LacZ (materiales y métodos).

4.2. Actividad de las deleciones seriadas del promotor de *KIHEMI* en condiciones aerobias y con diferentes fuentes de carbono

Tras la obtención de las deleciones descritas se llevó a cabo la transformación de la cepa MW190-9b de *K. lactis*. Los transformantes se seleccionaron en medio CM-Ura y se inocularon en medios de cultivo CM-Ura glucosa 0,5% y CM-Ura etanol-glicerol 2% (metabolismo respiratorio). Las medidas de actividad beta-galactosidasa se realizaron empleando el método de células permeabilizadas (materiales y métodos) utilizando seis transformantes independientes de cada una de las construcciones. Los resultados de ese estudio se muestran en la figura 48.

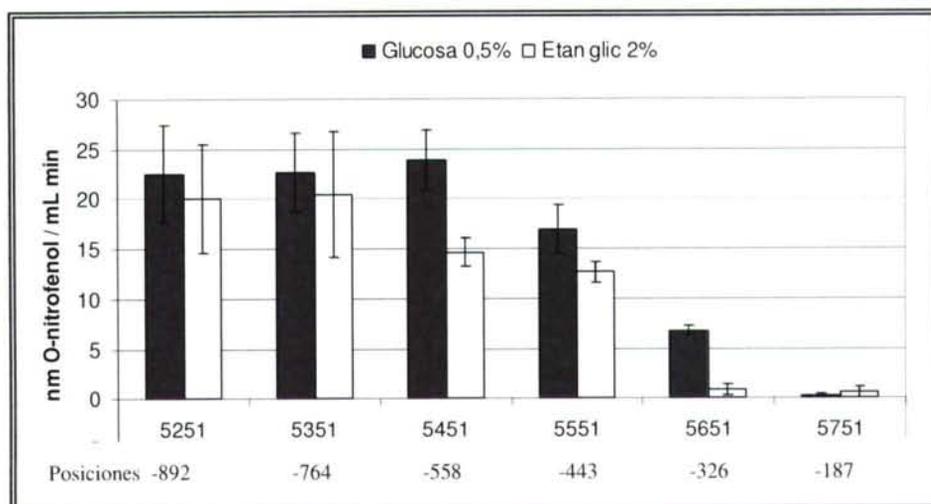


Figura 48. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por las deleciones seriadas del promotor de *KIHEMI* medidas en dos fuentes de carbono: glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%.

Cuando se analizan los resultados obtenidos para el promotor pXW5251 y las deleciones seriadas, pXW5351, pXW5451, pXW5551, pXW5651 y pXW5751, pueden sacarse algunas conclusiones. La primera de ellas es que no existen diferencias significativas entre las construcciones pXW5251 y pXW5351, por lo que la región que se extiende desde -892 a -764 no parece tener un papel relevante en la expresión del gen. En general, a medida que va disminuyendo el tamaño del promotor se va perdiendo expresión del gen pero sin que se observe una clara dependencia respecto de la fuente de carbono. En la deleción pXW5751, a penas se observa actividad. Podemos suponer que la secuencia comprendida entre las posiciones -764 a -187 contiene varios elementos que potencian la transcripción del gen y actúan de forma aditiva. El sistema de deleciones seriadas no resulta generalmente útil para localizar regiones represoras porque en el proceso seriado de eliminación se pueden estar eliminando regiones activadoras y represoras simultáneamente lo que enmascara los efectos observados.

4.3. Determinación de la funcionalidad del sitio de reconocimiento para el complejo Hap2/3/4/5p en relación con la regulación por fuente de carbono

El complejo Hap2/3/4/5p ha sido relacionado en *S. cerevisiae* con la inducción de genes en medios no fermentables. Hap4p está regulado a nivel transcripcional y se induce de 5-10 veces durante la adaptación de condiciones de metabolismo fermentativo a respirativo (Forsburg & Guarente, 1989; DeRisi *et al.*, 1997). Se ha demostrado la existencia de homólogos funcionales de Hap4p y de otros componentes del complejo en *K. lactis* (Bourgarel *et al.*, 1999; Mulder *et al.*, 1994a; Nguyen *et al.*, 1995).

Los datos obtenidos en un *shift* de condiciones de crecimiento en glucosa al 2% a condiciones de crecimiento en etanol-glicerol 2%, utilizando la técnica de *northern blot* (ver figura 42) y la fusión del promotor entero a *lacZ* (ver figura 45), mostraron que este gen puede ser inducido ligeramente en etanol-glicerol. Se decidió realizar varias construcciones específicas para analizar la funcionalidad del consenso para Hap2/3/4/5p utilizando las fusiones al gen reportero *lacZ*. Se diseñaron las construcciones D3 que incluye la región promotora desde la posición -656, D4 coincidente en tamaño con la anterior pero en la que se ha mutado el consenso para la unión Hap2/3/4/5p y Q1 en la que una región extensa, -764 a -588, que incluye el consenso Hap2/3/4/5p se fusionó a la construcción pXW5651.

Tabla 14. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de las delecciones D3, D4 y Q1. Los sitios de corte para *Bam*HI y *Sall* aparecen resaltados en negrita.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV51	GGGG TGACT TTGGCAGAAGAACGAATAACAGA	Crick	+29
ECV53	GGGG GATCCC ATCGAGGCCCTTGAGGAAAA	Watson	-764
ECV56	GGGG GATCCC CTCTCATATTGCCTGAAAATGA	Watson	-326
ECV147	GGGG GATCC AGCTATGTTGGTGTGCGCTTCG	Crick	-588
ECV297	GGGG GATCC TTAAAAATATTCTCTAGAAGTTAAATTTCTGG	Watson	-656
ECV298	GGGG GATCC TATTGGTATTCTCTAGAATGTAATTTCTG	Watson	-656

Las delecciones D3 y D4 se obtuvieron por PCR siguiendo la misma estrategia descrita para la obtención de la fusión del promotor y con los oligonucleótidos que se recogen en la tabla 14. El oligonucleótido ECV297 fue precisamente diseñado para reemplazar el consenso TTATTGGTA de unión a Hap2/3/4/5p por la secuencia TTAAAAATA (los nucleótidos modificados aparecen subrayados).

La construcción Q1 se realizó como se describe a continuación. Se diseñó el oligonucleótido ECV147 (corte para *Bam*HI en posición 5´) que hibrida en posición -609/-588, a 38 nucleótidos 5´ del sitio Hap2/3/4/5p. Combinándolo con ECV53 (corte para *Bam*HI), se amplificaron 189 nucleótidos que contenían el citado sitio de unión. Tras una digestión enzimática del fragmento amplificado empleando *Bam*HI, se digirió del mismo modo la deleción p5651, clonando el fragmento amplificado en dicha construcción. En la tabla 15 se muestra un resumen de los dominios que contienen las deleciones diseñadas.

Tabla 15. Resumen de los oligonucleótidos empleados para la construcción de las deleciones D3, D4 y Q1. Se indican las posiciones ocupadas por cada uno de ellos y los consensos que contiene finalmente la deleción.

Deleción	Cebadores empleados	Posiciones	Consenso que contiene	Tamaño amplificado
D3	ECV298 ECV51	-656 +29	Hap2/3/4/5/; Mig1; Buf1; Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA	679 pb
D4	ECV297 ECV51	-656 +29	Δ Hap2/3/4/5/; Mig1; Buf1; Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA	679 pb
Q1	ECV53 ECV147 ECV56 ECV51	-764 -609 -326 +29	Hap2/3/4/5/; TATA	-

Las construcciones fueron verificadas por análisis de restricción y secuenciación y se representan gráficamente en el esquema de la figura 49 junto con las construcciones pXW5351 y pXW5651 con la que fueron comparadas.



Figura 49. Esquema de las delecciones pXW5351, pXW5651, D3, D4 y Q1. Las letras H, M, B y G representan los consensos localizados para el complejo Hap2/3/4/5p, Mig1p, Bui1p y Gcr1p. La caja roja representa al elemento rico en pirimidinas. La línea delgada indica una delección.

En la figura 50 se recogen los valores de las medidas de actividad beta-galactosidasa en glucosa al 2% y las medidas efectuadas tras inducción en medio con etanol glicerol a distintos tiempos.

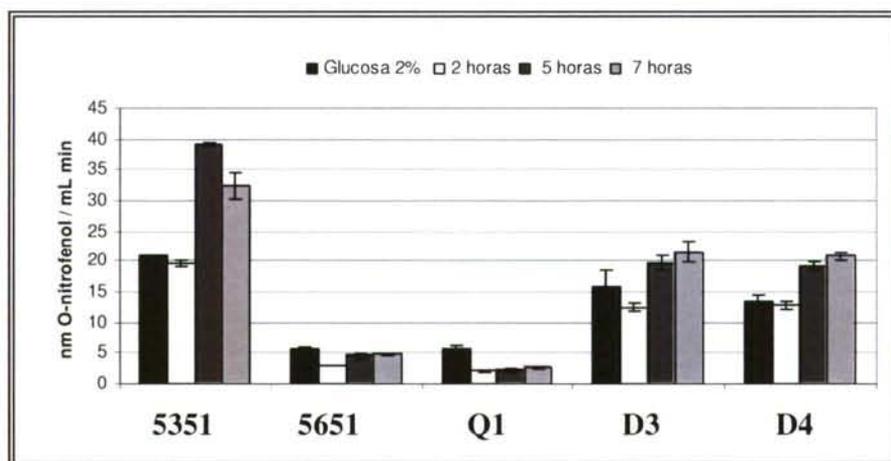


Figura 50. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por las delecciones diseñadas para el promotor de *KIHEMI* para analizar el consenso para Hap2/3/4/5p. Las medidas se realizaron tras una inducción desde glucosa 2% a etanol-glicerol 2% en tres tiempos: 2, 5 y 7 horas.

La construcción Q1 que contiene únicamente el consenso para la unión de Hap2/3/4/5p no es inducida en etanol-glicerol al 2%. La mutación del consenso en un contexto de promotor más cercano a la situación *in vivo*, y en el que otros elementos

reguladores se encuentran también presentes tampoco tiene efecto, como puede verse al comparar D3 y D4. Todo esto nos hace descartar el papel funcional del consenso encontrado en el análisis *in silico* del promotor, que por otra parte se encontraba presente en la hebra complementaria a la codificadora.

4.4.El elemento rico en pirimidinas es un elemento *cis* de activación transcripcional de *KIHEM1*.

Algunos genes de *S. cerevisiae* y *K. lactis* contienen en sus promotores elementos ricos en pirimidinas que activan la transcripción (McNeil, 1988; Ramil *et al.*, 1998). Para comprobar si éste era el caso de *KIHEM1*, se procedió a un estudio comparado de las deleciones pXW5551 y pXW5651 que se diferencian por la presencia en la primera construcción del elemento rico en pirimidinas (figura 51).

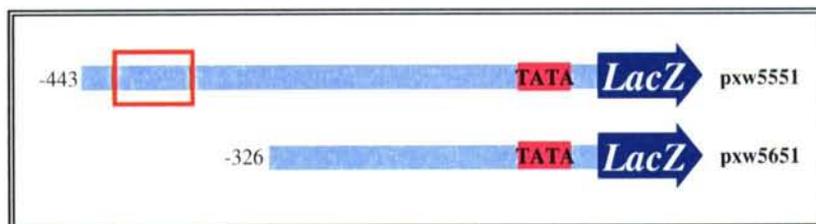


Figura 51. Esquema de las deleciones pXW5551 y pXW5651.

En la figura 52 se muestran los resultados obtenidos al comparar los valores de actividad beta-galactosidasa medidos en células de *K. lactis* transformadas con las construcciones pXW5651 y pXW5551 en fuentes de carbono (glucosa al 0,5% o etanol-glicerol al 2% que favorecen el metabolismo respiratorio).

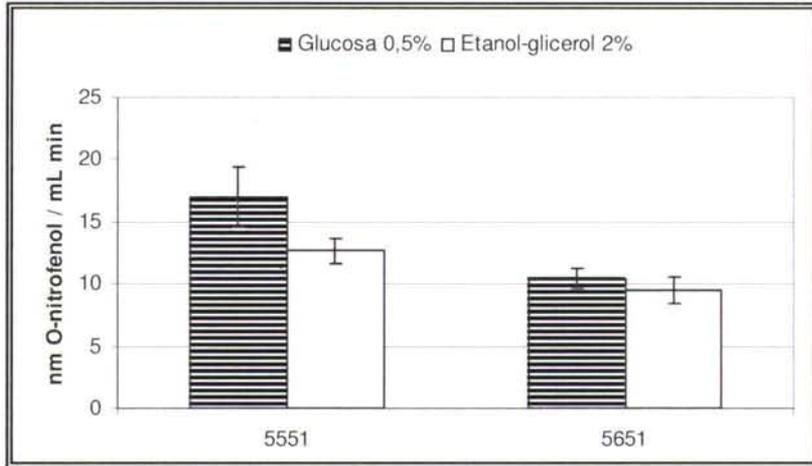


Figura 52. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por las deleciones diseñadas para el promotor de *KIHEMI* para analizar el consenso para Gcr1p. Las medidas se realizaron en dos fuentes de carbono: glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%.

De los resultados obtenidos (figura 52) se deduce que en la construcción pXW5551 el elemento rico en pirimidinas incrementa los valores de expresión, menores en la construcción pXW5651 que no contiene dicho elemento.

4.5.Determinación de la funcionalidad del sitio de reconocimiento para Gcr1p en relación con la regulación por fuente de carbono.

En *S. cerevisiae* un complejo de factores transcripcionales formado por Gcr1p, Gcr2p y Rap1p coordina la expresión de los genes necesarios para la vía glucolítica (Sasaki & Uemura, 2005; Willis *et al.*, 2003) y la mutación de Gcr1p o Gcr2p produce un incremento de la expresión de los genes relacionados con la respiración (Sasaki & Uemura, 2005) indicando que estos factores pueden estar controlando los flujos metabólicos relativos de metabolismo fermentativo (MF) y metabolismo respiratorio (MR).

Puesto que en levaduras la biosíntesis de hemo es necesaria tanto en condiciones aerobias (MR) o hipóxicas (MF), pero de manera más importante durante el MR para actuar como coenzima de las proteínas mitocondriales que participan en la respiración, se decidió comprobar si el sitio Gcr1p localizado en la búsqueda *in silico* del promotor era o no funcional. Se decidió abordar el estudio de Gcr1p posicionado en -475/-460.

Con este objetivo se diseñaron las construcciones D1 y D2 para compararlas con la delección Q3. Se emplearon los oligonucleótidos de la tabla 16.

Tabla 16. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de las delecciones D1 y D2. Los sitios de corte para *Bam*HI y para *Sal*I aparecen resaltados en negrita. Los nucleótidos modificados aparecen subrayados.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV51	GGGG TCGACT TTGGCAGAAGAACGAATAACAGA	Crick	+29
ECV56	GGGG GATCC CTCTCATATTGCCTGAAAATGA	Watson	-326
ECV149	GGGG GATCC ATTACTGCCACAGCTCTT	Watson	-501
ECV150	GGGG GATCC TCCGACATTGCCAGTTCC	Crick	-346
ECV269	GGGG GATCC ATTACTGCCACAGCTTTCGCTTCGCTCACAT AC AAATCTAC	Watson	-501

Para obtener la construcción Q3 se diseñaron los cebadores ECV149 (con sitio de corte para *Bam*HI) que hibrida en la posición -501/-484 y ECV150 (corte para *Bam*HI) que lo hace en -363/-346, amplificando una región de 168 nucleótidos que contiene el sitio *Ger*Ip y el elemento rico en pirimidinas (tabla 16).

Tras una digestión con *Bam*HI, se clonó en el sitio *Bam*HI de pXW5651. Se obtuvo así Q3 que contiene las regiones del promotor que van desde -501 a -346 y -326 a +26 (tabla 17).

La construcción fue verificada por análisis de restricción y secuenciación y sus características pueden verse en el esquema de la figura 53.

La obtención de D1 se realizó mediante el diseño del oligonucleótido ECV149 (con sitio de corte para *Bam*HI) que hibrida en la posición -501/-484 amplificando, en combinación con ECV51, una región de DNA de 524 pb del promotor que contiene los sitios reguladores: *Ger*Ip, elemento rico en pirimidinas y TATA funcional. D2 es similar a D1, pero con la peculiaridad de que el sitio *Ger*Ip se encuentra mutado. Para ello, se modificó su secuencia original CATCC a ACAA mediante el diseño del cebador ECV269 (también con sitio de corte para *Bam*HI) que hibrida en la misma posición de ECV149: -501/-484. En la tabla 17 aparece un resumen de los dominios contenidos por cada delección.

Tabla 17. Oligonucleótidos empleados para la construcción de las deleciones D1 y D2. Se indican las posiciones ocupadas por cada uno de ellos y los consensos que contiene finalmente cada deleción.

Deleción	Primers empleados	Posiciones	Consensos que contiene	Tamaño amplificado
D1	ECV149 ECV51	-501 +29	Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA	524 pb
D2	ECV269 ECV51	-501 +29	Elemento rico en pirimidinas; TATA	524 pb
Q3	ECV149 ECV150 ECV56 ECV51	-501 -363 -326 +29	Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA	-

Ambos fragmentos se clonaron en pXW1 con una digestión *Bam*HI-*Sal*I. Las construcciones fueron verificadas por análisis de restricción y secuenciación y sus características pueden verse en el esquema de la figura 53.

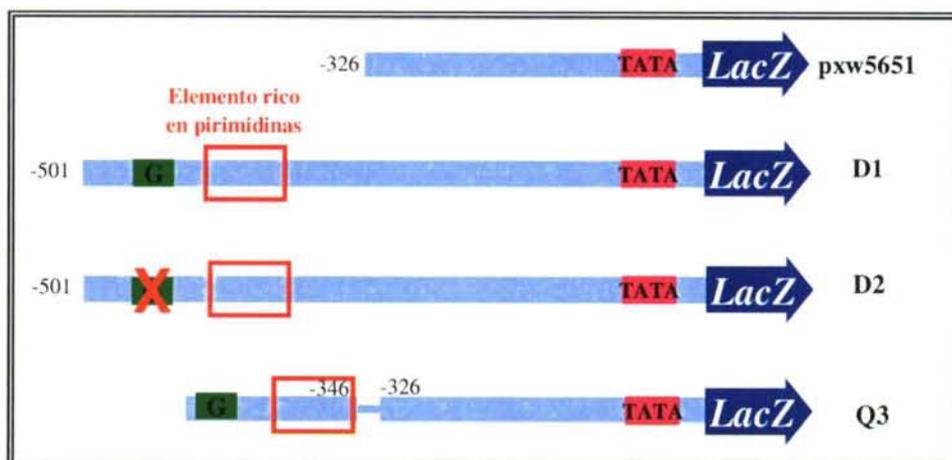


Figura 53. Esquema de las deleciones pXW5651, D1, D2 y Q3.

En la figura 54 se recogen los valores de las medidas de actividad beta-galactosidasa efectuados en transformantes de la cepa MW190-9b con las citadas construcciones en medios con glucosa al 2% y al 0,5%.

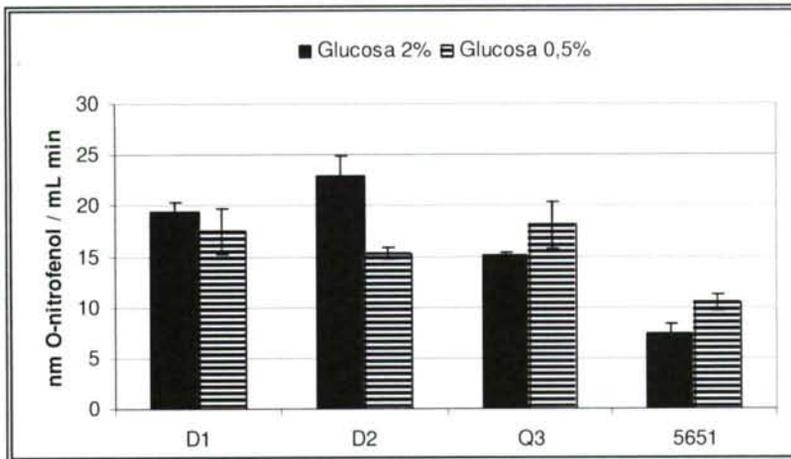


Figura 54. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por las deleciones diseñadas para el promotor de *KIHEM1* para analizar el consenso para Ger1p. Las medidas se realizaron en dos fuentes de carbono: glucosa 2% y glucosa 0,5%.

Se observa como la mutación del sitio de Ger1p produce un incremento de la expresión en medios con glucosa al 2%. Sasaki y Uemura (2005) probaron que una mutación *gcr1* provocaba un descenso en la expresión de genes relacionados con la glucólisis y a la vez un aumento de los genes relacionados con la respiración cuando las células crecen en medio rico en glucosa. Ya que *KIHEM1* se encuentra dentro de este último grupo de genes relacionados con la respiración, los resultados obtenidos (mayor expresión en el mutante en glucosa al 2% que al 0,5%) permiten asignar un cierto papel funcional al sitio Ger1p sobre la represión relacionada con la respiración de *KIHEM1* cuando existe una glucólisis muy activa.

4.6. Análisis de la funcionalidad del sitio de reconocimiento de Buf1p en la regulación del promotor de *KIHEM1* en condiciones aerobias

En *S. cerevisiae* está descrito que *ScHEM1* presenta una expresión constitutiva, debido a la combinación antagónica de factores activadores y represores (Keng & Guarente, 1987). Teniendo en cuenta que el factor que se comporta como represor es Buf1p, se decidió analizar si el sitio de reconocimiento para Buf1p presente en el promotor de *KIHEM1* era funcional

Estudio del promotor de *KIHEMI*

Para realizar este análisis se diseñaron las construcciones Q2, Q4 y Q5 para las que se emplearon los oligonucleótidos recogidos en la tabla 18.

Tabla 18. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de las delecciones Q2, Q4 y Q5. Los sitios de corte para *Bam*HI y para *Sa*II aparecen resaltados negrita.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV51	GGGG GT CGACTTGGCAGAAGAACGAATAACAGA	Crick	+29
ECV52	GGGG GGAT CCGACGGGAAATTACCAAGAGCA	Watson	-892
ECV54	GGGG GGAT CCCATGCTCATCCAGGCCAAT	Watson	-558
ECV56	GGGG GGAT CCCTCTCATATTGCCTGAAAATGA	Watson	-326
ECV148	GGGG GGAT CCAAGAGCTGTGGCAGTAAT	Crick	-484
ECV149	GGGG GGAT CCATTACTGCCACAGCTCTT	Watson	-501
ECV178	GGGG GT CGACCAGGTCCAGGGCCAGGGC	Watson	-523
ECV258	GGGG GGAT CTGGACCTGGCAGTTGAAGC	Watson	-534

Para obtener la delección Q2 se diseñó el cebador ECV148 (sitio de corte para *Bam*HI) que hibrida en -501/-484. En combinación con ECV54 amplificó un fragmento de DNA de 79 pb que contenía el sitio de unión para *Bu*f1p. Tras una digestión con *Bam*HI, se clonó en la delección pXW5651 digerida del mismo modo. Para obtener la delección Q4 se diseñó el oligonucleótido ECV178 (corte para *Bam*HI) que hibrida en -523/-505. Se combinó, en la reacción de PCR con ECV51 utilizando como DNA molde la construcción Q2. De este modo se amplificó únicamente la región que contiene el sitio *Bu*f1p (-523/-484) seguida de la región -326/+23. Para obtener la construcción Q5, se diseñó ECV258 (corte para *Bam*HI) que hibrida en -534/-517. En combinación con ECV52, y utilizando como molde DNA genómico de la cepa Y1140 de *K. lactis*, se amplificó un fragmento de 400 pb que contenía los sitios *Hap*2/3/4/5p y *Mig*1p. Tras una digestión con *Bam*HI, se clonó en la delección D1 digerida del mismo modo. Se obtuvo así Q5 que contiene la secuencia del promotor que va desde -892 a -517 seguida de -501 a +23, es decir que presenta una delección del sitio que potencialmente puede unirse al represor *Bu*f1p. En la tabla 19 aparece un resumen de las posiciones de los oligonucleótidos empleados así como de las regiones que contienen las delecciones creadas.

Tabla 19. Oligonucleótidos empleados para la construcción de las deleciones D1 y D2. Se indican las posiciones ocupadas por cada uno de ellos y los consensos que contiene finalmente cada deleción.

Deleción	Primers empleados	Posiciones	Consensos que contiene
Q2	ECV54 ECV148 ECV56 ECV51	-558 -501 -326 +29	Mig1; Buf1; TATA
Q4	ECV178 ECV51	-523 +29	Buf1; TATA
Q5	ECV52 ECV258 ECV149 ECV51	-892 -534 -501 +29	Hap2/3/4/5; Mig1; Gcr1p; Elemento rico en pirimidinas; TATA

Las construcciones fueron verificadas mediante análisis de restricción y secuenciación y sus características principales aparecen recopiladas en el esquema de la figura 55.

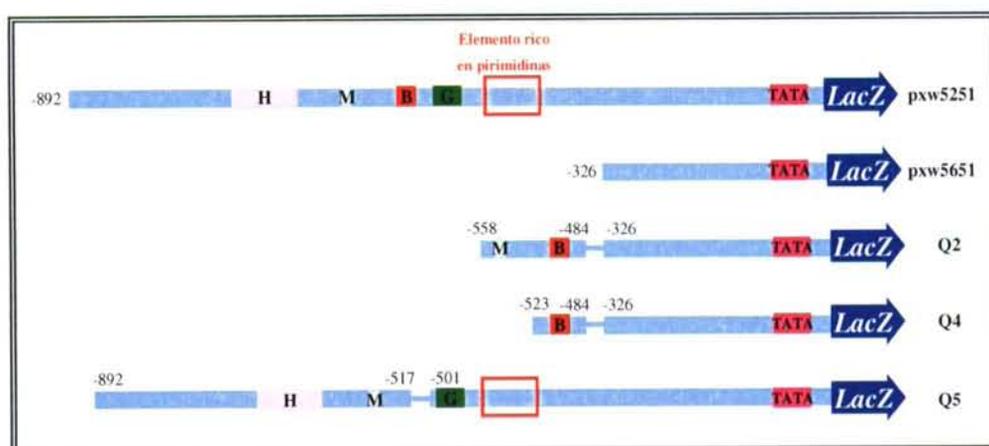


Figura 55. Esquema de las deleciones pXW5251, pXW5651, Q2, Q4 y Q5.

Células de la cepa MW190-9b de *K. lactis* fueron transformadas con estas construcciones y se determinaron las actividades beta-galactosidasa correspondientes. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 56.

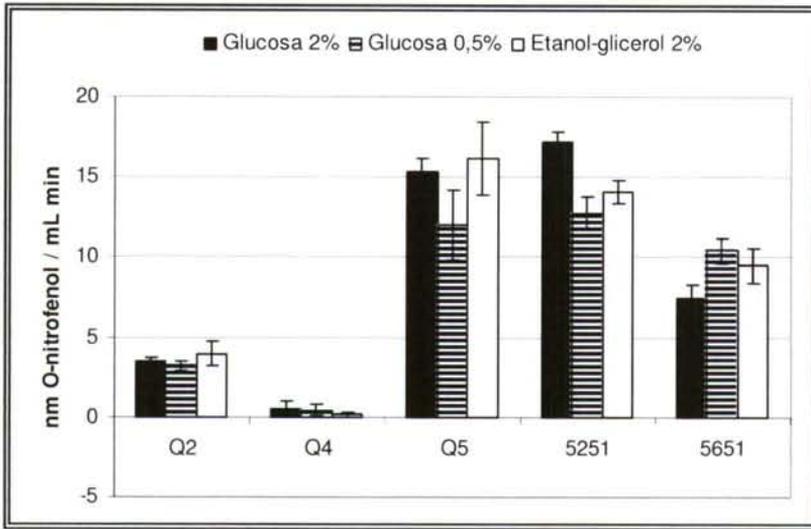


Figura 56. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por las deleciones diseñadas para el promotor de *KIHEMI* para analizar el consenso para Buf1p. Las medidas se realizaron en dos fuentes de carbono: glucosa 0,5% y etanol-glicerol 2%.

En el caso de las construcciones Q2 y Q4 que contienen el sitio de unión para el represor Buf1p, se advierte una disminución de la expresión con respecto a la construcción utilizada como control, pXW5651, lo que indica un papel represor para dicho elemento en este contexto. En cambio, si se comparan los valores de expresión obtenidos con las construcciones Q5 (promotor entero sin el sitio represor Buf1p) y el promotor completo (pXW5251) se observa sólo en etanol-glicerol un ligero aumento de la expresión de *KIHEMI* en ausencia del sitio de unión para el represor. Todos estos datos sugieren que aunque el elemento Buf1 puede actuar como represor en las construcciones Q2 y Q4, en un contexto más similar a la situación *in vivo* la funcionalidad del elemento con homología al consenso para la unión al represor Buf1p no parece justificada.

4.7. Actividad de las deleciones seriadas del promotor de *KIHEMI* en condiciones de hipoxia

Datos previos (González-Domínguez *et al.*, 1997) indicaban que el gen *KIHEMI* responde a una transición rápida (70-100 min) de condiciones hipóxicas, generadas por burbujeo de nitrógeno, a condiciones aerobias disminuyendo de dos a seis veces su expresión. También se pudo demostrar que la adición de un precursor de hemo a los

cultivos hipóxicos disminuía la expresión de *KIHEMI* hasta tres veces (González-Domínguez *et al.*, 1997).

A fin de analizar en las delecciones seriadas el efecto de los niveles de oxígeno y la presencia de precursores de hemo se realizaron cultivos en jarras de anaerobiosis (materiales y métodos).

En ensayos preliminares se utilizaron, como precursores de hemo, protoporfirina IX (hemina) y deuteroporfirina IX obteniéndose resultados similares tanto de crecimiento como de actividad beta-galactosidasa (figuras 57 y 58). La protoporfirina IX para transformarse en hemo tiene que ser empleada como sustrato de la enzima protoporfirinógeno oxidasa (codificada por el gen *HEM14*) en una reacción que requiere la presencia de oxígeno. La deuteroporfirina IX, un análogo de la porfirina IX, es mucho más soluble y se transforma en deuterohemo por acción de la ferroquelatasa (Hon *et al.*, 2003). El hecho de que la hemina tenga el mismo efecto que la deuteroporfirina indica que las condiciones generadas en la jarra permiten todavía unos niveles de oxígeno suficientes para satisfacer las demandas de la protoporfirinógeno oxidasa. En los ensayos que se muestran en este apartado se empleó deuteroporfirina IX en una concentración de 2µg/mL. Como fuente de carbono se utilizó glucosa al 2% ya que en condiciones de hipoxia únicamente puede obtenerse energía suficiente para el crecimiento celular a través de un metabolismo fermentativo, porque los bajos niveles de oxígeno limitan la capacidad respiratoria. De acuerdo con los requerimientos de crecimiento anaerobio el medio fue suplementado con metionina al 0,004% y con ergosterol al 0,002% y tween 80 al 0,5%.

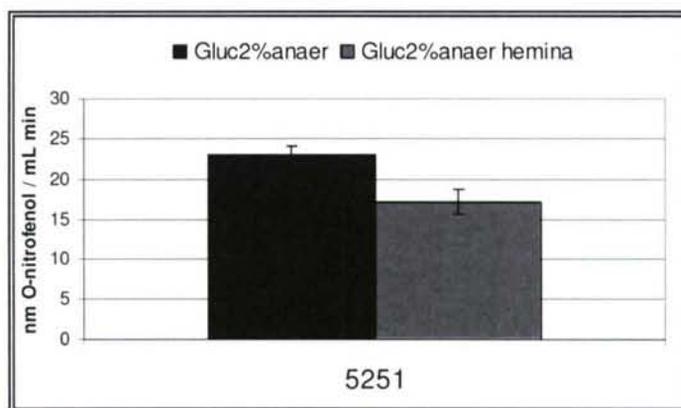


Figura 57. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por el promotor completo de *KIHEMI*. Las medidas se realizaron en jarras de anaerobiosis empleando glucosa 2% como fuente de carbono y glucosa suplementada con hemina.

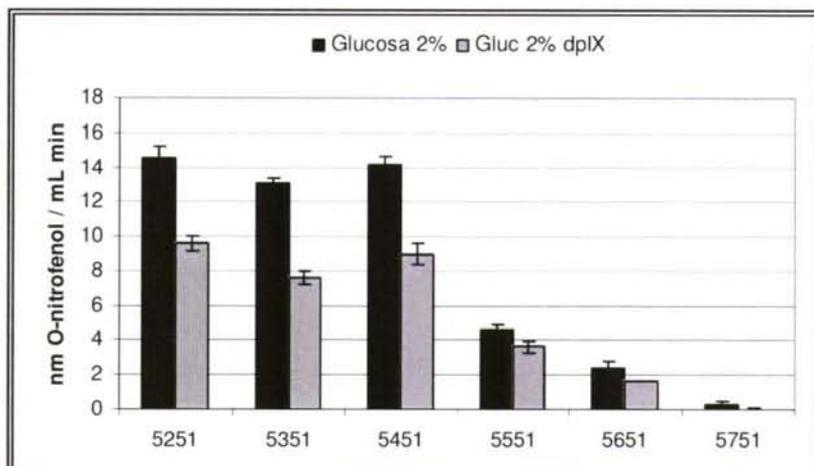


Figura 58. Efecto de la deuteroporfirina IX. Las medidas se realizaron en jarras de anaerobiosis empleando glucosa 2% como fuente de carbono.

