

**ESTUDIO DE LOS GENES *KIPDCB* Y *KIGSK-3*
DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis***

M. ESTHER RODRÍGUEZ BELMONTE

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

**ESTUDIO DE LOS GENES *KIPDCB* Y *KIGSK-3* DE LA
LEVADURA *Kluyveromyces lactis***

Memoria para aspirar al grado de Doctora en
Biología presentada por :

Dña. M. Esther Rodríguez Belmonte

Julio de 1997

El presente trabajo: **ESTUDIO DE LOS GENES *KIPDCB* Y *KIGSK-3* DE LA LEVADURA *Kluyveromyces lactis***, presentada por Dña. María Esther Rodríguez Belmonte para aspirar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

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

La Coruña, 28 de Mayo de 1997



VºBº

LA DIRECTORA DEL TRABAJO
Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva
Prof. de Bioquímica y Biología Molecular.

*"Todo debe hacerse
lo más simple posible,
pero no más simple"*
(Albert Einstein)

A mis padres y a Fran

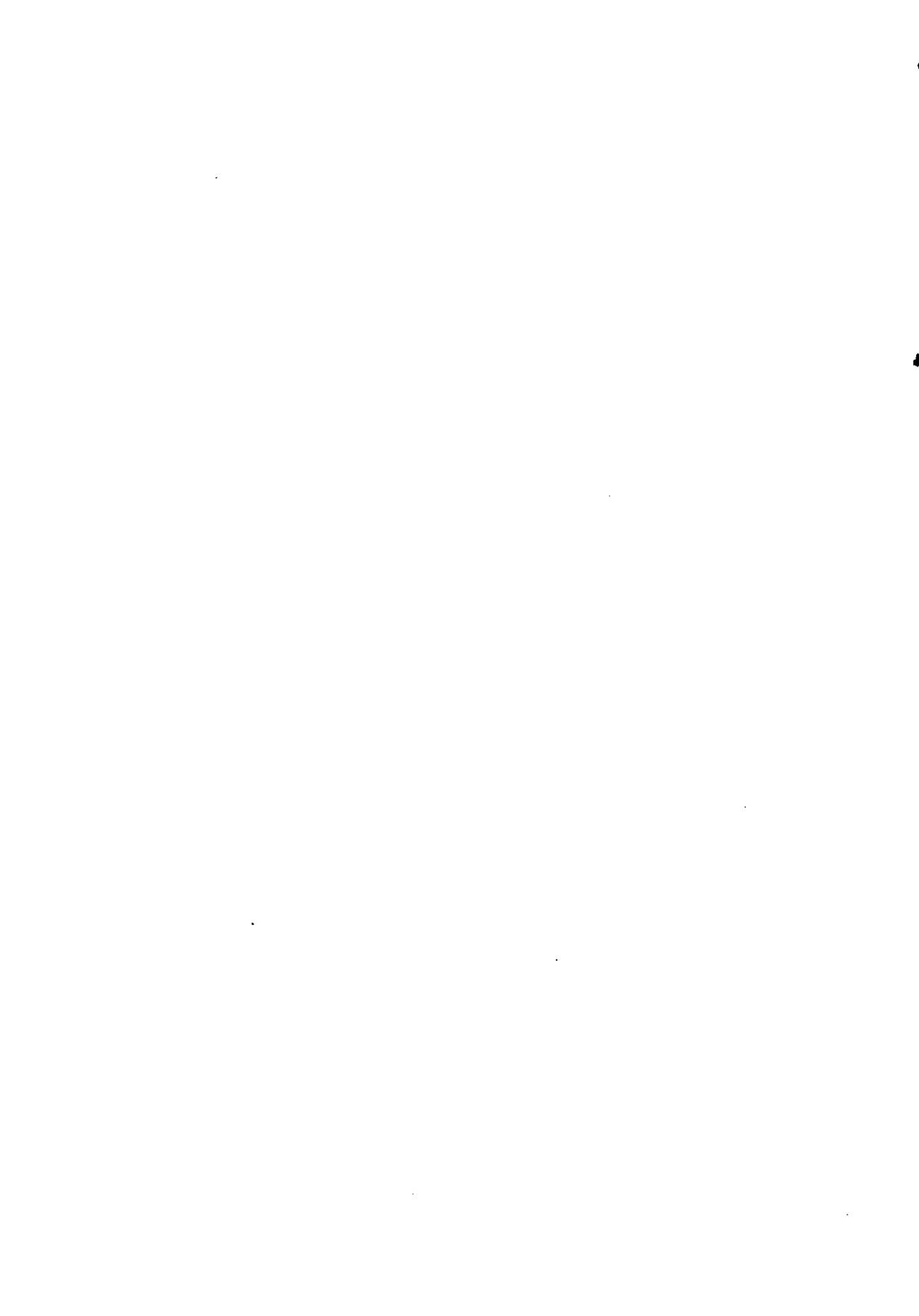
Quiero dar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Esperanza Cerdán, no sólo por la dirección de este trabajo, sino por su inestimable aportación personal en la redacción y en la interpretación de los resultados, que ha sido una valiosa ayuda en la discusión final de los mismos.

Quisiera agradecer el apoyo y paciencia que a lo largo de todos estos años me han demostrado mis compañeros Manuel, Mónica, Belén, "los Luises" y, especialmente, Elvira, Marián, Isabel y Ana que me han ayudado en mis primeros pasos por la Biología Molecular y, sobre todo, por su amistad.

También quiero mencionar a María Elena, por su buen humor (desde tan temprano) y por su capacidad de trabajo.

Tampoco quiero olvidar al resto de mis compañeros, fuera y dentro del Departamento, que de una u otra forma han contribuido con su amistad y con su apoyo a que esta memoria llegase a ser una realidad, especialmente a Geli y Anita, que han demostrado en todo momento su interés.

Determinados trabajos exigen una constancia especial, que puede terminar con la paciencia de quienes te rodean. Por ello, quisiera agradecer a todos aquellos que han *sufrido* esta Tesis y que, a pesar de todo, siguen dándome todo su apoyo.



La autora de este trabajo ha disfrutado durante su realización de una beca de la Xunta de Galicia desde Enero de 1993 hasta Mayo de 1995, y una beca de la Universidad de La Coruña en 1996 y 1997.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación obtenida a través de los proyectos CICYT (BIO94.0961), XUGA (10307B96) y CICYT (BIO96.2022-CE).

ÍNDICE GENERAL

1. PRESENTACIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Líneas celulares utilizadas	7
2.1.1. Líneas celulares de levaduras	7
2.1.2. Método de mantenimiento de las líneas celulares de levaduras	8
2.1.3. Líneas celulares de bacterias	9
2.1.4. Método de mantenimiento de las líneas celulares de bacterias	9
2.2. Medios de cultivo	10
2.2.1. Medios de cultivo para levaduras	10
2.2.2. Medios de cultivo para bacterias	14
2.3. Plásmidos	16
2.3.1. Vectores de clonación	16
2.3.2. Plásmidos contruidos para la secuenciación	16
2.3.3. Plásmidos con distintos marcadores de selección en levaduras contruidos para subclonar los genes <i>KIPDCB</i> y <i>KIGSK-3</i> .	17
2.3.4. Plásmidos contruidos para la interrupción de los genes <i>KIPDCB</i> y <i>KIGSK-3</i> en líneas de <i>Kluyveromyces lactis</i>	18
2.3.5. Plásmidos contruidos para el estudio de los promotores de <i>KIPDCB</i> y <i>KIGSK-3</i> .	19

2.4. Extracción de ácidos nucleicos	20
2.4.1. Extracción de DNA plasmídico de bacterias	20
2.4.1.1. Extracción mediante lisis alcalina	20
2.4.1.2. Extracción de DNA libre de RNA para secuenciación	22
2.4.2.3. Extracción rápida de plásmido de bacteria mediante lisis por calor	24
2.4.2. Extracción de DNA plasmídico de levaduras	24
2.4.3. Extracción de DNA de alto peso molecular de levaduras	25
2.4.4. Extracción de RNA total de levaduras	27
2.5. Medida de la concentración de ácidos nucleicos	28
2.5.1. Medida de la concentración de DNA	28
2.5.2. Medida de la concentración de RNA	29
2.6. Transformación de levaduras	29
2.6.1. Método de Klebe	29
2.6.2. Método de alta eficiencia para la transformación de <i>K. lactis</i>	30
2.7. Transformación de bacterias	32
2.7.1. Preparación de células competentes	32
2.7.2. Transformación	33
2.8. Técnicas de electroforesis	34
2.8.1. Geles de agarosa	34
2.8.1.1. Geles no desnaturalizantes	34
2.8.1.2. Geles desnaturalizantes	35
2.8.2. Geles de poliacrilamida	37
2.9. Técnicas de manipulación del DNA	39
2.9.1. Digestión de DNA	39
2.9.2. Aislamiento de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	40

2.9.3. Tratamiento con fosfatasa alcalina de los vectores tras digestión	40
2.9.4. Relleno de los extremos protuberantes de los vectores tras digestión	41
2.9.5. Ligamiento de fragmentos de DNA	41
2.10. Generación de deleciones con DNAsaI	41
2.11. Amplificación de ácidos nucleicos mediante <i>PCR</i>	45
2.11.1. Amplificación de DNA	45
2.11.2. Amplificación de RNA	47
2.12. <i>Southern blot</i>	47
2.13. <i>Northern blot</i>	48
2.14. Secuenciación	50
2.15. Ensayos β -Galactosidasa	51
2.16. Programas de análisis de secuencias	52
3. OBJETIVOS	55
4. SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>ORFs</i>	59
4.1. Obtención de subclones para secuenciación	61
4.2. Deleción de los subclones para secuenciación	62
4.3. Estrategia de secuenciación	66
4.4. Análisis de la secuencia	67
4.4.1. Secuencia de la <i>ORF1</i>	67
4.4.2. Secuencia de la <i>ORF2</i>	70
4.5. Comparación de las secuencias con las bases de datos	72
5. ESTUDIO DEL GEN <i>KIPDCB</i>	81
5.1. Introducción	83
5.1.1. Funciones relacionadas con genes homólogos a <i>KIPDCB</i>	83
5.1.2. La piruvato descarboxilasa de <i>S. cerevisiae</i>	84
5.1.3. La piruvato descarboxilasa de <i>K. lactis</i>	97
5.1.4. <i>THI3</i> , un regulador de elevada homología con piruvato descarboxilasas	100

5.2. Resultados	102
5.2.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región codificadora	102
5.2.2. Comparación del uso de codones de distintos genes que codifican piruvato descarboxilasas	105
5.2.3. Análisis de la región promotora de <i>KIPDCB</i>	106
5.2.4. Análisis funcional del gen <i>KIPDCB</i>	108
5.2.4.1. Subclonado del gen <i>KIPDCB</i>	108
5.2.4.2. Análisis de <i>Southern blot</i>	109
5.2.4.3. Complementación del doble nulo <i>pdcl⁰ pdc5⁰</i> de <i>S. cerevisiae</i>	110
5.2.4.4. Estudio de la expresión del gen	111
5.2.4.5. Interrupción del gen <i>KIPDCB</i>	115
5.2.4.6. Estudio del crecimiento del mutante ERp-1 del doble mutante ERp-2 en distintas fuentes de carbono	118
5.2.4.7. Expresión de <i>KIPDCA</i> en la línea ERp-1 (<i>KlfdcB::URA3</i>)	121
5.2.4.8. Crecimiento de ERp-1 en ausencia de tiamina	123
5.3. Discusión	125
6. ESTUDIO DEL GEN <i>KIGSK-3</i>	133
6.1. Introducción	135
6.1.1. El gen <i>MCK1</i>	138
6.1.2. Función de <i>MCK1</i> en la segregación cromosómica	140
6.1.3. <i>MCK1</i> como activador de la transcripción de <i>IME1</i>	145
6.1.4. El gen <i>MDS1/RIM11/ScGSK-3</i>	150
6.1.5. El gen <i>MRK1</i>	157
6.1.6. La <i>ORF YOL128c</i>	158

6.2. Resultados	160
6.2.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región codificadora	160
6.2.2. Comparación del uso de codones con otros genes de la familia GSK-3	164
6.2.3. Análisis de la secuencia de la región promotora del gen <i>KIGSK-3</i>	164
6.2.4. Análisis funcional del gen <i>KIGSK-3</i>	168
6.2.4.1. Subclonado del gen <i>KIGSK-3</i>	168
6.2.4.2. Análisis de <i>Southern blot</i>	169
6.2.4.3. Interrupción del gen <i>KIGSK-3</i>	170
6.2.4.4. Análisis fenotípico del mutante nulo <i>Klgsk-3::URA3</i>	173
6.2.4.5. Análisis de complementación	179
6.2.4.6. Estudio de la expresión del gen <i>KIGSK-3</i>	180
6.3. Discusión	188
7. CONCLUSIONES	197
8. BIBLIOGRAFÍA	203

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	61	Figura 23	122
Figura 2	62	Figura 24	124
Figura 3	63	Figura 25	146
Figura 4	65	Figura 26	162
Figura 5	66	Figura 27	163
Figura 6	67	Figura 28	165
Figura 7	69	Figura 29	169
Figura 8	71	Figura 30	170
Figura 9	101	Figura 31	171
Figura 10	105	Figura 32	172
Figura 11	108	Figura 33	173
Figura 12	109	Figura 34	174
Figura 13	110	Figura 35	176
Figura 14	112	Figura 36	177
Figura 15	113	Figura 37	178
Figura 16	114	Figura 38	180
Figura 17	114	Figura 39	181
Figura 18	115	Figura 40	181
Figura 19	116	Figura 41	183
Figura 20	117	Figura 42	184
Figura 21	119	Figura 43	186
Figura 22	120		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	64
Tabla 2	64
Tabla 3	73
Tabla 4	73
Tabla 5	74
Tabla 6	74
Tabla 7	76
Tabla 8	77
Tabla 9	77
Tabla 10	78
Tabla 11	78
Tabla 12	90
Tabla 13	91
Tabla 14	106
Tabla 15	164

ABREVIATURAS

- A₆₀₀** absorbancia a 600 nm
- Aa.** aminoácido
- acetil CoA** acetil coenzima A
- APS** persulfato amónico
- ATCC** Colección americana de cultivos tipo
- ATP** adenosin 5'-trifosfato
- Bicina** *N,N*-bi(2-hidroxietil) glicina
- Bis-acrilamida** *N,N'*-metilen bisacrilamida
- BLAST** *Basical Local Aligment Research Tool*
- cAMP** adenosin 3'5'-monofosfato ciclo
- CBI** índice de desviación en el uso de codones
- CM** medio completo mínimo
- Da** Dalton
- dATP** desoxiadenosin-trifosfato
- ddNTPs** didesoxinucleótidos trifosfato
- DEP** dietilpirocarbonato
- dNTPs** desoxinucleótidos trifosfato
- DMF** dimetilformamida
- DNA** ácido desoxirribonucleico
- DNasa** desoxirribonucleasa
- EDTA** ácido etilenodiaminotetracético

EGTA ácido etilen glicol-bis(β -aminoetil eter)-*N,N,N',N'*-tetracético

EMBL Laboratorio europeo de biología molecular

GCG *Genetics Computer Group* de la Universidad de Wisconsin

Gal D-galactosa

gen^o se ha utilizado esta terminología para diferenciar los mutantes puntuales de un determinado GEN (*gen*) de los mutantes a los que se les ha interrumpido con un marcador molecular de cualquier tipo; en el caso de que el marcador sea conocido, se utilizó la terminología usual como, por ejemplo, *gen::MARCADOR*.

