



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E MOLECULAR
FACULTADE DE CIENCIAS
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

KIHEM13, un gen hipóxico en la biosíntesis de hemo

Memoria presentada por
MOISÉS BLANCO CALVO

para aspirar al grado de
DOCTOR EN BIOLOGÍA

Junio 2006

2006
T
D

© Universidade da Coruña, 2006
Todos los derechos reservados

El presente trabajo, ***KIHEM13, un gen hipóxico en la biosíntesis de hemo***, presentado por Moisés Blanco Calvo para aspirar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular e Molecular de la Universidade da Coruña.

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

En A Coruña, a 9 de Mayo de 2006.

Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva
Catedrática del Área de Bioquímica y Biología Molecular

El autor de esta tesis ha disfrutado durante su realización de una beca predoctoral concedida por la Dirección Xeral de Investigación, Desenvolvemento e Innovación de la Xunta de Galicia (marzo 2004 – marzo 2006) y de una beca predoctoral concedida por la Universidade da Coruña (enero 2004 – febrero 2004). También ha estado contratado (septiembre 2001 – diciembre 2003) con cargo al proyecto de investigación MCYT (BMC2000-0117).

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos MCYT (BMC2000-0117) y MCYT (BMC2003-04992) y a través de los incentivos para dichos proyectos PGIDT01PXI10303PN y PGIDT04PXIC10302PN de la Xunta de Galicia.

A mi madre

"Hace tan solo seis meses, todavía trabajaba como albañil. No, no hay nada humillante en ello, aprendes muchas cosas, trabas amistad con gente sencilla y admirable, y también te das cuenta de que nosotros, gente de ciencia, somos unos privilegiados, porque hacer un trabajo que es a la vez una pasión es un privilegio, sí, amigos míos, el privilegio que jamás han conocido mis compañeros albañiles, porque es imposible cargar vigas con pasión."

Milan Kundera, en La Lentitud (1995)

Después de casi cinco años ha llegado la hora. He de enfrentar mi destino, ponerme delante del ordenador y dedicarle unas palabras a toda esa gente que de alguna forma ha estado conmigo y ha contribuido a este trabajo. Para empezar, quisiera agradecerle a la Dra. Esperanza Cerdán la oportunidad que me ha brindado de hacer una tesis (quién me lo iba a decir). Quisiera también agradecerle la confianza inquebrantable que ha depositado en este proyecto cuando ni yo mismo lo veía claro. Tampoco puedo olvidarme aquí del resto del equipo de Bioquímica y Biología Molecular que ha estado ahí para resolver alguna que otra incidencia y, bueno, también ha *caído* alguna que otra *bronca*. Ellos son las Dras. Ana Rodríguez, Maribel González, Marián Freire, Esther Rodríguez y Mónica Lamas y el Dr. Manuel Becerra Y, como no, a mi *jefa ejecutiva*, la *ya* Dra. Laura Núñez quisiera agradecerle toda esa avalancha de ayuda prestada en todo tipo de materias. Después de estos años juntos no deja de sorprenderme su sobrehumana capacidad de trabajo y dedicación, alimentada de un amor por la ciencia que estoy por asegurar que deja atrás al de muchos premios Nobel.

Una mención especial merece una persona también muy especial: Nuria. Después de todo este tiempo, tengo tanto que agradecerle que todo lo que diga aquí se quedará corto. Gracias por transmitirme un poco de tu energía (*sísmica*, ¿no?) desbordante y gracias por prestarme muchas veces parte de tu gran inteligencia (aunque reniegues de ella). Gracias por tu risa imborrable y gracias por tus incansables y sufridas cuerdas vocales que son los mejores antidotos conocidos contra la tristeza y la apatía. Gracias por estropear todo cacharro con más de dos piezas que tocas, porque si no yo me aburriría. Y, especialmente, gracias por aportar todo lo que has aportado a mi ser; no sé si te has dado cuenta pero tú has hecho de mí un nuevo yo, alguien distinto y desconocido de aquel que era hace ya casi cinco años. Gracias...

A los que están y que quizás algún día se vean escribiendo esto mismo: Raquel Castro, Ángel Pereira y Rafael Fernández, gracias por apoyarme en este último empujón, gracias por haberme permitido compartir con vosotros lo poco que sé y, en definitiva, gracias por ser como sois. Y a nuestras más recientes adquisiciones de la *cantera*: Silvia Remeseiro y Luisa Martínez, gracias por dejarme volver a ver la ilusión y las ganas de aprender de los que empiezan su camino.

A nuestra *pequeña*, Aida Sánchez, a la que le he prometido un apartado para ella sola, gracias por todo. Excepto por *chantajearme* emocionalmente para quedarme a comer y por haberme *enganchado* a las telenovelas.

Tampoco quisiera olvidarme de los que ya se han ido y que han aportado, de una u otra manera, algo a la realización de esta tesis: Ana Franco, Arturo Rodríguez, Silvia Díaz, Cristina Trillo, Silvia Seoane, Gema Ruiz, Eva Fortuna, Mónica Rey y Rebeca Santiso. Y gracias también a todos los chicos de intercambio por haberme mostrado que hay un mundo maravilloso por descubrir más allá del que vemos cada día.

Y como lo más importante siempre se deja para el final por aquello de que los últimos serán los primeros, quisiera agradecerle a mi madre todo lo que ha hecho, todo lo que ha luchado y todo lo que se ha sacrificado por mí desde el primer día en que vine a este mundo. Esta tesis es tan tuya como mía, porque tú me has convertido en lo que soy y lo que soy ha hecho esto. Por eso, va dedicada a ti.

Quisiera agradecerles al Dr. Jean Michel Camadro y a su gente,
la indispensable colaboración prestada con las medidas de la
actividad coproporfirinógeno oxidasa incluidas en este trabajo.
También quisiera agradecerles a las Dras. Laura Núñez y
Mónica González, su valiosa aportación a este trabajo.

ABREVIATURAS

- *: final en secuencia proteica.
- A: Alanina, aminoácido en secuencia proteica.
- A: Ampicilina, antibiótico añadido como suplemento en un medio de cultivo.
- A: desoxinucleótido de Adenina en secuencia de DNA.
- A: unidades de Absorbancia.
- AcLi: Acetato de Litio.
- AdoMet: S-Adenosil-L-Metionina.
- ADP: porfiria por deficiencia en ALA deshidratasa.
- AIP: Acute Intermitent Porphyria, porfiria intermitente aguda.
- ALA: AminoLevulinic Acid, ácido aminolevulínico.
- AMPc: adenosin monofosfato cíclico, nucleótido de adenina cíclico.
- APS: Ammonium PerSulphate, persulfato amónico.
- B: asparragina o ácido aspártico, aminoácido en secuencia proteica.
- bp: base pairs, pares de bases.
- BSA: Bovine SeroAlbumin, Seroalbúmina bovina.
- C: cisteína, aminoácido en secuencia proteica.
- C: desoxinucleótido de Citosina en secuencia de DNA.
- C: zona carboxilo-terminal, en estructura proteica.
- cDNA: DNA complementario, ácido desoxirribonucleico complementario.
- CDS: secuencia codificadora, CoDing Sequence.
- CEP: Congenital Erythropoietic Porphyria, porfiria eritropoyética congénita.
- CHIP: CHromatin ImmunoPrecipitation.
- CM: Complete Medium, medio completo.
- cm: centímetro.
- Cm²: centímetro cuadrado.
- CoA: Coenzima A.
- Coprogen: CoproPorphirinógeno.
- CPD: CoproPorphirinógeno Deshidrogenasa.
- CPO: CoproPorphirinógeno Oxidasa.
- CPRE: CPO Promoter Regulatory Element, elemento regulador del promotor de CPO.
- D.O.: Densidad Optica.
- D: cualquier base menos C en secuencia de ácidos nucleicos.
- D: ácodp aspártico, aminoácido en secuencia proteica.
- dATP: deoxyAdenine TriPhosphate, desoxinucleótido de adenina trifosfatado.
- dCTP: deoxyCytosine TriPhosphate, desoxinucleótido de citosina trifosfatado.

ddATP: *dideoxyAdenine TriPhosphate*, didesoxinucleótido de adenina trifosfatado.
ddCTP: *dideoxyCytosine TriPhosphate*, didesoxinucleótido de citosina trifosfatado.
ddGTP: *dideoxyGuanine TriPhosphate*, didesoxinucleótido de guanina trifosfatado.
ddTTP: *dideoxyThymine TriPhosphate*, didesoxinucleótido de timina trifosfatado.
DEPC: *DiEtilPiroCarbonato*.
dGTP: *deoxyGuanine TriPhosphate*, desoxinucleótido de guanina trifosfatado.
DNA: ácido desoxirribonucleico.
DNasa: desoxirribonucleasa, enzima degradadora de DNA.
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfatados, dATP, dTTP, dGTP, dCTP.
DTT: *DiTioTreitol*.
dTTP: *deoxyThymine TriPhosphate*, desoxinucleótido de timina trifosfatado.
E: glutamato, aminoácido en secuencia proteica.
E.: *Escherichia*.
EDTA: ácido *EtilenDiamino Tetra-Acético*.
EMSA: *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, ensayo de retardo en gel.
EPP: *Erythropoietic Protoporphyrin*, protoporfirina eritropoyética.
EUROSCARF: *EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functinal analysis*
F: fenilalanina, aminoácido en secuencia proteica.
G: desoxinucleótido de Guanina en secuencia de DNA.
G: glicina, aminoácido en secuencia proteica.
g: gramo, masa.
GCT+A: mezcla de dNTPs deficiente en dATP, usada en el marcaje de *primer extension*.
GTF: factor general de la transcripción, *General Transcription Factor*.
H: cualquier base menos G en secuencia de ácidos nucleicos.
H: histidina, aminoácido en secuencia proteica.
HEPES: ácido [4-(2-HidroxiEtil)-1-Piperazina-Etano-Sulfónico]
Hz: hercios, frecuencia.
I: isoleucina, aminoácido en secuencia proteica.
HCP: *Hereditary Coproporphyrin*, coproporfirina hereditaria.
IPTG: *IsoPropil-β-D-TioGalactopiranosido*.
K: Kanamicina, antibiótico suplementado a un medio de cultivo.
K.: *Kluyveromyces*.
K: lisina, aminoácido en secuencia proteica.
kDa: KiloDaltons, peso molecular.
Kl: delante de los nombres de los genes indica que son de *Kluyveromyces lactis*.
L: leucina, aminoácido en secuencia proteica.
l: litro, capacidad = volumen.
LB: *Luria Bertani*, medio de cultivo.
M: metionina, aminoácido en secuencia proteica.
M: molar, concentración mol/l.
mBa: milibares, presión.
Me: grupo Metilo.
mg: miligramo, masa.
mJ: milijulios, energía.
ml: mililitro, capacidad = volumen.
mM: milimolar, concentración.
MOPS: ácido 3-(N-Morfolino)-Propono-Sulfónico.
mRNA: RNA mensajero.
N: cualquier base en secuencia de ácidos nucleicos.
N: asparragina, aminoácido en secuencia proteica.
N: zona amino-terminal, en estructura proteica.
NADPH: nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido.
ng: nanogramos.
nm: nanometros, longitud de onda.
nmol: nanomoles.
°C: grados centígrados, temperatura.

ONPG: O-Nitrofenil- β -D-Galactopiranosido.
ORF: Open Reading Frame, pauta abierta de lectura.
P: prolina, aminoácido en secuencia proteica.
pb: pares de bases.
PBG: PorfoBilinóGeno.
PCIA: Phenol Chloroform Isoamyl Alcohol, fenol + cloroformo + alcohol isoamílico.
PCR: Polymerase Chain Reaction, reacción en cadena de la polimerasa.
PCT: Porfirina Cutánea Tarda.
PDB: Protein Data Bank, base de datos de estructuras proteicas.
PEG: PoliEtilenGlicol.
pH: potencial de Hidrógeno.
pmol: picomol.
Pro: grupo Propilo.
Proto: Protoporfirina IX.
Protogen: Protoporfirinógeno.
Q: glutamina, aminoácido en secuencia proteica.
Q: glutamato, aminoácido en secuencia proteica.
R: bases púricas, A ó G en secuencia de ácidos nucleicos.
R: arginina, aminoácido en secuencia proteica.
RNA: ácido ribonucleico.
RNasa: ribonucleasa, enzima degradadora de RNA.
rRNA: RNA ribosómico.
r.p.m.: revoluciones por minuto.
S.: *Saccharomyces*.
s: segundos.
S: serina, aminoácido en secuencia proteica.
Sc: delante de los nombres de los genes indica que son de *Saccharomyces cerevisiae*.
SD: secuencia Shine-Dalgarno.
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, dodecil sulfato sódico.
T: desoxinucleótido de Timina en secuencia de DNA.
t: tiempo.
T: treonina, aminoácido en secuencia proteica.
Taq: DNA-polimerasa usada en PCR extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*.
TBP: proteína de unión a TATA, TATA Binding Protein.
TEMED: N, N, N', N' -TetraMetil-EtilenoDiamina.
TIC: Translational Initiation Codon, codón de inicio de la traducción.
tRNA: RNA transferente.
Tween 80: *polyoxyethilenesorbitan monooleate*.
U: unidad de enzima.
UAS: Upstream Activating Sequence, secuencia activadora 5', elemento regulador.
upORF: upstream ORF.
Urogen: Uroporfirinógeno.
UTR: región no traducida, UnTranslated Region.
V: capacidad = volumen.
V: valina, aminoácido en secuencia proteica.
V: voltios, potencial eléctrico.
Vn: grupo Vinilo.
VP: Variegata Porphyrina, porfirina variegada.
W: bases A ó T/U en secuencia de ácidos nucleicos.
W: triptófano, aminoácido en secuencia proteica.
x g: fuerza centrífuga relativa ejercida sobre una muestra en una centrifuga.
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.
Y: bases pirimidínicas, C ó T, en secuencia de ácidos nucleicos.
Y: tirosina, aminoácido en secuencia proteica.
YNB: Yeast Nitrogen Base, suplemento para medios CM.
YPD: Yeast Peptone Dextrose, medio de cultivo a base de estos tres compuestos.

Z: Glutamina o ácido glutámico, aminoácido en secuencia proteica.

Ω : ohmios, resistencia eléctrica.

μF : microfaradios, capacitancia eléctrica.

μg : microgramo, masa.

μl : microlitro, capacidad = volumen.

μm : micrómetros, longitud.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	27
Levaduras y biotecnología	27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> versus <i>Kluyveromyces lactis</i>	27
Hemo, oxígeno y respiración	28
El hemo y su biosíntesis	29
La <i>coproporfirinógeno oxidasa</i> (CPO) y los genes que la codifican	31
En procariontes	31
En eucariotas	32
En <i>S. cerevisiae</i>	32
En <i>K. lactis</i>	37
En otros eucariotas	38
OBJETIVOS	43

MATERIAL Y MÉTODOS	47
Material biológico	47
Cepas de bacterias (<i>Escherichia coli</i>)	47
Cepas de levaduras	47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
<i>Kluyveromyces lactis</i>	47
Medios de cultivo	48
Medios de cultivo para bacterias	48
LB modificado	48
Medio SOC	48
Medios LB selectivos	48
Suplemento de X-Gal	49
Medios de cultivo para levaduras	50
YPD	50
CM y derivados	50
Suplemento de hemina	51
Adición de geneticina	52
Cultivos de levaduras en hipoxia	52
Sistemas para la realización de cultivos en hipoxia	52
Suplementos para cultivos en hipoxia	53
Cultivos en hipoxia con hemina	54
Marcadores de tamaño molecular	54
Vectores y genotecas	55
Genotecas de <i>K. lactis</i> : genoteca de pAB24.	55
Vectores	55
Vectores de clonación en bacterias	55
Vectores lanzadera de <i>K. lactis</i>	56
Vectores lanzadera de <i>S. cerevisiae</i>	56
Vectores lanzadera de <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i>	57
Introducción de DNA en las células	57
Transformación de bacterias	57
Preparación de células competentes de bacterias	57
Transformación de células de bacterias mediante choque térmico	58
Preparación de células electrocompetentes de bacterias	58
Transformación de células de bacterias mediante electroporación	59
Transformación de levaduras	59
Competencia de células de levaduras	59
Transformación de células de levaduras mediante choque térmico	60
Transformación de células de levaduras mediante electroporación	61
Extracción de ácidos nucleicos	62
Extracción de DNA plasmídico en bacterias	62
Extracción mediante lisis alcalina	62
Extracción mediante kits comerciales	64
Extracción de DNA plasmídico en levaduras	64
Extracción de DNA genómico de levaduras	65
Extracción de RNA total en levaduras	65
Extracción con <i>Trizol™ Reagent</i>	65
Extracción con PCIAxRE	68

Cuantificación de ácidos nucleicos	69
Mediante espectrofotometría	69
Mediante electroforesis en gel de agarosa	70
Ingeniería genética: corte y pegado del DNA	70
Corte: digestión mediante endonucleasas de restricción	70
Ligación: realización de construcciones	70
Recuperación, purificación y concentración de DNA	71
Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	71
Purificación y concentración de fragmentos de DNA	72
Obtención de DNA <i>in vitro</i>	72
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	72
Obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mediante retrotranscripción	73
Eliminación de restos de DNA genómico de las preparaciones de RNA	73
Obtención de cDNA para <i>primer extension</i>	74
Obtención de cDNA total y cDNA específico de gen	75
Electroforesis: separación y visualización de ácidos nucleicos	76
Electroforesis en geles de agarosa	76
Electroforesis de DNA en geles de agarosa	76
Electroforesis de RNA en geles de agarosa	77
Electroforesis en geles de poliacrilamida	79
Secuenciación	81
Secuenciación manual	81
Secuenciación automática	82
Transferencia <i>Northern</i>	82
Transferencia a membrana de RNA separado en gel de agarosa mediante electroforesis	83
Marcaje de sondas	84
Prehibridación, hibridación, lavado y exposición	85
Prehibridación	85
Hibridación	85
Lavado	85
Exposición y cuantificación	86
Determinación de los niveles de expresión de genes de <i>K. lactis</i> mediante <i>arrays</i> de DNA	86
Actividades enzimáticas	87
Medida de actividad <i>β-galactosidasa</i>	87
Medida de actividad <i>coproporfirinógeno oxidasa</i>	90
Soporte informático	91

RESULTADOS	95
Caracterización del gen <i>KIHEM13</i> y su proteína	95
Aislamiento del gen <i>KIHEM13</i>	95
Secuenciación de <i>KIHEM13</i>	98
Características de la proteína traducida a partir del gen <i>KIHEM13</i>	100
El gen <i>KIHEM13</i> complementa la mutación de <i>ScHEM13</i>	105
Obtención y análisis de una cepa haploide de <i>K. lactis</i> con el gen <i>KIHEM13</i> delecionado	107
Subclonación de <i>KIHEM13</i> en YIplac204	108
Eliminación de la secuencia codificadora de <i>KIHEM13</i>	109
Inserción del módulo kanMX4 en la construcción	110
Transformación de <i>K. lactis</i> y comprobación de la anulación de <i>KIHEM13</i>	111
Determinación del punto de inicio de la transcripción	113
Primer extension	113
Determinación de la naturaleza del extremo 5' del mRNA de <i>KIHEM13</i> mediante RT-PCR	117
Estudios de expresión heteróloga de <i>KIHEM13</i> en cepas de <i>S. cerevisiae</i> mutantes para genes reguladores relacionados con la respuesta a hipoxia	119
Obtención de una fusión del promotor de <i>KIHEM13</i> al gen reportero <i>lacZ</i> en el vector YEp365	119
Actividad del promotor de <i>KIHEM13</i> en cepas de <i>S. cerevisiae</i> silvestre y mutantes con deleciones para los genes reguladores <i>ROX1</i> y <i>MGA2</i>	119
Análisis de elementos reguladores en el promotor de <i>KIHEM13</i>	120
Análisis <i>in silico</i> del promotor	120
Fusiones en pXW1 al gen reportero <i>lacZ</i> desde el primer ATG de la ORF de <i>KIHEM13</i> (ATG1)	123
Fusiones en pXW1 al gen reportero <i>lacZ</i> desde el segundo ATG de la ORF de <i>KIHEM13</i> (ATG2)	126
Efecto de factores reguladores en <i>K. lactis</i> sobre la expresión de <i>KIHEM13</i>	127
Posibles factores reguladores relacionados con la respuesta aerobiosis/hipoxia en <i>K. lactis</i>	127
Expresión de los factores reguladores en condiciones aeróbicas e hipóxicas	130
Efecto de la deleción de <i>KIROX1</i> sobre la expresión de <i>KIHEM13</i>	131
Regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de hemo en <i>K. lactis</i>	132

DISCUSIÓN	137
El gen <i>KIHEM13</i> se encuentra en copia única en el genoma de <i>K. lactis</i>	137
El gen <i>KIHEM13</i> codifica una <i>coproporfirinógeno oxidasa</i> que es funcional en <i>K. lactis</i> y en <i>S. cerevisiae</i>	138
Los puntos de inicio de la transcripción de <i>KIHEM13</i> y su posición relativa respecto a las cajas TATA y a los TICs	139
<i>KIHEM13</i> : ORF y CDS	140
La actividad CPO de <i>K. lactis</i> en condiciones aerobias se recupera mayoritariamente en la fracción soluble no unida a membranas	143
La regulación transcripcional de <i>KIHEM13</i>	144
La regulación hipóxica de la biosíntesis de hemo en <i>K. lactis</i> a nivel transcripcional y el metabolismo de levaduras fermentadoras o respiradoras	148
CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXO	169

INTRODUCCIÓN

1. Levaduras y biotecnología

En términos generales la biotecnología se puede definir como el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre.

La biotecnología ha sido utilizada desde los comienzos de la historia en actividades tales como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o en la mejora de cultivos y de animales domésticos. Procesos como la producción de cerveza, vino, queso y yogurt implican el uso de microorganismos con el fin de convertir un producto natural en un producto derivado por fermentación. Entre los microorganismos empleados las levaduras ocupaban un lugar destacado, aunque claro, nuestros antepasados no tenían conciencia de ello. En la actualidad, la biotecnología se basa en una gran variedad de técnicas utilizadas en biología molecular que sirven para modificar, bien microorganismos, como las levaduras, bien células vegetales y animales, dotándolas de la capacidad para generar diversos productos de interés para el hombre que de otra manera serían muy difíciles de conseguir.

Por tanto, podemos decir que la biotecnología abarca desde la biotecnología tradicional, muy conocida y establecida, hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas de ingeniería genética sobre organismos de interés biotecnológico.

2. *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*

La levadura más utilizada desde los inicios de la biotecnología ha sido *Saccharomyces cerevisiae*. Se trata de una levadura cuyo mecanismo principal para la obtención de energía metabólica se basa en las fermentaciones. Incluso en condiciones aeróbicas, esta levadura fermenta glucosa u otras fuentes de carbono suministradas que puedan ser convertidas en etanol. Tan sólo cambia su manera de obtener energía cuando las fuentes de carbono de las que dispone no son fermentables, pasando entonces a respirar. Este sistema metabólico ha convertido a *S. cerevisiae* en el organismo más empleado en la biotecnología tradicional, una biotecnología que se centraba sobre todo en la elaboración de nuevos alimentos a través de procesos de fermentación.

Sin embargo, con la llegada de las técnicas de ingeniería genética aplicadas a la biotecnología, ésta ha sufrido una gran revolución, descubriéndose nuevas aplicaciones más allá de las ya conocidas en la industria alimentaria. De este modo, hoy se generan mediante procesos biotecnológicos un gran número de productos destinados al empleo en la industria farmacéutica, química, etc. Muchas veces estos procesos no sólo no requieren que los organismos empleados fermenten, sino que incluso este modelo metabólico resulta contraproducente. Ello es debido a que la generación de los productos finales depende en gran medida de la capacidad de generar biomasa por parte del organismo que lleva a cabo el

proceso biotecnológico, de tal manera que cuánta más biomasa se produzca en el menor tiempo posible y con los mínimos costes, mayor rendimiento económico se podrá obtener. Sin embargo, al ser la fermentación un sistema metabólico muy ineficiente, en términos de aprovechamiento de las fuentes de carbono y de obtención de energía, resulta inadecuada. Mediante el metabolismo respiratorio la levadura es capaz de generar mucha más cantidad de energía partiendo de una misma cantidad de nutrientes. Como consecuencia de ello, un microorganismo que tenga como modelo metabólico básico la respiración, asegura un mayor rendimiento biotecnológico y, por tanto, económico, puesto que con el mismo coste se generará más biomasa y mayor cantidad de producto final. Por todo lo expuesto, actualmente se utilizan, y son objeto de investigación para su mejora, una serie de microorganismos, entre los que se encuentra la levadura *Kluyveromyces lactis* que utiliza la respiración como sistema metabólico preferente para la obtención de energía. La fermentación sólo se produce en *K. lactis* en condiciones deficitarias de oxígeno, necesario para el metabolismo respiratorio (González-Siso *et al.*, 1996).

3. Hemo, oxígeno y respiración

El grupo hemo es un compuesto formado por cuatro anillos pirrólicos entre los cuáles se intercala un ión de hierro (en estado de oxidación +2 ó +3 según los casos). Este ión es capaz de interactuar de forma reversible con el oxígeno lo que convierte al hemo en un transportador de oxígeno. Además, el hemo puede interactuar con otras moléculas proporcionando un sistema para su unión y transporte. Debido a estas características, se ha postulado que en *S. cerevisiae* el grupo hemo puede funcionar como un sensor (Poyton, 1999) capaz de detectar la cantidad de oxígeno disponible en la célula en cada momento, bien a través de su unión física a él, bien a través del estado *redox* del hierro. Ante las variaciones en los niveles de oxígeno del medio ambiente y de la célula, el grupo hemo puede desencadenar una serie de mecanismos de respuesta en la célula a través de la intervención de factores de transcripción específicos que, o bien son hemo-proteínas, o son capaces de unirse a hemo. Además de este papel en la regulación transcripcional, el grupo hemo es fundamental para la respiración puesto que forma parte como grupo prostético de algunos transportadores de electrones de la cadena respiratoria. Por otro lado, el hemo actúa como cofactor en muy diversas reacciones enzimáticas en las que participa el oxígeno, como es el caso de la llevada a cabo por la *coproporfirinógeno oxidasa* que interviene en la propia biosíntesis de hemo. De todo esto se puede deducir que el grupo hemo está estrechamente relacionado con la gestión del oxígeno a nivel celular. Por tanto, el estudio de la biosíntesis de hemo, de su regulación y de los procesos en los que interviene nos pueden ayudar a entender la utilización de rutas metabólicas diferentes para la obtención de energía en levaduras, como sucede al comparar *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Los conocimientos obtenidos pueden resultar de aplicación para la modificación y mejora de estos microorganismos de cara a su aplicación en nuevos procesos biotecnológicos.

4. El hemo y su biosíntesis

En general, en diversos organismos procariotas y eucariotas la ruta de biosíntesis del hemo se encuentra organizada en ocho reacciones enzimáticas (Figura I.1). El primer paso consiste en la condensación de succinato y glicina para dar lugar al ácido δ -aminolevulínico (ALA), proceso catalizado por la enzima *aminolevulinato sintasa* codificada en levaduras por el gen *HEM1*, (*hemA* en procariotas). El siguiente paso llevado a cabo por la *aminolevulinato deshidratasa* codificada en levaduras por el gen *HEM2* (*hemB* en procariotas), consiste en la unión de dos moléculas de ALA para dar lugar a porfobilinógeno, una molécula cíclica que será la base estructural del grupo hemo. Como resultado de la fusión de cuatro moléculas de porfobilinógeno se consigue hidroximetilbilano gracias a la intervención de la *porfobilinógeno desaminasa* también llamada *uroporfirinógeno I sintasa*, codificada en levaduras por el gen *HEM3* (*hemC* en procariotas). El siguiente paso consiste en el cierre del anillo tetrapirrólico dando lugar a uroporfirinógeno III; esta reacción es catalizada por una holoenzima formada por la *uroporfirinógeno I sintasa* del paso anterior, junto con la *uroporfirinógeno III cosintasa*, fundamental para la formación del producto. Esta enzima está codificada en levaduras por el gen *HEM4* (*hemD* en procariotas). A continuación se genera coproporfirinógeno III con la intervención de la *uroporfirinógeno descarboxilasa* codificada en levaduras por el gen *HEM12* (también llamado *HEM6* en levaduras; *hemE* en procariotas). En el siguiente paso se produce una descarboxilación de la molécula, esta vez en presencia de oxígeno, dando lugar a protoporfirinógeno IX por la acción de la *coproporfirinógeno oxidasa* (Figura I.2 e I.5) codificada en levaduras por el gen *HEM13* (en procariotas *hemF* ó *hemN*; estos dos últimos dan lugar a dos isoformas bacterianas de la enzima). Seguidamente, el protoporfirinógeno IX pasa a protoporfirina IX, proceso catalizado por la *protoporfirinógeno oxidasa* con la intervención de nuevo del oxígeno. Esta enzima está codificada en levaduras por el gen *HEM14* (*hemG* y *hemY* en procariotas). A la protoporfirina IX ahora se le pueden incorporar distintos iones metálicos para dar lugar a distintos tipos de moléculas; cuando se le incorpora un ión de hierro se origina hemo. Este último paso lo realiza la *ferroquelatasa* codificada en levaduras por el gen *HEM15* (*hemH* en procariotas).

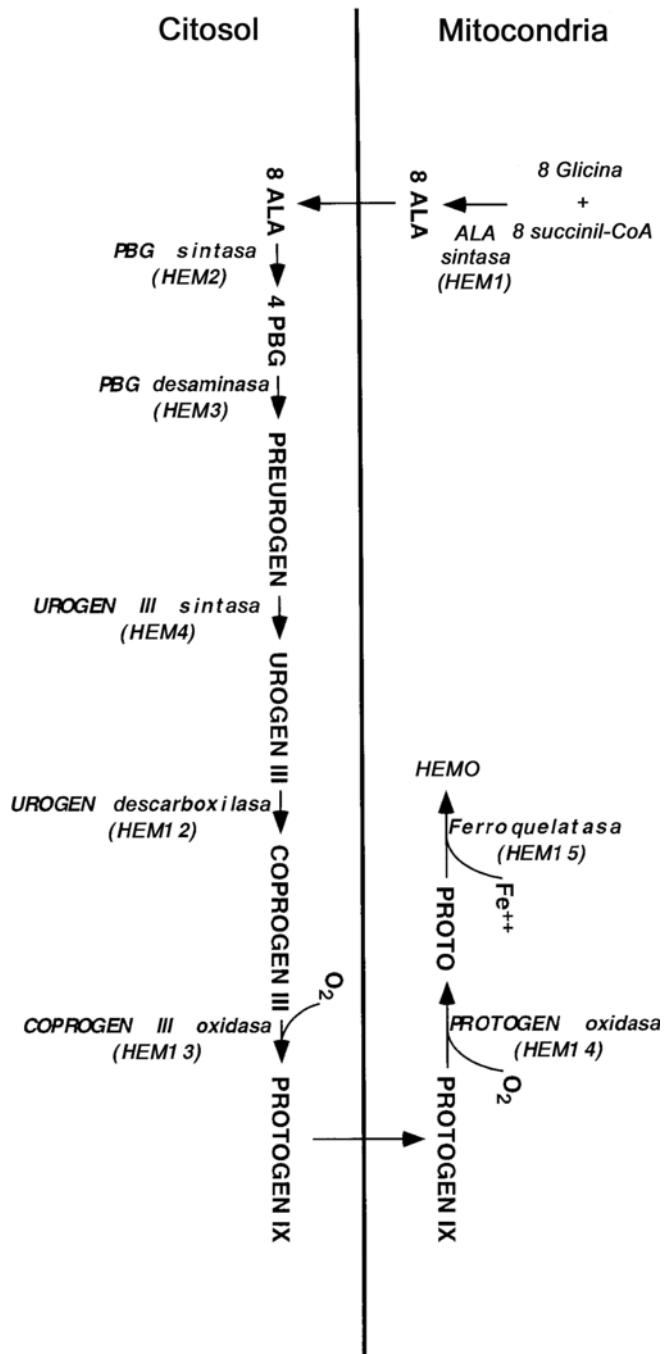


Figura I.1. Esquema que representa la secuencia de reacciones de la ruta de biosíntesis del grupo hemo y su localización subcelular en *S. cerevisiae*. Adaptado de Zhang y Hach (1999).

En general, en eucariotas esta serie de reacciones se inician en la matriz mitocondrial, donde se sintetiza ALA a partir de glicina y del succinato procedente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El ALA se exporta al citosol donde continúan el resto de reacciones hasta que llegamos a los tres últimos pasos, catalizados por enzimas que se encuentran en la mitocondria. El hemo generado puede salir al citosol para formar parte del *pool* de hemo libre o unirse a otras proteínas y/o estructuras y ejercer sus funciones. Cabe destacar una excepción a esta disposición de las enzimas que participan en

la biosíntesis de hemo. En *S.cerevisiae* se ha descrito que la *coproporfirinógeno oxidasa* se localiza en el citosol (Camadro *et al.*, 1986), aunque existía cierta controversia ya que previamente se había observado que la actividad enzimática era estimulada entre dos y tres veces por fosfolípidos y detergentes neutros, lo que apoya la hipótesis de que exista una interacción entre la CPO y las membranas mitocondriales (Yoshinaga y Sano, 1980) Por otro lado, cabe destacar que en algunas bacterias se observa la ausencia de los últimos cuatro genes de biosíntesis de la ruta de hemo, llegando incluso a desaparecer por completo la ruta en determinadas bacterias parásitas (Panek y O'Brian, 2002).

El hemo en eucariotas superiores se produce principalmente en dos lugares: en el hígado y en los tejidos eritropoyéticos. Los mecanismos que controlan la regulación de la síntesis de hemo se ejercen de forma diferente en ambos tejidos actuando sobre la producción de la primera enzima de la ruta de biosíntesis de hemo, la *ALA-sintasa*. En humanos, así como en el resto de eucariotas superiores, existen dos genes que codifican la *ALA-sintasa*, uno específico de células eritroides, el gen *ALA-sintasa 2* en el cromosoma X, y otro de codificación ubicua, el gen *ALA-sintasa 1* en el cromosoma 3 (May *et al.*, 1995). En las células eritroides la síntesis de enzimas participantes en la formación de hemo se encuentra bajo el control de la eritropoyetina generada en condiciones hipóxicas. Por otro lado, en ausencia de hemo, la traducción del transcrito del gen *ALA-sintasa 2* en las células eritroides es bloqueada por la unión de una proteína citosólica que une hierro a un elemento de respuesta a hierro localizado en el RNA mensajero (Ponka, 1999). En el hígado, el hemo celular libre retroinhibe la actividad *ALA-sintasa* a través de la actuación a tres niveles de regulación: una regulación a nivel transcripcional, una regulación a nivel traduccional con una desestabilización del RNA mensajero de la *ALA-sintasa* y una regulación de la tasa de internalización de la enzima en la matriz mitocondrial (May *et al.*, 1995).

A otro nivel en la ruta de biosíntesis, análisis funcionales del promotor del gen de la CPO en las células eritroides de humanos muestran que es necesaria la acción sinérgica de un elemento similar a Sp-1, un sitio GATA y un elemento regulador específico del gen, denominado CPRE (*CPO Promoter Regulatory Element*), que interactúa con Klf1, un factor con una estructura similar a las cremalleras de leucina de algunas proteínas. En las células no eritroides no es necesaria la presencia del elemento GATA para la actividad del promotor del gen de la CPO (Takahashi *et al.*, 2000) de lo que se deduce que el gen de la CPO presenta una regulación tejido-específica.

5. La *coproporfirinógeno oxidasa* (CPO) y los genes que la codifican

5.1. En procariontes

En algunas bacterias se ha constatado la presencia de dos isoformas de *coproporfirinógeno oxidasa* (CPO), frente a lo que ocurre en eucariotas que sólo poseen una. Una de las isoformas codifica una CPO oxígeno-

dependiente, mientras que la otra codifica una CPO independiente de oxígeno que no precisa de oxígeno para llevar a cabo el proceso de catálisis (Figura I.2). Esta peculiar característica hace que determinadas bacterias sean capaces de generar cantidades de hemo suficientes para sobrevivir, incluso en las condiciones anóxicas más estrictas. Estas bacterias presentan dos genes: el gen *hemF* y el gen *hemN* que codifican respectivamente las isoformas dependiente e independiente de oxígeno de la CPO. Sin embargo, esto no es lo habitual, y la mayoría de las bacterias suelen presentar sólo el gen *hemN* que da lugar a la isoforma independiente de oxígeno. Esta isoforma es mayoritaria incluso en aquellas bacterias que poseen también el gen *hemF* (Panek y O'Brian, 2002).

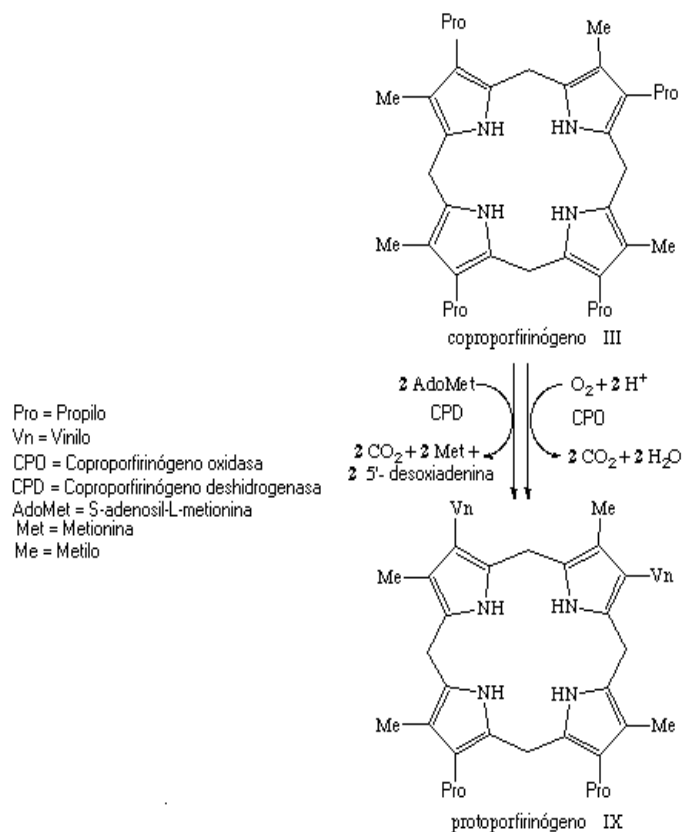


Figura I.2. Reacción catalizada por la *coproporfirinógeno oxidasa* (CPO) dependiente de oxígeno. La misma reacción es catalizada por la *coproporfirinógeno deshidrogenasa* (CPD), presente en algunas bacterias y que, como se puede observar, no utiliza el oxígeno como sustrato.

5.2. En eucariotas

5.2.1. En *S. cerevisiae*

S. cerevisiae quizás sea el organismo eucariota donde más se ha estudiado la ruta de biosíntesis del grupo hemo y en concreto, la CPO y el gen que la codifica, *HEM13*. El primer dato que nos encontramos en la bibliografía acerca de la presencia de CPO en levadura data de 1968 y se lo debemos a Miyake y Sugimura, cuando estudiaban una mutación termosensible que a alta temperatura presentaba deficiencias respiratorias,

carencia de todos los citocromos y acumulación de grandes cantidades de porfirinas. Después de una serie de estudios y controversias acerca de diferentes aspectos de la CPO, en el año 1986 Camadro y colaboradores, determinaron que la enzima en *S. cerevisiae* era citosólica y que precisaba oxígeno para llevar a cabo su función catalítica (Camadro *et al.*, 1986). Cabe la posibilidad de que sea necesaria una interacción transitoria entre la CPO y la membrana mitocondrial, de manera que el protoporfirinógeno generado pueda seguir siendo transformado a hemo por las dos últimas enzimas de la ruta que se encuentran en las membranas mitocondriales (Labbe-Bois y Labbe 1990). Camadro y colaboradores también demostraron que la CPO era en realidad un homodímero formado por dos subunidades idénticas de 35 kDa, cada una de las cuales presentaba un átomo de hierro unido, aunque no fueron capaces de asignarle ninguna misión en la catálisis. Por otro lado, comprobaron que el tratamiento con agentes que reducen los grupos tiol conducía a una inhibición parcial del enzima, de forma que postularon que la presencia de grupos sulfidril (SH) en la proteína era requerida para su funcionalidad (Camadro *et al.*, 1986).

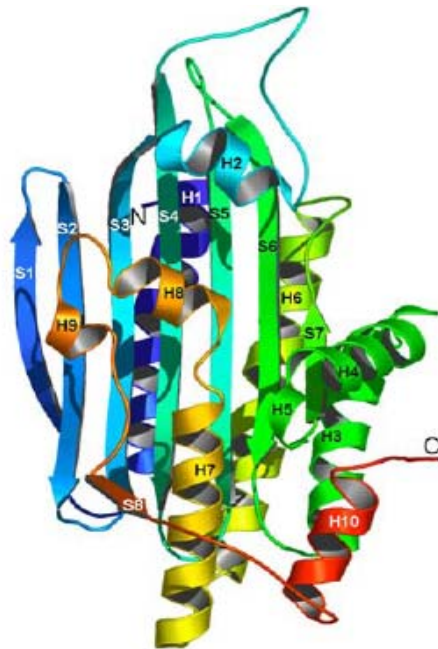


Figura I.3. Estructura terciaria de la *coproporfirinógeno oxidasa* de *S. cerevisiae*. Los elementos estructurales son designados con una H cuando se trata de hélices- α y con una S cuando son hebras- β . Los números se refieren al orden que ocupan con respecto al extremo amino-terminal. La gama de colores va desde el azul del extremo amino-terminal (N) al rojo del extremo carboxilo-terminal (C). Tomado de Phillips *et al.*, 2004.

Hasta hace relativamente poco tiempo no han existido datos estructurales de la CPO, más allá de intentos más o menos afortunados de predecir un modelo para su estructura terciaria (Colloc'h *et al.*, 2002). En 2004, Phillips y colaboradores cristalizaron la CPO de *S. cerevisiae* y determinaron por primera vez su estructura terciaria real que se muestra en la figura I.3 (Phillips *et al.*, 2004).

La proteína adopta una estructura terciaria diferente a los modelos previos obtenidos por modelado por homología (Colloc'h *et al.*, 2002). Presenta una lámina abierta formada por siete hebras beta antiparalelas, la cual se encuentra flanqueada por una serie de hélices alfa. La zona de ensamblaje de las dos subunidades que forman el dímero está constituida por un conjunto de hélices y una pequeña hebra beta aislada que se empareja de forma antiparalela con su compañera en la otra subunidad. El centro activo resultó estar enterrado en la profundidad de la estructura de la molécula y, como era de esperar, se encuentra bordeado por residuos conservados, que probablemente sean importantes para la catálisis, lo que explicaría los efectos deletéreos de muchas mutaciones asociadas con la coproporfiria hereditaria, una enfermedad en humanos causada por el mal o nulo funcionamiento de la CPO (Phillips *et al.*, 2004).

El gen *HEM13* de *S. cerevisiae* fue clonado por complementación de un mutante *hem13* por Zagorec y colaboradores (Zagorec *et al.*, 1988). Estudios previos habían puesto de manifiesto que la actividad enzimática CPO se incrementaba en mutantes deficientes en la biosíntesis de hemo, fuera cual fuera el paso de la biosíntesis que estuviese bloqueado (Labbe-Bois *et al.*, 1980; Grimal y Labbe-Bois, 1980; Rytka *et al.*, 1984). Además dicho incremento podía ser revertido mediante la adición de hemo al medio (Zagorec y Labbe-Bois, 1986). La actividad CPO también se incrementaba cuando las células no mutadas crecían en condiciones anaeróbicas, aunque en este caso el efecto no pudo ser revertido por la adición de hemo. Incrementos similares en la actividad CPO se detectaron cuando los mutantes crecían en anaerobiosis, lo que sugiere que los efectos de la carencia de hemo y oxígeno no se producen a través del mismo mecanismo. Estos cambios en la actividad enzimática CPO se producían de forma paralela con los que se observaban en los niveles de mRNA y de proteína CPO, de manera que se demostraba la existencia de una regulación negativa a nivel transcripcional por hemo y oxígeno sobre el gen *HEM13* de *S. cerevisiae* (Zagorec y Labbe-Bois, 1986; Zagorec *et al.*, 1988).

Al comparar la regulación descrita para *HEM13* a nivel transcripcional (Zagorec y Labbe-Bois, 1986; Zagorec *et al.*, 1988) con la de otros genes implicados en la biosíntesis de hemo en levaduras y para los que existen datos en la bibliografía (Keng and Guarente 19987; Keng *et al.*, 1992; Diflumieri *et al.* 1993; Schlaepfer *et al.*, 1994; Labbe-Bois, 1990), se deduce que, con la información por ahora disponible, el paso catalizado la CPO es uno de los más regulados de la ruta, a nivel transcripcional mediante el producto final, el hemo, además de mediante la variación en los niveles de oxígeno. Por otro lado, el paso se convierte en limitante en condiciones de déficit de oxígeno, debido a que la enzima CPO utiliza oxígeno para llevar a cabo la reacción. Esto convierte al hemo en un excelente sensor de oxígeno a nivel celular, puesto que sus niveles descienden de modo paralelo a como lo hace el oxígeno (Zagorec *et al.*, 1988). Aunque el modelo de regulación de *HEM13* y de la CPO parezca complejo, tiene un significado biológico. Cuando la disponibilidad de oxígeno desciende por debajo de un determinado nivel se produce un descenso progresivo en la actividad CPO, debido a que el oxígeno disponible no es suficiente para mantener la

actividad catalítica máxima. Esto provoca, como ya se ha comentado antes, que el paso catalizado por CPO se convierta en limitante para la ruta biosintética, de manera que se produce un descenso en la biosíntesis de hemo. Al cesar la represión por producto final, se produce un incremento de la expresión de *HEM13* que intenta paliar la disminución de la actividad catalítica incrementando la biosíntesis de la enzima. Por tanto, podemos clasificar a *HEM13* dentro del grupo de los genes hipóxicos de *S. cerevisiae*, es decir, aquellos cuya expresión se ve incrementada a bajos niveles de oxígeno.

En 1992 Teresa Keng demostró que el gen *HEM13* se encuentra bajo la regulación de dos factores que ejercen su control de forma dependiente de oxígeno: Hap1 (*Heme activating protein*) y Rox1 (*Repression by oxygen*). El factor Hap1 potencia la represión en condiciones aerobias mientras que es a la vez necesario para que *HEM13* pueda expresarse a su máximo nivel en condiciones de déficit de oxígeno y/o hemo. Rox1 ejerce una fuerte represión sobre *HEM13* en condiciones de hemo suficiencia y/o disponibilidad de oxígeno (Keng, 1992). En *S. cerevisiae*, la actividad reguladora de Hap1 es modulada por hemo y juega un papel importante en la activación transcripcional de genes que codifican proteínas requeridas en la respiración y en el control del daño oxidativo (Creusot *et al.*, 1988; Pfeifer *et al.*, 1989; Zhang y Hach, 1999). Hap1 también activa la transcripción del gen *ROX1* (Lowry y Zitomer, 1988) que codifica la proteína Rox1 que reprime la expresión de genes de función específicamente requerida para el crecimiento en anaerobiosis (Ushinsky y Keng, 1994). En ausencia de hemo, Hap1 está asociado con chaperonas formando un complejo de alto peso molecular (HMC) inactivo (Zhang *et al.*, 1998). La presencia de hemo provoca cambios conformacionales que posibilitan la liberación de muchas de las proteínas del complejo inactivo y Hap1 puede unirse como dímero al DNA con una alta afinidad y activar la transcripción de los genes diana (Hon *et al.*, 1999). Hap1 se une a dos tipos diferentes de elementos reguladores en los promotores, de los que podemos considerar como ejemplos los elementos UAS1 (*Upstream Activation Sequence*) del promotor del gen *CYC1* (CGGGGTTTACGGACGAC) y el UAS del promotor de *CYC7* (CGCTATTATCGCTATTA) (Pfeifer *et al.*, 1987). Además de este efecto activador de Hap1 en condiciones aerobias, Hap1 también es necesario para el crecimiento de *S. cerevisiae* en condiciones anaerobias o hemo-deficientes (Chantrel *et al.*, 1998). El mecanismo aceptado de forma general para la regulación de *HEM13* por parte de estos dos factores transcripcionales Hap1 y Rox1 propone que la represión por parte de Hap1 sobre *HEM13* en condiciones aeróbicas es un efecto indirecto mediado por Rox1, puesto que Hap1 en estas condiciones (en presencia de oxígeno y por tanto, en condiciones de hemo-suficiencia) se encuentra activo y se une a sus sitios diana en el promotor del gen *ROX1*, provocando la activación de su expresión y la producción de proteína Rox1 que actúa como represor sobre el promotor de *HEM13* (Figura I.4).