Los resultados obtenidos en hipoxia al comparar la actividad promotora de distintas regiones con deleciones seriadas (figura 58) indican que la caída más brusca de actividad se produce entre las construcciones pXW5451 y pXW5551. La eliminación del elemento rico en pirimidinas (comparación entre pXW5551 y pXW5651) tiene un efecto menor que el observado en condiciones aerobias. Por tanto entre las posiciones -558 a -443 (región que se elimina al pasar de pXW5451 a pXW5551) se localiza una señal activadora de la expresión del gen en condiciones anaerobias. La secuencia necesaria para la expresión hipóxica del gen parece ser también la responsable de la inhibición por hemo. En efecto, las medidas de actividad del promotor disminuyen en las tres primeras: pXW5251, pXW5351 y pXW5451 (ver figura 58), pero el efecto es muy pequeño en pXW5551, pXW5651 y pXW5751.

Puesto que existen datos bibliográficos que relacionan a Buf1p no sólo con la represión sino también con la activación transcripcional (Luche *et al.*, 1993) y, según acabamos de ver en el apartado anterior, la región más estrechamente relacionada con la actividad en hipoxia (-558 a -443) contiene un sitio Buf1p, se decidió comprobar de una forma más directa si este elemento participa en esta respuesta. Para ello se comparó la actividad de las construcciones pXW5651, Q4 y Q5 y los resultados se muestran en la figura 59.

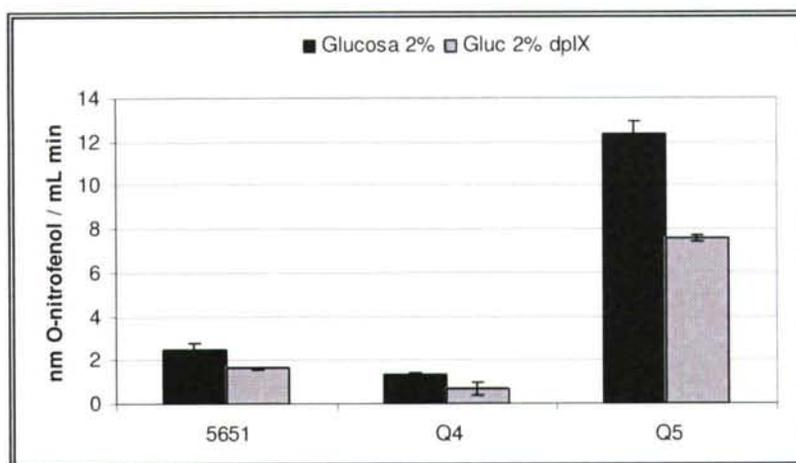


Figura 59. Resumen de las actividades enzimáticas mostradas por las delecciones pXW5651, Q4 y Q5 del promotor de *KIHEM1*. Las medidas se realizaron en jarras de anaerobiosis empleando glucosa 2% como fuente de carbono suplementada con deuteroporfirina IX.

Se puede comprobar que la presencia del sitio Buf1p en la construcción Q4 no permite una importante expresión hipóxica. Además, la construcción Q5 que contiene el promotor completo pero con el sitio Buf1p delecionado tiene actividad en hipoxia y responde a la represión por hemo. Se puede por tanto, descartar que el sitio Buf1p esté implicado en la activación hipóxica y que sea hemo-dependiente. Una vez descartado el papel del elemento Buf1p, futuros análisis serán necesarios para caracterizar el elemento responsable de esta regulación.

5.DISCUSIÓN.

Se ha llevado a cabo un estudio del promotor del gen *KIHEM1* que codifica la enzima 5-amino-levulinato sintasa, implicada en la primera reacción de biosíntesis de hemo. La determinación de los sitios de inicio de la transcripción mediante experimentos de *primer extension* ha permitido localizar varios puntos de inicio de la transcripción en las posiciones -71, -69, -66, -58 y -48 con cierta preferencia por la posición -48 que está situada a una distancia de 28 nt de una caja TATA localizada entre las posiciones -81 a -76 y a una distancia de 186 nt de otra caja TATA localizada entre las posiciones -239 a -234.

Se han analizado los elementos *cis* del promotor del gen *KIHEM1* que regulan su transcripción en respuesta a dos señales: la disponibilidad de fuentes de carbono

fermentables o no fermentables, y la disponibilidad de oxígeno. También se ha analizado el papel de un análogo a protoporfirina IX (precursor de hemo) en la señalización de la disponibilidad de oxígeno. Los valores de actividad transcripcional del promotor, silvestre o modificado, en diferentes condiciones de ensayo se determinaron mediante fusiones al gen reportero *lacZ* y medida de la actividad beta-galactosidasa.

El promotor de *KIHEMI* presenta una leve inducción, 1,5 veces, cuando se produce un cambio de la de fuente de carbono y se pasa de glucosa al 2% a etanol-glicerol al 2% (González-Domínguez *et al.*, 1997), mostrados en la figura 42 y datos de esta Tesis mostrados en la figura 45. Las levaduras, y en general los microorganismos, adaptan su metabolismo a la disponibilidad de fuentes de carbono. En condiciones aerobias *S. cerevisiae* tiene una clara preferencia por la utilización de glucosa por la vía fermentativa transformándola en etanol. A medida que la glucosa se agota se produce el denominado *shift* diáxico y *S. cerevisiae* se adapta a un metabolismo respiratorio para poder obtener energía a partir del etanol. Durante este cambio la transcripción de numerosos genes se ve modificada (DeRisi *et al.*, 1997) para propiciar el cambio metabólico. Esto se consigue mediante desrepresión de los genes reprimidos por glucosa durante el metabolismo fermentativo y la inducción de genes gluconeogénicos, genes que permiten la utilización de fuentes de carbono alternativas, la respiración y el desarrollo de las mitocondrias (Ronne, 1995). En condiciones aerobias *K. lactis*, aunque es capaz de producir etanol (González-Siso *et al.*, 2000), tiene preferencia por la utilización de glucosa a través de metabolismo respiratorio, oxidando el piruvato obtenido a partir de la glucólisis en lugar de transformarlo en etanol. La represión por glucosa de los genes respiratorios es débil en *K. lactis* y dependiente de cepa (Ferrero *et al.*, 1978; Breuning, 1989; Lodi *et al.*, 1994; Dong & Dickson, 1997). Los niveles basales de expresión en glucosa de genes que codifican proteínas respiratorias (*KICYC1*, *KIQCR7* o *KIQCR8*) son generalmente altos (Freire-Picos *et al.*, 1995) y en aquellos casos en los que se detecta inducción al pasar a medios no fermentables, ésta es transitoria y bastante débil si se compara con la encontrada en *S. cerevisiae* (Mulder *et al.*, 1995b,c). La escasa, y transitoria, inducción de *KIHEMI* en fuentes de carbono no fermentables está por tanto en perfecta sintonía con la de otros genes respiratorios analizados en esta levadura, sobre todo si se tiene en cuenta que la biosíntesis de hemo es necesaria para la síntesis de hemo-proteínas que participan en el transporte electrónico mitocondrial.

En *S. cerevisiae* la inducción específica de genes en el cambio diaúxico se relaciona con el complejo Hap2/3/4/5p. El análisis *in silico* del promotor de *KIHEM1* revelaba la existencia de una secuencia *cis* que se ajusta al consenso para la unión de este complejo (CCAAT) en las posiciones -656/-649. Para analizar la importancia funcional de este elemento se comparó con una construcción que contenía el promotor silvestre desde la posición -656 con la misma construcción en la que el elemento de unión para Hap2/3/4/5p había sido mutado. Los resultados obtenidos indican que este elemento no parece ser funcional en esta respuesta. Por otra parte análisis similares sobre la participación activa de la región que contiene el sitio Gcr1p en la represión del promotor de *KIHEM1* son concordantes con su clasificación como gen respiratorio que se reprime en glucosa al 2% cuando la glucólisis va a ser más activa. En estas condiciones, parte del piruvato producido será desviado hacia la producción de etanol. De todas formas, este efecto represor mediado por Gcr1p es muy pequeño y menor que el observado para otros genes de *S. cerevisiae* que se reprimen fuertemente en estas condiciones.

Se ha podido comprobar que el elemento rico en pirimidinas presente en el promotor de *KIHEM1* y que también se localiza en los promotores de otros genes de alta expresión en levaduras es funcional (McNeil, 1988). En *K. lactis* la presencia de un elemento rico en pirimidinas ha sido descrita en el promotor de *KICYC1* (Ramil *et al.*, 1998). La presencia de este elemento, cuyo mecanismo de acción consiste en limitar la formación RNAm con extremos 5' respecto al elemento rico en pirimidinas, en posición -412/-378, es decir 5' de la caja TATA más alejada de los puntos de inicio de la transcripción es algo inusual. Generalmente está descrito que el elemento rico en pirimidinas se localiza entre la caja TATA y los sitios de inicio de la transcripción (McNeil, 1988). La comprobación experimental de que este elemento rico en pirimidinas actúa como un activador de la transcripción de *KIHEM1* en condiciones aerobias indica que el comienzo de la ruta de biosíntesis de hemo está favorecido por un alto nivel de transcripción basal lo que resultaría conforme con el metabolismo eminentemente respirativo de esta levadura.

En condiciones aerobias, algunas construcciones diseñadas para medir si el elemento de unión de Buf1p puede tener un carácter represor así parecen indicarlo, sin embargo la sola eliminación de Buf1p del promotor no tiene un efecto activador sobre la transcripción de *KIHEM1* en glucosa al 0.5% y un muy leve efecto en Etanol-Glicerol al 2%.

De los datos expuestos se puede concluir que el gen *KIHEM1* se expresa en aerobiosis mediante una activación basal dependiente del elemento rico en pirimidinas. El papel activador del complejo Hap2/3/4/5p y el papel represor de Buf1p que mantienen una expresión constitutiva del gen homólogo de *S. cerevisiae* (Keng & Guarente, 1987) no parecen ser muy notorios funcionalmente en la determinación de los niveles de expresión aerobia del gen *KIHEM1* en *K. lactis*, al menos en las condiciones analizadas. Según este modelo el gen *KIHEM1* dispondría de una capacidad de expresión basal alta en condiciones aerobias y podría modular su expresión de forma leve mediante la respuesta a Gcr1p en función de la fuente de carbono.

En condiciones hipóxicas la expresión del gen aumenta, pero responde a la adición de hemina o deuteroporfirina IX disminuyendo su expresión. La región que se extiende desde las posiciones -558 a -443, es la que permite unos elevados niveles de expresión en condiciones hipóxicas. Esta región parece contener también algún elemento capaz de responder de forma negativa a la adición de deuteroporfirina IX. Se ha podido comprobar que el elemento de unión de Buf1p no actúa como un elemento regulador ni responde a deuteroporfirina IX en hipoxia.

CAPÍTULO 4:
ANÁLISIS FUNCIONAL DE
DOMINIOS DE Srb_{10p}

1. INTRODUCCIÓN

Las quinasas dependientes de ciclinas tienen un papel muy importante en el control del ciclo celular y en la transcripción. Existen tres quinasas diferentes implicadas en la transcripción en humanos: Cdk7p, Cdk8p y Cdk9p (Pinheiro *et al.*, 2004). Cada una de ellas funciona como parte de un complejo quinasa-ciclina. De entre ellas, Cdk7p y Cdk8p son componentes del factor transcripcional IIIH (TFIIH) (Palancade & Bensaude, 2003; Liao *et al.*, 1995), mientras que Cdk9p ha sido identificada como un factor de elongación de la transcripción (Peng *et al.*, 1998). Las quinasas Cdk7p y Cdk8p son reclutadas al complejo de la RNAPolII antes del inicio de la transcripción, mientras que Cdk9p es reclutada hacia la polimerasa en un estadio posterior (Zhou *et al.*, 2000). En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado cuatro quinasas diferentes implicadas en la transcripción: Kin28p, Ctk1p, Bur1p y Srb10p (Wilcox *et al.*, 2004). Kin28p (homóloga de Cdk7p en humanos) es un componente del TFIIB (Rodríguez *et al.*, 2000), Ctk1p y Bur1p (homóloga de Cdk9p en humanos) promueven una elongación eficiente (Murray *et al.*, 2001). Srb10p (homóloga de Cdk8p en humanos) junto con su ciclina Srb11p, forman un complejo Srb8/9/10/11p asociado con el mediador que está conservado en humanos y levaduras (Borggreffe *et al.*, 2002; Samuelsen *et al.*, 2003). Se ha demostrado que Srb10p regula negativamente la transcripción de ciertos genes (Holstege *et al.*, 1998) mediante la inhibición de la formación del complejo de pre-inicio (PIC) (Hengartner *et al.*, 1998) o promoviendo la degradación de ciertos factores transcripcionales como Gcn4p (Chi *et al.*, 2001). Se ha demostrado además que la interacción directa entre los componentes de las vías de transducción de señales y Srb10p representa un mecanismo de control transcripcional en respuesta a importantes señales como la disponibilidad de nutrientes (Chang *et al.*, 2001), estrés (Chi *et al.*, 2001; Bose *et al.*, 2005), la represión por glucosa (Balciunas & Ronne, 1995; Kuchin & Carlson, 1998), la inducción de genes específicos como *SUC2* (codifica la invertasa) y *PHO5* (codifica una fosfatasa ácida) (Kuchin *et al.*, 1995) y represión de los genes α -específicos dependiente de $\alpha 2$ (Wahi & Johnson, 1995).

Por tanto, Srb10p está relacionada con la regulación transcripcional de una amplia variedad de genes. Además, Srb10p participa tanto en mecanismos de activación como de represión de la transcripción. La actividad quinasa de Srb10p es responsable de la fosforilación del factor transcripcional de levaduras Gal4p en el aminoácido S699 y esta modificación se requiere para la activación transcripcional de los genes *GAL*

inducida por galactosa (Hirst *et al.*, 1999). Srb10p también tiene un papel positivo en la activación de los genes gluconeogénicos mediante la regulación del activador transcripcional Sip4p (Vincent *et al.*, 2001). Respecto al papel de Srb10p en los procesos de represión transcripcional, se ha demostrado *in vivo* la relación de Srb10p en el mecanismo de acción del complejo represor Tup1p-Ssn6p, sugiriendo una interacción con la RNA polimerasa II (Kuchin & Carlson, 1998) y con los componentes del par ciclina-quinasa Srb11p-Srb10p (Zaman *et al.*, 2001; Schüller y Lehming, 2003).

El primer dato de la relación de Srb10p con la respuesta hipóxica de levaduras surgió de la propia clonación del gen *SRB10* de *S. cerevisiae* en nuestro laboratorio. *ScSRB10* de *S. cerevisiae* fue clonado por complementación de una mutación *rox6* que produce un fenotipo de sobre-expresión de un gen hipóxico de esta levadura. Se trata del gen *CYC7* que codifica una isoforma de citocromo *c* cuya expresión se incrementa en hipoxia. Posteriormente se pudo demostrar que la delección de *SRB10* tiene diferentes consecuencias sobre el transcriptoma de la levadura en aerobiosis o en hipoxia. Además, el 57,2% de los genes hipóxicos que se consideran dependientes de Rox1p, son también dependientes de Srb10p. Estos resultados sugieren que Srb10p podría estar relacionado con mecanismos de represión aeróbica de genes hipóxicos mediados por el complejo Tup1p-Ssn6p (Becerra *et al.*, 2002). Sin embargo, no se ha podido demostrar una interacción física directa entre Rox1p y Srb10p en *S. cerevisiae* (Becerra *et al.*, 2002) aunque sí entre Tup1p y Srb10p (Zaman *et al.*, 2001) o entre Tup1p y Srb11p (Schuller & Lehming, 2003).

Una de las líneas de investigación generales en nuestro laboratorio es el estudio del control de la expresión de genes hipóxicos en levaduras que pertenecen a distintos grupos metabólicos respecto a su metabolismo respiro-fermentativo. Ya que no existían muchos datos sobre la estructura de otros factores Srb10p en otros grupos de levaduras, a parte de *S. cerevisiae*, tras la clonación de *KISR10* descrita en el capítulo primero de esta Tesis, se pensó que un estudio comparativo podría resultar interesante para aclarar algunos aspectos sobre su función. Por otra parte, la reciente secuenciación de varios genomas de levaduras a través del proyecto *Genolévures* ha aportado nuevos datos para la comparación.

2. ANÁLISIS *in silico* DE DOMINIOS CONSERVADOS

Empleando el programa BLAST2 (Tatusova & Madden, 1999) se compararon las homologías entre *KISrb10p* y otras proteínas relacionadas de *S. cerevisiae* (Liao *et al.*, 1995), *Saccharomyces kluyveri* (Comunicación personal de P. Cliften & M. Johnston), *Schizosaccharomyces pombe* (Watson & Davey, 1998), *Yarrowia lipolytica* (Dujon *et al.*, 2004) *Candida glabrata* (Dujon *et al.*, 2004), *Candida albicans* (Jones *et al.*, 2004), *Debariomyces hansenii* (Dujon *et al.*, 2004), *Homo sapiens* (Tassan *et al.*, 1995), *Mus musculus* (Strausberg *et al.*, 2002), *Xenopus tropicalis* (Richardson & Chapman, 2003), *Danio rerio* (Brabazon *et al.*, 2002), *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), *Dictyostelium discoideum* (Takeda *et al.*, 2002), *Arabidopsis thaliana* (Cheuk *et al.*, sin publicar) y *Oryza sativa* (Hashimoto *et al.*, 1992) dando como resultado que las mayores semejanzas se encuentran con *S. kluyveri* y *S. cerevisiae*. Los resultados se muestran en la tabla 20.

Como era de esperar el dominio quinasa está conservado en todas, pero en las de levaduras surgen tres dominios conservados que son específicos de ellas y que hemos denominado: Dominio conservado I (DC-I), Dominio Conservado II (DC-II) y Dominio rico en alaninas (DC-Ala). En la figura 60 se muestra un esquema de los dominios de levaduras comparando las secuencias de sus genes frente a la secuencia humana.

El hecho de la existencia de estos dominios, DC-I, DC-II y DC-Ala, puede relacionarse con la capacidad de complementación cruzada. Por ejemplo, el gen de *Kluyveromyces lactis* es capaz de complementar la mutación de *S. cerevisiae* (capítulo 1 de esta Tesis) y ambos comparten estos dominios. Mientras que el gen *PRK1* de *S. pombe*, que no los conserva, sólo complementa de modo parcial algunos de los fenotipos asociados a la mutación de *ScSRB10* (Watson & Davey, 1998). El gen humano para Cdk8p, carente de los dominios, no complementa la mutación de *ScSRB10* (Tassan *et al.*, 1995).

Análisis funcional de dominios de Srb10p

Tabla 20. Homología entre K/SRB10p y otras quinasas dependientes de ciclinas.

Fuente	Proteína	Solapamiento	% Identities	% Positivos	% Gaps
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Srb10	570	68	79	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Srb10	546	59	71	9
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Similar a K/SRB10p	436	61	74	3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Prk1	291	55	73	1
<i>Candida glabrata</i>	Similar a K/SRB10p	605	54	65	6
<i>Gibbsella zeae</i>	PH-1	350	52	63	13
<i>Neurospora crassa</i>	Similar a K/SRB10p	337	50	61	17
<i>Debariomyces hansenii</i>	Similar a K/SRB10p	418	48	60	10
<i>Candida albicans</i>	Similar a protein quinasa	425	45	59	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdc28	291	36	56	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kin28	288	35	52	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pho85	285	32	54	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bur1	138	31	50	14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ctk1	158	29	46	13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cak1	190	26	45	20
<i>Homo sapiens</i>	Cdk8	350	40	56	11
<i>Homo sapiens</i>	Cdk7	295	36	52	8
<i>Mus musculus</i>	Cdc216(similar a Cdk8 humana)	232	41	55	5
<i>Xenopus tropicalis</i>	Hipotética MGC76204	234	41	56	11
<i>Danio rerio</i>	Cdk8	228	41	57	6
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cdk8	241	41	56	9
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Cdk8	241	42	63	5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Similar a K/SRB10p	238	41	60	7
<i>Oryza sativa</i>	p34cdc2	192	37	62	10
<i>Nicotiana tabacum</i>	CDK	186	36	59	9

alineamiento mostrado en la figura 61 esta Lys se encuentra también conservada en *K/Srb10p*.

El dominio DC-I, situado en el extremo amino, consta de 29 aminoácidos de los que 17 son idénticos en las tres secuencias. El dominio DC-II, más cercano al extremo carboxilo, está integrado por 27 aminoácidos y es muy rico en asparragina. La región amino terminal de la proteína es rica en glutamina. La región carboxilo terminal contiene una secuencia conservada con 10 alaninas consecutivas, DC-Ala, y es rica en asparraginas. Además, en la proteína de *K. lactis*, pero no en las otras dos, aparece una región que se parece al dominio WRKY. El dominio WRKY se encuentra en una o dos copias en una superfamilia de factores transcripcionales de plantas que están relacionados con la regulación de varios procesos fisiológicos exclusivos de plantas, incluyendo la defensa contra patógenos, senescencia, desarrollo del tricoma y biosíntesis de metabolitos secundarios (Eulgem *et al.*, 2000).

Estos datos llevaron al planteamiento de la hipótesis de que, pese a que los dominios conservados, DC-I, DC-II y DC-Ala, no forman parte del dominio proteín-quinasa principal, también tienen un papel fundamental en la función de Srb10p. Se buscó información sobre si estos dominios se encuentran en otras proteínas de levaduras o incluso si están asociados con alguna función conocida, pero no se encontraron similitudes significativas. Por tanto estos dominios parecen ser específicos de las proteínas Srb10p de levaduras y se plantearon algunos experimentos para comprender su papel en la función de la proteína.

Rico en glutamina		
DOMINIO WRKY		
KlSrb10p	MYGNQQNSNPNYQMSYYRMNNGQQGTNRWFQQLSHQEMLAGHSQQILNTNKPAGNQSK	59
SkSrb10p	MQGQQLGTHSLWQQP-----QQMMDSKNTGSGNNK	30
ScSrb10p	MYNGKDRAGNSYQPMYQRPMQVQQQ-----QAQSFVGGKNTIGSVHVK	44
	* *	* *
Dominio conservado I de Srb10 Unión a ATP		
KlSrb10p	PIIVMASNNVFSIGPYRQRKDSRISVLEKYEIIGYIAAGTYGKVKAKARDYQNGMNRD	119
SkSrb10p	QPLLMANNSVFSIGPTKKRKDASRISVLEEYEIIGYIAAGTYGKVKAKKREDGRNEIES	90
ScSrb10p	APMLMANNDVFTIGPYRQRKDRMRVSVLEKYEIVIGYIAAGTYGKVKAKRQINSGTNSA	103
	* *	* *
KlSrb10p	NVILDSPDSVSADSNLDINSINRSTROQEANDLTT-----MDFRKP SHKRFTPPN	171
SkSrb10p	MAGGSTPTNLLSQQLDINSINKSTRAQEATESTNTSSTSQGRSSDFRKP SKKDSSTAA	150
ScSrb10p	NGSSLNGTNAKIPQFDSTQPKSSSSMDMQANTN-----ALRRNLLKD---E	146
	: : : : *	: : *
Protein quinasa		
KlSrb10p	NSNSTQIR-SNSGSETNVRINSSSITNNSRKPSQIQFYAIKKFKTEREGVE--HYTGISQ	228
SkSrb10p	TAVQSQSGNVTSPDSQPLSASVMIGSPSKMPTTAYYAIKKFKTEREGVEQLHYTGISQ	210
ScSrb10p	GVTGPRIR--TTREDVSPHYNSQ--KQTLIKKPLTVFYAIKKFKTEKDGVEQLHYTGISQ	202
	: : : : *	: : : : *
KlSrb10p	SACREMSLCRELDNHLTKLVEIFLEKKSIMVSEFAEHDLLQIHFHSHPEKRLIPPRM	288
SkSrb10p	SACREMSLCRELDNHLTKLVEIFLERKSIYMVSEFAEHDLLQIHFHSHPEKRLIPPRM	270
ScSrb10p	SACREMLCRELDHNKHLTLVEIFLERKCVHMVYEAHEDLLQIHFHSHPEKRMIPPRM	262
	* *	* *
Firma Protein quinasa		
KlSrb10p	LKSIMWQILDGVSYLHQNWILHRDLK PANIMVTVDGCVKIGDGLARKFNMMVQTLTYGD	348
SkSrb10p	LKSIMWQILDGVSYLHQNWILHRDLK PANIMVTVDGCVKIGDGLARKFNMMVQTLTYGD	330
ScSrb10p	VRSIMWQLLDGVSYLHQNWVLRDLK PANIMVTIDGCVKIGDGLARKFNMLQTLTYGD	322
	* *	* *
KlSrb10p	KVIVTIWYRAPELILGARHYTPAIDLWAVGCIFAELIGLRPIFKGEEAKMESKKS SVLFQA	408
SkSrb10p	KVVVTWYRAPELLLGARHYTPAIDLWAVGCIFAELIGLRPIFKGEEAKMDSKKSVPFQA	390
ScSrb10p	KVVVTIWYRAPELLLGARHYTPAVDLWSVGCIFAELIGLQPIFKGEEAKLDSKKTVPFQV	382
	* *	* *
KlSrb10p	NQFQKILEVMGSPDHKIWFNIDSYPEYLQAKMPKYRDNLTAWYQTAGGRDKTALDILYR	468
SkSrb10p	NQLQRILEVLGTPQKSWSNVYKYPEYEQMAKFPKYRDNLVWYHSSGGRDKAALNLLYQ	450
ScSrb10p	NQLQRILEVLGTPDQKIWFYLEKYPEYDQITKFPKYRDNLATWYHSAGGRDKHALSLLYH	442
	* *	* *
Rico en Asparagina		
Dominio conservado II de Srb10		
KlSrb10p	LLQYDPIKRIDAIDALDHVYETNGDPPVCENVFEGLNYKYPARRIHTNDNDITNVGNDNN	528
SkSrb10p	LFKYDPIKRIDAIDALDHEYETNGNPPVCENVFEGLNYKYPARRIHTNDNDIMNLGTAKN	510
ScSrb10p	LLNYDPIKRIDAFNALEHKYFETESDIPVSENVFEGLTYKYPARRIHTNDNDIMNLGSRTK	502
	* *	* *
Rico en alanina		
KlSrb10p	Q--ANHSQKQPMHGNNNNKNGNMNGLGVNKRILAAAAAAAAAAAVSGNGNPNPTSNTATGG	586
SkSrb10p	KSIANHHQQQAIGGSN-AQSAAMGGLGVNRRILAAAAAAAAAAVSGSGPNAQNGSASGTNG	569
ScSrb10p	N-----NTQASGITAGAAANALGGLGVNRRILAAAAAAAAAAVSGNNASDEP-----	548
	: : * *	: : : : *
KlSrb10p	SARKKRK 593	
SkSrb10p	PIRKRKR 576	
ScSrb10p	SRKKNRR 555	
	: : * : :	

Figura 61. Alineamiento mediante CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) de las proteínas Srb10p de levaduras

3. VERIFICACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LA REGIÓN COMPRENDIDA ENTRE LOS RESIDUOS 108 Y 206 DE *KISrb10p*

Observando detenidamente la secuencia de *KISrb10p* (figura 61), destaca el hecho de que existe un pequeño dominio proteín-quinasa conservado, que incluye la región de unión a ATP, desde la posición 90 a la 108. La conservación desaparece hasta la posición 206 en la que comienza una región muy extensa con homología a proteín-quinasas y que se extiende hasta el residuo 489. El hecho de que el dominio proteín-quinasa se encontrase, en las tres proteínas *Srb10p* de levadura alineadas, interrumpido por una secuencia sin homología aparente con proteín-quinasas planteó la duda de si se pudiera tratar de una secuencia intrónica que no había sido detectada por el programa EXPLORA empleado para la detección de intrones (Kalogeropoulos, 1995). En las bases de datos de las que tomamos las secuencias de las proteínas de *S. cerevisiae* (SGD) y *S. kluyveri* (EMBL) no se recogía la existencia de ningún intrón en el gen homólogo correspondiente. Las secuencias intrónicas definidas por Martin R. Hodge y Michael G. Cumsky en el año 1989 5' GTAPyGT TACTAAC PyAG 3', y especialmente la secuencia interna TACTAAC y la secuencia de unión 3' PyAG, están muy conservadas en levaduras por lo que no parecía muy probable la existencia de un intrón. En cualquier caso para poner a prueba experimental esta conjetura, se procedió a comparar los tamaños del fragmento amplificado a partir de DNA genómico de *K. lactis* y de su DNAc.

A partir del RNA de una cepa silvestre de *K. lactis* (Y1140) y empleando la RT-polimerasa (*SuperScript™ II Reverse Transcriptase* de Invitrogen™), se procedió a amplificar el DNAc. Se utilizó un oligo específico, ECV103 (tabla 21), que hibrida en la posición +989 de la hebra complementaria de la ORF de *KISRB10*. El DNAc así obtenido, contendrá toda la secuencia que va desde este nucleótido hasta el sitio de inicio de la transcripción de *KISRB10*. De esta manera, si se trata de un intrón, la supuesta secuencia intrónica, no será amplificada a partir del DNAc. Por el contrario, en el supuesto de que no sea un intrón, esta secuencia formará parte del DNAc.

Tabla 21. Listado de los oligonucleótidos empleados para la verificación de la presencia de la región +108/+206 en el RNAm de *KISR10*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV103	TCACCGATCTTGACGCAG	Watson	+989
ECV170	ATCAGGAAATGTTAGCGGG	Crick	+107
ECV119-bis	CCTTCTCTTCCGTTTTGAAC	Crick	+656

Una vez obtenido el DNAc, mediante una reacción de síntesis con la DNA polimerasa y empleando como cebador el oligonucleótido ECV103 (tabla 21), se procedió a la copia de la hebra complementaria a este DNAc desde la posición +989 que es donde hibrida el oligonucleótido ECV170. Una vez reestructurada la doble hebra se empleó como DNA molde en una reacción de PCR con los oligos ECV170/ECV119bis (tabla 21), hibridando este último en la posición +656, de esta manera se aseguró que ambos cebadores hibridasen en una zona interna del DNAc evitando así que la PCR fallase por emplear cebadores posicionados en los extremos (ver figura 62). Se amplificó así esta región de 549 nucleótidos. Paralelamente se realizó la misma reacción pero empleando como DNA molde, DNA genómico de la cepa Y1140.

ATGTACGGCA	ACCAACAAAA	CAACTCCAAT	CCATATCAAA	TGTCGTATTA	TCGAATGAAT	60		
AACGGCCAAG	GCCAGGGTAC	TAATCGCTGG	CCICAACAAC	TGTCACATCA	GGAAATGTTA	120	ECV170	
GCGGGCCATT	CTCAACAGAT	CCTTAATAAC	AATAAACCCAG	CTGAAACCA	ATCGAAGCCT	180		
CCGATTGTGA	TGGCTAGTAA	TAATGTTTTC	TCTATTGGTC	CATACCGTCA	ACGAAAGGAT	240		
AGTTCAAGAA	TCTCGGTGTT	ACAAAAGTAC	GAGATTATCG	GGTATATTGC	AGCTGGTACG	300		
TATGGTAAAG	TTTACAAAGC	TAAAGCGAGG	GATTATCAGA	ATGSTATGAA	TAGAGACAAC	360		
GTAAATAATAC	TAGATTCTCC	GGATTCTGTG	AGTGGCTGAT	CAAAATTGGA	TATAAATTCA	420		
ATCAACAGAT	CCACTAGACA	ACAGGAGGCT	AACGACAACC	TTACACCAT	GGACTTTAGG	480		
AAGCCTCCG	ACAAGCGATT	CAGACCTCCA	ATAATAGCA	ACTCAACACA	GATAGGCTCT	540		
AATAGTGGAT	CAGAAACAAA	TGTAAGGATA	AATTCGTGCA	GTATAACAAA	CAACTCCGAGA	600		
AAGCCTTCTC	AAATTTCAGT	CTATGCTATT	AAGAAGTCA	AAACCGAAAG	AGAAGGTGTC	660	ECV119bis	
GAGCATTACA	CAGGTATCTC	ACAAAGTGCA	TGCAGAGAGA	TGTCACCTTG	TAGAGAATTG	720		
GATAATAACC	ATTTAACGAA	ATTAGTTGAA	ATATTCCTAG	AGAAGAAGAG	CATCTACATG	780		
GTCTCAGAGT	TTGCTGAACA	TGATCTTTTA	CAAATTATCC	ATTTTCATTC	GCATCCCTGAA	840		
AAGAGACTAA	TACCGCCAAG	GATGCTCAA	TCAATAATGT	GGCAAATTCT	TGATGGTGTT	900		
TCTTATTGCG	ATCAGAAGTG	GATTCTTCAT	AGAGACTTAA	AGCCCCGCTAA	CATTATGGTT	960		
ACCGTTGATG	GCTGCGTCAA	GATCGGTGAT	CCTGGTCTAG	CGAGAAAATT	CAATAACATG	1020	ECV103	
GTACAGACTT	TATACACTGG	TGATAAGGTT	ATTGTAACAA	TTTGGTATCG	TGCCCCAGAA	1080		
Codon de inicio		Supuesto intrón						

Figura 62. Esquema de la secuencia de *KISR10* con los oligonucleótidos empleados para la comprobación de la presencia en el RNAm de la región que aparece subrayada con puntos. El codón de inicio de la ORF aparece remarcado en negra.