Homol. homología

ICDI índice de desviación en el uso de codones intrínseco

Ident. identidad

IPTG isopropil-1-tio- β - D-galactósido

Kb kilobase

KDa kiloDalton

MCS sitio múltiple de clonación

MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*), antes *Martinsried Institute for Protein Sequences*

MOPS ácido 3-(*N*-morfolino)-propano sulfónico

M_r, masa molecular relativa

mRNA ácido ribonucleico mensajero

ONPG *O*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido

ORF pauta de lectura abierta

pb pares de bases

PCR reacción de polimerización en cadena

PEG polietilen glicol

p/v peso/volumen

RNA ácido ribonucleico
RNasa ribonucleasa
r.p.m. revoluciones por minuto
rRNA ácido ribonucleico ribosomal
RT transcriptasa reversa
SAB seroalbúmina bovina
SDS dodecil-sulfato sódico
Solap. solapamiento
SSC tampón cloruro/citrato sódico
Taq DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*
TBE tampón Tris/borato
TE tampón Tris/EDTA
TEMED *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamina
THI tiamina
T_m temperatura de fusión del DNA
Tris tri(hidroximetil) amino-metano
TPP pirofosfato de tiamina
U unidad
U.V. ultra violeta
V_F volumen final
v/v volumen/volumen
X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
YCp plásmido centromérico de levaduras
YE_p plásmido episómico de levaduras
YIp plásmido integrativo de levaduras
YNB base nitrogenada para levaduras

1. PRESENTACIÓN

Los estudios genéticos sobre *Kluyveromyces lactis* comenzaron a principios de los años sesenta. Aunque inicialmente se consideró que esta levadura pertenecía al género *Saccharomyces*, y de hecho aparece citada como *Saccharomyces lactis*, posteriores estudios taxonómicos revelaron que se trata de un género aparte. La más reciente clasificación (Lachance, 1993) incorpora a *Kluyveromyces drosophilarum* y *Kluyveromyces vaudenii* dentro del mismo grupo, pero se considera una especie distinta a *Kluyveromyces marxianus*.

K. lactis es una levadura de interés industrial por su capacidad de crecer en lactosa como única fuente de carbono, por ello los primeros estudios genéticos se centraron en el sistema del enzima β -galactosidasa (Dickson *et al.*, 1979; Dickson y Markin, 1980; Godecke *et al.*, 1991, Poch *et al.*, 1992).

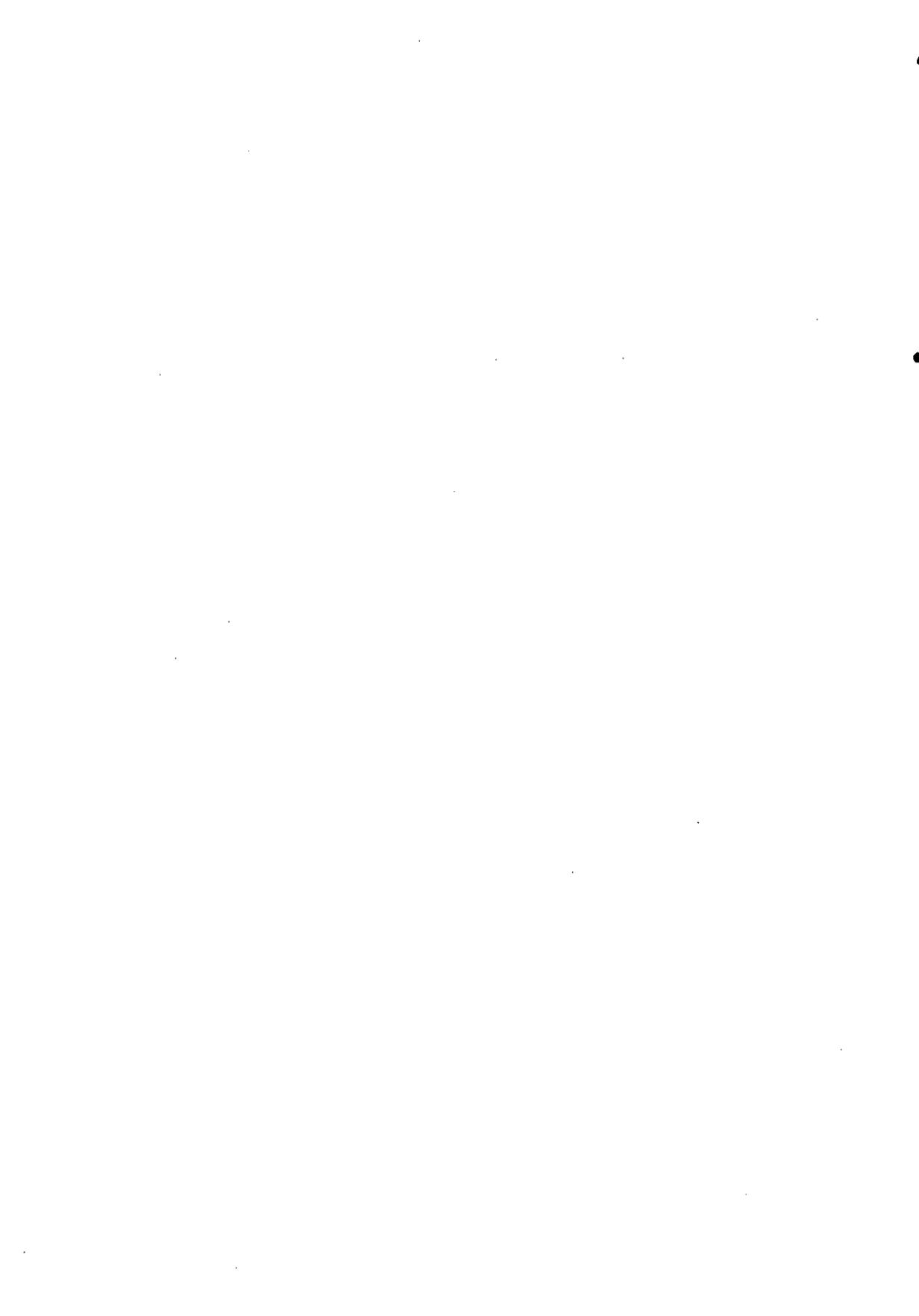
En el año 1988 se celebró la primera reunión sobre la biología de *Kluyveromyces* en París. A partir de este momento surge una nueva etapa en el estudio de esta levadura. A lo largo de estos años se han ido desarrollando herramientas, vectores de clonación, mutantes auxotrofos, sistemas de transformación, etc. que han permitido avanzar rápidamente en el conocimiento de nuevos sistemas genéticos. Este auge no obedece tan sólo a una intención de desarrollo de conocimiento básico, sino también a la creciente utilidad de esta levadura en la producción de proteínas heterólogas, ya que presenta algunas ventajas sobre la utilización de sistemas bacterianos u otros microorganismos.

En esta levadura la respiración predomina sobre la fermentación en condiciones aeróbicas, y la ruta respiratoria apenas se ve reprimida por glucosa (Ferrero *et al.*, 1978; Lodi *et al.*, 1994; Mulder *et al.*, 1994a y b), aunque sí es bien conocida la represión catabólica del metabolismo de la lactosa/galactosa mediada por el gen *LAC9*, homólogo al gen *GAL4* de *S. cerevisiae* (Breunig *et al.*, 1987; Salmerón *et al.*, 1989; Godeke *et al.*, 1990; Zachariae *et al.*, 1993). Esta preferencia por la respiración y la escasa importancia de la represión catabólica, ha llevado a clasificarla como una levadura *aeróbica respiradora*.

En condiciones aeróbicas, *K. lactis* tiene una tasa de crecimiento mucho mayor que *S. cerevisiae*, incluso en medios con fuente de carbono no fermentables, lo que confirma la superioridad respiratoria de *K. lactis* frente a *S. cerevisiae*, mientras que, en anaerobiosis, ambas levaduras alcanzan valores de crecimiento similares (Siso *et al.*, 1996).

A pesar de los avances conseguidos en la última década, el número de genes de *K. lactis* de los que se conoce su secuencia y su función es todavía muy limitado. En este trabajo hemos analizado una región del cromosoma seis del que, hasta ahora, se conocían tan sólo nueve genes (Wésolowski-Louvel y Fukuhara, 1995). La región analizada contiene un gen que codifica para una proteína con homologías con la familia GSK-3 y otro gen con homología con genes que codifican para piruvato descarboxilasas en distintas levaduras. La caracterización de estos genes se describe en dos capítulos independientes de esta memoria.

2. MATERIALES Y MÉTODOS



2.1. LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

2.1.1. LÍNEAS CELULARES DE LEVADURAS

Kluyveromyces lactis

NRRL-Y1140	[<i>MATa</i>] CBS 2359, ATCC 8585 (Jong y Edwars, 1990).
W600B	[<i>MATα ade leu</i>] ATCC 32143 (Mas <i>et al.</i> , 1974).
WM37	[<i>MATa his</i>] ATCC 32144 (Mas <i>et al.</i> , 1974).
⁽¹⁾ MW98-8c	[<i>MATα rag1 rag2 uraA metA1 argA</i>] (Bianchi <i>et al.</i> , 1987).
⁽¹⁾ MW190-9b	[<i>MATa lac4-8 uraA Rag⁺</i>].
⁽²⁾ PMI/C1	[<i>MATa uraA1-1 adeT-600 Kl pdcA::ura3</i>].
⁽²⁾ PM6-7A	[Línea isogénica de PMI/C1, salvaje para el gen <i>KlPDCA</i>] (Wésolowski-Louvel <i>et al.</i> , 1992b)
ERk-1	[Línea MW-190-9b con la interrupción <i>Klgsk-3::URA3</i>] (Este trabajo).
ERp-1	[Línea K-MW-190-9b con la interrupción <i>Klpdcb::URA3</i>] (Este trabajo).
ERp-2	[Doble mutante <i>KlpdcA::ura3 Klpdcb::URA3</i> derivado de la línea antes descrita, PMI/C1] (Este trabajo).

Líneas cedidas amablemente por la ⁽¹⁾Dra. M. Wésolowski-Louvel (*Université Claude Bernard*, Lyon, Francia) y por el ⁽²⁾Dr. M. Bianchi (*Universidad de Roma I La Sapienza*, Roma, Italia).

Saccharomyces cerevisiae

- YSH5.125.-1C⁽¹⁾ [*MATa leu2-3/112 ura3-52 trp-92 pdc1Δ:LEU2 pdc5Δ:URA3 GAL*].
- YSH5.125.-2C⁽¹⁾ [*MATa leu2-3/112 ura3-52 trp-92 pdc1Δ:LEU2*].
- YPH1024⁽²⁾ [*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 his3Δ200 trp1Δ1 mds1::TRP1 CFVII(RAD2.d. YPH273) URA3 SUP11*].
- YPH1025⁽²⁾ [*MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 his3Δ200 trp1Δ1 mck1::HIS3 CFVII(RAD2.d. yph273) URA3 SUP11*].
- AOE375::TRP1⁽³⁾ [Cepa derivada de la línea salvaje 1788, que lleva interrumpida la *ORF* AOE375 por el marcador *TRP1*].
- FY73 [*MATα ura3-52 his 3Δ200*].

Líneas cedidas amablemente por el ⁽¹⁾Dr. Stefan Hohmann (*Katholieke Universiteit te Leuven*, Leuven-Heverlee, Flandes, Bélgica), por el ⁽²⁾Dr. Philip Hieter, (*John Hopkins University School of Medicine*, Maryland, U.S.A.) y por el ⁽³⁾Dr. J. Ariño de la Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

2.1.2. MÉTODO DE MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE LEVADURAS

Las líneas celulares de levadura se conservaron habitualmente sembradas en placas YPD-0,5% (ver medios de cultivo) a 4°C. Se sembraron periódicamente cada dos meses. La línea YSH5.127.-1C se mantuvo en las mismas condiciones pero en placas YPE-3% (ver medios de cultivo).

Para el mantenimiento de las líneas a -80°C , las levaduras se inocularon en medio YPD-0,5% o YPE-3% y se dejaron crecer en agitación a 30°C hasta alcanzar una A_{600} entre 0,8 y 1, añadiéndose entonces glicerol estéril hasta una concentración final del 50%. Tras mezclar bien el cultivo, se tomaron alícuotas de 1 ó 1,5 ml y se guardaron a -80°C .

2.1.3. LÍNEAS CELULARES DE BACTERIAS

- JMIO1** [*supE thiΔ(lac-proAB) F'[traΔ36proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*] (Messing, 1979).
- JM109** [*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)*] (Yanish-Perron *et al.*, 1985).
- HB101** [*supE44 hsdS20 (rB⁺mB⁺) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*] (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969).
- DH5** [*α F' endA1 hsdR17 r_k⁻ m_k⁺ supE44 thi-1 recA1 gyrADA (lacZYA -argF) U169 (φ 80d lacZ ΔM15)*] (BRL).

2.1.4. MÉTODO DE MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE BACTERIAS

Las líneas celulares de bacterias se conservaron sobre placas LB. Las líneas transformadas con plásmidos se mantuvieron en placas LBA y LBK, dependiendo del gen de resistencia al antibiótico que portasen (ampicilina o canamicina) (ver medios de cultivo). Las placas se mantuvieron a 4°C y fueron resembradas periódicamente cada dos meses.