En 1996 Amillet y colaboradores (Amillet *et al.*, 1996) llevaron a cabo un análisis en profundidad de la región promotora del gen *HEM13* de *S. cerevisiae*, en relación con los datos de regulación transcripcional de este

gen aportados anteriormente. En este estudio se encontró una región UAS, además de tres sitios potenciales para la unión del factor de transcripción Rox1, el cuál ejerce su represión sobre el gen en condiciones aeróbicas. Se determinó mediante mutaciones en la secuencia UAS que ésta tenía relevancia en la regulación de la expresión de *HEM13* aunque no se pudo determinar qué factor se unía a ella, puesto que los ensayos EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) utilizando cepas delecionadas en los genes que codifican los factores Hap1 y Rox1 mostraban la presencia de una proteína desconocida unida a dicha secuencia. Por otro lado, en este mismo estudio se localizaron sitios de unión para el factor Rox1 en el promotor de *HEM13* y se analizó la funcionalidad de los mismos mediante mutaciones (Amillet et al., 1996). De los sitios localizados en el promotor que, por su secuencia, se habían identificado como potenciales para la unión de Rox1, el localizado en la posición -474 a -463 (tomando como -1 el nucleótido 5' respecto al ATG), con la secuencia TCAATTGTTTAG, era el que ejercía el mayor efecto represor, a pesar de que presenta cuatro variaciones respecto del consenso general aceptado para la unión de Rox1 (YYYATTGTTCTC). La unión de Rox1 a este sitio del promotor fue comprobada *in vitro* mediante ensayos EMSA en distintas condiciones, determinándose que, además, esta unión sólo se produce en presencia de oxígeno, hemo y el factor Tup1 (Amillet et al., 1996). Tup1 es un factor regulador perteneciente al complejo de represión Tup1-Ssn6 que es reclutado hasta los promotores de distintos genes reprimidos a través de factores específicos, entre los que se encuentra Rox1 (Mennella et al., 2005).

Más recientemente, en el año 2005, Klinkenberg y colaboradores actualizaron y ampliaron el estudio sobre el promotor de *HEM13* (Klinkenberg et al., 2005). De los cuatro sitios potenciales para la unión de Rox1 incluidos en el estudio, determinaron que el que presentaba más relevancia a la hora de ejercer la represión era el mismo caracterizado previamente por el grupo de Amillet. Además, encontraron cinco sitios potenciales para la unión de Mot3, de los cuales tres demostraron ser funcionales. Mot3 es también un factor transcripcional que regula la expresión de genes anaeróbicos en *S. cerevisiae* (Menella et al., 2003; Sertil et al., 2003; Kastaniotis et al., 2000). La importancia de su papel como represor de los genes que pertenecen al regulón de Rox1 es muy variable dependiendo del gen que se esté considerando (Kastaniotis et al., 2000). La unión de Mot3 a los promotores de los genes regulados se realiza a través del consenso degenerado TRCTD. Aunque Mot3 coopera con Rox1 en el reclutamiento del complejo co-represor Tup1-Ssn6 (Figura I.4.A y I.4.B), no se une cooperativamente con Rox1 *in vitro* (Kastaniotis et al., 2000) y mediante experimentos de CHIP (*CHromatin ImmunoPrecipitation*) se ha podido demostrar que Mot3 es capaz de reclutar a Ssn6 en ausencia de Rox1 (Menella et al., 2003). En el promotor de *HEM13* los tres sitios para la unión de Mot3 que resultaron ser funcionales (Klinkenberg et al., 2005) se encuentran flanqueando el sitio funcional Rox1 descrito anteriormente. Esta proximidad espacial de los sitios de unión para Rox1 y Mot3 tiene un efecto sinérgico mediante interacciones con el complejo represor general Tup1-Ssn6 (Klinkenberg et al., 2005).

Otro sistema de regulación que afecta a la expresión de *HEM13* en *S. cerevisiae* depende de los niveles de AMP cíclico (AMPc). La expresión hipóxica de *HEM13* disminuye ligeramente en mutantes defectuosos en la cadena de transducción de señales dependiente de AMPc (Bourdineaud *et al.*, 2000), sin embargo se desconoce por el momento si existe una relación entre la vía AMPc-dependiente y la vía hemo-dependiente.

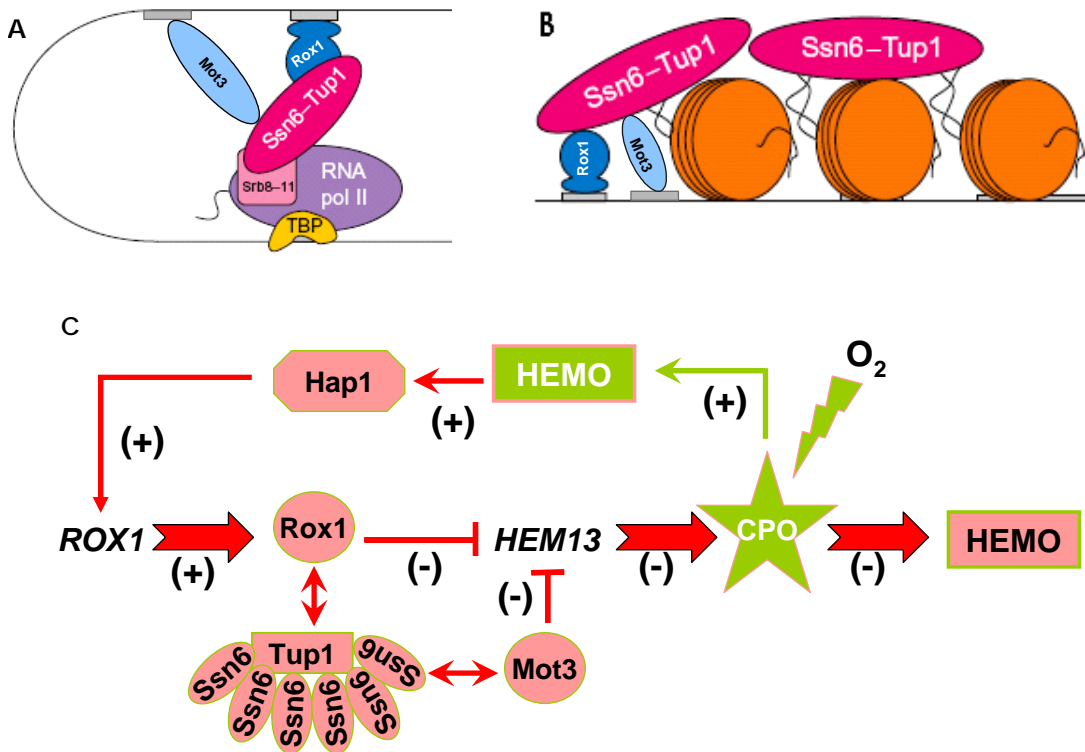


Figura I.4. A y B. Mecanismos de represión del complejo Ssn6-Tup1 en *S. cerevisiae*. Mot3 se une a Ssn6 y ayuda al reclutamiento del complejo por parte de Rox1. Mot3 y Rox1 ejercen un efecto represor mediado por Ssn6-Tup1 que, o bien se une a la RNA polimerasa (RNA pol II) evitando que arranque la transcripción (A), o bien se une a las histonas de la cromatina impidiendo su liberación para el acceso de la maquinaria transcripcional (B). Adaptadas de Smith y Jonson (2000). **C.** Mecanismo de regulación de *HEM13* en *S. cerevisiae*. En presencia de oxígeno se incrementan los niveles de hemo (puesto que la CPO, entre otras enzimas de la ruta de biosíntesis de hemo, depende del oxígeno para la catálisis de su reacción), lo que desencadena una cascada que termina con la represión de *HEM13* y la generación de menos CPO. De este modo se modulan y se mantienen estables dentro de unos límites los niveles de hemo.

5.2.2. En *K. lactis*

Antes de la realización de este trabajo existía muy poca información acerca del gen *HEM13* de *K. lactis*. En el año 2000, González-Domínguez y colaboradores, utilizando la técnica de Northern blot y una sonda de *KIHEM13*, obtenida por PCR a partir de DNA genómico de *Kluyveromyces lactis* mediante el diseño de cebadores en regiones conservadas en otros genes que codifican para CPO, demostraron que su expresión, al igual que la de *ScHEM13*, depende de la disponibilidad de hemo y oxígeno. El gen incrementa su expresión en hipoxia y este incremento de expresión se

mantiene incluso si se añade hemina al medio de cultivo (González-Domínguez *et al.*, 2000).

5.2.3. En otros eucariotas

Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae* cuya CPO es citosólica (Camadro *et al.*, 1986), las CPOs de eucariotas superiores se localizan en el espacio intermembrana mitocondrial. El gen de la CPO de humanos fue clonado y caracterizado funcionalmente por Martasek y colaboradores (1994) que observaron que da lugar a una proteína de 76 KDa, formada por dos subunidades con un peso molecular aproximado de 39 KDa. Como se ha comentado anteriormente la regulación de la CPO humana es específica de tejido (Takahashi *et al.*, 2000).

Para la CPO de humanos se ha demostrado que el transporte de la CPO desde el citosol, donde es generada, hasta la mitocondria se encuentra inhibido por la adición de hemina, una forma de hemo (Susa *et al.*, 2002). Por otro lado, el gen de la CPO de humanos presenta dos posibles codones ATG de inicio de la traducción (TIC) que se encuentran en la misma pauta de lectura. La CPO se genera en el citosol en forma de un polipéptido precursor, llamado pCPO, que porta en su extremo N-terminal una presecuencia que señala y dirige a la proteína hasta la mitocondria. Esta presecuencia es eliminada una vez que la proteína ha llegado a su destino. Los dos posibles TICs del gen de la CPO humana darían lugar a dos posibles pCPOs que tendrían 10 y 110 aminoácidos en su presecuencia. Susa y colaboradores (2003) estudiaron los dos precursores pCPO generados con los dos tipos de presecuencias y demostraron que era la presecuencia larga, de 110 aminoácidos, la que resultaba esencial para el transporte y localización de la CPO en la mitocondria.

Muchas publicaciones sobre la CPO humana se centran en la caracterización de las mutaciones que provocan un fallo total o parcial en la actividad de la CPO y que desencadenan enfermedades denominadas coproporfiria hereditaria y harderoporfiria. Las porfirias son enfermedades causadas por deficiencias funcionales en las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de hemo. Estas deficiencias funcionales son causadas por mutaciones que afectan a sus genes y su sintomatología clínica puede presentarse en distinto grado de intensidad dependiendo de la mutación producida. Las porfirias son clasificadas en eritropoyéticas o hepáticas en función del tejido en el que tiene lugar el exceso de producción de porfirinas o sus precursores. Las porfirias hepáticas se clasifican en función de su sintomatología en agudas y en cutáneas. Las porfirias agudas muestran un cuadro clínico de ataques agudos que se manifiestan de forma principal en convulsiones, ataques de dolor abdominal, acompañados de estreñimiento, náuseas, vómitos, taquicardia, hipertensión, sudores e insomnio, y en una neuropatía que en un 20-30% de los casos es de tipo psicológico presentándose en forma de ansiedad, depresión, desorientación, alucinaciones y estados de confusión. En más del 70% de los casos, la neuropatía es primordialmente motora y se puede presentar una

sintomatología de debilidad muscular con pérdida de movilidad en las extremidades pudiendo llegar a producirse una tetraplejía que, en algunos casos, desemboca en una parada respiratoria causando la muerte del paciente. También puede verse afectado ocasionalmente el sistema nervioso central con episodios de ceguera transitoria y pérdidas de conciencia entre otros síntomas. Este es el cuadro general que presentan los pacientes aquejados de porfiria causada por deficiencia en *ALA-deshidratasa* (ADP) que afecta al segundo enzima de la ruta, la porfiria aguda intermitente (AIP) que afecta a la *porfobilinógeno desaminasa*, tercer enzima de la ruta, la coproporfiria hereditaria (HCP) que afecta a la *coproporfirinógeno oxidasa*, sexto enzima de la ruta, y la porfiria variegada (VP) que afecta a la *protoporfirinógeno oxidasa*, séptimo enzima de la ruta. Aunque dependiendo de la enfermedad, pueden presentarse sólo ataques agudos, como es el caso de la ADP y la AIP, ó puede haber un porcentaje de pacientes que manifiesten la enfermedad solamente a través de una afección cutánea o bien con ataques agudos combinados con la afección cutánea, como en el caso de la HCP y la VP. Sin embargo, son más frecuentes los ataques agudos en el caso de la HCP mientras que en el caso de la VP la mayoría de los pacientes presentan sólo lesiones cutáneas. Dentro de las porfirias hepáticas la porfiria cutánea tarda (PCT) que afecta a la *uroporfirinógeno descarboxilasa*, quinto enzima de la ruta, es la única que sólo presenta como síntoma lesiones cutáneas. Existen tres porfirias eritropoyéticas: la porfiria eritropoyética congénita (CEP ó enfermedad de Günther), que afecta a la *uroporfirinógeno sintasa*, la cuarta enzima de la ruta, la protoporfiria eritropoyética (EPP), que afecta a la *ferroquelatasa*, la octava y última enzima de la ruta y la harderoporfiria eritropoyética, que afecta, como la HCP, a la *coproporfirinógeno oxidasa*, sexta enzima de la ruta.

Por tanto, las mutaciones sobre el gen de la CPO son responsables de dos tipos de porfirias, una de naturaleza hepática y otra eritropoyética. En el caso de la HCP, los pacientes son de estatura pequeña (140 cm a los 20 años), muestran fotosensibilidad y presentan síntomas neurológicos, como los descritos antes, con ataques agudos severos desde la edad de cinco años (Kuhnel *et al.*, 2000; Takeuchi *et al.*, 2001). En el caso de la harderoporfiria, los pacientes muestran ictericia y anemia hemolítica al nacer (Nordmann *et al.*, 1983; Lamoril *et al.*, 1998) y el patrón de excreción fecal de porfirinas no se corresponde con el de la HCP, en la cual se presentan cantidades importantes de coproporfirina, sino que la porfirina principal en este caso es la harderoporfirina. El nombre de la harderoporfirina procede del harderoporfirinógeno, un intermediario de la reacción de paso de coproporfirinógeno a protoporfirinógeno, en el cual tan solo uno de los grupos propilo ha sido descarboxilado a vinilo (Figura I.5). Las alteraciones en la CPO que dan lugar a la harderoporfiria están bien definidas (Schmitt *et al.*, 2005) y son las sustituciones R401W (cambio de arginina en la posición 401 de la CPO por triptófano) y K404E (cambio de lisina en la posición 404 de la CPO por glutamato). Estas alteraciones afectan a los aminoácidos que se corresponden con los localizados dentro de la hélice ocho de la estructura de la CPO de *S. cerevisiae* (Phillips *et al.*, 2004), hélice, que junto con la hélice dos, cierra el hueco en el que se introduce el sustrato en la CPO de levadura para ser procesado. Además el primero de los residuos se

encuentra ampliamente conservado entre organismos muy dispares (Phillips *et al.*, 2004). En la estructura de la CPO humana recientemente dilucidada (Lee *et al.*, 2005) estos residuos aparecen entre la pequeña zona de unión entre las hélices nueve y diez, muy próximos a una serie de residuos que enlazan una molécula de citrato que se ha encontrado en el centro activo de la enzima y que parece ser importante para el reconocimiento del sustrato y la catálisis. Es probable que la arginina 401 forme algún tipo de interacción electrostática con el harderoporfirinógeno, y ayudada por la lisina 404, evite su salida del enzima antes de que se produzca el segundo paso de descarboxilación. En lo que se refiere a las alteraciones de la CPO que dan lugar a HCP, existen más de veinte cambios documentados afectando al gen y en distinto grado a la actividad enzimática de la CPO resultante (Lee *et al.*, 2005).

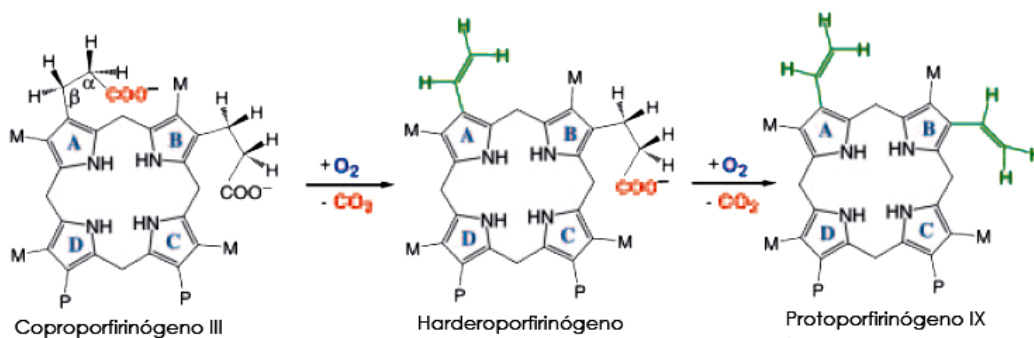


Figura I.5. Reacción llevada por la CPO paso a paso, donde se muestra el producto intermedio harderoporfirinógeno con solo uno de los propilos descarboxilado (anillo A). Adaptada de Lee y colaboradores (2005).

Dada la importancia de las mutaciones de la CPO en algunos tipos de porfirias, el estudio de CPOs de otros organismos eucariotas puede contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

OBJETIVOS

A fin de profundizar en el estudio de la ruta de biosíntesis de hemo en la levadura *Kluyveromyces lactis*, especialmente del gen *KIHEM13*, muy poco caracterizado en esta levadura y que además responde a hipoxia, nos propusimos en este trabajo los siguientes objetivos:

1. Clonar y secuenciar el gen *KIHEM13* a partir de genotecas de DNA genómico de la levadura *K. lactis*.
2. Comprobar su capacidad de complementación en un mutante *hem13* de *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Obtener una cepa haploide de *K. lactis* con el alelo *KIHEM13* delecionado y analizarla fenotípicamente.
4. Analizar los puntos de inicio de la transcripción de *KIHEM13*.
5. Estudiar la expresión heteróloga de *KIHEM13* en cepas de *S. cerevisiae* mutantes para los genes reguladores Rox1 y Mga2, relacionados con la respuesta a hipoxia.
6. Analizar los elementos reguladores del promotor de *KIHEM13*.
7. Averiguar la importancia del factor regulador Rox1 de *K. lactis*, en la expresión de *KIHEM13*.
8. Estudiar la regulación transcripcional dependiente de oxígeno de otros genes de la ruta de biosíntesis de hemo en *K. lactis* no estudiados hasta el momento: *KIHEM2*, *KIHEM3*, *KIHEM4*, *KIHEM14* y *KIHEM15*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Cepas de bacterias (*Escherichia coli*)

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas para la propagación de plásmidos se recogen en la tabla M.1.

Tabla M.1. Cepas de *Escherichia coli* empleadas y su procedencia.

Cepa	Genotipo
DH10B™*	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ- <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>
XL-1 Blue**	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q ZDM15 <i>Tn10</i> (Tet ^R)]

* Datos proporcionados por el proveedor: Gibco BRL-Invitrogen (www.invitrogen.com)

** Datos proporcionados por el proveedor: Stratagene (www.stratagene.com)

1.2. Cepas de levaduras

1.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Tabla M.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas y su procedencia.

Cepa	Genotipo
BY4743-Y20000*	<i>MATa/α, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, MET15/met15Δ0, ura3Δ0/ura3Δ0, HEM13/hem13::kanMX4</i>
BY4742-Δ <i>Schem13::KanMX4</i> **	<i>MATa/α (?), his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MET15, ura3Δ0, hem13::kanMX4</i>
21RΔ <i>mel1</i> *	<i>MATa, ura3-52, leu2-3,112, ade1, Δmel1</i>
BY4741-Y00000*	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>
BY4741-Y05484*	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YPR065w::kanMX4</i>
BY4741-Y05968*	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YIR033w::kanMX4</i>

*Procedentes de la colección EUROSCARF (<http://web.unifrankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>)

**Haploide derivado del diploide BY4743 por esporulación (cedido por la Dra. Laura Núñez)

1.2.2. *Kluyveromyces lactis*

Tabla M.3. Cepas de *Kluyveromyces lactis* empleadas y su procedencia.

Cepa (procedencia)	Genotipo
Y1140 (Colección NRRL)*	<i>MATa</i>
MW190-9B (Dra. M. Wésolowsky)	<i>MATa, uraA, lac4-8</i>
MW190-9B Δ <i>KIrox1</i> (Dra. L. Núñez)	<i>MATa, uraA, lac4-8, rox1::kanMX4</i>
CBSΔKu80 (Kooistra <i>et al.</i> , 2004)**	<i>MATa, Kku80</i>
CBSΔKu80Δ <i>KIhem13</i> (este trabajo)	<i>MATa, ku80, hem13::kanMX4</i>
SAY529 (Dr. S. Carter)	<i>MATα, ade1, trp1, leu2, metA1, uraA1, nej1::hisG</i>

*Y1140 = CBS2359 es una cepa de: *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (Dombrowski) van der Walt var. *lactis* (1986). **CBSΔKU80 deriva de CBS2359 = Y1140.

2. Medios de cultivo

2.1. Medios de cultivo para bacterias

2.1.1. LB modificado

La composición del medio se recoge en la tabla M.4. El medio es esterilizado en autoclave. El agar se añade cuando es necesaria la preparación del medio en estado sólido, vertiéndose en placas cuando éste se encuentra a una temperatura de en torno a los 65 °C. Se trata de un medio rico utilizado para el crecimiento y la recuperación de células bacterianas sin ningún tipo de selección.

Tabla M.4. Composición del medio LB (Luria-Bertani) modificado con adición de glucosa.

Compuesto	Gramos por 100 ml
<i>Bacto-Tryptona</i>	1
<i>Bacto-Yeast-Extract</i>	0,5
NaCl	0,5
Glucosa	0,1
(Agar)	(1,5)
Agua destilada	Hasta 100 ml

2.1.2. Medio SOC

Tabla M.5. Composición del medio SOC para la preparación de bacterias competentes. Tras su preparación, el medio se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 100 ml
<i>Bacto-Tryptona</i>	2 g
<i>Bacto-Yeast-Extract</i>	0,5 g
NaCl	58,4 mg
KCl	18,6 mg
Agua destilada	Hasta 100 ml

2.1.3. Medios LB selectivos

Este tipo de medios se utiliza para cultivar de manera selectiva bacterias que albergan en su interior un plásmido. Simplemente se trata de añadir al medio LB el antibiótico para el cual el plásmido que portan las bacterias posee el gen de resistencia. De este modo, el medio LB pasa a ser selectivo puesto que en él sólo podrán crecer aquellas bacterias que contengan el plásmido. El antibiótico se puede añadir tanto a medios en estado líquido como en estado sólido. El antibiótico debe ser añadido con posterioridad a la esterilización del medio en autoclave y después de dejar enfriar el medio hasta una temperatura de en torno a los 65 °C para no destruir el antibiótico. En este trabajo se han utilizado dos tipos de medios selectivos: el LBA y el LBAK. El LBA es LB suplementado con el antibiótico ampicilina a una concentración final de 40 µg/ml. El stock de ampicilina se prepara a una concentración de 40 mg/ml en agua. Este medio es utilizado

para el crecimiento selectivo de las bacterias transformadas con plásmidos que portan el gen que les confiere resistencia a la ampicilina. En el caso del LBAK, además de ampicilina al medio se añade también el antibiótico kanamicina a una concentración final en el medio de 30 $\mu\text{g/ml}$. El stock de kanamicina se prepara a una concentración de 10 mg/ml en agua.

2.1.4. Suplemento de X-Gal

Las placas de medio LB y de medios selectivos se suplementaron cuando fue necesario con un derivado sintético de la galactosa, denominado de forma abreviada X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Este compuesto puede ser utilizado como sustrato por la enzima β -galactosidasa, una enzima que, en condiciones naturales, es capaz de hidrolizar el enlace $\beta(1\rightarrow4)$ de la galactosa, un disacárido compuesto por galactosa y glucosa. El X-Gal, que de partida es incoloro, tras ser roto por la β -galactosidasa por su enlace β , da lugar a galactosa y a 5-bromo-3-cloro-4-indolil, un compuesto que presenta coloración azul. De este modo, mediante una alteración de la coloración blanquecina habitual de las colonias bacterianas, se pone de manifiesto de manera cualitativa la presencia de actividad β -galactosidasa en las mismas.

La β -galactosidasa bacteriana es codificada por el gen *lacZ*. Este gen es incluido en numerosos vectores de clonación como una señal que permite identificar por su coloración las colonias bacterianas que, tras una reacción de ligación y transformación (ver los apartados correspondientes), portan un vector con un inserto integrado. Esto se consigue gracias a que el sitio de clonación múltiple de estos vectores, una pequeña secuencia nucleotídica artificial con una serie de dianas para endonucleasas de restricción situadas en tándem, se encuentra situado dentro de la secuencia codificadora de *lacZ* sin alterar su pauta de lectura y provocando una mínima alteración en el tamaño, estructura y función de la β -galactosidasa resultante que seguirá siendo funcional. De este modo, aquellas células bacterianas sembradas en medio suplementado con X-Gal que tengan color azul, portarán el vector vacío, esto es, sin ningún inserto en su sitio de clonación múltiple. Sin embargo, aquellas células bacterianas sembradas en medio suplementado con X-Gal que tengan coloración normal, portarán un plásmido con un inserto en el sitio de clonación múltiple. Se debe de disponer de una cepa bacteriana que presente su copia genómica del gen *lacZ* mutada o delecionada, ya que sino todas las colonias a la que daría lugar en medio suplementado con X-Gal tendrían color azul. En este trabajo las dos cepas de *E. coli* utilizadas, *XL-1 Blue* y *DH10BTM*, son apropiadas para la selección en placas suplementadas con X-Gal.

Al medio también se añade IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido), un análogo no metabolizable de la galactosa que actúa como inductor artificial de la expresión del gen *lacZ* (en realidad es un inductor del operón *lac* al completo) ya que anula la represión a la que se ve sometido en ausencia de lactosa en el medio.

El stock de X-Gal (*Sigma-Aldrich*) es preparado a 20 mg/ml en dimetilformamida (*Sigma-Aldrich*) y la concentración final en medio es de 40 mg/l. El stock de IPTG (*Sigma-Aldrich*) es preparado a 230 mg/ml en agua y la concentración final en medio es de 92 mg/l.

2.2. Medios de cultivo para levaduras

2.2.1. YPD

El medio se esteriliza en autoclave. El agar se añade cuando es necesaria la preparación del medio en estado sólido, vertiéndose en placas cuando éste se encuentra a una temperatura de en torno a los 65 °C.

Tabla M.6. Composición del medio YPD (*Yeast extract, Peptone, Dextrose*).

Compuesto	Gramos por 100 ml
<i>Yeast Extract</i>	1
<i>Bacto-Peptona</i>	2
Glucosa	2
(Agar)	(1,5)
Agua destilada	Hasta 100 ml

2.2.2. CM y derivados (Zitomer y Hall, 1976)

Medio sintético utilizado para la selección de transformantes de levaduras mediante complementación de auxotrofías. El medio puede ser carente en uno o varios aminoácidos en función de la selección que se vaya a realizar, o puede incluir todos los aminoácidos en cuyo caso se trataría de un medio completo no selectivo. La mezcla sin el YNB y el YNB son esterilizados por separado en autoclave y se mezclan cuando la temperatura de ambos se encuentra alrededor de 65 °C. El agar se añade cuando es necesaria la preparación del medio en estado sólido, vertiéndose en placas cuando éste se encuentra a una temperatura de en torno a los 65 °C.

Tabla M.7. Composición del medio completo, CM.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Fuente de carbono (glucosa, fructosa,...)	2 g
Histidina	4 mg
Adenina	4 mg
Uracilo	4 mg
Leucina	4 mg
Tirosina	4 mg
Triptófano	3 mg
(Agar)	(1,5 g)
Mezcla de aminoácidos (Tabla M.8)	0,5 ml
Agua destilada	Hasta 92,8 ml
YNB (Tabla M.9)	6,7 ml

Tabla M.8. Composición de la mezcla de aminoácidos 200x para el medio CM. La mezcla es esterilizada en autoclave y se guarda a 4 °C.

Compuesto	Gramos por 100 ml
Arginina	0,2
Isoleucina	1,2
Lisina	0,8
Metionina	0,2
Treonina	0,2
Fenilalanina	1,2
Agua destilada	Hasta 100 ml

Tabla M.9. Composición del YNB (*Yeast Nitrogen Base*) para el medio CM. El sulfato amónico es añadido después de que el resto de componentes se encuentren disueltos. La mezcla es esterilizada en autoclave y se guarda a 4 °C.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Vitaminas (Tabla M.10)	5 ml
Sales traza (Tabla M.11)	10 ml
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Sulfato magnésico	0,75 g
Cloruro sódico	0,15 g
Cloruro cálcico	0,15 g
Agua destilada	Hasta 85 ml
Sulfato amónico	7,5 g

Tabla M.10. Composición de las vitaminas 300x para el YNB. Se guardan a -20 °C.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Biotina	0,06 mg
Pantotenato cálcico	12 mg
Ácido fólico	0,06 mg
Inositol	60 mg
Niacina	12 mg
Ácido p-Aminobenzoico	6 mg
Piridoxina	12 mg
Riboflavina	6 mg
Tiamina	12 mg
Agua destilada	Hasta 100 ml

Tabla M.11. Composición de las sales traza 150x para el YNB. Se guardan a -20 °C.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Ácido bórico	7,5 mg
Sulfato cúprico	0,6 mg
Ioduro potásico	1,5 mg
Cloruro férrico	3 mg
Molibdato sódico	3 mg
Sulfato de zinc	6 mg
Agua destilada	Hasta 100 ml

2.2.3. Suplemento de hemina

La hemina es un precursor no natural del grupo hemo que es fácilmente convertido por las células a hemo utilizable. Se trata de un grupo hemo con un hierro unido en un estado de oxidación +3, en lugar de +2 como es su estado natural. Los medios YPD y CM y derivados son

suplementados con hemina para facilitar el crecimiento de los mutantes deficientes en la biosíntesis de hemo a cualquier nivel de la ruta. También se utiliza para estudiar el comportamiento de diversos genes ante la adición de un suplemento de hemo exógeno en condiciones de hemo-deficiencia creadas al someter a los individuos a hipoxia. La hemina es añadida en los medios a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ (2,5 μl por cada ml de medio) a partir de una solución stock 20 mg/ml (Tabla M.12). Para su esterilización la suspensión se pasa 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, puesto que se trata de un compuesto fotolábil.

Tabla M.12. Preparación de solución stock de hemina (20 mg/ml).

Compuesto	Cantidades por 5 ml
Hemina	100 mg
NaOH 0,2M	2 ml
Tris-HCl	0,5 ml
Agua destilada	Hasta 5 ml (aprox. 2,5 ml)

2.2.4. Adición de genética

A los medios YPD y CM y derivados se les ha añadido genética para la selección de los mutantes, tanto de *S. cerevisiae* como de *K. lactis*, con algún gen anulado con el casete kanMX4. La genética es un antibiótico específico de eucariotas al cual confiere resistencia el gen *kan* presente en el casete de delección kanMX4. Se añade en los medios a una concentración final de 200 $\mu\text{g/ml}$ (Kooistra *et al.*, 2004) a partir de una solución stock de 200 mg/ml en agua (esto es, se añade 1 μl de stock de genética por cada ml de medio).

3. Cultivos de levaduras en hipoxia

3.1. Sistemas para la realización de cultivos en hipoxia

Para el crecimiento de levaduras en condiciones hipóxicas se han utilizado distintas metodologías. Para realizar cultivos de gran cantidad de muestras y durante periodos de tiempo relativamente largos (días) se han utilizado distintos sistemas comerciales para la generación de atmósferas pobres en oxígeno. Se utiliza un compartimento que se puede sellar de forma totalmente hermética, denominado jarra de anaerobiosis, dentro del cual, antes de su cierre, son colocados los tubos, matraces o botellas con las levaduras que se van a cultivar en condiciones hipóxicas. Existen varios tipos de sistemas de generación de atmósferas pobres en oxígeno. Uno de ellos se presenta en unos sobres que contienen ácido ascórbico como componente activo. El ácido ascórbico reacciona de forma espontánea con el oxígeno al entrar en contacto con él, generando dióxido de carbono; esto en un ambiente cerrado, como el creado en la jarra, hace que se agote prácticamente todo el oxígeno (quedan a niveles de en torno al 1%). El sistema de este tipo empleado ha sido el *AnaeroGen*TM (*Oxoid*). En el caso

de los sistemas que utilizan un catalizador para desencadenar la generación de atmósfera hipóxica, estos se presentan en unos sobres que en nuestro caso se encontraban divididos interiormente para albergar los diferentes reactivos. La reacción se inicia cuando se añaden al sobre 10 ml de agua, lo que hace que el catalizador se mezcle con los reactivos en el interior. Como resultado de la reacción se genera dióxido de carbono e hidrógeno. Los sistemas empleados en este caso han sido el *BBL™ GasPak™ Plus Enveloppe (BD)* y el *Gas Generating Kit (Oxoid)*.

Cuando se quieren realizar cultivos en hipoxia en periodos más cortos y con mayores volúmenes de cultivo se puede recurrir al burbujeo de nitrógeno o al fermentador. En el caso del burbujeo de nitrógeno, se trata simplemente de conectar uno o varios matraces a una bombona de nitrógeno. Los matraces se tapan con un tapón que cierre bien para soportar la presión y evitar que se escape el nitrógeno y/o entre el aire. Los tapones presentan un par de orificios atravesados por sendas varillas de vidrio huecas, una de las cuales se sumerge en el medio mientras que la otra no. El nitrógeno entra a través de la varilla sumergida en el medio, generándose un burbujeo en el mismo, y sale a través de la otra varilla. Esta varilla, a su vez, puede estar conectada con la varilla sumergida de otro matraz, lo que genera burbujeo en el mismo, expulsándose el gas por la otra varilla de este matraz. Y así sucesivamente, tantas veces como se quiera o matraces o espacio haya disponibles. Al final de la cadena de matraces se coloca un matraz con agua y una varilla sumergida, para asegurarse de que no entra aire en el último matraz, cosa que sí ocurriría si la varilla del último matraz con medio quedase expuesta directamente al aire. En el caso del fermentador sólo se puede hacer un cultivo de cada vez pero tiene la ventaja de que se puede monitorizar y controlar el suministro de nitrógeno en cada momento, puesto que dispone de un sistema de medición de la presión relativa de oxígeno y unas válvulas que facilitan el control del flujo de gas al interior.

3.2. Suplementos para cultivos en hipoxia

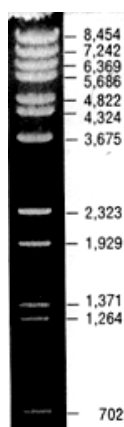
Para el crecimiento de levaduras en hipoxia se hace necesaria la adición de una serie de suplementos, puesto que la falta de oxígeno impide la generación de determinados compuestos en cuya biosíntesis interviene el oxígeno y que intervienen, entre otros procesos, en la generación y el mantenimiento de la membrana plasmática. Las levaduras creciendo en hipoxia no pueden generar ácidos grasos insaturados ya que la desaturasa requiere oxígeno como aceptor de electrones al generar las insaturaciones. La carencia de ácidos grasos insaturados da lugar, entre otras alteraciones, a cambios en la fluidez de la membrana plasmática. Del mismo modo, no son capaces de generar esteroides puesto que varias enzimas de la ruta básica de biosíntesis de los mismos utilizan oxígeno para llevar a cabo las reacciones. Por ello a los cultivos en anaerobiosis se les añade un preparado comercial de oleato (ácido graso insaturado) esterificado, denominado *Tween 80 (Sigma-Aldrich)*. También se les añade ergosterol (*Sigma-Aldrich*), un intermediario en la síntesis de esteroides, a partir del cual

las levaduras pueden sintetizar los mismos sin necesidad de oxígeno. Las cantidades utilizadas de ergosterol y Tween 80 por cada 100 ml de medio de cultivo son 1 ml y 2,5 ml de las soluciones stock respectivas. El stock de ergosterol se realiza a una concentración de 4 mg/ml en etanol absoluto manteniéndolo en agitación hasta su completa disolución. El stock de *Tween 80*TM se realiza diluyendo el preparado comercial a una concentración del 20% en agua estéril.

3.3. Cultivos en hipoxia con hemina

Para el estudio del comportamiento de determinados genes se han llevado a cabo una serie de cultivos de levadura en condiciones de hipoxia con adición de hemina exógena para revertir la carencia de hemo derivada de la deficiencia de oxígeno (para la biosíntesis de hemo es necesario el oxígeno). Estos cultivos se realizaron mediante el sistema de burbujeo de nitrógeno del siguiente modo: las células son cultivadas en aerobiosis hasta que alcancen una densidad óptica óptima para la realización del protocolo posterior (en este caso, densidad óptica sería de en torno a 0,8 para la extracción de RNA); seguidamente, se le añade al cultivo hemina en las cantidades indicadas en un apartado anterior y se deja seguir creciendo en aerobiosis durante aproximadamente una hora, para luego ser colocado en el sistema de burbujeo de nitrógeno. Esta preincubación en medio aerobio es necesaria para que la hemina sea incorporada al interior de la célula ya que el transporte está inhibido en hipoxia. El cultivo con burbujeo de nitrógeno se mantiene en un baño entre 28 y 30 °C y con agitación suave (incluso no es necesaria puesto que el mismo burbujeo de gas remueve el medio). Tras tres horas de burbujeo de nitrógeno, el crecimiento y metabolismo del cultivo se para en un baño con una mezcla de hielo y agua durante 15 minutos, manteniendo durante este tiempo el burbujeo de nitrógeno para evitar que las células se expongan al oxígeno mientras no paren su metabolismo. A continuación se procede con el desarrollo del protocolo para el cual fue puesto el cultivo.

4. Marcadores de tamaño molecular



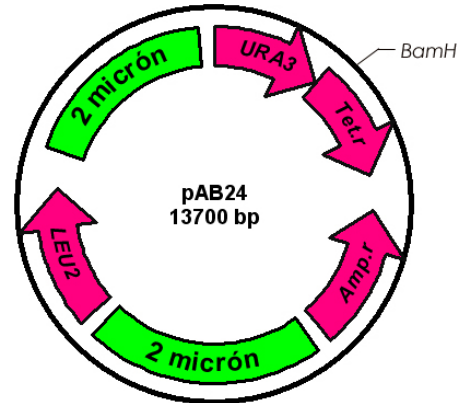
Para calcular de forma aproximada los tamaños de los fragmentos de DNA en gel, se ha empleado como marcador, un preparado comercial (*New England Biolabs*) del DNA del fago lambda digerido con la enzima de restricción *BstEII* (Figura M.1).

Figura M.1. Marcador de tamaño molecular para DNA, *BstEII* Lambda. Se obtiene con la digestión del DNA del fago Lambda por la endonucleasa de restricción *BstEII*. Fotografía obtenida de www.neb.com.

5. Vectores y genotecas

5.1. Genotecas de *K. lactis*: genoteca de pAB24

Figura M.2. Representación del vector pAB24 (Botstein *et al.*, 1979) sobre el que se construyó la genoteca de *K. lactis*. Se trata de un vector episódico lanzadera de *S. cerevisiae*, puesto que sólo tiene capacidad de replicación en esta levadura (debido al origen de replicación 2 micrón). El DNA genómico de *K. lactis* fue digerido parcialmente con la endonucleasa de restricción *Sau3A* I y luego insertado en el sitio *Bam*HI del vector (ambas enzimas dejan extremos cohesivos compatibles).



5.2. Vectores

5.2.1. Vectores de clonación en bacterias

Se ha utilizado el vector comercial *pGEM™ T-easy™* de Promega. El vector se encuentra abierto por su gen *lacZ* donde presenta unas colas monohebra de nucleótidos de timina (T), cada una en una hebra. En estas colas poli-T es donde se introducen los fragmentos de PCR a clonar, siempre y cuando sean generados por *Taq DNA-polimerasa* o alguna otra polimerasa de características similares. Esta polimerasa deja unas colas poli-A en ambos extremos de los productos de PCR que genera, de modo que estos hibridan fácilmente con las colas poli-T del vector. Los vectores en los que se ha introducido el inserto son distinguidos frente a aquellos que han autoligado por la ausencia de coloración azul de las colonias bacterianas transformadas sembradas en placas con el sustrato cromogénico de la β -galactosidasa, X-Gal, puesto que debido a la inserción de los fragmentos el gen *lacZ* queda interrumpido.

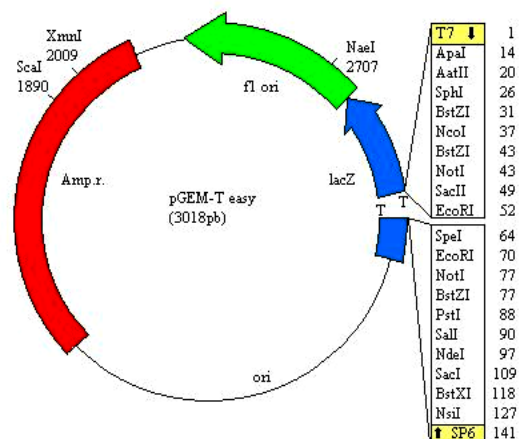


Figura M.3. Representación del vector comercial *pGEM™ T-easy™* (Promega). Dibujo extraído y adaptado de www.promega.com.

5.2.2. Vectores lanzadera de *K. lactis*

Se ha utilizado uno de los vectores episómicos de la serie pXW para la fusión de fragmentos de promotores (siempre con promotor basal puesto que el vector carece de ello) al gen informador *lacZ* que codifica la β -galactosidasa de *E. coli*. Las fusiones en este vector sólo podrán ser utilizadas en *K. lactis* puesto que sólo tiene capacidad para replicarse en esta levadura y servirán para hacer análisis de expresión de los genes cuyos promotores se han fusionado mediante estudios de actividad β -galactosidasa. La diferencia entre los tres vectores de la serie pXW estriba en la pauta de lectura a la que dan lugar tras el corte con las endonucleasas de restricción del sitio de clonación múltiple que se encuentra situado 5' del octavo codón del gen *lacZ*, como se muestra en la figura M.4.

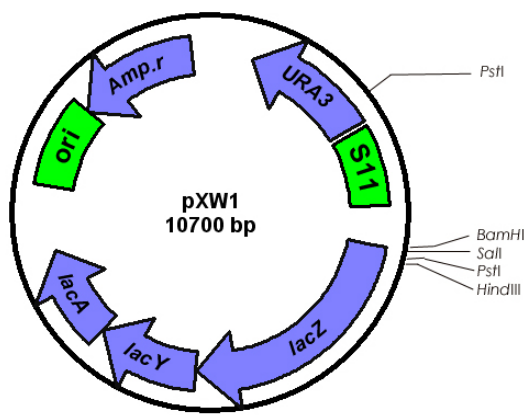


Figura M.4. Representación del vector pXW1 de la serie de vectores creada por X.J. Chen para la medida de actividad β -galactosidasa en células de *K. lactis*. (Chen *et al.*, 1992).

5.2.3. Vectores lanzadera de *S. cerevisiae*

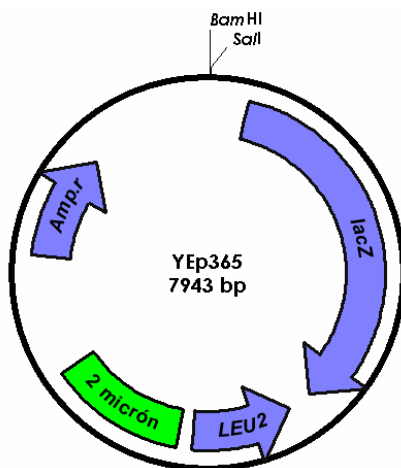


Figura M.5. Representación del vector episómico de *S. cerevisiae* YEp365 (Myers *et al.*, 1986), donde se pueden observar las enzimas que forman parte de su sitio de múltiple clonaje y que han sido utilizadas en este trabajo, así como los genes marcadores y el origen de replicación para *S. cerevisiae*.

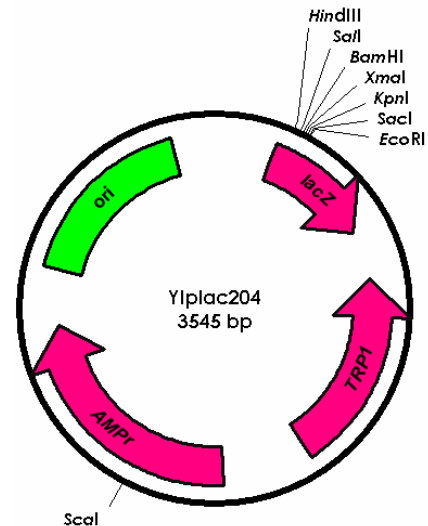


Figura M.6. Representación del vector integrativo de levaduras YIplac204 (Gietz y Sugino, 1998), donde se pueden observar las enzimas que forman parte de su sitio de clonación múltiple, así como los genes marcadores y el origen de replicación en bacterias.

5.2.4. Vectores lanzadera de *S. cerevisiae* y *K. lactis*

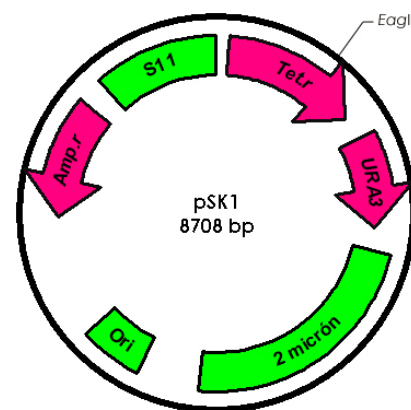


Figura M.7. Representación del vector episómico lanzadera (Prior *et al.*, 1993) obtenido al introducir un origen de replicación de *S. cerevisiae* (origen de replicación 2 micrón) en el vector Kep6 de *K. lactis* (origen de replicación S11). Se ha marcado, además de los genes y orígenes de replicación, el sitio de restricción para la endonucleasa *EagI* que es el utilizado en este trabajo.

6. Introducción de DNA en las células

6.1. Transformación de bacterias

6.1.1. Preparación de células competentes de bacterias

1. Con un precultivo de bacterias se inoculan 300 ml de medio SOC (tabla M.5) y el cultivo se incuba a 37 °C en agitación hasta que la densidad óptica sea de 0,6 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

2. Cuando se alcance la densidad óptica anterior, se para el crecimiento del cultivo en hielo durante 5-10 minutos. Seguidamente el cultivo se pasa a botes esterilizados previamente enfriados y se centrifuga a 5.000 r.p.m. durante 7 minutos en frío. Tras descartar el sobrenadante, se añade un pequeño volumen de tampón TBF-1 (Tabla M.13) frío en el que se resuspenden las células. A continuación se añade TBF-1 y la suspensión se mantiene en hielo durante 5 minutos.

3. De nuevo se recuperan las células centrifugando a 5.000 r.p.m. durante 7 minutos en frío.

4. Tras descartar el sobrenadante, se añade el tampón TBF-2 (Tabla M.14) donde se resuspenden las células. Esta suspensión, que ya contiene las células competentes, se reparte en alícuotas que se guardarán a -80 °C hasta el momento de su uso.

Tabla M.13. Composición del tampón TBF-1 para la preparación de bacterias competentes. El tampón se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 80 ml y un uso
RbCl ₂	0,964 g
MnCl ₂	0,788 g
Acetato potásico	0,232 g
Ca Cl ₂	0,116 g
Glicerol	12 ml
Agua bidestilada	Hasta 80 ml

Tabla M.14. Composición del tampón TBF-2 para la preparación de bacterias competentes. El tampón se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 15 ml y un uso
RbCl ₂	20 mg
CaCl ₂	0,2 g
Glicerol	2,28 ml
Agua destilada	Hasta 15 ml

6.1.2. Transformación de bacterias mediante choque térmico

1. Se toma un alícuota de 100 µl de bacterias competentes a las que se añade el DNA transformante y la mezcla se mantiene 20 minutos en hielo.