De este modo, ya que la diferencia de tamaño esperada, dependiendo de la presencia o ausencia del intrón, es de 297 pb, al analizar el producto de la PCR en un gel de agarosa, se podría observar si el tamaño amplificado empleando como DNA molde el DNAc era igual o diferente al tamaño empleando DNA genómico.

Los resultados obtenidos (figura 63) indican que no existe diferencia de tamaño entre la banda amplificada a partir de DNA genómico y DNAC, por lo que se descarta la existencia de un intrón atípico. Si la región fuese eliminada por *splicing*, esperaríamos obtener a partir de DNA genómico una banda de 549 pb y a partir de DNAC una banda de 251 pb.

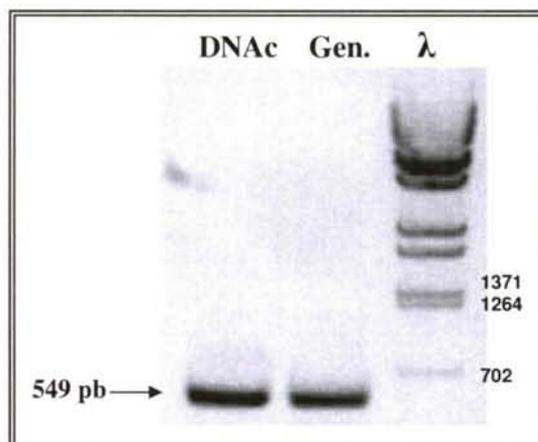


Figura 63. Resultado de la PCR para analizar la presencia/ausencia de intrón. Como resultado se descarta la existencia de un intrón.

4.CONSTRUCCIÓN DE DELECCIONES PARA LOS DOMINIOS CONSERVADOS DC-I, DC-II Y DC-ALA DE Srb10p EN LAS LEVADURAS *S. cerevisiae* y *K. lactis*

A fin de caracterizar funcionalmente el papel de los dominios específicos DC-I, DC-II y DC-Ala de Srb10p de levaduras, se diseñó la obtención de una serie de deleciones internas de cada uno de ellos en los correspondientes genes de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. También se incluyó la deleción del dominio WRKY en la proteína de *K. lactis*. Las deleciones correspondientes al dominio de unión a ATP de ambas proteínas se incluyeron también en este análisis.

En primer lugar, se procedió a clonar el gen *ScSRB10* en el vector episómico YEplac195 (materiales y métodos) mediante el diseño de la pareja de oligonucleótidos ECV252 (GGGGTCGACTTTTCCTTTTTTTTTTCTGGC) y ECV253 (GGGGTCGACCGCTCCTAGACGTTCCGT) que hibridan en las posiciones -598 de la región promotora y +838 de la terminadora (los sitios de reconocimiento para *Sall* aparecen remarcados en negrita).

Estos cebadores se caracterizan por tener en su región 5' los sitios de reconocimiento para el enzima *SalI*. Tras la realización de una PCR empleando como DNA molde DNA genómico de la cepa FY1679 de la levadura *S. cerevisiae*, se amplificó un fragmento de DNA de 2.908 pb. Después de digerir con *SalI* tanto el producto de PCR como el vector episómico, se realizó una reacción de ligamiento, denominándose la nueva construcción YEp195ScSRB10.

Las deleciones se obtuvieron mediante PCR inversa (divergente) utilizando como DNA molde la construcción YEp195KISR10 para *K. lactis* y YEp195ScSRB10 para *S. cerevisiae*. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para las distintas deleciones diseñadas aparecen listados en la tabla 22. Todos ellos se caracterizan por poseer en su extremo 5' un sitio de reconocimiento para en enzima de restricción *MluI*.

Tabla 22. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de deleciones de los genes *KISR10* y *ScSRB10* en el vector YEp195. El sitio de reconocimiento para *MluI* aparece remarcado en negrita.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra
ECV276	GCG ACGCGT CCCTCCGATTGTGATGGCTAGTAA	Watson
ECV277	GGG ACGCGT GCCGTACATTACAGCAGTAAATCG	Crick
ECV278	GGG ACGCGT CAAAAGTACGAGATTATCGGGTATA	Watson
ECV279	CGC ACGCGT CGATTGGTTTCCAGCTGG	Crick
ECV280	GGG ACGCGT GCGAGGGATTATCAGAATGGT	Watson
ECV281	GGG ACGCGT CTTTTGTAAACACCAGATTCTTGA	Crick
ECV282	GGG ACGCGT TAATGATAATAATCAAGCTAATCACTCTCA	Watson
ECV283	GGG ACGCGT ACAGACAGGAGGGTCGCC	Crick
ECV284	GGG ACGCGT GCTGTGTCTGGTAATGGAAACAA	Watson
ECV285	GCG ACGCGT GTTTCATGTTCCCATTTCTATTATTATTG	Crick
ECV286	GGG ACGCGT GAAAGTACGAAGTTATTGGCTACA	Watson
ECV287	GCG ACGCGT TTCATGCACACTTCCGATT	Crick
ECV288	GCG ACGCGT AGACAAATCAACTCCGGTACCA	Watson
ECV289	GGG ACGCGT CTTTTCTAAGACAGATACCCGCA	Crick
ECV290	GGG ACGCGT TCAAGAACTAAAAACAATACACAAG	Watson
ECV291	GGG ACGCGT ACTAACAGGAATATCACTTTCTGTGAA	Crick
ECV292	GGG ACGCGT TTCAGGAAACAATGCATCAGATGA	Watson
ECV293	GGG ACGCGT ACCTAACGCATTTGCAGCG	Crick

La temperatura de hibridación seleccionada para todos ellos fue de 62°C. En la tabla 23, se indican las posiciones de hibridación dentro de la ORF tanto en *K. lactis* como en *S. cerevisiae* junto con los dominios eliminados en cada caso.

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante los tubos *Ultrafree[®]-DA de Millipore* para a continuación someterlos a una digestión con *MluI* seguida de una reacción de autoligamiento.

De esta manera se recircularizó la construcción de modo que cada uno de los dominios eliminados fue sustituido por la secuencia nucleotídica ACGCGT

correspondiente al sitio de reconocimiento para *Mlu*I. En la figura 64 aparece un esquema de los dominios eliminados en cada deleción.

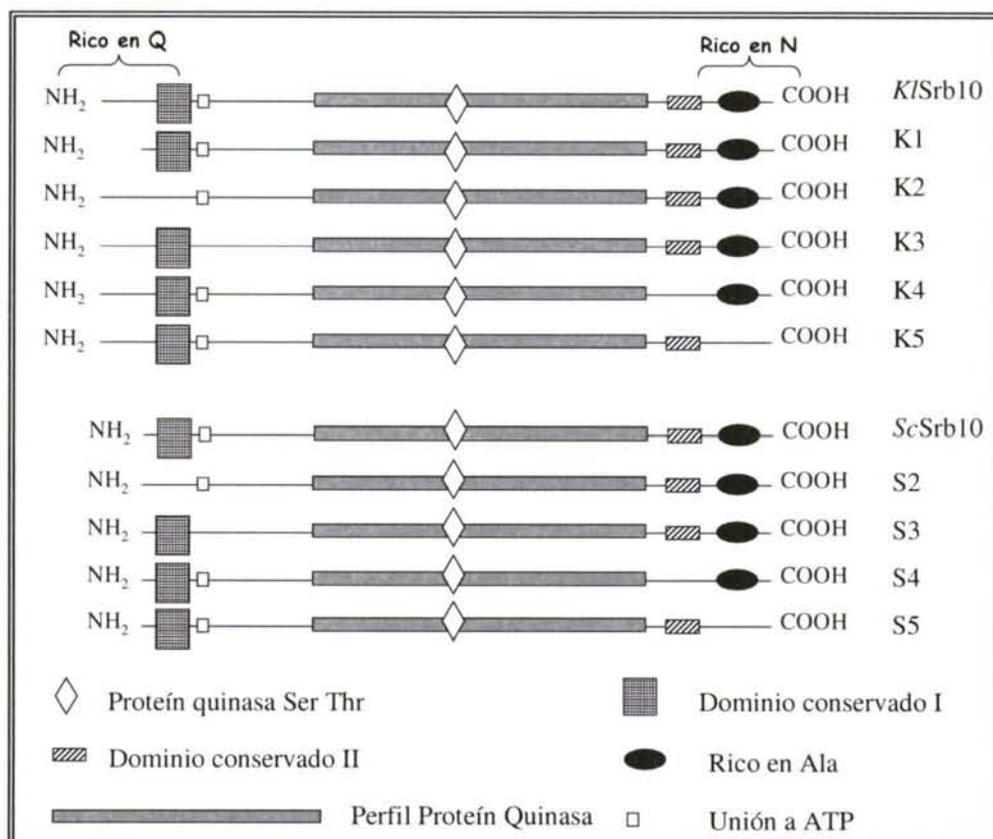


Figura 64. Esquema de los dominios eliminados en cada una de las deleciones diseñadas para *SRB10* de *K. lactis* y *S. cerevisiae*.

Para comprobar mediante secuenciación, la correcta eliminación de los dominios seleccionados, en *ScSRB10* se diseñaron los oligonucleótidos ECV295 y ECV296 que hibridan en las posiciones +6 y +1716. Para las deleciones en *KISRB10* se emplearon los oligos ECV161, ECV170, ECV179, ECV104 y ECV230 que hibridan en las posiciones -168, +107, +131, +1475 y +1883 (tabla 24).

Tabla 23. Listado de los oligonucleótidos empleados para la construcción de las deleciones. Se indican las posiciones que ocupan cada uno de ellos, la región que se elimina y el nombre que se le adjudica a la deleción.

<i>Kluyveromyces lactis</i>				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Región eliminada	Cebadores	Posición hibridación	Nombre	Región eliminada	Cebadores	Posición hibridación	Nombre
Dominio WRYK	ECV276	+178	K1				-----
	ECV277	+9					
Dominio conservado I	ECV278	+262	K2	Dominio conservado I	ECV286	+241	S2
	ECV279	+114			ECV287	+129	
Dominio de unión a ATP	ECV280	+325	K3	Dominio de unión a ATP	ECV288	+301	S3
	ECV281	+267			ECV289	+222	
Dominio conservado II	ECV282	+1573	K4	Dominio conservado II	ECV290	+1495	S4
	ECV283	+1491			ECV291	+1413	
Región rica en alanina	ECV284	+1708	K5	Región rica en alanina	ECV292	+1618	S5
	ECV285	+1650			ECV293	+1560	

Tabla 24. Listado de los oligonucleótidos empleados para la comprobación mediante secuenciación automática de la correcta eliminación de los dominios seleccionados para *KISRB10* y *ScSRB10*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra
ECV104	GCGACCCCTCCTGTCTGTG	Watson
ECV161	TCTTCACAGAACACGAATGG	Watson
ECV170	ATCAGGAAATGTTAGCGGG	Watson
ECV179	CTCAACAGATCCTTAATACC	Watson
ECV230	TAAACAATAGTCAAAGGCAAAA	Crick
ECV295	TAATGGCAAGGATAGAGCACA	Watson
ECV296	GACAGTGCTGTGGAATGAAAA	Crick

4.1. Fenotipos asociados a las deleciones de los dominios conservados en *KISrb10p* y *ScSRB10p*

Los plásmidos obtenidos, con las distintas deleciones de los dominios conservados de las proteínas Srb10p de ambas levaduras, se emplearon para transformar la cepa Z768 mutante *srb10* de *S. cerevisiae*, seleccionando los transformantes en placas CM-Ura-Leu.

Se analizaron los siguientes fenotipos basados en los datos previos sobre los efectos pleiotrópicos de mutaciones y deleciones de *ScSRB10*:

- Crecimiento con formación de flóculos (Holstege *et al.*, 1998)
- Crecimiento en galactosa 0,5% a 30 y 37°C (Hirst *et al.*, 1999)
- Expresión de varios genes cuya regulación depende de *SRB10* (Rupp *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 1980; Hamada *et al.*, 1998).

a) Efectos sobre el crecimiento con formación de flóculos

Para realizar las medidas de floculación, se inocularon 10 mL de medio de cultivo CM-Ura-Leu con células de la cepa de *S. cerevisiae* mutante (Δ *srb10*) Z768 transformados con cada una de las delecciones. También se midió la floculación del mutante transformado con los genes *ScSRB10* y *KISR10* completos. Como control de crecimiento sin floculación se empleó un cultivo en CM-Ura-Leu de la cepa mutante Z768 transformada con el clon *ScSRB10*YEp195. Así mismo, como control de crecimiento con formación de flóculos se empleó un cultivo del mutante Z768 en CM-Leu.

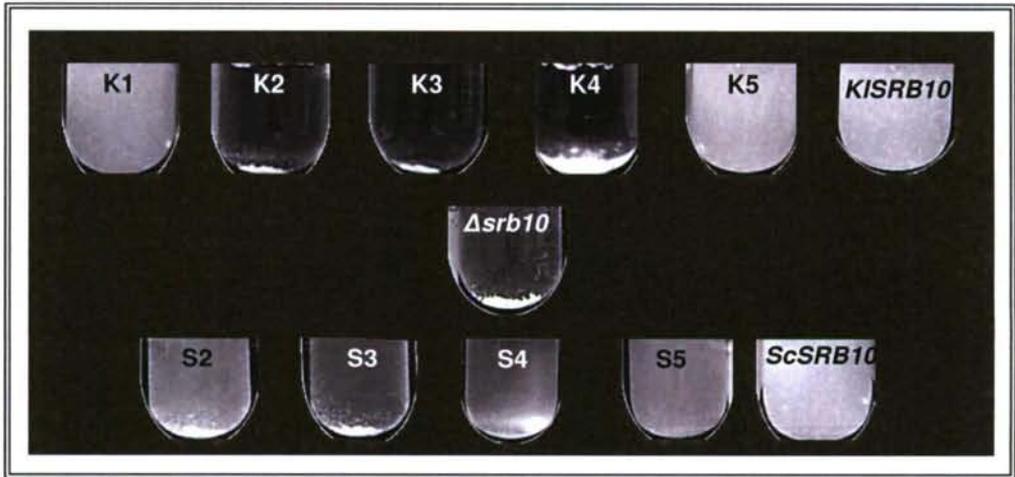


Figura 65. Medida cualitativa de la floculación para cada una de las delecciones diseñadas para *ScSRB10* y *KISR10*.

Tras analizar los resultados de floculación (figura 65) los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Tanto *KISR10* como *ScSR10* son capaces de restaurar el fenotipo silvestre de crecimiento sin formación de flóculos tal y como se observa en los tubos de crecimiento del mutante transformado con las construcciones portadoras de los genes completos.
- Tanto el dominio de unión a ATP como los dominios conservados DC-I, DC-II son fundamentales para la función de *KISrb10p* y *ScSrb10p*, como se deduce del hecho de que cuando están ausentes no se complementa el fenotipo de floculación en el mutante Z768. Sin embargo, el dominio WRKY (ausente en *S. cerevisiae*) y el dominio carboxilo terminal rico en alanina, DC-Ala, no parecen ser indispensables para la función de *KISrb10p* y *ScSrb10p*, ya que aún estando ausentes, las deleciones son capaces de complementar el fenotipo floculante.

Ya que se observaban distintos grados de floculación, se decidió cuantificarlos siguiendo los métodos previamente descritos (Samuelson *et al.*, 2003). Para ello, se realizaron cultivos del mutante transformado con cada una de las deleciones y con los genes completos en medio CM-Ura-Leu. Paralelamente se realizó un cultivo del mutante sin transformar en CM-Leu y un cultivo de la cepa silvestre en medio CM. Se dejaron crecer hasta la fase estacionaria y se disgregaron los flóculos por sonicación durante 45 segundos. A continuación, se agitaron los cultivos, se dejaron reposar encima de la poyata e inmediatamente se tomó una alícuota de 100 μL de cultivo de la zona superficial del tubo que se traspasó a un tubo *Eppendorf* junto con 900 μL de EDTA 50mM. Se consideró esta medida como la de tiempo cero y se repitió esta operación cada 20 segundos realizando un total de 11 medidas. A continuación se agitaron los tubos en el vortex y se midió la OD_{600} . Los resultados se recogen en las figuras 66A y 66B.

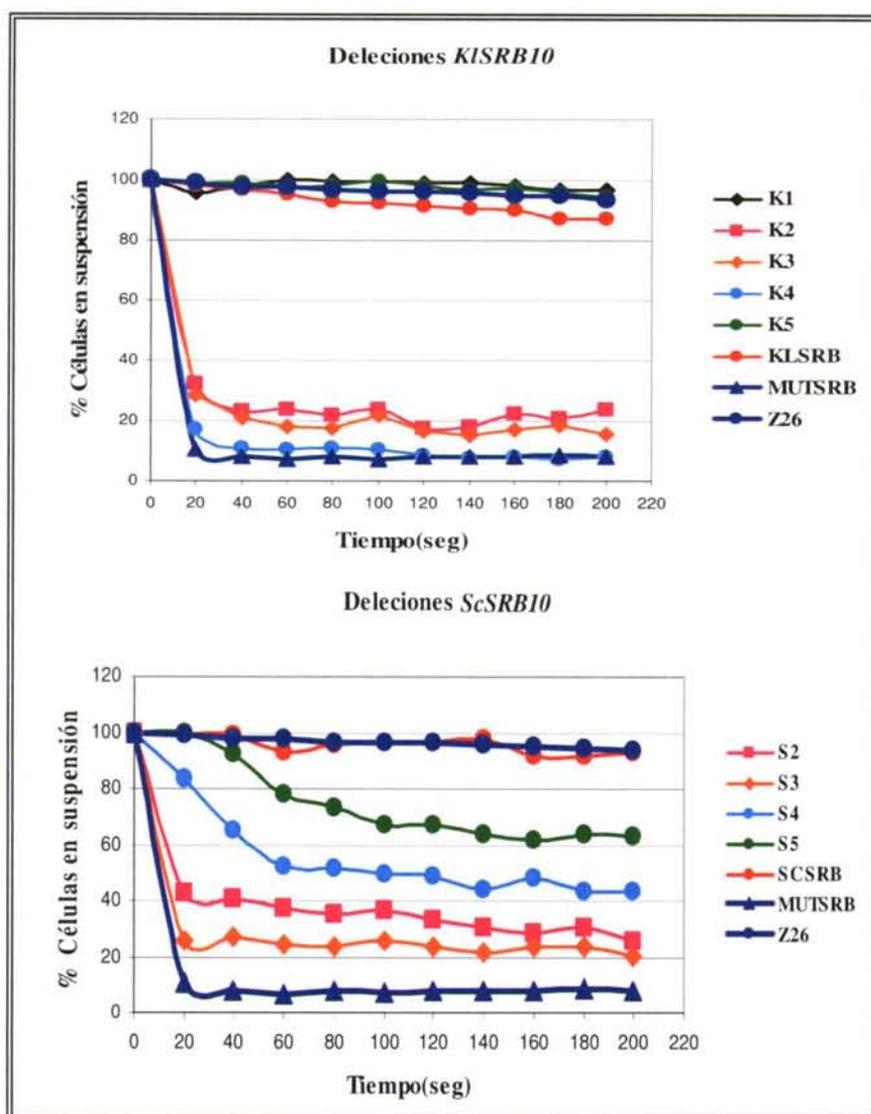


Figura 66. Medida cuantitativa del fenotipo de floculación asociado a las delecciones internas de *ScSRB10* (A) y *KISRBI0* (B).

Los resultados cuantitativos confirmaron los datos obtenidos con la observación cualitativa del fenotipo de floculación, indicando que los dominios conservados DC-I y DC-II son esenciales para la funcionalidad de las proteínas *Srb10* analizadas. En el caso de *S. cerevisiae*, los resultados obtenidos coinciden con las observaciones cualitativas, aunque las diferencias en los grados de floculación quedan aquí más evidenciadas. S2, S3 y S4, son incapaces de complementar la mutación, pero no presentan un grado de

floculación tan extremo como en el caso del mutante. S5 tampoco es capaz de restaurar completamente el crecimiento sin formación de flóculos.

b) Efectos sobre el crecimiento en galactosa como fuente de carbono a 30 y 37°C

Para el análisis del crecimiento en galactosa, se realizó un sembrado en zig-zag del mutante BY4741 Δ *srb10* (Referencia de Euroscarf Y02786) transformado con cada una de las deleciones y con el gen completo. Como control se empleó el mutante sin transformar y su silvestre BY4741 (Referencia Euroscarf Y00000). Transcurridos dos días y tras obtener colonias individuales, se escogió una de cada candidato y se resuspendió en 50 μ L de agua. A partir de esta dilución inicial, se hicieron diluciones 1/10 seriadas hasta la dilución 1/10⁴. Seguidamente, se tomaron 5 μ L de cada solución y se sembraron en placas CM galactosa al 0,5% en el caso de los dos controles, y CM-Ura galactosa 0,5% en el caso del mutante transformado con las distintas construcciones. Tras incubar un periodo de entre 6-11 días se obtuvieron los resultados siguientes (figura 67):

- El mutante BY4141 Δ *srb10* transformado con las deleciones K1 y K5 se comporta igual que el mutante transformado con el clon que contiene el gen *KISR10* original, confirmando también para este fenotipo que el dominio WRYK y el dominio DC-Ala no son esenciales para esta función de *Srb10p*. El resto de los dominios son fundamentales para el crecimiento normal a 37°C en presencia de galactosa como fuente de carbono, como puede comprobarse por el hecho de que existe disminución de crecimiento en estas condiciones.
- Ningún candidato del mutante BY4141 Δ *srb10* transformado con las deleciones de *ScSR10* es capaz de rescatar totalmente el fenotipo silvestre (crecimiento normal en medio con galactosa y a 37°C).

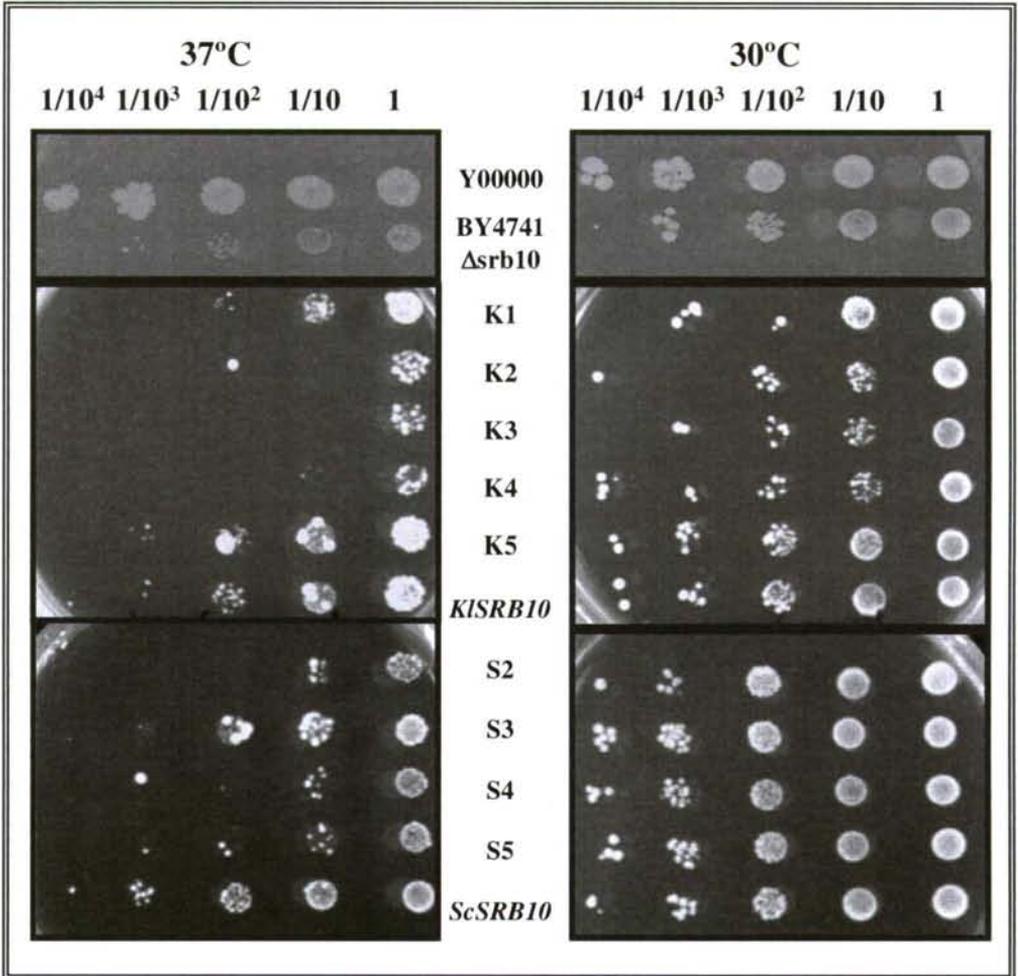


Figura 67. Estudio del fenotipo de crecimiento en galactosa a altas temperaturas para las deleciones de *ScSRB10* y *KISR B10*.

c) Efectos de las deleciones de Srb10p sobre la expresión de genes regulados por esta proteína

Se quiso también comprobar si las deleciones de estos dominios conservados en las proteínas Srb10p de levaduras afectaban a los niveles de RNAm de los genes que se sabe están regulados a nivel transcripcional por Srb10p. Se eligieron para ello tres genes de prueba de *S. cerevisiae*, uno relacionado con la floculación, *FLO11* y dos relacionados con la respuesta hipóxica *CYC7* y *SPI1*.

FLO11 es un gen de 4.104 nt que codifica para una proteína de pared celular del grupo de las floculinas y que está relacionado con el crecimiento con formación de pseudohifas y floculación (Robertson & Fink, 1998; Rupp *et al.*, 1999). Se sabe que la expresión de *FLO11* está reprimida por Sfl1p en un proceso en el que recluta al complejo Ssn6p-Tup1p, y en el que la participación de Srb10p es necesaria (Conlan & Tzamarias, 2001). *CYC7* es un gen de pequeño tamaño, 342 nt, que codifica para la isoforma 2 del citocromo *c* expresada mayoritariamente bajo condiciones de hipoxia (Montgomery *et al.*, 1980). *SPI1* codifica para una proteína de pared celular que contiene una secuencia señal para la adición de un anclaje de glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Hamada *et al.*, 1998). Este gen se encuentra reprimido por Rox1p y Srb10p (Green & Johnson, 2004).

La expresión de los genes seleccionados en el mutante Z768 transformado con las construcciones portadoras de las deleciones K1-K5 y S2-S4 se analizó mediante experimentos de *northern blot*. Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos para amplificar cada una de las sondas específicas para cada gen que luego se marcaron con ³²P tal y como se describe en materiales y métodos. Estos oligonucleótidos, sus posiciones de hibridación y las condiciones de amplificación por PCR se recogen en la tabla 25.

Tabla 25. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de sondas para los genes *ScFLO11*, *ScCYC1* y *ScSPI1* para el estudio de la expresión indirecta de *SRB10*.

Nombre	Gen en que se diseña	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV305	<i>FLO11</i>	CTCGCTTATTTGGTCCTTTCG	Watson	+39
ECV306	<i>FLO11</i>	TGTGCATGAGGTAGTGGTTGG	Crick	+843
ECV307	<i>CYC7</i>	ATGGCTAAAGAAAGTACGGGA	Watson	+1
ECV308	<i>CYC7</i>	CTATTTGGCAGCCTTTGTCA	Crick	+342
ECV343	<i>SPI1</i>	CTACGGCTCTCGGATTGG	Watson	+43
ECV344	<i>SPI1</i>	CACCAGCCAAACCTAGGG	Crick	+427

Como control interno de carga para las cuantificaciones se empleó el gen *SNR17A* (*Small Nucleolar RNA*) que codifica el snoRNA U3. Los oligonucleótidos empleados para amplificar esta sonda se denominaron U3F y U3R y sus características se recogen en la tabla 26.

Tabla 26. Listado de los oligonucleótidos empleados para la obtención de la sonda para emplear como control interno de carga en los experimentos de *northern blot*.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Posición	Hebra
U3F	CGACGTACTTCAGTATGTAA	+3	Watson
U3R	ATTTGTACCCACCCATAGAG	+475	Crick

Las hibridaciones con las sondas de *FLO11* y *CYC7* se realizaron a 58°C y las de *SPII* a 54°C. La cuantificación se llevó a cabo según se describe en material y métodos. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 68 y 69.

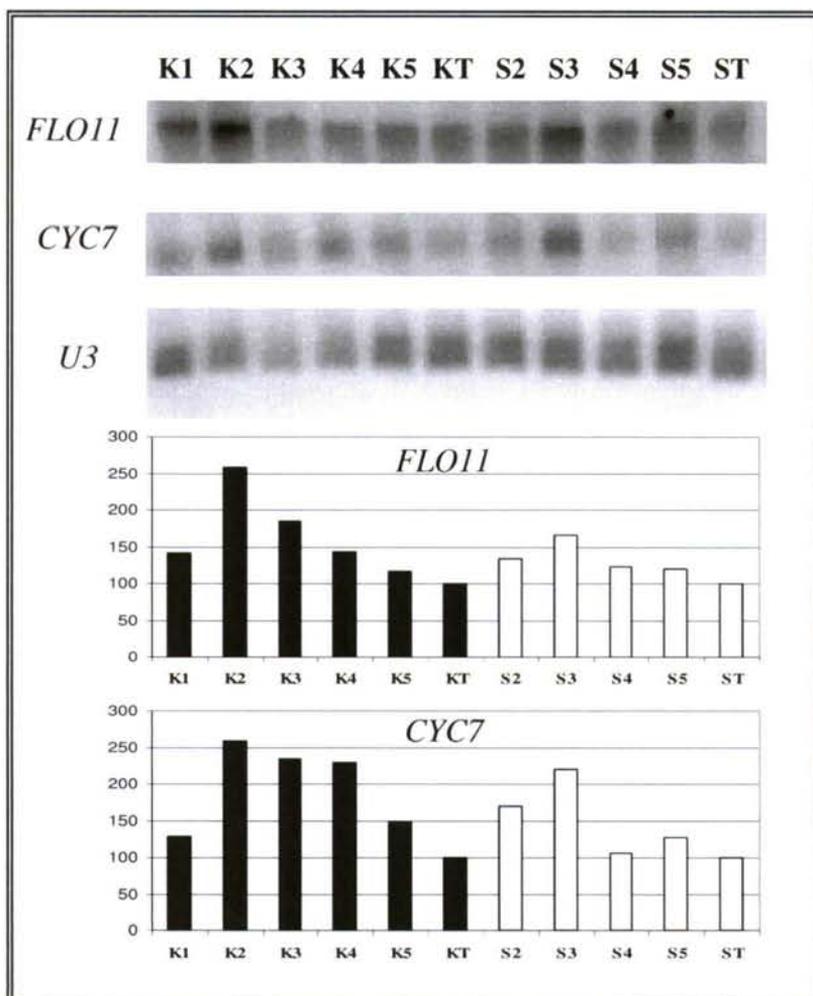


Figura 68. Resultados del análisis de la expresión mediante *northern blot* de los genes regulados por *SRB10*: *FLO11* y *CYC7*. Los datos fueron normalizados frente a la señal obtenida con el control *ScU3* (*snRNA17A*). Después de la normalización y cuantificación de la intensidad de la señal de cada banda, la intensidad correspondiente a Z768 transformada con el gen completo *SRB10* (KT para *KISR10* y ST para *ScSRB10*) fue considerada como valor 100 en unidades arbitrarias y se empleó como referencia para las otras señales.

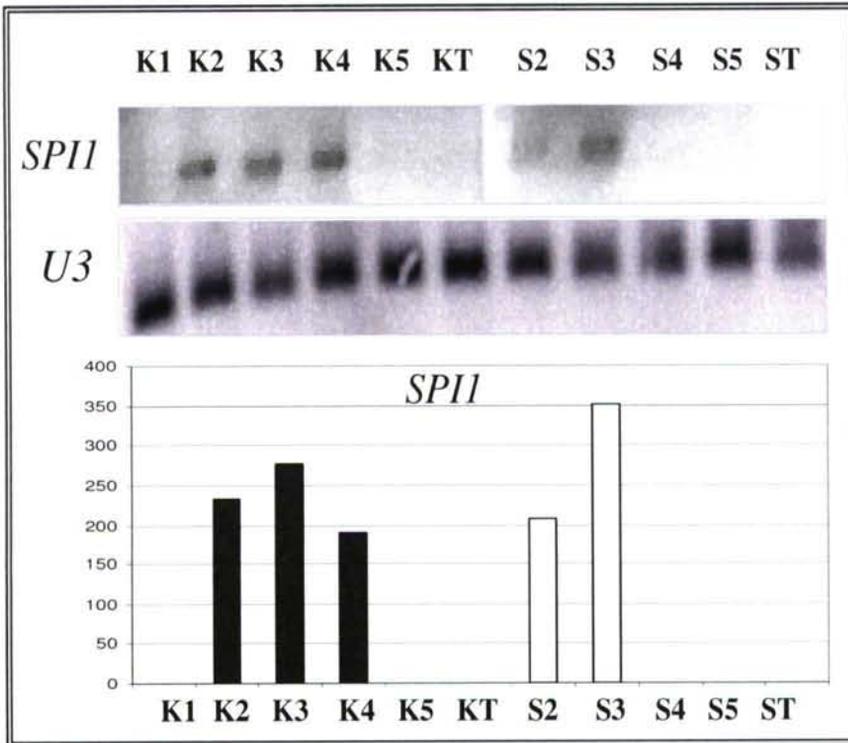


Figura 69. Resultados del análisis de la expresión mediante *northern blot* del gen regulado por *SRB10*: *SP11*. La hibridación con *ScU3* fue utilizada como control de carga. Los datos fueron normalizados frente a la señal obtenida con el control *ScU3* (*snRNA17A*). Después de la normalización y cuantificación de la intensidad de la señal de cada banda, la intensidad correspondiente a Z768 transformada con el gen completo *SRB10* (KT para *KISR10* y ST para *ScSRB10*) fue considerada como valor 0 en unidades arbitrarias y se empleó como referencia para las otras señales.