Para el mantenimiento de las líneas a -80°C , las bacterias se inocularon en los mismos medios y se dejaron crecer en agitación a 37°C hasta alcanzar una A_{600} entre 0,5 y 0,8. Tras alcanzar dicha absorbancia, se añadió glicerol estéril, hasta una concentración final del 50%, se mezcló el cultivo y se tomaron alícuotas de 1 ó 1,5 ml que se guardaron a -80°C .

2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se prepararon en agua destilada, con un suplemento de un 1,5% de Bacto-agar para los medios sólidos. Las soluciones se esterilizaron en un autoclave durante 20 min a 120°C .

2.2.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS

YP

Bacto-peptona	2,0	%
Extracto de levadura	1,0	%

Las variaciones en los porcentajes y tipo de fuente de carbono, para experimentos concretos de expresión génica, son indicados en cada caso en Resultados y Discusión, siendo YPD (Glucosa), YPG (Glicerol), YPE (Etanol), YPA (Acetato), YPF (Fructosa), YP(D+A) (Glucosa y Acetato).

YPD-Geneticina

Medio YPD con glucosa al 0,5% suplementado con 200 mg/l de antibiótico G418, un inhibidor ribosomal de muchas células eucariotas.

YPD-Benomil

Medio YPD con glucosa al 0,5% suplementado con 10 $\mu\text{g/ml}$ de benomil, una droga desestabilizadora de microtúbulos.

YPA-AA

Medio YPA con acetato al 2% suplementado con el inhibidor de la cadena respiratoria antimicina A, a una concentración final 5 μM .

ME

Extracto de malta	5 %
Agar	3 %

CM (Medio completo)

Para un litro:

- 5ml de Mezcla de aminoácidos (200X)⁽¹⁾
- 20g de glucosa

Se añadió la siguiente mezcla de aminoácidos, eliminando en cada caso el utilizado para la selección:

Histidina	40mg	Adenina	40mg
Leucina	40mg	Tirosina	40mg
Uracilo	40mg	Triptófano	30mg

Tras esterilizar en el autoclave se dejó enfriar hasta unos 60°C y se añadieron 67 ml de *YNB*⁽²⁾ estéril.

⁽¹⁾Mezcla de aminoácidos (200x)

Para 1 litro

Arginina	1g	Metionina	1g
Isoleucina	6g	Treonina	1g
Lisina	4g	Fenil-alanina	6g

⁽²⁾YNB.

Para 1 litro

Mezcla de vitaminas 300X ^a	50 ml	MgSO ₄	7,5 g
Sales traza 150X ^b	100 ml	NaCl	1,5 g
Sulfato amónico*	75 g	CaCl ₂	1,5 g
KH ₂ PO ₄	15 g		

*Se añadió al final, tras disolver el resto de los componentes ya que puede precipitar.

^aMezcla de vitaminas 300X

Para un litro:

Biotina	0,6	mg
Pantotenato cálcico	120	mg
Ácido fólico	0,6	mg
Inositol	600	mg
Niacina	120	mg
p-Aminobenzoico	60	mg
Piridoxina	120	mg
Riboflavina	60	mg
Tiamina	120	mg

^bSales traza 150X

Para 1 litro

Ácido bórico	75 mg	Sulfato manganoso	60 mg
Sulfato cúprico	6 mg	Molibdato sódico	30 mg
Ioduro potásico	15 mg	Sulfato de zinc	60 mg
Cloruro férrico	30 mg		

X-GAL*Para 1 litro:*

DISOLUCIÓN A		DISOLUCIÓN C	
KH ₂ PO ₄	13,6 g	Vitaminas 300x	3,4 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g	Mezcla de Aa.200x	5 ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	Tirosina	40 mg
KOH	4,2 g	Histidina	40 mg
FeSO ₄ (1mg/ml a 4°C)	0,3 ml	Adenina	40 mg
H ₂ O hasta V _F =	300 ml	Uracilo	40 mg
		Triptófano	30 mg
		Leucina	40 mg
		H ₂ O hasta V _F =	200 ml

DISOLUCIÓN B		DISOLUCIÓN D	
Dextrosa	20 g	Bacto-agar	15 g
H ₂ O hasta V _F =	200 ml	H ₂ O hasta V _F =	200 ml

Se esterilizaron las cuatro soluciones por separado, tras lo cual se mezclaron y se dejaron enfriar hasta 65°C antes de añadir 2 ml de una solución de X-Gal al 2% en N,N-Dimetilformamida, hasta una concentración final de 40 mg/ml).

Medio de esporulación (Spo)

Acetato potásico	1	%
Extracto de levadura	0,1	%
Glucosa	0,05	%

Cuando fue necesario, se añadió el aminoácido correspondiente a la auxotrofia.

2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

LB (Luria-Bertani)

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

LBA (Luria-Bertani suplementado con ampicilina)

Medio LB suplementado con 1 ml/l de una disolución de ampicilina de 40 mg/ml previamente preparada en agua bidestilada estéril y conservada en alícuotas a -20°C. Este medio se utilizó para la selección de bacterias que habían sido transformadas con un plásmido que contiene el gen de resistencia a la ampicilina, antibiótico que inhibe una serie de enzimas en la síntesis de la pared celular. El gen que confiere la resistencia a la ampicilina codifica para un enzima que es secretado al espacio periplásmico de la bacteria, donde cataliza la hidrólisis del anillo β -lactámico, y produce así la destrucción del efecto tóxico de la droga.

LBK (Luria-Bertani suplementado con canamicina)

Medio LB suplementado con 1 ml/l de una disolución de canamicina de 50 mg/ml preparada en agua bidestilada estéril y conservada en alícuotas a -20°C. Como en el caso anterior, este medio se utilizó para la selección de bacterias transformadas con plásmidos que contienen el gen del transposón bacteriano Tn903 que codifica la 3'-aminoglicósido-fosfotransferasa, que confiere resistencia a la canamicina.

LBA/X-Gal, LBK/X-Gal.

Son placas LBA o LBK suplementadas con X-Gal e IPTG. Para su preparación, aproximadamente 15 min antes de proceder a la siembra de los transformantes, se extendieron 50 μ l de una disolución de 20 mg de X-Gal/ml en DMF y 10 μ l de una disolución de IPTG 0,23 mg/ml en agua destilada estéril (Rose and Rotstein, 1983). Estas placas fueron utilizadas para la selección de colonias bacterianas transformadas con plásmidos que portan el gen *lacZ*, que codifica para el enzima β -galactosidasa de *E. coli*, interrumpido por un fragmento de DNA clonado, de modo que han perdido la capacidad de actuar sobre el sustrato cromogénico y no producen colonias transformantes azules como el plásmido no recombinante.

YT

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

SOC

Bacto-triptona	2	%
Extracto de levadura	0,5	%
CINa	10	mM
CIK	2,5	mM

Se ajustó el pH a 6,8-7 con KOH 1M

2.3. PLÁSMIDOS

2.3.1. VECTORES DE CLONACIÓN

YE _p 24	[2µm DNA, <i>URA3</i> , <i>tc^r</i> , <i>amp^r</i>] (Botstein <i>et al.</i> , 1979).
YE _p lac112	[2µm DNA, <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i>] (Gietz y Sugino, 1988).
YE _p lac195	[2µm DNA, <i>URA3</i> , <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i>] (Gietz y Sugino, 1988)
YI _p lac211	[<i>URA3</i> , <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i>] (Gietz y Sugino, 1988).
YC _p lac22	[<i>CEN4</i> , <i>ARS1</i> , <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i> , <i>lacZ</i>] (Gietz y Sugino, 1988).
pXW3.	[S11, <i>URA3</i> , <i>amp^r</i> , <i>lacA</i> , <i>lacY</i> , <i>lacZ</i>] (Chen <i>et al.</i> , 1992).
pXW3Δ <i>Pst</i> I	[Derivado de pXW3 al que se le ha destruido el sitio <i>Pst</i> I, en el marcador <i>URA3</i> , por digestión, relleno de los extremos protuberantes y ligamento].

2.3.2. PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS PARA LA SECUENCIACIÓN

pEC1

[Clon original consistente en un fragmento de unos 9.800 pb inserto en el sitio *Bam*HI del vector YE_p24 procedente de una librería genómica de *K.lactis*, y que contiene el gen *KICYC1*] (Freire-Picos *et al.*, 1993).

ERB1.8

[Fragmento *Sal*I-*Bam*HI del plásmido original pEC1 de unos 1.800 pb inserto en los sitios *Sal*I-*Bam*HI del MCS del vector YE_plac195] (Este trabajo).

ERB1.4

[Fragmento *Bam*HI-*Bam*HI del plásmido pEC1 de unos 1.400 pb inserto en el sitio *Bam*HI del MCS del vector YEplac195] (Este trabajo).

ERB0.6

[Fragmeto *Bam*HI-*Hind*III del plásmido pEC1, de unos 600 pb, inserto en los sitios *Bam*HI-*Hind*III del MCS del vector YEplac195] (Este trabajo).

**2.3.3. PLÁSMIDOS CON DISTINTOS MARCADORES DE SELECCIÓN EN LEVADURAS
CONSTRUIDOS PARA SUBCLONAR LOS GENES *KIGSK-3* Y *KIPDCB***

pKIGSK-3 (112)

[Fragmento *Hind*III-*Hind*III de unos 3.500 pb, del plásmido pEC1, que contiene la *ORF* completa del gen *KIGSK-3*, inserto en el sitio *Hind*III del vector YEplac112, con marcador *TRP1*] (Este trabajo).

pKIGSK-3 (22)

[Fragmento *Hind*III-*Hind*III de unos 3.500 pb, del plásmido pEC1, que contiene la *ORF* completa del gen *KIGSK-3*, inserto en el sitio *Hind*III del vector centromérico YCplac22, con marcador *TRP1*] (Este trabajo).

pKIPDCB (112)

[Fragmento *AvaI-AvaI*, de unos 4.200 pb, del plásmido pEC1, que contiene la *ORF* completa del gen *KIPDCB*, inserto en el sitio *SmaI* del vector YEplac112, con marcador *TRP1*] (Este trabajo).

pKIPDCB (195)

[Fragmento *AvaI-AvaI*, de unos 4.200 pb, del plásmido pEC1, que contiene la *ORF* completa del gen *KIPDCB*, inserto en el sitio *SmaI* del vector YEplac195, con marcador *URA3*] (Este trabajo).

2.3.4. PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS PARA LA INTERRUPCIÓN DE LOS GENES *KIGSK-3* Y *KIPDCB* EN LÍNEAS DE *Kluyveromyces lactis*

pKlpcBΔ(211)

[Fragmento *BamHI-HindIII*, de unos 600 pb, del plásmido pKIPDCB(112), que contiene la región interna de la *ORF* del gen *KIPDCB*, inserto en el sitio *BamHI-HindIII* del vector integrativo YIplac211 (Este trabajo).

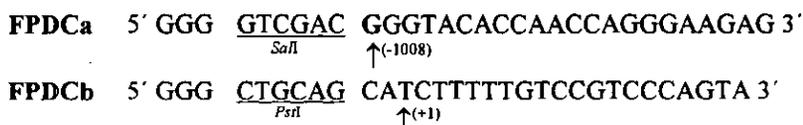
pKlgsk-3Δ(211)

[Fragmento *BglII-BglII* de 883 pb, del plásmido pKIGSK-3 (181), que contiene parte de la *ORF* del gen *KIGSK-3*, inserto en el sitio *BamHI* del vector integrativo YIplac211] (Este trabajo).

2.3.5. PLÁSMIDOS CONSTRUIDOS PARA EL ESTUDIO DE LOS PROMOTORES DE *KIGSK-3* Y *KIPDCB*

P_{PDCB}-lacZ

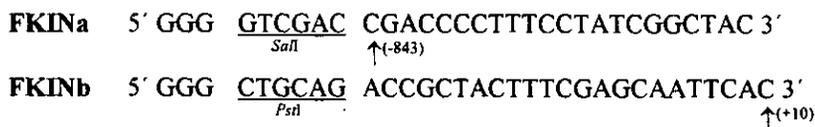
[Fragmento de unos 1.000 pb que contiene el promotor del gen *KIPDCB* inserto en *SaII-PstI* del MCS del plásmido pXW3Δ*PstI*. El fragmento fue generado por *PCR* utilizando los siguientes oligonucleótidos:



Como molde se utilizó uno de los plásmidos p*KIPDCB*, que contienen tanto el gen como el promotor de *KIPDCB*. Las flechas indican la posición del nucleótido respecto del codón ATG de iniciación.

P_{GSK}-lacZ

[Fragmento de unos 1.000 pb que contiene el promotor del gen *KIGSK-3* inserto en *SaII-PstI* del MCS del plásmido pXW3Δ*PstI*. El fragmento fue generado por *PCR* utilizando los siguientes oligonucleótidos:



Como molde se utilizó uno de los plásmidos pKIGSK-3, que contienen el gen completo y el promotor de *KIGSK-3*.

2.4. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICÓS

2.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE BACTERIAS

2.4.1.1. EXTRACCIÓN MEDIANTE LISIS ALCALINA

Se empleó el mismo procedimiento para la obtención de DNA plasmídico a pequeña y mediana escala, partiéndose de un cultivo de 1,5 ml en el primer caso y de 30-50 ml en el segundo. Los volúmenes de las disoluciones utilizadas se adaptaron en cada caso a la escala de extracción.

Para un cultivo de 50 ml:

Las células se inocularon en 50 ml del medio adecuado y se dejaron crecer en agitación a 37°C durante una noche. Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente una A_{600} entre 0,8-1, se recogieron las células en tubos y se precipitaron a 8.000 r.p.m. durante 5 min. Las células se resuspendieron en 2 ml de la disolución I con agitación vigorosa en vórtex. Una vez resuspendido el precipitado celular completamente, se añadieron 4 ml de la disolución II y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 3 ó 4 veces. Rápidamente se añadieron 3 ml de la disolución III y, nuevamente, se mezcló suavemente por inversión del tubo 3-4 veces. Se centrifugaron los tubos a 15.000 r.p.m. durante 5-10 min y se recogió el sobrenadante para pasarlo a un nuevo tubo. Para la extracción de proteínas se añadió un volumen igual

(aproximadamente 9 ml) de PCIA, agitando la mezcla en vórtex durante unos dos min tras lo cual se centrifugaron los tubos a 8.000 r.p.m. durante 5 min. Se recogió la fase superior acuosa y se pasó a un nuevo tubo. Opcionalmente se hizo una extracción de restos de fenol con 9 ml de CIA. Posteriormente se añadieron dos volúmenes de etanol al 95% para precipitar el DNA. Se agitó el tubo en el vórtex durante 1-2 min, y se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 5-10 min. El precipitado se lavó con 5 ml de etanol al 70% una o dos veces y se secó a vacío. Una vez seco, el DNA se resuspendió en agua bidestilada o 1xTE dependiendo de su uso posterior.