2. Seguidamente la mezcla de células y DNA se somete a un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos. Esto favorece la entrada del DNA en las bacterias.

3. Tras el choque térmico, al tubo de transformación se añade 1 ml de medio LB modificado y las células se ponen a recuperarse de 30 minutos a 1 hora a 37 °C.

4. Finalmente las células se recuperan por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 segundo. El sedimento celular se resuspende en un volumen de medio LB modificado adecuado para la siembra en placa selectiva (70-80 µl).

6.1.3. Preparación de células electrocompetentes de bacterias

1. Se inocula 1 litro de medio LB modificado y se incuba a 37 °C en agitación hasta que su densidad óptica sea de 0,6 unidades de absorbancia medida a una longitud de onda de 600 nm.

2. Se para el crecimiento del cultivo incubándolo en hielo durante 10 minutos. Seguidamente las células se pasan a botes esterilizados previamente enfriados y se recogen por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos en frío.
3. Se desecha el sobrenadante y se añaden 50 ml de agua bidestilada esterilizada donde se resuspenden. Las células se recuperan por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos en frío.
4. Se repite el paso anterior.
5. El botón celular se resuspende ahora en glicerol al 10% frío y la suspensión celular se somete a centrifugación de nuevo a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos en frío, tras lo cual se desecha el sobrenadante.
6. Se repite el paso anterior.
7. El precipitado celular se resuspende en 2 ml de glicerol al 10% frío y la suspensión celular se reparte en alícuotas en tubos previamente esterilizados para ser guardadas a -80 °C hasta su uso.

6.1.4. Transformación de células de bacterias mediante electroporación

1. Se toma una alícuota de 50 μ l de bacterias electrocompetentes a las que se añade el DNA transformante y la mezcla se mantiene en torno a 20 minutos en hielo.
2. Seguidamente la mezcla de células y DNA se coloca en una cubeta de electroporación de 1 mm de diámetro (*Equibio™*) y se somete a electroporación en un dispositivo *Gene Pulser™* (*Biorad*) en las siguientes condiciones: 1.500 V, 50 μ F, 150 Ω .
3. Tras la electroporación, se añade a la cubeta 1 ml de LB modificado, se agita levemente y se recupera en un tubo de cultivo. Las células se ponen a recuperar en un incubador a 37 °C durante 30 minutos a 1 hora.
4. Finalmente las células se recuperan por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 segundo. El sedimento celular se resuspende en un volumen de medio LB modificado adecuado para la siembra en placa selectiva (70-80 μ l).

6.2. Transformación de levaduras

6.2.1. Competencia de células de levadura

Para obtener células competentes de levadura preparadas para que sean capaces de tomar DNA exógeno, se utilizan soluciones salinas basándose en la técnica desarrollada por Ito y colaboradores (1983).

6.2.2. Transformación de células de levadura mediante choque térmico

1. Se prepara un cultivo en 10 ml de medio adecuado para el crecimiento de la levadura huésped hasta una densidad óptica de 0,6 a 0,8 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

2. Las células son recuperadas por centrifugación en un tubo estéril a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos, se descarta el medio de cultivo y se lavan por adición de agua estéril y nueva centrifugación en las condiciones anteriores.

3. A continuación las células son lavadas con 1 ml de tampón AcLi-TE (Tabla M.15) mediante resuspensión y posterior centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 segundo.

4. Seguidamente las células se resuspenden en 1 ml de tampón AcLi-TE.

5. De la suspensión anterior se toman 100 μ l de células para una transformación a los que se añaden 10-15 μ g de DNA transformante y la mezcla se agita por inversión o pipeteo. Seguidamente se añaden 50 μ g de DNA transportador o *carrier* (tabla M.16, Schiestl *et al.*, 1989), que en este caso será DNA de testículos de salmón (*Sigma-Aldrich*), y 300 μ l de PEG 4.000 preparado al 50% en agua, agitando de nuevo por pipeteo. El DNA *carrier* favorece la entrada del DNA en las células y probablemente lo preserve de la degradación por las DNAsas celulares.

6. La mezcla anterior se incuba durante 30 minutos a 30 °C, para luego someterla a un choque térmico de 15 minutos a 42 °C.

7. A continuación las células son recuperadas mediante una centrifugación de 13.000 r.p.m. durante 1 segundo, desechando el sobrenadante. El botón celular se resuspende en 1 ml de agua estéril para su lavado, recuperando de nuevo las células por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 segundo y descartando el agua.

8. Las células ahora se resuspenden en un pequeño volumen de agua (70-80 μ l) para la siembra en una placa de medio selectivo adecuado que se pondrá a crecer de 2 a 3 días en un incubador a 30 °C.

Tabla M.15. Preparación del tampón AcLi-Te. Las dos soluciones que lo componen se esterilizan en autoclave por separado.

Compuesto	Cantidades para 1 ml
Acetato de Litio 1 M	900 μ l
Tampón 10xTE (tabla M.17)	100 μ l

Tabla M.16. Preparación del DNA transportador o *carrier* para la transformación de levaduras. La solución una vez preparada se somete a agitación fuerte y posteriormente a sonicación con una potencia de 14 μ A, en 15 pulsos de 1 minuto. Seguidamente se desnaturaliza a 95 °C durante 5 minutos.

Compuesto	Cantidades para 1 ml
DNA de testículos de salmón	10 mg
Tampón 1xTE pH 8,0 (tabla M.17)	Hasta 1 ml

Tabla M.17. Composición del tampón 50xTE a partir del cual se puede preparar 1xTE diluyendo 50 veces. La mezcla se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Volúmenes para 100 ml
Tris 1M pH 8,0	50 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 ml
Agua bidestilada	30 ml

6.2.3. Transformación de células de levadura mediante electroporación

La técnica de electroporación de levaduras es la empleada por Kooistra y colaboradores (2004) a partir de una adaptación de la desarrollada por Wésolowsky-Louvel y colaboradores (1996) para transformar *K. lactis* con fragmentos lineales de DNA. Se basa en un lavado con una serie de soluciones salinas en frío antes de someter las células ya competentes a electroporación.

1. Las células de levadura se cultivan en 100 ml de YPD hasta que alcancen una densidad óptica de aproximadamente 0,8 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

2. Seguidamente las células se pasan a un bote de centrifuga esterilizado y se recuperan por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C y se descarta el sobrenadante.

3. Las células se lavan por resuspensión con 50 ml de tampón de electroporación (tabla M.18) mantenido a 4 °C y se repite de nuevo el paso anterior.

4. Ahora las células se resuspenden en 50 ml de tampón de incubación (tabla M.19) en el que se incuban durante 30 minutos a 30 °C sin agitación.

5. Pasados los 30 minutos, las células son recuperadas por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C, descartándose el sobrenadante y lavando el botón celular con 10 ml de tampón de electroporación enfriado en hielo (0 °C). Se repite la centrifugación anterior para recuperar las células, que finalmente son resuspendidas por pipeteo en 0,2 ml de tampón de electroporación enfriado en hielo (0 °C).

6. A partir de la suspensión celular anterior se toman 60 µl de células y se pasan a un tubo estéril donde se mezclan con el DNA transformante. Esta mezcla se incuba durante 15 minutos en hielo antes de ser transferida a una cubeta de electroporación de 2 mm de diámetro (suministrada por *Equibio*TM) estéril enfriada en hielo.

7. Tras limpiar la cubeta de electroporación de restos de agua y/o hielo, se monta en un electroporador (*Gene Pulser*TM de *Biorad*) ajustando las condiciones de electroporación a 1.000 V, 400 Ω y 250 µF.

8. Inmediatamente después del pulso se añade a la cubeta de electroporación 1 ml de YPD a temperatura ambiente, se agita por inversión y el contenido se recupera y es transferido a un tubo estéril para que las células se recuperen mediante incubación durante 2-3 horas a 30 °C con agitación.

9. A continuación las células se recuperan por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante. El botón

celular se lava con agua estéril y las células se recuperan de nuevo por centrifugación en las condiciones anteriores. Las células ahora se resuspenden en un pequeño volumen de agua (70-80 μ l) para la siembra en una placa de medio selectivo adecuado que se pondrá a crecer de 2 a 3 días en un incubador a 30 °C.

Tabla M.18. Composición del tampón de electroporación. Los componentes una vez mezclados se esterilizan en autoclave.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Tris-HCl pH 7,5	121,14 mg (10 mM)
Sacarosa	9,24 g (270 mM)
MgCl ₂	9,521 mg (1 mM)
Agua bidestilada	Hasta 100 ml

Tabla M.19. Composición del tampón de incubación. Los componentes una vez mezclados se esterilizan en autoclave.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
DTT (Ditiotreitol)	385,25 mg (25 mM)
HEPES pH 8,0	476,6 mg (20 mM)
YPD	Hasta 100 ml

7. Extracción de ácidos nucleicos

7.1. Extracción de DNA plasmídico en bacterias

7.1.1. Extracción mediante lisis alcalina (modificado de Sambrook *et al.*, 1989)

1. Se parte de un cultivo bacteriano iniciado el día anterior (12-16 horas) en LBA u otro medio selectivo dependiendo del plásmido que aloja la bacteria y que queremos extraer. El cultivo puede ser en placa (máximo 1/4 de placa) o en medio líquido (máximo 10 ml).

2. En el momento de comenzar la extracción se prepara a solución II (Tabla M.21).

3. Se raspa el sembrado de la placa con un palillo estéril y se resuspende en 200 μ l de la solución I (Tabla M.20). Si el cultivo se ha realizado en medio líquido, las células deben ser recuperadas en un paso previo de centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos o a 13.000 r.p.m. durante 1 segundo.

4. Agitación fuerte en *vortex* hasta conseguir una mezcla homogénea.

5. Añadir 400 μ l de la solución II (Tabla M.21) y agitación suave por inversión.

6. Añadir 300 μ l de la solución III (Tabla M.22) y agitación suave por inversión.

7. La mezcla anterior se somete a centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 5-10 minutos. Se pasa el sobrenadante a tubos limpios.

8. *Opcional: este paso sirve para obtener DNA más limpio (libre de proteínas), aunque en él se pierde cierta cantidad y calidad del DNA. Se*

añaden 500 μ l de PCIAxTE (tabla M.23). La mezcla se agita en vortex hasta que blanquee y luego se somete a centrifugación a 8.000 r.p.m. durante 5 minutos, resultado de la cual se formarán dos fases. Se reservará la fase acuosa (superior) y se descartará la orgánica (inferior). Se debe tener cuidado de no tomar la interfase puesto que ahí quedan depositadas las proteínas después de la centrifugación.

9. Al sobrenadante recuperado de cualquiera de los dos pasos anteriores, se añade 1 ml de etanol al 95% frío (-20 °C). Se agita la mezcla por inversión.

10. Precipitación del DNA a -80 °C. Con 5 minutos es suficiente.

11. Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.

12. Se lava el pellet con 1 ml de etanol al 70% frío (-20 °C). Mezclar por inversión.

13. Centrifugar 13.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante de etanol y se retira lo que quede en el tubo con una pipeta. Poner a secar en una bomba de vacío durante 10-15 minutos.

14. El DNA seco es suspendido en 30 μ l (o más dependiendo de la cantidad de DNA extraído) de agua bidestilada o 1xTE mediante pipeteo y/o agitación al vortex si es preciso.

Tabla M.20. Composición de la solución I para la extracción de DNA plásmidico de bacterias mediante el método de la lisis alcalina. Antes de su uso es esterilizada en autoclave.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Glucosa 20%	4,5 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	2 ml
Tris-HCl, pH 8,0	2,5 ml
Agua bidestilada	91 ml

Tabla M.21. Composición de la solución II para la extracción de DNA plásmidico de bacterias mediante el método de la lisis alcalina.

Compuesto	Cantidades por 10 ml
NaOH 0,2 M	9,5 ml
SDS 20%	0,5 ml

Tabla M.22. Composición de la solución III para la extracción de DNA plasmídico de bacterias mediante el método de la lisis alcalina. Antes de su uso es esterilizada en autoclave.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Acetato potásico 5M	60 ml
Ácido acético glacial	11,5 ml
Agua bidestilada	28,5 ml

Tabla M.23. Composición de la solución de PCIAxTE (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en 1xTE) empleado para la limpieza del DNA plásmidico.

Compuesto	Cantidades
Fenol equilibrado con 1xTE (tabla M.17)	100 ml
Cloroformo	100 ml
Alcohol isoamílico	8 ml

7.1.2. Extracción mediante *kits* comerciales

A lo largo de esta tesis se han empleado dos sistemas de extracción comerciales basados en la unión del DNA a una membrana cargada. Ésta se encuentra alojada en el centro de un reservorio o columna donde es depositado el DNA en suspensión junto con el fluido resultado de la ruptura celular. Esta suspensión es forzada a pasar por centrifugación a través de la membrana donde queda retenido el DNA. Estos sistemas comerciales han sido: *Qiaprep™ Spin miniprep (Qiagen™)* y *SpinClean™ Plasmid Miniprep Kit de M Biotech™* y se han utilizado según los protocolos suministrados por el fabricante.

7.2. Extracción de DNA plasmídico en levaduras

1. Se realiza un cultivo de las células de levadura transformadas en 10 ml de medio selectivo adecuado durante una noche (12-16 horas).
2. Se recuperan las células mediante centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos y se resuspenden en 200 μ l de solución I (tabla M.20) fría.
3. Se añaden *glass beads (Sigma-Aldrich)* de 0,4 mm de diámetro hasta debajo del nivel que alcance la suspensión de células.
4. La mezcla anterior se agita en *vortex* durante 4 minutos a máxima velocidad.
5. Se procede a una centrifugación a 13.000 r.p.m. durante un par de minutos y se recupera el sobrenadante.
6. Al sobrenadante se añaden 200 μ l de solución II (Tabla M.21) fría, se agita por inversión y se añaden 300 μ l de solución III (Tabla M.22) fría y de nuevo se agita por inversión.
7. La mezcla se incuba 5 minutos en hielo y se añaden 500 μ l de PCIAxTE (tabla M.23), se agita por inversión y se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 2 minutos.
8. Al sobrenadante que se recupera del paso anterior (aproximadamente 500 μ l) se le añaden 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (aproximadamente 50 μ l) y 2 volúmenes de etanol al 95% (aproximadamente 1 ml) y la mezcla se mantiene durante 30 minutos en hielo para favorecer la precipitación del DNA.
9. Se procede a una centrifugación de 15 minutos a 13.000 r.p.m., tras la cual se descarta el sobrenadante que es sustituido por 1 ml de etanol al 70%. En el fondo del tubo quedará un precipitado blanco de DNA. De nuevo se procede a una centrifugación a 13.000 r.p.m. pero esta vez de 5 minutos, tras la cual se descarta el sobrenadante y se secan bien los restos de etanol del fondo del tubo.
10. El sedimento de DNA se seca en una bomba de vacío tras lo que se resuspende en 10 μ l de 1xTE (Tabla M.17). Seguidamente se transforma una cepa de bacterias altamente competentes (por ejemplo, XL-1 Blue) mediante electroporación.

7.3. Extracción de DNA genómico de levaduras

1. Las levaduras se cultivan en 10 ml de un medio apropiado durante una noche.
2. Se recuperan por precipitación en una centrifuga a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en 500 μ l de agua.
3. Las células se pasan a un tubo limpio y se centrifugan a 13.000 r.p.m. durante un segundo. Se descarta el sobrenadante y se agitan en *vortex* brevemente en seco.
4. Las células se suspenden en 200 μ l de solución de ruptura (tabla M.24) y se añaden entre 100 y 200 μ l de *glass beads* (*Sigma-Aldrich*), 2 μ l de RNasa diluida 25 mg/ml (*Qiagen*) y 200 μ l de PCIAxTE.
5. La mezcla se agita en *vortex* a baja velocidad (15-20 Hz) durante 3 minutos.
6. Se añaden 200 μ l de 1xTE (tabla M.17) y se agita brevemente.
7. La mezcla se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante se transfiere a un nuevo tubo. Se añade 1 ml de etanol 100% y se mezcla por inversión. Se deja de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
8. La mezcla se centrifuga ahora a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 30 μ l de 1xTE. Mantener a 4 °C.

Tabla M.24. Composición de la solución de ruptura empleada en la extracción de DNA genómico de levaduras.

Compuesto	Cantidades para 10 ml
Triton X-100 2%	200 μ l
SDS 1%	500 μ l de SDS 20%
NaCl 100 mM	200 μ l de NaCl 5 M
Tris-HCl 10 mM, pH 8,0	100 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 8,0
EDTA 1 mM, pH 8,0	20 μ l de EDTA 0,5 M, pH 8,0

7.4. Extracción de RNA total en levaduras

7.4.1. Extracción con *Trizol™ Reagent* (*Invitrogen*)

A lo largo de esta tesis se han utilizado dos variantes de este método en el que se utiliza un preparado comercial a base de fenol y isotiocianato de guanidina, llamado *Trizol™*, desarrollado y suministrado por *Invitrogen Life Technologies*. Este preparado estabiliza el RNA en los pasos del protocolo posteriores a su introducción, de manera que queda relativamente protegido de la digestión por RNasas y de la ruptura y degradación generada por exposición a la temperatura ambiental, lo que convierte a este método en el idóneo si se va a utilizar el RNA en posteriores procesos y tratamientos. El *Trizol™* puede ser utilizado también para la extracción de DNA y proteínas en células de plantas o tejidos de mamíferos, además de para la extracción de RNA en levaduras. La diferencia entre las dos variantes del método que aquí se presenta radican en el modo de abordar la ruptura de la pared de las

células de levadura necesaria para facilitar el acceso del *Trizol*TM al RNA, siendo llevada a cabo en un caso mediante pulverización, previa congelación en nitrógeno líquido, mientras que en el otro caso se utilizan perlas de vidrio que son añadidas a las células de levadura que son rotas mediante fricción mecánica generada por agitación vigorosa en *vortex*.

1. Se pone un preinóculo de la levadura a la que se le desea extraer el RNA, a crecer durante una noche (15-16 horas) en el medio de cultivo adecuado y a 30 °C.

2. Se inoculan entre 100 y 200 ml de medio con el volumen necesario de preinóculo para que su densidad óptica (D.O.) sea 0,3-0,4 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Poner a crecer a 30 °C a agitación moderada (200-250 r.p.m.).

3. Esperar a que el cultivo alcance una D.O. de 0,8-0,9 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. El tiempo de crecimiento dependerá de la cepa de levadura y de las condiciones de cultivo. Una vez alcanzada la D.O. deseada se enfría el cultivo en hielo durante 5-10 minutos.

4. El cultivo se recoge en el bote y se centrifuga a 5.000 r.p.m. durante 3 minutos en frío.

Opción A: utilizando nitrógeno líquido para la ruptura de las levaduras.

5. Se retiran 5 ml de medio (sobrenadante) con una pipeta y se desecha el resto. Los 5 ml retirados son añadidos al sedimento celular y se resuspende en el mismo bote manteniéndose en hielo.

6. Se toma un tubo plástico de 10 ml y se introduce en el nitrógeno líquido llenándolo del mismo. Se espera hasta que cese el burbujeo y se saca del nitrógeno.

7. Se toman con la pipeta parte de los 5 ml de cultivo y se añaden gota a gota sobre el nitrógeno líquido del tubo para que se vayan formando una especie de bolas de levadura congeladas, repitiendo el proceso hasta agotar los 5 ml de células.

8. Se montan las cápsulas del pulverizador con su bola de tungsteno y se introducen en nitrógeno líquido. Una vez frías se abren sobre la placa *petri*, se abre un tubo con bolas de levadura congeladas y se toman con las pinzas una serie de bolas colocándolas en el interior de la cápsula para volverla a cerrar e introducirla de nuevo en nitrógeno líquido.

9. Se saca la cápsula del nitrógeno líquido y se monta en el pulverizador, procediendo a dar un pulso de 3 minutos a 2.000 r.p.m. Mientras, se prepara un tubo de vidrio con 10 ml de *Trizol*TM frío (4 °C).

10. Se abre la cápsula del pulverizador y se retira el polvo de levadura con una cucharilla añadiéndoselo al *Trizol*TM.

Opción B: utilizando perlas de vidrio para la ruptura de las levaduras.

5. Se retira 1 ml de medio (sobrenadante) y se desecha el resto. Se añade a las células precipitadas y se resuspenden en el mismo bote manteniéndolo en hielo.

6. Las células son transferidas a un tubo de vidrio y se mantienen en hielo. Se añaden perlas de vidrio de 0,3 cm de diámetro hasta abarcar 2/3

del volumen de células y se procede a su ruptura. Para ello se darán en *vortex* 15 pulsos de 20 segundos, enfriando en hielo 20 segundos entre pulso y pulso.

7. A continuación se añaden 10 ml de *Trizol*TM al tubo de vidrio.

Final común del protocolo.

1. La mezcla de *Trizol*TM y levaduras se agitan con *vortex* durante 1 minuto y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

2. Se añaden 2 ml cloroformo y la mezcla se agita en *vortex* 15 segundos, dejando reposar de 3 a 10 minutos a temperatura ambiente.

3. La mezcla se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Tras la centrifugación se pasa la fase acuosa (aprox. 5 ml) a un tubo de vidrio limpio.

4. A la fase acuosa se le añade ahora 5 ml de 2-isopropanol para la precipitación del RNA, se mezcla dando un toque de *vortex* y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

5. La mezcla se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C.

6. Tras la centrifugación el RNA quedará pegado a la pared del tubo. Se desecha el líquido y se añaden al RNA, 2 ml de etanol al 75% libre de RNAsas conservado a -20 °C, mezclando a continuación con un toque de *vortex*. La mezcla se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C.

7. Se repite el paso anterior, tras lo cual se seca levemente el RNA durante 5 minutos en bomba de vacío.

8. El RNA se disuelve lavando las paredes del tubo de vidrio con 500 µl de agua tratada (tabla M.25) disparada con una pipeta automática. El RNA disuelto en agua es transferido entonces a un tubo plástico pequeño, donde se le añaden 500 µl del tampón de sales a base de LiCl (tabla M.26) y se mezcla con pipeta. La mezcla se deja reposar a -20 °C de 2 horas a una noche.

9. La mezcla anterior se centrifuga a 15.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C para recuperar el RNA.

10. Se desecha con cuidado el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 75% libre de RNAsas conservado a -20 °C, mezclando con pipeta automática. A continuación se centrifuga la mezcla a 15.000 r.p.m. durante 15 minutos.

11. Se repite el paso anterior, tras lo cual el RNA se seca levemente durante 5 minutos en bomba de vacío.

12. El RNA es suspendido ahora en el mínimo volumen posible (en torno a 30 µl de agua tratada) y se mide su calidad y concentración bien al espectrofotómetro, bien en gel de agarosa.

Tabla M.25. Preparación de agua tratada. Después de mezclar el dietilpirocarbonato con el agua se deja reposar durante una noche y se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 1 litro
Agua bidestilada	999 ml
DEPC	1 ml

Tabla M.26. Composición del tampón LiCl utilizado en la extracción de RNA de levaduras mediante *Trizol*TM.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
LiCl	16,96 g (4 M)
Tris-HCl 1 M, pH7,5	2 ml (20 mM)
EDTA 0,5 M	2 ml (10 mM)
Agua tratada	Hasta 100 ml

7.4.2. Extracción con PCIAxRE

1. Se pone un preinóculo de la levadura a la que se le desea extraer el RNA, a crecer durante una noche (15-16 horas) en el medio de cultivo adecuado y a 30 °C.

2. Inocular entre 100 y 200 ml de medio con el volumen necesario de preinóculo para que su D.O. sea 0,3-0,4 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

3. Esperar a que el cultivo alcance una D.O. de 0,8-0,9 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. El tiempo de crecimiento dependerá de la cepa de levadura y de las condiciones de cultivo. Una vez alcanzada la D.O. deseada enfriar el cultivo en hielo durante 5 minutos

4. Pasar los cultivos a los botes de plástico de 250 ml previamente fríos y precipitar las células en la centrifuga refrigerada durante 5 minutos a 5.000 r.p.m.

5. Tras la centrifugación se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en aproximadamente 25 ml de 1xRE frío (Tabla M.28).

6. Se centrifuga de nuevo en la centrifuga refrigerada durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. y se descarta el sobrenadante. NOTA. En este momento se puede parar el protocolo congelando el precipitado a -20 °C.

7. Se resuspende el precipitado en 2 ml de 1xRE frío y se pasa a un tubo de vidrio. Añadir perlas de vidrio de 3 mm de diámetro, lavadas con ácido nítrico y esterilizadas, hasta que alcancen la curvatura de la base del tubo de vidrio.

8. Se dan al menos 15 pulsos de 20 segundos cada uno en *vortex*, dejando el tubo en hielo entre pulso y pulso al menos 20 segundos para evitar su calentamiento.

9. Se añaden 2 ml de 1xRE + SDS 1% (10 ml de 1xRE y 0,5 ml de SDS 20%) a cada muestra. Agitación mediante *vortex* suave durante 20 segundos.

10. Se añaden 7,8 ml de PCIAxRE (tabla M.29). El tubo de vidrio se cubre con papel plástico. Toque de *vortex* para mezclar las fases.

11. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Mientras se centrifuga se preparan tubos de vidrio fríos con 5 ml de PCIAxRE (tabla M.29).

12. Se transfiere la fase acuosa superior (no tomar la interfase) al tubo de vidrio con PCIAxRE preparado antes. Se tapa con papel plástico. Toque de *vortex* para mezclar las fases. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. Mientras tanto se prepara otro tubo de vidrio frío por muestra.

13. Se transfiere la fase acuosa superior (no tomar interfase) al tubo de vidrio preparado antes. Se añaden 2,5 volúmenes de etanol 95% y 1/10 de acetato sódico 3 M (5 ml de etanol y 0,5 ml de acetato sódico).
14. Se deja precipitando a -20 °C una noche (15-16 horas).
15. Se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C.
16. Se añaden 10 ml de etanol 75% (preparado con agua tratada). Se resuspende el precipitado con pipeta automática y se centrifuga de nuevo durante 10 minutos a 10.000 r.p.m. y a 4 °C.
17. Dar la vuelta a los tubos de vidrio sobre un trozo de papel secante hasta escurrir el etanol de las paredes. Se secan los tubos en bomba de vacío o al aire.
18. El RNA es suspendido ahora en el mínimo volumen posible (en torno a 30 µl de agua tratada) y se mide su calidad y concentración bien al espectrofotómetro, bien en gel de agarosa.

Tabla M.28. Composición del tampón 10xRE para la extracción de RNA total de levaduras. Se prepara 10xRE como stock y se diluye a 1xRE para uso. Ambas soluciones se preparan con agua tratada y se mantienen a 4 °C. El tampón 10xRE se esteriliza en autoclave. Se debe ajustar el pH del agua tratada a 7,4.

Compuesto	Cantidades por 100 ml
Tris	12,11 g (1 M)
LiCl	4,24 g (1 M)
EDTA	37 mg (1 mM)
Agua tratada	Hasta 100 ml

Tabla M.29. Composición de la solución PCIAxRE para la extracción de RNA total de levaduras. El LiCl se prepara con agua tratada.

Compuesto	Cantidades
Fenol equilibrado con 1xTE	100 ml
Cloroformo	100 ml
Alcohol isoamílico	8 ml
LiCl 5 M	2 ml

8. Cuantificación de ácidos nucleicos

8.1. Mediante espectrofotometría

La concentración de las muestras de ácidos nucleicos se puede medir con un espectrofotómetro haciendo incidir sobre ellas radiación ultravioleta a 260 nm, longitud de onda que absorben. Para el DNA de doble hebra 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50 µg/ml, mientras que 1 unidad de absorbancia a 260 nm de DNA de hebra sencilla equivale a 33 µg/ml. En el caso de RNA de hebra sencilla (desnaturalizado), 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg/ml. En el caso del RNA la absorbancia se suele medir además a una longitud de onda de 280 nm y el ratio entre la absorbancia obtenida a 260 nm y la obtenida a 280 nm da una idea de la calidad del RNA. Normalmente se considera de buena calidad un RNA cuando el ratio de absorbancia 260nm/280nm se encuentra próximo

a 2 (Sambrook *et al.*, 1989). Las medidas fueron realizadas en un espectrofotómetro *Cecil CE2041*.

8.2. Mediante electroforesis en gel de agarosa

Este método para la medida de la concentración de ácidos nucleicos se basa en la propiedad del bromuro de etidio (ver apartado 11), la molécula que se usa para la visualización de los mismos, de emitir tanta más fluorescencia cuanto más concentrado está el ácido nucleico al que se ha unido. Además se debe tener en cuenta que cuanto más larga es el fragmento de ácido nucleico más bromuro de etidio se une a él, con lo cual más fluorescencia emitirá una molécula mayor a una misma concentración que una pequeña. Por eso las muestras a medir se comparan en fluorescencia, teniendo en cuenta su posición en el gel, respecto a un marcador de tamaño molecular cuyas bandas tienen una concentración conocida. Para la cuantificación se pueden utilizar distintos programas de análisis de imagen, siendo en este caso el *Quantity One™* de *Biorad*.

9. Ingeniería genética: corte y pegado del DNA

9.1. Corte: digestión mediante endonucleasas de restricción

El DNA plasmídico fue digerido con endonucleasas de restricción de diversos proveedores (*Roche*, *New England Biolabs* y *Takara*) siguiendo sus recomendaciones en cuanto a los tampones, tiempos y temperaturas de reacción e inactivación y en el caso de digestiones dobles, las enzimas con tampones compatibles.

9.2. Ligación: realización de construcciones

Para la colocación de fragmentos de DNA en vectores se empleó la *T4 DNA ligasa* de *Roche* con el tampón suministrado con la enzima. Las ligaciones se realizaron añadiendo un volumen variable de inserto y de vector (generalmente una proporción 1:10 de vector e inserto a clonar) con 1 U de ligasa por cada μg de DNA y la cantidad de tampón adecuada. La mezcla se incubó toda la noche a 14 °C. El inserto puede provenir de otro vector por digestión, en cuyo caso la/s endonucleasa/s de restricción empleada/s para separar el inserto del vector donante debe/n ser la/s misma/s con la/s que se corte el vector huésped o como mínimo, aunque sean distintas, deben dejar extremos compatibles, para que pueda producirse el ligado. El inserto también se puede obtener a partir de PCR; en este caso, los cebadores deben llevar en sus extremos 5' unas colas, que no hibridarán con el molde, en las que portan la diana para la endonucleasa de restricción y unos cuantos desoxinucleótidos más a mayores hacia su extremo 5', que servirán como zona de soporte y anclaje para que las enzimas de restricción se unan al extremo del fragmento de DNA amplificado y puedan cortarlo. Estas colas en el extremo 5' de los cebadores se muestran junto a la secuencia de los

mismos en los diferentes apartados de Resultados según se fueron usando. Una alícuota del producto de la PCR se comprueba en gel y, tras comprobar que su tamaño es correcto, el resto del producto de la PCR se purifica según se indica en el apartado correspondiente. Después de purificar el producto de la PCR, éste es sometido a la digestión mediante las endonucleasas de restricción apropiadas. Tras la digestión, las endonucleasas de restricción son inactivadas siguiendo las recomendaciones del proveedor y, a continuación, el DNA se purifica de nuevo como se indica en apartado correspondiente. Este DNA ya está listo para ser utilizado como inserto en la reacción de ligación.

En los casos en que el vector es digerido con una única endonucleasa de restricción se hace necesario el empleo de una fosfatasa con el fin de evitar posibles autoligados (puesto que los dos extremos del vector al ser generados por la misma endonucleasa de restricción encajan a la perfección). Para ello se trata el DNA con la fosfatasa que elimina los grupos fosfato en el extremo 5' del vector impidiendo que la ligasa sea capaz de unir un extremo al otro y recircularizar el vector. En el tratamiento se siguen las recomendaciones del proveedor (*Roche*), utilizando 1U de *fosfatasa alcalina* junto con 1 μ l del tampón 10x suministrado, añadiendo 8 μ l de la digestión del vector para completar 10 μ l finales. La mezcla se incuba durante 1 hora a 37 °C y, transcurrido ese tiempo, la fosfatasa se inactiva por calor a 65 °C durante 10 minutos, añadiéndole previamente, 10 μ l de EGTA 0,1 mM. Tras la inactivación, la mezcla se purifica según se indica en el apartado correspondiente.

10. Recuperación, purificación y concentración de DNA

10.1. Recuperación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de DNA separados en geles de agarosa se utilizan los tubos *Montáge™ DNA Gel Extraction Kit – Ultrafree™ DA (Millipore)*. Se trata de unos tubos en cuyo interior tienen montado un compartimento en el fondo del cual se encuentra colocado un dispositivo nebulizador, que rompe la agarosa en fragmentos muy pequeños, seguido de un filtro, que evita el paso de cualquier partícula de agarosa. Dentro del compartimento se sitúa el trozo de gel de agarosa que contiene el fragmento de DNA o banda que se quiere purificar. Al someter a una centrifugación de 10 minutos a 5.000 x g (en nuestra minicentrífuga, 9.500 r.p.m.), la fuerza centrífuga empuja el trozo de agarosa contra el nebulizador y el filtro, apretándolo y haciendo que éste libere el tampón que contiene junto con el fragmento de DNA. El fluido recuperado debe ser purificado posteriormente como se describe en el siguiente apartado.

10.2. Purificación y concentración de fragmentos de DNA

Para la purificación y concentración de fragmentos de DNA, tanto provenientes de una separación mediante electroforesis en gel de agarosa, de una PCR o de cualquier otro tipo de manipulación, se utiliza el sistema de columnas con filtros de afinidad y tampones del kit *SpinClean™ PCR Purification Kit (M Biotech)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit es capaz de retirar enzimas de restricción, polimerasas, cebadores y nucleótidos no incorporados durante la PCR, además de eliminar las sales y otros compuestos y contaminantes no deseados que pueden estar presentes en las soluciones de DNA. En esencia, los pasos a los que se somete el DNA para su purificación son los siguientes:

1. Se mide el volumen de la suspensión de DNA, sea cual sea su origen, y se añaden 5 veces más de tampón de purificación.
2. La mezcla se pasa a una columna con filtro de afinidad y se hace pasar por el filtro por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto.
3. Se desecha el líquido y se añaden a la columna 700 μ l de tampón de lavado con etanol. La columna se lava por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto.
4. Se desecha el líquido y la columna se centrifuga en vacío a 13.000 r.p.m. durante 1 minuto para eliminar los restos de tampón.
5. La columna se pasa ahora a un tubo limpio y se añade el volumen deseado de agua al filtro de la columna (no menos de 30 μ l), se deja que se empape durante 1 minuto y se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante otro minuto. En el agua se encuentra contenido el DNA ya limpio.

11. Obtención de DNA *in vitro*

11.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta es una de las técnicas básicas en Biología Molecular desde que en la década de los 80, Kari Mullis recibió el premio Nobel por su desarrollo. Se utiliza para amplificar (esto es, aumentar su cantidad), y por extensión también en muchas ocasiones para detectar haciendo visibles, fragmentos específicos de DNA, ya sea plasmídico o genómico, a partir de cantidades ínfimas del mismo (la teoría dice que basta con una sola molécula de DNA). Se trata en esencia de una serie de reacciones cíclicas de replicación *in vitro* llevadas a cabo a distintas temperaturas en unos dispositivos denominados termocicladores, donde se explota la capacidad de las DNA-polimerasas de sintetizar una hebra complementaria de DNA tomando como referencia una molécula de DNA monohebra, que se denomina molde, con el único requerimiento de unos cebadores. Los cebadores, generalmente obtenidos por síntesis hibridan con el DNA molde en los extremos de la región a amplificar. En el presente trabajo se han utilizado la *Taq DNA-polimerasa* de Roche y la *Vent DNA-polimerasa* de New England Biolabs y en todos los casos se ha utilizado el tampón de reacción proporcionado y se han seguido las recomendaciones de los proveedores. Los cebadores empleados en

cada proceso se listan en el correspondiente apartado de Resultados y fueron suministrados por *Roche TIB-Mol*.

11.2. Obtención de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mediante retrotranscripción

Para la obtención de cDNA a partir de RNA se emplea el kit *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* de *Invitrogen* que consta de la retrotranscriptasa *SuperScript™ II*, su correspondiente tampón *5x First Strand™* y una solución de 0,1 M de DTT.

11.2.1. Eliminación de restos de DNA genómico de las preparaciones de RNA

En los protocolos utilizados para la extracción de RNA total de levadura se aísla también como producto colateral DNA genómico. Debido a que para el uso del RNA en las siguientes técnicas se necesita que éste se encuentre totalmente puro y libre de contaminación de DNA, lo que podría dar lugar a resultados “fantasma”, se procede a la eliminación del DNA genómico mediante el uso de una desoxirribonucleasa o DNasa. En este caso, se ha empleado el kit de la DNasa libre de RNasa *RQ1™*, siguiendo para ello las instrucciones del proveedor (*Promega*).

1. Se emplean tantas unidades de DNasa como μg de RNA se vayan a tratar, mezclando ambos componentes con la cantidad apropiada de un tampón de reacción 10x suministrado con la DNasa.
2. El tratamiento se lleva a cabo durante 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se añade una solución de parada 10x, suministrada con la DNasa.
3. Finalmente se inactiva la DNasa incubando toda la mezcla anterior durante 10 minutos a 65 °C.
4. A continuación, para retirar la DNasa y los demás componentes utilizados en la reacción, se lleva a cabo una precipitación del RNA añadiendo un volumen de isopropanol a la mezcla anterior.
5. Después de dejar precipitar el RNA durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C) se procede a una centrifugación de 30 minutos a 15.000 r.p.m. a 4 °C.
6. Una vez terminada se debe observar un pequeño sedimento blanco de RNA en el fondo del tubo. Se descarta el sobrenadante y se añade 1 ml de etanol al 75% libre de RNasas. Se centrifuga durante 5 minutos a 15.000 r.p.m. y a 4 °C.
7. Se repite el paso anterior.
8. Se descarta el etanol del último lavado procurando retirar el máximo posible. Se utiliza pipeta automática teniendo cuidado de no llevarse el RNA del fondo del tubo. El RNA se seca brevemente en una bomba de vacío o a temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante 5 minutos y se resuspende en el volumen deseado de agua tratada.

9. Se comprueba la ausencia de DNA genómico mediante la realización de una PCR.

11.2.2. Obtención de cDNA para *primer extension*

Hacer un *primer extension* supone, en esencia, obtener cDNA específico de un determinado gen utilizando un cebador localizado en las cercanías del extremo 5' de su secuencia codificadora orientado hacia su región 5'. La retrotranscriptasa genera cDNA a partir del mRNA desde el cebador hasta su límite 5' obteniéndose así una banda de un tamaño determinado que se visualiza al ser cargada la reacción en un gel de poliacrilamida. Si en paralelo se efectúa una secuenciación del gen utilizando el mismo cebador que el empleado en la reacción de retrotranscripción, se puede determinar en que punto exacto se encuentra el límite 5' del mRNA y, por tanto, el sitio de inicio de la transcripción del gen. Para la obtención de cDNA para *primer extension* se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Se toman 40-60 μg de RNA, se tratan con la DNasa RQ-1™ y se suspenden en 12 μl de agua tratada. Se añaden 2 pmoles en 2 μl de cebador específico (suministrado por Roche TIB-Mol) de gen (evidentemente a 1 pmol/ μl).

2. La mezcla se incuba a 70 °C durante 10 minutos y se enfría rápidamente en hielo.

3. Se añaden ahora: 6 μl de tampón 5x *First Strand*™ (en el Kit *Super Script*™ II Reverse Transcriptase), 3 μl de DTT 0,1 M (en el Kit *Super Script*™ II Reverse Transcriptase), 1 μl de mezcla de desoxinucleótidos GCT+A, 4 μl de dATP marcado con ³²P en el fosfato α (*GE-Healthcare Amersham Biosciences*) y 2 μl de retrotranscriptasa *SuperScript*™ II. La mezcla GCT+A es una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados deficiente en dATP (los dNTPs son suministrados por Roche) puesto que el faltante se añade en forma de dATP marcado (Tabla M.30). El volumen final de la reacción será de 30 μl .

4. La reacción de obtención del cDNA (y simultáneamente de marcaje) se lleva a cabo a 42 °C durante 1 hora.

5. A continuación se procede a la hidrólisis del molde de RNA, añadiendo para ello a la mezcla de reacción: 1 μl de SDS 1%, 1 μl de EDTA 0,5 M pH 8,0 y 3 μl de NaOH 3 M. Todo esto se calienta a 65 °C durante 30 minutos y luego se deja enfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos.

6. Seguidamente la mezcla anterior se neutraliza añadiendo: 10 μl de Tris-HCl 1M pH 8,0 y 3 μl de HCl 2 M.

7. Finalmente se procede a la precipitación del cDNA. Para ello se añaden: 5 μl de acetato sódico 3 M pH 5,3, 5 μl de tRNA 10 mg/ml y 60 μl de isopropanol. La precipitación se realiza durante 2 horas a -80 °C o bien durante una noche (12 a 16 horas) a -20 °C.

8. El cDNA precipitado se recupera centrifugando a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos.

9. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 10 μ l de agua bidestilada y se guarda a -20 °C si el cDNA no va a ser usado de forma inmediata. En el momento de la carga en el gel, al cDNA se añaden 4 μ l de tampón de carga o de solución de parada de las secuenciaciones, puesto que es coloreada y lleva glicerol en su composición lo que ayuda en la operación de cargado.

Tabla M.30. Composición de la mezcla de desoxinucleótidos GCT+A. La mezcla se realiza en agua tratada.

Compuesto	Cantidades
dGTP, dCTP, dTTP	16 mM
dATP	100 μ M

11.2.3. Obtención de cDNA total y cDNA específico de gen

Como resultado de este protocolo se puede obtener cDNA total que sería un reflejo del RNA mensajero existente en la célula. Esto se consigue gracias al uso del oligo-dT, un cebador formado por 12-18 desoxinucleótidos de timina (dT_s) que hibrida de forma específica con la cola poli-A característica del extremo 3' terminal de los RNA mensajero. Si en lugar del oligo-dT, se utiliza un cebador específico de un gen determinado que hibrida con el interior o final de su secuencia codificadora o con la zona de terminación de dicho gen, se puede obtener un cDNA perteneciente únicamente al gen deseado.

1. Se toman 40 μ g de RNA total y se tratan con DNasa *RQ-1*. Tras el tratamiento se suspende en 10 μ l de agua tratada.

2. Se toman 4 μ l de RNA total sin DNA y se le añaden: 500 ng de oligo-dT (suministrado por *Roche TIB-Mol*) o, en su lugar, 2 pmol de cebador específico de gen (suministrado por *Roche TIB-Mol*), según lo que se quiera conseguir, 1 μ l de dNTPs (*Roche*) y agua tratada hasta 13 μ l.

3. La mezcla calienta a 65 °C durante 5 minutos y se enfría rápidamente en hielo para desnaturalizar el RNA. Seguidamente se añaden 4 μ l de 5x *First Strand™* (en el Kit *Super Script™ II Reverse Transcriptase*) y 2 μ l de DTT 0,1 M (en el Kit *Super Script™ II Reverse Transcriptase*).

4. La mezcla anterior se incuba ahora a 42 °C durante 2 minutos, tras lo cual se le añade 1 μ l de retrotranscriptasa *Super Script™ II Reverse Transcriptase* y se continúa con la incubación a 42 °C durante 1 hora para que se produzca la reacción de retrotranscripción.

5. Al cumplirse la hora, la reacción se para calentándola a 70 °C durante 15 minutos y se guarda a -20 °C hasta su uso.

12. Electroforesis: separación y visualización de ácidos nucleicos

Para la separación y visualización de muestras de ácidos nucleicos se utiliza la técnica de la electroforesis. La electroforesis consiste en la creación de un campo eléctrico a través de un tampón salino, de manera que se

fuerza a las moléculas a ir hacia el polo que presente una carga opuesta a la suya. En este caso, los ácidos nucleicos presentan carga negativa con lo cual migrarán hacia el polo positivo. Si a la molécula en cuestión se le obliga además a atravesar una matriz porosa, el resultado es que se producirá una separación en función de los tamaños de la molécula, puesto que las moléculas más pequeñas migrarán más rápido al encontrar menor resistencia al paso entre la retícula formada por la matriz porosa.

12.1. Electroforesis en geles de agarosa

La agarosa es un polímero natural extraído a partir de algas que añadido al agua o tampones es insoluble formando una suspensión, pero que después de calentado por encima de una determinada temperatura (depende del tipo de agarosa) se disuelve totalmente pasando a convertirse en un fluido transparente. Si este fluido se deja enfriar lentamente, polimeriza y queda convertido en un sólido de aspecto gelatinoso, translúcido y uniforme, a través del cual se harán pasar los ácidos nucleicos. El tamaño de poro que deja la agarosa después de polimerizar depende de la cantidad añadida siguiendo una relación inversamente proporcional: a más concentración de agarosa, menor tamaño de poro y más resolución.

12.1.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

En el caso de los geles de agarosa, para visualizar el DNA una vez separado es necesario teñir o añadir al gel o a las muestras bromuro de etidio, una molécula plana que se intercala de forma estable entre la doble hebra del DNA. El procedimiento para la realización de los geles de agarosa para DNA es el siguiente: la agarosa en polvo es suspendida en tampón 1xTAE (Tabla M.31) y la mezcla se calienta en microondas hasta que la agarosa se funde y la mezcla quede transparente y fluida. Después de enfriar la mezcla brevemente en agua, se le añade unas gotas de una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml en agua) y se vierte todavía caliente en un molde donde se le coloca un peine que dará lugar a los pocillos del futuro gel. A continuación, se deja enfriar hasta que la agarosa polimerice y quede formado el gel. Una vez preparado el gel, éste se coloca en cubetas de electroforesis *Mini Sub® Cell GT* de *Biorad* llenándolas de tampón 1xTAE hasta que el gel quede cubierto por una capa fina del mismo. Seguidamente se cargan las muestras a las que previamente se les ha añadido 1/10 de tampón de carga 10x (Tabla M.32), que contiene glicerol, que por su densidad hace que las muestras se carguen con más facilidad al caer al fondo de los pocillos, y colorantes, que facilitan la visualización del avance de las muestras a través del gel. Seguidamente se tapa la cubeta y se inicia la electroforesis. El voltaje utilizado y el tiempo de migración son variables dependiendo del tamaño del gel y de la concentración de agarosa utilizada. Tras la electroforesis el gel es irradiado con luz ultravioleta de manera que el DNA se hace visible y la imagen puede ser recogida mediante el uso de un sistema adecuado de análisis de imagen.

Tabla M.31. Preparación del tampón 20xTAE modificado con baja concentración de EDTA. A partir de éste se prepara el 1xTAE en el que se realizan las electroforesis de DNA en geles de agarosa. El Tris y el EDTA se disuelven en unos 600 ml de agua y es en este momento cuando se añade el ácido acético, midiendo el pH en evolución, hasta que se alcance pH 8,0. Se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 1 litro
Tris	96,91 g
EDTA	0,744 g
Ácido acético	35 ml
Agua bidestilada	Hasta 1 litro

Tabla M.32. Preparación del tampón azul de carga 10x utilizado para facilitar la carga y visualizar el avance de muestras en geles de agarosa.

Compuesto	Cantidades para 5 ml
Glicerol	2 ml
Azul de bromofenol	1,5 mg
Xilencianol	1,5 mg
1xTE	3 ml

12.1.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

En el caso de los geles de agarosa utilizados para separar muestras de RNA no se utiliza bromuro de etidio, puesto que estos geles después son utilizados para transferir las muestras de RNA separadas a una membrana y realizar ensayos de *Northern* con posterioridad y el bromuro de etidio podría interferir en cualquiera de estos dos procesos. Además en estos geles se utiliza formaldehído, un compuesto desnaturalizante que ayuda a mantener el RNA desenredado y libre de bucles que forma de manera natural. Otra peculiaridad a tener en cuenta a la hora de hacer estos geles es el uso de material tratado con DEPC (dietilpirocarbonato), tanto en el agua, como en la preparación de las muestras y en las soluciones empleadas, lo que ayuda a inactivar las RNasas a lo largo de todo el proceso. El tampón en el que se hace el gel y que se utiliza para la realización de la electroforesis es el 1xMOPS, preparado a partir de una solución stock de 20xMOPS (tabla M.34) guardada a 4 °C. La agarosa (a una concentración final del 1,5%) se mezcla con el agua tratada y el MOPS (Tabla M.34) y se calienta todo en el microondas hasta que la solución sea homogénea y transparente. Entonces se deja enfriar en un baño a 65 °C. Cuando la mezcla alcance más o menos esa temperatura, se añade el formaldehído (Tabla M.33), se vierte en un molde y se coloca el peine. El gel se deja polimerizar durante una media hora en una campana extractora para absorber los vapores de formaldehído.