El análisis de los resultados obtenidos corrobora los datos de Conlan & Tzamarías que en 2001 probaron una desrepresión de *FLO11* en un mutante *srb10*. Parece existir necesidad de la actividad quinasa para el papel regulador de Srb10p sobre la represión transcripcional de *FLO11*. Los resultados obtenidos para la delección del dominio DC-I en la proteína ScSrb10p indican que tiene un efecto pequeño sobre la expresión de *FLO11*, en cambio la expresión heteróloga de *KISR10p* con este dominio delecionado produce mayor desrepresión.

En el caso del gen hipóxico *CYC7*, tanto el fragmento eliminado del dominio quinasa como los dominios conservados DC-I y DC-II juegan un papel en la represión de *CYC7* en condiciones aeróbicas, sin embargo la delección DC-II tiene un efecto más acusado en la proteína de *K. lactis*.

Resultados similares se obtienen al estudiar la expresión de *SPII* en que también queda de manifiesto la importancia del dominio proteína-quinasa y del DC-I. En este caso además se observa un cierto papel de DC-II sobre la expresión del gen para la proteína *K/Srb10p*.

Se puede concluir por tanto que el dominio quinasa deletado tanto de la proteína *ScSrb10p* como de *K/Srb10p* juega un papel muy importante sobre la acción represora de los genes analizados. Los dominios conservados DC-I y DC-II parecen tener también una función asociada a la represión de dichos genes. El efecto de DC-I se manifiesta tanto en *K/Srb10p* como en *ScSrb10p*, si bien DC-II tiene mayor influencia sobre la proteína de *K. lactis*.

4.2. Los dominios conservados DC-I y DC-II son necesarios para la interacción de Srb10p con Srb11p

Puesto que los dominios conservados DC-I y DC-II son necesarios para la actividad reguladora de Srb10p en la represión aeróbica de genes hipóxicos de levaduras se planteó la posibilidad de que ejercieran un papel en la interacción de Srb10p con su ciclina reguladora Srb11p.

Para ello se llevaron a cabo ensayos de doble-híbrido empleando los vectores pGAD-C2 y pGBD-C2 (James *et al.*, 1996). El gen *ScSRB11* se clonó en el vector pGAD-C2, que es el portador del dominio de activación y los genes *KISRB10* y *ScSRB10* y sus delecciones se clonaron en el vector pGBD-C2.

Se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicas (tabla 27) para amplificar los genes *SRB11* de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Para el caso de *KISRB11*, se diseñaron ECV350 y ECV351 que hibridan en las posiciones +5 y +910 respectivamente. Se caracterizan además por tener en sus extremos 5' unas secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I respectivamente. Empleando como DNA molde en una reacción de PCR, DNA genómico de la cepa Y1140 de *K. lactis*, se amplificó un fragmento de DNA de 905 pb que se clonó en los sitios *Bam*HI-*Sal*I del sitio de clonaje múltiple del vector pGAD-C2, de manera que esta secuencia quedó en pauta de lectura (*in frame*) con la región de activación del gen *GAL4* que presenta dicho vector.

Tabla 27. Listado de los oligonucleótidos empleados para la clonación y secuenciación de las delecciones para *KISR10* y *ScSRB10* así como de los genes completos en los vectores pGAD-C2 y pGBD-C2. Los sitios de corte para *Bam*HI y para *Sall* aparecen remarcados en negrita. La temperatura de hibridación seleccionada fue de 55°C.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Hebra	Posición
ECV350	GGGGGATCCGCGCCTCATACTGGGATT	Watson	+5
ECV351	GGGGT CGAC GAATTGCTGGTGTTTGTTGAC	Crick	+910
ECV352	GGGGGATCCCGGGGAGCTTCTGGACATC	Watson	+5
ECV353	GGGGT CGAC TTGCAGATGCTGGTCTAAGATACAA	Crick	+967
ECV354	GGGGGATCCATAATGGCAAGGATAGAGCACAA	Watson	+5
ECV355	GGGGT CGAC TTCTGTTTTCTTTTCGAGATGG	Crick	+1063
ECV356	GGGGGATCCACGGCAACCAACAAAACAA	Watson	+5
ECV357	GGGGT CGAC TTCTCTTTTTCCGTGCTGATC	Crick	+1777
ECV358	GGGGGATCCACGGCACGCGTCCTC	Watson	+5
ECV360	CAGGGATGTTTAATACCACTACAAT	Watson	pGAD-C2
ECV361	AGTATAGTTACATAAAAGAAGGCAAAC	Crick	pGAD-C2/pGBD-C2
ECV362	CTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGT	Watson	pGBD-C2

Del mismo modo, para clonar *ScSRB11* a partir de DNA genómico de *S. cerevisiae*, se diseñaron los oligonucleótidos ECV352 y ECV353 que hibridan en las posiciones +5 y +967 de la ORF del gen. De esta manera se amplificaron 962 pb que se clonaron en los sitios *Bam*HI-*Sall* del MCS de pGAD-C2, manteniendo la misma pauta de lectura para la región de activación de *GAL4*.

Para *ScSRB10* se diseñaron ECV354 y ECV355, posicionados en +5 y +1663, que amplifican una región de 1.658 pb que se clonó en los sitios *Bam*HI-*Sall* del MCS del vector pGBD-C2. Esta pareja de oligonucleótidos también se empleó en reacciones de PCR que utilizaron como DNA molde las delecciones diseñadas para *ScSRB10*: S2, S3, S4 y S5. De esta manera se amplificaron las secuencias con delecciones en los sitios conservados.

En el caso de *KISR10*, los pares de oligonucleótidos que se diseñaron fueron ECV356 y ECV357, posicionados en +5 y +1.777, que amplifican 1.772 pb. Al igual que en el caso de *S. cerevisiae*, al emplear como DNA molde las delecciones diseñadas (K2, K3, K4 y K5) se obtuvo la secuencia sin los dominios conservados. En este caso, para amplificar la secuencia correspondiente a la delección K1, ya que la región eliminada está muy próxima al ATG esta secuencia se modificó, de manera que se diseñó ECV358 para combinarlo con ECV357. Todos los fragmentos amplificados se clonaron en los sitios *Bam*HI-*Sall* del MCS del vector pGBD-C2. La totalidad de las construcciones fueron comprobadas mediante secuenciación con los oligos ECV360 y ECV361 que hibridan en las posiciones próximas a la región promotora y terminadora respectivamente del gen clonado en pGAD-C2. Para las construcciones obtenidas en pGBD-C2, se emplearon los cebadores ECV362 y ECV361.

Tras la obtención de todas las construcciones, se procedió a la co-transformación de la cepa PJ69-4A con cada una de las variantes de *KISRBI0* y con *KISRBI1*. De igual modo, se hizo con las variantes de *ScSRBI0* y *ScSRBI1*. Se seleccionaron los transformantes en primer lugar en CM-Leu (el vector pGAD-C2 lleva el marcador *LEU2*) y luego en CM-Leu-Trp (el vector pGBD-C2 es portador del marcador *TRP1*).

En el sistema del doble híbrido empleado (James *et al.*, 1996), además de la actividad beta-galactosidasa, existen otros dos marcadores que pueden informar de la interacción. En caso de que haya interacción y se promueva la expresión del gen *GALA*, la proteína activadora Gal4p actuará sobre los promotores de *lacZ*, *ADE2* y *HIS3* modificados a este fin. De esta manera, en caso de interacción, la cepa presentará fenotipo Ade+ y His+. Por este motivo para verificar la presencia o ausencia de interacción entre Srb11p y las distintas variantes de Srb10p obtenidas delecionando dominios específicos, se realizó una resiembra de los candidatos en placas de medio CM-Leu-Trp-Ade-His. Los resultados obtenidos analizando para cada caso un total de 4 transformantes se recogen en la tabla 28.

Tabla 28. Resumen de las interacciones en el experimento del doble híbrido. Análisis de las auxotrofías para Leu, Trp, Ade e His.

Construcciones Transformadas en PJ694-A	Crecimiento en CM-Leu-Trp-Ade-His
<i>KISRBI1</i> pGAD/K1pGBD	+
<i>KISRBI1</i> pGAD/K2pGBD	-
<i>KISRBI1</i> pGAD/K3pGBD	-
<i>KISRBI1</i> pGAD/K4pGBD	-
<i>KISRBI1</i> pGAD/K5pGBD	+
<i>KISRBI1</i> pGAD/ <i>KISRBI0</i> pGBD	+
<i>ScSRBI1</i> pGAD/S2pGBD	-
<i>ScSRBI1</i> pGAD/S3pGBD	-
<i>ScSRBI1</i> pGAD/S4pGBD	-
<i>ScSRBI1</i> pGAD/S5pGBD	+
<i>ScSRBI1</i> pGAD/ <i>ScSRBI0</i> pGBD	+

Cuando se cuantificó la actividad β -galactosidasa con células permeabilizadas los resultados obtenidos coinciden con lo observado con los otros dos marcadores en placa, y se reflejan en la figura 70.

Como se puede observar para la proteína *KlSrb10p*, la actividad obtenida en el caso de la eliminación del dominio WRKY (K1), y al delecionar DC-Ala (K5) es semejante a la de la interacción silvestre (KT en el gráfico). Por tanto el dominio WRKY, específico de *KlSrb10p*, y dominio final DC-Ala, presente tanto en la proteína de *K. lactis* como en la de *S. cerevisiae*, no son fundamentales para la interacción entre la ciclina y su quinasa. Sin embargo la delección del dominio de unión a ATP o cualquiera de los dominios DC-I y DC-II produce una incapacidad para promover la interacción tanto en la asociación *ScSrb10p/ScSrb11p* como en la asociación *KlSrb10p/KlSrb11p*.

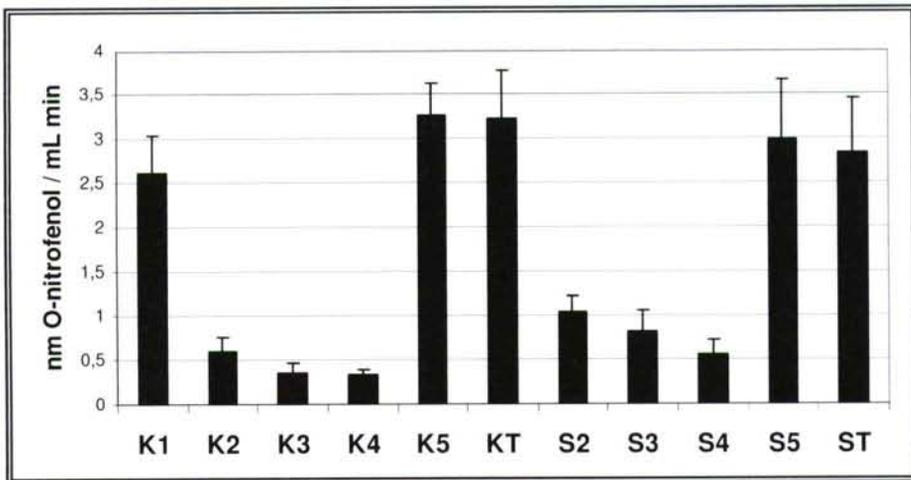


Figura 70. Resultados del análisis de interacción entre *SRB11* y las delecciones de *SRB10* en *S. cerevisiae* y *K. lactis*. KT y ST representan los controles positivos de interacción utilizando las construcciones con los genes *SRB10* y *SRB11* completos.

4.3. Los dominios conservados DC-I y DC-II son necesarios para la interacción de Srb10p con Tup1p

Los dominios DC-I y DC-II parecen fundamentales en la represión de la expresión los genes analizados. Ya que la represión ejercida por Srb10p sobre determinados genes está mediada por el reclutamiento del complejo Ssn6-Tup1 tras una interacción directa de Tup1p con Srb10p (Zaman *et al.*, 2001), se decidió comprobar si estos dominios eran fundamentales para esta interacción.

Al igual que en el apartado precedente, se empleó el método del doble híbrido (James *et al.*, 1996). Para ello se procedió a la clonación del gen *ScTUP1* en el vector pGAD-C2 mediante el diseño de los oligonucleótidos ECV412 (GGGATCGATCTGCCAGCGTTTCGAATAC) y ECV413 (GGGCTGCAGTTGGCGCTATTTTTTATACTTC) que hibridan en las posiciones +5 y +2.137 y que se caracterizan por llevar unos sitios de reconocimiento para las endonucleasas *ClaI* y *PstI* respectivamente (resaltados en negrita). En una reacción de PCR empleando DNA genómico de *S. cerevisiae* como molde, se amplificaron un total de 2.133 pb que se clonaron en los sitios *ClaI* y *PstI* de pGAD-C2. Una vez obtenida esta construcción, se procedió a la transformación de la cepa PJ69-4A seleccionando los candidatos en CM-Leu. Seguidamente se realizó la transformación con los genes *ScSRB10* y las delecciones diseñadas para el mismo (S2-S3-S4-S5) y con *KISRB10* y sus delecciones (K1-K2-K3-K4-K5) seleccionando en este caso en placas CM-Leu-Trp. Los ensayos de beta-galactosidasa se realizaron por el método de permeabilización de células (materiales y métodos).

Se observa que para la proteína *KISrb10p*, la actividad obtenida en el caso de la eliminación del dominio WRKY (K1), y al delecionar DC-Ala (K5) no disminuye notablemente respecto a la de la interacción silvestre (KT en el gráfico). Se deduce por ello que el dominio WRKY, específico de *KISrb10p*, y dominio final DC-Ala presente en la proteína de *K. lactis*, no son fundamentales para la interacción entre *ScTup1p* y *KISrb10p*. Sin embargo, el DC-Ala en *ScSRB10* si tiene cierta influencia en esta interacción, ya que la actividad beta-galactosidasa medida es muy inferior a la del control positivo ST. La delección del dominio de unión a ATP (S3 o K3) o cualquiera de los dominios DC-I y DC-II produce una incapacidad para las interacciones *ScSrb10p/ScTup1p* y *KISrb10p/ScTup1p*.

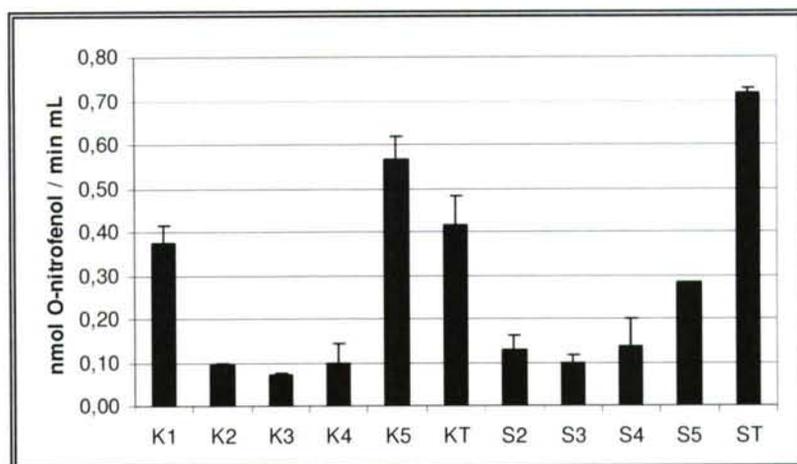


Figura 71. Resultados del análisis de interacción entre *ScTUP1* y las delecciones de *SRB10* en *S. cerevisiae* y *K. lactis*. KT y ST representan los controles positivos de interacción utilizando las construcciones con los genes *ScSRB10* y *KISR10* completos.

5.DISCUSIÓN.

En levaduras existen al menos 4 quinasas capaces de fosforilar el dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II (Kin28p, Ctk1p, Bur1p y *Srb10p*) (Wilcox *et al.*, 2004). En los procesos de iniciación y elongación de la transcripción el estado de fosforilación de las repeticiones de CTD tiene un importante papel regulador (Hengartner *et al.*, 1998). CTD consiste en una serie de repeticiones de 7 aminoácidos que se repiten 27 veces en la proteína de levaduras y hasta 52 en la proteína homóloga de mamíferos (Allison *et al.*, 1985; Corden *et al.*, 1985). Se necesita que CTD esté desfosforilado para que se produzca el ensamblaje del complejo de preinicio (PIC) en los promotores de los genes que van a ser transcritos. El paso de la fase de inicio a la de elongación de la transcripción requiere al factor general TFIIF que fosforila a CTD aunque otras quinasas pueden contribuir a esta fosforilación entre ellas *Srb10p*. Se ha propuesto que la fosforilación de CTD previa a la formación del PIC tiene un efecto represor de la transcripción, mientras que la fosforilación posterior a la formación del PIC tiene un efecto activador. En esta fosforilación, previa o posterior a la formación del PIC, jugarían un papel alternativo las quinasas de levaduras *Srb10p* y Kin28p (Hengartner *et al.*, 1998). CTD también se requiere para el *splicing* del pre-mRNA y la poliadenilación. Kin28p, asociada el factor TFIIF facilita el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento del RNA a la RNA polII, concretamente de la enzima de

capping guanilil-transferasa, Ceg1p (Rodríguez *et al.*, 2000). Para asociarse con la maquinaria de *splicing* es necesario que CTD esté fosforilado. En las células el grado de fosforilación de CTD está regulado de forma precisa por el balance entre proteín-quinasas y fosfatasas. Los programas de desarrollo y de adaptación a las condiciones ambientales pueden influir sobre este balance y afectar por tanto de forma general al metabolismo del RNAm.

Al comparar las secuencias de los genes *KISR10* y *ScSRB10* con las de otros genes correspondientes a proteín-quinasas relacionadas con Srb10p de eucariotas superiores, se pudo comprobar la existencia de una región muy poco conservada de longitud variable entre 258 y 324 nucleótidos. Como se ha comentado, se requiere CTD fosforilado para que Kin28p facilite el reclutamiento de la maquinaria de procesamiento de RNA a la RNA polimerasa II y se planteó la hipótesis de si la maquinaria de procesamiento tendría como sustrato a un supuesto pre-RNA de la propia Srb10p. En condiciones de transcripción/procesamiento activo este mecanismo permitiría acompañar ambos procesos. Los experimentos realizados mediante la determinación del tamaño de fragmentos específicos amplificados a partir del DNAc de *KISR10*, así como la inexistencia de consensos típicos de intrones en levaduras, analizados mediante el programa EXPLORA (Kalogeropoulos, 1995), permiten descartar que la región analizada de *KISR10* sea procesada por *splicing*, al menos en las condiciones analizadas.

En *S. cerevisiae* la actividad quinasa de Srb10p se ha relacionado directamente con la huella característica del centro activo de las Ser/Thr proteín-quinasas, conservada entre las posiciones 282-294, ya que una mutación en la Lys 288 causa el mismo fenotipo que el alelo nulo (Surosky *et al.*, 1994). Los estudios realizados en este trabajo con las proteínas Srb10p de *K. lactis* y *S. cerevisiae* delecionadas en una región del dominio proteín-quinasa (posiciones 90-108 en *KISrb10p* y 75-93 en *ScSrb10p*) muy alejada de la huella Ser/Thr quinasa, permiten afirmar que la región delecionada, que incluye el sitio de unión de ATP, es también importante para la función de Srb10p tanto en lo que se refiere a su función reguladora sobre la transcripción de los genes *FLO11*, *SPI1* y *CYC7* como en la coincidencia de varios fenotipos asociados al alelo nulo de Srb10p: floculación y dificultad para el crecimiento en galactosa a 37°C.

Por otra parte, al comparar las secuencias conservadas en las proteínas Srb10p de levaduras con otras proteín-quinasas relacionadas, incluida la proteína Cdk8p homóloga a Srb10p en mamíferos, se identificaron una serie de regiones muy

conservadas en levaduras y ausentes en las proteín-quinasas de otros orígenes. El denominado dominio DC-I, situado en el extremo amino, consta de 29 aminoácidos de los que 17 son idénticos en las tres secuencias disponibles de Srb10p de levaduras. El dominio DC-II, más cercano al extremo carboxilo, está integrado por 27 aminoácidos y es muy rico en asparragina. La región carboxilo terminal contiene una secuencia conservada con 10 alaninas consecutivas, DC-Ala, y es rica en asparraginas. La región amino terminal de la proteína es rica en glutamina. Además, en la proteína de *K. lactis*, pero no en las otras dos, en esta región amino terminal aparece una secuencia con cierta similitud al dominio WRKY característico de factores transcripcionales en plantas. Tanto el dominio DC-I como DC-II son fundamentales para la función de *K/Srb10p* y *ScSrb10p*, como se deduce del hecho de que cuando están ausentes no se complementa el fenotipo de floculación en el mutante $\Delta srb10$ de *S. cerevisiae* ni mejora su capacidad de crecimiento en galactosa a 37°C. Sin embargo, el dominio WRKY (ausente en *S. cerevisiae*) y el dominio final rico en alanina, DC-Ala, no parecen ser indispensables para la función de *K/Srb10p* y *ScSrb10p*, ya que aún estando ausentes, las proteínas delecionadas son capaces de revertir los dos fenotipos analizados en el mutante $\Delta srb10$.

Srb10p juega un importante papel en la regulación transcripcional de muchos genes en unos casos con un efecto activador y en otros con un efecto represor. El efecto activador de Srb10p sobre la transcripción se ha atribuido a su papel promotor de la formación del PIC a través de fosforilaciones que afectan al complejo mediador y sobre todo a su papel sobre la transición desde la fase de inicio a la de elongación. El complejo mediador se requiere para la regulación transcripcional *in vivo* e *in vitro* y está conservado en todos los eucariotas. El complejo mediador de *S. cerevisiae* puede considerarse integrado por dos submódulos: Rgr1 y Srb4. El subcomplejo Rgr1 está a su vez integrado por el módulo Gal11 (Gal11, Sin4, Hrs1, y Med2) que une activadores, y el módulo Med9/10 (Med1, Med4, Med9, Med10, Med7 y Srb7) que se requiere tanto para la activación transcripcional como para la represión (Kang *et al.*, 2001). La quinasa Srb10p, integrada en el subcomplejo Srb8/9/10/11 (Borggreffe *et al.*, 2002) interactúa con el mediador y fosforila la subunidad Med2 lo que sugiere que las modificaciones post-traduccionales del mediador son muy importantes en la regulación génica (Hallberg *et al.*, 2004). Además Srb10p fosforila a varios activadores transcripcionales durante el proceso de activación transcripcional y se ha demostrado que se produce una interacción entre Srb10p (asociada a su ciclina Srb11p) y el dominio ácido de los activadores,

fosforilando regiones internas o adyacentes a dicho dominio (Ansari *et al.*, 2002, Ansari *et al.*, 2005; Balciunas *et al.*, 2003).

Por el momento el papel de Srb10p en la represión génica se explica por diversos tipos de mecanismos. Uno de ellos es mediante la fosforilación de CTD previa a la formación del PIC, lo que impediría el establecimiento de este complejo (Hengartner *et al.*, 1998). Otro mecanismo represor puede actuar por su papel sobre componentes represores del complejo mediador como el subcomplejo Med9/10, ya que las proteínas del submódulo Med9 interaccionan genética y físicamente con Srb10/Srb11p (Kang *et al.*, 2001). Finalmente se ha demostrado que Srb10/11p pueden promover la rápida degradación, mediante exportación del núcleo al citoplasma, de factores transcripcionales activadores específicos causando así represión de los genes correspondientes (Chi *et al.*, 2001).

En este trabajo se ha analizado el papel que los dominios conservados DC-I, DC-II y DC-Ala tienen en la represión mediada por Srb10p sobre un gen relacionado con la floculación (*FLO11*) y dos genes hipóxicos (*CYC7* y *SPI1*). Los dominios DC-I y DC-II parecen tener un papel sobre la represión de estos genes, en distinta medida para cada gen analizado y también con algunas diferencias si el ensayo se realiza con la proteína de *S. cerevisiae* o de *K. lactis*. Sin embargo el dominio DC-Ala no juega ningún papel en dicho proceso represor para ninguno de los genes analizados y con independencia del origen de la proteína. El potencial dominio WRKY, exclusivamente presente en la proteína Srb10p de *K. lactis* tampoco parece tener ninguna relevancia funcional en el mecanismo represor de Srb10p sobre la transcripción de los genes analizados.

El hecho de que los dominios conservados DC-I y DC-II tengan un papel importante en la función de Srb10p, indica que sólo la actividad quinasa de Srb10p no es suficiente para explicar su función, y concretamente tampoco lo es para explicar su función relacionada con procesos que implican represión transcripcional. Estos resultados son coherentes con los datos aportados por Watson y Davey (1998) que indican que el gen *ScPRK1* de *S. pombe* que codifica para una quinasa relacionada con Srb10p pero que carece de dominios conservados típicos de ésta última, complementa la mutación *srb10* sólo de forma parcial. También están en consonancia con los datos aportados por Tassan y colaboradores que indican que Cdk8 humana, sin dominios DC-I ó DC-II, tampoco es capaz de complementar la mutación *srb10* (Tassan *et al.*, 1995).

La actividad quinasa de Srb10p está dirigida hacia varios sustratos: la región CTD de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II (Liao *et al.*, 1995), subunidades del complejo mediador (Hallberg *et al.*, 2004) o zonas cercanas a los dominios activadores de factores transcripcionales activadores (Ansari *et al.*, 2005). La forma tradicional por la que las quinasas que participan en el ciclo de regulación celular son dirigidas hacia distintos sustratos es por medio de su interacción específica con ciclinas que a su vez interaccionan con los sustratos específicos. Sin embargo, Srb10p y otras quinasas relacionadas con la transcripción están asociadas a una sola ciclina, en el caso de Srb10p con la ciclina Srb11p (Liao *et al.*, 1995). Por tanto la especificidad no está determinada por la ciclina sino por otro tipo de interacciones directas o indirectas que podrían ser variables para cada sustrato. Sin embargo, la actividad quinasa de Srb10p no se detecta en ausencia de la ciclina, por lo que esta interacción entre el par ciclina-quinasa puede tener un papel modulador sobre la actividad quinasa, de hecho se conocen algunos mecanismos de regulación transcripcional mediados por la degradación de Srb11p (Cooper & Strich, 2002).

El dominio caracterizado para la interacción de Srb10p con Srb11p es el denominado sitio PSTAIRE. Este sitio se corresponde con la secuencia QSACRE (Kuchin *et al.*, 1998) localizada entre los aminoácidos 201-207 o 226-232 en Srb10p de *S. cerevisiae* y *K. lactis* respectivamente, y que forma parte del dominio quinasa conservado; pero cabe plantearse que existan sitios adicionales para la interacción Srb10p/Srb11p que a su vez puedan afectar a la estabilidad del complejo o puedan favorecer conformaciones necesarias para la interacción con otras proteínas que participan en el mecanismo represor. A fin de verificar si los dominios conservados DC-I y DC-II o el dominio de unión a ATP, que como se ha visto tienen un papel en la función represora de Srb10p sobre la transcripción de genes específicos, o incluso otros que no desempeñan este papel, como DC-Ala o el supuesto dominio WRKY, tienen importancia en la formación del complejo ciclina-quinasa, se analizó dicha interacción. Los estudios se realizaron tanto con la proteína Srb10p nativa, como con las deleciones obtenidas para cada uno de estos dominios. Para ello se utilizó el sistema del doble-híbrido y los resultados obtenidos indican una concordancia perfecta entre la necesidad de un determinado dominio para la función represora y para la interacción con Srb11p. Concretamente los dominios DC-I y DC-II y el dominio de unión a ATP son necesarios para que se produzca interacción y los dominios DC-Ala y WRKY son totalmente dispensables.

Dos de los genes que se han elegido como reporteros de la función de Srb10p al realizar este estudio, *FLO11* y *CYC7* tienen una característica en común y es que presentan en sus promotores sitios reguladores necesarios para la interacción con represores específicos que reclutan a su vez al complejo co-represor Ssn6/Tup1. Sfl1p es el represor que actúa sobre el promotor de *FLO11* reclutando al co-represor Ssn6-Tup1 (Conlan & Tzamarias, 2001) y Rox1p es el represor que actúa en el promotor de *CYC7* para reclutar al co-represor Tup1-Ssn6p (Zhang *et al.*, 1991). Ensayos del doble híbrido nos indican que Srb10p no parece interactuar con Rox1p de modo directo (Becerra *et al.*, 2002). Se ha demostrado mediante el sistema *split-ubiquitin* que Srb11p puede interactuar directamente con Tup1p *in vivo* (Schuller & Lehming, 2003), también se produce una interacción directa de Tup1p con Srb10p (Zaman *et al.*, 2001). En este trabajo se ha podido demostrar que los dominios DC-I, DC-II, y en cierta medida DC-Ala, de Srb10p son necesarios para la interacción con Tup1p.

El hecho de que los mismos dominios conservados de Srb10p (DC-I y DC-II) sean necesarios para la interacción con Srb11p y Tup1p sugiere que su papel sea en gran medida estructural, potenciando una conformación de Srb10p capaz de interactuar con ambas proteínas. Aunque es posible modelar por homología el dominio quinasa de Srb10p, dado que es muy similar al de otras proteínas-quinasa para las que se han establecido modelos tridimensionales por difracción de rayos X, no hemos obtenido ningún resultado satisfactorio al intentar construir modelos que incluyan también a los dominios DC-I, DC-II o DC-Ala. Por tanto serán necesarios futuros estudios sobre la estructura tridimensional de la proteína Srb10p para poder verificar esta hipótesis.

Teniendo en cuenta todos estos datos se propone un mecanismo de acción de Srb10p en la regulación transcripcional que podría explicar el papel de estas nuevas interacciones que se establecen con la participación de dominios específicos de Srb10p distintos del PSTAIRE. Puesto que la interacción de Srb10p con Srb11p es siempre necesaria tanto en los procesos de activación como en los de represión, es probable que diferentes conformaciones del complejo formado por el par ciclina/quinasa sean necesarias para la interacción con el co-represor o con otras proteínas que participan en la represión o en la activación. Además el hecho de que el DC-I presente varias serinas que podrían servir como puntos de fosforilación del propio factor Srb10p por otras quinasa que participan en la transducción de señales, sugiere que las distintas interacciones/conformaciones podrían venir reguladas por fosforilación/desfosforilación

de Srb10p, aunque por el momento no se han descrito ni las quinasas ni las fosfatasas que participarían en este proceso de regulación de Srb10p.

CONCLUSIONES

1.- Mediante la técnica de *DCbyPCR* se han clonado los genes *KIHEM12*, *KIHAP1* y *KISRB10* de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Para *KIHEM12* y *KISRB10* se ha demostrado su funcionalidad en la levadura, mediante verificación de su transcripción o interrupción del gen y verificación de fenotipos asociados. Todos los genes, y las proteínas codificadas, muestran gran similitud con sus homólogos de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, *KIHEM12* y *KISRB10* complementan respectivamente las mutaciones *hem12* y *srb10* en *S. cerevisiae*. Sin embargo, *KIHAP1* bajo el control de su propio promotor no es capaz de complementar la mutación *hap1* de *S. cerevisiae*.

2.- Se ha analizado, mediante *northern blot*, *primer extension*, y fusiones del promotor al gen reportero *lacZ* la expresión de *KIHEM12* en *K. lactis*. La expresión transcripcional de *KIHEM12* es dependiente de cepa. El promotor puede considerarse como TATA-less con múltiples sitios de inicio de la transcripción sin preferencia definida por ninguno de ellos. La transcripción aerobia de *KIHEM12* no responde a hemo pero sí muestra una ligera activación por fuentes de carbono no fermentables. En relación con esta activación, se ha podido demostrar que la caja CCAAT, en la posición -389/-385, es necesaria para la función del complejo activador Hap2/3/4/5p. En un mutante *hap3* de *K. lactis* se produce una disminución de la transcripción de *KIHEM12*, lo que demuestra la implicación del complejo Hap2/3/4/5p en este sistema de regulación.

3.- Se han analizado diversas regiones del promotor de *KIHEM1* que son responsables de su expresión y regulación transcripcional. Mediante análisis de *primer extension* se han localizado los puntos de inicio en las posiciones -71, -69, -66, -58 y -48, siendo esta última predominante. Mediante ensayos de deleciones y mutagénesis dirigida hacia regiones concretas del promotor fusionado a *lacZ* se ha verificado la importancia del elemento rico en pirimidinas, localizado entre las posiciones -412 y -378, para determinar elevados niveles de expresión tanto en condiciones aerobias como anaerobias. En relación con la regulación del gen en respuesta a la presencia de fuentes de carbono fermentables o no fermentables, es muy pequeña. La participación en esta respuesta del consenso CCAAT para la unión del complejo Hap2/3/4/5p, situado en las posiciones -656/-649, ha quedado descartada. El sitio *cis* para la unión de Gcr1p tiene un efecto represor en medios con glucosa al 2%. El consenso para la unión de Buf1p,

que en el promotor del gen homólogo de *S. cerevisiae* tiene un efecto represor, no muestra un claro papel regulador ni en condiciones aeróbicas ni hipóxicas. En la región situada entre las posiciones -558 a -443 se localiza una señal necesaria para la expresión hipóxica y la respuesta a hemo.