Disoluciones empleadas:

Disolución I:

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

Se esterilizó y se conservó a 4°C.

Disolución II:

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

Se preparó en el momento de su uso a partir de disoluciones estériles de NaOH 0,2 M y SDS al 20%.

Disolución III:

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

Se conservó a temperatura ambiente.

PCIA:

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

CIA:

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

1xTE:

Tris-HCl pH 7,5 0,5 M
EDTA 0,05 M

Se esterilizó en autoclave y se conservó a temperatura ambiente.

2.4.1.2. EXTRACCIÓN DE DNA LIBRE DE RNA PARA SECUENCIACIÓN

Se realizó una extracción del DNA del plásmido tal y como se describe en el apartado anterior, y se resuspendió en 200 µl de 1xTE a los que se añadieron 0,5 µl de una solución de RNAsa (*Boehringer*) de 10 mg/ml, dejando incubar la mezcla a 37°C durante unos 30 min.

Tras la incubación con RNAsa se purificó el DNA haciendo dos extracciones sucesivas con 200 µl de PCIA y una con 200 µl de CIA. Tras la

purificación se añadió a la fase líquida 20 μ l de acetato potásico 3 M y 400 μ l de etanol al 95% frío. Se mezcló todo con vórtex y se incubó en hielo unos 5-10 min. Se centrifugó el DNA precipitado durante unos 5 min a 13.000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se lavó 1-2 veces con 1 ml de etanol al 70% frío. El DNA precipitado se secó a vacío y se resuspendió en 80 μ l de agua estéril. Se añadieron 16 μ l de NaCl 5 M y se mezclaron en vórtex, tras lo cual se añadieron 100 μ l de PEG-6.000 al 13% y se incubó durante unos 20 min en hielo. Se centrifugó la mezcla durante unos 5-10 min a 13.000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante retirándolo por aspiración. El precipitado de DNA, libre de RNA, se secó a vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de agua dependiendo de su uso posterior.

Disoluciones empleadas:

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

RNAse:

Se preparó una disolución de 5 mg/ml de RNAse en agua bidestilada estéril y se hirvió durante unos 20 min. Se conservó en alícuotas a -20°C.

PEG-6.000 al 13%:

Se preparó una disolución de PEG-6.000 al 13% peso/volumen en agua destilada estéril y se agitó al vórtex durante varios min hasta su completa disolución, preparándose en el momento de su uso y manteniéndose a temperatura ambiente.

2.4.2.3. EXTRACCIÓN RÁPIDA DE PLÁSMIDO DE BACTERIA MEDIANTE LISIS POR CALOR

Un cultivo de 1,5 ml, tras una noche en agitación a 37° C, se centrifugó en un tubo Eppendorff, a 6.000 r.p.m. durante 2 min. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 350 µl de STET al precipitado de células. Se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 ó 2 min y se le añadieron 20 µl de lisozima 10 mg/ml, volviéndose a agitar en el vórtex durante otros 30 s. Se hirvió la mezcla durante 40 s y se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 10 min. El precipitado que se obtuvo se retiró del fondo del tubo utilizando un palillo o una punta de pipeta. Se precipitó el sobrenadante con un volumen de isopropanol y un décimo del volumen de acetato sódico 3 M. Se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 6 min y se lavó el precipitado de DNA con etanol al 70%.

STET (Para 10ml)

Sacarosa al 50%	1,6	ml
Tris 1 M, pH 8	0,1	ml
EDTA 0,5M, pH 8	1	ml
Tritón	0,05	ml
H ₂ O	7,25	ml

2.4.2. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO DE LEVADURAS

Se precipitaron 5 ml de un cultivo de células, que había sido incubado toda la noche en agitación a 30°C en el medio requerido, a 3.000 r.p.m. durante 5 min y se lavaron las células con sorbitol 1 M.

Una vez lavadas las células, se resuspendieron en 800 μ l de una disolución de sorbitol 0,9 M, NaH_2PO_4 50 mM, pH 7,5 y mercaptoetanol 14 mM. Se añadieron 5 μ l de una disolución 5 mg/ml de liticasa disuelta en agua y se incubaron durante unos 45 min a 37°C. Tras la incubación, se precipitaron las células, se descartó el sobrenadante y se añadieron 500 μ l de EDTA 50 mM a pH 8, SDS 0,3% y se agitó vigorosamente en el vórtex para incubar la mezcla a 65°C durante unos 20 min. Posteriormente, se añadió acetato potásico 3 M a pH 4,8 y se incubó a 0°C durante unos 120 min.

Se centrifugó durante 5 min para descartar el precipitado y se añadió un volumen de etanol al 95% al sobrenadante. Se dejó precipitar durante 5 min a -20°C y se centrifugó durante otros 5 min. El precipitado de DNA se lavó una o dos veces con etanol al 70% y, para eliminar restos de proteína, se realizaron los lavados necesarios con PCIA y CIA según el procedimiento habitual. Una vez precipitado y lavado el DNA, se resuspendió en 1xTE o H_2O para su posterior uso.

2.4.3. EXTRACCIÓN DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR DE LEVADURAS

Las extracciones se realizaron partiendo de cultivos de 10 ml, o 100 ml con una A_{600} aproximada de 0,6 dependiendo de la cantidad de DNA genómico final requerida, siguiendo el procedimiento de Brian Rymon modificado según se describe:

Para cultivos de 100 ml, las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 3 min y se lavaron con 10 ml de sorbitol 1 M, EDTA 0,1 M tras lo

cual, se resuspendieron en 10 ml de la disolución de extracción (sorbitol 0,9 M, EDTA 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM pH 7.5, 14 mM β-mercaptoetanol). A la mezcla se le añadieron 0,5 ml de liticasa, previamente disuelta a una concentración de 5 mg/ml en agua y se agitó suavemente durante 30 min a 30°C. Tras este período de incubación, se añadió SDS hasta una concentración final del 1% y se mezcló suavemente. Se incubó durante 20 min a 60°C sin agitación y, después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se hicieron uno o varios lavados con 1,5 volúmenes de PCIA saturado con TE, agitando suavemente, para evitar roturas en el DNA. Las fases se separaron por centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 10 min, hasta conseguir una fase acuosa lo más limpia de proteínas posible. Para completar la extracción de proteínas, la fase acuosa se incubó durante 2-4 horas en hielo con acetato potásico 5 M (pH 4,8) en una proporción 1:5, tras lo cual se centrifugó 15 min a 10.000 r.p.m. Se recogió el sobrenadante, descartando el posible precipitado que se produce cuando quedan restos de proteína. Una vez purificado, el DNA genómico se precipitó con 1,5 volúmenes de etanol al 95%, mezclándolo suavemente por inversión del tubo, hasta que se observó la formación del precipitado de DNA, y se centrifugó durante 5 min a 5.000 r.p.m. El DNA se lavó una o dos veces con etanol al 70% para eliminar restos de sales y se secó a vacío durante unos 5 min para resuspenderlo en H₂O o en 1xTE.

2.4.4. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE LEVADURAS

Para la extracción de RNA total de levaduras, al igual que en todos aquellos procesos en los que se llevó a cabo la manipulación de RNA, todo el material utilizado, tanto plástico como cristal, fue utilizado en condiciones estériles y previamente lavado con agua bidestilada tratada con DEP al 1% durante 24 horas, y esterilizada en autoclave para inactivar totalmente el DEP, con el fin de evitar posibles contaminaciones de RNAasas. Todas las disoluciones fueron tratadas con DEP del mismo modo (DEP 1% durante 24h en agitación y esterilizadas a continuación).

Se partió de cultivos de 100 ml, en distintas condiciones, tal y como se comenta en Resultados y Discusión, dependiendo del experimento en concreto. Una vez alcanzada la absorbancia óptica requerida en cada caso, los cultivos se pararon rápidamente en hielo, dejándolos unos 15 min con agitación para impedir, en lo posible, la degradación del RNA y asegurar el cese de crecimiento y de la transcripción. Todos los procesos posteriores se realizaron en frío.

Las células se centrifugaron a 5.000 r.p.m. durante 5 min y se lavaron con 50 ml de 1xRE (Tris-ClH 0,1 M, ClLi 0,1 M, EDTA 0,1 mM pH 7,5). En este punto, el precipitado fue utilizado inmediatamente para la extracción o congelado a -20°C, durante no más de 24 horas, hasta su utilización posterior.

El precipitado celular se resuspendió en 1,5 ml de 1xRE y se le añadieron bolas de vidrio, de 1 mm de diámetro, hasta 2/3 del volumen final.

Se realizaron pulsos de agitación vigorosa en vórtex de 20 s, y 20 s de incubación en hielo para impedir que la muestra se calentase por la fricción. Se repitió esto unas 7-9 veces, tras lo cual se añadieron 2 ml de 1xRE con un 1% de SDS. Se mezcló bien y se añadieron unos 7,8 ml de PCIA saturado con 1xRE para proceder a la extracción de proteínas, repitiendo este paso hasta que la fase acuosa perdió la turbidez provocada por el SDS, agitando unos 20 s en el vórtex y centrifugando 10 min a 10.000 r.p.m. para separar las fases. La fase acuosa se precipitó con 2,3 volúmenes de etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M, incubando unas horas a -20°C.

El RNA precipitado se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 10 min y se lavó 1-2 veces con etanol al 70%, tras lo cual se secó a vacío y se resuspendió en H₂O tratada.

2.5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.5.1. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA

Se tomaron 5 µl de la muestra de DNA a medir, libre de RNA, y se llevaron a un volumen final de 1 ml con H₂O bidestilada estéril. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Cary en cubetas de cuarzo de 1 ml. La absorbancia se midió a dos longitudes de onda, 260 y 280 nm, y la concentración se calculó sabiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm indica una concentración de 50 µg/ml de DNA de doble hebra.

La relación A_{260}/A_{280} es un índice del grado de impurezas que puede haber en la muestra. La relación ideal se ajusta a un valor aproximado de 1,8 (Sambrook *et al.*, 1989). La concentración de aquellas muestras a las que no se les realizó una extracción de RNA fue estimada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, comparando la intensidad de fluorescencia de las bandas de las muestras con un marcador de concentración conocida.

2.5.2. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA

Las medidas de RNA se realizaron del mismo modo que las de DNA, utilizando 4 μ l de muestra llevados a 1 ml en H₂O tratada, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 μ g/ml de RNA y que la relación óptima A_{260}/A_{280} es de 2 (Sambrook *et al.*, 1989).

2.6. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS

2.6.1. MÉTODO DE KLEBE

Para la transformación de levaduras por este método (Klebe *et al.*, 1983), se tomó un cultivo de 10 ml a una $A_{600} \cong 0,6$ y se centrifugó a 3.500 r.p.m. durante 5 min. Las células precipitadas se lavaron con 5 ml de una disolución de sorbitol 1 M, bicina 10 mM, etilen-glicol al 3%, KCl 1,25 M, CaCl₂ 30 mM a pH 8,35 y DMSO al 5% (este último, añadido tras la esterilización) a temperatura ambiente. Una vez lavadas, las células se

resuspendieron en 0,2 ml de la misma disolución y se transfirieron a tubos de propileno para congelarlas rápidamente en hielo seco o a -70°C . Tras una incubación de 10 min se añadieron de 5-20 μg de DNA (sin tratamiento previo con RNAasa) y se transfirieron rápidamente a un baño de agua a 37°C con agitación vigorosa durante 5 min. Tras el choque térmico, se añadieron 5 ml de una disolución PEG-1.000 al 40%, bicina 200 mM, pH 8,35, mezclando muy suavemente, por inversión del tubo, y se incubó durante 60 min a 30°C . Transcurrido ese tiempo, las células se precipitaron a 3.500 r.p.m. durante 5 min y se lavaron con 1,5 ml de una disolución NaCl 0,15 M, bicina 10 mM, pH 8,35. Una vez lavadas, las células se resuspendieron en el volumen adecuado de esta misma disolución para ser sembradas en las placas selectivas adecuadas.

2.6.2. MÉTODO DE ALTA EFICIENCIA PARA LA TRANSFORMACIÓN DE *K. lactis*

Las células competentes de *K. lactis* se prepararon de acuerdo con el protocolo publicado por Gietz y Woods (1994). Se inocularon 5 ml de medio YPD-0,5% para iniciar un precultivo a partir de una colonia aislada y se incubó toda la noche a 30°C en agitación. Se determinó la densidad celular con una cámara de contaje y se inocularon 50 ml de YPD-0,5% con $1 \cdot 10^4$ células/ml, incubándose a 30°C unas 16 horas hasta alcanzar una A_{600} no mayor de la correspondiente a $1,7 \cdot 10^7$ células/ml. Las células se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 1 ml de agua estéril, tras lo cual, se transfirió a un tubo Eppendorff estéril. Las células se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en acetato de litio

100 mM hasta una densidad aproximada de $2 \cdot 10^9$ células/ml. Una vez resuspendidas, las células fueron incubadas a 30°C durante 20 min.

Tras la preparación de las células competentes, se llevó a cabo la transformación añadiendo, 5 μ l de DNA de salmón (10 mg/ml), previamente desnaturalizado durante 10 min a 95°C, y 1-5 μ g de DNA plasmídico lineal, a cada tubo Eppendorff que contenía 50 μ l de células competentes. Se agitó el tubo brevemente y se incubó durante 20 min a 30°C. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 300 μ l de una disolución de acetato de litio 100 mM, PEG-3.350 40%, preparada en el momento a partir de acetato de litio 1 M y PEG-3.355 al 50% (p/v). La mezcla se agitó brevemente en el vórtex y se incubaron las células durante 20 min a 30°C antes de proceder a un choque térmico a 42°C durante otros 20 min. Las células se centrifugaron entonces a 5.000 r.p.m. durante 5 min en una microcentrífuga. Se descartó el sobrenadante de PEG/acetato de litio y las células se resuspendieron en 4 ml de YPD-0,5% , para un período de recuperación a 30°C durante 2-3 horas antes de sembrarlas en las placas selectivas.