Tabla M.33. Preparación un gel de agarosa para la separación de RNA. La mezcla de agarosa, MOPS y agua tratada se calienta en microondas y luego se deja enfriar hasta 65 °C. Al alcanzar esa temperatura se añade el formaldehído y se procede a su vertido.

Compuesto	Cantidades para un gel de 100 ml
Agarosa	1,5 g
20xMOPS (tabla M.34)	5 ml
Agua tratada	78,4 ml
Formaldehído	16,6 ml

Tabla M.34. Preparación del tampón 20xMOPS. Este tampón se utiliza en la electroforesis para la separación de RNA y en la preparación de los geles de agarosa para RNA y en la preparación del tampón de muestra para disolución del RNA antes de la carga en el gel. El pH se debe ajustar a 7 con NaOH. No se esteriliza en autoclave. Se guarda en oscuridad y a 4 °C.

Compuesto	Cantidades para un litro
Ácido 3-(N-MOrfolino)-Propano-Sulfónico (MOPS)	33,72 g (0,2 M)
Acetato sódico	8,20 g (5 mM)
EDTA	7,44 g (1 mM)
Agua tratada	Hasta 1 litro

Mientras el gel va polimerizando se procesan las muestras de RNA que se van a cargar. La concentración del RNA extraído y que va a ser cargado debe de ser cuantificada ya sea al espectrofotómetro o en gel (véase el apartado correspondiente), si es que todavía no lo está. En el gel se cargará una cantidad fija de RNA para todas las muestras que oscilará entre 20 y 40 μg . Como los RNA extraídos están a distintas concentraciones, los 20-40 μg estarán en distintos volúmenes por lo que las distintas muestras serán llevadas a un volumen final de 10 μl con agua tratada. A las muestras se les añade entonces 20 μl de tampón de muestra (Tabla M.35) que contiene formamida desionizada y formaldehído, dos compuestos que mantienen al RNA desnaturalizado. A continuación, la mezcla es sometida a una desnaturalización a 65 °C durante 5 minutos con enfriamiento posterior en hielo. Finalmente, se le añade a las muestras 2-3 ml de buffer azul de carga (Tabla M.32) y se conserva todo en hielo hasta el momento de su carga en el gel.

Una vez polimerizado el gel se coloca en una cubeta de electroforesis refrigerada (para evitar la degradación térmica del RNA) *HE100 Super SubTM Horizontal Unit* de *Hofer* llena de tampón 1xMOPS (Tabla M.34) y se procede a cargar las muestras previamente preparadas.

Tabla M.35. Preparación del tampón de muestra para la carga y separación de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa. Se prepara de cada vez que se realiza la electroforesis.

Compuesto	Cantidades para un litro
Formamida desionizada (tabla M.36)	1,44 ml
Formaldehído comercial (37%)	576 μl
20xMOPS	225 μl
Agua tratada	160 μl

Tabla M.36. Preparación de la formamida desionizada para el tampón de muestra para la carga y separación de RNA mediante electroforesis en gel de agarosa. Ambos componentes se mezclan en un matraz de 100 ml en agitación durante una hora y después se guardan (sin separar) a 4 °C.

Compuesto	Cantidades para 50-75 ml
<i>Analytical grade mixed bed resin</i>	Unas perlas cubriendo el fondo
Formamida comercial	50-75 ml

12.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la separación de fragmentos pequeños de DNA se utilizan los geles de poliacrilamida. Los geles se realizan mezclando distintas proporciones de acrilamida y bisacrilamida, añadiendo o no algún compuesto desnaturante, dependiendo su adición y el tipo de compuesto desnaturante de la finalidad del gel. En el caso de geles para la visualización de fragmentos de DNA se utiliza la urea como agente desnaturante. La bisacrilamida es el componente que conecta entre sí las hebras lineales de acrilamida polimerizada, formando el tamiz. Así, la concentración relativa de bisacrilamida determina el tamaño de poro del gel y, por tanto, la mayor o menor resolución del mismo.

El gel de acrilamida utilizado se encuentra a una concentración del 7% (Tabla M.38) y para su preparación se parte de un preparado concentrado de acrilamida/bisacrilamida al 45% (Tabla M.39) junto con el tampón 10xTBE (tabla M.40), urea y agua. El gel de acrilamida/bisacrilamida al 7% es mantenido a 4 °C. Para la formación del polímero (Tabla M.37) se le añade TEMED (N, N, N, N – TetraMetilEtilenDiamina) un iniciador de la reacción de polimerización, y APS (persulfato amónico), a una concentración de 10 mg/ml, un agente catalizador que acelera la formación de la trama de enlaces acrilamida/bisacrilamida.

Tabla M.37. Preparación de la mezcla de polimerización del gel desnaturante de acrilamida/bisacrilamida al 7% para visualización de fragmentos de DNA. El APS se prepara de nuevo para cada gel.

Compuesto	Cantidades para un gel
Gel de acrilamida/bisacrilamida al 7% (tabla M.38)	90 ml
TEMED	90 µl
APS 10 mg/ml	270-290 µl

Tabla M.38. Preparación del gel desnaturante de acrilamida/bisacrilamida al 7% para la visualización de fragmentos de DNA. Para poder disolver la urea completamente es necesario calentar la preparación de forma moderada mientras se mantiene en agitación. Una vez realizada la mezcla se mantiene en una botella oscura a 4 °C.

Compuesto	Cantidades para 700 ml
Mezcla bisacrilamida/acrilamida al 45% (tabla M.39)	109 ml
10xTBE (tabla M.40)	70 ml
Urea	249 g
Agua bidestilada	Hasta 700 ml

Tabla M.39. Preparación de la mezcla de la mezcla de acrilamida/bisacrilamida al 45%. Mezclar por agitación.

Compuesto	Cantidades para 500 ml
Acrilamida	217 g
Bisacrilamida	7,5 g
Agua bidestilada	Hasta 500 ml

Tabla M.40. Preparación del tampón 10xTBE. Este tampón se usa en la preparación del gel de acrilamida y, disuelto a 1xTBE, como medio en el que se realiza la electroforesis.

Compuesto	Cantidades para 250 ml
Tris	27 g
Ácido bórico	13,75 g
EDTA	3,7 g
Agua bidestilada	Hasta 250 ml

Para ralentizar la reacción de polimerización del gel de acrilamida, la mezcla con el TEMED y el APS se realiza en un recipiente mantenido en hielo. A continuación, la mezcla se va inyectando, ayudándose de una jeringuilla, en el hueco dejado por dos cristales entre los cuales se formará el gel. Los cristales deben estar silinizados, es decir, impregnados con una mezcla de cianin-xilol diluido en cloroformo. El objetivo de este tratamiento es facilitar el vertido del gel sin formación de burbujas y evitar que el gel se quede pegado al vidrio cuando se quiera retirar después de la electroforesis. A partir de este momento los cristales tienen orientación, puesto que para el vertido correcto del gel de acrilamida las caras tratadas deben ir hacia el interior. Para el montaje de los cristales se coloca el más grande horizontalmente con la cara tratada hacia arriba y en sus bodes mayores, que serán los que luego queden en vertical en el dispositivo de electroforesis, se colocan unas tiras plásticas denominadas separadores, que son los responsables de dejar el hueco entre los cristales y definen el grosor del gel de acrilamida. Los separadores irán impregnados en vaselina que ayudará a contener el gel en el hueco de los cristales, puesto que repele las soluciones acuosas. Sobre los separadores y el cristal mayor se coloca el cristal menor (con la cara tratada hacia abajo), alineando los bordes de los cristales excepto por uno de los lados pequeños, en el que el cristal mayor sobresaldrá sobre el menor donde se añadirá el gel de acrilamida y se colocará apoyado el peine. A continuación se sellan todos los bordes de los cristales excepto aquel por donde se añade el gel de acrilamida.

Después del vertido del gel, se coloca un peine apoyado en el cristal mayor y se deja polimerizar la acrilamida por espacio de unas horas a una noche (la velocidad de polimerización depende de la temperatura del ambiente que rodea al gel y de la cantidad de APS añadido en su preparación).

Una vez el gel está polimerizado se les quita el sello a los bordes de los cristales y se procede a colocar todo el montaje en el dispositivo de electroforesis vertical con el peine en la parte superior (puesto que las muestras circularan de arriba abajo). En los depósitos superior e inferior del dispositivo de electroforesis se añade 1xTBE (preparado a partir de 10xTBE) y se retira el peine del gel. Se limpian los pocillos, ayudándose de una pipeta *pasteur*, de restos de urea precipitada y se procede a un precalentamiento del gel durante aproximadamente 30 minutos, aplicando al gel la misma diferencia de potencial que la que se utilizará posteriormente en la electroforesis. Después se desconecta la fuente de alimentación y se limpian de nuevo los pocillos de restos de urea acumulados. A continuación se cargan las muestras, que deben de haber sido previamente

desnaturalizadas, y se inicia la electroforesis en sí. El campo eléctrico aplicado, tanto en el precalentamiento como en la electroforesis, tiene una diferencia de potencial de 1.500 V.

13. Secuenciación

13.1. Secuenciación manual

Antes de empezar con el protocolo en sí de secuenciación manual hay que desnaturalizar el DNA plasmídico si éste es de doble hebra.

1. Se toman de 2 a 3 μg de DNA plasmídico y se completa con agua bidestilada hasta 10 μl . A continuación se añade 1,1 ml de una solución de NaOH 2 M y EDTA 2 mM (en 2 ml de agua se diluye una lenteja de NaOH y se añade 4 μl de EDTA 0,5 M).
2. Incubar 30 minutos a 37 °C.
3. Precipitación: se añaden 1,2 μl de acetato sódico 3 M y 30 μl de etanol 95%. Se mantiene a -80 °C durante 15 minutos y se centrifuga a 15.000 r.p.m. durante 30 minutos.
4. Lavar con etanol 70% (añadir 1 ml y centrifugar 5 minutos a 15.000 r.p.m. en frío). Secar el precipitado y conservar así hasta la siguiente fase.

Para la secuenciación se ha utilizado el kit de *USB, Sequenase™ version 2.0 DNA sequencing kit*. Este kit se basa en el método de secuenciación de los didesoxinucleótidos desarrollado por el ya premio Nobel Frederick Sanger y sus colaboradores (Sanger *et al.*, 1977), lo que le valió el segundo premio Nobel de su carrera en el año 1980. Los didesoxinucleótidos son moléculas análogas a los nucleótidos a los que se les ha sustituido el grupo hidroxilo (-OH) del carbono 3' de la desoxirribosa por un hidrógeno (-H). Debido a que es por el 3'-OH de la desoxirribosa por donde se une el siguiente nucleótido a la cadena naciente de DNA, cuando la polimerasa (en este caso, llamada *Sequenase™*) integra uno de los didesoxinucleótidos, al carecer del grupo 3'-OH, se para la extensión de la cadena.

5. El DNA plasmídico seco y desnaturalizado en el paso anterior se resuspende en 7 μl de agua bidestilada. Se añaden 2 μl de tampón de reacción y 1 μl de cebador a 1 pmol/ml.
6. La mezcla se incuba 2 minutos a 65 °C y luego se deja enfriar a 30 °C durante 15-30 minutos.
7. Mientras se preparan cuatro tubos donde se pondrá en cada uno una mezcla que contiene, además de los todos los nucleótidos trifosfato necesarios para la extensión, didesoxinucleótidos trifosfatados (ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP) en una pequeña proporción. Al añadir un análogo didesoxi en cada tubo, la extensión de la molécula de DNA se parará en cada tubo a la altura de un didesoxinucleótido de G, A, T ó C, permitiéndonos leer la secuencia en un gel de acrilamida posterior. Tanto los nucleótidos como los didesoxinucleótidos deben estar trifosfatados puesto

que la polimerasa extrae la energía necesaria para la incorporación de los mismos rompiendo el enlace entre el fosfato más cercano al nucleósido y los dos siguientes.

8. Se preparan diluciones 1:5 de *labeling mix* ó mezcla de marcaje y 1:8 de *Sequenasa™* (*T7 DNA-polimerasa I* genéticamente modificada). Ambas diluciones se mantendrán en hielo.

9. Después de estar a 30 °C se añade al tubo de reacción: 1 µl de DTT (ditiotreitól) 0,1 M, 2 µl de dilución de *labeling mix*, 0,5 µl de α [³²P]-dATP suministrado por *GE-Healthcare Amersham Biosciences*) y 2 µl de dilución de *Sequenase™*.

10. La mezcla anterior se mantiene a temperatura ambiente durante 5 minutos mientras se preincuban a 37 °C los tubos que contienen los didesoxinucleótidos trifosfatados.

11. Se añaden 3,5 ml de la mezcla de reacción a cada uno cuatro tubos que contienen los didesoxinucleótidos trifosfatados y se espera a que se produzca la reacción de extensión no más de 5 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo la reacción se para con 4 ml de solución de parada (proporcionada en el kit) y la secuenciación se congela (-20 °C) hasta su visualización (no más de unos días) en un gel de acrilamida desnaturalizante con urea. En el gel una secuenciación se carga en cuatro carriles. En cada carril se carga la reacción de secuenciación terminada con un didesoxinucleótido distinto, de modo que los nucleótidos con G, A, T y C de la secuencia se leen en los cuatro carriles de abajo a arriba según la polimerasa fue generando productos intermedios de la amplificación del DNA molde diana interrumpidos con los didesoxinucleótidos.

13.2. Secuenciación automática

La secuenciación automática ha sido realizada por la empresa *Sistemas Genómicos* (www.sistemasgenomicos.com). Este método es similar al anterior salvo que los didesoxinucleótidos están marcados cada uno con un fluorocromo de un color distinto. De este modo se pueden mezclar los cuatro didesoxinucleótidos en un mismo tubo de reacción de manera que cada reacción de secuenciación se carga en un solo carril de gel y los distintos fragmentos/bandas a los que dan lugar las paradas en los distintos didesoxinucleótidos, y por tanto las secuencias, se pueden leer gracias al distinto color en que éstos emiten fluorescencia.

14. Transferencia Northern

La técnica de la transferencia *Northern* ó *Northern blotting* fue desarrollada por Alwine y colaboradores (1977) y consiste en una transferencia de fragmentos de RNA desde un gel de electroforesis a una membrana o *blot*. Tras la transferencia, el RNA es inmovilizado sobre la membrana de manera que ésta portará una reproducción semipermanente del gel. Después de la inmovilización, el RNA contenido en la membrana puede ser sometido a hibridación con una sonda de DNA marcada que hibridará únicamente con el RNA de la membrana que presente una

secuencia complementaria, dando lugar así a una determinada banda. La intensidad relativa de la banda frente a un control de carga será proporcional a la cantidad de RNA que la genera, de modo que podemos determinar los niveles de expresión (cantidad de RNA generado) de un determinado gen en diferentes condiciones de cultivo y cepas celulares, lo que nos proporciona información acerca de su comportamiento y su regulación. El control de carga normalmente viene dado por la intensidad de la banda generada por la hibridación con una sonda de un gen constitutivo cuyos niveles de expresión no varían, en nuestro caso será el gen *SNR17A* de *S. cerevisiae* que da lugar al RNA pequeño nuclear 17A (también llamado *ScU3*).

14.1. Transferencia a membrana de RNA separado en gel de agarosa mediante electroforesis

Para la transferencia se han utilizado membranas de nailon (*Roche*) debido a su resistencia a la ruptura, a la gran capacidad para unir RNA y a que permiten ser hibridadas en repetidas ocasiones con más de una sonda. Estas membranas de nailon, de tamaño de poro de 0,45 μm , están cargadas positivamente y atraen y unen al RNA en el momento de la transferencia mediante una interacción electrostática debido a su diferente carga (el RNA tiene carga negativa). Sin embargo, esta interacción es débil y pasajera y, debido a ello, tras la transferencia a la membrana, el RNA debe ser inmovilizado mediante la generación de enlaces covalentes entre él y la membrana, lo que se consigue por exposición de la membrana a luz ultravioleta. Otra cuestión a resaltar es que utilizando un tampón de transferencia con un alto contenido en sales se promueve la unión del RNA a la membrana. El tampón usado para transferencia de RNA a membranas de nailon es el SSC (Tabla M.41), compuesto de cloruro sódico y citrato sódico.

Antes de empezar se corta un trozo de membrana de nailon de tamaño similar al del gel de electroforesis en el que se separa el RNA y, tras un lavado con agua tratada, se impregna durante 10 minutos en una solución de tampón 10xSSC (Tabla M.41). Seguidamente la membrana se coloca en el dispositivo de transferencia *VacuGene XL*TM de *Pharmacia* y sobre ella se dispone el gel de agarosa con el RNA separado tras la electroforesis. El RNA se transfiere a la membrana utilizando una solución de 10xSSC a una presión de vacío de 50 a 60 mBa durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se retira el gel (comprobándose, tras una breve tinción con bromuro de etidio, que todo el RNA ha sido transferido) y el RNA se fija a la membrana con luz ultravioleta, aplicando mediante el dispositivo *UV Cross Linker 500* de *Hofer*, una energía de 120 mJ/cm^2 durante 2 minutos. Finalmente se etiqueta la membrana, se sella en una bolsa de plástico y se conserva a 4 °C hasta la hibridación.

Tabla M.41. Preparación del tampón 20xSSC. Tras su preparación se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 1 litro
NaCl	175,32 g (3 M)
Citrato sódico	88,23 g (0,3 M)
Agua tratada	800 ml
HCl	Hasta ajustar el pH a 7
Agua tratada	Hasta 1 litro

14.2. Marcaje de sondas

El DNA obtenido a partir de PCR o por digestión a partir de un vector, es cargado en un gel de agarosa para su separación por electroforesis y posterior visualización. Tras la electroforesis el DNA es recuperado, purificado y concentrado siguiendo el método ya descrito en un apartado anterior. Este DNA se marca mediante el método de *random primed* o cebado aleatorio (Feinberg y Vogelstein, 1983) utilizando los reactivos suministrados en el kit *Prime-a-Gene™ Labeling System (Promega)* y siguiendo las instrucciones de uso.

1. Se toman entre 30 ng y 3 µg de DNA en 14µl de agua y se desnaturalizan a 95 °C, tras lo cual se enfrían rápidamente en hielo.
2. Seguidamente al DNA desnaturalizado se le añaden: 7 µl de mezcla de marcaje (Tabla M.42), 3 µl de $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (suministrado por *GE-Healthcare Amersham Biosciences*), 1 µl del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli* (en el kit) y se completa con agua hasta 25 µl.
3. La mezcla se incuba a 37 °C durante 1 hora para que la polimerasa incorpore dATP marcado a la sonda.
4. La sonda ahora se puede guardar hasta su uso a -20 °C (no por tiempo prolongado) o se puede preparar para su uso. Para ello, se desnaturaliza a 95 °C y se enfría rápidamente en hielo justo antes de ponerla a hibridar con la membrana.

Tabla M.42. Preparación de la mezcla de marcaje o *labeling mix* para el marcaje de sondas radiactivas y su uso en hibridaciones *Northern*. El tampón de marcaje contiene: Tris-HCl 250 mM pH 8,0, MgCl₂ 25 mM, DTT 10 mM, HEPES 1M pH 6,6 y 26 unidades de absorbancia a 260 nm en 1 ml de hexadesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria que hibridan en varios puntos de la sonda proporcionando un cebado para la polimerasa.

Compuesto	Cantidades para 700 µl
Tampón de marcaje 5x (en el kit)	300µl
dCTP (1,5 mM) (en el kit)	20µl
dGTP (1,5 mM) (en el kit)	20µl
dTTP (1,5 mM) (en el kit)	20µl
BSA (10 mg/ml) (en el kit)	60 µl

14.3. Prehibridación, hibridación, lavado y exposición

14.3.1. Prehibridación

Las membranas son introducidas en botellas de hibridación (normalmente una por botella) y se les añaden 10 ml de solución de (pre)hibridación (Tabla M.43). A continuación, se introducen en un horno de hibridación *Hybridization oven Model 1004* de *SHEL-LAB™* y se mantienen girando a una temperatura variable, dependiendo de la longitud y de la exactitud de la sonda, durante 1 hora con el fin de eliminar posibles uniones inespecíficas durante la posterior hibridación. La prehibridación no es necesaria después de la primera hibridación de la membrana.

Tabla M.43. Preparación de la solución de (pre)hibridación para *Northern* (Church y Gilbert, 1984). Esta solución no se esteriliza. Preparación del tampón fosfato 1 M pH 7,2: se pesan 45,44 g de Na_2HPO_4 y se disuelven en 300 ml de agua tratada; se pesan 12 g de NaH_2PO_4 y se disuelven en 100 ml de agua tratada; se pone la primera solución en agitación en el pH-metro y se ajusta su pH a 7,2 añadiendo poco a poco la segunda. La solución así preparada se esteriliza en autoclave.

Compuesto	Cantidades para 500 ml
Tampón fosfato 1 M pH 7,2	250 ml
SDS 20%	175 ml
EDTA 0,5 M	1 ml
Agua tratada	Hasta 500 ml

14.3.2. Hibridación

Tras la prehibridación, se renueva la solución de hibridación, poniendo de nuevo 10 ml, a la que se añade la sonda marcada y desnaturalizada, teniendo la precaución de que no toque la membrana antes de que se diluya en la solución de hibridación. La hibridación se realiza durante una noche a la misma temperatura a la que se hizo la prehibridación y que depende de la longitud y de la exactitud de la sonda.

14.3.3. Lavado

Tras la hibridación se elimina la sonda no unida mediante una serie de lavados con 20 ml de una solución de lavado (Tabla M.44). Por lo general, se realiza un primer lavado de 10 minutos a la temperatura de hibridación seguido de otro lavado de 10 minutos a temperatura ambiente, aunque el número y duración de los lavados se puede variar dependiendo del grado de emisión de las membranas.

Tabla M.44. Preparación de la solución de lavado para hibridaciones *Northern*. Esta solución no se esteriliza.

Compuesto	Cantidades para 1 litro
20xSSC	100 ml (2xSSC)
SDS 20%	5 ml (0,1%)
Agua tratada	Hasta 1 litro

14.3.4. Exposición y cuantificación

Después de retirar la solución de lavado, las membranas radiactivas se introducen en una bolsa de plástico para poder exponerlas a las pantallas del sistema de detección para su análisis posterior. El tiempo de exposición depende de la intensidad de emisión del α [³²P]-dATP empleado (hay que tener en cuenta que la vida media del ³²P es de 15 días) y de la capacidad de expresión del gen: un gen que se exprese de forma importante y cuya sonda ha sido marcada con un α [³²P]-dATP fresco necesitará menor tiempo de exposición que otro gen que se expresa menos utilizando el mismo α [³²P]-dATP o que el mismo gen con un α [³²P]-dATP con su vida media ya agotada. Para analizar las señales radiactivas de hibridación sobre la membrana de nailon se utiliza el escáner *PhosphorImager SITM Scanning Instrument 425* de *Molecular Dynamics*. Las señales obtenidas se cuantifican y los valores del gen a estudio se normalizan respecto a los valores obtenidos del control de carga (en nuestro caso el *U3* de *S. Cerevisiae*, secuencia *SNR17A* que genera el RNA pequeño nuclear 17A).

Tras la exposición, las membranas ya hibridadas con una determinada sonda se lavan con la solución de lavado (Tabla M.44) durante 2-3 horas a 80 °C para proceder a una nueva hibridación con una sonda distinta.

15. Determinación de los niveles de expresión de genes de *K. lactis* mediante *arrays* de DNA

Las sondas de DNA se prepararon a partir de DNA genómico de la cepa NRRL-Y1140 mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada gen. Una vez verificados y purificados, los productos de PCR fueron cuantificados mediante espectrofotometría y se inmovilizaron 600 ng de cada uno sobre membranas de nailon cargadas positivamente. La obtención de cDNA a partir de los mRNA obtenidos en distintas condiciones de cultivo ya se ha descrito en el apartado 11.2.3.

Las membranas fueron prehibridadas una hora a 65 °C en la solución de hibridación (Tabla M.45). La sonda (cDNA) fue desnaturalizada a 100 °C durante 5 minutos, enfriada rápidamente e hibridada durante toda una noche a 65 °C. Al día siguiente se retiró la sonda y se hicieron dos lavados a 65 °C, de 5 y 20 minutos respectivamente, con la solución de lavado (tabla M.46). Las membranas se expusieron durante 24 horas en una pantalla de fósforo y la toma de datos y cuantificación se llevó a cabo con un *PhosphorImager SITM Scanning Instrument 425* de *Molecular Dynamics*. Para la cuantificación de las señales se utilizó software de *Array Vision* (*Molecular Dynamics*).

Tabla M.45. Solución de hibridación para *arrays*. Se debe ajustar su pH a 7.

Compuesto	Cantidades
NaCl	750 mM
Acetato sódico	75 mM
BSA	0,1%
Ficol	0,1%
Polivinilpirrolidona	0,1%
SDS	0,5%
Agua bidestilada	Hasta completar volumen final

Tabla M.46. Solución de lavado para *arrays*. Se debe ajustar su pH a 7.

Compuesto	Cantidades
NaCl	300 mM
Acetato sódico	30 mM
SDS	0,1%
Agua bidestilada	Hasta completar el volumen final

16. Actividades enzimáticas

16.1. Medida de actividad β -galactosidasa

La β -galactosidasa es una enzima que hidroliza de forma natural el enlace β (1 \rightarrow 4) de la lactosa, un disacárido compuesto por galactosa y glucosa. Esta enzima también es capaz de utilizar como sustrato moléculas artificiales que contienen enlaces similares (como es el caso del X-Gal ya comentado), de modo que tras su ruptura se genera un producto coloreado. En función de la intensidad del color obtenido se puede medir la cantidad de producto generado y, de manera indirecta, la actividad β -galactosidasa. Por ello, el gen *lacZ*, que codifica la β -galactosidasa de *E. coli*, es utilizado como gen informador en un gran número de vectores. En el presente trabajo se han utilizado el vector pXW1 de la serie pXW específicamente diseñados por el Dr. X. J. Chen para *K. lactis* (Figura M.4). Un gen informador es aquel que, como su propio nombre indica, es capaz de aportar información acerca de la expresión de otro gen. Esto se consigue mediante la colocación de la región 5' no traducida del gen a estudio, ya sea tal cual o con mutaciones, o fragmentos de la misma, delante de la secuencia codificadora del gen informador, en este caso el gen *lacZ*. Las construcciones son entonces introducidas mediante transformación (ver apartado correspondiente) en una cepa celular mutada para que no genere β -galactosidasa endógena (en nuestro caso se ha utilizado la cepa de *K. lactis* MW190-9B) que pueda distorsionar los resultados. Las células transformadas pueden ser cultivadas en distintos tipos de medios y condiciones de cultivo para averiguar si la expresión del gen a estudio se ve afectada por algún tipo de factor ambiental. Tras realizar los cultivos, se puede determinar la actividad β -galactosidasa generada, la cual será un reflejo de la cantidad de β -galactosidasa producida por el gen *lacZ* y esto, a su vez, será un reflejo de la capacidad de generar expresión que tienen las distintas construcciones de la región 5' del gen a estudio en cada caso.

La medida de la actividad β -galactosidasa se realizó midiendo el color (amarillo) que se genera cuando la β -galactosidasa hidroliza un sustrato sintético incoloro llamado ONPG (O-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido). Esta medida se realizó a partir de cultivos líquidos llevados a cabo en condiciones de aerobiosis e hipoxia, bien permeabilizando las células para permitir la salida de la proteína al medio, bien extrayendo y purificando la proteína. Tras iniciar la reacción añadiendo el ONPG a los cultivos permeabilizados o a los extractos de proteína y después de transcurrir un tiempo determinado (que se toma, ya que es fundamental para los cálculos posteriores), la reacción es detenida mediante la adición de carbonato sódico que inhibe a la β -galactosidasa. La intensidad de color obtenida es medida de manera cuantitativa en un espectrofotómetro a través de la absorbancia que presenta la muestra a una longitud de onda de 420 nm. Es importante resaltar que la absorbancia obtenida depende de forma directa de la intensidad de la coloración que presenta la muestra, pero ésta no tiene porque ser un reflejo de la actividad β -galactosidasa, puesto que la actividad β -galactosidasa depende además de la densidad celular del cultivo (densidad óptica medida en unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm), del volumen de cultivo utilizado para el ensayo y del tiempo que se ha dejado actuar la β -galactosidasa.

El protocolo utilizado para la medida de la actividad β -galactosidasa en permeabilizados celulares (Rose *et al.*, 1990) es en esencia el que se presenta a continuación:

1. Se toman 10 ml de un cultivo celular a una densidad óptica de 0,6-0,8 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm y se recogen las células mediante centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos.
2. Las células son resuspendidas en 1 ml de tampón Z (Tabla M.45) y se recogen de nuevo mediante centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Ahora las células se resuspenden en 2 ml de tampón Z y se les añaden 110 μ l de cloroformo y 175 μ l de SDS al 0,1%, tras lo cual son sometidas a agitación fuerte en *vortex* durante unos 15 segundos.
4. La mezcla anterior se pone a preincubar en agitación en un baño de agua a 30 °C (temperatura óptima para la β -galactosidasa) durante 5 minutos.
5. A continuación se añaden 440 μ l de una solución de ONPG 4 mg/ml en tampón Z y se toma el tiempo inicial en el cual ha sido añadido.
6. Cuando la reacción empiece a virar de color a amarillo, se toma 1 ml de la misma y se para en un tubo con 500 μ l de Na₂CO₃ 1 M y se toma el tiempo de reacción transcurrido hasta ese momento.
7. A continuación se espera el mismo tiempo del paso anterior (el que ha transcurrido desde el tiempo inicial hasta la retirada de la primera muestra) y se retira una segunda muestra siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado en el paso anterior: retirada de 1 ml de reacción y parada de la misma en un tubo con 500 μ l de Na₂CO₃.

8. Las muestras obtenidas se centrifugan a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar todos los restos celulares. Se recoge 1 ml del sobrenadante que se deposita en una cubeta para la medición del color en un espectrofotómetro.

La fórmula aplicada para la obtención de la actividad β -galactosidasa además de la intensidad de color (A_{420} es la absorbancia del O-nitrofenol presente en las muestras medida a una longitud de onda de 420 nm), tiene en cuenta el factor tiempo (t es el tiempo utilizado en la toma de las muestras dado en minutos), la concentración de células en el cultivo de partida (a través de su densidad óptica medida como unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, A_{600}) y el volumen del mismo utilizado en ml (V). Las unidades en que se presenta la actividad β -galactosidasa son las unidades Miller.

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{A_{420}}{t \times A_{600} \times V} \times 1.000$$

En el caso de la utilización de proteína total para la medida de la actividad β -galactosidasa en los mismos, antes es necesario la obtención de los extractos proteicos (Rose *et al.*, 1990). Para ello se sigue el siguiente protocolo:

1. Las células de un cultivo de 10 ml son recuperadas por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante.

2. Ahora las células se resuspenden en 1 ml de tampón Z (tabla M.45) y de nuevo se recuperan por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 5 minutos, descartando el sobrenadante.

3. Las células se resuspenden en 250 μ l de tampón Z y se añaden aproximadamente 0,5 gramos de *glass beads* de 0,4 μ m de diámetro (*Sigma-Aldrich*).

4. Se dan tres pulsos de *vortex* de 30 segundos cada uno con 30 segundos de enfriado de la muestra en hielo entre pulso y pulso.

5. Se recoge el fluido y se pasa a un tubo limpio. El tubo con las *glass beads* se lava por adición de 750 μ l de tampón Z y el fluido resultante se pasa al mismo tubo limpio anterior. El tubo con las *glass beads* se descarta y se guarda el tubo con el fluido que contiene la proteína y los restos celulares para ser utilizado en el siguiente paso.

6. El tubo anterior se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares y las *glass beads* que hayan podido ser transferidas al mismo en el paso anterior.

7. El sobrenadante, que es el extracto proteico crudo, se pasa a un tubo limpio y se mantiene en hielo hasta su uso en un corto periodo de tiempo, puesto que tiene una vida limitada.

Antes de proceder a la medida de la actividad β -galactosidasa es necesario conocer la concentración del extracto proteico obtenido. Para ello se realiza un patrón utilizando una serie de disoluciones de la proteína BSA

(seroalbúmina bovina) con cantidades conocidas de la misma, midiendo la absorbancia que presentan a una longitud de onda de 595 nm, tras hacerlas reaccionar con el reactivo de Bradford (*Biorad*) durante 5-10 minutos. En función de la absorbancia que presente, a la misma longitud de onda, una disolución del extracto proteico que se ha hecho reaccionar del mismo modo con reactivo de Bradford, es posible calcular su concentración.

El extracto se utiliza para la medida de la actividad β -galactosidasa del siguiente modo:

1. Se toma una cantidad determinada de extracto proteico en función de su concentración y llevar a 1 ml con tampón Z.
2. Se añaden 400 μ l de ONPG a una concentración de 4 mg/ml diluido en tampón Z y la muestra se hace reaccionar en un baño a 30 °C. Se anota el tiempo que tarda en cambiar de color de forma perceptible, momento en el cual se retira 1 ml de la muestra y para detener la reacción por adición a un tubo que contiene 500 μ l de Na₂CO₃ 1 M.
3. Seguidamente se mide la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 420 nm.

La fórmula aplicada en este caso para la obtención de la actividad β -galactosidasa además de la intensidad de color (A_{420} es la absorbancia del O-nitrofenol presente en las muestras a una longitud de onda de 420 nm), tiene en cuenta el factor tiempo (t es el tiempo utilizado en la toma de las muestras dado en minutos), el volumen final de reacción (V_r) en ml (después de añadir todos los componentes de la reacción, incluido el Na₂CO₃), la concentración del extracto proteico (C) expresada en mg/ml de proteína y el volumen de extracto utilizado (V_e) expresado en ml. El factor 0,0045 es la absorbancia de una solución de o-nitrofenol de 1 nmol/ml. La actividad β -galactosidasa viene dada en nmoles de o-nitrofenol generados por minuto y ml (nmol/min x ml).

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{A_{420} \times V_r}{0,0045 \times C \times V_e \times t}$$

Tabla M.47. Preparación del tampón Z. El pH se ajusta a 7. No esterilizar.

Compuesto	Cantidades para 500 ml
Na ₂ HPO ₄ (•7H ₂ O)	4,26 g (8,05 g)
NaH ₂ PO ₄ (•7H ₂ O)	2,39 g (2,75 g)
KCl	0,375 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,123 g

16.2. Medida de actividad coproporfirinógeno oxidasa

El ensayo fluorimétrico acoplado, que se describe a continuación, fue desarrollado por Pierre Labbe y colaboradores (Labbe *et al.*, 1985) y ha podido llevarse a cabo gracias a la colaboración del Dr. J. M. Camadro.

Las células de las cepas de *K. lactis* mutante $\Delta hem13::kanMX4$ y su isogénica salvaje para *KIHEM13* ($CBS\Delta Ku80\Delta Kihem13$ y $CBS\Delta Ku80$) fueron cultivadas en medio rico (YPD) modificado con un contenido extra de adenina (a una concentración final de 100 mg/l de medio) y metionina (a una concentración final de 2 g/l de medio) y con suplemento de hemina (como se describe en un apartado anterior) hasta alcanzar una densidad óptica de 2 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

Seguidamente las células se lavaron para eliminar los restos de hemina y se procedió a su ruptura con *glass beads* (0,4 mm de diámetro, *Sigma-Aldrich*) en un tampón fosfato potásico 0,1 M a un pH de 7,2. A continuación la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 3.000 x g para eliminar las células que no habían sido rotas. El sobrenadante resultado de este paso se denominó como “homogenado”.

Una alícuota del homogenado anterior se centrifuga de nuevo a 45.000 x g durante 30 minutos para sedimentar los orgánulos y las membranas mitocondriales. El sobrenadante resultado de este paso es lo que se denominó como “fracción soluble”.

Las actividades fueron medidas en un espectrofluorímetro *Photon Technology International* en cubetas de 1 ml de diámetro, a 30 °C y en tampón fosfato potásico 0,1 M a pH 7,2 saturado con aire, *Tween 80* 1%, EDTA 1 mM, DTT 6 mM y coproporfirinógeno recién preparado. La enzima acoplada utilizada fue *protoporfirinógeno oxidasa* de *S. cerevisiae* altamente purificada (5-7 U/ml). La longitud de onda de excitación fue de 410 nm y la longitud de onda de emisión fue de 632 nm.

17. Soporte informático

Oligo. Se trata de la solución informática, diseñada por *Molecular Biology Insights Inc.*, utilizada para el diseño de los cebadores de este trabajo.

pDRAW32. Esta es la aplicación desarrollada por *AcaClone Software* y utilizada para dibujar los vectores que se muestran en este trabajo.

Array Vision. Aplicación para el tratamiento de datos procedentes de *arrays* desarrollada por *Molecular Dynamics*.

Adobe® Reader, *Adobe® Acrobat® Professional* y *Adobe® Photoshop®*. Aplicaciones de *Adobe Systems Incorporated* utilizadas para el tratamiento del texto y las imágenes del presente trabajo.

Bases de datos En el presente trabajo se han utilizado las siguientes bases de datos: *NCBI-Entrez-PubMed* (www.pubmed.gov), *EBI-EMBL* (www.ebi.ac.uk/), *KEGG encyclopedia* (www.genome.jp/kegg/), *Genolevures* (cbl.labri.fr/Genolevures/), *Saccharomyces Genome Database*

(www.yeastgenome.org/), *Vector DB* (seq.yeastgenome.org/vectordb/) y *PDB* (<http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>).

Aplicaciones en línea. En este trabajo se han utilizado los recursos informáticos alojados en los siguientes sitios de la red: *NCBI-BLAST* (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), *EBI-Tools* (www.ebi.ac.uk/Tools/), *ExpPASy* (www.expasy.org), *RSA-Tools* (rsat.scmdbb.ulb.ac.be/rsat/), *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y *LALING* (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html). La aplicación *BLAST*, *Basic Local Alignment Search Tool*, ha sido desarrollada por Altschul y colaboradores (1990). La aplicación *ClustalW* ha sido desarrollada por Higgins y colaboradores (1994). La aplicación *PSIPRED* ha sido desarrollada por Jones (1999) y puesta en marcha por McGuffin y colaboradores (2000). *LALING* ha sido desarrollado por William Pearson basado en el trabajo de Huang y Miller (1991).

RESULTADOS

1. Clonación y caracterización del gen *KIHEM13* de *Kluyveromyces lactis*

1.1. Aislamiento del gen *KIHEM13*

En primer lugar se verificó mediante PCR la presencia del clon deseado en una serie de genotecas de *Kluyveromyces lactis* disponibles en el laboratorio, utilizando para ello cebadores basados en regiones conservadas del gen en varios organismos (González-Domínguez *et al.*, 2000). Los resultados que se muestran en la figura R.1 indicaron que la más idónea era la genoteca construida en el vector pAB24. Esta genoteca fue construida por Anthony Brake a partir de DNA genómico de la cepa NRRL-Y1140 mediante inserción de fragmentos de DNA de *K. lactis* generados por la digestión con la endonucleasa de restricción *Sau3A* en el sitio *Bam*HI del vector pAB24. Nos fue amablemente cedida por el Dr. Robert Dickson (Departamento de Bioquímica de la Universidad de Kentucky) y por Jeffrey R. Shuster (de la empresa *Chiron Corporation*).

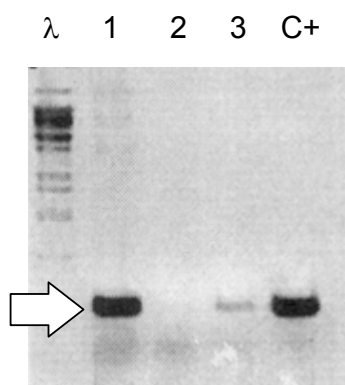


Figura R1. Análisis de tres genotecas genómicas de *K. lactis* para el gen *KIHEM13*. 1: genoteca en pAB24, 2: genoteca en KEp6, 3: genoteca en pSK1, C+: un control positivo en el que se utiliza como molde para la PCR, DNA genómico de *K. lactis* (cepa NRRL-Y1140). λ: marcador de tamaños moleculares *Bst*EII Lambda.

Se procedió a la amplificación de la genoteca seleccionada mediante electroporación de bacterias (línea DH10B de *E. coli*), para obtener un número de colonias suficiente como para que todos los clones (y por tanto todo el genoma de *K. lactis*) estuviesen representados, lo que supone el análisis de 30.000 transformantes si se quiere una redundancia aproximada de cinco veces por cada clon.

A continuación se procedió a la detección y aislamiento del clon portador de *KIHEM13* mediante el uso de la estrategia denominada *DCbyPCR* (Díaz *et al.*, 2004). Esta estrategia consiste en la detección por PCR del clon portador del gen buscado en grupos de transformantes. Ya que este sistema se basa en la técnica de la PCR, es indispensable disponer de dos cebadores que amplifiquen un fragmento de la secuencia codificadora (CDS) del gen buscado. Por tanto, es necesario conocer previamente, como mínimo, la secuencia de un pequeño fragmento de la CDS. En el caso de *KIHEM13*, el fragmento de CDS fue obtenido amplificando por PCR DNA genómico de *K. lactis*, utilizando para ello cebadores basados en regiones conservadas del gen en varios organismos (González-Domínguez *et al.*,

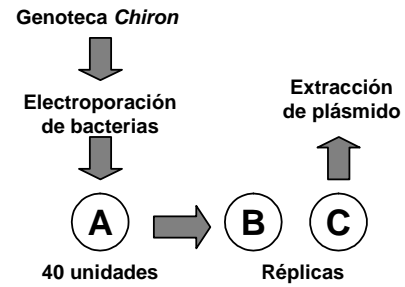
2000). A partir de la secuencia del fragmento obtenido por PCR se diseñaron los cebadores que se utilizaron para la identificación del gen en la genoteca (ECV95M Y ECV96M; Tabla R.1).

Tabla R.1. Cebadores utilizados para la clonación y secuenciación de *KIHEM13*. TETRA1 y TETRA2 hibridan en las zonas adyacentes al sitio *Bam*HI de inserción de los fragmentos de DNA genómico de *K. lactis* en el vector pAB24, el cual se sitúa dentro de la CDS del gen de resistencia al antibiótico tetraciclina. La hebra se designa como Watson (*forward*) y Crick (*reverse*).

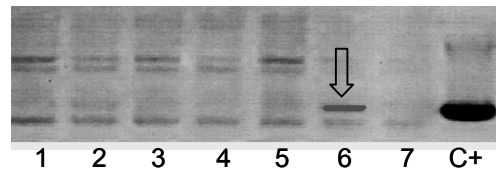
Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV95M	GGA CGT TGC CTT GTA CCC AAA	Watson
ECV96M	GAA CAC GGG ATC CTG GAG TTC	Crick
ECV120M	AGG CGA AGA ATT TTA CTC CTG	Crick
ECV121M	GGC CGT CGA CAA TAC TTT TAT	Watson
ECV129M	TCC TCT TCC TGT ATG CGG	Watson
ECV130M	ATC CAA AAA GCA AGC AGA CT	Crick
ECV131M	AGG GTC TGG AAA CTT TGG	Watson
ECV133M	GAT GCT TTC GTT TTG CCC	Crick
ECV135M	TCA CGC TTC ATT AGG CTC G	Crick
ECV136M	CCC GGC TTG TTA CTG CTC	Watson
TETRA1	GCT TCG CTA CTT GGA GCC ACT	Watson
TETRA2	GGT GAT GCC GGC CAC GA	Crick

Después de la transformación de bacterias con esta genoteca se hicieron una serie de réplicas de las placas para proceder a continuación a realizar la extracción del DNA plasmídico del conjunto de transformantes de cada placa (ver Material y Métodos). Este DNA se utilizó como molde en una serie de reacciones de PCR, llevadas a cabo con los cebadores ECV95M y ECV96M que hibridan sobre la secuencia codificadora de *KIHEM13*, que revelaron qué placa contenía el clon de *KIHEM13*. Dividiendo esta placa por sectores y aplicando la metodología anterior se pudo identificar un grupo de colonias entre las cuales se encontró la portadora del clon de *KIHEM13* (marcadas en las sucesivas imágenes de la figura R.2 con una flecha).

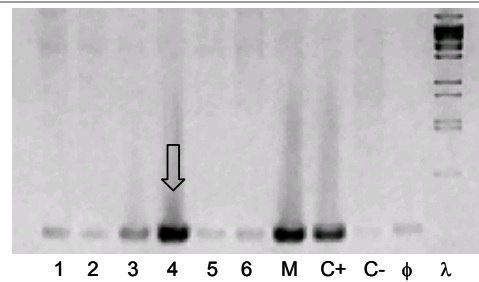
Paso 1. Amplificación de la genoteca (transformaciones individuales sembradas cada una en varias placas) y realización de réplicas (A, B y C de cada placa). Extracción de DNA plasmídico de cada una de las placas de la réplica C.



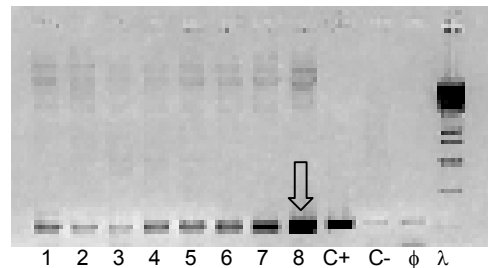
Paso 2. PCRs usando de molde una mezcla de extracciones de plásmido de cada grupo de réplicas C procedentes de una transformación. Se realizaron PCRs, tantas como transformaciones. El clon de *KIHEM13* se detectó en la PCR número 6.



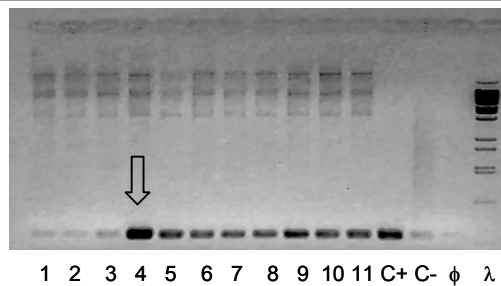
Paso 3. PCRs con las extracciones de plásmido individuales de cada una de las seis placas (réplicas C) del grupo 6 encontrándose el clon en la placa 4. M es una mezcla del DNA de las 6 placas. C- es el control negativo, amplificación sin DNA. C+ es el control amplificado desde genómico. ϕ es la amplificación desde el vector vacío y λ es el marcador de tamaños moleculares.



Paso 4. División en 8 sectores de la réplica B de la placa 4 y extracción de DNA de cada sector para comprobar por PCR dónde se encuentra el clon. *KIHEM13* se encuentra en el sector 8. C+: control positivo con DNA genómico de *K. lactis*.



Paso 5. Resiembra a partir de la placa original (A) de la totalidad de las colonias del sector 8, extracción en grupos de colonias y comprobación por PCR. Se seleccionó el grupo 4. C+: control positivo realizado utilizando como molde para una PCR, DNA genómico de *K. lactis*.



Paso 6. Detección del clon portador de *KIHEM13* en varios transformantes individuales del grupo 4. C+: control positivo realizado utilizando como molde para una PCR, DNA genómico de *K. lactis*.

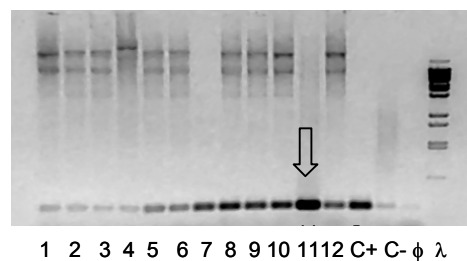


Figura R.2. Esquema del proceso *DCbyPCR* seguido para la obtención del clon de *KIHEM13*.