4.- Tras clonar el gen *KISRB10* y realizar un alineamiento de la proteína con otras proteínas Srb10p, o proteína-quinasa relacionadas, de distintos orígenes, se pudo observar que las de levaduras presentaban una serie de motivos altamente conservados cuya funcionalidad se quiso comprobar. Para ello se realizaron una serie de deleciones de cada uno de ellos, tanto sobre la proteína Srb10p de *K. lactis* como sobre la de *S. cerevisiae*. Los motivos denominados DC-I y DC-II y el motivo de unión a ATP son esenciales para la función de Srb10p *in vivo* como queda demostrado por los efectos de su deleción sobre los fenotipos asociados y sobre la expresión transcripcional de los genes *FLO11*, *CYC7* y *SPII*. Además se ha podido comprobar que estos motivos son necesarios, de forma directa o indirecta, para que se produzca la interacción entre la quinasa y su ciclina Srb11p, así como para la interacción con el represor Tup1p. Otro motivo también conservado, DC-Ala, cercano al extremo carboxilo terminal, carece de relevancia funcional en la interacción con Srb11p, aunque tiene cierta influencia en la interacción con Tup1p. El motivo WRKY, únicamente presente en la proteína de *K. lactis* y cercano al extremo amino, no parece esencial en los fenotipos e interacciones analizados.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS A., GOTTSCHLING D. E. & STEARNS T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA.
- ADAMS M. D., CELNIKER S. E., HOLT R. A., EVANS C. A., GOCAYNE J. D., AMANATIDES P. G., SCHERER S. E., LI P. W., HOSKINS R. A., GALLE R. F., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**: 2185-2195.
- ALLISON L. A., MOYLE M., SHALES M. & INGLES C. J. (1985). Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell*, **42**: 599-610.
- AMILLET J. M. & LABBE-BOIS R. (1995). Isolation of the gene *HEM4* encoding uroporphyrinogen III synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**: 419-424.
- ANSARI A. Z., KOH S. S., ZAMAN Z., BONGARDS C., LEHMING N., YOUNG R. A. & PTASHNE M. (2002). Transcriptional activating regions target a cyclin-dependent kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 14706-14709.
- ANSARI A. Z., OGIRALA A. & PTASHNE M. (2005). Transcriptional activating regions target attached substrates to a cyclin-dependent kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 2346-2349.
- 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.
- BALASUBRAMANIAN B., LOWRY C. V. & ZITOMER R. S. (1993). The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 6071-6078.
- BALCIUNAS D. & RONNE H. (1995). Three subunits of the RNA polymerase II mediator complex are involved in glucose repression. *Nucleic Acids Res.*, **23**: 4421-4425.
- BALCIUNAS D., HALLBERG M., BJORKLUND S. & RONNE H. (2003). Functional interactions within yeast mediator and evidence of differential subunit modifications. *J. Biol. Chem.*, **278**: 3831-3839.
- BARNETT J. A., PAYNE R. W. & YARROW D. (1990). *Yeast: Characteristics and Identification*, 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- BECERRA M., LOMBARDIA-FERREIRA L. J., HAUSER N. C., HOHEISEL J. D., TIZON B. & CERDAN M. E. (2002). The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *hap1*, *rox1*, *rox3* and *srb10* deletions. *Mol. Microbiol.*, **43**: 545-555.
- BIANCHI M. M., SANTARELLI R. & FRONTALI L. (1989). Active recombination of *pKDI*-derived vectors with resident *pKDI* in *Kluyveromyces lactis* transformation. *Curr. Genet.*, **15**: 253-260.
- BILLARD P., MENART S., BLAISONNEAU J., BOLOTIN-FUKUHARA M., FUKUHARA H. & WESOLOWSKI-LOUVEL M. (1996). Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J. Bacteriol.*, **178**: 5860-5866.
- 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. & WESOLOWSKI-LOUVEL M. (2000). Genomic exploration of hemiascomycetous yeast: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett.*, **487**: 66-70.

- BORGGREFE T., DAVIS R., ERDJUMENT-BROMAGE H., TEMPST P. & KORNBERG R. D. (2002). A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J. Biol. Chem.*, **277**: 44202-44207.
- BORRALHO L. M., MALAMUD D. R., PANEK A. D., TENAN M. N., OLIVEIRA D. E. & MATTOON J. R. (1989). Parallel changes in catabolite repression of haem biosynthesis and cytochromes in repression-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**: 1217-1227.
- BORRALHO L. M., PANEK A. D., MALAMUD D. R., SANDERS H. K. & MATTOON J. R. (1983). In situ assay for 5-aminolevulinate dehydratase and application to the study of a catabolite repression-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Bacteriol.*, **156**: 141-147.
- BOSE S., DUTKO J. A. & ZITOMER R. S. (2004). Genetic Factors That Regulate the Attenuation of the General Stress Response of Yeast. *Genetics*, **15**: en imprenta
- BOTSTEIN D., FALCO S. C., STEWART S. E., BRENNAN M., SCHERER S., STICHCOMB 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.
- BOURDINEAUD J. P. (2000). At acidic pH, the diminished hypoxic expression of the *SRP1/TIR1* yeast gene depends on the GPA2-cAMP and HOG pathways. *Res. Microbiol.*, **151**: 43-52.
- BOURGAREL D., NGUYEN C. C. & BOLOTIN-FUKUHARA M. (1999). HAP4, the glucose-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.
- BRABAZON E. D., BREE R. T., CARTON M. W., GREALY M. & BYRNES L. (2002). Cyclin-dependent kinase 8 is expressed both maternally and zygotically during zebrafish embryo development. *Biochim. Biophys. Acta*, **1576**: 203-208.
- BRACHMANN C. B., DAVIES A., COST G. J., CAPUTO E., LI J., HIETER P. & BOEKE J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**: 115-132.
- 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.
- BREUNIG K. D. (1989). Glucose repression of *LAC* gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. *Mol. Gen. Genet.*, **216**: 422-427.
- BUISSON N. & LABBE-BOIS R. (1998). Flavohemoglobin expression and function in *Saccharomyces cerevisiae*. No relationship with respiration and complex response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **273**: 9527-9533.
- BULDER C. J. (1964a). Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, **30**: 1-9.
- BULDER C. J. (1964b). Lethality of the petite mutation in petite negative yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*, **30**: 442-454.
- BUNN H. F. & POYTON R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.* **76**: 839-885.

- CADAHÍA-RODRÍGUEZ J. L. (1996). Clonación del gen *ROX6* de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña.
- CASADABAN M. J. & COHEN S. N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **138**:179-207.
- CASSART J. P., GEORIS L., OSTLING J., RONNE H., VANDENHAUTE J. (1995). The MIG1 repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **371**: 191-194.
- CERDAN M. E. & ZITOMER R. S. (1988). Oxygen-dependent upstream activation sites of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c genes are related forms of the same sequence. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 2275-2279.
- CHANG Y. W., HOWARD S. C., BUDOVSKAYA Y. V., RINE J. & HERMAN P. K. (2001). The rye mutants identify a role for Ssn/Srb proteins of the RNA polymerase II holoenzyme during stationary phase entry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **157**: 17-26.
- CHANTREL Y., GAISNE M., LIONS C. & VERDIERE J. (1998). The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics*, **148**: 559-569.
- CHARNAY P. & MANIATIS T. (1983). Transcriptional regulation of globin gene expression in the human erythroid cell line K562. *Science*, **220**: 1281-1283.
- CHELSTOWSKA A., ZOLADEK T., GAREY J., KUSHNER J., RYTKA J. & LABBE-BOIS R. (1992). Identification of amino acid changes affecting yeast uroporphyrinogen decarboxylase activity by sequence analysis of *hem12* mutant alleles. *Biochem. J.*, **288**: 753-757.
- CHEN J. J. & LONDON I. M. (1995). Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem. Sci.*, **20**: 105-108.
- CHEN, X. J., WÉSOŁOWSKI-LOUVEL, M. & FUKUHARA, H. (1992). Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.*, **233**: 97-105.
- CHESTOWSKA A. & RYTKA J. (1993). Heme biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Postpy. Biochem.*, **39**: 173-185.
- CHEUK R., CHEN H., KIM C. J., SHINN P. & ECKER J. R. *Arabidopsis* ORF clones. Sin publicar.
- CHI Y., HUDDLESTON M. J., ZHANG X., YOUNG R. A., ANNAN R. S., CARR S. A. & DESHAIES R. J. (2001). Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev.*, **15**: 1078-1092.
- CHOI J. Y., STUKEY J., HWANG S. Y. & MARTIN C. E. (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated repression of the *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene. *J. Biol. Chem.*, **271**: 3581-3589.
- CHOMCZYNSKI P. & SACCHI N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.*, **162**:156-159.
- CHU S., DeRISI J., EISEN M., MULHOLLAND J., BOTSTEIN D., BROWN P. O. & HERSKOWITZ I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science*, **282**: 699-705.

- CHURCH G. M. & GILBERT W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 1991-1995.
- CLAVILIER L., PERE G. & SLONIMSKI P. P. (1969). Demonstration of several independent loci involved in the synthesis of iso-2-cytochrome c in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **104**: 195-218.
- CONLAN R. S. & TZAMARIAS D. (2001). Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2. *J. Mol. Biol.*, **309**: 1007-1015.
- COOPER K. F. & STRICH R. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p is required for efficient induction and execution of meiotic development. *Eukaryot. Cell.*, **1**: 66-74.
- CORDEN J. L., CADENA D. L., AHEARN J. M. JR. & DAHMUS M. E. (1985). A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7934-7938.
- CREUSOT F., VERDIERE J., GAISNE M. & SLONIMSKI P. P. (1988). *CYP1 (HAP1)* regulator of oxygen-dependent gene expression in yeast. I. Overall organization of the protein sequence displays several novel structural domains. *J. Mol. Biol.*, **204**: 263-276.
- CRISP R. J., POLLINGTON A., GALEA C., JARON S., YAMAGUCHI-IWAI Y. & KAPLAN J. (2003). Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J. Biol. Chem.*, **278**: 45499-45506.
- DANIELS D. L., SCHROIDER J. L., SZYBALSKI W., SANGER F. & BLATTNER F. R. (1983). Appendix I: A molecular map of coliphage lambda. En "Lambda-II" (Ed. Hendrix R. W., Roberts J. W., Stahl F. W. & Weisberg R. A.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- DAUM G., LEES N. D., BARD M. & DICKSON R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**: 1471-1510.
- DECKERT J., KHALAF R. A., HWANG S. M. & ZITOMER R. S. (1999). Characterization of the DNA binding and bending HMG domain of the yeast hypoxic repressor Rox1. *Nucleic Acids Res.*, **27**: 3518-3526.
- DeDEKEN R. H. (1966). The Crabtree effects and its relation to the *petite* mutation. *J. Gen. Microbiol.*, **44**: 157-65.
- DEFRAUX N., GAISNE M. & VERDIERE J. (1994). Functional analysis of the zinc cluster domain of the *CYP1 (HAP1)* complex regulator in heme-sufficient and heme-deficient yeast cells. *Mol. Gen. Genet.*, **242**: 699-707.
- DEMINGOFF S. J., TORNOW J. & SANTANGELO G. M. (1995). Unigenic evolution: a novel genetic method localizes a putative leucine zipper that mediates dimerization of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory Gcr1p. *Genetics*, **141**: 1263-1274.
- DeRISI 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.
- 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
- DiFLUMERI C., LAROCQUE R. & KENG T. (1993). Molecular analysis of *HEM6 (HEM12)* in *Saccharomyces cerevisiae*, the gene for uroporphyrinogen decarboxylase. *Yeast*, **9**: 613-623.

- DONG J. & DICKSON R. C. (1997). Glucose represses the lactose-galactose regulon in *Kluyveromyces lactis* through a SNF1 and MIG1- dependent pathway that modulates galactokinase (*GAL1*) gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3657-3664.
- DUJON B. (1996). The yeast genome project: what did we learn?. *Trends Genet.*, **12**: 263-270.
- DUJON B., SHERMAN D., FISCHER G., DURRENS P., CASAREGOLA S., LAFONTAINE I., DE MONTIGNY J., MARCK C., NEUVEGLISE C., TALLA E., GOFFARD N., *et al.* (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, **430**: 35-44.
- ELLEFSON R. D. (1982). Porphyrinogens, porphyrins, and the porphyrias. *Mayo Clin. Proc.*, **57**: 454-458.
- EPHRUSSI B., HOTTINGUER H. & CHIMENES Y. (1949). Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation "petite colonie." *Ann. Inst. Pasteur*, **76**: 351-367.
- EULGEM T., RUSHTON P. J., ROBATZEK S. & SOMSSICH I. E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant. Sci.*, **5**: 199-206.
- EVANGELISTA C. C. Jr., RODRIGUEZ TORRES A. M., LIMBACH M. P. & ZITOMER R. S. (1996). Rox3 and Rts1 function in the global stress response pathway in baker's yeast. *Genetics*, **142**: 1083-1093.
- 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.
- FELIX F. & BROUILLET N. (1990). Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast uroporphyrinogen decarboxylase. *Eur. J. Biochem.*, **188**: 393-403.
- FERRERO I., ROSSI C., LANDINI M. P. & PUGLISI P. P. (1978). Role of the mitochondrial protein synthesis is the catabolite repression of the petite-negative yeast *K.lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**: 340-348.
- FISCHER G., NEUVEGLISE C., DURRENS P., GAILLARDIN C. & DUJON B. (2001). Evolution of gene order in the genomes of two related yeast species. *Genome Res.*, **11**: 2009-2019.
- FLATTERY-O'BRIEN J. A., GRANT C. M. & DAWES I. W. (1997). Stationary-phase regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *SOD2* gene is dependent on additive effects of HAP2/3/4/5- and STRE-binding elements. *Mol. Microbiol.*, **23**: 303-312.
- FLEER R., CHEN X. J., AMELLAL N., YEH P., GAULT N., FAUCHER D., FOLLIARD F., FUKUHARA H. & MAYAUX J. F. (1991a). High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1beta in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, **107**: 285-295.
- FLEER R., YEH P., AMELLAL N., FOURNIER A., BACCHETTA F., BADUEL P., JUNG G., L'HÔTE H., BECQUART J., FUKUHARA H. & MAYAUX J. F. (1991b). Stable multicopy vectors for high level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology*, **9**: 968-975.
- FORSBURG S. L. & GUARENTE L. (1989). Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.*, **3**: 1166-1178.
- FREIRE-PICOS M. A., HOLLENBERG C. P., BREUNIG K. D. & CERDAN M. E. (1995). Regulation of cytochrome c expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett.*, **360**: 39-42.

- FUJIWARA D. U., YOSHIMOTO H., SONE H., HARASHIMA S. & TAMAI Y. (1998). Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, *ATF1* and delta-9 fatty acid desaturase gene, *OLE1* by unsaturated fatty acids. *Yeast*, **14**: 711-721.
- FYTLOVICH S., GERVAIS M., AGRIMONTI C. & GUIARD B. (1993). Evidence for an interaction between the *CYP1(HAP1)* activator and a cellular factor during heme-dependent transcriptional regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **12**: 1209-1218.
- GANCEDO C. & SERRANO R. C. (1989). Energy yielding-metabolism. En: Rose A H, Harrison J. S., editors. The Yeast (Book): Energy Yielding-metabolism. Vol 3. London. Academic Press. Pp: 205-259.
- GARDNER K. H., ANDERSON S. F. & COLEMAN J. E. (1995). Solution structure of the *Kluyveromyces lactis* LAC9 Cd2 Cys6 DNA-binding domain. *Nat. Struct. Biol.*, **2**: 898-905.
- GAREY J. R., LABBE-BOIS R., CHELSTOWSKA A., RYTKA J., HARRISON L., KUSHNER J. & LABBE P. (1992). Uroporphyrinogen decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *HEM12* gene sequence and evidence for two conserved glycines essential for enzymatic activity. *Eur. J. Biochem.*, **205**: 1011-1016.
- GBELSKA Y., HORVATHOVA K., VAN der AART Q. J., ZONNEVELD B. J., STEENSMA H. Y. & SUBIK J. (1996). Isolation and molecular analysis of the gene for cytochrome c1 from *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.*, **30**: 145-150.
- GIAEVER G., CHU A. M., NI L., CONNELLY C., RILES L., VERONNEAU S., DOW S., LUCAU-DANILA A., ANDERSON K., ANDRE B., ARKIN A. P., ASTROMOFF A., et al. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, **418**: 387-391.
- GIARDINA C. & LIS J. T. (1993). DNA melting on yeast RNA polymerase II promoters. *Science*, **261**: 759-762.
- GIETZ R. D. & SUGINO A. (1998). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**: 527-534.
- GISH W. & STATES D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.*, **3**: 266-272.
- GOFFEAU A., BARRELL H., BUSSEY H., DAVIS R. W., DUJON B., FELDMANN H., GALIBERT F., HOHEISEL J. D., JACQ C., JOHNSON M., LOUIS E. J., MEWES H. W., MURAKAMI Y., PHILIPPSEN P., TETTELING H. & OLIVER S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, **274**: 546, 563-567.
- GOLLUB E. G., LIU K. P., DAYAN J., ADLERSBERG M. & SPRINSON D. B. (1977). Yeast mutants deficient in heme biosynthesis and a heme mutant additionally blocked in cyclization of 2,3-oxidosqualene. *J. Biol. Chem.*, **252**: 2846-2854.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ M. (1999). The *HEM1* gene of *Kluyveromyces lactis*. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. Universidad de La Coruña.
- GONZALEZ-DOMINGUEZ M., FREIRE-PICOS M. A. & CERDAN M. E. (2001). Haem regulation of the mitochondrial import of the *Kluyveromyces lactis* 5-aminolaevulinic synthase: an organelle approach. *Yeast*. **18**: 41-48.

- GONZALEZ-DOMINGUEZ M., FREIRE-PICOS M. A., RAMIL E., GUIARD B. & CERDAN M. E. (2000). Heme-mediated transcriptional control in *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.*, **38**: 171-177.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ M., MÉNDEZ-CARRO C. & CERDÁN M. E. (1997). Isolation and characterization of the *KIHEM1* gene in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, **13**: 961-971.
- GONZALEZ-SISO M. I., FREIRE-PICOS M. A., RAMIL E., GONZALEZ-DOMINGUEZ M., RODRIGUEZ-TORRES A. & CERDAN M. E. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**: 699-705.
- GONZÁLEZ-SISO M. I., RAMIL E., CERDÁN M. E. & FREIRE-PICOS M. A. (1996). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb. Technol.*, **18**: 585-591.
- GREEN S. R. & JOHNSON A. D. (2004). Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **15**: 4191-4202.
- GRIGGS D. W. & JOHNSTON M. (1991). Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **19**: 8597-8601.
- GRIVELL L.A. (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**: 121-164.
- GUARENTE L. & MASON T. (1983). Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell*, **32**: 1279-1286.
- GUARENTE L., LALONDE B., GIFFORD P. & ALANI E. (1984). Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*. *Cell*, **36**: 503-511.
- GUARENTE, L. (1983). Yeast promoters and *lac Z* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.*, **101**: 181-191.
- HACH A., HON T. & ZHANG L. (1999). A new class of repression modules is critical for heme regulation of the yeast transcriptional activator Hap1. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 4324-4333.
- HACH A., HON T. & ZHANG L. (2000). The coiled coil dimerization element of the yeast transcriptional activator Hap1, a Gal4 family member, is dispensable for DNA binding but differentially affects transcriptional activation. *J. Biol. Chem.*, **275**: 248-254.
- HALLBERG M., POLOZKOV G. V., HU G. Z., BEVE J., GUSTAFSSON C. M., RONNE H. & BJORKLUND S. (2004). Site-specific Srb10-dependent phosphorylation of the yeast Mediator subunit Med2 regulates gene expression from the 2-microm plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 3370-3375.
- HAMADA K., FUKUCHI S., ARISAWA M., BABA M. & KITADA K. (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **258**: 53-59.
- HAMPSEY M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol.* **62**: 465-503.
- HASHIMOTO J., HIRABAYASHI T., HAYANO Y., HATA S., OHASHI Y., SUZUKA I., UTSUGI T., TOH-E A. & KIKUCHI Y. (1992). Isolation and characterization of cDNA clones encoding *cdc2*

- homologues from *Oryza sativa*: a functional homologue and cognate variants. *Mol. Gen. Genet.*, **233**: 10-16.
- HEALY A. M. & ZITOMER R. S. (1990). A sequence that directs transcriptional initiation in yeast. *Curr. Genet.*, **18**: 105-109.
- HENGARTNER C. J., MYER V. E., LIAO S. M., WILSON C. J., KOH S. S. & YOUNG R. A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell.*, **2**: 43-53.
- HERMAN A. & HALVORSON H. (1963a). Genetic control of beta-glucosidase synthesis in *Saccharomyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **85**: 901-910.
- HERMAN A. & HALVORSON H. (1963b). Identification of the structural gene for beta-glucosidase in *Saccharomyces lactis*. *J. Bacteriol.*, **85**: 895-900.
- HIRST M., KOBOR M. S., KURIAKOSE N., GREENBLATT J. & SADOWSKI I. (1999). GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase SRB10/CDK8. *Mol. Cell.*, **3**: 673-678.
- HOCHACHKA P. W., BUCK L. T., DOLL C. J. & LAND S. C. (1996). Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 9493-9498.
- HODGE M. R. & CUMSKY M. G. (1989). Splicing of a yeast intron containing an unusual 5' junction sequence. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 2765-2770.
- 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.
- HOFFMAN M., GORA M. & RYTKA J. (2003). Identification of rate-limiting steps in yeast heme biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**: 1247-1253.
- HOHMANN S., HUSE K., VALENTIN E., MBONYI K., THEVELEIN J. M. & ZIMMERMANN F. K. (1992). Glucose-induced regulatory defects in the *Saccharomyces cerevisiae* *byp1* growth initiation mutant and identification of *MIG1* as a partial suppressor. *J. Bacteriol.*, **174**: 4183-4188.
- HOLSTEGE F. C., JENNINGS E. G., WYRICK J. J., LEE T. I., HENGARTNER C. J., GREEN M. R., GOLUB T. R., LANDER E. S. & YOUNG R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**: 717-728.
- HON T., DODD A., DIRMEIER R., GORMAN N., SINCLAIR P. R., ZHANG L. & POYTON R. O. (2003). A mechanism of oxygen sensing in yeast. Multiple oxygen-responsive steps in the heme biosynthetic pathway affect Hap1 activity. *J. Biol. Chem.*, **278**: 50771-50780.
- HON T., HACH A., LEE H. C., CHENG T. & ZHANG L. (2000). Functional analysis of heme regulatory elements of the transcriptional activator Hap1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 584-591.
- HON T., HACH A., TAMALIS D., ZHU Y. & ZHANG L. (1999). The yeast heme-responsive transcriptional activator Hap1 is a preexisting dimer in the absence of heme. *J. Biol. Chem.* **274**: 22770-22774.
- HON T., LEE H. C., HACH A., JOHNSON J. L., CRAIG E. A., ERDJUMENT-BROMAGE H., TEMPST P. & ZHANG L. (2001). The Hsp70-Ydj1 Molecular Chaperone Represses the Activity of the Heme Activator Protein Hap1 in the Absence of Heme. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 7923-7932.

- HON T., LEE H. C., HU Z., IYER V. R. & ZHANG L. (2005). The heme activator protein Hap1 represses transcription by a heme-independent mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **169**: 1343-1352.
- HUIE M. A. & BAKER H. V. (1996). DNA-binding properties of the yeast transcriptional activator, Gcr1p. *Yeast*, **12**: 307-317.
- ITO H., FUKUDA Y., MURATA K. & KIMURA A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**: 163-168.
- 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.
- JOHNSTON S. A., SALMERON J. M. Jr. & DINCHER S.S. (1987). Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell*, **50**: 143-146.
- JONES T., FEDERSPIEL N. A., CHIBANA H., DUNGAN J., KALMAN S., MAGEE B. B., NEWPORT G., THORSTENSON Y. R., AGABIAN N., MAGEE P. T., DAVIS R. W. & SCHERER S. (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 7329-7334.
- KALOGEROPOULOS A. (1995). Automatic intron detection in nuclear DNA sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**: 555-565.
- KANG J. S., KIM S. H., HWANG M. S., HAN S. J., LEE Y. C. & KIM Y. J. (2001). The structural and functional organization of the yeast mediator complex. *J. Biol. Chem.*, **276**: 42003-42010.
- KÄPPELI O. & SONNLEITNER B. (1986). Regulation of sugar metabolism in *Saccharomyces*-type yeast: experimental and conceptual considerations. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **4**: 299-325.
- KASTANIOTIS A. J., & ZITOMER R. S. (2000). Rox1 mediated repression. Oxygen dependent repression in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **475**: 185-195.
- KELLY P. A., GOUJON L., SOTIROPOULOS A., DINERSTEIN H., ESPOSITO N., EDERY M., FINIDORI J. & POSTEL-VINAY M. C. (1994). The GH receptor and signal transduction. *Horm. Res.* **42**: 133-139.
- KENG T. & GUARENTE L. (1987). Constitutive expression of the yeast *HEM1* gene is actually a composite of activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9107-9113.
- KENG T. (1992). HAP1 and ROX1 form a regulatory pathway in the repression of *HEM13* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 2616-2623.
- KIERS J., ZEEMAN A. M., LUTTIK M., THIELE C., CASTRILLO J. I., STEENSMA H. Y. & VAN DIJKEN J. P. (1998). Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. CBS 2359. *Yeast*, **14**: 459-469.
- KIM J. & IYER V. R. (2004). Global role of TATA box-binding protein recruitment to promoters in mediating gene expression profiles. *Mol. Cell. Biol.*, **24**: 8104-8112.
- KING D.A., ZHANG L., GUARENTE L. & MARMORSTEIN R. (1999). Structure of HAP1-18-DNA implicates direct allosteric effect of protein-DNA interactions on transcriptional activation. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 22-27.

- KOIPALLY J., ASHBURNER B. P., BACHHAWAT N., GILL T., HUNG G., HENRY S. A. & LOPES J. M. (1996). Functional characterization of the repeated UASINO element in the promoters of the *INO1* and *CHO2* genes of yeast. *Yeast*, **12**: 653-665.
- KUCHIN S. & CARLSON M. (1998). Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-I, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol. Cell. Biol.*, **18**: 1163-1171.
- KUCHIN S., YEGHIAYAN P. & CARLSON M. (1995). Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs *SSN3* and *SSN8* contribute to transcriptional control in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**: 4006-4010.
- 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., BURKE P. V., STAAHL B. T. & POYTON R. O. (1999). Oxygen sensing in yeast: evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 5446-5451.
- KWAST K. E., BURKE P.V. & POYTON R. O. (1998). Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.*, **201**: 1177-1195.
- KWAST K. E., LAI L. C., MENDA N., JAMES D. T^{3RD}, 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.
- LABBE P. & LABBE-BOIS R. (1990). Tetrapyrrol and heme biosynthesis in yeast. En "Biosynthesis of heme and chlorophylls". (Ed. H. A. Dailey) pp. 235-285. New York: McGraw-Hill.
- LABBE-BOIS R. & VOLLAND C. (1977). Changes in the activities of the protoheme-synthesizing system during the growth of yeast under different conditions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**: 565-577.
- LABBE-BOIS R., SIMON M., RYTKA J., LITWINSKA J. & BILINSKI T. (1980). Effect of 5-aminolevulinic acid synthesis deficiency on expression of other enzymes of heme pathway in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**: 1357-1363.
- LAMB P. & MCKNIGHT S. L. (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem. Sci.*, **16**: 417-422.
- LAN C., LEE H. C., TANG S. & ZHANG L. (2004). A novel mode of chaperone action: heme activation of Hap1 by enhanced association of Hsp90 with the repressed Hsp70-Hap1 complex. *J. Biol. Chem.*, **279**: 27607-27612.
- LEE H. C., HON T. & ZHANG L. (2002). The Molecular Chaperone Hsp90 Mediates Heme Activation of the Yeast Transcriptional Activator Hap1. *J. Biol. Chem.*, **277**: 7430-7437.
- LEE H. C., HON T., LAN C. & ZHANG L. (2003). Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol. Cell. Biol.*, **23**: 5857-5866.
- LIAO S. M., ZHANG J., JEFFERY D. A., KOLESKE A. J., THOMPSON C. M., CHAO D. M., VILJOEN M., VAN VUUREN H. J. & YOUNG R. A. (1995). A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **374**: 193-196.

- LILLEHAUG J. R. & KLEPPE R. K. (1976). Phosphorylation of double-stranded DNAs by T4 polynucleotide kinase. *Biochemistry*, **15**: 1858-1865.
- LODI T. & GUIARD B. (1991). Complex transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYB2* gene encoding cytochrome b2: CYP1(HAP1) activator binds to the *CYB2* upstream activation site UAS1-B2. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 3762-3772.
- LODI T., O'CONNOR D., GOFFRINI P. & FERRERO I. (1994). Carbon catabolite repression in *Kluyveromyces lactis*: isolation and characterization of the KIDLD gene encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.*, **244**: 622-629.
- LOWRY C. V. & ZITOMER R. S. (1988). ROX1 encodes a heme-induced repression factor regulating *ANB1* and *CYC7* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 4651-4658.
- LOWRY C. V., CERDAN M. E. & ZITOMER R. S. (1990). A hypoxic consensus operator and a constitutive activation region regulate the *ANB1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 5921-5926.
- LUCHE R. M., SMART W. C. & COOPER T. G. (1992). Purification of the heteromeric protein binding to the URS1 transcriptional repression site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **89**: 7412-7416.
- LUCHE R. M., SMART W. C., MARION T., TILLMAN M., SUMRADA R. A. & COOPER T. G. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* BUF protein binds to sequences participating in DNA replication in addition to those mediating transcriptional repression (URS1) and activation. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 5749-5761.
- MARTINEZ E., CHIANG C. M., GE H. & ROEDER R. G. (1994). TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J.*, **13**: 3115-3126.
- MARTINS B. M., GRIMM B., MOCK H. P., HUBER R. & MESSERSCHMIDT A. (2001). Crystal structure and substrate binding modeling of the uroporphyrinogen-III decarboxylase from *Nicotiana tabacum*. Implications for the catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, **276**: 44108-44116.
- MAS J., CELIS E., PINA. & BRUNNER A. (1974). Effect of O₂, ergosterol and sterol precursors on the mating ability of *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**: 613-620.
- MATTOON J. R., CARAVAJAL E. & GUTHRIE D. (1990). Effects of *hap* mutations on heme and cytochrome formation in yeast. *Curr. Genet.*, **17**: 179-83.
- McBRIDE L. J., KOEPF S. M., GIBBS R. A., SALSER W., MAYRAND P. E., HUNKAPILLER M. W. & KRONICK M. N. (1989). Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin. Chem.*, **35**: 2196-2201.
- McNABB D. S., TSENG K. A. & GUARENTE L. (1995). Cloning of yeast *HAP5*: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.*, **9**: 47-58.
- McNABB D. S., TSENG K. A. & GUARENTE L. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 7008-7018.
- McNEIL J. B. (1988). Functional characterization of a pyrimidine-rich element in the 5'-noncoding region of the yeast iso-1-cytochrome c gene. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 1045-1054.

- MENNELLA T. A., KLINKENBERG L. G. & ZITOMER R. S. (2003). Recruitment of Tup1-Ssn6 by yeast hypoxic genes and chromatin-independent exclusion of TATA binding protein. *Eukaryot. Cell*, **2**: 1288-1303.
- MERCADO J. J., VINCENT O. & GANCEDO J. M. (1991). Regions in the promoter of the yeast *FBP1* gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene *MIG1*. *FEBS Lett.*, **291**: 97-100.
- MILLER J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- MIYAKE S. & SUGIMURA T. (1968). Coproporphyrinogenase in a respiration-deficient mutant of yeast lacking all cytochromes and accumulating coproporphyrin. *J. Bacteriol.*, **96**: 1997-2003.
- MONTGOMERY D. L., LEUNG D. W., SMITH M., SHALIT P., FAYE G. & HALL B. D. (1980). Isolation and sequence of the gene for iso-2-cytochrome c in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 541-545.
- MULDER W., SCHOLTEN I. H., De BOER R. W. & GRIVELL L. A. (1994a). Sequence of the *HAP3* transcription factor of *Kluyveromyces lactis* predicts the presence of a novel 4-cysteine zinc-finger motif. *Mol. Gen. Genet.*, **245**: 96-106.
- MULDER W., SCHOLTEN I. H., NAGELKERKEN B. & GRIVELL L. A. (1994b). Isolation and characterisation 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. (1994c). Isolation and characterisation of the linked genes *APA2* and *QCR7*, coding for Ap4A phosphorylase II and the 14 kDa subunit VII of the mitochondrial bc1-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1219**: 719-723.
- MURRAY S., UDUPA R., YAO S., HARTZOG G. & PRELICH G. (2001). Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by the Bur1 cyclin-dependent kinase. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 4089-4096.
- MYLIN L. M., GERARDOT C. J., HOPPER J. E. & DICKSON R. C. (1991). Sequence conservation in the *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* GAL11 transcription activators suggests functional domains. *Nucleic Acids Research*, **19**: 5345-5350.
- NGUYEN C., BOLOTIN-FUKUHARA M., WESOLOWSKI-LOUVEL M. & FUKUHARA H. (1995). The respiratory system of *Kluyveromyces lactis* escapes from *HAP2* control. *Gene*, **152**: 113-115.
- OECHSNER U. & BANDLOW W. (1996). Interactions of the yeast centromere and promoter factor, Cpf1p, with the cytochrome c1 upstream region and functional implications on regulated gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 2395-2403.
- OHKUNI K. & YAMASHITA I. (2000). A transcriptional autoregulatory loop for KIN28-CCL1 and SRB10-SRB11, each encoding RNA polymerase II CTD kinase-cyclin pair, stimulates the meiotic development of *S. cerevisiae*. *Yeast*, **16**: 829-846.
- OLESEN J., HAHN S. & GUARENTE L. (1987). Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell*, **51**: 953-961.