2.7. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

2.7.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

***E. coli* JM101, JM109 y HB101**

Las células competentes se prepararon partiendo de 100 ml de un cultivo fresco en YT, inoculado 2-3 horas antes con 1-2 ml de un cultivo estacionario, hasta alcanzar una A_{600} de 0,6 aproximadamente. Las células se centrifugaron a 3.500 r.p.m. durante 5 min a 0 °C, se lavaron en 50 ml de NaCl 100 mM, se resuspendieron en 50 ml de Cl_2Ca 100 mM a 0 °C y se incubaron en hielo durante 20 min. Este tratamiento induce a las células a un estado de “competencia” transitorio, durante el cual las células son capaces de captar el DNA. Este estado de competencia se mantuvo almacenando las células en alícuotas a -70°C en un medio rico con un 15% de glicerol estéril.

***E. coli* DH5**

La preparación de células competentes DH5 se basa en una modificación al método de Hanahan (Hanahan, 1983). A partir de una colonia aislada, se inocularon 5 ml de medio SOC. Se cultivó con agitación fuerte a 37°C hasta alcanzar una A_{590} aproximada de 0,5. Con este precultivo se reinocularon 100 ml del mismo medio hasta alcanzar una A_{590} entre 0,5 y 0,6. En ese momento se enfrió el cultivo a 4 °C durante unos 10 min y se precipitaron las células a la misma temperatura, durante 10 min a 5.000 r.p.m.. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las células en 30 ml de tampón

TfB-1 frío. Se precipitaron las células de nuevo y se resuspendieron con suavidad en 4 ml de TfB-2 frío. Las células se repartieron en alícuotas de 200 μ l y se congelaron rápidamente a -70°C .

TfB-1:

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

TfB-2:

MOPS pH7	10 mM
Cl_2Rb	10 mM
Cl_2Ca	75 mM
Glicerol	15 %

Ambas disoluciones se esterilizaron por filtración.

2.7.2. TRANSFORMACIÓN

E. coli JM101, JM109 y HB101

La transformación se llevó a cabo siguiendo el método de Hanahan (Hanahan, 1983), sometiendo alícuotas de 200 μ l células competentes recién descongeladas a una incubación de 30 min a 0°C en 800 μ l de CaCl_2 al que se añade 1-2 μ g de DNA plasmídico. Transcurrido ese tiempo, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 min. Una vez realizada la transformación,

las células se incubaron en 4 ml de LB durante 90 min a 37°C antes de sembrarlas en placas selectivas.

E. coli DH5

Para cada transformación, se descongeló una alícuota de 100 µl de células competentes. Una vez descongeladas, se añadió el DNA y se incubó durante 20 min en hielo, tras los cuales se realizó un choque térmico a 42°C durante 90 s. Transcurrido ese tiempo, las células se incubaron 3 min en hielo. Antes de sembrar las células en placas selectivas, las células transformadas se incubaron durante aproximadamente una hora a 37°C con 400 µl de LB.

2.8. TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

Los ácidos nucleicos fueron separados por migración en campo eléctrico dependiendo de su tamaño molecular. Se han utilizado distintos tipos de geles según las necesidades concretas en cada momento.

2.8.1. GELES DE AGAROSA

2.8.1.1. GELES NO DESNATURALIZANTES

Los geles de agarosa no desnaturizantes se utilizaron para la separación de fragmentos de DNA generados por digestión con

endonucleasas de restricción. Los geles se prepararon con porcentajes de agarosa entre un 0,5 y un 2% en tampón 1xPE, (el mismo utilizado para la electroforesis), dependiendo del tamaño molecular de los fragmentos a separar, según describen Sambrook y colaboradores (Sambrook *et al.*, 1982).

Para determinar el peso molecular de los distintos fragmentos, diferentes marcadores de peso molecular se hicieron migrar al mismo tiempo que las muestras a 60-100 V, dependiendo del tamaño y concentración del gel. El tiempo de migración fue determinado en función de la separación de los colorantes del azul de carga.

1xPE:

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

Azul de carga:

H ₂ O o 1xPE	7	ml
Glicerol	3	ml
Azul de bromofenol	2,5	mg
Xilen-cianol	2,5	mg

2.8.1.2. GELES DESNATURALIZANTES

Para la separación de RNA en función de su tamaño se utilizaron geles de agarosa al 1,5% en tampón 1xMOPS (el mismo utilizado para la electroforesis). Una vez disuelta la agarosa, se dejó enfriar hasta unos 60°C. Alcanzada esa temperatura, se le añadió un 37% (v/v) de formaldehído y se

vertió inmediatamente.

Las muestras de RNA, en 10 μ l de H₂O, se desnaturalizaron 5 min a 65°C junto con 20 μ l de tampón de carga y se enfriaron rápidamente en hielo, antes de ser cargadas en el gel. Las electroforesis se realizaron en cámara fría a 4°C, generalmente a 100 V durante unas 2 horas, dependiendo de la separación de los azules de carga.

10xMOPS

Ácido 3-[N-Morfolino]-propano-sulfónico	0,2	M
Acetato sódico pH7	50	mM
EDTA	10	mM

Azul de carga

Glicerol	50	% (v/v)
Azul de bromofenol	0,25	%
Xilen-cianol	0,25	%

Tampón de carga

Formamida desionizada	50	%
10xMOPS	10	%
Formaldehído	37	%

Tinción de los geles de agarosa

Los geles se tiñeron por inmersión en agua (tratada con DEPC, en el caso de geles de RNA) o en tampón de electroforesis, con un 0,01% (v/v) de una disolución de bromuro de etidio 5 mg/ml durante 5-10 min.

Posteriormente, se destiñeron durante otros 5 min.

Visualización de las muestras

Las muestras se visualizaron exponiendo los geles a la luz U.V. en un transiluminador Fotodyne.

Fotografiado de los geles

Los geles, expuestos a luz U.V. se fotografiaron con película Kodak X-Plus-Pan 125 ISO, utilizando una apertura de diafragma entre 4 y 5,6 y exponiéndola entre 10 y 15 s. Se utilizó un filtro rojo Cokin 52 mm RED R2.

2.8.2. GELES DE POLIACRILAMIDA

Los geles de poliacrilamida se utilizaron para la visualización y/o aislamiento de fragmentos de DNA muy pequeños. También fueron utilizados para secuenciación. Los geles se prepararon a distintas concentraciones de poliacrilamida, dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA, oscilando entre un 4 y un 10%.

Para secuenciación, los geles de poliacrilamida se prepararon como sigue:

Mezcla para 70 ml:

Urea	50,4	g
Acrilamida al 45%	21,3	ml
10xTBE	12	ml

Justo antes de verter el gel, se añadieron 130 μ l de APS y 60 μ l de TEMED.

Disolución de acrilamida al 45% (para 500ml)

Acrilamida	21,5	g
Bis-acrilamida	7,5	g

10xTBE (para 1 litro)

Tris	54	g
Ácido bórico	27,5	g
EDTA	7,4	g

Visualización de los geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida, una vez separados de los soportes de electroforesis, fueron teñidos del mismo modo que los geles de agarosa, con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador U.V. Para detectar bandas de tamaño muy pequeño, se utilizó la tinción de plata. Para ello se sumergieron los geles en 200 ml de una solución al 0,1% de ácido acético y 10% de etanol durante 30 min con agitación. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con agua destilada unos segundos y se incubaron otros 30 min en NO_3Ag al 0,1%. Los geles se lavaron varias veces con agua destilada y se

cubrieron con una solución al 1,5% de NaOH y 0,5% de formaldehído hasta que aparecieron las bandas. En ese momento, se paró la reacción con varios lavados de agua y los geles se guardaron en bolsas de plástico selladas para facilitar su manipulación.

Fotografiado de los geles de poliacrilamida

Los geles teñidos con bromuro de etidio fueron fotografiados del mismo modo que los geles de agarosa. En los casos en los que se utilizó la tinción de plata, los geles se fotografiaron utilizando una película *Kodalith entho film 6556* (8 Asa) de Kodak, con una exposición de 1 s y apertura de diafragma 11.

En el caso de los geles de secuenciación, los geles fueron expuestos directamente a películas de rayos X *Agfa Curix RP2*.

2.9. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DEL DNA

2.9.1. DIGESTIÓN DE DNA

Tanto el DNA plasmídico como genómico fueron digeridos con endonucleasas de restricción de diversas casas comerciales siguiendo sus recomendaciones en cuanto al tampón y a la temperatura utilizadas. Los tiempos de digestión variaron, según la cantidad de DNA a digerir, entre 2 y 4 horas.

2.9.2. AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de restricción de DNA plasmídico generados por digestión con endonucleasas fueron aislados individualmente utilizando el kit "Gene-Clean" de *BIO-1001*. Para ello, una vez digerido el DNA se hizo migrar en geles de agarosa al 0,7-1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a aislar, utilizando como tampón 1xPE.

2.9.3. TRATAMIENTO CON FOSFATASA ALCALINA DE LOS VECTORES TRAS DIGESTIÓN

La fosfatasa cataliza la eliminación de los extremos 5'-fosfato del DNA, RNA, rNTP y dNTP. Este tratamiento se realizó sobre vectores digeridos, con el fin de evitar el autoligamiento de éstos. Para ello se utilizó 1 U de fosfatasa alcalina de *Boheringer Mannheim* y 1 µl del tampón recomendado para un volumen final de digestión de 10 µl. Se incubó la mezcla durante 30 min a 37°C y, transcurrido ese tiempo, la fosfatasa se inactivó por calor a 75°C durante 10 min, añadiéndole, previamente, 1 µl de EGTA 0,2 mM. Tras la inactivación, al DNA se le hicieron dos extracciones con PCIA y una con CIA. El DNA se precipitó con dos volúmenes etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M. Se lavó con etanol al 70% y se secó a vacío para su uso posterior.

2.9.4. RELLENO DE LOS EXTREMOS PROTUBERANTES DE LOS VECTORES TRAS DIGESTIÓN

Para rellenar los extremos de DNA monocatenario que se generan al cortar con determinadas enzimas de restricción, se usaron tanto el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I como la T₄ DNA polimerasa de *E. coli* y siguiendo las recomendaciones del distribuidor (*Boehringer Mannheim*).

2.9.5. LIGAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA

Para las reacciones de ligamiento se utilizó la T₄ DNA ligasa (*Boehringer Mannheim*) siguiendo las recomendaciones del distribuidor. Los ligamientos de extremos cohesivos se realizaron a temperatura ambiente durante 2-4 horas, o a 4°C durante toda la noche. Los ligamientos de extremos romos se realizaron a 18°C con un 13% de PEG-6.000.

2.10. GENERACIÓN DE DELECCIONES CON DNAasa I

La obtención de las deleciones de los subclones para secuenciación se realizó por el método de cortes al azar con DNAasa I (*Boehringer Mannheim*) (*Sambrook et al.*, 1982).

Digestión con DNAasa I

5 μl de DNAasa I (1U/ μl) se diluyeron, inicialmente, en 45 μl de tampón MTS, dejando estabilizar la mezcla unos 20 min a 4°C. Transcurrido ese tiempo, se prepararon diluciones sucesivas 1:10, 1:100, 1:1000, etc. de esta mezcla en el mismo tampón.

Mezcla de digestión (MTS) para 20 muestras:

DNA	10-12 μg
tampón MT ⁽¹⁾	100 μl
SAB (1 mg/ml)	100 μl
H ₂ O	hasta V _F = 1000 μl

⁽¹⁾MT= 10 mM MnCl₂, 0,2 M Tris-ClH pH 7,5.

La mezcla de digestión se repartió en alícuotas de 48 μl en tubos Eppendorff, y se añadieron 2 μl de las distintas diluciones de DNAasa I a intervalos de 15 s. La digestión se paró añadiendo 50 μl de PCIA y agitando vigorosamente en vórtex, también en intervalos de 15 s, de modo que todos los tubos fueron incubados durante 5 min a temperatura ambiente. Se extrajo el fenol con CIA, y se tomaron alícuotas de 4 μl para su comprobación en geles de agarosa al 0,8%. El resto de la digestión se reservó a 4°C. Una vez examinado el gel, las digestiones que generaron una menor proporción de DNA super-enrollado o circular se mezclaron y se precipitaron con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 de acetato sódico 3 M. El precipitado se lavó con etanol al 70% y, tras su secado a vacío, se resuspendió en 75 μl de H₂O estéril.

Digestión con el ENZIMA I

Una vez cortado el DNA en sitios al azar, el ENZIMA I se utilizó para conseguir las deleciones unidireccionales. Debe ser un enzima que no corte en el inserto y que pertenezca al MCS del vector de clonación, situado en el mismo lado, respecto del inserto, en el que se haya escogido el cebador para secuenciar.

Mezcla de digestión:

DNA	75 μ l
SAB (1 mg/ml)	10 μ l
Tampón	10 μ l
Enzima I	150 U
H ₂ O hasta	100 μ l

Se incubó durante 90 min a 37°C y se precipitó el DNA digerido con 134 μ l de 2,5 M NaCl, 20% PEG-6.000, ajustando el volumen final a 300 μ l con agua. Se incubó durante otros 90 min en hielo y se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 10 min, tras lo cual, se retiró el sobrenadante y el DNA se resuspendió en 100 μ l de 1xTE. Se realizó una extracción con un volumen de PCIA y una segunda extracción con un volumen de CIA. Se tomaron unos 10 μ l de muestra y se comprobaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, para observar si aparecían las bandas de distintos tamaños producto de la digestión. El resto se precipitó con tres volúmenes de etanol al 95% y 1/10 de acetato sódico 3 M durante 15-20 min a -70°C. Transcurrido ese tiempo, el DNA se centrifugó durante 30 min a 15.000 r.p.m., se lavó con etanol al 70% y se secó a vacío.

Relleno de los extremos protuberantes y ligamiento

El DNA se resuspendió en 18 μl de H_2O . Se añadieron 2 μl de tampón 10x y 0,5 unidades de *Klenow* (*Boehringer Mannheim*). Se incubó 5 min a 37°C y se añadieron 2 μl de mezcla de nucleótidos 0,125 mM y se incubó durante otros 10 min a 37°C.

Para la reacción de ligamiento, a los 22 μl de DNA se añadieron:

Tampón de ligasa 10x	15 μl
SAB (1 mg/ml)	15 μl
H_2O	82 μl
ATP 10 mM	15 μl
T_4 DNA ligasa	5 U

La reacción de ligamiento se incubó toda una noche a 15°C.