Con la intención de obtener más información acerca del tamaño del inserto en el vector pAB24 y de establecer un mapa de restricción del mismo, se realizaron una serie de digestiones con endonucleasas de restricción (Figura R.3). Del estudio de los datos obtenidos en la digestión con *SphI* se deduce que el tamaño del inserto es de entre 6.000 y 7.000 pb. Asimismo, se ha podido determinar que *SmaI* no corta en el inserto. La de *KpnI* es en realidad doble.

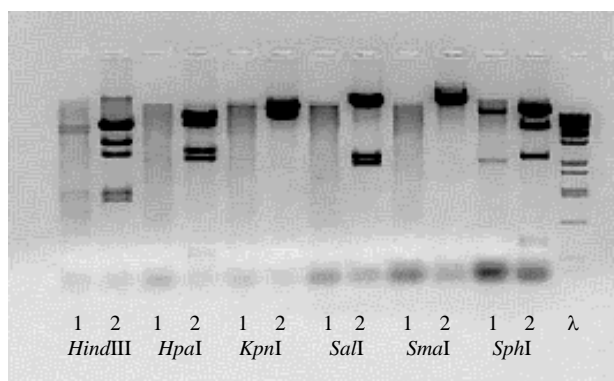


Figura R.3. Digestiones enzimáticas del clon de *KIHEM13* con diversas endonucleasas de restricción. 1 = vector pAB24; 2 = clon de *KIHEM13*; λ = marcador de tamaño molecular *BstEII* Lambda.

1.2. Secuenciación de *KIHEM13*

Una parte del clon así obtenido fue secuenciada (Sanger *et al.*, 1977) en las dos hebras mediante la estrategia de *primer walking*, consistente en el diseño de cebadores (Tabla R.1) divergentes sobre los fragmentos ya secuenciados de manera que se va ampliando de forma progresiva la lectura. Como resultado de este proceso, y tras el ensamblado de los distintos fragmentos obtenidos, se obtuvo una secuencia de 3.411 pb. Tras el análisis de esta secuencia se llegó a la conclusión de que contiene dos secuencias codificadoras que se extienden desde la posición 1.062 a la 2.189 en la hebra de Watson y desde la posición 2.975 a la posición 2.637 en la hebra de Crick (Figuras R.4, R.5 y anexo). Una de ellas presenta homología con el gen *HEM13* de *S. cerevisiae*. La otra secuencia codificadora, que se encuentra en posición 3' de la anterior y en la hebra reversa, presenta homología con el gen *RPC11* que codifica una subunidad de la *RNA polimerasa III* de *S. cerevisiae*. La secuencia completa se depositó en la base de datos del EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) con el número de acceso AJ519802.

1062 atgagaagagaagcattggatctatactgcccttttctctccaat
 M R R E A L D L Y C P F L S N
 1107 caagcagaatcattgataaaaactttacatccagtatacttgctg
 Q A E S L I K L Y I Q Y T C L
 1152 gtaaagcaaacagaaactcaacgaccggttcatcttaacacacat
 V K Q T E T Q R P V H L N T H
 1197 tctaaatattatcattgtgcatgacagattcacaagtgccaaat
 S K Y Y H C A M T D S Q V P I
 1242 agagagagaatggaggccttagtgccggaacagcaagaaat
 R E R M E A L V R R K Q Q E I
 1287 accaaggtctggaaactttggatactgtaaagttcaagccgat
 T K G L E T L D T V K F Q A D
 1332 tcttgggatcgtggcaacaacggtggtggcggtgtctcgatggtg
 S W D R G N N G G G G V S M V
 1377 ttgcagaatggtactacgtttgagaaagtggtgtaatgtcagt
 L Q N G T T F E K G G V N V S
 1422 gtggttcatgggaacttgagtcacactgctatcaaggctatgaaa
 V V H G N L S P P A I K A M K
 1467 gcgaccacaaaaatttgcatctgcctattgatcctgcaactggt
 A D H K N L H L P I D P A T G
 1512 gaaccagatgcaacaggagtaaaattcttcgcctgtgtctctct
 E P D A T G V K F F A C G L S
 1557 atggttattcatccaattaatccacatgcgccaaccaccatttg
 M V I H P I N P H A P T T H L
 1602 aattataggtatctcgaaacctggaatgcgacggtacaccacaa
 N Y R Y F E T W N A D G T P Q
 1647 gcttgggtggttcggtggtggtgctgatttaactccttcttatttg
 A W W F G G G A D L T P S Y L
 1692 tacgaggaagacgctaaattgttccatcaattgcacaaggatgct
 Y E E D A K L F H Q L H K D A
 1737 ttggacaaaacggacggtgcctgtacccaaaatacaagaaatgg
 L D K T D V A L Y P K Y K K W
 1782 tgcatgagatatttctatatcaaacacagagaagaaaccagaggt
 C D E Y F Y I K H R E E T R G
 1827 atcgggtggtatcttcttggatgatgtcgatgatcgatgacccaaac
 I G G I F F D D V D D R D P N
 1872 gaaatcttgcaaatgggtgaaaactgttttgatgccttcttgcca
 E I L Q M V E N C F D A F L P
 1917 tcttacctcgaaatcatcaaaagaagaaaggatgaccccttacact
 S Y L E I I K R R K D M P Y T
 1962 gaagaagaaaagacaatggcaacaaattagacgtggcagatacgtt
 E E E R Q W Q Q I R R G R Y V
 2007 gaattcaacctagtccttgacagaggtactcaattcggtttaaga
 E F N L V L D R G T Q F G L R
 2052 actccaggatcccgtgtcgaaagtattttgatgtctttgcctgtg
 T P G S R V E S I L M S L P V
 2097 actgcttcggtggtgtatgaccatcatcctgaagtagactctaga
 T A S W L Y D H H P E V D S R
 2142 gaagataaattactccaagtattgaagaaccctgttgaatgggtt
 E D K L L Q V L K N P V E W V
 2187 tga 2189

Figura R.4. Identificación de la CDS que muestra homología con el gen *HEM13* de *S. cerevisiae* y su traducción a proteína

```

2975 atgcttttcgttttgcccattatgcaataacatggttggttatca
    M L S F C P L C N N M L L V S
2930 aaagctgattcaggtctgtataaactagcatgcggtatcatgccca
    K A D S G L Y K L A C G S C P
2885 taccagtttttaattgatgggatagaggtatac gatagaaagaac
    Y Q F L I D G I E V Y D R K N
2840 ctccctaggaaagaagttgatgatgtcttaggtggagaaggtgca
    L P R K E V D D V L G G E G A
2795 tgggataatgttgaccagacagcagcacaatgtccgaacctgac
    W D N V D Q T A A Q C P N H D
2750 caatgtgcggtgaaagagcttacttcttccagttgcaaactcaga
    Q C A G E R A Y F F Q L Q I R
2705 tctgcagatgaacctatgacaactttctacaaatgtgttaactgt
    S A D E P M T T F Y K C V N C
2660 ggtcataaatggagagagaactag 2637
    G H K W R E N *

```

Figura R.5. Identificación de la CDS que muestra homología con el gen *RPC11* de *S. cerevisiae* y su traducción a proteína

1.3. Características de la proteína traducida a partir del gen *KIHEM13*

La traducción del gen *KIHEM13* da lugar a una proteína que muestra elevada homología con otras *coproporfirinógeno oxidasas* de organismos eucariotas (tabla R.2). Las comparaciones se han hecho con el programa BLAST2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Tanto la matriz de comparación utilizada como los parámetros estadísticos de la misma fueron los proporcionados por defecto en el programa. *Gaps* indica el número de huecos, es decir, aminoácidos no presentes en alguna de las dos proteínas después de la mejor comparación. *Identities* indica el número de aminoácidos iguales entre ambas proteínas y *positives* indica el número de identidades más el número de aminoácidos que aún siendo distintos entre ambas proteínas, son del mismo tipo. El segundo número de cada par indica el número de aminoácidos de la CPO del organismo frente al que se realiza la comparación que se han podido solapar en la comparación, esto es, la diferencia entre la posición del último aminoácido comparado menos el primero más los *gaps*.

La CPO de *K. lactis* presenta dos posibles codones ATG de inicio de la traducción (TIC) que se encuentran en la misma pauta de lectura. La duda para asignar el TIC utilizado en *K. lactis* surge cuando se compara la proteína de *K. lactis* con otras de levaduras o con las de eucariotas superiores. Ya que la homología con las de levaduras sólo comienza desde el segundo TIC, mientras que la homología con las de eucariotas superiores, por ejemplo la humana, comienza desde el primer TIC. La proteína resultante de la traducción de la secuencia codificadora desde el segundo TIC consta de 323 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 37,1 KDa y un punto isoelectrico estimado de 5,59. La proteína resultante de la traducción desde el primer hipotético punto de inicio de la traducción consta de 375 aminoácidos, un peso molecular aproximado de 43,3 KDa y un punto isoelectrico estimado de 5,98. Los análisis informáticos llevados a cabo para intentar predecir la existencia de alguna presecuencia de localización

subcelular han dado un resultado negativo tanto para la proteína derivada de la traducción de la secuencia desde el primer ATG como desde el segundo.

Tabla R.2. Resultados de la comparación mediante *Blast-2-Sequences* de las CPOs de distintos organismos frente a la secuencia de aminoácidos derivada de la traducción de *KIHEM13*.

Organismo	Gaps	Identities	Positivos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	243/318 (76%)	269/318 (84%)
<i>Candida albicans</i>	08/322 (2%)	222/322 (68%)	250/322 (76%)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	13/323 (4%)	163/323 (50%)	216/323 (66%)
<i>Homo sapiens</i>	12/317 (3%)	155/317 (48%)	206/317 (64%)

La distribución topológica de los elementos de estructura secundaria está bien conservada cuando se comparan las proteínas de CPO de *K. lactis* y otras levaduras. La predicción de estructura secundaria ha sido realizada con el programa PSIPRED (Jones, 1999; McGuffin *et al.*, 2000) al que se puede acceder desde la red (<http://bioinf.es.ucl.ac.uk/psipred/>) y se muestra sobre el *clustal* de la figura R.7.

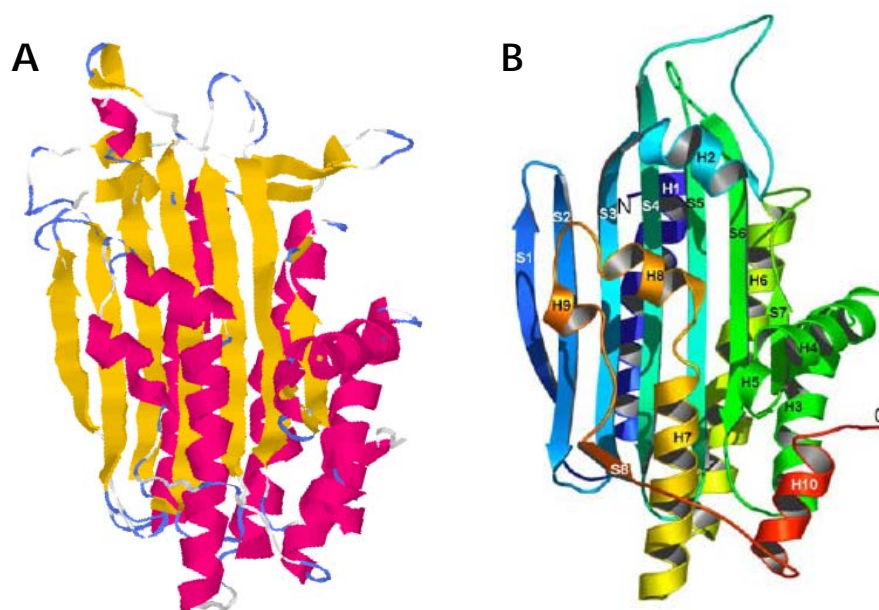


Figura R.6. Comparativa del modelo obtenido para la CPO de *K. lactis* en este trabajo (A) y el modelo de la estructura determinada mediante datos cristalográficos para la CPO de *S. cerevisiae* tomado de Phillips y colaboradores (Phillips *et al.*, 2004) (B).

Se ha podido predecir mediante modelado por homología (programa *SwissModel*, Schwede *et al.*, 2003) la estructura terciaria de la proteína CPO de *K. lactis*. Se han utilizado los datos disponibles de la cristalización de la CPO de *S. cerevisiae* (Phillips *et al.*, 2004) que muestran una coincidencia estructural con una hipotética proteína de *Leishmania major* cuyos datos cristalográficos se encuentran depositados también en PDB (*Protein Data Bank*) bajo el código 1VJU. El modelo obtenido para la CPO de *K. lactis* incluye la mayor parte de la proteína aunque excluye 39 aminoácidos de la región amino-terminal, los localizados entre el primer TIC y el segundo. La

predicción estructural se ajusta bien a los datos cristalográficos disponibles tanto para la CPO de *S. cerevisiae* como a los publicados posteriormente para la CPO de humanos, mostrando una estructura terciaria caracterizada por una lámina abierta formada por siete hebras β antiparalelas flanqueadas por ambas caras con hélices α (Figura R.6).

La única diferencia es que tanto en la CPO de humanos como en la de *S. cerevisiae* existen ocho hebras β , mientras que en la predicción estructural de CPO de *K. lactis* aparecen nueve hebras β , aunque dos de ellas parecen no formar parte de la lámina abierta que caracteriza a estas proteínas. El número de hélices α es variable en las dos CPOs cristalizadas, en *S. cerevisiae* hay diez hélices mientras que en humanos hay doce (las dos adicionales se encuentran en la zona amino-terminal de la proteína que en humanos es más extensa). En el modelo de la predicción para *K. lactis* aparecen nueve hélices (Figura R.7).

En lo que se refiere a las mutaciones que causan coproporfiria hereditaria (HCP) y harderoporfiria en humanos, algunas de ellas se encuentran afectando a residuos altamente conservados entre muy diversas especies mientras que otras no parecen seguir ninguna distribución concreta. Es más, hay mutaciones que incluso afectando a residuos conservados no producen una pérdida de actividad enzimática tan acusada como otras que afectan a residuos no tan conservados. Ni siquiera si las comparamos con los aminoácidos que en la CPO de *S. cerevisiae* se encuentran expuestos en el centro catalítico de la enzima parecen coincidir en distribución (Phillips *et al.*, 2004 y de Lee *et al.*, 2005). Una explicación de los efectos de estas mutaciones es que puedan desestabilizar la formación de alguna hebra o hélice y que esto afecte a la estructura general de la proteína o a la formación del dímero (Figura R.8).

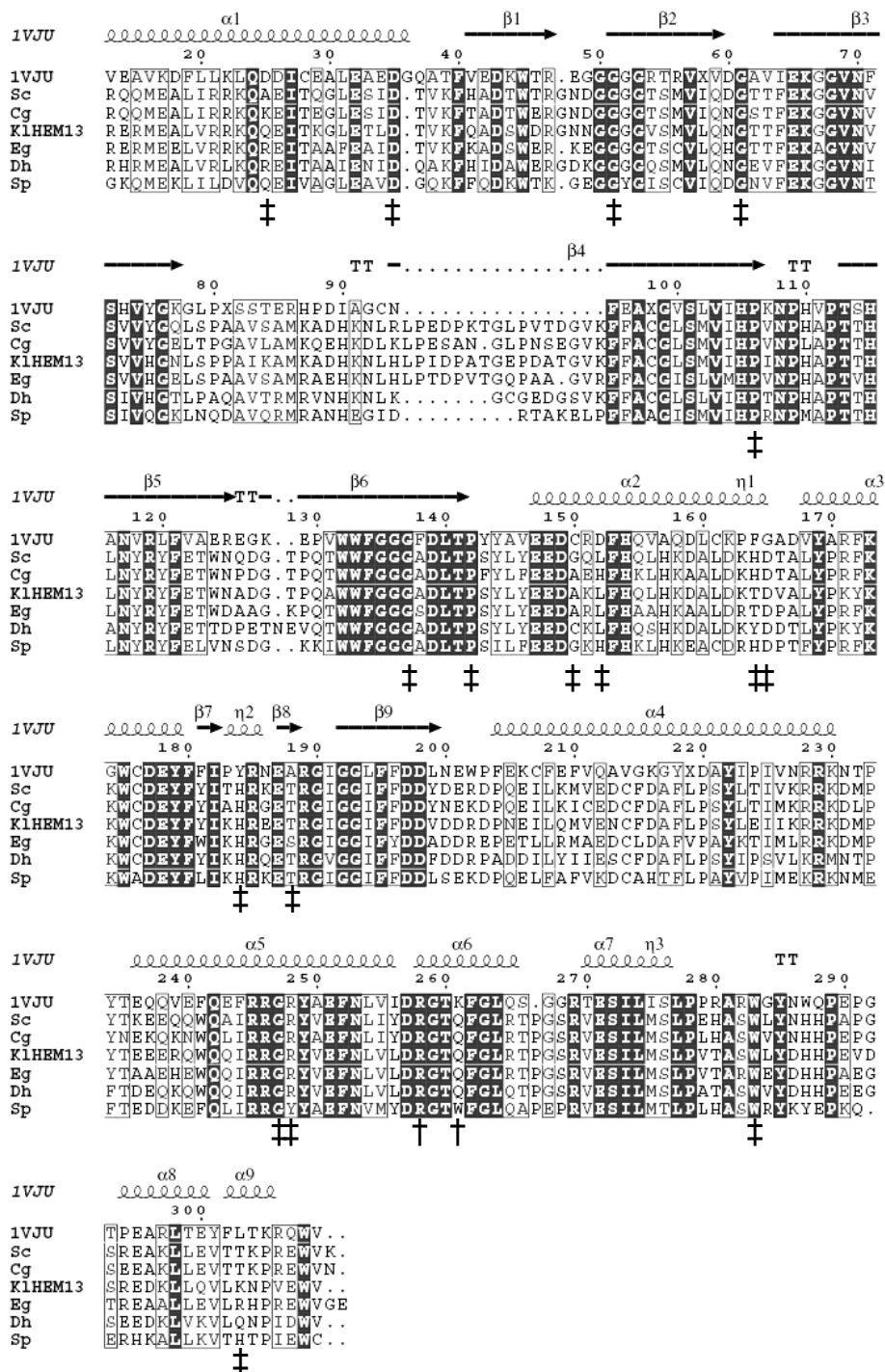


Figura R.7. Alineamiento *clustal* y predicción de estructura secundaria. ‡ son residuos cuyas mutaciones en la CPO humana producen HCP y † son residuos cuyas mutaciones en la CPO humana derivan en harderoporfiria. Con fondo gris se marcan aminoácidos altamente conservados. α denota hélices α . β denota hebras β . Sc: *S. cerevisiae*, Cg: *Candida glabrata*, KlHEM13: *K. lactis*, Eg: *Eremothecium gossypii*, Dh: *Debaryomyces hansenii*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*.

RESULTADOS

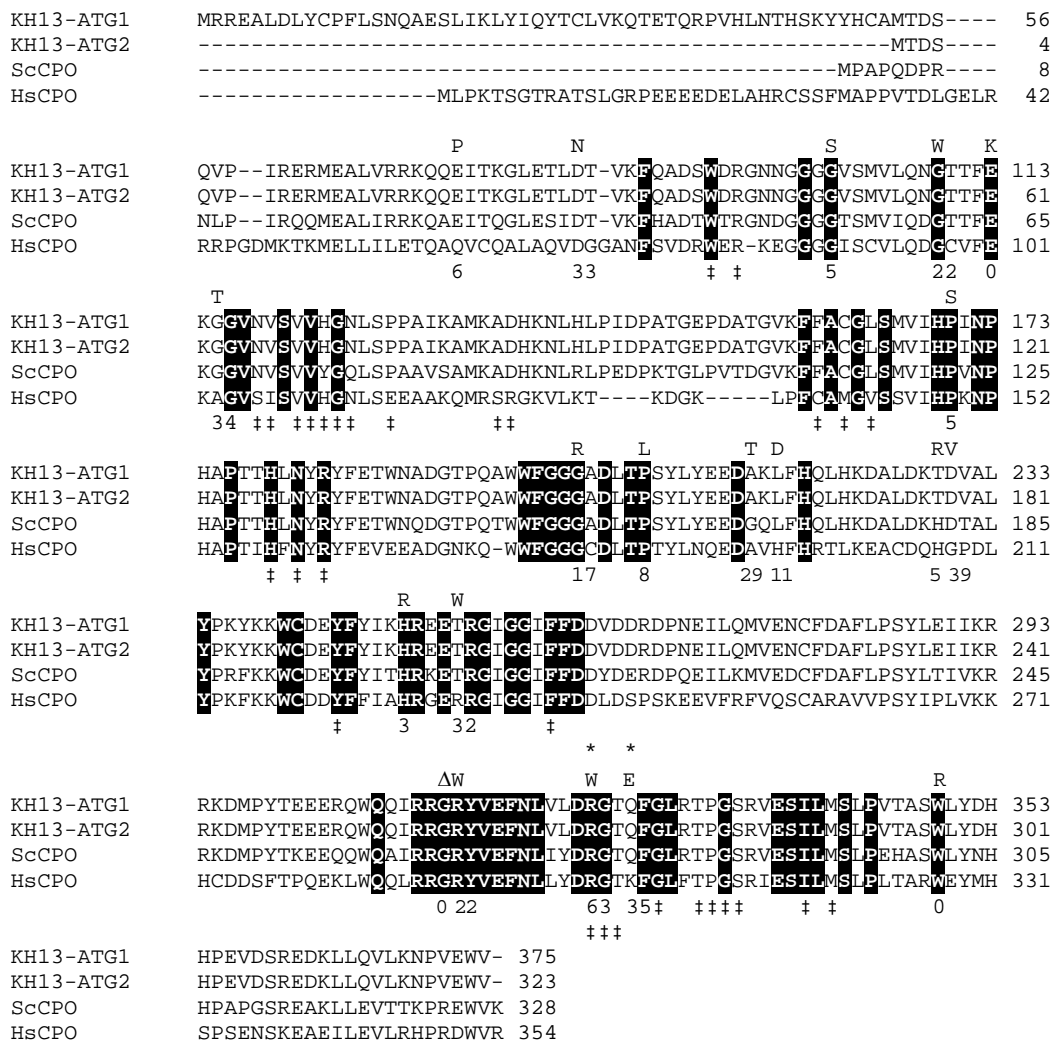


Figura R.8. Clustal que muestra una comparación entre las CPOs de humanos (Hs), *S. cerevisiae* (Sc) y KIH13p (KH13) traducida desde los dos posibles puntos de inicio de la traducción (ATG1 y ATG2). Con * encima se muestran los dos residuos que dan lugar a la harderoporfiria. Los residuos en blanco muestran los residuos conservados tras la comparación de las CPOs de los organismos que se muestran y de los siguientes: *Drosophila melanogaster*, *Aplysia californica*, *Mus musculus*, *Nicotiana tabacum*, *Synechocystis sp. PCC 6803*, *E. coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens str. C58* y *Arabidopsis thaliana*. Adaptada de Phillips y colaboradores (2004) y de Lee y colaboradores (2005).

En la figura R.8 los símbolos † debajo de los residuos indican que ese aminoácido en la estructura de la CPO de *S. cerevisiae* se encuentra expuesto en el centro catalítico de la enzima en la forma II, la forma con el centro activo cerrado. Las letras encima de los residuos indican el aminoácido por el cual se ha sustituido en una mutación concreta el que aparece en ese lugar en la CPO humana y que dan lugar a porfirias. Los números debajo de los residuos indican el porcentaje de actividad que presenta la CPO humana alterada por la sustitución del aminoácido indicado arriba con respecto a la actividad de la CPO humana normal (Phillips *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

2. El gen *KIHEM13* complementa la delección de *HEM13* en *S. cerevisiae*

Para comprobar si el clon de *KIHEM13* obtenido a partir de la genoteca era capaz de complementar la delección del gen homólogo de *S. cerevisiae* se proyectó transformar con él la cepa de *S. cerevisiae* BY4742- Δ *Schem13::KanMX4* (procedente de EUROSCARF, ver Material y métodos) que presenta el gen *HEM13* anulado mediante delección y sustitución de su secuencia codificadora por el gen de resistencia a la geneticina (Wach *et al.*, 1994). Esta cepa mutante de *S. cerevisiae* es incapaz de crecer en un medio sin el aporte de una fuente de hemo exógena (hemina, ver Material y métodos) y si le es suministrada presenta un crecimiento pobre. Sin embargo, el mutante transformado con el clon de *KIHEM13* recupera el fenotipo propio de una cepa salvaje siendo capaz de crecer en ausencia de hemina (Figura R.9).

Debido a que el clon original era de gran tamaño y contenía más de un gen, se procedió también a subclonar únicamente el gen *KIHEM13* en el vector pSK1 (Prior *et al.*, 1993). Este es un vector lanzadera capaz de replicarse en bacterias y en las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis*. La subclonación en pSK1 se realizó en su sitio *EagI*, previo paso por el vector comercial *pGEMTM T-easyTM* (ver Material y métodos) y digestión con *NotI* (cuya diana de corte es compatible con la de *EagI*). La subclonación inicial en *pGEMTM T-easyTM* fue realizada mediante PCR con los cebadores que se describen en la tabla R.3. Una vez en el vector pSK1 se verificó la secuencia para comprobar que no se habían introducido mutaciones durante el proceso de amplificación.

Tabla R.3. Cebadores empleados en la subclonación del gen *KIHEM13* en el vector pSK1.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV164M	gggatcgatTTTTTTGGCATGGAAGGAACG	Watson
ECV165M	gggatcgatTAGGTGGAGAAGGTGCATGGG	Crick

La cepa mutante BY4742 Δ *Schem13::KanMX4* al ser transformada con el clon original o con el subclón en el vector pSK1 restablecía su capacidad para crecer en ausencia de precursores de hemo. (Figura R.9). De todo esto se puede deducir que el gen *KIHEM13* que se ha aislado de la genoteca de *K. lactis* es totalmente funcional y además, es lo suficientemente similar a su homólogo de *S. cerevisiae* como para suplir su ausencia en una cepa mutante y restaurar un fenotipo salvaje.

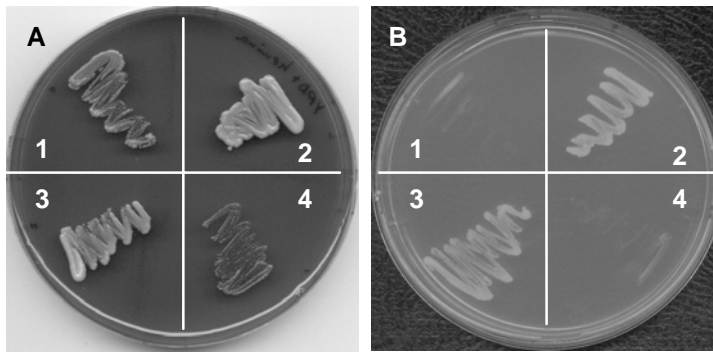


Figura R.9. *KIHEM13* complementa la delección de *ScHEM13*. 1: Cepas mutante $\Delta hem13::KanMX4$. 2: Mutante transformado con el clon original de *KIHEM13* en pAB24; 3: Mutante transformado con el subclón de *KIHEM13* en pSK1; 4: Mutante transformado con el vector pSK1 sin inserto. Todos crecen en presencia

de hemina (A) mientras que en su ausencia (B) sólo son capaces de crecer los mutantes que han sido transformados con el gen *KIHEM13*.

Para asegurar mediante otra prueba experimental que el fenotipo de crecimiento en ausencia de hemina, era dependiente del gen *KIHEM13* insertado en el plásmido, se realizaron cultivos de los transformantes en medio no selectivo durante varias generaciones. En estas condiciones se favorece la pérdida del plásmido y puede analizarse si la pérdida del mismo está asociada a la pérdida de la capacidad de crecimiento en medios sin adición de hemina. Tras un periodo de seis días creciendo en YPD líquido, y renovando el cultivo en días alternativos, se sembró una dilución del mismo en una placa YPD+hemina. De esta placa se tomó un grupo de colonias y se sembraron en varios medios con el fin de estudiar su crecimiento: CM, CM-URA, CM-URA+hemina y YPD+hemina (Figura R.10).

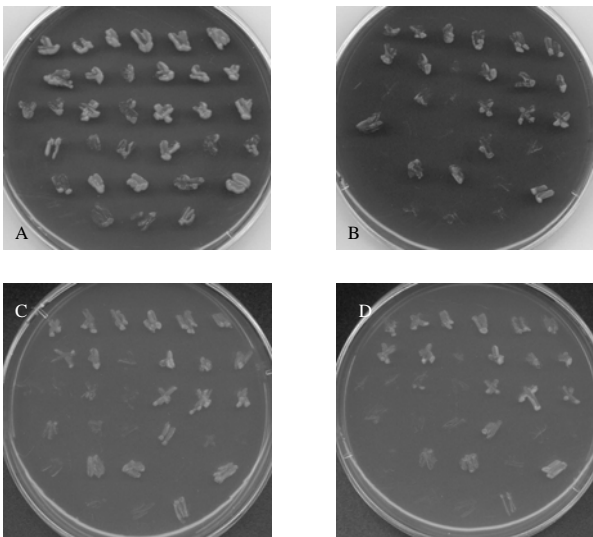


Figura R.10. Ensayo de curación sobre 33 transformantes A: YPD+hemina; B: CM-URA+hemina; C: CM; D:CM-URA. La pérdida de la capacidad de crecer en medios sin uracilo (-URA) va asociada a la pérdida de capacidad de crecimiento en medios sin adición de suplemento de hemina (CM).

3. Obtención y análisis de una cepa haploide de *K. lactis* con el gen *KIHEM13* deletado

Una vez comprobada la funcionalidad de *KIHEM13* en *S. cerevisiae* se planteó la necesidad de verificar su funcionalidad en *K. lactis* y averiguar si también en esta levadura existe un único gen que codifica la enzima CPO, como sucede en *S. cerevisiae* (Zagorec *et al.*, 1988) Para ello se procedió a la delección y sustitución de su secuencia codificadora por el módulo kanMX4 (Wach *et al.*, 1994). Este módulo contiene la secuencia codificadora del gen *kan^r*, aislada del transposón Tn903 de *E. coli*, bajo el control transcripcional y traduccional de los elementos promotores y terminadores del gen *TEF* del hongo filamentoso *Ashbya gossypii*. La proteína a la que da lugar la secuencia codificadora del gen *kan^r*, permite una versátil y eficiente selección dual mediante el uso de los antibióticos kanamicina y geneticina, específicos de procariontes y eucariontes respectivamente, a los que confiere resistencia. Esto posibilita la realización de manera más sencilla de trabajos de ingeniería genética con el módulo en bacterias para posteriormente, usar las construcciones conseguidas sobre *K. lactis*. Este módulo se localiza en el vector pFA6 en una secuencia de clonación múltiple (MCS) donde se encuentra flanqueado por dianas de corte para la endonucleasa de restricción *NotI*, con la que puede ser retirado de su ubicación original. Su tamaño es de aproximadamente 1.500 pb y está específicamente destinado a la realización de sustituciones de genes para la consecución de mutantes nulos en *S. cerevisiae*, aunque debido a su versatilidad es de aplicación también en otras especies de levaduras. Sin embargo, debido a que el proceso de recombinación homóloga, muy favorable en *S. cerevisiae*, no suele producirse con la misma eficacia en *K. lactis* es necesario utilizar una amplia región flanqueando ambos extremos del casete kanMX4. Por este motivo el diseño de cebadores para amplificar directamente el casete kanMX4 desde el vector pFA6 con colas homólogas al gen que se desea anular en la levadura *K. lactis* no resulta adecuado. La estrategia diseñada en este caso implica una serie de pasos intermedios adicionales que se resumen en el esquema de la figura R.11. La levadura *K. lactis* presenta una recombinación homóloga muy poco activa registrándose casos (depende del gen diana) donde es inferior al 1% (Zeeman y Steensma, 2003), resultando extraordinariamente complicado llevar a cabo una integración dirigida. Para incrementar las probabilidades de la ocurrencia de recombinación homóloga en *K. lactis* se deben situar grandes regiones flanqueantes de la secuencia diana a ambos lados del módulo que se va a utilizar para sustituirla (en este caso flanqueando kanMX4 se colocaron 897 y 497 pb). Aún así, resulta muy difícil llevar a cabo la integración por recombinación homóloga en cepas convencionales de *K. lactis* y se recurre a cepas como SAY529 o CBSΔKu80, modificadas genéticamente para aumentar la recombinación homóloga por distintas estrategias.

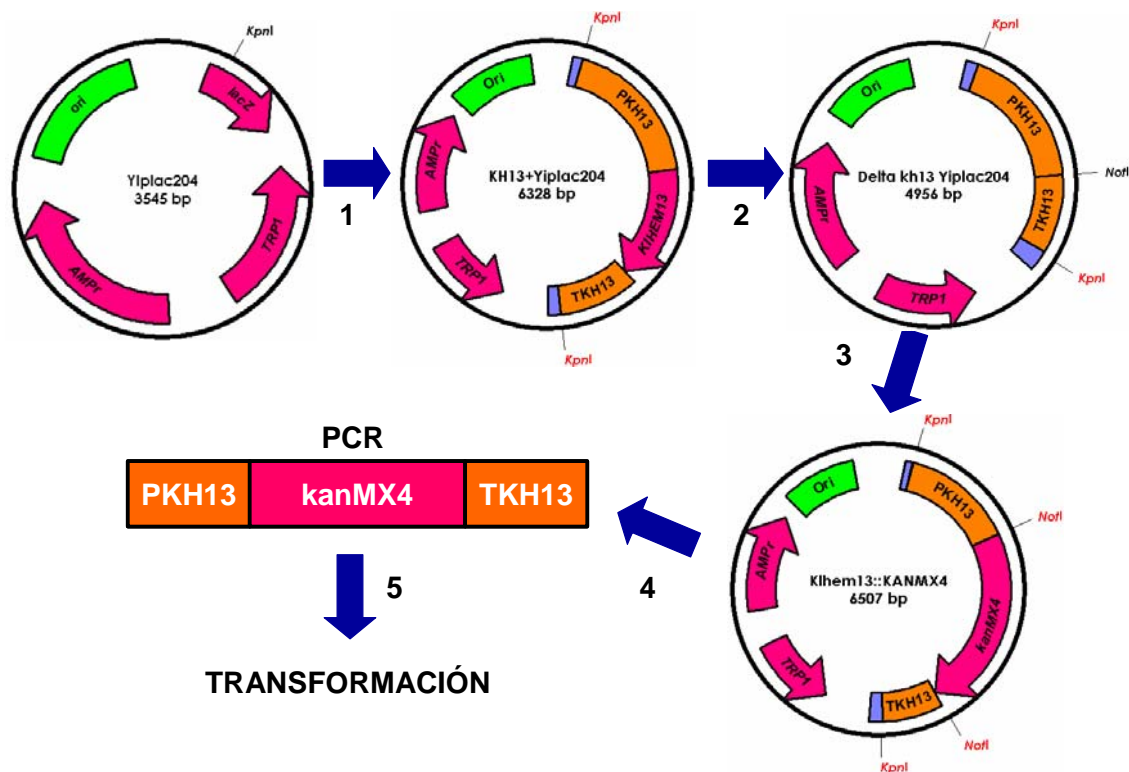


Figura R.11. Esquema de los pasos seguidos para la anulación del gen *KIHEM13*. 1. Subclonación del gen *KIHEM13* en el sitio *KpnI* del vector YIplac204. 2. Delección de la secuencia codificadora de *KIHEM13* y creación de un sitio *NotI* en su lugar. 3. Inserción en el sitio *NotI* del módulo kanMX4. 4. Amplificación por PCR de la construcción obtenida formada por el promotor de *KIHEM13* (PKH13), el módulo kanMX4 y el terminador de *KIHEM13* (TKH13). 5. Transformación mediante electroporación de diferentes líneas de *K. lactis* con el producto de PCR para obtener la integración del mismo por recombinación del promotor y terminador de *KIHEM13* con sus homólogos genómicos, consiguiendo la sustitución en el cromosoma de la secuencia codificadora de *KIHEM13* por el módulo kanMX4.

3.1 Subclonación de *KIHEM13* en YIplac204

En primer lugar se clonó el gen *KIHEM13* en un vector de tamaño pequeño. En este caso se eligió el vector YIplac204 (Gietz *et al.*, 1988; ver material y métodos), un vector integrativo (carente de elementos de replicación) que tiene un tamaño de 3.545 pb. YIplac204 presenta un sitio de clonación múltiple con una serie de sitios únicos de corte por endonucleasas de restricción, donde se podrán colocar el/los inserto/s. Para la inserción del gen se seleccionó uno de estos sitios de modo que no cortase en el interior del gen a subclonar. Esa diana de restricción se colocó delante (5') de unos cebadores (Tabla R.4) diseñados para la amplificación del gen completo. Estos cebadores fueron empleados en una PCR utilizando como molde DNA genómico de *K. lactis* (cepa NRRL-Y1140, ver Material y métodos) para amplificar un fragmento de 2.776 pb que contenía el gen *KIHEM13*. De este modo, el fragmento amplificado llevaba en sus extremos, en este caso, un par de dianas para la endonucleasa de restricción *KpnI*, que es la que portaba en su extremo 5' los cebadores utilizados en la amplificación. El producto obtenido en la PCR, después de haber sido comprobado en

rendimiento y tamaño mediante electroforesis se sometió a digestión con la endonucleasa *KpnI* (ver Material y métodos).

Tabla R.4. Cebadores empleados para la subclonación del gen *KIHEM13* completo en el vector YIplac204. Estos cebadores portan en su extremo unas **dianas** para la enzima de restricción *KpnI*, además de una cola de Gs que facilita el corte posterior del producto de PCR.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV184M	ggggggtaccTTTTTTGGCATGGAAGGAACG	Watson
ECV185M	ggggggtaccTAGGTGGAGAAGGTGCATGGG	Crick

A continuación se cortó el vector con esta misma endonucleasa y se unió con el producto de la PCR digerido previamente. Una vez concluido este proceso se llevó a cabo una transformación de una línea bacteriana competente y se comprobó si entre los transformantes había alguno que portase la construcción deseada. Esta comprobación se realizó mediante PCR (utilizando los mismos cebadores usados previamente para la amplificación del inserto) y posteriormente se verificó el resultado en un gel de agarosa (figura R.12).

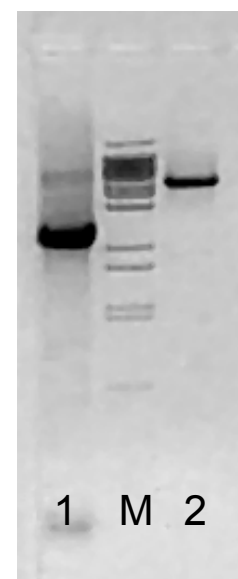


Figura R.12. En el carril 1 se observa la comprobación por PCR de la obtención del subclón de *KIHEM13* en el vector YIplac204. El tamaño del fragmento amplificado es justamente el del gen *KIHEM13* insertado, 2.776 pb. En 2 se observa el resultado de la PCR realizada con los cebadores que hibridan de manera divergente en los extremos de la secuencia codificadora de *KIHEM13* y que servirán para deletarla. Estos cebadores amplifican el promotor y el terminador de *KIHEM13* con el vector YIplac204 entre ambos, dando un fragmento de un tamaño total de aproximadamente 5.300 pb. **M:** marcador de pesos moleculares *BstEII* Lambda.

3.2 Eliminación de la secuencia codificadora de *KIHEM13*

Una vez que se consiguió clonar *KIHEM13* en YIplac204 se procedió a eliminar la secuencia codificadora de dicho gen. Para hacer esta delección se diseñaron unos cebadores (Tabla R.5) que hibridan en sentido divergente en los extremos de la secuencia codificadora de *KIHEM13*. Estos cebadores llevan en sus extremos 5' una diana para la endonucleasa de restricción *NotI*. Esta endonucleasa de restricción no corta ni en el vector ni en los fragmentos de *KIHEM13* que se amplificarán. A partir de aquí el procedimiento fue similar al seguido en el paso anterior. En primer lugar se

procedió a la realización de una PCR con estos cebadores utilizando como molde la construcción obtenida anteriormente (Figura R.12).

Como los cebadores están colocados en orientaciones opuestas en los extremos de la secuencia codificadora, amplifican el promotor del gen diana, el vector al completo y el terminador del gen diana, dejando fuera la secuencia codificadora, consiguiendo de esta forma eliminarla. A continuación, se procedió a la digestión del producto obtenido en la PCR mediante la endonucleasa de restricción *NotI*. Seguidamente, se llevó a cabo la reacción de auto-ligación, se transformaron bacterias competentes y se comprobó si entre los transformantes obtenidos había alguno correcto. Para la comprobación de los transformantes se llevaron a cabo digestiones con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI* para comprobar la presencia de la diana, dando como resultado la disminución del tamaño del inserto contenido en YIplac204 (debido a la delección de la secuencia codificadora de *KIHEM13*), en el primer caso, y la linearización de la construcción, en el segundo caso (Figura R.13). De esta manera, el resultado final de este paso es el vector original que ahora presenta un inserto con el promotor y el terminador de *KIHEM13* separados por una diana para la endonucleasa de restricción *NotI*.

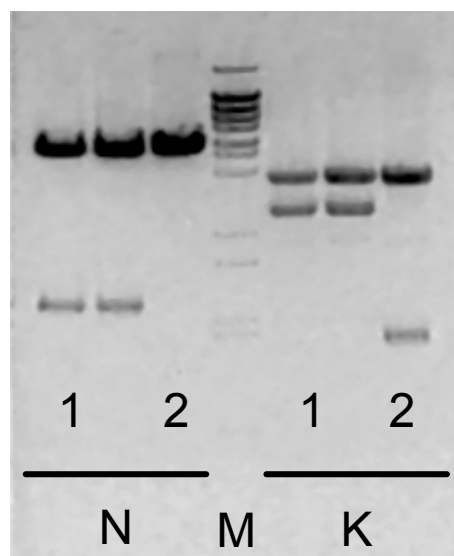
Tabla R.5. Cebadores empleados en la delección de la secuencia codificadora de *KIHEM13* en YIplac204. Estos cebadores portan en su extremo 5' unas **dianas** para la endonucleasa de restricción *NotI*, además de una cola de Gs que facilita el corte posterior del producto de PCR.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV250M	ggggg gcggccgc GGCTAGCTAGTTTCCACCG	Crick
ECV251M	ggggg gcggccgc GGCCGTCGACAATACTTTT	Watson

3.3 Inserción del módulo kanMX4 en la construcción

El siguiente paso consiste en la inserción del módulo kanMX4 en el lugar que antes ocupaba la secuencia codificadora de *KIHEM13*. Para ello se llevó a cabo la extracción del módulo de su plásmido original mediante digestión con la endonucleasa de restricción *NotI* cuyas dianas flanquean dicho módulo. Por otro lado, simultáneamente, se procede a la apertura de la construcción sin la secuencia codificadora de *KIHEM13* obtenida en el paso anterior mediante digestión con la misma endonucleasa de restricción. Seguidamente se llevó a cabo la ligación del módulo kanMX4 y de la construcción ya digeridos y se procedió a su transformación en bacterias competentes y siembra en un medio selectivo con la adición del antibiótico kanamicina que sólo permitirá el crecimiento de aquellos transformantes que porten el gen de resistencia *kan^r* en el módulo kanMX4. La inserción de kanMX4 en el lugar correcto se comprobó mediante digestiones con las enzimas de restricción *KpnI* y *NotI*. *KpnI* libera la construcción completa formada por el promotor de *KIHEM13*, el módulo kanMX4 y el terminador de *KIHEM13*. *NotI* libera el módulo kanMX4 (Figura R.13). De este modo se delecionó la secuencia codificadora de *KIHEM13* y se sustituyó por el módulo kanMX4.

Figura R.13. N: Digestiones con la endonucleasa de restricción *NotI* de las construcciones para la obtención del nulo de *KIHEM13*. **1:** con el módulo kanMX4 sustituyendo a la secuencia codificadora, donde se observan las bandas inferiores que se corresponden con el módulo liberado (aproximadamente 1.500 pb) y las bandas superiores que se corresponden con el vector YIplac204 con el promotor y el terminador de *KIHEM13*. **2:** sin la secuencia codificadora con un tamaño de aproximadamente 5.300 pb; **K:** Digestiones con la endonucleasa de restricción *KpnI* de las construcciones para la obtención del nulo de *KIHEM13*. **1:** con el módulo kanMX4 sustituyendo a la secuencia codificadora, donde se observan las bandas inferiores correspondientes a la suma del promotor y el terminador de *KIHEM13* más el módulo kanMX4, y la banda superior que se corresponde con el vector YIplac204 linearizado. **2:** sin la secuencia codificadora, donde se observa la banda inferior correspondiente a la suma del promotor más el terminador de *KIHEM13* (aproximadamente 1.400 pb) y la banda superior que se corresponde con el vector YIplac204 linearizado (3.545 pb). **M:** Marcador de tamaño molecular *BstEII* Lambda.



3.4 Transformación de *K. lactis* y comprobación de la anulación de *KIHEM13*

Una vez conseguida la construcción anterior se llevó a cabo su integración en el genoma de *K. lactis* mediante la recombinación entre las secuencias que presentan en común la construcción anteriormente descrita y el cromosoma de la levadura, es decir, entre los promotores y terminadores de *KIHEM13*. Esto lleva consigo la sustitución de la secuencia codificadora de *KIHEM13* por el módulo kanMX4 en el DNA genómico de la levadura.

Para ello, en primer lugar se procedió a la amplificación por PCR (Tabla R.6) de la construcción anterior dando como resultado un fragmento constituido por el promotor de *KIHEM13*, seguido del módulo kanMX4 y del terminador de *KIHEM13*. Este DNA fue introducido en la levadura mediante transformación por electroporación. Los transformantes fueron sembrados en placas de medio rico (YPD) al que se adicionó hemina y geneticina. La adición de hemina es necesaria para la viabilidad celular del nulo *KIHEM13*. La geneticina es el marcador de selección para las levaduras que integran el módulo kanMX4. Para la transformación se utilizaron varias cepas de *K. lactis*, MW190-9B, SAY539 y CBS Δ Ku80, descritas en materiales y métodos. La cepa CBS Δ Ku80 tiene deletado el gen *KIKU80* que interviene en el mecanismo de integración de fragmentos de extremos no homólogos (muy activo en *K. lactis*), de manera que se fuerza a los fragmentos de DNA a ser integrados por la vía de recombinación homóloga. Esta cepa facilita relativamente el trabajo de integración en *K. lactis* y en nuestro caso fue la única en la que se consiguió llevar a cabo la integración con éxito.

Tabla R.6. Cebadores empleados en la amplificación de la construcción realizada en YIplac204 y destinada a la obtención de un mutante nulo por integración dirigida en el gen *KIHEM13*.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV261M	GGAAGGAACGCGATCTTCAGC	Watson
ECV262M	CAGCAGCACAAATGTCCGAACC	Crick

Para seleccionar las levaduras en las que se había conseguido la integración correcta, se llevó a cabo en primer lugar una resiembra de los transformantes procedentes de las placas selectivas con hemina y geneticina en dos placas de medio completo (CM): una en la que se había añadido sólo hemina y donde crecieron todas, y otra sin hemina donde las levaduras con la integración correcta, y que por tanto carecen de la secuencia codificadora de *KIHEM13*, no pudieron crecer (Figura R.14.B). A continuación se tomaron aquellos transformantes que cumplían con las características fenotípicas esperadas para los mutantes nulos en *KIHEM13* y se procedió a la extracción de su DNA genómico y a la comprobación de integración correcta del módulo *kanMX4*. Para ello se llevaron a cabo unas PCR utilizando combinaciones de cebadores que hibridan en el DNA genómico de la levadura, en zonas externas a las utilizadas en el fragmento recombinante, y dentro del módulo *kanMX4* (Tabla R.7) Si se produce amplificación y el fragmento es del tamaño esperado indica que la integración fue correcta (Figura R.14.A).