- OZIER-KALOGEROPOULOS O., MALPERTUY A., BOYER J., TEKAIA F. & DUJON B. (1998). Random exploration of the *Kluyveromyces lactis* genome and comparison with that of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **26**: 5511-5524.
- PADMANABAN G., VENKATESWAR V. & RANGARAJAN P. N. (1989). Haem as a multifunctional regulator. *Trends Biochem. Sci.*, **14**: 492-496.
- PALANCADE B. & BENSUADE O. (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl-terminal domain (CTD) phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, **270**: 3859-3870.
- PEARSON W. R. & LIPMAN D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **85**: 2444-2448.
- PENG J., ZHU Y., MILTON J. T. & PRICE D. H. (1998) Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.*, **12**: 755-762.
- PFEIFER K., ARCANGIOLI B. & GUARENTE L. (1987). Yeast HAP1 activator competes with the factor RC2 for binding to the upstream activation site UAS1 of the *CYC1* gene. *Cell*, **49**: 9-18.
- PFEIFER K., KIM K. S., KOGAN S. & GUARENTE L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell*, **56**: 291-301.
- PINELLI A., TRIVULZIO S., TOMASONI L., BERTOLINI B. & PINELLI G. (2002). High-dose vitamin E lowers urine porphyrin levels in patients affected by porphyria cutanea tarda. *Pharmacol. Res.*, **45**: 355-359
- PINHERO R., LIAW P., BERTENS K. & YANKULOV K. (2004). Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II. *Eur. J. Biochem.*, **271**: 1004-1014.
- PINKHAM J. L. & KENG T. (1994). Heme-mediated gene regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. En: Winkelmann G. & Winge D. R. (eds). Metal ions in fungi. pp 455-501. Marcel Dekker, New York.
- PINKHAM J. L., WANG Z. & ALSINA J. (1997). Heme regulates SOD2 transcription by activation and repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **31**: 281-291.
- 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.
- PUGH B. F. & TJIAN R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.*, **5**: 1935-1945.
- RAMIL E., FREIRE-PICOS M. A. & CERDAN M. E. (1998). Characterization of promoter regions involved in high expression of *KICYC1*. *Eur. J. Biochem.*, **256**: 67-74.
- REGNACQ M., ALIMARDANI P., MOUDNI B. E. & BERGES T. (2001). Sut1p interaction with Cyc8p(Ssn6p) relieves hypoxic genes from Cyc8p-Tup1p repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **40**: 1085-1096.
- RICHARDSON P. M. & CHAPMAN J. (2003). The *Xenopus Tropicalis* Genome Project. *Current Genomics*, **4**: 645-652.
- RIEGER M., KÄPPELI O. & FIECHTER A. (1983). The role of a limited respiration in the incomplete oxidation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 653-661.

Bibliografía

- ROBERTSON L. S. & FINK G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 13783-13787.
- RODRIGUEZ C. R., CHO E. J., KEOGH M. C., MOORE C. L., GREENLEAF A. L. & BURATOWSKI S. (2000). Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 104-112.
- RONNE H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Genet.*, **11**: 12-17.
- ROSE M. & BOTSTEIN D. (1983). Structure and function of the yeast *URA3* gene. Differentially regulated expression of hybrid beta-galactosidase from overlapping coding sequences in yeast. *J. Mol. Biol.*, **170**: 883-904.
- ROST B. (1996). PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.*, **266**: 525-539.
- ROTHSTEIN R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.*, **194**: 281-301.
- RUPP S., SUMMERS E., LO H. J., MADHANI H. & FINK G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.*, **18**: 1257-1269.
- RYTKA J., BILINSKI T. & LABBE-BOIS R. (1984). Modified uroporphyrinogen decarboxylase activity in a yeast mutant which mimics porphyria cutanea tarda. *Biochem. J.*, **218**: 405-413.
- SABOVA L., ZEMAN I., SUPEK F. & KOLAROV J. (1993). Transcriptional control of *AAC3* gene encoding mitochondrial ADP/ATP translocator in *Saccharomyces cerevisiae* by oxygen, heme and *ROX1* factor. *Eur. J. Biochem.*, **213**: 547-553.
- SALEMME F. R. (1977). Structure and function of cytochromes c. *Annu. Rev. Biochem.*, **46**: 299-329.
- SALZMANN M. & BACHMANN M. F. (1998). The role of T cell receptor dimerization for T cell antagonism and T cell specificity. *Mol. Immunol.*, **35**: 271-277.
- SAMBROOK J., MANIATIS T. & FRITSCH E. F. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMUELSEN C. O., BARAZNENOK V., KHOROSJUTINA O., SPAHR H., KIESELBACH T., HOLMBERG S. & GUSTAFSSON C. M. (2003). TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 Mediator subunits are functionally conserved through evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**: 6422-6427.
- SANGER F., NICKLEN S. & COULSON A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.
- SANTANGELO G. M. & TORNOW J. (1990). Efficient transcription of the glycolytic gene *ADHI* and three translational component genes requires the *GCR1* product, which can act through *TUF1/GRF1/RAP1* binding sites. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 859-862.
- SASAKI H. & UEMURA H. (2005). Influence of low glycolytic activities in *gcr1* and *gcr2* mutants on the expression of other metabolic pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **22**: 111-127.
- SASSA S. & NAGAI T. (1996). The role of heme in gene expression. *Int. J. Hematol.*, **63**: 167-178.
- SCHLAEPFER D. D., HANKS S. K., HUNTER T. & Van Der GEER P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by *GRB2* binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**: 786-791.

- SCHNEIDER J. C. & GUARENTE L. (1991). Regulation of the yeast *CYT1* gene encoding cytochrome c1 by HAP1 and HAP2/3/4. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 4934-4942.
- SCHULLER J. & LEHMING N. (2003). The cyclin in the RNA polymerase holoenzyme is a target for the transcriptional repressor Tup1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **5**: 199-205.
- SHERMAN D., DURRENS P., BEYNE E., NIKOLSKI M. & SOUCIET J. L. (2004). Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.*, **32**: D315-318.
- SMITH R. L. & JOHNSON A. D. (2000). Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, **25**: 325-330.
- SOUCIET J., AIGLE M., ARTIGUENAVE F., BLANDIN G., BOLOTIN-FUKUHARA M., BON E., BROTTIER P., CASAREGOLA S., De MONTIGNY J., DUJON B., DURRENS P., GAILLARDIN C., LEPINGLE A., LLORENTE B., MALPERTUY A., NEUVEGLISE C., OZIER-KALOGEROPOULOS O., POTIER S., SAURIN W., TEKAIA F., TOFFANO-NIOCHE C., WESOLOWSKI-LOUVEL M., WINCKER P. & WEISSENBACH J. (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett.*, **487**: 3-12.
- STARK M. J., BOYD A., MILEHAM A. J. & ROMANOS M. A. (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast*, **6**: 1-29.
- STRAUSBERG R. L., FEINGOLD E. A., GROUSE L. H., DERGE J. G., KLAUSNER R. D., COLLINS F. S., WAGNER L., SHENMEN C. M., SCHULER G. D., ALTSCHUL S. F., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**: 16899-16903.
- STRUHL K. (1987). Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell*, **49**: 295-297.
- SUN C. & WOOLFORD J. L. Jr. (1997). The yeast nucleolar protein Nop4p contains four RNA recognition motifs necessary for ribosome biogenesis. *J. Biol. Chem.*, **272**: 25345-25352.
- SUROSKY R. T., STRICH R. & ESPOSITO R. E. (1994). The yeast *UME5* gene regulates the stability of meiotic mRNAs in response to glucose. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 3446-3458.
- TAKEDA K., SAITO T. & OCHIAI H. (2002). A novel *Dictyostelium* Cdk8 is required for aggregation, but is dispensable for growth. *Dev. Growth Differ.*, **44**: 213-223.
- TASSAN J. P., JAQUENOUD M., LEOPOLD P., SCHULTZ S. J. & NIGG E.A. (1995). Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 8871-8875.
- TATUSOVA T. A. & MADDEN T. L. (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.*, **174**: 247-250.
- THOMPSON C. M. & YOUNG R. A. (1995). General requirement for RNA polymerase II holoenzymes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 4587-4590.

- THOMPSON J. D., HIGGINS D. G. & GIBSON T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 4673-4680.
- THORSNESS M., SCHAFFER W., D'ARI L., & RINE J. (1989). Positive and negative transcriptional control by heme of genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **9**: 5702-5712.
- TIMMERMAN J., VUIDEPOT A. L., BONTEMS F., LALLEMAND J. Y., GERVAIS M., SHECHTER E. & GUIARD B. (1996). ¹H, ¹⁵N resonance assignment and three-dimensional structure of CYP1 (HAP1) DNA-binding domain. *J. Mol. Biol.*, **259**: 792-804.
- TONG A. H., LESAGE G., BADER G. D., DING H., XU H., XIN X., YOUNG J., BERRIZ G. F., BROST R. L., CHANG M., CHEN Y., CHENG X., CHUA G., FRIESEN H., *et al.* (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*, **303**: 808-813.
- TREITEL M. A. & CARLSON M. (1995). Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **92**: 3132-3136.
- TROCHA P. J. & SPRINSON D. B. (1976). Location and regulation of early enzymes of sterol biosynthesis in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**: 45-51.
- TRUEBLOOD C. E., WRIGHT R. M. & POYTON R. O. (1988). Differential regulation of the two genes encoding *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit V by heme and the *HAP2* and *REO1* genes. *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 4537-4540.
- TURCOTTE B. & GUARENTE L. (1992). *HAP1* positive control mutants specific for one of two binding sites. *Genes Dev.*, **6**: 2001-2009.
- TURI T. G. & LOPER J. C. (1992). Multiple regulatory elements control expression of the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome P450, lanosterol 14 alpha-demethylase (*ERG11*). *J. Biol. Chem.*, **267**: 2046-2056.
- TURKEL S., TURGUT T., LOPEZ M. C., UEMURA H. & BAKER H. V. (2003). Mutations in *GCR1* affect *SUC2* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics*, **268**: 825-831.
- URBAN-GRIMAL D. & LABBE-BOIS R. (1981). Genetic and biochemical characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* blocked in six different steps of heme biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.*, **183**: 85-92.
- URBAN-GRIMAL D., VOLLAND C., GARNIER T., DEHOUX P. & LABBE-BOIS R. (1986). The nucleotide sequence of the *HEM1* gene and evidence for a precursor form of the mitochondrial 5-aminolevulinate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **156**: 511-519.
- USHINSKY S. C. & KENG T. (1994). A novel allele of *HAP1* causes uninducible expression of *HEM13* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **136**: 819-831.
- VAN DER BERG J. A., VAN DER LAKEN K. J., VAN OUYEN A. J. J., REUNIERS C. H. M., RIETVELD K., SCHAAP A., BRAKE A. J., BISHOP R. J., SCHULTZ K., MOYER D., RICHMAN M. & SHUSTER J. R. (1990). *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology*, **8**: 135-139.

- VELCULESCU V. E., ZHANG L., ZHOU W., VOGELSTEIN J. & BASRAI M. A., BASSETT D. E. Jr., HIETER P., VOGELSTEIN B. & KINZLER K. W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, **88**: 243-251.
- VERDIERE J., CREUSOT F., GUARENTE L. & SLONIMSKI P. P. (1986). The overproducing *CYP1* and the underproducing *hap1* mutations are alleles of the same gene which regulates in trans the expression of the structural genes encoding iso-cytochromes c. *Curr. Genet.*, **10**: 339-342.
- VERDIERE J., GAISNE M. & LABBE-BOIS R. (1991). CYP1 (HAP1) is a determinant effector of alternative expression of heme-dependent transcribed genes in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **228**: 300-306.
- VERDUYN C., POSTMA E., SCHEFFERS W. A. & Van DIJKEN J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, **8**: 501-517.
- VINCENT O., KUCHIN S., HONG S. P., TOWNLEY R., VYAS V. K. & CARLSON M. (2001). Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a transcriptional activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 5790-5796.
- VIOLA A. M., GALEOTTI C. L., GOFFRINI P., FICARELLI A. & FERRERO I. (1995). A *Kluyveromyces lactis* gene homologue to AAC2 complements the *Saccharomyces cerevisiae* *op1* mutation. *Curr. Genet.*, **27**: 229-233.
- VUIDEPOT A. L., BONTEMS F., GERVAIS M., GUIARD B., SHECHTER E. & LALLEMAND J. Y. (1997). NMR analysis of *CYP1(HAP1)* DNA binding domain-*CYC1* upstream activation sequence interactions: recognition of a CGG trinucleotide and of an additional thymine 5 bp downstream by the zinc cluster and the N-terminal extremity of the protein. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3042-3050.
- WACH A., BRACHAT A., POHLMANN R. & PHILIPPSSEN P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**: 1793-1808.
- WAHI M. & JOHNSON A. D. (1995). Identification of genes required for alpha 2 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **140**: 79-90.
- WATSON P. & DAVEY J. (1998). Characterization of the Prk1 protein kinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **14**: 485-492.
- WHITBY F. G., PHILLIPS J. D., KUSHNER J. P. & HILL C. P. (1998). Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J.*, **17**: 2463-2471.
- WILCOX C. B., ROSSETTINI A. & HANES S. D. (2004). Genetic interactions with C-terminal domain (CTD) kinases and the CTD of RNA Pol II suggest a role for *ESS1* in transcription initiation and elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **167**: 93-105.
- WILCOX L. J., BALDERES D. A., WHARTON B., TINKELBERG A. H., RAO G. & STURLEY S. L. (2002). Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J. Biol. Chem.*, **277**: 32466-32472.
- WILLIS K. A., BARBARA K. E., MENON B. B., MOFFAT J., ANDREWS B. & SANTANGELO G. M. (2003). The global transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*, Gcr1p, mediates the response to glucose by stimulating protein synthesis and CLN-dependent cell cycle progression. *Genetics*, **165**: 1017-1029.

- WINKLER H., ADAM G., MATTES E., SCHANZ M., HARTIG A. & RUIS H. (1988). Co-ordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins: a binding site for the HAP1 (CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (*CTT1*). *EMBO J.*, **7**: 1799-1804.
- WINSTON F., DOLLARD C. & RICUPERO-HOVASSE S. L. (1995). Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, **11**: 53-55.
- WRIGHT R. M. & POYTON R. O. (1990). Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, *COX6* and *CYC1*, from glucose repression requires the *SNF1* and *SSN6* gene products. *Mol. Cell Biol.*, **10**: 1297-1300.
- ZAMAN Z., ANSARI A. Z., KOH S. S., YOUNG R. & PTASHNE M. (2001). Interaction of a transcriptional repressor with the RNA polymerase II holoenzyme plays a crucial role in repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**: 2550-2554.
- ZENG X., DEMINOFF S. J. & SANTANGELO G. M. (1997). Specialized Rap1p/Gcr1p transcriptional activation through Gcr1p DNA contacts requires Gcr2p, as does hyperphosphorylation of Gcr1p. *Genetics*, **147**: 493-505.
- ZHANG L. & GUARENTE L. (1994). HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *J. Biol. Chem.* **269**: 14643-14647.
- ZHANG L. & GUARENTE L. (1995). Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.*, **14**: 313-320.
- ZHANG L. & HACH A. (1999). Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**: 415-426.
- ZHANG L., HACH A. & WANG C. (1998). Molecular mechanism governing heme signaling in yeast: a higher-order complex mediates heme regulation of the transcriptional activator HAP1. *Mol. Cell Biol.*, **18**: 3819-3828.
- ZHANG M., ROSENBLUM-VOS L. S., LOWRY C. V., BOAKYE K. A. & ZITOMER R. S. (1991). A yeast protein with homology to the beta-subunit of G proteins is involved in control of heme-regulated and catabolite-repressed genes. *Gene*, **97**: 153-161.
- ZHAO X. J., RAITT D., V BURKE P., CLEWELL A. S., KWAST K.E. & POYTON R.O. (1996). Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.*, **271**: 25131-25138.
- ZHOU M., HALANSKI M. A., RADONOVICH M. F., KASHANCHI F., PENG J., PRICE D. H. & BRADY J. N. (2000) Tat modifies the activity of *CDK9* to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol. Cell Biol.*, **20**: 5077-5086.
- ZITOMER R. S. & HALL B. D. (1976). Yeast cytochrome c messenger RNA. In vitro translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product. *J. Biol. Chem.*, **251**: 6320-6326.
- ZITOMER R. S. & LOWRY C. W. (1992). Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **56**: 1-11.
- ZITOMER R. S., CARRICO P. & DECKERT J. (1997). Regulation of hypoxic gene expression in yeast. *Kidney Int.*, **51**: 507-513.

Bibliografia

- ZOLADEK T., CHELSTOWSKA A., LABBE-BOIS R. & RYTKA J. (1995). Isolation and characterization of extragenic mutations affecting the expression of the uroporphyrinogen decarboxylase gene (*HEM12*) in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **247**: 471-481.

ANEXO PUBLICACIONES

Los trabajos que a continuación se indican, y cuya separata se adjunta en las páginas siguientes, fueron realizados en el transcurso de las investigaciones llevadas a cabo durante la realización de la Tesis doctoral presentada por Laura Núñez Naveira y de los que es autora principal.

A) Trabajos ya publicados en el momento de presentación de la memoria de la Tesis

Núñez L, González-Siso I, Becerra M, Cerdán ME. Functional characterisation and transcriptional regulation of the *KIHEM12* gene from *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet*. 2004, 46:147-157.

Núñez L, Fernández-Otero C, Rodríguez-Belmonte E, Cerdán ME. The *KISR10* gene from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*. 2004, 21:511-518.

B) Trabajos en preparación/ revisión

Núñez L and Cerdán ME. Functional analysis of specific domains of yeast *Srb10*. (recoge los resultados del capítulo 4 de la memoria)

Núñez L, González-Siso I, Becerra M, Cerdán ME. Regulatory elements in the *KIHEM1* promoter (recoge los resultados del capítulo 3 de la memoria)

Núñez L, Becerra M, González-Siso I, Cerdán ME. Functional characterisation of *KIHAPI* (recogerá los resultados sobre la caracterización del gen *KIHAPI* que se describen en el capítulo 1 de la memoria y que están siendo completados)

Además, Laura Núñez Naveira ha participado en el estudio, mediante arrays de DNA, de la transcripción de genes de *Kluyveromyces lactis* relacionados con la respuesta a hipoxia y a niveles de hemo cuyos datos se encuentran en proceso de análisis para una futura publicación.

Yeast Sequencing Report

The *KISRB10* gene from *Kluyveromyces lactis*

Laura Núñez, Cristina Fernández-Otero, Esther Rodríguez-Belmonte and M. Esperanza Cerdán*

Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de La Coruña, La Coruña 15071, Spain

*Correspondence to:

M. Esperanza Cerdán, Dpto. de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña, 15071 La Coruña, Spain.
E-mail: bmanamr@udc.es

Abstract

We report the cloning and sequencing of a gene from *Kluyveromyces lactis* with high homology to the *SRB10* gene (alias *UMES*, *SSN3*, *GIG2*, *NUT7*, *RYE5*) from *Saccharomyces cerevisiae* and other organisms. The *KISRB10* gene is located in a similar configuration to that found in *S. cerevisiae*, flanked by *NOT4* and a gene with high similarity to YPL041c. The translated protein contains 593 amino acids and the characteristic domains of kinases from the CMGC subgroup. The functional relationship to yeast *SRB10* is demonstrated by complementation of mutant phenotypes in a haploid *S. cerevisiae* strain containing a null allele. Submitted to EMBL data library under Accession No. AJ532841. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Kluyveromyces lactis*; *SRB10*

Received: 6 February 2003
Accepted: 1 February 2004

Introduction

Cyclin-dependent kinases (CDKs) have important roles in cell cycle control and transcription. Two different kinases have been implicated in transcription, the *Saccharomyces cerevisiae* Kin28p and its mammalian homologue Cdk7 are subunits of the general transcription factor TFIIF. The yeast Srb10p and its mammalian homologue Cdk8p are associated with the RNA polymerase II mediator complex (Liao *et al.*, 1995). It has recently been reported that Srb8/9/10/11p form a complex associated with the mediator which is conserved between yeast and human cells (Borggreve *et al.*, 2002; Samuelsen *et al.*, 2003). Direct regulatory interactions between components of signal transduction pathways and Srb10p provide a mechanism for transcriptional control in response to important signals such as nutrient availability (Chang *et al.*, 2001), glucose repression (Balciunas and Ronne, 1995; Kuchin and Carlson, 1998), galactose induction of specific genes (Kuchin *et al.*, 1995), $\alpha 2$ repression of the *a*-specific genes (Wahi and Johnson, 1995) and stress (Chi *et al.*, 2001).

Srb10p is involved in the transcriptional regulation of a wide variety of yeast genes. The involvement of Srb10p in the mechanism of repression

caused by the complex Tup1p–Ssn6p was proved *in vivo*, suggesting that one mechanism of repression by Tup1p–Ssn6p involves functional interaction with RNA polymerase II (Kuchin and Carlson, 1998) and direct interaction between Tup1p and the components of the Srb10–Srb11p pair has been proved (Zaman *et al.*, 2001; Schüller and Lehming, 2003). A transcriptome analysis has shown that the deletion of *SRB10* has very different consequences in aerobiosis and during hypoxia. Besides, 57.2% of the hypoxic genes that are considered Rox1p-dependent genes are also dependent on Srb10p, suggesting that this component of the RNA polymerase II holoenzyme could be related to the transmission of repression from the Rox1p repressor to the basal transcriptional machinery; although a direct interaction between Rox1p and Srb10p in a two-hybrid analysis showed a negative result (Becerra *et al.*, 2002).

The phosphorylation of the yeast transcription factor Gal4p at S699 is required for efficient galactose-inducible transcription of the *GAL* genes and it has been reported that this site is a substrate for Srb10p kinase activity (Hirst *et al.*, 1999). Srb10p also has a positive role in the activation of gluconeogenic genes by regulation of the transcriptional activator Sip4p (Vincent *et al.*, 2001).

Acidic transcriptional activating regions from the yeast Gen4p activator, the mammalian p53 and the viral VP16 contact Srb10p, so that the activator is phosphorylated (Ansari *et al.*, 2002).

Here, we report the isolation and characterization of a gene from *Kluyveromyces lactis* that is homologous to the available fungal *SRB10* genes and which complements the disruption of *SRB10* in a *S. cerevisiae* strain. Relative levels of transcription of *SRB8*, *SRB9*, *SRB10* and *SRB11* follow the same pattern in *S. cerevisiae* and *K. lactis*, as expected for components of the basic transcriptional machinery.

Materials and methods

Yeast strains, cell growth and transformation

The haploid *S. cerevisiae* strain Z768 (*MATa ura3-52 his3Δ200 leu2-3,-112 rpb1Δ187::HIS3 srb10Δ1::hisG* [L14(*LEU2 CEN RPB1*)]) was kindly provided by Richard A. Young (Hengartner *et al.*, 1998). Cells were grown at 30 °C or 40 °C in YPD (2% glucose, 2% bacto-peptone, 1% yeast extract) or in complete media (CM), prepared as previously described (Zitomer and Hall, 1976) with the carbon source being 2% glucose. Yeast cells were transformed by the procedure of Ito *et al.* (1983) and transformants were grown on selective plates, CM without uracil (CM-URA). Other strains from *S. cerevisiae*, FY73 (*MATα his3Δ200 ura3-52*) and *K. lactis*, Y1140 (ATCC-8585), were used for RNA extraction.

Cloning the gene

Basically, using PCR, the presence of the clone of interest was determined in clusters of plasmid DNA extracted from pools of the bacterial colonies bearing the clones of the library. In each step, the cluster giving a positive fragment by specific PCR amplification was selected and then the components of this cluster were used separately as templates for new PCR reactions until arriving at the isolated clone of interest. Isolation of DNA and plasmid propagation was carried out by conventional methods (Sambrook *et al.* 1989). *E. coli* DH-10B was used for plasmid amplification by electroporation. The Chiron *K. lactis* genomic library was originally constructed by the insertion of restriction fragments generated by partial *Sau3A* digestion of

genomic DNA from *K. lactis* strain into the unique *Bam*HI site of the vector pAB24 (Botstein *et al.*, 1979).

Sequencing and sequence analysis

Both strands were sequenced by the method of Sanger *et al.* (1977) using synthetic primers for primer walking. The complete nucleotide sequence has been entered in the EMBL Data Library under Accession No. AJ532841. The sequence was analysed using DNASIS/PROSIS (Hitachi), standard FASTA from EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) and BLASTA or BLAST-Two-sequences program (Tatusova and Madden, 1999) from NCBI Tools (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Multiple alignment was carried out by CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) from EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Analyses of protein domains and profiles were carried out through ScanProsite (Gattiker *et al.*, 2002) using the Expasy access (<http://www.expasy.org/tools>).

Expression analysis

The use of arrays was as previously described (Becerra *et al.*, 2002). For RNA isolations, cells from the *S. cerevisiae* strain FY73 and the *K. lactis* strain Y1140 (ATCC-8585) were grown in complete media with 2% glucose. For RNA isolations, cells were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen, later disrupting them with a Micro-Dismembrator (B. Braun Biotech International). The resulting powder was mixed with TRI-ZOL Reagent (Life Technologies) and total RNA was extracted by the method of Chomczynski and Sacchi (1987). Probe generation was as described in Hauser *et al.* (1998). Briefly, 60 µg total RNA was annealed to oligonucleotide dT15 and used as a template to synthesize and radiolabel the corresponding first strand cDNA with 50 µCi [α -³²P]-dCTP (Amersham) and SuperScript II (Life Technologies). The reactions were carried out at 43 °C for 1 h, after which the RNA was hydrolysed with NaOH at 65 °C for 30 min. The probe was purified by isopropanol precipitation and the isotope incorporation was measured to check the efficiency of the reaction.

The labelled cDNAs obtained from each RNA sample were used to probe the DNA arrays containing the whole set of genes from *S. cerevisiae*

(Hauser *et al.*, 1998). Filters were pre-hybridized for 1 h at 65 °C in the hybridization mix: 5× SSC, 5× Denhardt's solution and 0.5% SDS. The probe was then denatured for 5 min at 100 °C, cooled quickly on ice and hybridized with the arrays overnight at 65 °C. The next day, two washes were carried out, at hybridization temperature, for 5 and 20 min respectively, in 2× SSC 0.1% SDS. The filters were exposed 24 h to a storage phosphor screen and data collected using a PhosphorImager Scanning Instrument 425 (Molecular Dynamics). Signal quantification was performed with Array Vision software (Molecular Dynamics), which localizes over each array element a bounding circle fitted to the size of the DNA spot. At least two replica-spots per gene were analysed. Normalization of values from the genes of interest was carried out by dividing the intensity for each gene by the value obtained for the actin gene.

Hybridization of DNA arrays from *S. cerevisiae* with cDNA from *K. lactis* was successful due to the high homology existing between the genomes of both yeasts (Ozier-Kalogeropoulos *et al.*, 1998; Llorente *et al.*, 2000). The results obtained clearly showed that there is a difference in the distribution of signal intensities obtained in the arrays hybridized with cDNA from *S. cerevisiae* or *K. lactis*; some genes that show strong expression in *S. cerevisiae* are expressed at low levels in *K. lactis* and vice versa. Despite the lower intensity obtained in the arrays hybridized with *K. lactis* cDNA, attributable to the lowest homology between the cDNA and the probes, a signal is obtained for the 94% of the heterologous probes. The correlation coefficient (CC) between the whole set of data obtained using cDNA from *S. cerevisiae* or *K. lactis* is moderate/low (0.335); however, analysing the correlation between groups of genes clustered by functional distribution according to MIPS (<http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/index.jsp>), it is possible to discover that the expression of some clusters of genes is highly correlated while others are poorly correlated. Some functional groups related to housekeeping functions such as mitosis, transcription, cell wall biogenesis and others are highly correlated. This validates the use of heterologous arrays from *S. cerevisiae* to analyse the transcriptome of *K. lactis* under different conditions or genetic backgrounds.

Results and discussion

Isolation of the *KISRBI0* gene

Previously, an internal fragment of the ORF was cloned by PCR from *K. lactis* genomic DNA, using oligonucleotides based on two small partial sequences of *KISRBI0* available in databases and which overlap each other (Ozier-Kalogeropoulos *et al.*, 1998; Bolotin-Fukuhara *et al.*, 2000); after sequencing the 875 bp PCR product, the fragment gave high homology with the *ScSRB10* gene. The isolation of a *KISRBI0* clone was obtained by screening a *K. lactis* genomic library in the vector pAB24, as described in Materials and methods. A total of approximately 30 000 transformants were pooled into 244 pools, grouped into 56 subgroups and finally into eight groups. Once the group, subgroup and pool carrying the clone were identified, groups of individual colonies from the pool were tested by PCR in order to find the positive clone. A fragment from the positive clone was sequenced by primer walking to reach a contig of 3757 bp and the sequence deposited into EMBL data library under Accession No. AJ532841. Homology search by BLASTN revealed that the clone contained a gene with high homology to several *SRB10* genes isolated from different organisms, and also that the arrangement of genes in the up and down regions surrounding *KISRBI0* is the same as that found in *S. cerevisiae* (Figure 1). A gene with homology to the *S. cerevisiae* ORF YPL041C (60% identity using FASTA) is located upstream in the same strand as *KISRBI0*; downstream, and in the complementary strand, a sequence giving homology with *NOP4* (ORF YPL043 in *S. cerevisiae*) is located. Figure 1 summarizes the direction of transcription and the homology between the *K. lactis* and *S. cerevisiae* genes.

The *KISRBI0* gene complements the Δ *SRB10* mutation in *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae*, *SRB10* mutants have partial loss of glucose repression, flocculence, unscheduled meiotic gene expression, thermosensitivity and poor growth on galactose. The functionality of the cloned *KISRBI0* gene was verified by complementation of a mutant strain from *S. cerevisiae*. The haploid *S. cerevisiae* strain Z768 (*MATa ura3-52 his3 Δ 200 leu2-3,-112 rpb1 Δ 187::HIS3 srb10 Δ 1::hisG [L14(LEU2 CEN RPB1)]*) was transformed

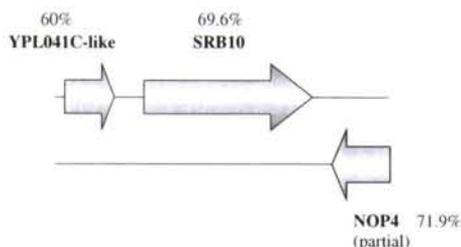


Figure 1. Physical map of the ORFs identified in the sequenced contig from the *K. lactis* clone. The percentage of identities to the homologous *S. cerevisiae* genes was calculated by FASTA

with the clone and transformants selected on CM-URA plates. The Z768 strain was grown in CM and the transformed Z768/*KISR10* strain in CM-URA liquid media to test for flocculence. Figure 2 shows that complementation with the *KISR10* gene avoids the flocculence of the mutant (Figure 2A). Cultures of the Z768 mutant strain, untransformed or transformed with the *KISR10* clone, were grown to reach $OD_{600} = 0.30$ and 10 μ l aliquots of the original culture were spotted on CM plates with 2% glucose as carbon source.

Complementation with the *KISR10* clone overpasses the thermosensitivity of the mutant at 40 °C (Figure 2B).

Transcription of *SRB10* and other components of the *Srb8/9/10/11p* complex

It has been recently reported that *Srb8/9/10/11p* form a complex associated with the mediator which is conserved between yeast and human cells (Borggreve *et al.*, 2002; Samuelsen *et al.*, 2003). We have carried out a comparative analysis of the expression of the *SRB8*, *SRB9*, *SRB10* and *SRB11* genes in *S. cerevisiae* and *K. lactis*, taking advantage of the DNA-array technology as explained in Materials and methods. Figure 2C shows that the pattern of relative expression of these genes is very similar in the two yeasts. Relative levels of expression of *SRB8*, *SRB10* and *SRB11* are similar to the expression of the large subunit of RNA polymerase II (*RPB1*), while levels of expression of *SRB9* are higher than *RPB1* in the two yeasts.