Digestión con el ENZIMA II y transformación

La digestión con este enzima se realiza para eliminar todos aquellos plásmidos que no hayan sido delecionados. Se trata de un enzima que no corta dentro del inserto y del mismo lado del MCS que el ENZIMA I, pero de localización más próxima al inserto respecto de este enzima. Antes de digerir se reservaron 5 μl de mezcla de ligamiento para transformar y comprobar el porcentaje de no delecionados:

DNA	145 μl
Tampón 10x	19 μl
SAB (1mg/ml)	19 μl
Enzima II	150 U
H_2O hasta	190 μl

La digestión se incubó a 37°C durante 90 min. Transcurrido ese tiempo, se tomaron alícuotas de 20 µl para realizar la transformación. Se utilizaron células competentes JM109. Los transformantes se sembraron en placas LBA, preparando distintas diluciones en LB. El DNA plasmídico se analizó por digestión con los ENZIMAS III y IV.

Esquema de la posición relativa de los ENZIMAS I, II, III y IV



2.11. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE *PCR*

2.11.1. AMPLIFICACIÓN DE *DNA*

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó a partir de DNA genómico total, DNA plasmídico y, directamente, a partir de células según los casos.

Las amplificaciones a partir de DNA, tanto plasmídico como genómico, se realizaron tras un pretratamiento de las muestras con RNasa. Tras eliminar la RNasa por extracción con fenol, se realizaron varias

diluciones para alcanzar el óptimo de amplificación. En los casos en los que la amplificación se utilizó para subclonar los promotores, con el fin de estudiar su actividad en distintas condiciones, se utilizó además el enzima *Vent DNA polimerasa* (*New England Biolabs*) para evitar el riesgo de introducir mutaciones debidas a los posibles errores que pudiese producir la *Taq DNA polimerasa*. Cuando fue necesario amplificar fragmentos de DNA con extremos romos, evitando las colas de adenina que genera la *Taq DNA polimerasa*, se utilizó el enzima *Pwo* de *Boehringer Mannheim*. Las condiciones de polimerización variaron en cada caso, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de la T_m de los oligonucleótidos.

Para la amplificación de DNA a partir de células, se tomaron colonias aisladas, con una punta de pipeta automática estéril, directamente de las placas (aproximadamente unos 2-3 μ l de volumen) y se transfirieron a tubos Eppendorff que contenían 50 μ l de lisozima (20 U/ml). Las células se incubaron durante unos 20-30 min a temperatura ambiente con agitación. Transcurrido ese tiempo, las células se precipitaron a 5.000 r.p.m. durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante, tras lo cual se procedió a una desnaturalización de 5 min a 95°C. Inmediatamente después, el precipitado celular se incubó en hielo durante otros 5 min antes de realizar la *PCR* para evitar que las proteasas pudiesen inactivar la DNA polimerasa. La mezcla de *PCR* se añadió directamente sobre el precipitado celular.

Una vez terminada la amplificación, las células se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 1 minuto y se cargaron 10 μ l en un gel de agarosa al 2% para su comprobación mediante separación electroforética.

2.11.2 AMPLIFICACIÓN DE RNA.

Para la amplificación de ácidos nucleicos a partir de RNA se utilizó el kit *Lysate mRNA capture kit for RT-PCR (Amersham)*. La *RT-PCR* se realizó tanto a partir de células como de RNA total. Siempre se hicieron duplicados en ausencia de retrotranscriptasa como controles negativos.

2.12. SOUTHERN BLOT

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

Tanto en el caso de *Southern blot* de DNA genómico como plasmídico, el DNA digerido se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7%. La transferencia del DNA a las membranas *Nytran N-13 (Scheider and Schuell)* se realizó mediante una bomba de vacío a 50 mBa durante 2 min con solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M, NaCl 1,5 M) y unos 20-30 min con solución de neutralización (Tris-ClH 0,5M, pH 7,8, NaCl 1,5 M). Una vez transferido el DNA a las membranas, éste se fijó mediante luz U.V. durante 3 min. Las membranas se guardaron en bolsas de plástico selladas a 4°C hasta su hibridación.

2.13. NORTHERN BLOT.

Preparación de las sondas

Las sondas se marcaron utilizando el kit *Prime a Gene System* (*Promega*). Para ello, aproximadamente 30 ng de DNA se disolvieron en H₂O, se hirvieron durante 5 min para su desnaturalización y se enfriaron rápidamente en hielo.

Al DNA desnaturalizado se le añadieron los siguientes componentes del kit:

Mezcla de marcaje	7 μ l
$\alpha^{32}\text{P}$ dATP*	3 μ l
Klenow	1 μ l
H ₂ O hasta V _F =	25 μ l

* (*Amersham*)

Se incubó durante una hora a 37°C y, transcurrido ese tiempo, la sonda marcada se hizo pasar por una columna de *Sephadex-G50* equilibrada con STE (Tris-ClH 10 mM pH 7,5, EDTA 0,1 M, SDS 1%), recogiendo fracciones de 200 μ l en tubos Eppendorff. La radioactividad incorporada en dichas fracciones fue determinada en un contador de centelleo (*Beta-Wallac*) y se recogieron aquellas muestras con la mayor carga de radioactividad.

Preparación de las muestras

Las muestras de RNA total se hicieron migrar en geles de agarosa desnaturalizantes, tal y como se describe en el apartado 2.8.1.2. La transferencia a las membranas de hibridación se realizó mediante una bomba

de vacío durante 30 min - 1 hora, a 50 mBa, añadiendo continuamente 10xSSC (NaCl 1,5 M, citrato sódico 0,15 M). El RNA se fijó a las membranas por exposición a la luz U.V. durante 3 min, tras lo cual, las membranas se prehibridaron durante 1 hora a 65 °C con 50 ml de solución de hibridación (Na_2HPO_4 0,5 M a pH 7,2, SDS 7%, EDTA 1 mM). Transcurrido ese tiempo, se retiró parte de la solución de hibridación, dejando tan sólo 5-10 ml a los que se les añadió la sonda previamente desnaturalizada. La hibridación se realizó durante una noche a la misma temperatura.

Los lavados de las membranas con la solución de lavado (2xSSC, SDS 0,1%) se realizaron a la misma temperatura de hibridación y a temperatura ambiente durante unos 10 min. El número de lavados varió dependiendo del grado de emisión de las membranas.

Se utilizaron tanto placas de *PhosphorImager* como películas de autorradiografía para ser expuestas a las membranas radioactivas

La señal de hibridación fue cuantificada por densitometría (*Molecular Dynamics*), usando el programa de análisis *Image Quant* (Microsoft). La intensidad de la señal fue normalizada en relación con la carga de rRNA y las unidades arbitrarias se calcularon como la relación entre el volumen de las bandas de rRNA (media entre 17S y 26S) y el volumen de las bandas de la señal de hibridación.

2.14. SECUENCIACIÓN

Las reacciones de secuenciación se realizaron empleando el método de Sanger y colaboradores (Sanger *et al.*, 1977), utilizando la DNA polimerasa T7 y *Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (Amersham)*. Se utilizaron cebadores comerciales o diseñados a partir de la secuencia de DNA previamente establecida.

Preparación del DNA molde

El DNA para secuenciación se obtuvo tal y como se describe en el apartado 2.4.1.2. Los moldes se prepararon a partir de DNA bicatenario mediante una desnaturalización alcalina, en la que 5 µg de DNA se incubaron durante 30 min a 37°C en 10 µl de NaOH 2 M, EDTA 2 mM. Una vez desnaturalizado, el DNA se precipitó con 1,1 µl de acetato sódico 3 M y 2-3 volúmenes de etanol al 95% durante 30 min a -70°C. Tras la precipitación, el DNA se lavó con etanol al 70% y se secó a vacío.

Reacciones de secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron siguiendo las recomendaciones del distribuidor del kit de secuenciación antes mencionado.

Gel de secuenciación

Los geles de secuenciación se prepararon en células de secuenciación de *Biorad* tal y como se describe en el apartado 2.8.2. Las muestras se desnaturalizaron a 75°C durante 2 min antes de ser cargadas por primera vez

en el gel y se mantuvieron en hielo para las cargas posteriores. La electroforesis se realizó a 1.900-2.000 V, manteniendo los cristales de secuenciación a una temperatura más o menos constante de 50°C.

Los geles se secaron durante una hora a 80°C en un secador a vacío. Una vez seco, la autorradiografía se realizó exponiendo una película de rayos X *Agfa Curix RP2* de *Agfa*.

2.15. ENSAYOS β -GALACTOSIDASA

Para el análisis de la actividad de los promotores fusionados a la secuencia que codifica a la β -galactosidasa, se utilizó el ONPG como sustrato cromogénico.

Seis colonias de levadura, transformadas con los plásmidos que portan la fusión de los promotores con el gen de la β -galactosidasa, se utilizaron para inocular un cultivo que se dejó crecer hasta la absorbancia adecuada. La composición de los medios y la temperatura de cultivo también variaron dependiendo del experimento, pero en todos los casos se utilizó medio carente del aminoácido correspondiente a la auxotrofia con el fin de evitar la pérdida de plásmidos. Los resultados se refirieron a la media de tres experimentos independientes.

La extracción de proteínas se realizó mediante pulsos de agitación fuerte con bolas de vidrio en tampón Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 ,

10 mM KCl, 1 mM Mg₂SO₄, pH 7,4), tal y como se describe en Mount y colaboradores (Mount *et al.*, 1996). La estimación total de proteínas se realizó mediante el ensayo de cuantificación de Bradford (1976) y utilizando seroalbúmina bovina como estándar. Se utilizaron 100 y 50 µl de extracto proteico en un volumen de 1 ml de tampón Z . En tiempo t₀ se añadieron 200 µl de ONPG (4 mg/ml en tampón Z) para la reacción, que se efectuó a 30°C. Una vez iniciada la hidrólisis del sustrato, la reacción se paró con 500 µl de Na₂CO₃ (tiempo t₁). La absorbancia se midió a 420 nm y se calculó la actividad de acuerdo con la siguiente ecuación (Mount *et al.*, 1996):

$$U = [A_{420}(\Delta t \times p \times 0,0045)] \text{ nmol de ONPG/mg/ml}$$

en donde A_{420} = absorbancia del *o*-nitrofenol a 420 nm
 Δt = tiempo de reacción en min
 p = mg de proteína totales utilizados
0,0045 = coeficiente de extinción molar

2.16. PROGRAMAS DE ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Búsqueda de ORFs

Para la búsqueda de pautas de lectura abiertas tras la secuenciación, y para el análisis de hidrofobicidad de las proteínas predichas por estas *ORFs* se utilizó el programa DNASIS/PROSIS HITACHI_{TM} (*copyright of Hitachi Software Engeneering Co., LTD.*).

Búsqueda de secuencias homólogas

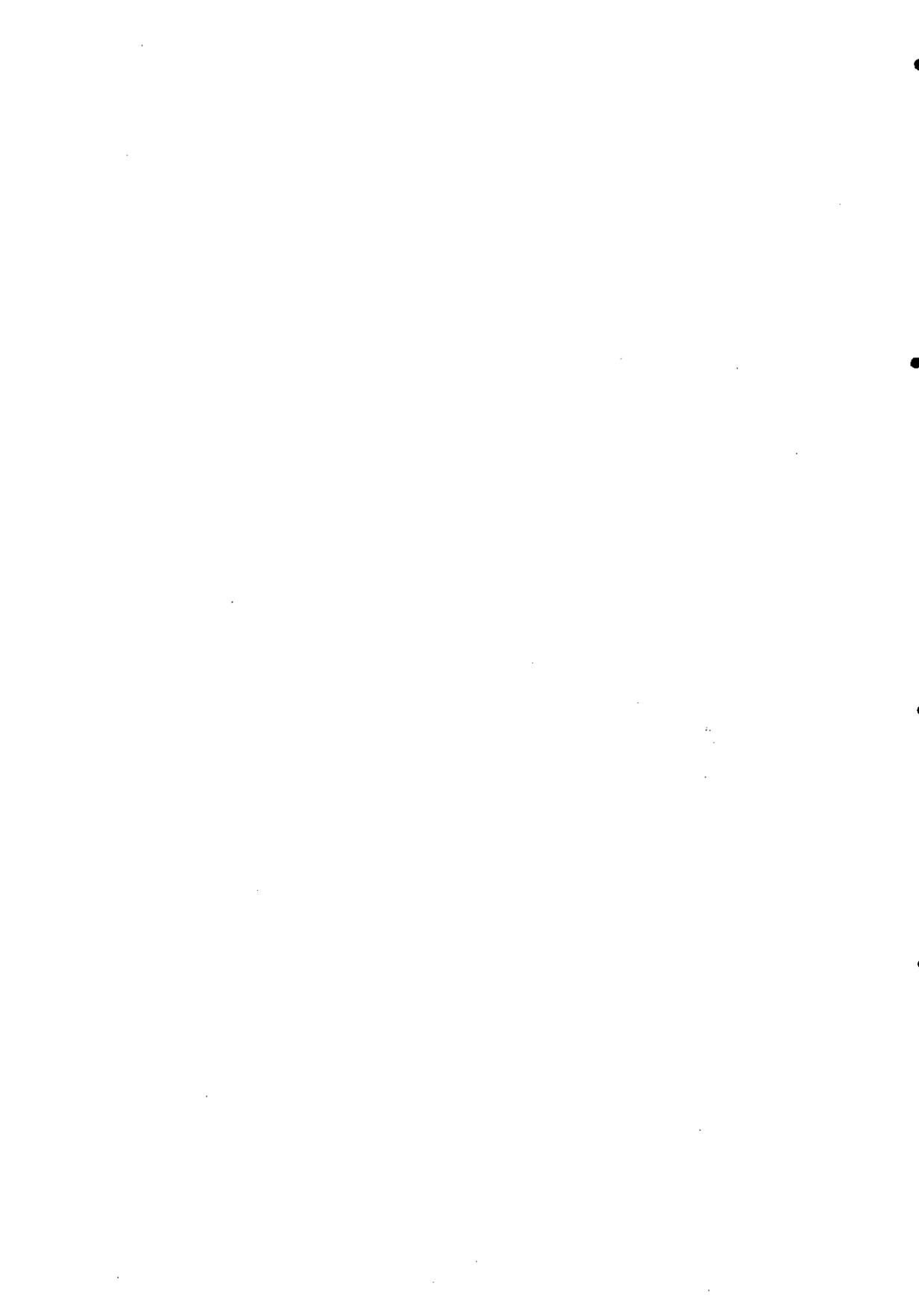
Para realizar la búsqueda de secuencias homólogas a las *ORFs* encontradas, fueron utilizados distintos programas de búsqueda en bases de datos de nucleótidos y proteínas: *FastA* y *FastN* (Pearson, 1990) del paquete de programas del GCG (Genetic Computer Group) (Devereux, *et al.*, 1984) y *BlastX* y *BlastN* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Karlin and Altschul, 1990, 1993).