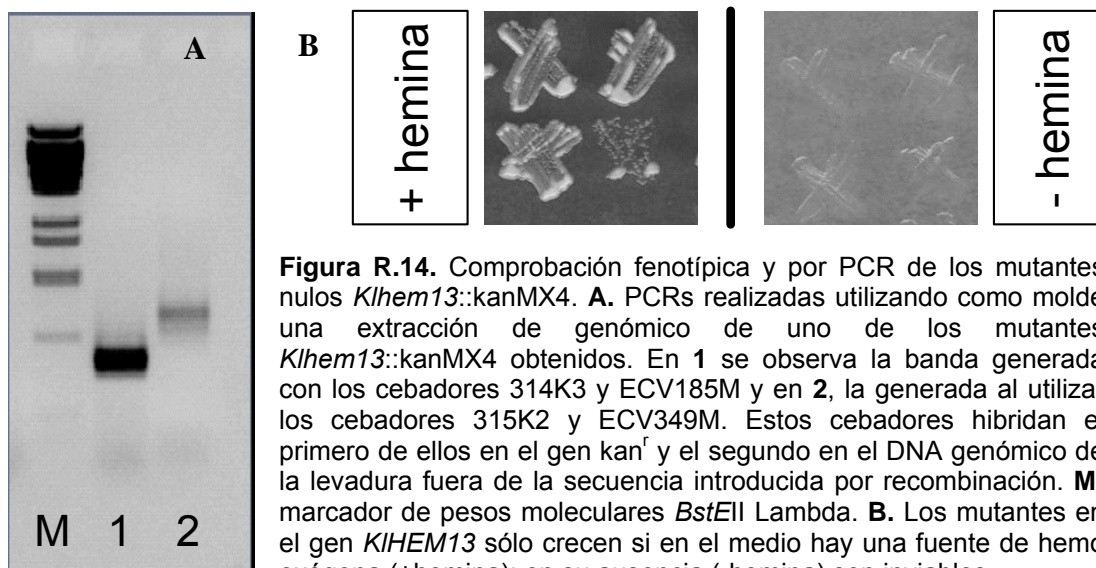


Figura R.14. Comprobación fenotípica y por PCR de los mutantes nulos *Kihem13::kanMX4*. **A.** PCRs realizadas utilizando como molde una extracción de genómico de uno de los mutantes *Kihem13::kanMX4* obtenidos. En 1 se observa la banda generada con los cebadores 314K3 y ECV185M y en 2, la generada al utilizar los cebadores 315K2 y ECV349M. Estos cebadores hibridan el primero de ellos en el gen *kan^r* y el segundo en el DNA genómico de la levadura fuera de la secuencia introducida por recombinación. **M:** marcador de pesos moleculares *BstEII* Lambda. **B.** Los mutantes en el gen *KIHEM13* sólo crecen si en el medio hay una fuente de hemo exógena (+hemina); en su ausencia (-hemina) son inviables.

Tabla R.7. Cebadores utilizados en la comprobación de los mutantes nulos *Kihem13::kanMX4*.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV185M	ggggggtaccTAGGTGGAGAAGGTGCATGGG	Crick
ECV349M	gggggagctcACGACGAAGTTTGTATTATTTTTTTTTT	Watson
314K3	GCCTCGACATCATCTGCCAG	Watson
315K2	CGCCTTAATTAACCCGGGGAT	Crick

Además de la imposibilidad de crecimiento en ausencia de una fuente exógena de hemo, otra característica que fue observada en el nulo de *KIHEM13* fue una disminución en la velocidad de crecimiento y una coloración rosácea que lo distinguía claramente de su isogénica salvaje de color blanco aunque no se producía una clara fluorescencia como sucede por ejemplo con otros mutantes en la ruta de biosíntesis de hemo como $\Delta Kihem12$ (Núñez *et al.*, 2004).

Para comprobar por otro método experimental que el gen estaba correctamente deletado, se procedió a determinar la actividad enzimática CPO de uno de los candidatos en colaboración con el Dr. Jean Michel Camadro del Instituto Jacques Monod (París, Francia) y su equipo, expertos en esta técnica (Labbe *et al.*, 1985). Como se observa en la figura R.15 en el mutante obtenido la actividad *coproporfirinógeno oxidasa* es nula en la fracción soluble libre de membranas.

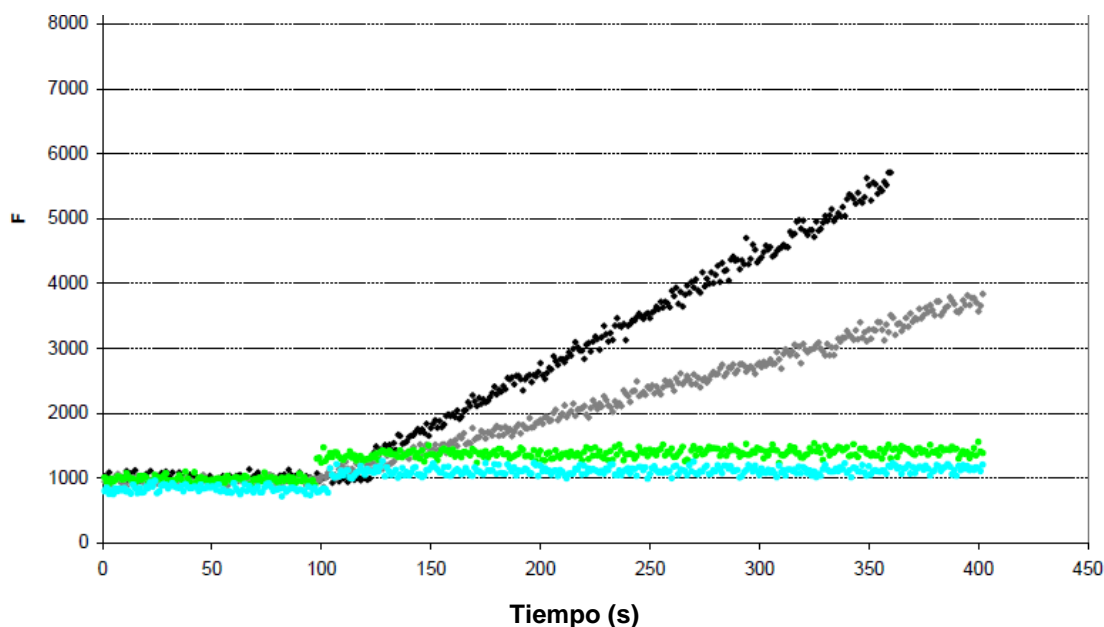


Figura R.15. Actividad *coproporfirinógeno oxidasa* medida en el mutante $\Delta Kihem13::KanMX4$ y en su cepa isogénica salvaje utilizando distintas cantidades de extracto (50 y 25 μ l) procedente de la fracción soluble carente de membranas celulares. En negro y en gris se muestra la actividad obtenida en la cepa salvaje con 50 y 25 μ l, respectivamente, de la fracción soluble libre de membranas mitocondriales y demás orgánulos. En verde y en azul se muestra la actividad obtenida en la cepa mutante con 50 y 25 μ l, respectivamente, de la fracción soluble libre de membranas mitocondriales y demás orgánulos. Como se puede observar el mutante carece de actividad *coproporfirinógeno oxidasa*. En la cepa salvaje se han obtenido unas tasas de generación de protoporfirina de 9,48 μ M/h y de 5,17 μ M/h para 50 y 25 μ l de fracción soluble añadida, respectivamente.

4. Determinación del punto de inicio de la transcripción

4.1. Primer extension

En levaduras es frecuente que existan varios puntos para el inicio de la transcripción de un gen (Chen y Struhl, 1985). La determinación de los puntos de inicio de la transcripción resulta muy útil para determinar el

tamaño del promotor mínimo y porque en algunos casos, en los que se producen varios puntos de inicio, la frecuencia de utilización de los mismos puede formar parte de un proceso de regulación de la expresión del gen. Para la determinación de los puntos de inicio de la transcripción de *KIHEM13* utilizamos la técnica de *primer extension*. Se extrajo RNA total de la cepa MW190-9B transformada con el gen *KIHEM13* clonado en el plásmido episómico de *K. lactis* pSK1 (Prior *et al.*, 1993) para incrementar los niveles de mRNA. A continuación se procedió a la obtención de cDNA específico de *KIHEM13* mediante el uso de una retrotranscriptasa y un cebador que hibrida en las proximidades del extremo 5' de la secuencia codificadora de *KIHEM13* y dirigido hacia el promotor del gen. El cebador hibrida específicamente sobre el mRNA del gen *KIHEM13* y la retrotranscriptasa genera el DNA complementario hasta el límite 5' del transcrito. Los fragmentos de cDNA, junto con una escalera de secuenciación obtenida con el mismo cebador se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.

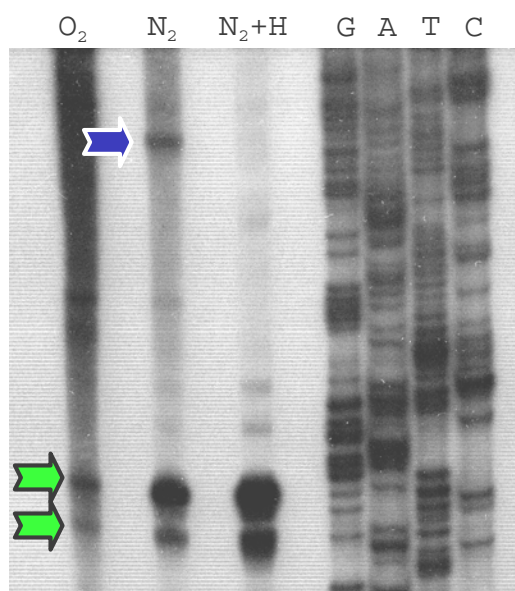


Figura R.16. *Primer extension* realizado para la determinación del punto de inicio de la transcripción de *KIHEM13* con el cebador ECV405M (Tabla R.8). Los dos principales puntos de inicio de la transcripción que aquí se han marcado con unas flechas verdes, aparecen posicionados sobre la secuencia de la región 5' no traducida de *KIHEM13* en la figura R.18. Con la flecha azul se indica la posición de un posible punto de inicio de la transcripción específico de hipoxia (N₂) en el gen *KIHEM13*. O₂: condiciones aeróbicas. N₂+H: condiciones hipóxicas con suplemento de hemina. G, A, T, C: carriles correspondientes a la secuenciación de *KIHEM13* por el método de Sanger.

En el experimento realizado se extrajo RNA (utilizando *Trizol*TM) a partir de cultivos celulares en tres condiciones de crecimiento: aerobiosis, hipoxia e hipoxia con suplemento de hemina en el medio CM-URA (sin uracilo). Las condiciones de hipoxia de los cultivos se generaron mediante burbujeo de nitrógeno durante tres horas. Como se puede observar en la figura R.16, existen dos puntos donde se produce el inicio de la transcripción de forma predominante (marcados con dos flechas verdes finas). Estos sitios se han marcado sobre la secuencia promotora en la figura R.18. Se puede observar como la banda de cDNA es más intensa en el caso de condiciones hipóxicas, lo cual es un reflejo de la mayor expresión del gen en esas condiciones. Además en posición 5' respecto de los puntos de inicio anteriormente señalados, aparece una banda de menor intensidad sólo en condiciones de hipoxia (señalada con una flecha azul). Debido a la compresión de la reacción de secuenciación en esta zona resultaba imposible determinar cuál era el punto exacto donde se localiza este inicio

de la transcripción en la secuencia del promotor. Para solucionar este problema se llevó a cabo un segundo experimento de *primer extension*, utilizando para ello otro cebador específico ECV300M (tabla R.8) que hibrida en posición 5' respecto al utilizado en el experimento anterior y que permitiría obtener fragmentos de cDNA más pequeños y de mejor resolución en el gel de poliacrilamida.

Figura R.17. *Primer extension* realizado para la determinación del punto de inicio de la transcripción de *KIHEM13* con el cebador ECV300M (Tabla R.8). Con la flecha negra se indica la posición de un posible punto de inicio de la transcripción específico de hipoxia (N₂) que se encuentra por encima del primer hipotético punto de inicio de la traducción en pauta y que coincide con el observado en el *primer extension* de la figura R.16. Además, señalados con flechas blancas, se pueden observar otros posibles puntos de inicio de la transcripción. O₂: condiciones aeróbicas. N₂+H: condiciones hipóxicas con suplemento de hemina. G, A, T, C: carriles correspondientes a la secuenciación de *KIHEM13* en el plásmido pSK1. C-: controles negativos.

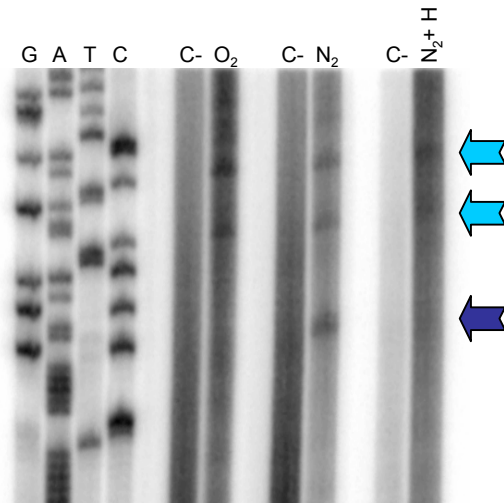


Tabla R.8. Cebadores empleados para la obtención del DNA complementario de *KIHEM13* para los experimentos de *primer extension*.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV300M	ATGTAAAGTTTTATCAATGATTCTGC	Crick
ECV405M	AGTATCCAAAGTTTCCAGAC	Crick

Como se puede comprobar en la figura R.17, el punto de inicio específico de las condiciones hipóxicas pudo ser localizado en este segundo experimento y además se localizaron otra serie de puntos de inicio de la transcripción situados en posiciones 5' respecto del anterior y que no resultaban específicos de las condiciones de cultivo. Todos ellos aparecen localizados sobre la secuencia del promotor de *KIHEM13* en la figura R.18.

RESULTADOS

```

-557 CCATCAATGTCGTATCTTGAATGTATGTTGGTTTCAGCCTCTATTTCTCTCGTAGATAGTA
-497 GTATGTTCGAATGGTTCACCTTGACCTTTTTTTTTTTCAGTATATA CGGTTTAACTAAAC
-437 GAATGCTGACGCCTATGTCTCCGTTTCAGACCATAATAATGATACAGTAGTGTATATAT
-377 TCATCTTGTGGTGCTCGGACTGCCACTATTGTGATGAGATTCTTGTATCTCGTATCTTTT
-317 CCTCTTCCTGTATGCGGTGGAACTAGCTAGCCTTTTTTCTTCAATTACCTTTATCCA AA
-257 TTATCACCAGGTCTGAATCTTGAAGTCTGCTTCTTTTTGGATTTTTTTTTTTTTGACTAT
-197 ATTAACGAAAGTGAATTATTCCATTGACTCACCAACTGAAATGAGAAGAGAAGCATTGG
-137 ATCTATACTGCCCTTTTCTCTCCAATCAAGCAGAATCATTGATAAACTTTACATCCAGT
                                     ← ECV300M
- 77 ATACTTGTCTGGTAAAGCAAACAGAACTCAACGACC GGTTTCATCTTAACACACATTCTA
- 17 AATATTATCATTGTGCGATGACAGATTACAAGTGCCAATTAGAGAGAGAATGGAGGCCT
+ 44 TAGTGCGCCGAAACAGCAAGAAATTACCAAGG GTCTGGAACTTTGGATACTGTAAAGT
                                     ← ECV405M

```

Figura R.18. Localización sobre el promotor de *KIHEM13* de los puntos de inicio de la transcripción determinados mediante *primer extension*. Las regiones donde se han diseñado los cebadores utilizados aparecen subrayadas y con su nombre debajo. Las cajas TATA (correspondientes a un consenso TATANA no degenerado o degenerado en una base) se muestran en rojo. Se muestra en turquesa el primer ATG en pauta y los posibles puntos de inicio por encima del mismo. En azul oscuro se indica un hipotético punto de inicio de la transcripción que sólo aparece en hipoxia. En verde se muestra el segundo ATG en pauta y los posibles puntos de inicio, encontrados con ECV405M, por encima del mismo y por debajo del anterior. Numeración relativa al segundo ATG en pauta.

Como se ha comentado en el apartado de análisis comparativo de la estructura de la CPO de *K. lactis* frente a la de otras enzimas de levaduras o de eucariotas superiores (página 100 y siguientes), la ORF traducida a partir del primer ATG del gen de *KIHEM13* (marcado en la figura R.18 en turquesa) da lugar a un extremo amino-terminal que no se encuentra presente en otras CPO de levaduras, pero que sí muestra homologías con presecuencias de eucariotas superiores. En cambio, si se traduce a partir del segundo ATG (marcado en la figura R.18 en verde) el alineamiento con las CPO de levaduras es mayor en el extremo amino. En levaduras, en la mayor parte de los ejemplos conocidos, la región codificadora que se traduce a proteína coincide con la mayor ORF en pauta de lectura (Kozak, 1998). Como la traducción se realiza sobre un mRNA previamente transcrito, es importante conocer experimentalmente los puntos de inicio de la transcripción para poder determinar si ambos ATG se encontrarán presentes en el mRNA que va a ser traducido. De los resultados obtenidos en los experimentos de *primer extension* se deduce que los dos puntos de inicio de la transcripción más importantes detectados darían lugar a un mensajero que sólo contiene el segundo ATG; aunque en condiciones de hipoxia y minoritariamente también en condiciones aeróbicas o en hipoxia pero en presencia de hemina existen otros puntos de inicio de la transcripción que darían lugar a un mensajero que contiene también el primer ATG.

Con el fin de verificar estos resultados en una cepa que no sobre-expresase el mensajero de *KIHEM13*, se utilizó una segunda estrategia experimental mediante el diseño de una serie de reacciones de RT-PCR que se describen en el apartado siguiente.

4.2. Determinación de la naturaleza del extremo 5' del mRNA de *KIHEM13* mediante RT-PCR

Para ello se diseñó un cebador sobre la hebra de Crick que hibrida de forma específica con la secuencia codificadora del gen *KIHEM13* y dirigido hacia los potenciales codones de inicio de la traducción. Este cebador (ECV552M) fue utilizado para la obtención de cDNA específico del gen mediante retrotranscripción usando como molde RNA total (libre de DNA) extraído de la cepa salvaje de *K. lactis* MW190-9B, cultivada tanto en condiciones aeróbicas como hipóxicas. Una vez obtenido el cDNA específico de *KIHEM13*, éste fue utilizado como molde en dos reacciones de PCR llevadas a cabo con tres cebadores distintos (Tabla R.9): un único cebador para las dos reacciones, situado sobre la hebra de Crick por encima del usado para la obtención del cDNA (ECV550M) y dos cebadores superiores, diseñados ambos sobre la hebra de Watson (Figura R.19). Uno de estos cebadores (ECV551M) contiene el primer ATG, mientras que el otro (ECV548M) fue diseñado unos pares de bases 5' del segundo ATG, hallado en pauta con el primero. El objetivo de esta prueba es determinar si el cDNA, y por tanto el mRNA, contiene los dos TICs o solamente el segundo de ellos. Si se obtiene producto de PCR tanto con ECV551M como con ECV548M es que el cDNA contiene ambos posibles TICs. En el caso de que sólo se obtenga producto de PCR cuando se utilice el segundo de los cebadores superiores es que el cDNA sólo contiene el segundo TIC y, por tanto, la traducción no podría iniciarse desde el primero.

Como se puede observar en la figura R.20, se ha obtenido producto de PCR en ambos casos, de lo que se puede deducir que el cDNA específico de *KIHEM13*, producido tanto en condiciones aeróbicas como hipóxicas, contiene los dos ATG que podrían actuar como TICs en la traducción del mRNA.

RESULTADOS

```

-257  TTATCACCAGGTCTGAATCTTGAAGTCTGCTTGCTTTTTGGATTTTTTTTTTTTTTGGACTAT
-197  ATTAACGAAAGTGAATTATTCCATTGACTCACCAACTGAAATGAGAAGAGAAGCAATTGG
                                     ECV551M  →
-137  ATCTATACTGCCCTTTTCTCTCCAATCAAGCAGAATCATTGATAAAACTTTACATCCAGT
-77   A TACTTGTCTGGTAAAGCAAACAGAAACTCAACGACCGGTTTCATCTTAACACACATTCTA
      ECV548M  →
-17   AATATTATCATTGTGCGATGACAGATTACAAAGTGCCAATTAGAGAGAGAATGGAGGCCT
+44   TAGTGCGCCGGAAACAGCAAGAAATTACCAAGGGTCTGGAAACTTTGGATACTGTAAAGT
+104  TTCAAGCCGATTCTTGGGATCGTGGCAACAACGGTGGTGGCGGTGTCTCGATGGTGTTC
+164  AGAATGGTACTACGTTTGAGAAAGGTGGTGTTAATGTCAGTGTGGTTCATGGGAACTTGA
+224  GTCCACCTGCTATCAAGGCTATGAAAGCGGACCACAAAAATTTGCATCTGCCTATTGATC
+284  CTGCAACTGGTGAAC CAGATGCAACAGGAGTAAAATTTCTTCGCCTGTGGTCTCTCTATGG
                                     ← ECV550M
+344  TTATTCATCCAATTAATCCACATGCGCCAACCACCCATTTGAATTATAGGTATTTTGAAA
+404  CCTGGAATGCGGACGGTACACCACAAGCTTGGTGGTTCGGTGGTGGTGCTGATTTAACTC
                                     ← ECV552M
+464  CTTCTTATTTGTACGAGGAAGACGCTAAATTGTTCCATCAATTGCACAAGGATGCTTTGG
  
```

Figura R.19. Esquema de las posiciones relativas de los cebadores utilizados para determinar qué **ATG** contiene el mRNA. También se han posicionado con la misma marca los posibles puntos de inicio de la transcripción.

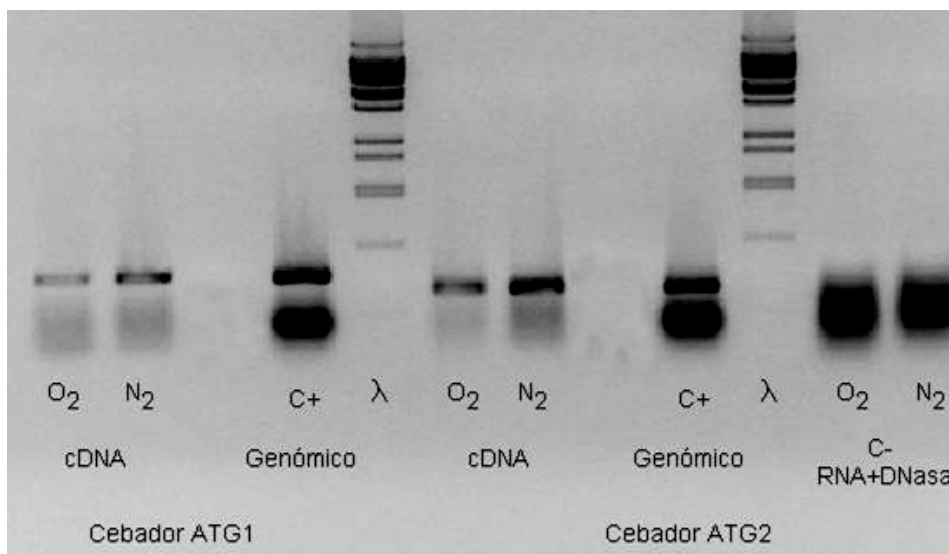


Figura R.20. PCR de comprobación del mRNA de *KIHEM13*. Tras obtener cDNA específico de *KIHEM13* (ECV552M) se llevaron a cabo reacciones de PCR con un mismo cebador inferior (ECV550M) y dos cebadores superiores (AT1 y AT2). C+: controles positivos de PCR utilizando como molde genómico de *K. lactis* de la línea MW190-9B. C-: controles negativos para descartar la presencia de DNA en las muestras de RNA (PCR utilizando de molde el RNA tratado con DNasa y los cebadores ECV548M y ECV550M). O₂ y N₂, muestras de RNA extraídas de la línea de *K. lactis* MW190-9B cultivada en aerobiosis e hipoxia, respectivamente, a partir de las cuales se obtuvo el cDNA de *KIHEM13*. λ: marcador de tamaños moleculares *BstEII lambda*.

Tabla R.9. Cebadores utilizados para la obtención y amplificación de cDNA específico de *KIHEM13*.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV548M (ATG2)	TGGTAAAGCAAACAGAAACTG	Watson
ECV550M	ATTTTACTCCTGTTGCATCTG	Crick
ECV551M (ATG1)	ACTGAAATGAGAAGAGAAGCA	Watson
ECV552M	AGAAGGAGTTAAATCAGCAC	Crick

5. Estudios de expresión heteróloga de *KIHEM13* en cepas de *S. cerevisiae* mutantes para genes reguladores relacionados con la respuesta a hipoxia

5.1. Obtención de una fusión del promotor de *KIHEM13* al gen reportero *lacZ* en el vector YEp365

El plásmido YEp365 (Myers *et al.*, 1986) contiene el gen reportero *lacZ* y puede utilizarse para medir la actividad de promotores fusionados. El producto de PCR de 1026 pb, amplificado a partir de DNA genómico de la cepa de *K. lactis* MW190-9B utilizando los cebadores ECV154M y ECV163M descritos en la tabla R.13, incluye el promotor de *KIHEM13*. Este fragmento se insertó en los sitios de clonación situados en el vector YEp365 regulando la expresión del gen que codifica la β -galactosidasa y la construcción fue verificada mediante análisis de restricción y secuenciación.

5.2. Actividad del promotor de *KIHEM13* en cepas de *S. cerevisiae* silvestre y mutantes con deleciones para los genes reguladores *ROX1* y *MGA2*

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (González-Domínguez *et al.*, 2000) indicaban que el gen *KIHEM13* es un gen hipóxico que incrementa su expresión en condiciones de deficiencia de oxígeno. En *S. cerevisiae* está disponible una colección completa de cepas delecionadas en cada uno de los genes de esta levadura (Colección de EUROSCARF). Aprovechamos la existencia de estas herramientas para tratar de dilucidar, mediante análisis de la expresión heteróloga del promotor de *KIHEM13* en cepas seleccionadas de dicha colección, si el incremento de la expresión en condiciones hipóxicas se debía a la eliminación del efecto represor que ejerce Rox1 en condiciones aeróbicas o a un efecto activador en condiciones hipóxicas mediado por Mga2. Está descrito que el gen *HEM13* de *S. cerevisiae* incrementa su expresión en condiciones aeróbicas en un mutante Δ *rox1* (Keng, 1992). Aunque no se ha descrito todavía en la bibliografía ningún efecto directo de Mga2 sobre el gen *HEM13* de *S. cerevisiae*, si se ha determinado que Mga2 participa en la activación hipóxica de otros genes de *S. cerevisiae* (Jiang *et al.*, 2001).

La construcción reportera descrita en el apartado anterior fue utilizada para transformar las cepas de *S. cerevisiae* Y0000 (salvaje), Y05484 (Δ *rox1*) y Y05968 (Δ *mga2*) y los transformantes fueron seleccionados en CM-URA. Se realizaron cultivos en condiciones de hipoxia (jarras con generador

anaeróbico como se describe en Materiales y Métodos) o aerobias y se determinó la actividad β -galactosidasa en células permeabilizadas con SDS y cloroformo (Rose *et al.*, 1990). Los ensayos se realizaron por duplicado y la actividad se expresó en unidades Miller ($A_{420} \times 1000/A_{600} \times \text{min} \times \text{ml}$). Los resultados se muestran en la tabla R.10.

Tabla R.10. Actividad del promotor de *KIHEM13* desde el primer ATG en cepas de *S. cerevisiae* mutantes para los genes reguladores *ROX1* y *MGA2*, así como en su cepa salvaje de procedencia.

Cepa	Descripción	Condiciones de cultivo	Actividad β -galactosidasa (unidades Miller)
Y00000	Salvaje	Hipoxia	3.01
Y05968	Δ <i>mga2</i>	Hipoxia	3.85
Y00000	Salvaje	Aerobiosis	0.03
Y05484	Δ <i>rox1</i>	Aerobiosis	0.04

Los resultados obtenidos indican que los factores reguladores Rox1 y Mga2 de *S. cerevisiae* no ejercen un papel regulador sobre el promotor de *KIHEM13*, al menos en el fondo genético de las cepas de EUROSCARF y en las condiciones ensayadas.

6. Análisis de los elementos reguladores del promotor de *KIHEM13*

Experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio por la Dra. González-Domínguez y que se muestran en la figura R.21 demostraron que el gen *KIHEM13* es un gen hipóxico ya que sus niveles de mRNA aumentan cuando disminuye la disponibilidad de oxígeno. Además el gen está reprimido por hemo. La expresión del gen en condiciones aerobias se incrementa en un mutante para la enzima δ -aminolevulinato sintasa si el cultivo se realiza en presencia de bajas concentraciones de δ -aminolevulinato (ALA), producto de la reacción, pero disminuye al incrementar su concentración. La adición de hemo al medio en condiciones hipóxicas no tiene efecto notable sobre los niveles de mRNA.

6.1. Análisis *in silico* del promotor

Utilizando el programa *RSA-tools* se llevó a cabo un análisis del promotor de *KIHEM13* para buscar en él las secuencias consenso a las que potencialmente podrían unirse factores de transcripción como los que en *S. cerevisiae* participan en la regulación génica dependiente de oxígeno y/o hemo.

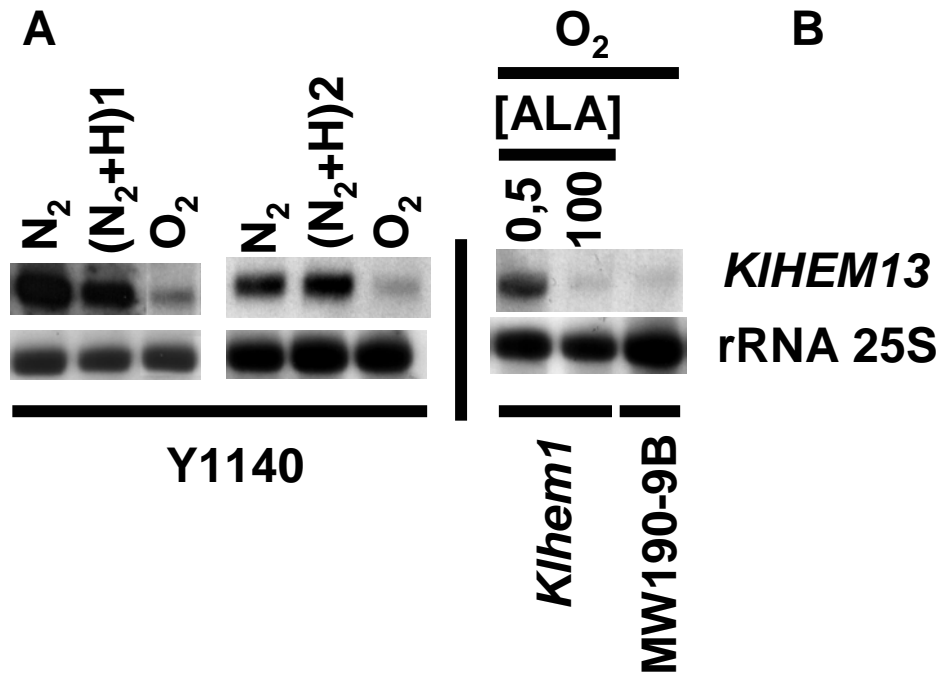


Figura R.21. Análisis mediante *Northern blot* de la expresión de *KIHEM13* en las cepas silvestres Y1140 y MW190-9B y en la cepa mutante derivada de ésta última, *Kihem1*. **A.** En condiciones de transición de condiciones hipóxicas, creadas mediante burbujeo de nitrógeno (N₂), a condiciones aeróbicas (O₂). También se recoge la ausencia de efecto de la adición de dos concentraciones de hemina (N₂+H) al medio de cultivo en condiciones hipóxicas (1: 13 μg/ml; 2: 26 μg/ml). **B.** Expresión de *KIHEM13* en la cepa silvestre MW190-9B y en la mutante para *KIHEM1* (*Kihem1*) en presencia de bajas concentraciones de ALA (0,5 μg/ml), imprescindibles para el crecimiento, y concentraciones más elevadas (100 μg/ml) que causan una disminución de la expresión, similar a la encontrada en la cepa silvestre. La sonda de *KIHEM13* fue un fragmento interno de la ORF de 323 pb. Como control de carga se utilizó el RNA ribosómico 25S.

Los resultados obtenidos, junto con una comparativa de la misma búsqueda llevada a cabo sobre el promotor del gen *HEM13* de *S. cerevisiae* se recogen en la tabla R.11 y en la figura R.22. En la búsqueda se incluyeron los consensos para los factores reguladores Hap1, Rox1 y Mot3, cuya influencia directa sobre el promotor de *HEM13* en *S. cerevisiae* ya ha sido demostrada experimentalmente y comentada en la introducción de esta memoria, y también otros consensos que no se ha publicado que actúen sobre el gen *HEM13*, pero si lo hacen sobre otros genes relacionados con la respuesta a hipoxia en *S. cerevisiae*. Entre ellos se incluyen en primer lugar el consenso para el complejo Hap2/3/4/5 que participa en la regulación por hemo y fuente de carbono (Zitomer y Lowry, 1992; Matoon *et al.*, 1990); en segundo lugar, los consensos AR1 y AR2 que se han relacionado con la activación hipóxica de un grupo de genes (*DAN*, *TIR*, *ERG*) regulados por Upc2 y que pertenecen a un regulón diferente al de Rox1 (Abramova *et al.*, 2001a, 2001b; Ter Linde *et al.*, 2003); en tercer lugar el consenso LORE al que se une un complejo de proteínas activadoras en condiciones hipóxicas del que forma parte Mga2 (Jiang *et al.*, 2001); y finalmente los consensos DRE1 y DRE2. Sobre el consenso DRE1 y en condiciones aeróbicas se une un represor desconocido que es desplazado en hipoxia por los factores Sut1/Sut2 (Ter Linde *et al.*, 2003).

RESULTADOS

Utilizando el programa LALING (Huang *et al.*, 1991) se buscaron también secuencias comunes conservadas que se encontrasen en los promotores de ambos genes, *KIHEM13* y *ScHEM13*, aunque no hubiesen sido previamente reconocidas como reguladoras. Los resultados de esta búsqueda se muestran en la tabla R.12.

Tabla R.11. Análisis comparativo de la presencia de consensos para la unión de factores reguladores relacionados con hipoxia en los promotores de los genes *KIHEM13* y *ScHEM13* (H, hebra. D, directa. R, reversa. nc, número de cambios respecto al consenso buscado). Las posiciones para el promotor de *KIHEM13* están numeradas con referencia al primer ATG. Consensos: Hap1, CGGN₆CCG y CGGN₆CGG (N: cualquier nucleótido); Hap2/3/4, CCAAT; Rox1, YYYATTGTTCTC (Y, pirimidinas, C ó T); Mot3, TRCCTD (R, purinas, A ó G; D, cualquiera menos C); AR1, TCGTTYAG (Y, pirimidinas, C ó T); AR2, AAAAATTGTTGA; LORE, ACTCAACAA; DRE1, AACGCGCAGG; DRE2, AACGCGTGCC.

<i>ScHEM13</i>					<i>KIHEM13</i>				
Factor	Secuencia	H	nc	Posición	Secuencia	H	nc	Posición	
Hap1	CGGTTACAGCG	D	1	-524 -513	CCGCGCGCTCGG	D	2	-576 -565	
	CTGGGATTACCG	D	2	-441 -430					
	CGGCTCCGCGGG	D	1	-361 -350					
	CGCAAGATCCGG	R	1	-782 -771	CCGCGCGCTCGG	D	1	-576 -565	
	CGGATCGTCCGT	R	1	-218 -207					
Hap2/3/4	CCAAT	D	0	-268 -264	CCAAT	D	0	-798 -794 -416 -412	
Rox1	TATATTCTTCTC	D	2	-890 -879	TCTATTGTTTTC	D	1	-835 -824	
	CCGTTTGTCTC	R	2	-790 -779	TTTATGATTCTC	R	2	-728 -717	
	TCAATTGTTTAG	D	2	-474 -463	TCTATTCTCTC	D	2	-363 -352	
	TTTCTGGTTCTC	D	2	-283 -272					
	CCCATTGTTCTC	D	0	-188 -177					
Mot3	TACCTA	D	0	-1016 -1011	TGCCTA	R	0	-461 -456	
	TACCTT	R	0	-1004 -999	TACCTT	D	0	-115 -110	
	TACCTT	R	0	-997 -992					
	TGCCTT	R	0	-726 -721					
	TGCCTA	R	0	-496 -491					
	TGCCTT	D	0	-461 -456					
	TGCCTA	R	0	-426 -421					
AR1	TCGTTACAC	D	1	-611 -604	TCGTTCTCT	R	2	-708 -701	
	TTGTTTAG	D	1	-473 -466	TCGGTTAC	D	2	-568 -561	
	TCTTTCAG	R	1	-389 -382	TGGTTCAG	D	1	-373 -366	
	TCGTTTAA	R	1	-338 -331	TCGTTTAG	R	0	-287 -280	
	TCGTTTCG	D	1	-178 -171					
AR2	-	-	-	-	-	-	-	-	
LORE	ATTCAAGAA	D	2	-1025 -1017	ACTGAAAAA	D	2	-978 -970	
	TATCAACAA	R	2	-707 -699	ACTGAAAAA	R	2	-311 -303	
	TTTCAACAA	D	2	-664 -656	ACTAAACGA	D	2	-288 -280	
	TCTAAACAA	R	2	-473 -465					
	GCTTAACAA	R	2	-116 -108					
DRE1	-	-	-	-	-	-	-	-	
DRE2	-	-	-	-	-	-	-	-	

Amillet y colaboradores en el año 1996 (Amillet *et al.*, 1996) definieron en la región promotora del gen *ScHEM13* un elemento activador (UAS) que era necesario para la expresión basal en condiciones aeróbicas. Este elemento UAS está integrado por 40 pb y contiene una secuencia de 16 pb que incluye dos bloques con simetría díada (TCN₁₁GA) y el consenso solapante CGAGTCG flanqueado por una región rica en GC. Hemos buscado una secuencia similar en el promotor de *KIHEM13* pero no la hemos localizado.

Tabla R.12. Secuencias comunes en los promotores de *KIHEM13* y *ScHEM13*. Las posiciones para el promotor de *KIHEM13* están numeradas con referencia al primer ATG. nts: número de nucleótidos de la secuencia; % id: identidad; Sc pos: posiciones en el promotor de *ScHEM13*; K/ pos: posiciones en el promotor de *KIHEM13*. W: A ó T; Y: C ó T; R: G ó A; S: G ó C; K: G ó T; M: A ó C. En **negrita** se resalta la región encontrada con mayor coincidencia en posición y secuencia en los dos promotores.

Secuencia	nts	% id	Sc pos	K/ pos
TAATTRYTCYRTRTATATTSTWYTCC	27	70,4	-921 -895	-842 -816
CYATTTTCYYKCGKAGWTWKTASTRTGTTYG AAAYGGTTC	39	66,7	-566 -527	-370 -331
ATAGGCACGGTAYT	14	92,9	-504 -491	-462 -449
GGTMTWTRWTTTCAATTGTTT	23	78,3	-496 -475	-858 -834
ATCTCGTATCT	11	100	-1.079 -1068	-177 -166
GGRTTTTTYTTTTTTTGASYATATYAA	26	80,8	-93 -68	-62 -37

6.2. Fusiones en pXW1 al gen reportero *lacZ* desde el primer ATG de la ORF de *KIHEM13* (ATG1)

Para llevar a cabo el estudio de expresión del gen *KIHEM13* se procedió a fusionar distintos fragmentos de su región 5' a la secuencia codificadora del gen informador *lacZ* que, como ya se ha comentado, codifica para la β -galactosidasa de *E. coli*. Las fusiones a *lacZ* se han realizado en el vector pXW1, un vector idóneo para el trabajo en *K. lactis* puesto que posee un origen de replicación que le permite estabilidad en dicha levadura, pero que presenta también algunos inconvenientes entre los cuales destaca la falta de un promotor mínimo delante de la secuencia codificadora de *lacZ*. Este elemento, necesario para la transcripción basal pero no regulado, sería útil para fusionar al informador cualquier fragmento a estudio sin necesidad de aportar un promotor mínimo. Esto condicionó que realizásemos dos tipos de construcciones mediante fusiones de distintos fragmentos promotores que incluyesen el primer o segundo ATG de la ORF de *KIHEM13* en pauta de lectura con el octavo codón de la CDS de *lacZ*, presente en el vector pXW1.

En primer lugar, se realizaron una serie de fusiones de fragmentos de la región 5' de *KIHEM13* a *lacZ*, teniendo en cuenta como referencia para realizar la fusión el primer ATG. En dichas construcciones se incluyó, además del ATG necesario para iniciar la traducción de *lacZ*, una serie de nucleótidos de la secuencia codificadora de *KIHEM13* por motivos de

optimización del diseño del cebador. En estas fusiones los únicos puntos de inicio presentes para el inicio de la transcripción son los situados por delante de ATG1 (los señalizados en azul turquesa o azul oscuro en la figura R.18).

La fusión más larga contiene 1.025 pb, le sigue un fragmento de 624 pb, uno de 561 pb, 403 pb, 344 pb, 140 pb y, el más pequeño, 93 pb. Los nombres asignados a estas fusiones son, respectivamente, P, D1, D2, D3, D4, D5 y D6, tal y como aparecen en la figura R.22. Los cebadores utilizados para la obtención de las PCRs necesarias para la realización de estas construcciones aparecen listados en la tabla R.13. Se caracterizan porque todos los cebadores 5' (hebra de Watson) llevan en su extremo 5' un sitio para la digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, mientras que el cebador 3' (hebra de Crick) utilizado para la fusión, lleva en su extremo 5' un sitio para la digestión con la endonucleasa de restricción *Sal*I. Estos sitios son los mismos que permiten la clonación en el vector pXW1 (ver el esquema del vector en la sección de Materiales y Métodos). Todas las construcciones, excepto la P, fueron realizadas en primer lugar en el vector *pGEM*TM *T-easy*TM y luego pasadas a pXW1. Se comprobaron mediante análisis de restricción y se secuenciaron para detectar posibles mutaciones introducidas durante el proceso.

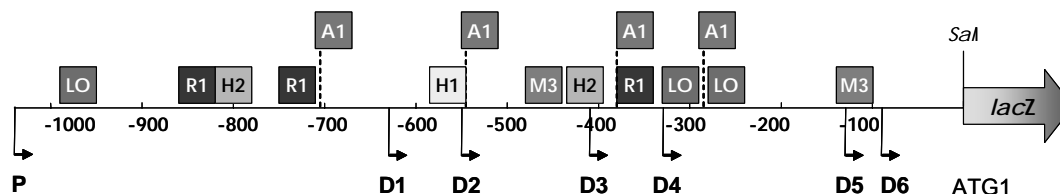


Figura R.22. Esquema donde se representan los distintos fragmentos (P y D1 a D6) de la región 5' de *KIHEM13* que se han fusionado a *lacZ* en pXW1, en pauta con el ATG1. Además se muestran posicionadas las secuencias similares a los consensos definidos en *S. cerevisiae* para la unión de una serie de factores relacionados con la regulación de genes hipóxicos. LO: LORE (*L*ow *O*xygen *R*esponse *E*lement) R1: Rox1, H2: Hap2/3/4, A1: AR1, M3: Mot3.

Tabla R.13. Cebadores utilizados para la amplificación de distintos fragmentos de la región 5' de *KIHEM13* y su fusión, incluyendo el ATG1 de *KIHEM13*, a *lacZ* de pXW1. En **negrita** se muestran las dianas para las endonucleasas de restricción empleadas (*Sal*I y *Bam*HI).

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV154M	gtcgac GGCTTCTTCTTCATTTTCAGTT	Crick
ECV155M (D1)	ggatcc GGCTACTACTCATTTTCTCGAA	Watson
ECV156M (D2)	ggatcc CCACAAACACATCACCTAATA	Watson
ECV157M (D3)	ggatcc CTCCATCAATGTCGTATCTT	Watson
ECV158M (D4)	ggatcc GTAGTATGTTTCGAATGGTTCC	Watson
ECV159M (D5)	ggatcc ACTAGCTAGCCTTTTTTCTTC	Watson
ECV160M (D6)	ggatcc AGGTCTGAATCTTGAAGTCTG	Watson
ECV163M (P)	gggggatcc TTTTTTGGCATGGAAGGAACG	Watson

La cepa de *K. lactis* MW190-9B se transformó con las construcciones obtenidas, y los transformantes se seleccionaron en placas CM-URA. La actividad β -galactosidasa se midió en condiciones aeróbicas con dos fuentes de carbono, lactato 2% y glucosa 2%, y en hipoxia generada en jarras con

un generador anaeróbico, en este caso utilizando como fuente de carbono glucosa al 2%. Las actividades β -galactosidasa que se obtuvieron para esta serie de construcciones eran muy bajas y por ese motivo no pudieron cuantificarse en células permeabilizadas. Las medidas se realizaron a partir de extractos proteicos para mejorar la sensibilidad. Los datos obtenidos se muestran en la figura R.23.

Respecto a las medidas realizadas en condiciones aeróbicas, la actividad correspondiente a la construcción mayor (P), es pequeña en glucosa al 2%, pero se incrementa al utilizar una fuente de carbono que no puede ser fermentada como es el lactato. Para el resto de construcciones, los niveles de actividad β -galactosidasa, medidos en glucosa al 2% y lactato al 2% en condiciones aeróbicas, no son significativamente diferentes. Desde la construcción P a la D1 se elimina un sitio potencial para la unión de Hap2/3/4/5 que en otros genes está relacionado con la regulación por fuente de carbono.

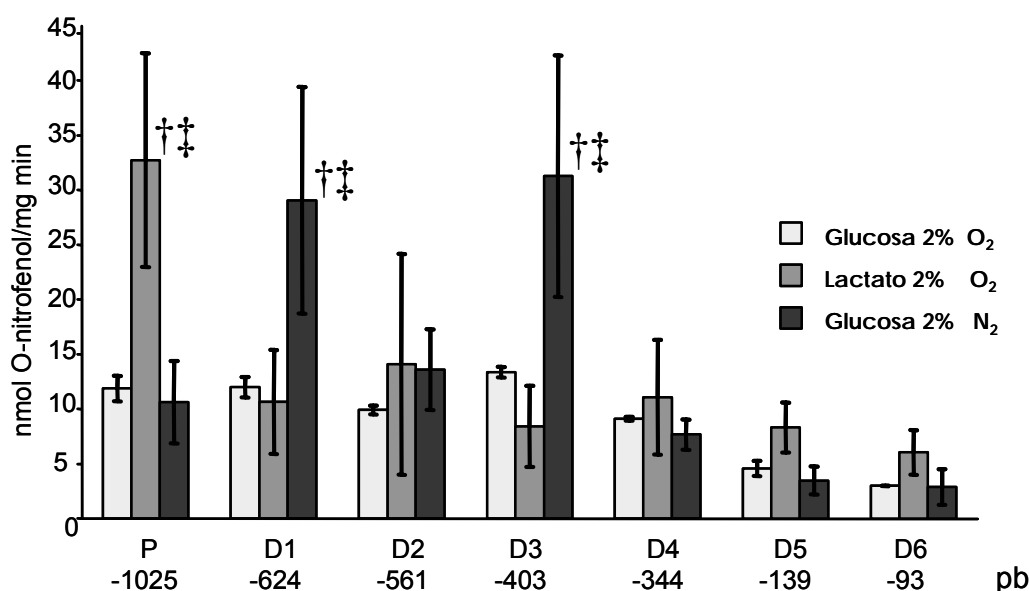


Figura R.23. Actividad β -galactosidasa de las construcciones P y D1-D6. Los valores están expresados como la media de cuatro medidas y las barras indican el error estándar. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante el test de comparación múltiple con un nivel de confianza del 95%. † denota diferencias significativas con los datos obtenidos para el resto de las construcciones en células cultivadas en iguales condiciones y ‡ denota diferencias significativas con los datos obtenidos con la misma construcción en las otras condiciones de cultivo.

En lo que se refiere a la comparación entre las medidas realizadas en condiciones aeróbicas e hipóxicas, sólo en las construcciones D1 y D3 se produce un incremento considerable (de aproximadamente dos veces) en la actividad β -galactosidasa en condiciones hipóxicas. El hecho de que la construcción P no responda a hipoxia indica que tal vez incluya regiones represoras que en condiciones fisiológicas se vean compensadas por factores activadores localizados 5'. Al pasar de D1 a D2 se elimina un sitio para la unión de Hap1 que podría ser importante para la activación hipóxica. La región de -561 a -403 parece contener elementos represores de la

activación hipóxica desconocidos que al ser eliminados permiten la activación hipóxica. La eliminación de los sitios Rox1 al pasar de P a D1 y de D3 a D4 no incrementa la actividad aeróbica, lo que pone en duda la funcionalidad de estos sitios en el promotor de *KIHEM13*. La activación hipóxica se pierde al pasar de D3 a D4 (-403 a -344 desde el primer ATG ó -559 a -500 desde el segundo ATG) lo que indica que contiene elementos importantes para esta regulación. La ausencia de actividad en las construcciones D5 y D6 puede estar relacionada con el hecho de que ya no contienen elementos necesarios para actuar como un promotor mínimo (tienen puntos de inicio de la transcripción pero no TATA).