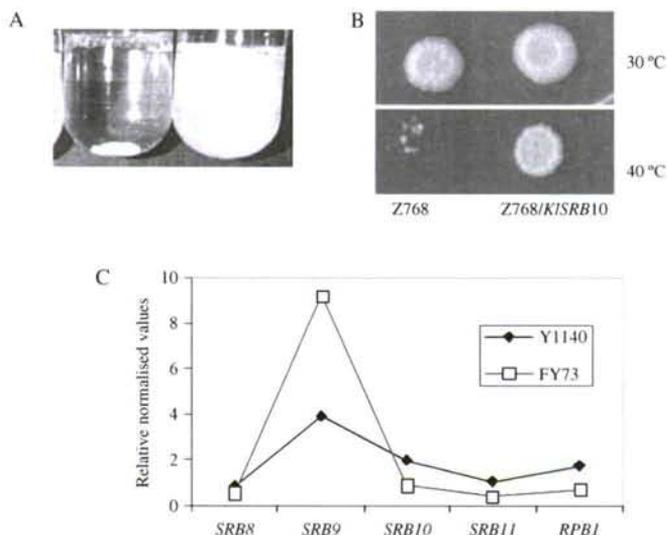


Figure 2. Functional analysis of *KISR10*. (A) Complementation of the flocculent phenotype in *S. cerevisiae*. (B) Complementation of the thermosensitive phenotype in *S. cerevisiae*. (C) Comparative transcription of genes encoding for the components of the *Srb8/9/10/11p* complex in *S. cerevisiae* and *K. lactis*

Protein features

Srb10p, a cyclin-dependent protein kinase, is a member of the CMGC group of protein kinases (Hunter and Plowman, 1997) and is closely related to other yeast proteins, such as Kin28p, Cdc28p or Pho85p, Cak1p (altogether constituting the CDK family, as defined in the MIPs catalogue), as well as human *CDK7* (Kin28p homologue) or *CDK8* (Srb10p homologue) (Balciunas and Rhone, 1995). Using the BLAST 2 sequences program (Tatusova and Madden, 1999), we have checked the homology between the translated protein from *KISR10* and the related proteins from *S. cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* (P. Cliften and M. Johnston, personal communication) and *Schizosaccharomyces pombe* (Watson and Davey, 1998); the same comparison was also applied in reference to the other members of the CDK family from *S. cerevisiae* and the Cdk7p and Cdk8p proteins. The results are summarized in Table 1 and the query protein shows the highest homology with the Srb10 proteins from *S. kluyveri* and *S. cerevisiae*.

CLUSTAL alignment of *KISrb10p* with the Srb10 proteins from *S. cerevisiae* and *S. kluyveri* is shown in Figure 3. Several conserved regions are deduced from the alignment; the widest is the protein kinase profile that also includes the Ser/Thr protein kinase signature and it is flanked by two conserved sequences (marked Srb10 conserved domains I and II in Figure 3). The amino-terminal region of the protein is rich in glutamine. In addition, the *KISrb10* protein, but not *KsSrb10p* or *ScSrb10p*, includes in this region a sequence that resembles a WRKY-like domain. The COOH-terminal region contains a conserved sequence with 10 consecutive alanine residues and is rich in asparagines. The alignment of these proteins with the human homologue Cdk8p (data not shown)

reveals that they only share the protein kinase profile.

In *S. cerevisiae*, the kinase activity appears to be central to the function of Srb10p, since mutation of a lysine (shown as bold **K** in Figure 2) inside the conserved serine/threonine kinase domain causes the same phenotypes as the null allele (Surosky *et al.*, 1994). The conservation of this lysine in *KISrb10p* argues in favour of its functional significance (Figure 3).

The WRKY domain is found in one or two copies in a superfamily of plant transcription factors involved in the regulation of various physiological programmes that are unique to plants, including pathogen defence, senescence, trichome development and the biosynthesis of secondary metabolites (Eulgem *et al.*, 2000). Therefore, its functional relevance in yeast is improbable, although the presence of this domain in a yeast protein related to transcription could have evolutionary implications in the generation of the functional WRKY domain of specific transcriptional factors actually known in plants.

In order to find specific domains in the structure of the Srb10 proteins from yeast, we have aligned the location of different functional domains or conserved sequences in these proteins and closely related others (Figure 4). Several features are remarkable. First, in the Srb10 proteins, the protein kinase domain is interrupted after the 19th amino acid inside this domain by a sequence that scarcely varies from 108 amino acids in *SkSrb10p* to 99 in *KISrb10p* or 86 in *ScSrb10p*. This extra sequence has a similar length in the three Srb10 proteins from closely related yeast, but the sequence is not conserved.

A second notable feature is that Srb10 proteins of fungal origin share three domains (shown in

Table 1. Homology between *KISrb10* and other cyclin-dependent kinases

Source	Protein	Overlap	Identities (%)	Positives (%)	Gaps (%)
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	Srb10	570	68	79	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Srb10	546	59	71	9
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Prk1	291	55	73	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdc28	291	36	56	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kin28	288	35	52	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pho85	285	32	54	7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cak1	190	26	45	20
<i>Homo sapiens</i>	Cdk8	350	40	56	11
<i>Homo sapiens</i>	Cdk7	295	36	52	8

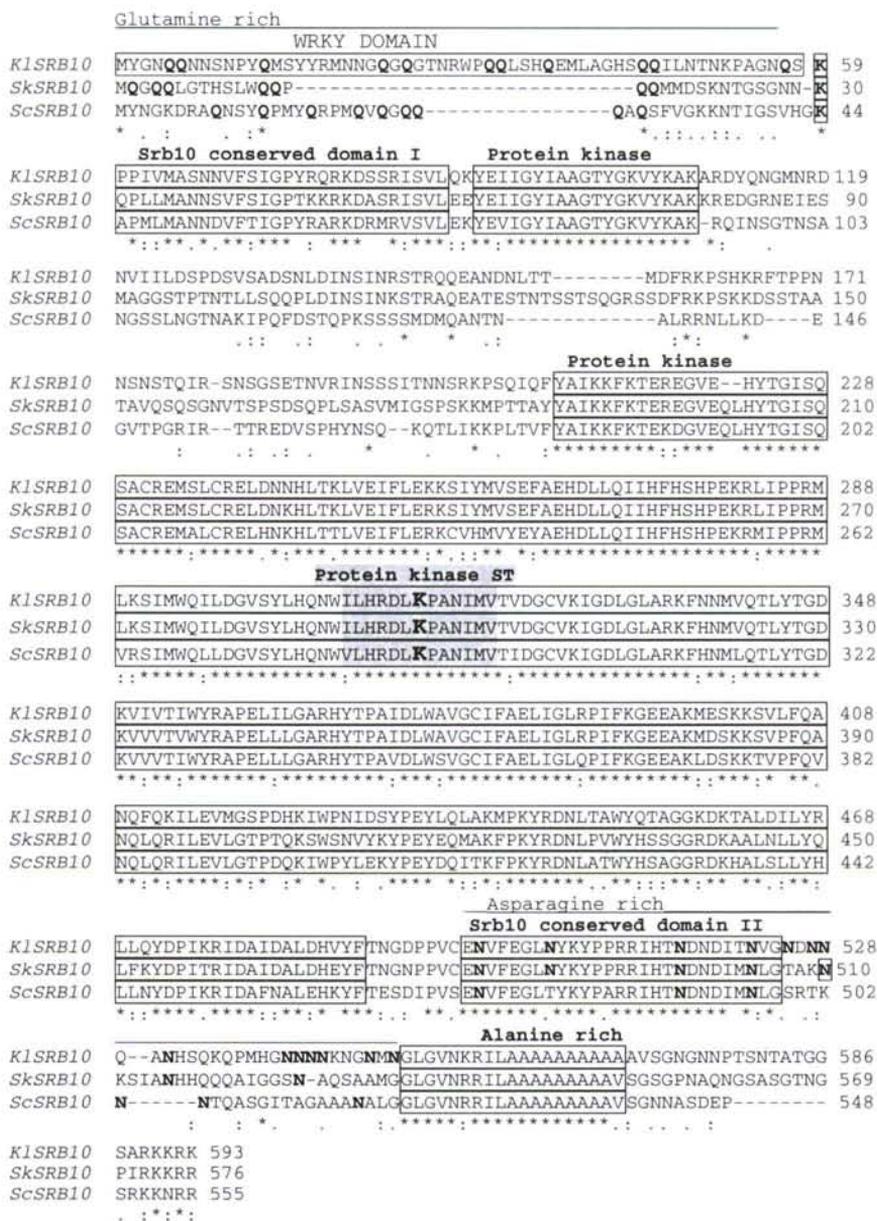


Figure 3. CLUSTAL W alignment of Srb10 proteins of fungal origin

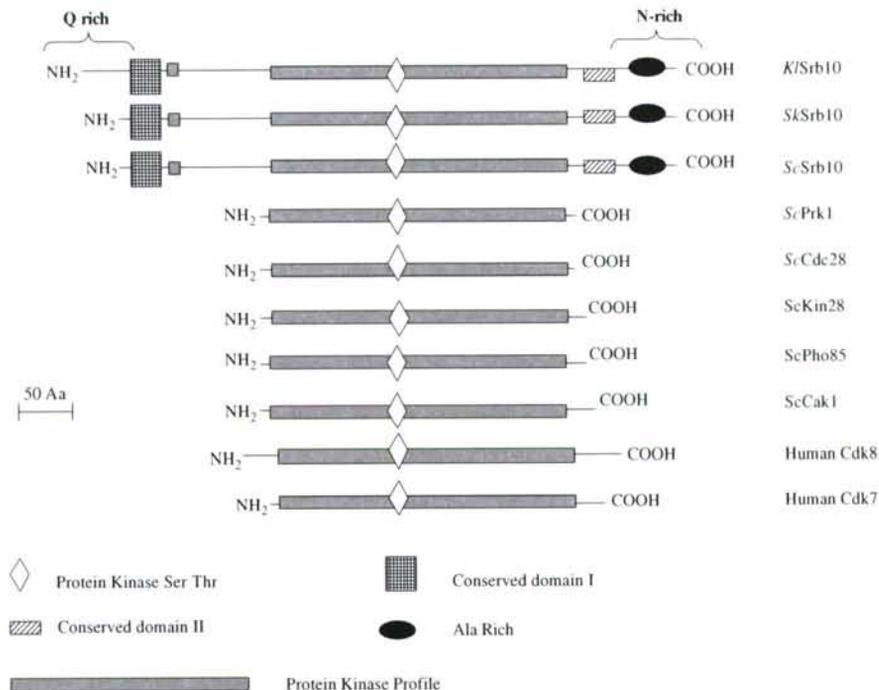


Figure 4. Domain distribution in Srb10 proteins and comparison to related CDKs from yeast and human

Figures 3 and 4 as I, II and Ala rich) that are not present in the other related CDKs. We have investigated whether these domains are conserved in other yeast proteins or whether they have been associated with some known function. However, even using the BLASTA algorithm developed for short, nearly exact matches, we have not found significant similarities. Therefore, these domains seem to be specific to Srb10 proteins of fungal origin.

Acknowledgements

This work was supported by grants PGIDT00PXI10303PR and PGIDT01PXI10303PR from the Xunta de Galicia (Spain) and BMC2000-0117 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). L.N.N. was the recipient of a fellowship from the Xunta de Galicia (Spain).

References

Ansari AZ, Koh SS, Zaman Z, *et al.* 2002. Transcriptional activating regions target a cyclin-dependent kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 14706–14709.

Balciunas D, Ronne H. 1999. Yeast genes GIS1–4: multicopy suppressors of the Gal⁻ phenotype of *snf1 mig1 srb8/10/11* cells. *Mol Gen Genet* **262**: 589–599.

Becerra M, Lombardia-Ferreira LJ, Hauser NC, *et al.* 2002. The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of *HAP1*, *ROX1*, *ROX3* and *SRB10* deletions. *Mol Microbiol* **43**: 545–555 (see erratum in *Mol Microbiol* **45**: 265).

Bolotin-Fukuhara M, Toffano-Nioche C, Artiguenave F, *et al.* 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 11. *Kluyveromyces lactis*. *FEBS Lett* **487**: 66–70.

Borggreve T, Davis R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD. 2002. A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J Biol Chem* **277**: 44202–44207.

Botstein D, Falco SC, Stewart SE, *et al.* 1979. Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**: 17–24.

Chang YW, Howard SC, Budovskaya YV, Rine J, Herman PK. 2001. The *rye* mutants identify a role for Ssn/Srb proteins of the RNA polymerase II holoenzyme during stationary phase entry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**: 17–26.

Chi Y, Huddleston MJ, Zhang X, *et al.* 2001. Negative regulation of Gen4 and Msn2 transcription factors by *SRB10* cyclin-dependent kinase. *Genes Dev* **15**: 1078–1092.

- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156–159.
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**: 199–206.
- Gattiker A, Gasteiger E, Bairoch A. 2002. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Appl Bioinform* **1**: 107–108.
- Hauser NC, Vingron M, Scheideler M, et al. 1998. Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1209–1221.
- Hengartner CJ, Myer VE, Liao SM, et al. 1998. Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol Cell* **2**: 43–53.
- Hirst M, Kobor MS, Kuriakose N, Greenblatt J, Sadowski I. 1999. GAL4 is regulated by the RNA polymerase II holoenzyme-associated cyclin-dependent protein kinase Srb10/Cdk8. *Mol Cell* **3**: 673–678.
- Hunter T, Plowman GD. 1997. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci* **22**: 18–22.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 136–168.
- Kuchin S, Carlson M. 1998. Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-I, and transcriptional co-repressor Ssn6-Tup1. *Mol Cell Biol* **18**: 1163–1171.
- Kuchin S, Yeghiayan P, Carlson M. 1995. Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs *SSN3* and *SSN8* contribute to transcriptional control in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4006–4010.
- Liao SM, Zhang J, Jeffery DA, et al. 1995. A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* **374**: 193–196.
- Llorente B, Malpertuy A, Blandin G, et al. 2000. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Lett* **487**: 71–75.
- Ozier-Kalogeropoulos O, Malpertuy A, Boyer J, Tekaia F, Dujon B. 1998. Random exploration of the *Kluyveromyces lactis* genome and comparison with that of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **26**: 5511–5524.
- Sambrook KI, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York.
- Samuelsen CO, Baraznenok V, Khorosjutina O, et al. 2003. TRAP230/ARC240 and TRAP240/ARC250 Mediator subunits are functionally conserved through evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6422–6427.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463–5467.
- Schuller J, Lehming N. 2003. The cyclin in the RNA polymerase holoenzyme is a target for the transcriptional repressor Tup1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 199–205.
- Surosky RT, Strich R, Esposito RE. 1994. The yeast *UME5* gene regulates the stability of meiotic mRNAs in response to glucose. *Mol Cell Biol* **14**: 3446–3458.
- Tatusova TA, Madden TL. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 247–250.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Vincent O, Kuchin S, Hong SP, et al. 2001. Interaction of the Srb10 kinase with Sip4, a transcriptional activator of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 5790–5796.
- Wahi M, Johnson AD. 1995. Identification of genes required for $\alpha 2$ repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **140**: 79–90.
- Watson P, Davey J. 1998. Characterization of the Prk1 protein kinase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 485–492.
- Zaman Z, Ansari AZ, Koh SS, Young R, Ptashne M. 2001. Interaction of a transcriptional repressor with the RNA polymerase II holoenzyme plays a crucial role in repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2550–2554.
- Zitomer RS, Hall BD. 1976. Yeast cytochrome *c* messenger RNA. *In vitro* translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product. *J Biol Chem* **251**: 6320–6326.

Laura Núñez · Isabel González-Siso · Manuel Becerra
M. Esperanza Cerdán

Functional characterisation and transcriptional regulation of the *KIHEM12* gene from *Kluyveromyces lactis*

Received: 10 December 2003 / Revised: 8 June 2004 / Accepted: 10 June 2004 / Published online: 15 July 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Cloning, sequencing and functional analysis of the *Kluyveromyces lactis* *KIHEM12* gene and its upstream region are reported. The gene encodes for a protein that is highly homologous to uroporphyrinogen decarboxylases from different organisms and complements its mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. Secondary structure prediction allows outlining a topology diagram which is compatible with a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel structure. A *K. lactis* haploid strain carrying a null allele of *KIHEM12* showed decreased growth in media not supplemented with heme (ferriprotoporphyrin IX) and red-fluorescent colonies due to the accumulation of porphyrins. *KIHEM12* expression was analysed by Northern blot and promoter fusion to the reporter *lacZ* gene. Transcription of this gene is not under heme or glucose repression and it is slightly induced by non-fermentable carbon sources through the Hap2/3/4/5 complex.

Keywords Heme biosynthesis · Uroporphyrinogen decarboxylase · *HEM12* · *Kluyveromyces lactis*

Introduction

Heme is of great importance in oxygen-dependent biological functions. Many proteins associated with oxygen binding, oxidative damage prevention and electron transport use heme as their prosthetic group. It also regulates gene expression through the action of specific

transcriptional regulatory factors. Since many cellular functions are influenced by heme, its synthesis is regulated.

The heme biosynthetic pathway is well conserved in different organisms throughout evolution (Wyckoff et al. 1996). Uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D; EC 4.1.1.37) catalyses the fifth step in the heme biosynthetic pathway, converting uroporphyrinogen III to coproporphyrinogen III. This cytosolic enzyme sequentially removes the four carboxyl groups from the acetate side-chains of the substrate, with the formation of the intermediates hepta-carboxyporphyrinogen, hexa-carboxyporphyrinogen and penta-carboxyporphyrinogen (Rytka et al. 1984). In humans, the study of URO-D is of particular interest since an inherited or acquired deficiency of the enzyme activity leads to the most common form of porphyrias, porphyria cutanea tarda (for a review, see Nordmann and Puy 2002).

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, heme biosynthesis involves eight enzymatic steps going from glycine and succinylCoA to heme (for a review, see Labbe-Bois and Labbe 1990). URO-D is encoded by the gene *HEM12* (*HEM6*, *POP3*, *YDR047W*), independently cloned by complementation of the allelic *hem12* and *hem6* mutant strains (Garey et al. 1992; Diflumieri et al. 1993). The biosynthesis of heme in different yeasts that also have very important biotechnological applications is less studied. Our previous work on the regulation of other genes encoding heme biosynthetic enzymes in *Kluyveromyces lactis* demonstrated that the first step of heme biosynthesis in *K. lactis* is under a double feed-back control by heme, at the level of transcription (González-Domínguez et al. 1997) and mitochondrial import (González-Domínguez et al. 2001). The present work reports the cloning, sequencing and functional analysis of the *KIHEM12* gene from *K. lactis*. Transcription of this gene is not under heme or glucose repression and is slightly induced by non-fermentable carbon sources through the Hap2/3/4/5 complex.

Communicated by K. Breunig

L. Núñez · I. González-Siso · M. Becerra · M. E. Cerdán (✉)
Dpto. de Biología Celular y Molecular,
Universidad de A Coruña, F. Ciencias,
Campus de A Zapateira s/n,
15075 A Coruña, Spain
E-mail: bmanamrt@udc.es
Tel.: +34-981-167000
Fax: +34-981-167065

Materials and methods

Yeast strains, cell growth and transformation

The *S. cerevisiae* strains BWG1-7a (*MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 ade1-100 his4-419*) and *hem6-1B* (*MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 ade1-100 his4-419 hem12*) were kindly provided by Teresa Keng (McHill University, Montreal, Canada). The *S. cerevisiae* diploid strain BY4742 (*hem12::kanMX4*) was obtained from EURO-SCARF (<http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf>) and its sporulation provided a haploid *hem12::kanMX4* strain, named $\Delta hem12-1A$.

The *K. lactis* strains used in this work are described in Table 1. Cells were grown at 30°C in YPD medium (2% glucose, 2% bacto-peptone, 1% yeast extract) or complete medium (CM, prepared as described by Zitomer and Hall 1976) with various carbon sources as specified. Media were supplemented with hemin (ferriprotoporphyrin IX) at a final concentration of 50 µg/ml in plates or at different concentrations as described. Yeast cells were transformed following the procedure of Ito et al. (1983).

Cloning the gene

A fragment of the ORF from *K. lactis* genomic DNA was amplified by PCR, using primers based on two partial and overlapping sequences of 854 bp and 767 bp, BAOAB029H03 and BAOAB011A07, respectively, which did not complete the coding sequence (CDS) and available through Genolevures (<http://cbi.labri.u-bordeaux.fr/Genolevures/>). The 489-bp PCR product obtained with the primers designed was sequenced to confirm specific amplification. Using the DC-by-PCR technique (Díaz Prado et al. 2004), the presence of the clone of interest was determined in clusters of plasmid DNA extracted from pools of clones from the *K. lactis* genomic library in the pAB24 vector (Botstein et al. 1979). In each step, the cluster giving a positive fragment by specific PCR amplification was selected and then the components of this cluster were used separately as templates for new PCR reactions, until arriving to

the isolated clone of interest. Approximately 30,000 transformants were checked in 45 individual PCR reactions organised in five serial sets. Isolation of DNA and plasmid propagation was achieved by conventional methods (Sambrook et al. 1989). *E. coli* DH-10B was used for plasmid amplification and transformations were carried out by electroporation.

The complete *KIHEM12* gene, including a functional upstream region of 676 bp and a downstream region of 878 bp, was subcloned into pSK1 (Prior et al. 1993). This is a shuttle vector suitable for bacterial, *K. lactis* and *S. cerevisiae* transformations.

Sequencing and sequence analysis

Both strands were sequenced by the method of Sanger et al. (1977) using synthetic primers for primer walking. The complete nucleotide sequence was added to the EMBL database under accession number AJ496574. The sequence was analysed using BLASTA from NCBI Tools (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Multiple alignments were carried out by CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) from EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Prediction of secondary structure was carried out with the PredictProtein service utility (Rost 1996) using ExPASy Access (<http://www.expasy.org/tools>).

Null allele and measurement of red fluorescence

The $\Delta hem12::kanMX4$ null allele in the haploid *K. lactis* strain PM5-3C was obtained following the one-step method (Rothstein 1991) by replacement of 92% of the CDS with the *kanMX4* cassette (Wach et al. 1994). Red fluorescence was measured by densitometry of pictures obtained by illuminating the plates with a UV transilluminator.

Northern blot analysis

RNA isolation and Northern blots were performed as described by González-Domínguez et al. (2000). RNA blots were hybridised overnight at 62°C in buffer

Table 1 *K. lactis* strains used in this work. ATCC American Type Culture Collection, CBS Central-Bureau voor Schimmelcultures, NRRL Northern Regional Research Culture.

<i>K. lactis</i> strains	Description	Source	Reference
NRRL-Y1140 (CBS 2359)	<i>MATa</i> wt	ATCC 8585	
MW270-7B	<i>MATa leu2 uraA1-1 metA1-1</i>	M. Wesołowski-Louvel	Billard et al. (1996)
MW98-8C	<i>MATx rag1 rag2 uraA metA1 argA</i>	M. Wesołowski-Louvel	Bianchi et al. (1987)
PM5-3C	<i>MATa uraA Rag⁻</i>	M. Wesołowski-Louvel	
MW190-9B	<i>MATa lac4-8 uraA Rag⁻</i>	M. Wesołowski-Louvel	
W600B	<i>MATx ade1ade2 leu1</i>	ATCC 32143	
MWH7302-D1 <i>hap3::LEU2</i>	<i>MATx leu2 uraA trp1 metA₁ ade2 his2-2 hap3::ScLEU2</i>	L. Grivell	

containing 0.5 M Na₂HPO₄, pH 7.2, 7% SDS and 1 mM EDTA with a *KIHEM12* probe obtained by PCR-amplification of genomic DNA from the *K. lactis* strain NRRL Y-1140, using two specific oligonucleotides which anneal at +17 and +1090, including 98% of the CDS. After hybridisation, filters were washed twice with 0.1% SDS and 2× SSC at 62°C for 5 min. Radioactive blots were exposed onto PhosphorImager screens for quantification using the ImageQuant programme. Data were normalised for RNA loading against the signal obtained from the control probe, rRNA 25S or U3 (snRNA 17A). After loading normalisation and to compare the signal intensity of each blot, the lowest intensity in each blot was considered 1 in arbitrary units (relative normalised values) and was used as a reference for the other signals.

Construction of the *lacZ* fusion and β -galactosidase determinations

The amplified promoter from positions -988 to +23 was cloned in pXW1 (Chen 1996) and fused in-frame to the eighth codon of the *lacZ* reporter gene (p *KIHEM12*). Four internal deletions of the promoter fused in frame to *lacZ* in pXW1 were obtained by PCR. In these constructions, two sequences with similarity to the consensus CCAAT, necessary for binding of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p complex, were removed. In the ΔA deletion, the sequence between -672 and -661 (TTATA GTTGGAC) was changed to a *Bam*HI restriction site. In the ΔB deletion, the sequence between -395 and -384 (AAGTCT CCAATA) was changed to a *Bam*HI restriction site. The ΔAB deletion included ΔA + ΔB deletions but the sequence between -672 and -661 was changed in this case to the sequence GGATCT. The ΔC construction is a huge deletion from -672 to -384, in which the two CCAAT-like sequences are also removed and the two fragments are connected by a *Bam*HI restriction site. The constructions were verified by sequencing. The *lacZ* fusions described above were used to transform *K. lactis* strain MW190-9B. For the quantification of β -galactosidase activity, 3–5 transformant colonies were randomly picked and grown in CM-Ura media to an optical density at 600 nm of approximately 0.8. β -Galactosidase activity was determined in cell extracts as described by Mount et al. (1996), in duplicate assays. Values are presented in

nanomoles of *o*-nitro phenol per milligram of protein per minute; and they represent the average value of 6–10 measurements for each condition. The standard deviation was always under 10%.

Results

Isolation of the *KIHEM12* gene and phenotypes of the null allele

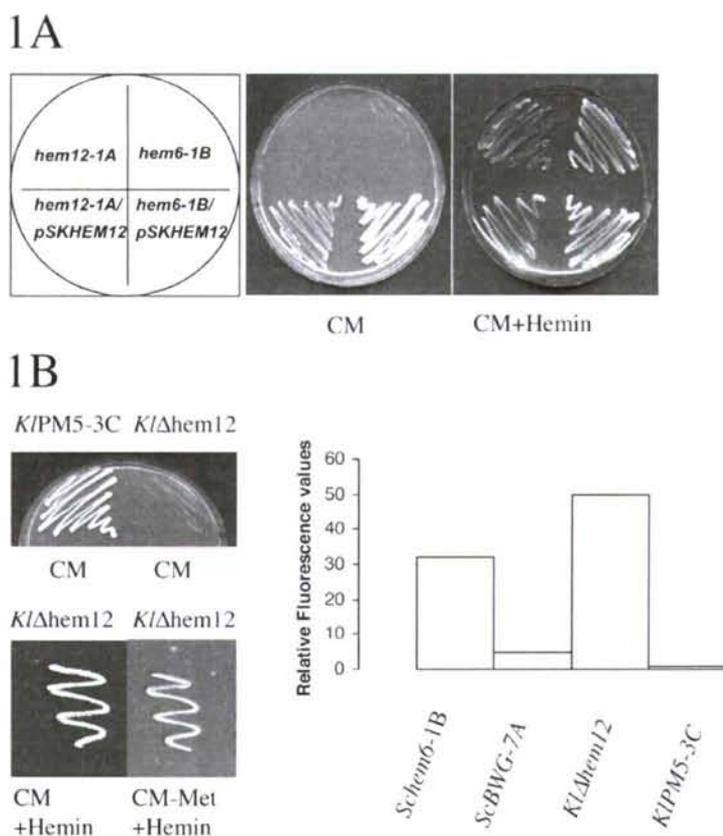
The isolation of a *KIHEM12* clone was achieved by screening a *K. lactis* genomic library using the DC-by-PCR technique, as described in the Materials and methods. Restriction analysis of the positive clone revealed that it contained an insert of 7 kb. The insert was sequenced by primer walking until reaching a contig of 2,939 bp, including the *KIHEM12* gene. The sequence was deposited into EMBL data library under accession number AJ496574 and contains the CDS (1,110 bp), an upstream region (989 bp) and a downstream region (840 bp). Homology analyses of the CDS by BLAST alignments revealed high homology to several *HEM12* genes and URO-D proteins from different organisms. A summary of the six best scores found comparing the translated CDS with URO-D proteins from different sources is shown in Table 2. The *K. lactis* protein (*KIHEM12p*) has 369 amino acids and is closely related not only to URO-D of fungal origin, but also to URO-D from vertebrates.

The functionality of the cloned *KIHEM12* gene was verified by complementation of two *Saccharomyces cerevisiae* haploid strains containing a point mutation or a deletion of the *HEM12* gene, respectively. The *S. cerevisiae* strains *hem6-1B* (kindly supplied by Teresa Keng) and BY4742 $\Delta hem12-1A$ (obtained in this work) were unable to grow in the absence of hemin. Both strains were transformed with the *KIHEM12* gene subcloned in pSK1, as described in the Materials and methods. Transformants were selected on CM-Ura plates and grown without addition of hemin (Fig. 1a). The same results were obtained with the original clone in pAB24 (data not shown); and in this case, to corroborate the plasmid dependence of this phenotype, transformants were grown in non-selective media to allow plasmid loss. After 1 week, cells were plated on/in CM supplemented with hemin and individual colonies were screened for growth in CM-Ura supplemented with hemin and in CM

Table 2 Homology between *KIHEM12p* and URO-D from different origins

Source	Protein	Overlap	% Identity	% Positive
<i>S. cerevisiae</i>	URO-D	359	82	90
<i>Neurospora crassa</i>	Hypothetical	363	59	74
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	probable URO-D	371	54	71
<i>Danio rerio</i>	URO-D	359	54	69
<i>Homo sapiens</i>	URO-D	367	50	68
<i>Ovis aries</i>	URO-D	355	51	68

Fig. 1a, b Functionality of the *KIHEM12* clone in *S. cerevisiae* and phenotypes of the *K. lactis* null allele. **a** Complementation of *hem12* mutants from *S. cerevisiae*. The *S. cerevisiae* strains used are BWG1-7a (*MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 ade1-100 his4-419*) and *hem6-1B* (*MATa leu2-3 leu2-112 ura3-52 ade1-100 his4-419 hem12*), kindly provided by Teresa Keng. **b** Phenotypes of the null allele in *K. lactis*, heme auxotrophy, red-fluorescence caused by accumulation of porphyrins and the absence of methionine auxotrophy. The null allele, *KlΔhem12*, was obtained from PM5-3C (*MATa uraA Rag⁻*), as explained in the Materials and methods



without hemin. The colonies cured of the plasmid, unable to grow in CM-Ura supplemented with hemin, were also unable to grow in CM in the absence of hemin (data not shown).

We constructed a null allele in the haploid *K. lactis* strain PM5-3C by the one-step method (Rothstein 1991). The lineal fragment used in the yeast transformation contained an internal deletion of the CDS at positions 52–1,074, replaced by the kanMX4 cassette (Wach et al. 1994). The correct replacement in the *K. lactis* genome was verified by PCR (data not shown) and phenotypic analysis revealed: (1) diminished growth in media not supplemented with hemin, (2) colonies with red fluorescence (as described for other mutants which accumulate porphyrins) and (3) the absence of auxotrophy for methionine (Fig. 1b). Uroporphyrinogen III, the substrate of URO-D, is a common precursor in the metabolism of heme and siroheme. Therefore, uroporphyrinogen III connects the metabolism of heme and methionine since the biosynthesis of cysteine and methionine in *S. cerevisiae* involves cellular uptake and reduction of sulphate to sulphide, siroheme acting as the prosthetic group of sulphite reductase (Labbe-Bois and

Labbe 1990). In *S. cerevisiae*, it has been reported that the null allele *hem12* has methionine auxotrophy (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/>). We analysed whether a methionine auxotrophy was present in *Klhem12* and found none (Fig. 1b).

Structural characteristics of the *KIHEM12* protein

The *KIHEM12* protein (*KlHem12p*) is structurally related to URO-D proteins (See Table 2 for homology data). A multiple alignment of *KlHem12p* with related URO-D proteins from yeast, *Nicotiana tabacum* and humans is shown in Fig. 2.