Uso de codones de las secuencias codificadoras

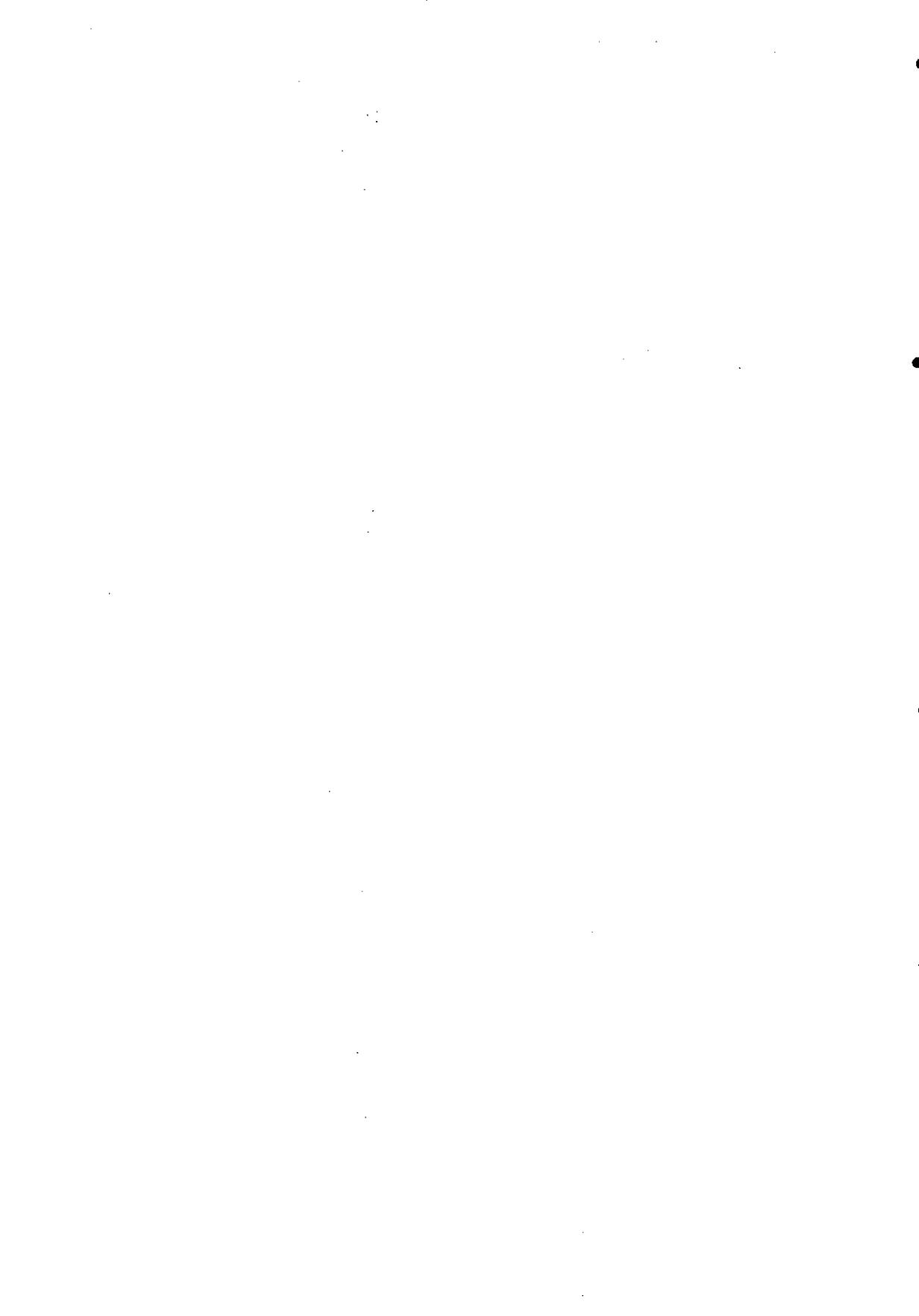
Los índices utilizados para el análisis del uso de codones de las *ORFs* ICDI (*Intrinsic Codon Deviation Index*) (Freire-Picos *et al.*, 1994) y CBI (*Codon Bias Index*) (Bennetzen y Hall, 1982), fueron calculados con los programas PICDI (Rodríguez-Belmonte *et al.*, 1996) y CODONS (Lloyd and Sharp, 1992)

Alineamientos de las secuencias de aminoácidos

Para el análisis comparativo de homologías e identidades de las distintas secuencias de aminoácidos, se utilizó el programa CLUSTAL V (Higgins *et al.*, 1992).

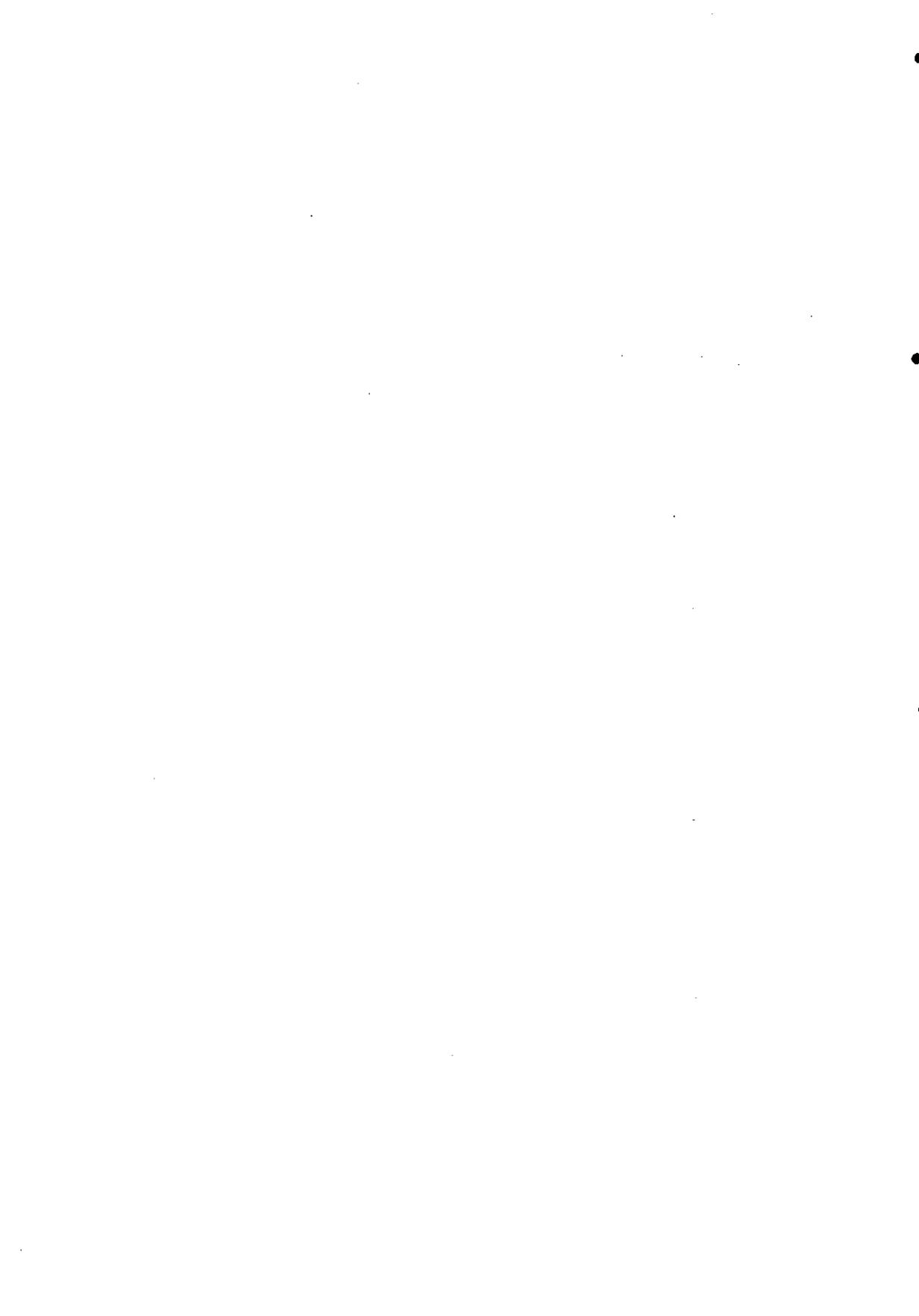


3. OBJETIVOS

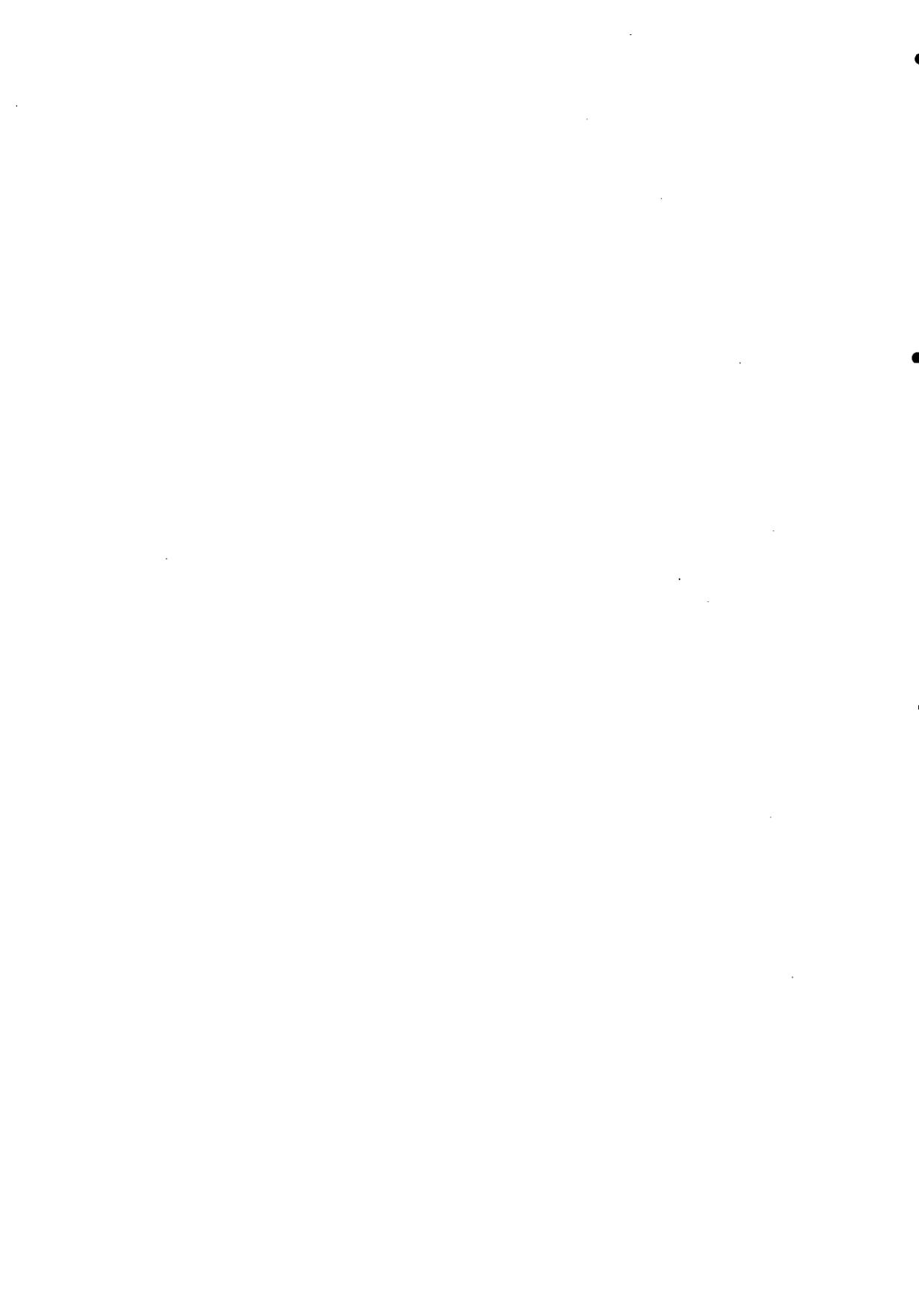


En el presente trabajo se ha analizado una región de DNA del cromosoma seis de la levadura *Kluyveromyces lactis*. Los objetivos propuestos se describen a continuación:

1. Secuenciación de la región *SalI-PstI* de 5 Kb.
2. Determinación del número de pautas de lectura abierta (*ORF*).
3. Subclonado de las *ORFs* encontradas.
4. Análisis funcional.
 - 4.1. Predicción de función basada en homologías respecto a secuencias recopiladas en las bases de datos.
 - 4.2. Interrupción génica y análisis fenotípico.
 - 4.3. Análisis de la secuencia de los promotores.
 - 4.4. Análisis de expresión mediante *Northern blot*, *RT-PCR* y fusiones a genes marcadores.



4. SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *ORFs*



Con el fin de alcanzar el primer objetivo propuesto, realizamos la secuenciación de un fragmento *SalI-HindIII* de 3,8 Kb, que solapa parcialmente con un fragmento *BamHI-PstI* previamente secuenciado en nuestro laboratorio, y localizado en posición 5' del gen *KICYC1* (Fig. 1).

4.1. OBTENCIÓN DE SUBCLONES PARA SECUENCIACIÓN

Se subclonó, en varios fragmentos, una región de unos 5.500 pb del plásmido original pEC1, que contiene parte de *KICYC1*, hasta la posición +245, según el siguiente esquema (Fig. 1).

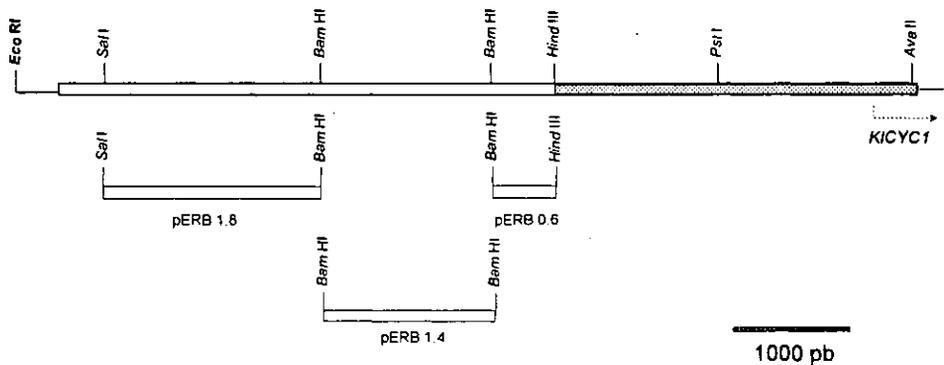


Figura 1. Esquema de los subclones para secuenciación. La región señalada en gris pertenece a una región previamente secuenciada. La flecha indica la posición del ATG y el comienzo de la *ORF* del gen *KICYC1*.