6.3. Fusiones en pXW1 al gen reportero *lacZ* desde el segundo ATG de la ORF de *KIHEM13* (ATG2)

Se realizaron tres fusiones a *lacZ* en pXW1 de distintas regiones promotoras de *KIHEM13*, esta vez tomando como inicio de la pauta de lectura de *KIHEM13* para fusionar al octavo codón de *lacZ*, el ATG2. La fusión más larga contiene 1.202 pb, le sigue una de 650 pb y, finalmente, una de 443 pb, denominándose respectivamente P2, SX y PM. A las construcciones se les ha añadido, además del ATG para iniciar la traducción de *lacZ*, una serie de nucleótidos de la secuencia codificadora de *KIHEM13* por motivos de optimización del diseño del cebador. En estas fusiones están presentes todos los puntos de inicio de la transcripción determinados experimentalmente que se muestran en la figura R.18) Estas construcciones aparecen representadas en la figura R.24 y la secuencia de los cebadores empleados se presenta en la tabla R.14. Se caracterizan porque todos los cebadores superiores (hebra de Watson) llevan en su extremo 5' unos sitios para la digestión con la endonucleasa de restricción *Sall*, mientras que el cebador inferior (hebra de Crick) utilizado para la fusión, lleva en su extremo 5' un sitio para la digestión con la endonucleasa de restricción *HindIII*, que encaja con el mismo sitio en el sitio de múltiple clonación del vector pXW1.

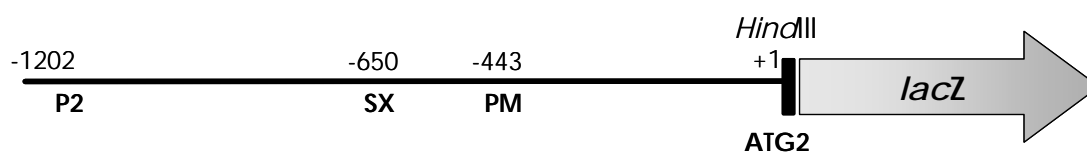


Figura R.24. Esquema donde se representan los distintos fragmentos (P2, SX y PM) de la región 5' de *KIHEM13* que se han fusionado a *lacZ* en pXW1, a través de su sitio *HindIII*, por el segundo punto de inicio de la traducción en pauta (ATG2).

Tabla R.14. Cebadores utilizados para la amplificación de distintos fragmentos de la región promotora de *KIHEM13* y su fusión, por el ATG2, a *lacZ* de pXW1. En **negrita** se muestran las dianas para las endonucleasas de restricción empleadas (*HindIII* y *Sall*).

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Hebra
ECV309M (P2)	ggggg gtcgac ACGACGAAGTTTGGTTATTATTTTTTTTTT	Watson
ECV394M	ggggg aagctt TTCTCTCTCTAATTGGCACTTGTG	Crick
ECV395M (PM)	ggggg gtcgac CTAAACGAATGCTGACGCCTA	Watson
ECV396M (SX)	ggggg gtcgac CATTCATCGTAACTGCCAACC	Watson

Las construcciones fueron comprobadas mediante análisis de restricción y secuenciación y se utilizaron para transformar la cepa de *K. lactis* MW190-9B seleccionando los transformantes en CM-URA. Los transformantes se cultivaron en condiciones aeróbicas e hipóxicas mediante el empleo de jarras herméticas con un generador anaeróbico. La fuente de carbono fue en ambos casos glucosa al 2%. La actividad enzimática de estos transformantes resultó ser notablemente superior a la obtenida con las fusiones desde el ATG1 y pudo ser determinada en células permeabilizadas.

En esta serie de fusiones, mientras en cultivos aeróbicos de la cepa salvaje (MW190-9B) no es apreciable actividad β -galactosidasa alguna, en condiciones hipóxicas la generación de actividad es patente en las tres construcciones analizadas, mostrando una ligera disminución conforme la longitud del fragmento de la región 5' de *KIHEM13* fusionado va disminuyendo (Figura R.25). Reuniendo la información obtenida en la figura R.23 y R.25 puede acotarse la región en la que se localizaría/n un/os elemento/s necesario/s para la activación hipóxica entre las posiciones comunes a PM y D3 (de -559 a -443 respecto al segundo ATG).

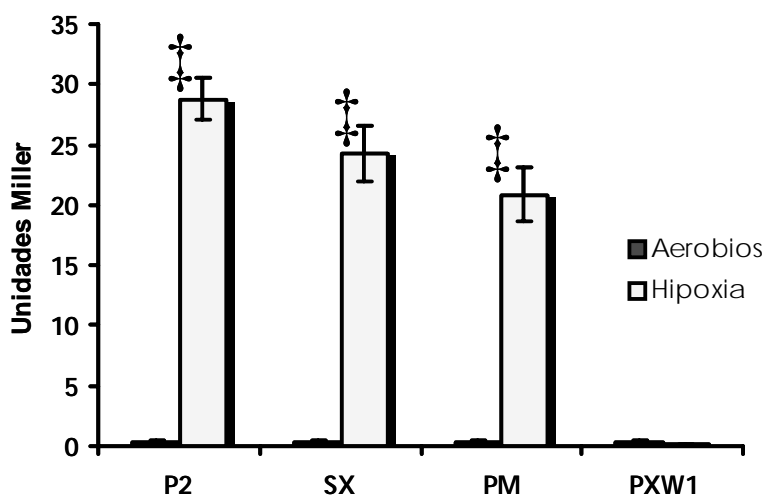


Figura R.25. Actividad β -galactosidasa de la cepa MW190-9B transformada con las construcciones P2, SX y PM. Los valores están expresados como la media de 4 medidas y las barras indican el error estándar. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante el test de rango múltiple con un nivel de confianza del 95%. ‡ denota diferencias significativas con los datos obtenidos con la misma construcción en la otra condición.

7. Efecto de factores reguladores de *K. lactis* sobre la expresión de *KIHEM13*

7.1. Posibles factores reguladores relacionados con la respuesta aerobiosis/hipoxia en *K. lactis*

En 2004 se hizo pública la secuencia completa de varios genomas de levaduras obtenidas a través del consorcio de investigación de Génolevures (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). Entre las levaduras secuenciadas se encontraba *K. lactis*. Esto nos permitió comprobar si en esta levadura se encontraban genes que codificasen para proteínas con similitud a los

factores reguladores relacionados con la respuesta aerobiosis/hipoxia en *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla R.15. Además de los factores ya comentados a lo largo del trabajo (Hap1, Rox1, Mot3, Mga2, Sut1, Sut2, Upc2) se incluyó en esta búsqueda Ord1 y Ecm22, este último homólogo de secuencia de Upc2 en *S. cerevisiae* (Davies *et al.*, 2005).

El primer hecho destacable es que en *K. lactis* no existen parálogos para Upc2 ni para Sut1. Aunque en ambos casos existen sus correspondiente homólogos Ecm22 y Sut2. En general, el porcentaje de homología (considerando el número de identidades o sustituciones por aminoácidos equivalentes en el total del solapamiento encontrado entre las proteínas de *S. cerevisiae* y la de *K. lactis*, %H en la tabla R.15) es muy bajo y oscila entre un 14 y un 53%. En muy pocos casos (Hap1 y Mga2) la homología se extiende a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos, desde el extremo amino al extremo carboxilo terminal. En la mayoría de las comparaciones las regiones homólogas se encuentran restringidas a determinadas regiones que constituyen dominios específicos en el extremo amino o en el extremo carboxilo-terminal. La función de estos dominios conservados, por ejemplo HMG (*High Mobility Group*), se relaciona con la capacidad de las proteínas que los contienen de interactuar con el DNA (Xin *et al.*, 2000).

El regulador Rox1 es tal vez de los menos conservados entre ambas levaduras. Como se puede ver en el alineamiento de la figura R.26, el número de posiciones conservadas es muy pequeño. En cambio ambos factores conservan elevada homología en el dominio HMG (figura R.27).

Tabla R.15. Búsqueda en *K. lactis* (*K.l.*) de parálogos a los genes reguladores relacionados con aerobiosis/hipoxia en *S. cerevisiae* (*S.c.*). Aa: aminoácidos; %H: porcentaje de homología; HMG: dominio *High Mobility Group*; -NH₂: extremo amino-terminal; -COOH: extremo carboxilo-terminal.

	ORF (<i>S.c.</i>)	ORF (<i>K.l.</i>)	Idénticos	Positivos	Región	%H
Hap1	YLR256w (1.502 aa)	KLLA0F22990g (1.253 aa)	603/1457 (41%)	790/1457 (54%)	ORF	53%
Rox1	YPR065w (368 aa)	KLLA0B11495g (393 aa)	37/84 (44%)	53/84 (63%)	HMG**	14%
Mot3	YMR070w (490 aa)	KLLA0E18645g (431 aa)	60/148 (40%)	70/148 (47%)	-NH ₂	14%
Ord1	YKL032c (597 aa)	KLLA0E18557g (464 aa)	114/163 (69%)	144/163 (88%)	-NH ₂ HMG	24%
Mga2	YIR033w (1.113 aa)	KLLA0E18029g (1.151 aa)	378/1046 (36%)	525/1046 (50%)	ORF	46%
Upc2	YDR213c (913 aa)	Ausente				
Ecm22	YLR228c (814 aa)	KLLA0A04169g (775 aa)	305/517 (58%) 52/105 (49%)	362/517 (70%) 62/105 (59%)	-NH ₂ -COOH	52%
Sut1	YGL162w (299 aa)	Ausente				
Sut2	YPR009w (268 aa)	KLLA0A03091g (383 aa)	57/146 (39%)	88/146 (60%)	-NH ₂	23%

**El extremo NH₂ de una proteína solapa con el extremo COOH de la otra.

KLLA0B11495g YPR065W	MSLSVCHRQFEKTHKSNVREIGKKRRTRRIKALTILKKYHIPRSMRPRKLP SILQLIDEF 60 MNPKSSTPKI PRP-KNAFILFRQHYHRILIDEWTAQGV EIPHNSNISKIIGTKWKGLQPE 59 : : : : : : : : : : : : : : : : :
KLLA0B11495g YPR065W	NDVDADADADVNANRNDENDENTTGFTPSTGRSANLSQQA EKNPESFNKRQRISRIDHSGQ 120 DKAHWENLAEKEKLEHERKYPEYKYKPVRSKKKQLLLKEIEQQQQQQQKEQQQQQSQP 119 : : : : : : : : : : : : : : : :
KLLA0B11495g YPR065W	DIGVPYYSTMSPPPGFPGTMSMPVFNMG L FQQQPNLMIYIP AQP NFIVSYPPPAQA 180 QLQQPFNNNIVLMKRAHSLSPSSSVSSSN SYQFQLNNDLKR LPIP SVNTSNYMVRSLSG 179 : : : : : : : : : : : : : : : :
KLLA0B11495g YPR065W	YYTNPNMVLLPGQLQGGQYTPNSRKALSLPTLDTSFHNRPNFPQDRFNHKSSMSNIS 240 LPLTHDKTARDLPQLSSQLNSIPYYSAPHDPSTRHHYLNVAQAQPRANSTPQLPFISSII 239 : : : : : : : : : : : : : : : :
KLLA0B11495g YPR065W	IDPQMRNELHYDYEKAIETDSNYKSPDSDLRRPQQQH IPRPRNAFILFRQHWHQVF 300 NNSQTPVTTTTTTSTTTATSPGKFSSSPSSVLENNR LNSINNSNQYLPPLPLSLQDF 299 : : : : : : : : : : : : : : : :
KLLA0B11495g YPR065W	DQEKEKITTDTSQGT SKLGSFKANSQASRDIGR KWRSLPDSEKKYWL DLAKQEKEAHKKK 360 QLD-----QYQLKQMGPTYIVKPLSHTRNNLLSTTP THHHIPH 339 : : : : : : : : : : : : : : : :
KLLA0B11495g YPR065W	YPDYKYL PTRKALRNGSSPTSSSTQEQSPKSN 393 IPN-QNIPLHQIINSS-NTEVTAKTSLVSEK-- 368 : : : : : : : : : : : : : : : :

Figura R.26. Alineamiento de las proteínas codificadas por los genes *ROX1* en *S. cerevisiae* (YPR065W) y *K. lactis* (KLLA0B11495g).



B

KlRox1-HMG	IPRPRNAFILFRQHWHQVFDQEKEKITTDTSQGT SKLGSFKA
ScRox1-HMG	IPRPKNAFILFRQHYHRILIDEW-----TAQGV EIP----H
	**** ***** * *
KlRox1-HMG	NSQASRDIGRKWRSLPDSEKKYWL DLAKQEKEAHKKKY PDYK
ScRox1-HMG	NSNISKIIGTKWKGLQPEDKAHWENLAEKEKLEHERKYPEYK
	** * ** ** * * * ** ** * ** *

Figura R.27. A. Comparativa de la posición de los HMG (*High Movility Group*) en las proteínas Rox1 de *K. lactis* y *S. cerevisiae*. **B.** Alineamiento *clustal* de los HMG de las proteínas Rox1 de *K. lactis* (KlRox1-HMG) y *S. cerevisiae* (ScRox1-HMG).

7.2. Expresión de los factores reguladores en condiciones aeróbicas e hipóxicas

Como parte de un estudio más extenso de la regulación transcripcional de genes de *K. lactis* mediante la utilización de *arrays* de DNA, se analizó si la transcripción de los parálogos de *HAP1*, *ROX1*, *MOT3* y *MGA2* está regulada por las variaciones en la disponibilidad de oxígeno. Para ello se diseñaron cebadores específicos (Tabla R.16) para la amplificación de fragmentos de DNA que fueron incluidos en el *array*. El *array* fue hibridado con cDNA obtenido a partir de RNA purificado de cultivos creciendo en condiciones de aerobiosis y tras 3 y 6 horas de cultivo en hipoxia en fermentador. Los datos de la expresión de estos cuatro genes se resumen en la tabla R.17 donde se comparan con la expresión de sus parálogos en *S. cerevisiae*. Los datos de expresión de los factores reguladores en *S. cerevisiae* han sido tomados de un estudio previo llevado a cabo por Becerra y colaboradores (2002).

Tabla R.16. Cebadores correspondientes a *KIHAP1*, *KIROX1*, *KIMOT3* y *KIMGA2* empleados en la obtención de los productos de PCR para la realización de los *arrays*. Las posiciones de los cebadores se han calculado desde el inicio de la ORF a la primera base del cebador en la secuencia 5'>3'.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Posición	Hebra
D22990.a (<i>HAP1</i>)	AACAATTGCCCCCACTGA	3.167	Watson
D22990.b (<i>HAP1</i>)	GTAAGCGAAGCCCACCAT	3.665	Crick
B11495.a (<i>ROX1</i>)	AATAGGCCAAACTTCCCG	658	Watson
B11495.b (<i>ROX1</i>)	TCTCCGAATCTGGCAAAG	1.010	Crick
E18645.a (<i>MOT3</i>)	AGGTCCGAATTCAGGGCT	33	Watson
E18645.b (<i>MOT3</i>)	GGTTCGAATCATGGCCAG	377	Crick
E18029.a (<i>MGA2</i>)	AAGTCGCAGCATGTTTCG	2.527	Watson
E18029.b (<i>MGA2</i>)	GGAGTACGAGCCGACCTG	2.976	Crick

Tabla R.17. Comparativa de los ratios de inducción hipoxia/aerobiosis para los genes *HAP1*, *ROX1*, *MOT3* y *ROX1* de *S. cerevisiae* y sus parálogos en *K. lactis*. Los datos de expresión en *S. cerevisiae* proceden de Becerra y colaboradores (Becerra *et al.*, 2002). N₂: condiciones de hipoxia creadas en fermentador mediante el suministro de nitrógeno; O₂: cultivo aeróbico mediante burbujeo de aire en fermentador; h: horas.

Factor	<i>S. cerevisiae</i>		<i>K. lactis</i>		
	ORF	Ratio N ₂ /O ₂	ORF	Ratio N ₂ 3h/O ₂	Ratio N ₂ 6h/O ₂
Hap1	YLR256w	1,84	KLLA0F22990g	0,75	1,04
Rox1	YPR065w	1,07	KLLA0B11495g	0,79	1,13
Mot3	YMR070w	1,02	KLLA0E18645g	0,65	0,90
Mga2	YIR033w	1,75	KLLA0E18029g	0,78	1,10

En *S. cerevisiae* tras tres horas de crecimiento en hipoxia se observa un incremento en la expresión de los factores reguladores Hap1 y Mga2 (Becerra *et al.*, 2002). En *K. lactis* tras tres horas de hipoxia se observa una disminución ligera en la expresión de los factores reguladores analizados, que se recupera al cabo de 6 horas de hipoxia, pero no se produce un

incremento de la expresión respecto de los valores medidos en condiciones aerobias para ninguno de los factores analizados.

7.3. Efecto de la delección de *KIROX1* sobre la expresión de *KIHEM13*

La Dra. Laura Núñez, había obtenido una cepa de *K. lactis* con una delección del gen *KIROX1* mediante una estrategia paralela a la aquí descrita para la obtención del nulo de *KIHEM13*, pero sobre la cepa de *K. lactis* MW190-9B (Núñez *et al.*, en preparación). La verificación de que en esta cepa no se transcribe *KIROX1* fue llevada a cabo mediante RT-PCR y los resultados se muestran en la figura R.28.

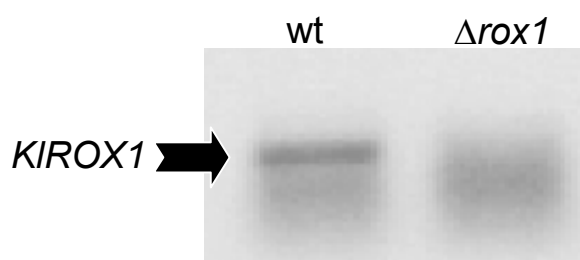


Figura R.28. RT-PCR de comprobación del mutante por anulación del gen *KIROX1*. wt: cepa salvaje, MW190-9B; Δ *rox1*, mutante MW190-9B Δ *rox1*.

Para llevar a cabo la RT-PCR en primer lugar se obtuvo cDNA a partir del RNA extraído de las cepas salvaje y mutante en *KIROX1* utilizando para ello un cebador (Tabla R.18) localizado en las proximidades del extremo 3' de la secuencia codificadora de *KIROX1*. A continuación se procedió a realizar una amplificación por PCR tomando como molde el cDNA previamente sintetizado y usando unos cebadores (Tabla R.18) que hibridan en el centro de la secuencia codificadora de *KIROX1*, en posición 5' respecto al cebador utilizado anteriormente para la síntesis del cDNA. De este modo, como se observa en la figura R.28, sólo se produce amplificación en el caso de que en el cDNA estén presentes copias de la secuencia codificadora de *KIROX1*, lo que ocurre en la cepa salvaje (MW190-9B) pero no en la mutante (MW190-9B Δ *rox1*).

Tabla R.18. Cebadores utilizados en la comprobación del nulo de *KIROX1* mediante RT-PCR. Las posiciones de los cebadores se han calculado desde el inicio de la ORF a la primera base del cebador en la secuencia 5'>3'.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Posición	Hebra
B11495.b	TCTCCGAATCTGGCAAAG	1.010	Crick
ECV519L	AAAACCTTGCTGGTGCCAATGT	879	Crick
B11495.a	AATAGGCCAAACTTCCCG	658	Watson

Seguidamente se estudió la expresión de *KIHEM13* mediante *Northern* en las cepas de *K. lactis* MW190-9B y su derivada MW190-9B Δ *rox1*. La sonda específica de DNA para la detección de *KIHEM13* se obtuvo mediante PCR con los cebadores ECV95M y ECV96M descritos en la tabla R.1. La línea MW190-9B fue cultivada en tres condiciones: aeróbicas, hipóxicas

(conseguidas mediante el burbujeo de nitrógeno a través del medio de cultivo) e hipóxicas con suministro de suplemento exógeno de hemo en forma de hemina. Como se puede observar en la figura R.29, la expresión de *KIHEM13* se incrementa en condiciones de deficiencia de oxígeno (N₂) hasta casi dos veces la existente bajo condiciones aeróbicas (O₂). Este incremento de expresión se mantiene prácticamente sin cambios cuando, en las mismas condiciones de déficit de oxígeno, el medio es suplementado con una fuente exógena de hemo en forma de hemina (N₂+H). Los resultados obtenidos con la cepa MW190-9B corroboran los previamente obtenidos con la cepa Y1140 por la Dra. González-Domínguez y que se han mostrado en la figura R.21. En la cepa mutante MW190-9B Δ *rox1* cultivada en condiciones aeróbicas la expresión de *KIHEM13* es menor que la obtenida para la cepa silvestre en esas mismas condiciones. Este dato indica que *KIROX1* no actúa como un represor aeróbico sobre la expresión de *KIHEM13*.

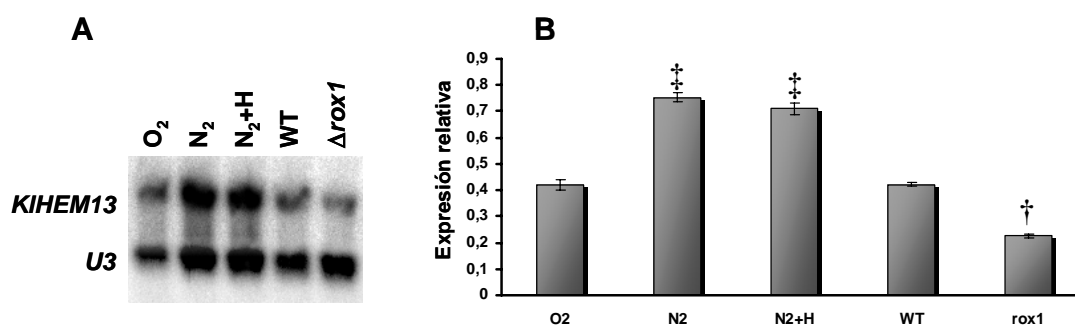


Figura R.29. **A.** Northern mediante el cual se ha analizado la expresión de *KIHEM13* en condiciones aeróbicas, en una cepa salvaje (WT) de *K. lactis* (MW190-9B) y un mutante Δ *rox1* derivado de la misma. Se incluye como control la expresión en la cepa salvaje bajo diferentes condiciones de cultivo: O₂, aerobiosis, N₂, hipoxia y N₂+H, hipoxia con suplemento de hemo exógeno en forma de hemina. **B.** En la gráfica se muestra cuantificación del Northern una vez normalizados los datos respecto a la diferencia de carga, teniendo en cuenta las intensidades obtenidas para la hibridación con *ScU3*. ‡ denota diferencias significativas entre las diferentes condiciones de cultivo de la misma cepa y † diferencias significativas entre las cepas cultivadas en las mismas condiciones.

8. Regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de hemo en *K. lactis*

En *S. cerevisiae* el gen de la ruta de biosíntesis de hemo que responde a hipoxia de forma importante con un incremento de su transcripción es *HEM13*, aunque también se ha descrito cierta inducción, menor que la de *HEM13*, para *HEM14* y *HEM15* (Kwast *et al.*, 2002).

En *K. lactis* se ha visto que la transcripción de *KIHEM1* responde a los niveles de oxígeno y hemo (González Domínguez *et al.*, 1997, 2001) y que *KIHEM12* no responde a las variaciones en la disponibilidad de oxígeno (Núñez *et al.*, 2004). En este trabajo se ha podido comprobar que *KIHEM13* responde con un incremento de su transcripción a la disminución de los niveles de oxígeno. La disponibilidad de las secuencias del genoma completo de *K. lactis* nos permitió averiguar si en *K. lactis* otros genes de la ruta de biosíntesis de hemo están regulados por la disponibilidad de oxígeno.

Como parte de un estudio más extenso de la regulación transcripcional de genes de *K. lactis*, del que ya se ha hablado anteriormente y que implica la utilización de *arrays* de DNA, se analizó si la transcripción de los genes *KIHEM2*, *KIHEM3*, *KIHEM4*, *KIHEM14* y *KIHEM15*, todos ellos de copia única tanto en *S. cerevisiae* como en *K. lactis*, está regulada por las variaciones en la disponibilidad de oxígeno. Para ello se diseñaron cebadores específicos para la amplificación de fragmentos de DNA (Tabla R.19) correspondientes a las ORFs de los genes que fueron incluidos en el *array*. El *array* fue hibridado con cDNA obtenido a partir de RNA purificado de cultivos creciendo en condiciones de aerobiosis y tras 3 y 6 horas de cultivo anaerobio en fermentador. Los datos de la expresión correspondiente a estos cinco genes se resumen en la tabla R.20 donde se comparan con la expresión de los correspondientes genes en *S. cerevisiae*. Los datos de expresión de los genes en *S. cerevisiae* han sido tomados de un estudio previo llevado a cabo Kwast y colaboradores (Kwast *et al.*, 2002).

Tabla R.19. Cebadores para la amplificación de fragmentos de ORFs de genes que forman parte de la ruta de biosíntesis de hemo en *K. lactis* y que fueron empleados en el *array*. Las posiciones de los cebadores se han calculado desde el inicio de la ORF a la primera base del cebador en la secuencia 5'>3'.

Cebadores	Secuencia 5' > 3'	Posición	Hebra
F09273.a (<i>HEM2</i>)	TATGCCATTGCTGGTGCT	505	Watson
F09273.b (<i>HEM2</i>)	ACCCTTCTCTGCAGCAGC	895	Crick
C15147.a (<i>HEM3</i>)	GGATTCTGAATTAGGCGGT	286	Watson
C15147.b (<i>HEM3</i>)	AACGCTCGGCTAGACAGC	707	Crick
C07150.a (<i>HEM4</i>)	AGGTGGTGTGAGGTGGG	333	Watson
C07150.b (<i>HEM4</i>)	GTTCCGGTTTGTGCTGA	728	Crick
B11616.a (<i>HEM14</i>)	CCACGCAAGGATGTCATT	1.087	Watson
B11616.b (<i>HEM14</i>)	TGAAAGCCATTCTCCAA	1.520	Crick
F20141.a (<i>HEM15</i>)	CTGTCATTGACCGTTGGC	569	Watson
F20141.b (<i>HEM15</i>)	CGATGTGAATGCGATTGG	901	Crick

Tabla R.20. Comparativa de la expresión en *arrays* de cinco genes implicados en la biosíntesis de hemo en *S. cerevisiae* y *K. lactis* en aerobiosis (O₂) e hipoxia (N₂). Los datos de expresión en *S. cerevisiae* proceden de Kwast y colaboradores (Kwast *et al.*, 2002). h: horas transcurridas en hipoxia.

Gen	<i>S. cerevisiae</i>		<i>K. lactis</i>		
	ORF	Ratio N ₂ /O ₂	ORF	Ratio N ₂ 3h/O ₂	Ratio N ₂ 6h/O ₂
<i>HEM2</i>	YGL040c	0,68	KLLA0F09273g	0,69	0,94
<i>HEM3</i>	YDL205c	1,05	KLLA0C15147g	0,75	1,11
<i>HEM4</i>	YOR278w	1,39	KLLA0C07150g	0,76	1,12
<i>HEM14</i>	YER014w	2,82	KLLA0B11616g	0,84	1,32
<i>HEM15</i>	YOR176w	1,30	KLLA0F20141g	0,84	1,20

Como puede observarse en los datos de la tabla R.20, en *K. lactis* sólo *KIHEM14* y *KIHEM15*, se inducen muy ligeramente y sólo tras 6 horas de cultivo en hipoxia. Pero la inducción de *KIHEM14* es inferior a la que se puede medir para *HEM14* en *S. cerevisiae* (Kwast *et al.*, 2002).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha abordado la clonación y caracterización funcional del gen *KIHEM13* de la levadura no convencional *Kluyveromyces lactis*. En *Saccharomyces cerevisiae* *HEM13* codifica la enzima *coproporfirinógeno III oxidasa* que cataliza la oxidación del coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX, el sexto paso de la vía de biosíntesis del grupo hemo. La ausencia de datos sobre este gen en *K. lactis* contrasta con lo que ocurre en *S. cerevisiae* donde se sabe que es un gen hipóxico que incrementa su expresión cuando la disponibilidad de oxígeno en la célula cae por debajo de unos ciertos límites. Sin embargo, a diferencia de otros genes exclusivamente anaerobios, *HEM13* se sigue expresando en presencia de oxígeno puesto que la biosíntesis de hemo es esencial para la célula, tanto en condiciones aerobias como anaerobias. En anaerobiosis, a pesar de que muchas hemo-proteínas no son necesarias, por ejemplo los citocromos de la cadena respiratoria, otras siguen siendo imprescindibles.

Nuestro interés por este gen en *K. lactis* radica en comprender si tiene un papel en las diferencias funcionales con *S. cerevisiae* que conducen a la existencia de dos modelos metabólicos claramente diferenciados. Mientras *K. lactis* es una levadura de metabolismo respiratorio, *S. cerevisiae* utiliza la fermentación como modo preferente para la obtención de energía metabólica y ambas levaduras difieren en las características de su metabolismo respiratorio (González-Siso *et al.*, 2000). La regulación de la síntesis del grupo hemo es un parámetro a estudiar en relación a este tema por dos motivos. En primer lugar, porque el grupo hemo forma parte de los transportadores electrónicos mitocondriales que intervienen en la respiración. Por otro lado, actúa como un sensor de oxígeno a escala celular, capaz de modular la activación y la represión de la expresión de una serie de genes gracias a la mediación de diversos factores reguladores de la transcripción (Hon *et al.*, 2003).

1. El gen *KIHEM13* se encuentra en copia única en el genoma de *K. lactis*

Diversas pruebas experimentales obtenidas en el transcurso de este trabajo sugerían que el gen *KIHEM13* es de copia única en *K. lactis*. Por una parte, en el proceso de obtención del clon no se obtuvieron indicios de que existiese más de una forma del gen presente en la genoteca. Por otra parte, cuando se obtuvo el alelo nulo en la cepa haploide CBS Δ Ku80, la cepa mutada perdía la capacidad de crecimiento en ausencia de hemina (Figura R.14) y además no era posible medir actividad *coproporfirinógeno oxidasa* (Figura R.15). Por tanto no había una segunda copia/forma del gen que pudiese remplazar su función al delecionar *KIHEM13*. La existencia de un gen no funcional o de muy baja expresión ha quedado totalmente descartada al hacerse pública la secuencia completa del genoma de *K. lactis* (Dujon *et al.*, 2004) ya que los análisis realizados mediante distintos programas que permiten buscar homologías partiendo de la secuencia del gen o de la proteína dieron siempre resultados negativos.

Cabe destacar que este tipo de análisis basados en el conocimiento del genoma completo de las levaduras, revela que todos los genes de la ruta de biosíntesis de hemo se encuentran en copia única tanto en *S. cerevisiae* como en *K. lactis*. Desde el punto de vista evolutivo, la aparición del género *Saccharomyces* es posterior a la del género *Kluyveromyces* y el establecimiento del género *Saccharomyces* estuvo precedido de una duplicación genómica generalizada (Seoighe y Wolfe, 1998), por este motivo es muy frecuente que genes que se encuentran en copia única en *K. lactis* presenten dos copias en el genoma de *S. cerevisiae*. Este proceso evolutivo estuvo ligado a una transición desde levaduras con metabolismo respiratorio a formas con metabolismo fermentativo (Ihmels *et al*, 2005). Si durante esta adaptación la presión selectiva operó para favorecer la posibilidad de llevar a cabo procesos metabólicos en ausencia de oxígeno, puede comprenderse que los genes de la biosíntesis de hemo no resultasen duplicados en el genoma de *S. cerevisiae*, aunque tampoco pudieron ser eliminados totalmente, porque el grupo hemo resulta esencial para algunas funciones que suceden en condiciones anaeróbicas y además *S. cerevisiae* es un organismo facultativo que puede vivir en presencia y ausencia de oxígeno. Sin embargo, en *S. cerevisiae*, algunos genes que son necesarios de forma aparentemente exclusiva en condiciones aeróbicas, como es el caso de *CYC1* que codifica para iso-1-citocromo *c*, *COX5a* que codifica la subunidad V de la *citocromo oxidasa* ó *AAC1* que codifica el transportador ATP/ADP mitocondrial presentan duplicados (*CYC7*, *COX5b* y *AAC3* respectivamente) que se inducen de forma exclusiva durante el periodo de adaptación de las condiciones aeróbicas a las condiciones hipóxicas (Laz *et al.*, 1984; Hodge *et al.*, 1989; Kolarov *et al.*, 1990). Esta situación no tiene lugar en *K. lactis*.

2. El gen *KIHEM13* codifica una *coproporfirinógeno oxidasa* que es funcional en *K. lactis* y en *S. cerevisiae*

La traducción de la secuencia del gen *KIHEM13* reveló que codifica una proteína con un gran parecido estructural con otras *coproporfirinógeno oxidasas* eucariotas. La existencia de datos sobre la estructura terciaria de la proteína de *S. cerevisiae* (Phillips *et al.*, 2004) nos permitió analizar comparativamente la estructura de la CPO de *K. lactis* en referencia a la de *S. cerevisiae*, pudiendo comprobar que los aminoácidos que se ha demostrado son importantes para la catálisis se encuentran conservados en ambas proteínas (Figura R.8).

Que la proteína es funcional en *K. lactis* quedó de manifiesto por el hecho de que es posible medir actividad enzimática CPO en la cepa silvestre de *K. lactis* analizada (CBS Δ Ku80) pero que dicha actividad desaparece en la cepa mutada que contiene un alelo nulo (Figura R.15).

La funcionalidad de la proteína de *K. lactis* en *S. cerevisiae* se puso de relieve por la capacidad de complementación por parte del gen *KIHEM13* del fenotipo de ausencia de crecimiento en un medio sin suministro de hemo que presenta un mutante Δ *hem13* de *S. cerevisiae* (Figura R.9).

Cabe señalar que tanto las medidas de actividad CPO en la cepa silvestre y mutante $\Delta hem13$ de *K. lactis* como la complementación del mutante $\Delta hem13$ de *S. cerevisiae* se realizaron en condiciones aerobias, en las que los niveles de expresión del gen son muy bajos. Aunque los niveles de mRNA son muy bajos en estas condiciones, resultan suficientes para que los niveles de proteína sintetizada sean adecuados para que pueda ejercer su función.

3. Los puntos de inicio de la transcripción de *KIHEM13* y su posición relativa respecto a las cajas TATA y a los TICs

Los análisis de *primer extension* realizados permitieron localizar una serie de puntos de inicio de la transcripción para el gen *KIHEM13*.

El inicio exacto de la transcripción por la *RNA polimerasa II* requiere no sólo de la polimerasa, 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, *TATA Binding Protein*), TFIIB, TFIIE, TFIIIF y TFIIH y otros factores (Hampsey, 1998). La existencia de análogos para los GTFs en diferentes especies de eucariotas sugiere que la transcripción mediada por la *RNA polimerasa II* 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 unos 30 pb en posición 3' a la caja TATA (Giardina y 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 (Chen y Struhl, 1985).

Como es característico de muchos genes de levaduras (Healy y Zitomer, 1990) existen varios sitios de inicio de la transcripción para *KIHEM13* (Figuras R.16 y R.17). Algunos de los puntos de inicio de la transcripción detectados mediante *primer extension* se encuentran entre los dos ATG en pauta correspondientes a la primera y segunda metionina de la ORF, por este motivo se ha utilizado como referencia (+1) el segundo ATG de la ORF para posicionarlos (Figura R.18). Con este criterio, los puntos de inicio de la transcripción se han localizado en las posiciones -243, -236, -225, -111 y -101. Las posiciones -111 y -101 parecen preferentes al analizar la intensidad relativa. Al buscar cajas TATA que se ajusten al consenso aceptado en levaduras (TATANA) en posición 5' respecto de los puntos de inicio de la transcripción hallados experimentalmente, localizamos una serie de cajas TATA en posiciones, -506, -459, -397, -382, -265, -200, -136. Por su posición relativa, alguna o varias de las cajas TATA situadas en -459, -397 y -382 podrían estar condicionando la selección de los puntos de inicio desde -243 a -225, mientras que las cajas TATA de las posiciones -200 o -136 podrían condicionar la selección de los puntos de inicio de la transcripción que se detectan con mayor intensidad en posiciones -111 y -101.

La determinación de los puntos de inicio de la transcripción se realizó en el contexto de este trabajo con un doble objetivo. Por una parte determinar el tamaño del promotor mínimo no regulado, entendiendo como tal la región que contiene los sitios para la unión de la proteína TBP (cajas TATA) y los factores transcripcionales generales que permiten ensamblar el complejo activo de la *RNA polimerasa II*. Este promotor mínimo puede utilizarse como control para estudiar determinadas secuencias reguladoras adicionales que actúan en la inducción o represión del gen mediante la unión a factores reguladores específicos activadores o represores. Los resultados obtenidos sugieren dos posibilidades, que el promotor mínimo conste de al menos 459 pb si se utiliza el primer *cluster* de puntos de inicio de la transcripción (-243 a -225), o que conste únicamente de al menos 200 nucleótidos si se utiliza el segundo (-111 a -101). Como se vio al analizar los resultados, los sitios de inicio de la transcripción de las posiciones -111 y -101 no sólo son los que presentan una intensidad mayor sino que dirigen la transcripción en todas las condiciones ensayadas, aerobiosis, hipoxia e hipoxia con suplemento de hemina (figura R.16). Esto sugiere que tanto la transcripción basal en condiciones aerobias (reprimida o no inducida) como la transcripción incrementada en condiciones hipóxicas (desreprimida y/o inducida) comienza mayoritariamente desde estas posiciones. En cambio, el inicio de la transcripción desde la posición -225 sólo era observable en condiciones de hipoxia (figura R.17). Esto sugiere que en estas condiciones pueda producirse adicionalmente un transcrito mayor cuya aparición está regulada por la disponibilidad de oxígeno y hemo, ya que la adición de hemina al medio de cultivo producía la desaparición de este sitio. Sin embargo el significado funcional de este sitio regulado no resulta fácil de interpretar ya que, minoritariamente, en todas las condiciones de cultivo ensayadas aparecen también transcritos mayores probablemente iniciados a partir de los sitios que ocupan las posiciones -243 y -236.

Además, el conocimiento de los puntos de inicio de la transcripción puede resultar útil, en el caso del gen *KIHEM13*, para determinar si la traducción de la proteína se produce desde el primer codón de inicio de la traducción (TIC) o desde el segundo. El hecho de que los sitios de inicio de la transcripción mayoritariamente utilizados se encuentren en posición 3' respecto del primer TIC indica que será el segundo TIC el que pueda ser utilizado en la traducción de la mayoría de las moléculas de mRNA. Esto no descarta la posibilidad de que, en una proporción menor se originen transcritos que puedan contener el primer TIC. Tanto los datos de *primer extension* como los obtenidos a partir del estudio del cDNA de *KIHEM13* indican que al menos en algunos transcritos están presentes los dos codones de inicio (Figuras R.17, R.18, R.19 y R.20).

4. ***KIHEM13*: ORF y CDS**

En la mayoría de los genes de levaduras los conceptos de ORF (*Open Reading Frame* ó trama abierta de lectura) y CDS (*CoDing Sequence* ó secuencia codificadora), aunque no son sinónimos, representan la misma realidad ya que la región que se traduce a proteína incluye la totalidad de la

pauta abierta de lectura desde el primer ATG hasta el codón de parada. Sin embargo, en el caso de *KIHEM13*, algunos datos obtenidos en este trabajo nos hacen cuestionarnos si para este gen la CDS coincide con la ORF.

En primer lugar, como se ha comentado en el apartado anterior, la mayoría de los transcritos de *KIHEM13* van a contener únicamente el segundo TIC, lo que descarta en ese caso la coincidencia de ORF y CDS simplemente porque la primera parte de la ORF no estaría presente en el mRNA que va a ser traducido.

Por otra parte, de la presencia de los dos TICs en algunos transcritos minoritarios de *KIHEM13* tampoco puede concluirse que vaya a iniciarse necesariamente la traducción a proteína desde el primero. Los mecanismos mediante los cuales un ribosoma se une al mRNA y selecciona el punto de inicio de la traducción (TIC) difieren en procariontes y eucariontes. Los TICs en los mRNA policistrónicos de procariontes se seleccionan mediante un mecanismo de reconocimiento de bases complementarias entre el rRNA y el mRNA. En los mRNA procariontes los codones de inicio están precedidos por una secuencia rica en purinas (ACCUCCUUA) denominada secuencia de *Shine-Dalgarno* (SD) que forma enlaces de hidrógeno de tipo Watson y Crick con secuencias complementarias en el rRNA de 16S (Steiz y Jakes, 1975; Brink *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 1987). En los organismos eucariontes, el reconocimiento de los TICs se produce mediante un mecanismo de escaneado de la región 5' no traducida del mRNA (5'UTR) por parte del ribosoma, lo que en la mayoría de los casos produce el reconocimiento del primer ATG presente en el mRNA como codón de inicio de la traducción (Kozak, 1998). Sin embargo, la selección de TICs en los mRNA eucariontes en algunos casos escapa a esta regla (primer AUG=TIC) y se han propuesto tres modelos distintos de escape: escaneado deficiente dependiente del contexto (proceso denominado como *leaky scanning*), reinicio e iniciación interna directa (revisado por Kozak, 2002).

El *leaky scanning*, frecuente en mamíferos, se produce porque el primer AUG no es reconocido en el 100% de los casos y la traducción se iniciará también desde el segundo, que probablemente presente un contexto más adecuado (adecuación a la secuencia de Kozak: GCCRCCaugG). En *S. cerevisiae* se había descrito que la necesidad de concordancia con la secuencia de Kozak no era determinante para la selección del codón AUG (Donahue y Cigan, 1988) y por tanto la importancia del mecanismo del *leaky scanning* sería mínima. Sin embargo, en *S. cerevisiae* pueden encontrarse ejemplos de genes que presentan un doble sitio de inicio para la traducción mediante *leaky scanning*, por ejemplo el gen que codifica para la *glutathione reductasa* (Outten y Culotta, 2004). En *S. cerevisiae* el consenso Kozak específico tiene la secuencia 5'HAWAAUGUCU3', siendo la A en posición -3 la más importante (H: A, C ó U; W: A ó U). Al comparar esta secuencia con las que rodean los dos AUG en el mRNA de *KIHEM13*, se puede observar que en ambos casos las coincidencias con un contexto adecuado son muy escasas (3 de 7 alrededor del primer TIC y 2 de 7 alrededor del segundo) y en ninguno de los dos casos aparece conservada la A en posición -3 (Tabla D.1). Esto nos sugiere que la probabilidad de producción de dos proteínas

diferentes a partir de los transcritos de mayor tamaño de *KIHEM13* mediante *leaky scanning* es muy pequeña.

Tabla D.1. Comparación del consenso Kozak en levaduras y las regiones próximas a los dos primeros codones de inicio de la traducción (TIC1 y TIC2) de *KIHEM13*. +: ajuste al consenso; -: no se ajusta al consenso. H: cualquier base menos G; W: A ó U.

Consenso	H	A	W	A	A	U	G	U	C	U
TIC1	U	G	A	A	A	U	G	A	G	A
Ajuste	+	-	+	+		TIC1		-	-	-
TIC2	U	G	C	G	A	U	G	A	C	A
Ajuste	+	-	-	-		TIC2		-	+	-

El mecanismo de reinicio consiste en que una vez que el ribosoma ha traducido una pequeña ORF (menor de 30 codones) situada 5' (upORF) respecto al verdadero TIC funcional y ha alcanzado el codón de parada de dicha ORF, la traducción se reinicia en un AUG situado a una cierta distancia en posición 5'. En este caso a partir del mRNA se obtiene un pequeño péptido y una sola proteína funcional. El reinicio en eucariotas es más eficaz si entre la señal de parada de la upORF y el codón AUG existe al menos una distancia de 79 nucleótidos (Kozak, 1987). Al analizar la región 5'UTR de *KIHEM13* pudimos comprobar que existen dos upORFs y que la más pequeña podría cubrir las expectativas de un mecanismo de re-inicio que sucediese únicamente desde el segundo TIC de *KIHEM13*, ya que tiene menos de 30 codones y su codón de stop está situado a una distancia límite (78 pb) respecto del primer TIC (figura D.1) lo que podría condicionar el salto del ribosoma hasta el segundo TIC. Sin embargo, al superponer las posiciones de los sitios de inicio de la transcripción, pudimos observar que ninguna de estas dos upORFs estaría presente en el transcrito mayor. Por tanto la selección del segundo TIC mediante un proceso de reinicio parece también poco probable. El proceso de inicio interno directo requiere la presencia de elementos IRES que no se han detectado en la región 5'UTR de *KIHEM13*.

```

-557 CCATCAATGTCGTATCTTGAATGTATGTTGGTTCAGCCTCTATTTCTCTCGTAGATAGTA
-497 GTATGTTTCGAATGGTTCACCTTGACCTTTTTTTTTTCAGTATATACGGTTTAACTAAAC
-437 GAATGCTGACGCCTATGTCTCCGTTTCAGACCATAATAATGATACAGTAGTGTATTATAT
-377 TCATCTTGTGGTGCCTCGGACTGCCACTATTGTGATGAGATTCTTGTATCTCGTATCTTTT
-317 CCTCTTCCTGTATGCGGTGGAAACTAGCTAGCCTTTTTTCTTCAATTACCTTTATCCAAA
-257 TTATCACCAGGTCTGAATCTTGAAGTCTGCTTGCTTTTTGGATTTTTTTTTTTTGACTAT
-197 ATTAACGAAAGTGAATTATTCCATTTCGACTACCAACTGAAATGAGAAGAGAAGCATTGG
-137 ATCTATACTGCCCTTTTCTCTCCAATCAAGCAGAATCATTGATAAAACTTTACATCCAGT
- 77 ATACTTGTCTGGTAAAGCAAACAGAACTCAACGACCGGTTCATCTTAACACACATTCTA
- 17 AATATTATCATTGTGCGATG
    
```

Figura D.1. Localización de pequeñas upORFs en la región 5' UTR de *KIHEM13* y su disposición relativa respecto a los sitios de inicio de la transcripción (obtenidos en **aerobiosis** y en **hipoxia** por encima del **primer ATG** y en **aerobiosis** los que se encuentran por encima del **segundo ATG**) determinados experimentalmente. En **negrita** los puntos de inicio y parada de las upORFs.

De los análisis expuestos podemos deducir que si a partir del gen *KIHEM13* se pudiesen originar dos proteínas de distinto tamaño, se debería

con mayor probabilidad a mecanismos que afectan a la selección de los sitios de inicio de la transcripción o a modificaciones post-transcripcionales que a modificaciones de la selección de los TICs durante la traducción.

En el presente trabajo no hemos analizado de forma directa si se producen efectivamente dos proteínas diferentes, aunque fusionando las respectivas ORFs y los primeros codones adyacentes desde ambos TICs al octavo codón de la *β-galactosidasa* es posible obtener proteínas híbridas con diferente actividad enzimática. Los datos de fusión de regiones 5' de *KIHEM13* al gen reportero *lacZ* realizadas desde la ORF del primer TIC muestran una pobre actividad *β-galactosidasa* si las comparamos con las obtenidas para las realizadas utilizando como punto de partida el segundo TIC. Mientras que para la detección de las primeras actividades fue necesario realizar extractos proteicos crudos y se tuvo que añadir gran cantidad de proteína, en las segundas, la actividad *β-galactosidasa* era detectable fácilmente en permeabilizados celulares. Esta observación es compatible con varias interpretaciones. La primera de ellas es que en todas las condiciones analizadas (aerobiosis/hipoxia) se utilicen preferentemente los sitios de inicio de la transcripción localizados entre ambos TICs, por este motivo las construcciones carentes de ellos sólo podrían iniciar la transcripción desde regiones localizadas en posiciones 5' y menos eficientes, originando en consecuencia una menor producción de proteína y una menor actividad. Una segunda interpretación podría basarse en la consideración de que la región comprendida entre el primer TIC y el segundo contenga no sólo elementos necesarios para el inicio de la transcripción sino también algún elemento regulador positivo.