Fig. 2 Clustal alignment of URO-D from fungi, tobacco and humans. For better localisation, Cys are *shadowed* and His are in *bold*. Residues whose mutations affect catalytic activity in *S. cerevisiae* are indicated by an *arrow* and *underlined* when conserved. Residues that may be directly or indirectly related to substrate binding or catalysis in human URO-D are indicated by a *star* and *underlined* where conserved

K.lactis	-----MQVQNVDRSKFAPMKNDLMLRAALGE	26
S.cerevisiae	-----MGNFPAKNDLILRAAKGE	19
S.castelli	-----MENMRDEFPPKNDLILRLVLRGE	23
S.pombe	-----MKNDLILRAAKGE	13
H.sapiens	-----MEANGLGPGQFPPELKNDFLRAAWGE	26
N.tabacum	MMSQNYFSFSSISPPSSKSAFTSPSNFNLNPRLICCSAGGTVAEPKAINATQPLLLDAVRGK	60
	: : * : *	
	* * * * * * * * * *	
K.lactis	KVERPPCWIMR--QAGRYLP-----EYHEVKNGRDFPFETCR-DAEIASEITI	70
S.cerevisiae	KVERPPCWIMR--QAGRYLP-----EYHEVKNNRDFPFQTCR-DAEIASEITI	63
S.castelli	EVERPPCWLMR--QAGRYLP-----EYHEAKGGRDFPFETCR-DAEIASEITI	67
S.pombe	EVERPPVWIMASWKISSWYVHDLNLIVCTNETIEYHKLRAKQSFEMCQ-TPETACELTL	72
H.sapiens	ETDTPVWVMR--QAGRYLP-----EFRETRAAQDFPFETCR-SPEACCELTL	70
N.tabacum	EVERPPVWLMR--QAGRYMK-----SYQLLCEKYPLFRDRSENVDLVVEISL	105
	: : * * * * : : * : * : *	
	* * * * * * * * * *	
K.lactis	QPVRRYAGLLDAAIIFSDILVLPQAMGMKVMVEGKGFHPPEPLRTEEQLVLDYKVVV	130
S.cerevisiae	QPVRRYRGLIDAAIIFSDILVLPQAMGMVRVEMLEGGKGFHPPEPLRNPEDLQTVLDYKVDV	123
S.castelli	QPIKHFQGLIDAAIIFSDILVLPQAMGMKVMIEGKGFHPPEPLREVSDVIEVLDYKVDV	127
S.pombe	QPVTRFKGLDAAIIFSDILVLPQALGMQVVMLEQKGFHPKPLVVPEDIDLLEKTPN-I	131
H.sapiens	QPLRRF--LLDAAIIFSDILVVPQALGMEVTMVPKGKGFHPPEPLREEQDLERLRDPEV-V	127
N.tabacum	QPWKVFR--PDGVILFSDILTPLSGMNIPFDI IKGKGPVIFDPLRTAADVEKVRFP--	161
	* * : * . * : * * * * : : * * : * * : : .	
	* * * * * * * * * *	
K.lactis	LDELEWAFKAITMTRTKLDGQVPLLGFCGAPWTLVVMTEGGGSRLFRFAKQWLNESPES	190
S.cerevisiae	LKELDWAFKAITMTRIKLDGEVPLFGFCGGPWTLLVVMTEGGGSRLFRFAKQWINMYPDL	183
S.castelli	LKELDWAFKINSINLRWKLNGEVPLFGFCGGPWTLLVVMTEGGGSRIFRYAKQWINEHPDL	187
S.pombe	SAKLGVMDAISLREKLDGQVPLMGFSGAPWTIMAYMIEGGSKTFAKAKSWLFRYPEA	191
H.sapiens	ASELGVVFQAITLTRQRLAGRVPLIGFAGAPWTLMTYMEGGGSSTMAQAKRWLYQRPOA	187
N.tabacum	EKSPVYVGEALTILRKEVNNQAAVLGFVGAFTLASVVEGGSSKNFTKIKRLAFAEPKV	221
	: : . . : : * : : * * * * : * : * * * * : * * .	
	* * * * * * * * * *	
K.lactis	SHKLLQKITDVAVEFLCQQVVAGCQMLQVFSWGGELGSRDFDEFSLPYLKQIAERVPPR	250
S.cerevisiae	SHKLLQKITDVAVEFLSQVVAGAQILQVFSWGGELSSVDFDEFSLPYLRQIAERVPKR	243
S.castelli	SKRLLQKITDVAVEFLSQVVAGAVLQVFSWGGELSSLDDEFDEFSLPYLKQIVSKVPRR	247
S.pombe	SHKLLKIITDQVSYLIQQVYAGQQLQIFDSWAGELSPEDFTEYAYPYLVRI CQEVKQH	251
H.sapiens	SHQLRLILTDALVPYLVGQVVAGAAQLQVFSHAGHLGQPQFNKALPYIRDVAKQVKAR	247
N.tabacum	LHALQKFATSMAYIRYQADSGAQAVI FDSWATELSPVDFEFLPYLKQIVDSVKLT	281
	: * * : : . : : * . * * * * : * . * . * : : * * : : . *	
	* * * * * * * * * *	
K.lactis	LKQLGIEERVPMVVFAGKSWYALDKLDCSGYNAVSLDWSWDPAEAVKINS-DRVTLQGNL	309
S.cerevisiae	LQELGIMEQIPMIVFAKSWYALDKLCCSGFDVSLDWSWDPREAVKINK-NRVTLQGNL	302
S.castelli	LQELGITEKIPMIVFAKSWYALDKLDCSGFDVSLDWTWDPKEAVSINK-GRVTLQGNL	306
S.pombe	LKKKRDE-VPMIVFAKAWYAIQDLDCSGYDVIGLDWTVSPKEAVRIRGNRRVTFQGNL	310
H.sapiens	LREAGLAP-VPMIIFAKDGHFALELAQAGYEVVGLDWTVPAPKARECVG-KVTTLQGNL	305
N.tabacum	HPN-----LPLILYASGGGLLERLPLTGVDVSLDWTVDMDGRRRLG-PNVAIQGNV	334
	: * * * * * * : * : * * * * : . . * * * * * : * * * * *	
	* * * * * * * * * *	
K.lactis	DPGVIYGSDEIITKRVTEMVHFGGGKQHYIVNFGHGTSPFMDPEKIKFFLQECHRVGSQ----	369
S.cerevisiae	DPGVMYGSKEVITKVKQMI EAFGGGKSRIVNFGHGTSPFMDPDVVKFFLEECHRIGSK----	362
S.castelli	DPGVIYGSKEVITKTEEMIKRFGGGKKNYIVNFGHGTSPFMDPEQIRFFLEECHRIGSKK----	367
S.pombe	DPNILYGTREIIEARTKEMIQDFGGKQGYIINLHGITPGVNPDDVRFLEKCHQVGS-----	370
H.sapiens	DPALYASEEEIGQLVKQMLDDFG--PHRYIANLGHGLYDMDPEHVGAFVDAVHKHSRLLRQN	367
N.tabacum	DPGVLFGSKEFITNRINDTVKKAG--KKGHLNLCGHGIVKGTPEENFAHFFEIAKGLRY-----	391
	* * : : * * : : . * : * * * * : . . * * : :	

Five out of seven Cys found in the URO-D from *K. lactis* align with the Cys present in fungal URO-D (Cys are shadowed in Fig. 2). His at position 345 in the *K. lactis* protein (in bold in Fig. 2 and double labelled with arrow and star) is also conserved and associated with catalytic site activity in URO-D from *S. cerevisiae* (Felix and Brouillet 1990) and of human origin (Whitby et al. 1998). Two more residues that are conserved in the *K. lactis* protein, Asp at position 81 and Tyr at position 167 (indicated by stars in Fig. 2), have been related directly or indirectly to the catalytic function of human URO-D (Whitby et al. 1998). Other mutations affecting enzymatic activity were identified in *S. cerevisiae* (Garey et al. 1992; Chelstowska et al. 1992). In Fig. 2 they are indicated by arrows and it is possible to observe that these are also invariant residues in *K. lactis* (Gly40, Gly307, Ser66, Thr69, Leu14, Ser222).

The crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase was determined (Whitby et al. 1998), showing that the 40.8-kDa protein is comprised of a single domain containing a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel with a deep active site cleft formed by loops at the C terminal ends of the barrel strands (L1–L2–L3–L4). Many residues conserved in other URO-D from different sources cluster at this cleft (indicated in Fig. 2 with a star). The conserved residues are two Arg and one His that are probably involved in substrate binding and Asp, Tyr and Ser involved either in substrate binding or catalysis. A similar structure was determined for URO-D from *N. tabacum* (Martins et al. 2001). The conservation of these important residues in the *K. lactis* and other fungal URO-D enzymes and the positional conservation of prolines suggests a similar folding pattern for fungal URO-D proteins whose crystal structures have not been resolved yet. Secondary structure prediction from the *K.*

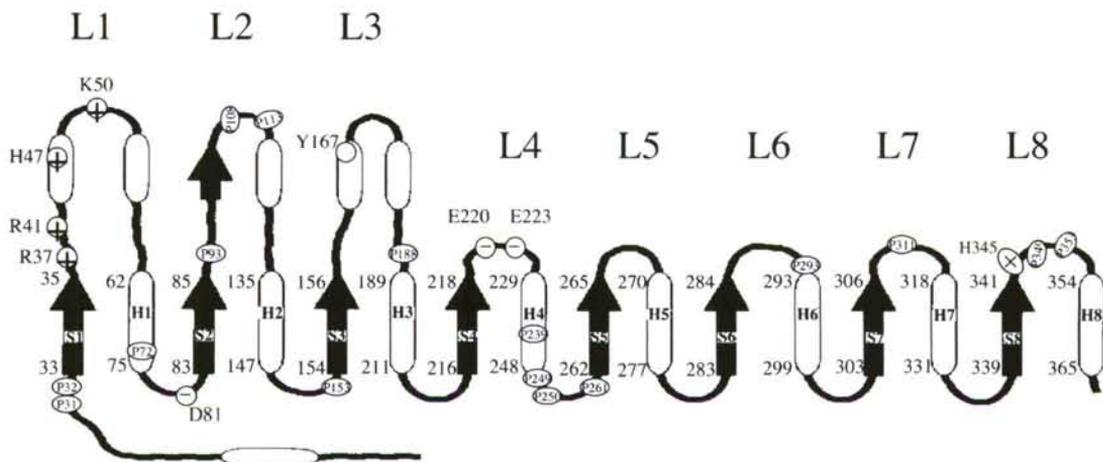
lactis sequence allows a topology diagram to be outlined (Fig. 3), which shows the secondary elements predicted and which is compatible with a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel structure like that experimentally found for the enzyme from *N. tabacum* and of human origin. The principal differences between the *K. lactis* enzyme and these ones are, apparently: (1) loop L2, in which only one β -strand and one α -helix are predicted instead of two present in human URO-D, (2) the lack of predicted α -helices in loops L4 and L7.

Expression analyses and promoter features

KIHEM12 expression was analysed by Northern blot and promoter fusion to *lacZ* in a reporter plasmid as described in the Materials and methods. The sequence of the *KIHEM12* upstream region is shown in Fig. 4a; and in silico analysis looking for putative consensus for transcriptional regulatory factors reveals the existence of putative sites (CCAAT) for binding of the complex Hap2/3/4 (–389 to –385, –663 to –667). Degenerate sequences from the consensus for Gcr1p binding are also present (–325 to –321, –713 to –709).

In *S. cerevisiae*, the levels of *HEM12* expression are strain-dependent. Zoladek et al. (1995), using a set of different strains, reported low *ScHEM12* expression, only detectable using poly-A RNA preparations or total RNA from cells transformed with the gene in a multi-copy plasmid. Di Flumeri et al. (1993), using RNA isolated from the strain BWG1-7a or derivatives, found levels of *ScHEM12* comparable with those found for the transcript of loading control actin. The existence of extragenic mutations affecting *HEM12* expression has been reported in *S. cerevisiae* (Zoladek et al. 1995) and could be related to the different levels of expression for different genetic backgrounds. Table 1 contains the levels of *KIHEM12* expression using total RNA in five *K. lactis* strains available in the laboratory. Signal intensities obtained and normalised to loading are

Fig. 3 Topological diagram of *KIHEM12p*, according to secondary structure prediction



quantified in Fig. 4b. A faint band is perceptible in all strains, although higher expression (five-fold) is detected in PM5-3C. Our results indicate that, with our Northern conditions and in all the strains tested, in *K. lactis* the *KIHEM12* transcript can be detected using total RNA

and without transforming the cells with a multicopy plasmid. However, our calculations (data not shown) give absolute values far below those expected for actin expression.

To easily extend our analysis on *KIHEM12* expression to different conditions, the promoter of the gene was fused in-frame to the reporter gene *lacZ* in the plasmid pXW1 as explained in the Materials and methods. The results obtained (Fig. 5a) indicate that the gene is not repressed by glucose, but is slightly induced by non-fermentable carbon sources like lactate or ethanol/glycerol. The gene is not regulated by heme, since the levels of expression do not change upon addition of hemin (up to 100 µg/ml). The addition of 2 mM H₂O₂ to generate oxidative stress does not affect *KIHEM12* expression.

Fig. 4a-c Promoter sequence and *KIHEM12* expression analyses by Northern blot. **a** Promoter sequence and identification of putative Hap2/3/4/5p complex and Gcr1p binding sites. **b** *KIHEM12* expression in different *K. lactis* strains in CM with 2% ethanol/glycerol. **c** Influence of the *hap3* mutation upon *KIHEM12* expression in *K. lactis*. The wild type (*wt*) is MW190-9B and *hap3* is MWH7302-D1 *hap3::LEU2*. The *K. lactis* strains used in the experiments are fully described in Table 1. The *KIHEM12* probe is described in the Materials and methods. RNA 25S or U3 probes were used for a loading control

A

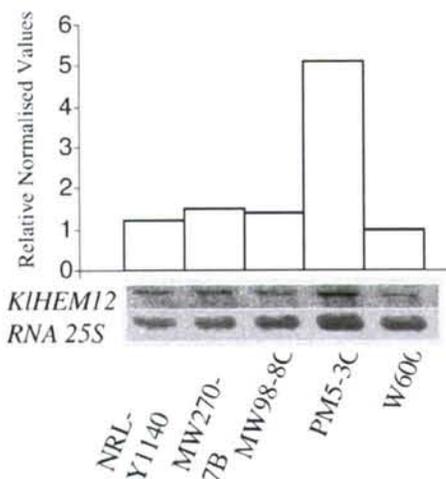
```

-989 GACACCATTA GCAGAATCAT CAGATACCTC AATAAACTTT GACTTTTTTCG ATATCTGCTC
-929 GACTCTTTGC AACAAATAGT CATGTACATT ATCATTGAAA TGAGAAGTGT AAGGATGAGG
-869 TTTCTCGGTA ATGACTTGTG AATCATGCCA AGCTGCATCT AACAATGAAT TTGATGACTT
-809 ATCATCTGGT AAGTTTGGCT TATATTTATT AGCATCGAAC CATGTCCAGTA TACTAATAAC
-749 CAAAAAGTA AGCACAAACA AGGTGCTAAC GGTGGTCTTC CTAAACTTGA AAGTAGACCG
-689 AAAATAATTG GCCATCATTA TAGTGGACC AGGGAAAGAA AGAGCAGCCC TGAACGATCA
-629 CCCGCTAATT TCTAAGAAAT TGTAGGTGCT TGTCAAACAC TTATTAATAA AACGAATGGA
-569 ATAATACCTC TCTTTATCAG TTCTATTGAT TTATTGTGAC TGAAAACCCCT TAAGTCTGTT
-509 TTGGTTTTAA TTGTACATAT TTCGATTATA CTCATCTTCT CGAATGATAA CTAGATAAAG
-449 AAAACGTACA TATACACAGA GAAAAGGGCA TTGACGAAGC TTTGCAGCCT TTAAGAGTCT
-389 CCAATYACAG AGTATTCATT AATCATAGGT ATGTGCGTGT TCTACTCTTG TCTATCCTGT
-329 AGCTCATCCT TATTCCTTCT CGAGCATGTA TTGGCGTCTT ATTTGAAGAA CTCACGTGCC
-269 GAGAAAGAAA TTATGTTACC CTGAAAATAG ATACTGGAGA GGAAAACATC AAACCCGTGC
-209 ATGGTGATAA CAGATGTGCC ATGCAAATTT CCTCGAGACC TTTTGGGGAC AATAGTTTAT
-149 GCATATACGA CCTGCATGGA CGTTCCTAAT AACAAAGATT ATCTGTACCA TTGAAATTTG
-89 CTCCTCTACA TTCAGGTCTT AGTAGTTTTT TTTTCGGTTA AGAGTGCAGG TTTACTGAAA
-29 AGTGAACAT ACAAAGACTC GTCGTCAAGATG

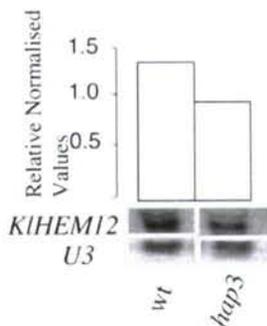
```

Hap2/3/4/5
Gcr1

B



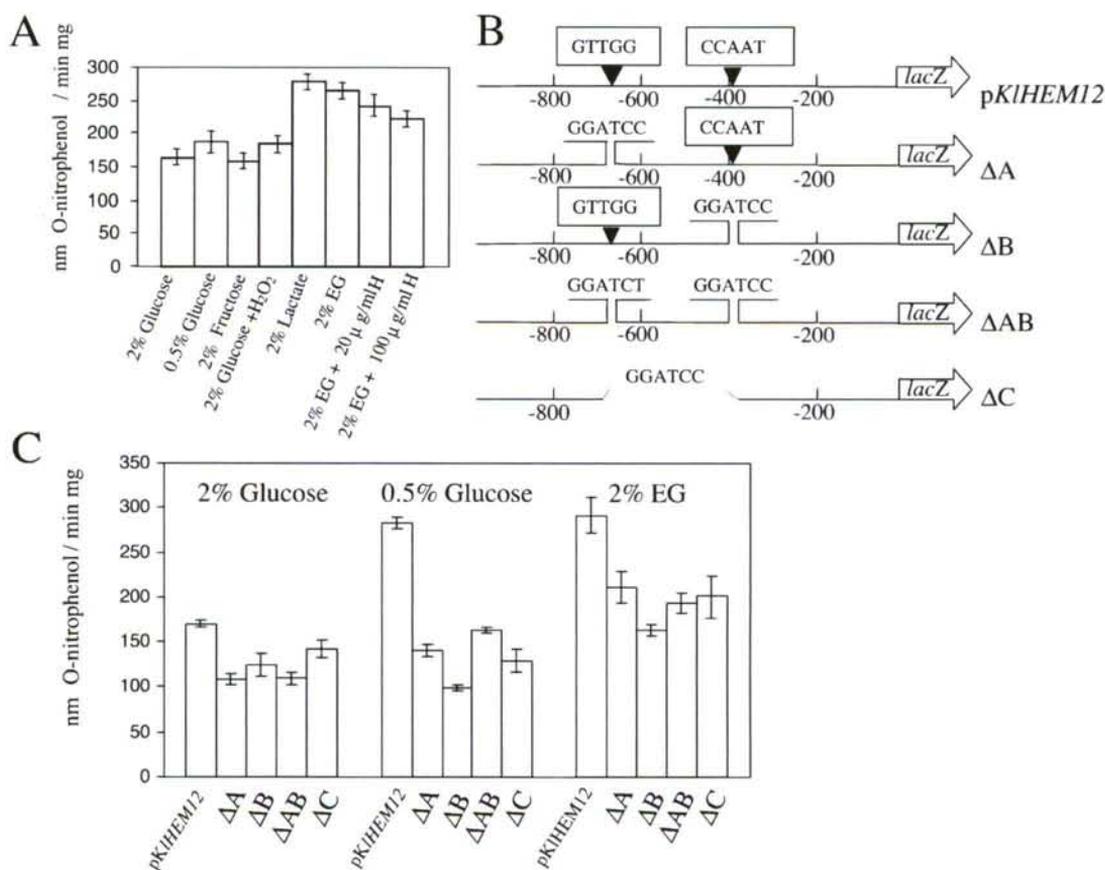
C



The functionality of the putative Hap2/3/4/5p binding sites present in the promoter was first investigated by transformation of the wild-type and *hap3* *K. lactis* mutant strains with the pSK *KIHEM12* construction. Northern blot (Fig. 4c) indicated that *KIHEM12* levels diminish 1.4-fold in the *hap3* mutant. This result is in agreement with ratios between 1.7 and 1.5 for induction obtained in non-fermentable carbon sources versus 2% glucose (Fig. 5a) and suggests that Hap3p, through the complex Hap2/3/4/5, could mediate this induction, although its functional significance in *K. lactis* is moderate and disruption of the *KIHEM12* gene in *K. lactis* does not result in a respiratory-deficient phenotype (Mulder et al. 1994).

The two putative CCAAT boxes which could mediate the response to the Hap2/3/4/5p complex were mutated as explained in the Materials and methods and depicted in Fig. 5b. Four constructions with different mutations in the promoter and fused in-frame to the reporter gene *lacZ* were used to transform *K. lactis* strain MW190-9B. Transformed cells were grown in 2% glucose, 0.5% glucose or 2% ethanol-glycerol. Measurements of β -galactosidase activity (Fig. 5c) revealed that single or double mutations of the CCAAT boxes at positions -389 to -385 and -663 to -667 diminished the activity of the promoter and that this effect was higher in 0.5% glucose or 2% ethanol-glycerol than in 2% glucose. The down-regulation observed in the double mutant is not higher than that observed in the single mutations; and this could be explained if only one of the CCAAT boxes is functional in the original promoter, but after deletion, the remaining one could replace its function. Although our data do not allow ascertaining which one of the CCAAT boxes is functional in the cell, elimination of the CCAAT box at positions -389 to -385 has the higher effect and is also more dependent on the carbon

Fig. 5a-c Promoter analyses by *lacZ* fusions. **a** β -Galactosidase assay showing the influence of carbon source and heme levels upon *KIHEM12* expression. **b** Description of deletions used in this study. **c** Effect of deletions described in **b** on *KIHEM12* promoter activity in three different culture media. These analyses were carried out by transforming *K. lactis* strain MW190-9B. EG Ethanol glycerol, H hemin



source. Also, it matches the consensus CCAAT better than the sequence at positions -663 to -667.

Discussion

The cloning and sequencing of the *KIHEM12* gene is presented. The gene is functional in *S. cerevisiae* and complements both a point mutation and the deletion of the homologous gene *ScHEM12*. The homology of the *K. lactis* protein encoded by *KIHEM12* to URO-D from different sources and the conservation of amino acid residues, which is related to catalytic activity for this enzyme from other sources, also supported its URO-D function. This presumption was also confirmed by the phenotypes associated with the null allele in *K. lactis*, since they are those expected for a protein related to heme biosynthesis. The strain with the null allele shows heme auxotrophy (Labbe-Bois and Labbe 1990) and red fluorescence upon UV irradiation, indicative of an accumulation of Zn-porphyrins. (Rytka et al. 1984; Kurlandzka et al. 1988). The presence of methionine auxotrophy in the null mutant of *HEM12* from *S. cerevisiae* has been reported (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/>). However, we have not detected this phenotype in the *K. lactis* Δ *hem12* null mutant. Methionine auxotrophy is related to mutants affected in the early steps of the heme pathway, prior to the synthesis of uroporphyrinogen III (Labbe-Bois and Labbe 1990). Therefore, the phenotype in the *K. lactis* Δ *hem12* null mutant is that expected for a gene coding for an enzyme acting downstream in the heme biosynthetic pathway and one that does not interfere with the production of siroheme. Methionine auxotrophy in the null mutant of *HEM12* from *S. cerevisiae* is probably attributable to the concurrence, in the genetic background of the strain, of other undetected mutations affecting the regulation of heme or methionine biosynthesis.

In the *K. lactis* URO-D, the organisation of secondary structure elements is compatible with a spatial structure in a $(\beta/\alpha)_8$ -barrel, similar to that crystallographically determined for the enzyme from other sources (Whitby et al. 1998; Martins et al. 2001). Analysis of the crystal structure of human URO-D suggests that the active site is formed by loops L1, L2, L3, L4 and L8, which form a cleft necessary for interaction with the acetate and/or propionate carboxylate groups of the substrates. Consistent with the highly negatively charged substrate, the active site cleft contains a number of polar and positively charged chains (Whitby et al. 1998). In the *K. lactis* enzyme, several basic amino acids are present in L1: Arg37, Arg41, His47 and Lys50. However, the two basic residues His220 and His223 present in the human L4 loop are substituted by Trp and Glu in *K. lactis* and also in all the URO-Ds aligned in Fig. 2. For the two conserved residues related to catalysis in other organisms, in the predicted $(\beta/\alpha)_8$ -barrel for *K. lactis* URO-D, the Tyr167 is also located at the L3

loop, yet Asp81 is located on the other side of the hypothetical barrel, far away from loop L2 where this conserved Asp is located in human URO-D. We may speculate that Glu220 and Glu223, present in the L4 loop in *K. lactis* URO-D, may replace the functional role of Asp in the catalytic cleft, but mutation and crystallographic analyses will be necessary to confirm this hypothesis.

The five Cys found in the URO-D from *K. lactis* align with Cys present in URO-D of fungal origin (Fig. 2). URO-D from yeast and other sources is inhibited by sulphhydryl-specific reagents, such as *N*-ethylmaleimide (Elder et al. 1978; Kawanishi et al. 1983; Felix and Brouillet 1990). This result was initially interpreted as a consequence of the importance of Cys in the maintenance of the active site. However, data obtained by site-directed mutation refuted this idea (Wyckoff et al. 1996; Di Flumieri et al. 1997). Determination of the crystal structure of human URO-D suggests that Cys do not participate in the catalytic site and are buried in the structure. Therefore, modification with a bulky maleimide group is likely to disrupt the structure explaining the inhibitory effect, but a conservative change to Ser, as that introduced by site-directed mutagenesis, is easily tolerated (Whitby et al. 1998). Curiously, the five Cys are well conserved in *K. lactis* and in all the URO-D of fungal origin and may play an important, yet uncharacterised, role in preserving structure or activity.

The URO-D enzyme is also inhibited by diethylpyrocarbonate (Battlle et al. 1986) and ferric iron (Felix and Brouillet 1990), suggesting the involvement of His residues in changing the conformation of the active site. In human URO-D, the change of His339 to Asn displays normal activity for the initial substrate, but the mutated enzyme is weakly active for additional decarboxylations of the 7-intermediate, 6-intermediate and 5-intermediate (Wyckoff et al. 1996). This residue is located at the opening to the active site cleft and thus may play a role in the orientation of partially decarboxylated substrates in the active site (Whitby et al. 1998). This His is also present in the *K. lactis* protein at position 345, reinforcing the importance of its conservation.

The expression of *KIHEM12* is strain-dependent. The existence of extragenic mutations affecting *HEM12* expression has been reported in *S. cerevisiae* (Zoladek et al. 1995) and could be related to different levels of expression, both in different genetic backgrounds and in *K. lactis* (Fig. 4b). The pattern of *KIHEM12* transcriptional regulation in different carbon sources is very similar to that reported for its homologue in *S. cerevisiae* (Chelstowska et al. 1992; Di Flumieri et al. 1993). The transcription of the *KIHEM12* gene increases slightly in non-fermentable carbon sources, as deduced by β -galactosidase assays. There are two consensus sequences (CCAAT) for the interaction with the complex Hap2/3/4/5p in the promoter (Fig. 4a); and mutation of *KIHAP3* decreases *KIHEM12* transcrip-

tion. In a Hap2/3/4/5p wild-type genetic background, mutation of the CAAAT boxes also lowers *KIHEM12* expression. The effects caused by mutations are carbon source-dependent, as previously explained in the Results. Binding of the Hap2/3/4/5p complex to their regulated promoters in *S. cerevisiae* is related to heme induction and also to induction by non-fermentable carbon sources under aerobic conditions (Olesen et al. 1987). The presence of the consensus CCAAT in the *KIHEM12* promoter and the fact that β -galactosidase levels do not change when comparing cells grown in (2%) glucose versus fructose (2%) both argue against glucose repression and in favour of the existence of induction in non-fermentable carbon sources. Also reinforcing this hypothesis, no putative sites for the binding of transcriptional repressors related to glucose repression are present in the promoter. Putative sites for Gcr1p binding, a transcriptional regulator of glycolytic enzymes, do not seem to be functional since *KIHEM12* expression does not increase with higher levels of glucose.

The *KIHEM12* gene is not regulated by heme levels. The addition of hemin, a precursor of heme biosynthesis, has no effect on β -galactosidase expression directed by the *KIHEM12* promoter at concentrations that affect the levels of expression of other genes related to the heme biosynthetic pathway (González-Domínguez et al. 2000). The data on expression indicate that the transcriptional regulation of *KIHEM12* is not a key point for regulation of heme synthesis in *K. lactis* although it is slightly induced in non-fermentable carbon sources by a Hap3p-dependent mechanism.

Acknowledgements This work was supported by grants PGIDT00PXI10303PR and PGIDT01PXI10303PR from the Xunta de Galicia (Spain), BMC2000-0117 and BMC2003-04992 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). We thank our yeast colleagues cited in the text for providing strains and plasmids. L.N.N. was the recipient of a fellowship award from the Xunta de Galicia (Spain).

References

- Battle AM, Salamanca RE de, Chinarro S, Afonso SG, Stella AM (1986) Photodynamic inactivation of red cell uroporphyrinogen decarboxylase by porphyrins. *Int J Biochem* 18:143-147
- Bianchi MM, Falcone C, Chen XJ, Wesołowski-Louvel M, Frontali L, Fukuhara H (1987) Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 μ circular plasmid pKDI. *Curr Genet* 12:185-192
- Billard P, Menart S, Blaissonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H, Wesołowski-Louvel M (1996) Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J Bacteriol* 178:5860-5866
- Boistein D, Falco SC, Stewart SE, Brennan M, Scherer S, Stinchcomb DT, Struhl K, Davis RW (1979) Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* 8:17-24
- Chelstowska A, Zoladek T, Garey J, Kushner J, Rytka J, Labbe-Bois R (1992) Identification of amino acid changes affecting yeast uroporphyrinogen decarboxylase activity by sequence analysis of *hem12* mutant alleles. *Biochem J* 288:753-757
- Chen XJ (1996) Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 172:131-136
- Díaz Prado S, Tarrío N, Cerdán ME, González-Siso MI (2004) Cloning genes from a library using a clustering strategy and PCR. *Mol Biotechnol* 26:35-38
- Di Flumeri C, Larocque R, Keng T (1993) Molecular analysis of *HEM6* (*HEM12*) in *Saccharomyces cerevisiae*, the gene for uroporphyrinogen decarboxylase. *Yeast* 9:613-623
- Di Flumeri C, Acheson NH, Keng TA (1997) A conserved Cys residue in yeast uroporphyrinogen decarboxylase is not essential for enzymatic activity. *Can J Microbiol* 43:792-795
- Elder GH, Lee GB, Tovey JA (1978) Decreased activity of hepatic uroporphyrinogen decarboxylase in sporadic porphyria cutanea tarda. *N Engl J Med* 299:274-278
- Felix F, Brouillet N (1990) Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 188:393-403
- Garey JR, Labbe-Bois R, Chelstowska A, Rytka J, Harrison L, Kushner J, Labbe P (1992) Uroporphyrinogen decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *HEM12* gene sequence and evidence for two conserved glycines essential for enzymatic activity. *Eur J Biochem* 205:1011-1016
- González-Domínguez M, Méndez-Carro C, Cerdán ME (1997) Isolation and characterization of the *KIHEM1* gene in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 13:961-971
- González-Domínguez M, Freire-Picos MA, Ramil E, Guiard B, Cerdán ME (2000) Heme-mediated transcriptional control in *Kluyveromyces lactis*. *Curr Genet* 38:171-177
- González-Domínguez M, Freire-Picos MA, Cerdán ME (2001) Haem regulation of the mitochondrial import of the *Kluyveromyces lactis* 5-aminolaevulinic synthase: an organelle approach. *Yeast* 18:41-48
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153:136-168
- Kawanishi S, Seki Y, Sano S (1983) Uroporphyrinogen decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenyl isomers. *J Biol Chem* 258:4285-4292
- Kurlandzka A, Zoladek T, Rytka J, Labbe-Bois R, Urban-Grimal D (1988) The effects in vivo of mutationally modified uroporphyrinogen decarboxylase in different *hem12* mutants of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochem J* 253:109-116
- Martins BM, Grimm B, Mock H-P, Huber R, Messerschmidt A (2001) Crystal structure and substrate binding modeling of the uroporphyrinogen-III decarboxylase from *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* 276:44108-44116
- Mount RC, Jordan BE, Hadfield C (1996) Reporter gene systems for assaying gene expression in yeast. *Methods Mol Biol* 53:239-248
- Mulder W, Scholten IH, Boer RW de, Grivell LA (1994) Sequence of the HAP3 transcription factor of *Kluyveromyces lactis* predicts the presence of a novel 4-cysteine zinc-finger motif. *Mol Genet Genomics* 245:96-106
- Nordmann Y, Puy H (2002) Human hereditary hepatic porphyrias. *Clin Chim Acta* 325:17-37
- Olesen J, Hahn S, Guarente L (1987) Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* 51:953-961
- Prior C, Mamestier P, Fukuhara H, Chen XJ, Wesołowski-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
- Rost B (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* 266:525-539
- Rothstein R (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* 194:281-301
- Rytka J, Bilinski T, Labbe-Bois R (1984) Modified uroporphyrinogen decarboxylase activity in a yeast mutant which mimics porphyria cutanea tarda. *Biochem J* 218:405-413

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10:1793-1808
- Whitby FG, Phillips JD, Kushner JP, Hill CP (1998) Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO J* 17:2463-2471
- Wyckoff EE, Phillips JD, Sowa AM, Franklin MR, Kushner JP (1996) Mutational analysis of human uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim Biophys Acta* 1298:294-304
- Zitomer RS, Hall BD (1976) Yeast cytochrome *c* messenger RNA. In vitro translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product. *J Biol Chem* 251:6320-6326
- Zoladek T, Chelstowska A, Labbe-Bois R, Rytka J (1995) Isolation and characterization of extragenic mutations affecting the expression of the uroporphyrinogen decarboxylase gene (*HEM12*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 247:471-481

36

2005
TD

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
AREA DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDADE DA CORUÑA