5. La actividad CPO de *K. lactis* en condiciones aerobias se recupera mayoritariamente en la fracción soluble no unida a membranas

Como se ha comentado en el apartado anterior es posible considerar dos TIC como iniciadores de la traducción de *KIHEM13*. La lectura de aminoácidos derivada de la traducción a partir del segundo TIC produce un alineamiento *clustal* con otras CPOs de levaduras (Figura R.7) que abarca la totalidad de la secuencia. Sin embargo la traducción desde el primer TIC produce una ausencia total de alineamiento en el extremo amino. Sin embargo, este extremo amino muestra un alineamiento mejor con CPOs de eucariotas superiores (Figura R.8).

Diversas consideraciones nos llevaron a plantearnos si esta prolongación amino terminal obtenida a partir del primer TIC podía contener una secuencia señal que dirigiera a la proteína hasta la mitocondria. Por una parte las CPOs de levaduras son citosólicas, mientras que las CPO de mamíferos son mitocondriales. Por otra parte, algunos genes, como el que codifica la *glutathion reductasa*, que en *S. cerevisiae* están duplicados y dan lugar a dos isoformas distintas de la proteína, una citosólica y otra mitocondrial, en *K. lactis* sólo presentan una copia, pero a partir de ella se generan dos isoformas citosólica y mitocondrial (Outten y Culotta, 2004).

Cuando la región amino terminal de la proteína de *K. lactis* derivada del primer TIC se sometió a análisis mediante programas informáticos que predicen localización subcelular no se obtuvo evidencia de que pudiese contener una secuencia de importe a la mitocondria. Por ejemplo, utilizando el programa TargetP Server (Emanuelson *et al.*, 2000; Nielsen *et al.*, 1997; <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) la probabilidad de destino mitocondrial para la CPO de *K. lactis* fué sólo de 0,052, mientras que las probabilidades calculadas para las CPO humana y de ratón (en ambos casos se ha demostrado su localización mitocondrial experimentalmente) con este mismo programa fue de 0,458 y 0,424 respectivamente.

El hecho de que la CPO de *K. lactis* sea mayoritariamente citosólica está apoyado, al menos en condiciones aeróbicas, por las medidas de actividad *coproporfirínógeno oxidasa* que se muestran en la figura R.15, donde se observa la presencia de actividad CPO en una fracción libre de membranas y orgánulos. En la fracción membranosa no se recuperó apenas actividad (datos no mostrados). Sin embargo no tenemos todavía una evidencia experimental de que en otras condiciones de cultivo, por ejemplo en hipoxia, no puedan producirse formas mitocondriales.

6. La regulación transcripcional de *KIHEM13*

Datos anteriores a este trabajo habían puesto de manifiesto que *KIHEM13* se comporta como un gen hipóxico (González-Domínguez *et al.*, 2000). Estos datos han sido también corroborados en este trabajo utilizando la cepa MW190-9B tanto mediante *Northern* (Figura R.29) como mediante fusiones del promotor al gen informador *lacZ* (Figuras R.25 y R.23). En condiciones aeróbicas la ausencia de hemo intracelular, en un mutante $\Delta Kihem1$, provoca un incremento en la expresión del gen (González-Domínguez *et al.*, 2000), mientras que en condiciones hipóxicas la adición de hemo exógeno no tiene ningún efecto (González-Domínguez *et al.*, 2000 y Figura R.29).

En este trabajo hemos secuenciado una amplia región 5'UTR del gen *KIHEM13* y los análisis *in silico* realizados sobre dicha secuencia revelan que contiene numerosos consensos para factores reguladores implicados en la respuesta aerobiosis/hipoxia en levaduras (Tabla R.11 y Figura R.22).

En *S. cerevisiae*, el gen *HEM13* también se comporta como un gen hipóxico y el circuito regulador mejor conocido está basado en la represión aeróbica del gen (Keng, 1992; Zagorec *et al.*, 1988). En este mecanismo de represión participan los factores Hap1, Rox1, Mot3, Tup1 y Ssn6. Hap1 es un factor regulador de la transcripción que en ausencia de hemo se encuentra unido a otras proteínas formando un complejo que lo mantiene inactivo. Cuando se une a él una molécula de hemo se desencadenan una serie de cambios conformacionales que dan lugar a su activación (Lan *et al.*, 2004; Hon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Hon *et al.*, 2000). La activación de Hap1 dependiente de hemo provoca que se active la transcripción de una serie de genes entre los que se encuentra *ROX1*. La proteína Rox1 es un

represor que, ayudado por otro factor denominado Mot3, reprime de forma finamente modulada la expresión de genes hipóxicos en aerobiosis entre ellos *HEM13* (Klinkenberg *et al.*, 2005). Tup1 y Ssn6 forman un complejo co-represor que no tiene capacidad directa de unión al DNA pero que al ser reclutado hasta el promotor por los factores transcripcionales específicos (en este caso Rox1 y Mot3) modifica la transcripción mediante interacciones con el complejo de la *RNA polimerasa II* y mediante efectos directos sobre la estructura de la cromatina (Zhang y Reese, 2004; Mennella *et al.*, 2003; Davie *et al.*, 2003; Davie *et al.*, 2002; Smith y Johnson, 2000).

En la región 5' de *KIHEM13* se han localizado una serie de secuencias que encajan con los consensos definidos en *S. cerevisiae* para la unión de los factores represores Rox1 y Mot3. En *S. cerevisiae* se ha descrito que la principal región represora del gen *HEM13* se encuentra formada por un sitio de unión de Rox1 rodeado por tres sitios muy próximos (en un margen de 70 pb) para la unión de Mot3, que contribuyen a estabilizar la unión de los factores represores y a reclutar al complejo co-represor (Klinkenberg *et al.*, 2005). Sin embargo, este esquema no se ha podido apreciar en el promotor de *KIHEM13*, puesto que los posibles sitios para la unión de Mot3 se encuentran bastante alejados de los sitios a los que se podría unir Rox1 (Figura D.2).

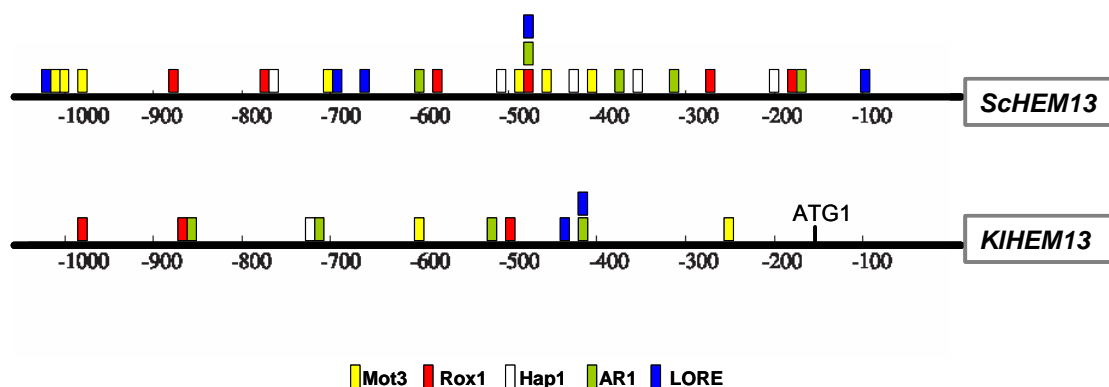


Figura D.2. Distribución relativa de los consensos para factores reguladores relacionados con hipoxia localizados en el promotor de *KIHEM13* y *ScHEM13*

En el genoma de *K. lactis* existen parálogos para los genes que codifican los factores reguladores Hap1, Rox1, Mot3, Tup1 y Ssn6 (Tabla R.15). De hecho, algunos de estos factores son objeto de estudio por parte de otros investigadores del laboratorio. Respecto a la regulación transcripcional de Hap1, Rox1 y Mot3, no parece haber diferencias notables entre *S. cerevisiae* y *K. lactis*. Ya que los factores reguladores existen y también los consensos sobre el promotor de *KIHEM13*, quisimos saber si tenían un papel funcional en la represión aeróbica de este gen. Teniendo en cuenta que Rox1 es un punto clave en el circuito regulador en el que están implicados todos estos factores, el efecto esperado tras la eliminación de Rox1 consistiría, si el mecanismo funciona sobre el promotor de *KIHEM13*, en un incremento de la expresión aerobia de *KIHEM13*. En una primera aproximación, utilizamos un análisis de expresión heteróloga en una cepa Δ *rox1* de *S. cerevisiae* (Tabla R.10) y comprobamos que no se producía el

efecto esperado. Este resultado indicaba que el factor Rox1 de *S. cerevisiae* no ejercía un efecto represor sobre el promotor de *KIHEM13*, al menos en el fondo genético utilizado. Pero dada la escasa homología que existe entre el factor Rox1 de *S. cerevisiae* y el de *K. lactis* y que está limitada al dominio HMG (Figura R.27), la ausencia de respuesta observada podía deberse a la divergencia entre los factores de *K. lactis* y *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando se pudo disponer de una cepa de *K. lactis* con el gen *ROX1* deletado y se comparó mediante *Northern* la expresión de *KIHEM13* en el mutante y la cepa silvestre, se obtuvo el mismo resultado (Figura R.29). Por otra parte en ninguna de las fusiones al gen reportero *lacZ* analizadas (Figuras R.25 y R.23) hemos podido observar una desrepresión en condiciones aerobias, a pesar de que en algunas de ellas se habían eliminado potenciales sitios para la unión de Rox1. Todos estos datos indican que la baja expresión aeróbica de *KIHEM13* no se debe a un mecanismo represor mediado por Rox1. Si esto depende de la diferente distribución topológica de los consensos para la unión de Rox1 y Mot3 en su promotor tendrá que ser dilucidado en posteriores estudios. En *S. cerevisiae*, el papel de Mot3 en la represión mediada por Rox1 se sabe que tiene distinta importancia en función de los genes analizados (Klinkenberg *et al.*, 2005; Sertil *et al.*, 2003; Kastaniotis *et al.*, 2000), pero por el momento siempre se ha considerado a Rox1 como el que tiene un efecto represor más fuerte y no aparecen descritos en la bibliografía casos en los que Mot3 pueda actuar como represor independiente de Rox1. Serán necesarios futuros análisis, utilizando cepas de *K. lactis* deletadas en Mot3 o dobles mutantes $\Delta Klr ox1 \Delta Klm ot3$, para determinar si en el promotor de *KIHEM13* la represión puede estar mediada por Mot3 de forma prioritaria, o por otros reguladores negativos.

Otra alternativa para interpretar el patrón de expresión transcripcional de *KIHEM13* (baja expresión en aerobiosis y mayor en hipoxia) consistiría en suponer que la expresión aeróbica es una expresión basal no regulada que se ve inducida en hipoxia por factores reguladores positivos. Otras secuencias potenciales para la unión de factores de transcripción relacionados con la regulación en respuesta a oxígeno que se encontraron en la región 5' de *KIHEM13*, son los sitios AR1 (Figura R.22 y Tabla R.11). A los sitios AR1 en *S. cerevisiae* y en hipoxia se une el factor Upc2 que está implicado en la regulación de los genes anaeróbicos de la familia *DAN* (Abramova *et al.*, 2001a, 2001b; Cohen *et al.*, 2001; Sertil *et al.*, 1997). También se han localizado secuencias LORE (Figura R.22 y Tabla R.11) a las que, en *S. cerevisiae*, se une un complejo regulador del que forma parte la proteína Mga2 y otros factores todavía no caracterizados, activando la expresión del gen hipóxico *OLE1* (Jiang *et al.*, 2001, 2002).

Respecto a una posible activación hipóxica de *KIHEM13* mediada por Upc2 a través de los sitios AR1, podemos descartarla porque dicho factor no se encuentra presente en el genoma de *K. lactis* (Tabla R.15). Aunque es cierto que existe un homólogo, Ecm22. Sin embargo, en otras levaduras la función de ambas proteínas está relacionada sólo a nivel de la regulación de genes de la biosíntesis de esteroides (Davies *et al.*, 2005; Shianna *et al.*, 2001).

El factor Mga2 existe en el genoma de *K. lactis* (Tabla R.15) aunque en las condiciones ensayadas en este trabajo no hemos podido comprobar que su expresión se incremente en hipoxia como sucede en *S. cerevisiae* (Tabla R.17). Si Mga2 tiene un efecto activador sobre la expresión hipóxica de *KIHEM13* a través de los sitios LORE presentes en su promotor, su delección debiera producir un descenso en los niveles de expresión en estas condiciones. Un análisis de expresión heteróloga de *KIHEM13* en una cepa Δ *mga2* de *S. cerevisiae* (Tabla R.10) no produjo el efecto esperado. El grado de conservación que existe entre las proteínas Mga2 de *K. lactis* y *S. cerevisiae* es grande (Tabla R.15), pero hay que tener en cuenta que en *S. cerevisiae* este factor no se une de forma directa a las secuencias LORE, sino que otros factores son necesarios para que se produzca la unión al DNA de los promotores regulados. Como estos factores adicionales todavía no han sido caracterizados en *S. cerevisiae* desconocemos si se encuentran también presentes en el genoma de *K. lactis* o no. Tampoco disponemos por el momento de una cepa de *K. lactis* con el gen *MGA2* delecionado y que, si se obtiene, puede resultar muy útil para aclarar algunos aspectos sobre la regulación de *KIHEM13*. Los datos de las fusiones de regiones promotoras al gen reportero *lacZ* que se muestran en la figura R.25 indican que la construcción menor (PM), que contiene un sitio LORE incompleto, conserva en hipoxia aproximadamente un 80% de la actividad medida para el promotor completo (P2). Este dato, aunque de forma indirecta, sugiere que la regulación puede ejercerse a través de un mecanismo de activación hipóxica no dependiente de Mga2. La región que mayor importancia parece tener en la expresión hipóxica es la comprendida entre la posición -443 (límite superior de la construcción PM, figura R.24) y el promotor mínimo (de -200 a +1) estimado en relación con los sitios de inicio de la transcripción en las posiciones -101 y -111. También comparando los elementos comunes de las construcciones PM (Figura R.24) y D4 (Figura R.22), y puesto que ambas responden a hipoxia, puede determinarse la región -443 a -559 (respecto al segundo ATG) como importante para la regulación.

Si se compara la construcción SX con P2, la diferencia de actividad en condiciones hipóxicas es muy pequeña (en torno al 8%). Este dato no respondió a las expectativas reguladoras que hipotéticamente habíamos atribuido a esta región promotora. En la región que diferencia a ambas construcciones (de -1202 a -650) existe una secuencia (ATAGGCACGGTAYT) que está muy bien conservada cuando se comparan los promotores de *HEM13* en *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Tabla R.12) y que además presenta unas características de repetición simétrica inversa que se producen a veces en regiones reguladoras, sin embargo su papel en la regulación aeróbica o hipóxica de *KIHEM13* no parece ser relevante.

Finalmente, en la región 5' de *KIHEM13* se han localizado posibles sitios para la unión de otros factores de regulación transcripcional. Es el caso de los sitios de unión para el complejo Hap2/3/4 (consenso CCAAT) (Figura R.22 y tabla R.11). Hap2/3/4 es un factor activador en respuesta a hemo/oxígeno y/o crecimiento en fuentes de carbono no fermentables. El primero de estos sitios en posición 5' puede ser responsable de la mayor actividad β -galactosidasa que presenta la construcción P (Figura R.23)

cuando las células son cultivadas en un medio que contiene como fuente de carbono lactato al 2%, un sustrato no fermentable.

7. La regulación hipóxica de la biosíntesis de hemo en *K. lactis* a nivel transcripcional y el metabolismo de levaduras fermentadoras o respiradoras

En *S. cerevisiae* algunos de los genes de la biosíntesis de hemo están regulados a nivel transcripcional por oxígeno/hemo. *HEM13* responde a hipoxia en mayor medida que *HEM14* y *HEM15* pero todos ellos incrementan su expresión en hipoxia (Kwast *et al.*, 2002). En *K. lactis* también *KIHEM13* y en menor medida *KIHEM14* responden a hipoxia (Tabla R.20). La principal diferencia a nivel transcripcional se produce para el gen *HEM1* que es constitutivo en *S. cerevisiae* y está inhibido por hemo en *K. lactis*.

En este sentido las diferencias en el metabolismo respiro-fermentativo de las levaduras *K. lactis* y *S. cerevisiae* no parecen producirse por diferencias en la disponibilidad de hemo dependientes de procesos de regulación transcripcional de los genes implicados en su biosíntesis. La proteína δ -aminolevulinato sintasa, codificada por *HEM1*, en *K. lactis* sufre un proceso de regulación por hemo durante el importe a la mitocondria que no sucede para la proteína de *S. cerevisiae* (González Domínguez *et al.*, 2001). Carecemos de datos sobre si las proteínas codificadas por los genes *KIHEM14* y *KIHEM15*, tienen localización mitocondrial (como sucede en *S. cerevisiae*) y si en este caso el proceso de importe también se encuentra regulado por hemo como sucede para *KIHEM1*. Los niveles de hemo dependen no sólo de la tasa de biosíntesis sino también de la de degradación y este proceso metabólico por el momento tampoco ha sido explorado en *K. lactis* para poder establecer comparaciones con *S. cerevisiae*. Por otra parte, otros procesos metabólicos relacionados con la necesaria reoxidación del NADPH generado en el citoplasma a través del ciclo de las pentosas fosfato están resultando muy importantes a la hora de interpretar las diferencias metabólicas entre *S. cerevisiae* y *K. lactis* (Tarrío *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

1. El gen *KIHEM13* clonado a partir de una genoteca de la levadura *Kluyveromyces lactis* se encuentra en copia única en el genoma de la levadura y codifica una proteína con gran homología con *coproporfirinógeno oxidasas* eucariotas.
2. El gen *KIHEM13* complementa la mutación $\Delta hem13$ de una cepa de *S. cerevisiae*, lo que demuestra que la proteína codificada por este gen de *K. lactis*, no sólo tiene un gran parecido estructural con la de *S. cerevisiae* sino que también su función está conservada.
3. Una cepa haploide de *K. lactis* con el alelo *KIHEM13* delecionado es incapaz de crecer en un medio que no esté suplementado con hemina y carece de actividad *coproporfirinógeno oxidasa*.
4. En la región 5' de *KIHEM13* se han detectado varios puntos de inicio para la transcripción. Los dos más intensos se han localizado en las posiciones -111 y -101 respecto al segundo ATG de la ORF y situados en posición 3' respecto al primer ATG de la ORF. También se han localizado otros puntos de inicio de la transcripción, menos intensos, en posiciones -277, -243, -236 y -225 respecto al primer ATG de la ORF. Este último sólo se detecta en condiciones de hipoxia, pero no en aerobiosis o en hipoxia con suplemento de hemina.
5. La expresión heteróloga de *KIHEM13* no se ve alterada en cepas de *S. cerevisiae* derivadas de la cepa BY4741 y mutantes para los genes reguladores *ROX1* y *MGA2*, relacionados con la respuesta a hipoxia.
6. El promotor de *KIHEM13* contiene consensos para varios factores reguladores relacionados con la represión aeróbica y la inducción hipóxica en levaduras. Cuando se realizan fusiones de distintas regiones del promotor al gen reportero *lacZ* se comprueba que la región comprendida entre el primer y segundo ATG de la ORF es imprescindible para que se produzca la transcripción a elevados niveles en hipoxia. Estos datos indican que los puntos de inicio de la transcripción en posiciones -111 y -101 respecto al segundo ATG son mayoritariamente utilizados tanto en condiciones aeróbicas como hipóxicas. La región que controla la expresión hipóxica a partir de dichos puntos de inicio queda mayoritariamente delimitada en la región -559 (D3) a -443 (PM) respecto del segundo ATG de la ORF.
7. El factor regulador Rox1 de *K. lactis* no actúa como represor de la expresión aeróbica de *KIHEM13* en las condiciones ensayadas.
8. La transcripción de otros genes de la ruta de biosíntesis de hemo que no habían sido estudiados previamente, *KIHEM2*, *KIHEM3*, *KIHEM4* y *KLHEM15*, no está regulada por la disponibilidad de oxígeno y únicamente *KIHEM14* muestra una ligera inducción tras seis horas de hipoxia en las condiciones ensayadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramova, N. E., Cohen, B. D., Sertil, O., Kapoor, R., Davies, K. J. & Lowry, C.V. (2001a). Regulatory mechanisms controlling expression of the DAN/TIR mannoprotein genes during anaerobic remodeling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157: 1169-1177.
- Abramova, N., Sertil, O., Mehta, S. & Lowry, C.V. (2001b). Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 183: 2881-2887.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J. & Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridation with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5350-5354.
- Amillet, J. M., Buisson, N. & Labbe-Bois, R. (1995). Positive and negative elements involved in the differential regulation by heme and oxygen of the *HEM13* gene (coproporphyrinogen oxidase) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 28: 503-511.
- Amillet, J. M., Buisson, M. & Labbe-Bois, R. (1996). Characterization of an upstream activation sequence and two Rox1p-responsive sites controlling the induction of the yeast *HEM13* gene by oxygen and heme deficiency. *J. Biol. Chem.*, 271: 24425-24432.
- Becerra, M., Lombardia-Ferreira, L. J., Hauser, N. C., Hoheisel, J. D., Tizón, B. & Cerdán, M. E. (2002). The yeast transcriptome in aerobic and hypoxic conditions: effects of hap1, rox1, rox3 and srb10 deletions. *Mol. Microbiol.*, 43: 545-55.
- Botstein, D., Falco, S. C., Stewart, S. E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D. T., Struhl, K. & Davis, R. W. (1979). Sterile host yeasts (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.
- Brink, M. F., Verbeet, M. P. & de Boer, H. A. (1995). Specialized ribosomes: highly specific translation in vivo of a single targeted mRNA species. *Gene*, 156: 215-222.
- Camadro, J. M., Chambon, H., Jolles, J. & Labbe, P. (1986). Purification and properties of coproporphyrinogen oxidase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 156: 579-587.

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.

Chen, X. J., Wésolowski-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.

Chen, W. & Struhl, K. (1985). Yeast mRNA initiation sites are determined primarily by specific sequences, not by the distance from the TATA element. *E. M. B. O. J.*, 4: 3273-3280.

Church, G. M. & Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Acad. Natl. Sci. U. S. A.*, 81: 1991-1995.

Cohen, B. D., Sertil O., Abramova, N. E., Davies, K. J., & Lowry, C. V. (2001). Induction and repression of *DAN1* and the family of anaerobic mannoprotein genes in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through a complex array of regulatory sites. *Nucleic. Acids. Res.*, 29: 799-808.

Colloc'h, N., Mornon, J. P. & Camadro, J. M. (2002). Hypothesis. Towards a new T-fold protein?: The coproporphyrinogen III oxidase sequence matches many structural features from urate oxidase. *FEBS Letters*, 526: 5-10.

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.

Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B. & Dent, S. Y. (2003). Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *J. Biol. Chem.*, 278: 50158-50162.

Davie, J. K., Trumbly, R. J. & Dent, S. Y. (2002). Histone-dependent association of Tup1-Ssn6 with repressed genes in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 693-703.

Davies, B. S., Wang, H. S. & Rine, J. (2005). Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 7375-7385.

Díaz Prado, S., Tarrío, N., Cerdán, M. E. & González-Siso, M. I. (2004). Cloning genes from a library using a clustering strategy and PCR. *Mol. Biotechnol.*, 26: 35-38.

Difflumeri, C., Larocque, R. & Keng, T. (1993). Molecular analysis of *HEM6* (*HEM12*) in *Saccharomyces cerevisiae*, the gene for uroporphyrinogen decarboxylase. *Yeast*, 9: 613-623.

Donahue, T. F & Cigan, A. M. (1988). Genetic selection for mutations that reduce or abolish ribosomal recognition of the *HIS4* translational initiator region. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2955-2963.

Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. & Souciet, J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430: 35-44.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300: 1005-1016.

Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132: 6-13.

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*, 74:527-34.

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., Freire-Picos, M. A. & Cerdán, M. E. (2001). Haem regulation of the mitochondrial import of the *Kluyveromyces lactis* 5-aminolaevulinate synthase: an organelle approach. *Yeast*, 18: 41-48.

González-Domínguez, M., Freire-Picos, M. A., Ramil, E., Guiard, B. & Cerdán, 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.
- González-Siso, M. I., Freire-Picos, M. A., Ramil, E., González-Domínguez, M., Rodríguez Torres, A. M. & Cerdán, M. E. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. *Enzyme Microb. Technol.*, 26: 699-705.
- Grimal, D. & Labbe-Bois, R. (1980). An enrichment method for heme-less mutants of *Saccharomyces cerevisiae* based on photodynamic properties of Zn-protoporphyrin. *Mol. Gen. Genet.*, 178: 713-6.
- Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 465-503.
- Healy, A. M. & Zitomer, R. S. (1990). A sequence that directs transcriptional initiation in yeast. *Curr. Genet.*, 18: 105-109.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., 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.
- Hodge, M. R., Kim, G., Singh, K. & Cumsy, M. G. (1989). Inverse regulation of the yeast COX5 genes by oxygen and heme. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1958-1964.
- 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.
- Huang, X. & Millar, W. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.*, 12: 337-357.
- Ihmels, J., Bergmann, S., Gerami-Nejad, M., Yanai, I., McClellan, M., Berman, J. & Barkai, N. (2005). Rewiring of the yeast transcriptional network through the evolution of motif usage. *Science*, 309: 938-940.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, 153: 163-168.

Jacob, W. F., Santer, M. & Dahlberg, A. E. (1987). A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84: 4757-4761.

Jiang, Y., Vasconcelles, M. J., Wretzel, S., Light, A., Gilooly, L., McDaid, K., Oh, C. S., Martin, C. E. & Goldberg, M.A. (2002). Mga2p processing by hypoxia and unsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: impact on LORE-dependent gene expression. *Eukaryot. Cell.*, 1: 481-490.

Jiang, Y., Vasconcelles, M. J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C. E. & Goldberg, M. A. (2001). MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 6161-6169.

Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, 292: 195-202.

Kastaniotis, A.J., Mennella, T.A., Konrad, C., Torres, A.M. & Zitomer, R.S. (2000). Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene *ANB1* in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 7088-7098.

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.

Keng, T. & Guarente, L. (1987). Constitutive expression of the yeast *HEM1* gene is actually a composite of activation and repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84: 9113-9117.

Keng, T., Richard, C. y Larocque, R. (1992). Structure and regulation of yeast *HEM3*, the gene for porphobilinogen deaminase. *Mol Gen Genet.*, 234: 233-43.

Klinkenberg, L. G., Mennella, T. A., Luetkenhaus, K. y Zitomer, R. S. (2005). Combinatorial repression of the hypoxic genes of *Saccharomyces cerevisiae* by the DNA binding proteins Rox1 and Mot3. *Eukaryot Cell.*, 4: 649-60.

Kolarov, J., Kolarova, N. & Nelson, N. (1990). A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J. Biol. Chem.*, 265: 12711-12716.

Kooistra, R., Hooykaas, P. J. J. & Steensma, H. Y. (2004). Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 21: 781-792.

Kozak, M. (1987). Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3438-3445.

Kozak, M. (1998). Primer extension analysis of eukaryotic ribosome-mRNA complexes. *Nucleic Acids Res.*, 26: 4853-4859.

Kozak, M. (2002). Pushing the limits of scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299: 1-34.

Kuhnel, A., Gross, U., Doss, M. O. (2000). Hereditary coproporphyria in Germany: clinical-biochemical studies in 53 patients. *Clin. Biochem.*, 33: 465-73.

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., Camadro, J. M. & Chambon, H. (1985). Fluorometric assays for coproporphyrinogen oxidase and protoporphyrinogen oxidase. *Analytical Biochemistry*, 149: 248-260.

Labbe, P. & Labbe-Bois, R. (1990). Tetrapyrrol and heme biosynthesis in yeast. *Biosynthesis of heme and chlorophylls*. Ed. H.A. Dailey. McGraw-Hill. New York.

Labbe-Bois, R. (1990). The ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence, disruption and expression of its structural gene *HEM15*. *J. Biol. Chem.*, 265: 7278-7283.

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: 1357-63.

Lamoril, J., Puy, H., Gouya, L., Rosipal, R., Da Silva, V., Grandchamp, B., Foint, T., Bader-Meunier, B., Dommergues, J. P., Deybach, J. C. & Nordmann, Y. (1998). Neonatal hemolytic anemia due to inherited harderoporphyria: clinical characteristics and molecular basis. *Blood*, 91: 1453-1457.

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.

Laz, T. M., Pietras, D. F. & Sherman, F. (1984). Differential regulation of the duplicated isocytochrome c genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 4475-4479.

Lee, D. S., Flachsová, E., Bodnárová, M., Demeler, B., Martasek, P. & Raman, C. S. (2005). Structural basis of hereditary coproporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 14232-14237.

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.

- Lowry, C. V., Cerdán, 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.
- 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.
- Martasek, P., Camadro, J.M., Raman, C. S., Lecomte, M. C., Le Caer, J. P., Demeler, B. Grandchamp, B. & Labbe, P. (1997). Human coproporphyrinogen oxidase. Biochemical characterization of recombinant normal and R231W mutated enzymes expressed in *E. coli* as soluble, catalitically active homodimers. *Cell Mol. Biol.*, 43: 47-58.
- May, B. K., Dogra, S. C., Sadlon, T. J., Bhasker, C. R., Cox, T. C. & Bottomley, S. S. (1995). Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 51: 1-51.
- McGuffin, L. J, Bryson, K. & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16: 404-405.
- 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.
- Miyake, S. & Sugimura, T. (1968). Coproporphyrinogenase in a respiration-deficient mutant of yeast lacking all cytochromes and accumulating coproporphyrin. *J. Bacteriol*, 96: 1997-2003.
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M. & Lusty C.J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene*, 45: 299-310.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10: 1-6.
- Nordmann, Y., Grandchamp, B., de Verneuil, H., Phung, L., Cartigny, B. & Fontaine, G. (1983). Harderoporphyria: a variant hereditary coproporphyria. *J. Clin. Invest.*, 72: 1139-1149.
- Núñez, L., Gonzalez-Siso, M. I., Becerra, M. & Cerdán, M. E. (2004). Functional characterisation and transcriptional regulation of the *KIHEM12* gene from *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.*, 46: 147-57.
- Outten, C. E. & Culotta, V. C. (2004). Alternative start sites in the *Saccharomyces cerevisiae* *GLR1* gene are responsible for mitochondrial and cytosolic isoforms of glutathione reductase. *J. Biol. Chem.*, 279: 7785-7791.

- Panek, H. & O'Brian, M. R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*, 148: 2273–2282.
- Pfeifer, K., Kim, K.S., Kogan, S. & Guarente, L. (1989). Functional dissection and sequence of yeast *HAP1* activator. *Cell*, 56: 291-301.
- Pfeifer, K., Prezant, T. & Guarente, L. (1987). Yeast *HAP1* activator binds to two upstream activation sites of different sequence. *Cell*, 49: 19-27.
- Phillips, J. D., Whitby, F. G., Warby, C. A., Labbe, P., Yang, C., Pflugrath, J. W., Ferrara, J. D., Robinson, H., Kushner, J. P. & Hill, C. P. (2004). Crystal structure of the oxygen-dependant coproporphyrinogen oxidase (odCPO/Hem13p) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279: 38960-38968.
- Ponka, P. (1999). Cell biology of heme. *Am. J. Med. Sci.*, 318: 241-256.
- Poyton, R. O. (1999). Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. *Respiration Physiology*, 115: 119–133.
- Prior, C., Mamessier, P., Fukuhara, H., Chen, X. J. & Wésolowski-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.
- Rose, M. D., Winston, F. & Hieter, P. (1990). Methods in yeast genetics. A course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Rytka, J., Bilinski, T. & Labbe-Bois, R. (1984). Modified uroporphyrinogen decarboxylase activity in a yeast mutant which mimics porphyria cutanea tarda. *Biochem. J.*, 218: 405-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E. J. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74: 5463-5467.
- Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1983). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.*, 16: 339-346.
- Schlaepfer, I.R., Mattoon, J.R. & Bajszar, G. (1994). The sequence and potential regulatory elements of the *HEM2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10: 227-229.

Schmitt, C., Gouya, L., Malonova, E., Lamoril, J., Camadro, J. M., Flamme, M., Rose, C., Lyoumi, S., Da Silva, V., Boileau, C., Grandchamp, B., Beaumont, C., Deybach, J. C. & Puy, H. (2005). Mutations in human CPO gene predict clinical expresión of either hepatic hereditary coproporphyría or erythropoietic harderoporphyria. *Hum. Mol. Genet.*, 14: 3089-3098.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, 31: 3381-3385.

Seoighe, C. & Wolfe, K.H. (1998). Extent of genomic rearrangement after genome duplication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 4447-4452.

Sertil, O., Cohen, B. D., Davies, K. J. & Lowry, C. V. (1997). The *DAN1* gene of *S. cerevisiae* is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism. *Gene*, 192: 199-205.

Sertil, O., Kapoor, R., Cohen, B.D., Abramova, N. & Lowry, C.V. (2003). Synergistic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 31: 5831-5837.

Shianna, K. V., Dotson, W. D., Tove, S. & Parks, L. W. (2001). Identification of a *UPC2* homolog in *Saccharomyces cerevisiae* and its involvement in aerobic sterol uptake. *J. Bacteriol.*, 183: 830-834.

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.

Steitz, J. A. & Jakes, K. (1975). How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 4734-4738.

Susa, S., Daimon, M., Ono, H., Li, S., Yoshida, T. & Kato, T. (2002). Heme inhibits the mitochondrial import of coproporphyrinogen oxidase. *Blood*, 100: 4678-4679 .

Susa, S., Daimon, M., Ono, H., Li, S., Yoshida, T. & Kato, T. (2003). The long, but not the short, presequence of human coproporphyrinogen oxidase is essential for its import and sorting to mitochondria. *Tojoku J. Exp. Med.*, 200: 39-45.

Takahashi, S., Furuyama, K., Kobayashi, A., Taketani, S., Harigae, H., Yamamoto, M., Igarashi, K., Sasaki, T. & Hayashi, N. (2000). Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273: 596-602.

Takeuchi, H., Kondo, M., Daimon, M., Susa, S., Ueoka, K., Uemura, O. & Togari, H. (2001). Neonatal-onset hereditary coproporphyrinemia with male pseudohermaphroditism. *Blood*, 98: 3871-3873.

Tarrío, N., Becerra, M., Cerdán, M. E. & Siso, M. I. (2006). Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *F. E. M. S. Yeast Res.*, 6: 371-380.

Ushinsky, S. C. & Keng, T. (1994). A novel allele of *HAP1* causes uninducible expression of *HEM13* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 136: 819-831.

Vilela, C. & McCarthy, J. E. G. (2003). Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5' untranslated region. *Molecular Microbiology*, 49: 859-867.

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.

Wésolowsky-Louvel, M., Breunig, K. D. & Fukuhara, H. (1996). In *Nonconventional Yeast in biotechnology*, Wolf, K. (ed.). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg; 139-202.

Wesolowski-Louvel, M., Tanguy-Rougeau, C. & Fukuhara, H. (1988). A nuclear gene required for the expression of the linear DNA-associated killer system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 4:71-78.

Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980). Coproporphyrinogen oxidase. I. Purification, properties, and activation by phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 255: 4722-4726.

Zagorec, M. & Labbe-Bois, R. (1986). Negative control of yeast coproporphyrinogen oxidase synthesis by heme and oxygen. *J. Biol. Chem.*, 261: 2506-2509.

Zagorec, M., Buhler, J. M., Treich, I., Keng, T., Guarente, L., & Labbe-Bois, R. (1988). Isolation, sequence, and regulation by oxygen of the yeast *HEM13* gene coding for coproporphyrinogen oxidase. *J. Biol. Chem.*, 263: 9718-9724.

Zeeman, A. M. & Steensma, H. Y. (2003). The acetyl co-enzyme A synthetase genes of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 20: 13-23.

Zhang, L. & Hach, A. (1999). Molecular mechanism of heme signaling in yeast: the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 56: 415-426.

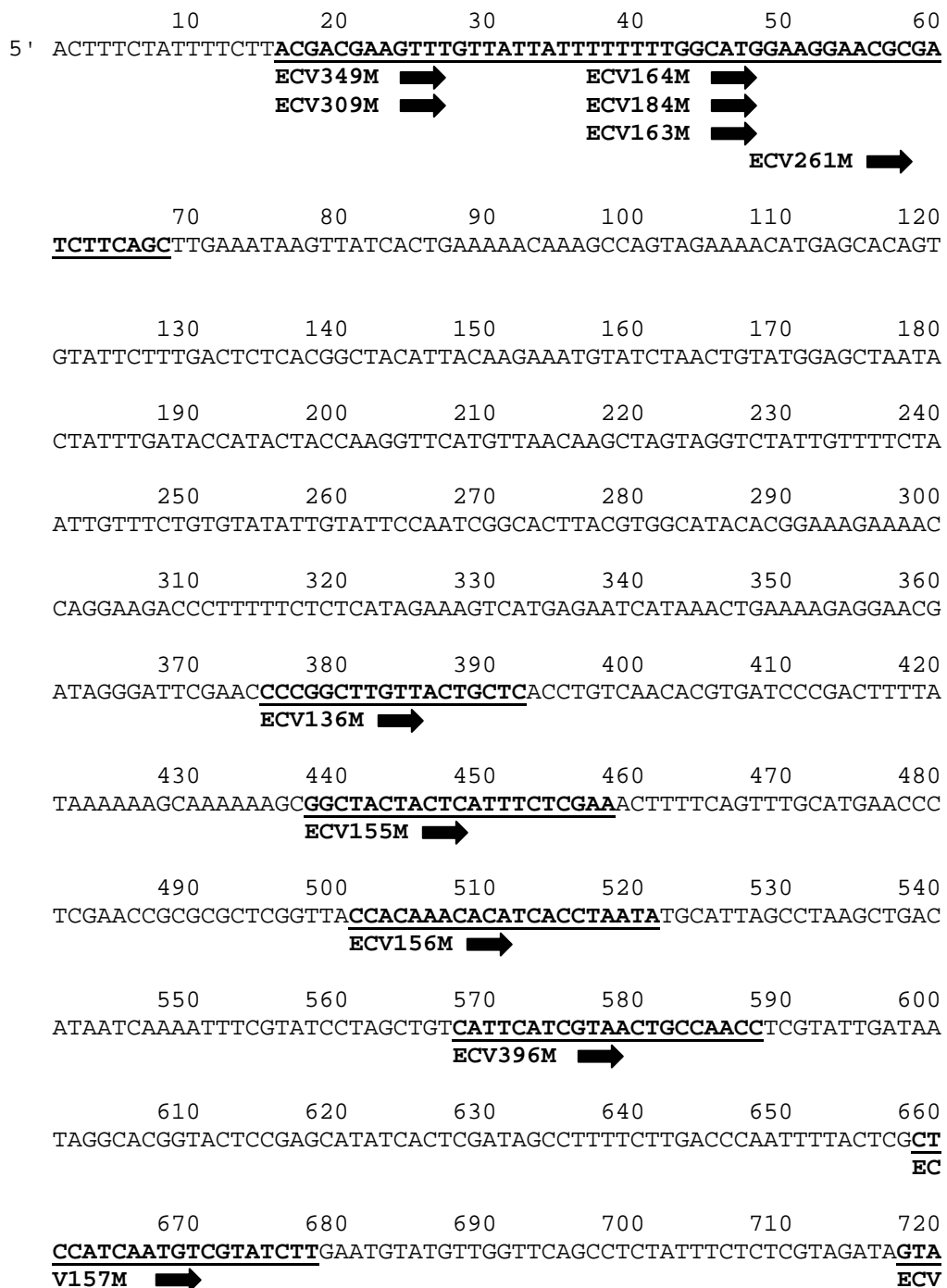
Zhang, L., Hach, A. & Wang, C. (1998). Molecular mechanism governing heme signaling in yeast: a higher-order complex mediates heme regulation of the transcriptional activator *HAP1*. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 3819-3828.

Zhang, Z. & Reese, J. C. (2004). Redundant mechanisms are used by Ssn6-Tup1 in repressing chromosomal gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 279: 39240-39250.

Zitomer, R. S. & Hall, B. D. (1977). Yeast cytochrome c messenger RNA. *In vitro* translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product. *J Biol Chem.*, 251: 6320-6326.

ANEXO

En este anexo se muestra la secuencia obtenida en este trabajo, en la que se han marcado los dos posibles codones de inicio de la traducción de *KIHEM13* y el de *KIRPC11*, así como sus respectivos codones de parada (en **blanco**). *KIRPC11* se encuentra en la hebra complementaria por lo que su codón de parada (CTA) se encuentra antes que el codón de inicio (CAT) en esta secuencia (5'>3'). Igualmente sobre esta secuencia se han posicionado los **cebadores** utilizados en las diferentes técnicas llevadas a cabo en el presente trabajo. La flecha indica la dirección (5'>3') en la que se ha diseñado el cebador y la letra inicial de su nombre se encuentra debajo del primer nucleótido de su secuencia.



ANEXO

730 740 750 760 770 780
GTATGTTTCGAATGGTTCCACTTGACCTTTTTTTTTTTCAGTATATACGGTTTAACACCTAAAC
158M → **ECV395**

790 800 810 820 830 840
GAATGCTGACGCCTATGTCCTCCGTTTCAGACCATAATAATGATACAGTAGTGTATTATAT
M →

850 860 870 880 890 900
 TCATCTTGTGGTGCTCGGACTGCCACTATTGTGATGAGATTCTTGTATCTCGTATCTTTTT
E

910 920 930 940 950 960
CCTCTTCCTGTATGCGGTGGAAACTAGCTAGCCTTTTTTCTTCAATTACCTTTATCCAA
CV129M → **ECV159M** →
 ← **ECV250M**

970 980 990 1000 1010 1020
 TTATCACCAGGTCTGAATCTTGAAGTCTGCTTGGATTTTTTTTTTTTTGACTAT
ECV160M →
 ← **ECV130M**

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ATTAACGAAAGTGAATTATTCATTTCGACTCACCAACTGAAATGAGAAGAGAAGCATTGG
 ← **ECV154M**

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 ATCTATACTGCCCTTTTCTCTCCAATCAAGCAGAATCATTGATAAACTTTACATCCAGT

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATACTTGTCTGGTAAAGCAAACAGAACTCAACGACCGGTTTCATCTTAACACACATTCTA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AATATTATCATTGTGCGATGACAGATTCACAAGTGCCAATTAGAGAGAGAATGGAGGCCT
 ← **ECV394M**

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TAGTGCGCCGAAACAGCAAGAAATTACCAAGGGTCTGGAAACTTTGGATACTGTAAAGT
ECV131M →

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TTCAAGCCGATTCTTGGGATCGTGGCAACAACGGTGGTGGCGGTGTCTCGATGGTGTTC

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 AGAATGGTACTACGTTTGAGAAAGGTGGTGTAAATGTCAGTGTGGTTCATGGGAACCTGA

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GTCCACCTGCTATCAAGGCTATGAAAGCGGACCACAAAAATTTGCATCTGCCTATTGATC

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CTGCAACTGGTGAACCAGATGCAACAGGAGTAAAATCTTCGCCTGTGGTCTCTCTATGG
 ← **ECV120M**

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 TTATTTCATCCAATTAATCCACATGCGCCAACCACCATTGGAATTATAGGTATTTTCGAAA

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CCTGGAATGCGGACGGTACACCACAAGCTTGGTGGTTCGGTGGTGGTGGTCTGATTTAACTC

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CTTCTTATTTGTACGAGGAAGACGCTAAATTGTTCCATCAATTGCACAAGGATGCTTTGG

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACAAAC**GGACGTTGCCTTGTACCCAAA**ATACAAGAAATGGTGCGATGAGTATTTCTATA
ECV95M →

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 TCAAACACAGAGAAGAAACCAGAGGTATCGGTGGTATTTTCTTTGATGATGTGCGATGATC

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 GTGATCCAAACGAAATCTTGCAAATGGTTGAAACTGTTTTGATGCCTTCTTGCCATCTT

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 ACCTCGAAATCATCAAAGAAGAAAGGATATGCCTTACACTGAAGAAGAAAGACAATGGC

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 AACAAATTAGACGTGGCAGATACGTTGAATTCAACCTAGTCCTTGACAGAGGTACTIONCAAT

2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCGGTTTAA**GAACTCCAGGATCCCGTGTC**GAAAGTATTTTGTATGTCTTTGCCTGTGACTG
 ← **ECV96M**

2110 2120 2130 2140 2150 2160
 CTTTCGTGGTTGTATGACCATCATCCTGAAGTAGACTCTAGAGAAGATAAATTACTCCAAG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 TATTGAAGAACCCTGTTGAATGGGTT**TGA**ATGCCTTTATTTATGTAACGTCTCATGTATT

2230 2240 2250 2260 2270 2280
 TAATTCTTAGTTTCTAATGATCTTAATTTCTTACGCTTCAAAAACCAAGTCGGTCGTTAG

2290 2300 2310 2320 2330 2340
 TACCATACAGCGTTGCACGAAATGGTTCTGTCA**GGCCGTCGACAATACTTTTAT**TTTGTC
ECV121M →
ECV251M →

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TTGTTCAATCTATTTGTAGATTTATAACATTATATTACACTTTGATTTCAGAAGAAGTTTCA

2410 2420 2430 2440 2450 2460
 TCAAACCCTAACAACTTCCTTTT**CGAGCCTAATGAAAGCGTGA**TCTACCTTTCATCATT
 ← **ECV135M**

2470 2480 2490 2500 2510 2520
 TGAAAGATTAAGCATGCGTTTTTTAGCTGGGCGAGAGACAAATGGCAGCGATTAAAGCCGA

2530 2540 2550 2560 2570 2580
 ACATTTATCTTCTTGTGCTGTTTTTTGCTCTAAGCGATGTAATAACTGCTAAGAAGATCTA

2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TAATATTTTGTGTTGATGCGTATCGAAATCAAAGTAAATTTCAAAAATACACAATCT**CTAG**

2650 2660 2670 2680 2690 2700
 TTCTCTCTCCATTTATGACCACAGTTAACACATTTGTAGAAAGTTGTCATAGGTTTCATCT

2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GCAGATCTGATTTGCAACTGGAAGAAGTAAGCTCTTTCACCCGCACATTGGTCAT**GGTTC**
 ← **ECV26**

ANEXO

2770 2780 2790 2800 2810 2820
GGACATTGTGCTGCTGTCTGGTCAACATTATCCCATGCACCTTCTCCACCTAAAGACATCA
2M ← ECV165M
← ECV185M

2830 2840 2850 2860 2870 2880
TCAACTTCTTTCTAGGGAGGTTCTTTCTATCGTATACCTCTATCCCATCAATTAAAAAC

2890 2900 2910 2920 2930 2940
TGGTATGGGCATGATCCGCATGCTAGTTTATACAGACCTGAATCAGCTTTTGATACCAAC

2950 2960 2970 2980 2990 3000
AACATGTTATTGCATAATGGCAAAACGAAAGCATCCTACAACCTTAATTCTCAATGTCAG
← ECV133M

3010 3020 3030 3040 3050 3060
ACTCCTCAAACACGATACGTTAACGCACCGTTACCTGCCATAAGCTCCTTCAACACGTT

3070 3080 3090 3100 3110 3120
ATCGCATACACTCTAAAATGAACCTCATCGCTATAATTATTGAGAGTAGGTTTTAATTCT

3130 3140 3150 3160 3170 3180
TTCCTCATCTCATATAGAAATTTTTTCAGAAAAAAAAAAGTAGAGCTTCATGCCTTTAACT

3190 3200 3210 3220 3230 3240
TTGAATCGATATTTATGTTGACATTTAAGGTTTGTATGTCAAATATAGTGTATAGGGTTA

3250 3260 3270 3280 3290 3300
ATACCTGTGGGCGAGGTTTGATAGAAGAACAACCTCCACATTTATAAGTTAGTTTCCATT

3310 3320 3330 3340 3350 3360
CTCTAGACTTTAGAGTATTTGATTATCTTGGAGCGGTTAAACCTTGAAAACATGACGAAG

3370 3380 3390 3400 3410
AAAGAGTGCAGTGATAATGAGGAAGAAGAAGACATTGATATTGGTAAA 3'