El fragmento *SalI*-*Bam*HI, de 1.863 pb, se insertó en el sitio *SalI*-*Bam*HI del sitio múltiple de clonación del vector YEplac195. El fragmento *Bam*HI-*Bam*HI, de 1.458 pb, se insertó en el sitio *Bam*HI de YEplac195. El fragmento *Bam*HI-*Hind*III, de 572 pb, se insertó en el sitio *Bam*HI-*Hind*III de YEplac195.

4.2. DELECCIONES DE LOS SUBCLONES PARA SECUENCIACIÓN

Los dos fragmentos de mayor tamaño, pERB1.8 y pERB1.4, se deleccionaron mediante digestión con DNAasa I, tal y como se describe en Materiales y Métodos, para generar subfragmentos de menor tamaño. Los enzimas de restricción utilizados se describen en el siguiente esquema (Figs. 2 y 3)

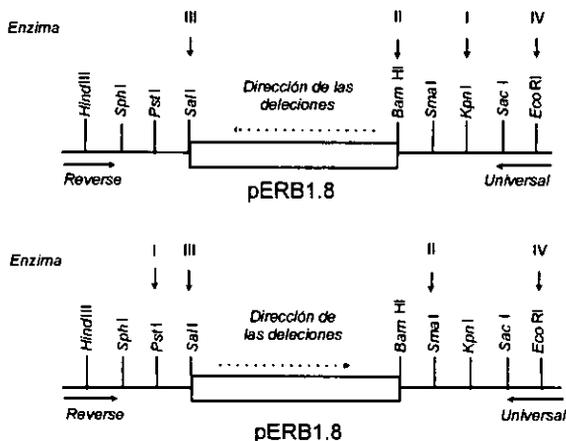


Figura 2. Delecciones de pERB1.8. Esquema de los enzimas de restricción utilizados para generar delecciones unidireccionales de pERB1.8 para su posterior secuenciación.

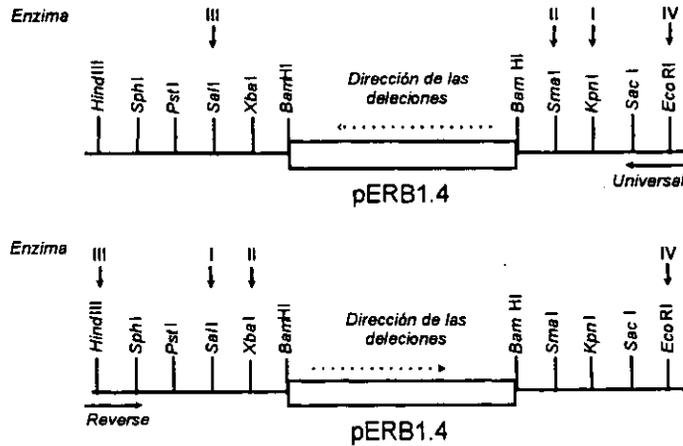


Figura 3. Deleciones de pERB1.4. Esquema de los enzimas de restricción utilizados para generar deleciones unidireccionales de pERB1.4 para su posterior secuenciación.

Los tamaños aproximados de las deleciones que han sido utilizadas para secuenciación, estimados en geles de agarosa al 0,7% tras digestión con los enzimas de restricción III-IV, que separan el inserto íntegro del vector de clonación (ver Materiales y Métodos), se resumen en las siguientes tablas (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Tamaños aproximados de los fragmentos generados por delección del plásmido pERB 1.8. Los tamaños han sido estimados tras digestión de los plásmidos con los enzimas de restricción *SaI* y *EcoRI* (en el caso de las delecciones de dirección *Universal*) o *BamHI* y *HindIII* (en el caso de las delecciones de dirección *Reverse*), que liberan el inserto completo del vector.

<i>Lado "Reverse"</i>		<i>Lado "Universal"</i>	
<i>Delección</i>	<i>Tamaño en pb</i>	<i>Delección</i>	<i>Tamaño en pb</i>
$\Delta I-2$	800	$\Delta VIII-68$	1.400
$\Delta I-4$	1.050	$\Delta VIII-25$	1.200
$\Delta I-9$	1.130	$\Delta VIII-6$	1.150
$\Delta I-7$	1.430	$\Delta XI-188$	750

Tabla 2. Tamaños aproximados de los fragmentos generados por delección del plásmido pERB 1.4. Los tamaños han sido estimados tras digestión de los plásmidos con los enzimas de restricción *SaI* y *EcoRI* (en el caso de las delecciones de dirección *Universal*) o *HindIII* y *EcoRI* (en el caso de las delecciones de dirección *Reverse*), que liberan el inserto completo del vector.

<i>Lado "Reverse"</i>		<i>Lado "Universal"</i>	
<i>Delección</i>	<i>Tamaño en pb</i>	<i>Delección</i>	<i>Tamaño en pb</i>
$\Delta VI-15$	1350	$\Delta XII-7$	1200
$\Delta VII-24$	1100		
$\Delta IV-13$	950		
$\Delta V-14$	700		
$\Delta VII-22$	380		

Por este método se aislaron también otros clones que portaban fragmentos de tamaños intermedios, tal y como se aprecia en las fotografías de la (Fig. 4), sin embargo, no fueron utilizados para secuenciación, ya que los descritos en las tablas anteriores fueron suficientes para solapar la lectura. En aquellos casos en los que no se encontraron delecciones intermedias, se diseñaron oligonucleótidos sintéticos para poder solapar la lectura.

La secuenciación del clon pERB0.6, por no encontrarse los enzimas adecuados en el sitio múltiple de clonación del vector, se llevó a cabo mediante "primer walking", utilizando cebadores diseñados de acuerdo con la información obtenida en lecturas previas.

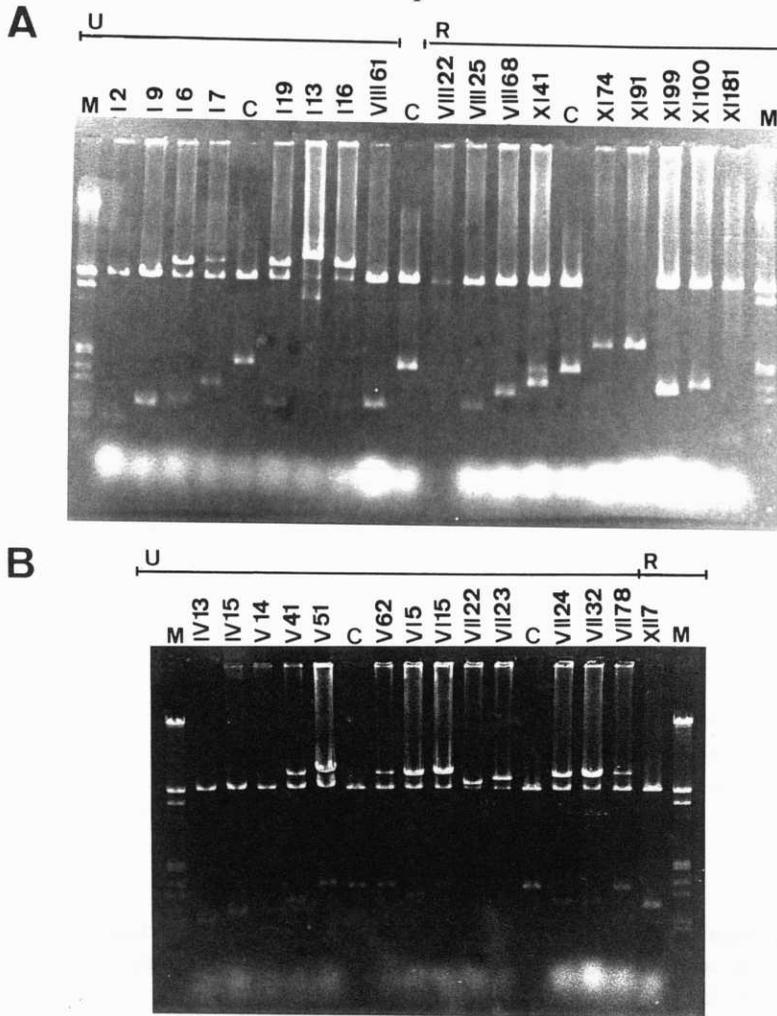


Figura 4. Digestión con los enzimas de restricción III y IV que liberan el inserto del vector de clonación. A. Deleciones del clon pERB1.8, B. Deleciones del clon pERB1.4. M: Marcador molecular III (Boehringer). C: Controles de los clones originales sin delecionar. U: Universal. R: Reverse.

4.3. ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN

La secuenciación de las dos hebras se realizó siguiendo el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Se utilizaron los cebadores *Universal* y *Reverse* para secuenciar tanto los subclones como las deleciones de los mismos desde los extremos de los insertos. En los casos en los que las secuenciaciones de las deleciones no se solaparon, se utilizaron oligonucleótidos sintéticos para utilizar como cebadores de la misma.

La estrategia de secuenciación está esquematizada en la figura 5.

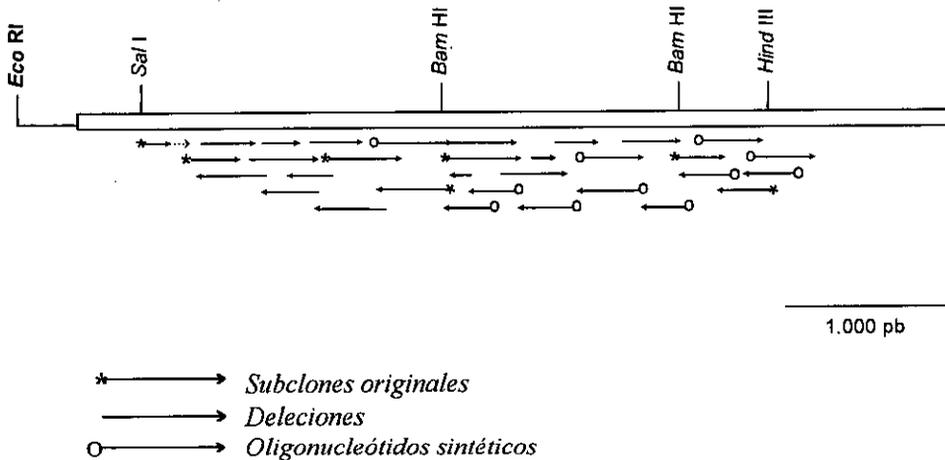


Figura 5. Esquema de la estrategia de secuenciación. Las flechas indican la dirección de la lectura. La secuenciación a partir de los extremos de los fragmentos de los subclones (*) o de las deleciones de los mismos está diferenciada. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados para solapar la lectura también están indicados (o).

4.4. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA

El análisis de la secuencia de DNA mediante el programa DNASIS reveló la existencia de dos largas *ORFs* que se encontraban en distintas pautas de lectura, pero en el mismo sentido. La *ORF* más cercana al gen *KICYC1*, de 1.734 pb, predice una proteína de 577 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 65 KDa. La segunda *ORF*, más alejada de *KICYC1*, presenta una longitud de 1.245 pb y predice una proteína de 414 aminoácidos, con un peso molecular de unos 47 KDa (Fig. 6).

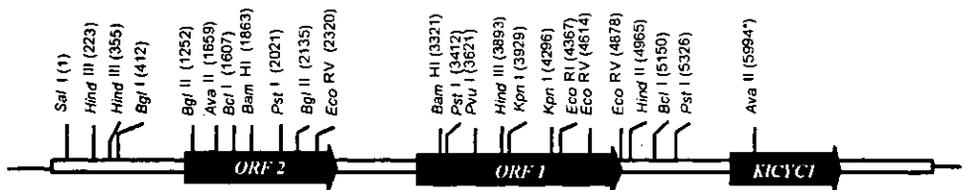


Figura 6. Localización de las *ORFs*. Mapa de restricción de la secuencia y localización de las *ORFs* respecto de *KICYC1*.

4.4.1. SECUENCIA DE LA *ORF1*

En la siguiente figura (Fig. 7) se muestra tanto la secuencia de nucleótidos, como la de aminoácidos, del fragmento de la región secuenciada que contiene la *ORF1*, más cercana al gen *KICYC1*.

2502	GAG	AGA	AGG	AAA	TAT	GCA	AAT	ACA	AAT	GCA	TTA	ATG	TAA	CGT	TCT	ACC	2549
2550	CAG	CAC	ATC	CAA	AGA	AAA	TGA	AAT	TAA	TAC	ACG	AAA	TTA	ATG	TGC	ATA	2597
2598	CAA	ATA	GTT	ACT	TCT	CAT	ATG	CCT	ACT	TGT	TGC	AGG	CAA	CAC	CGT	TGT	2645
2646	TCA	ATG	CTA	TCC	TAC	GCT	CCC	CCC	CTT	TGC	ATA	TCA	TAT	TTC	TCT	TCA	2693
2694	ATT	TTA	AAG	TTC	ATT	TCA	ATG	TCT	TTC	GGA	AAA	CCT	ATA	GTT	CTA	TCC	2741
2742	TGT	CCC	TAA	TAG	TGT	TCA	TAT	TGG	GCA	GTG	GAT	TCT	TTT	TAT	TTA	TGT	2789
2790	TAA	GCA	TTC	CCT	ATT	CCT	CAC	TAG	GAA	AAG	GGC	ACT	TGG	ACA	TCA	TAA	2837
2838	TTC	TTC	CTT	TTA	TAG	CAA	TAC	TTT	TCT	TTC	TAG	CTT	CCG	TCC	TAC	CTT	2885
2886	TTT	CAT	ACC	GGA	TTT	CAC	CTT	GTC	AGT	TCA	TAA	TAA	TAT	CAA	TAC	TCA	2933
2934	CCT	ATT	AAG	AGC	CAC	ATG	ACG	TGC	GTG	CGA	TTG	AGT	ACT	TAA	AAA	CTA	2981
2982	CTG	TTA	CCT	TTT	GTC	CAT	CGT	GTA	ACT	TTG	CAT	TTT	CTT	TGT	CAC	ATT	3029
3030	TTC	CTG	TAC	AAG	AAC	TAA	CTT	GAC	AAA	ATT	GAT	TTT	CCT	TGA	AGA	GAA	3077
3078	GTC	GAA	TTA	AAA	GTT	TAA	CAG	GAA	TAT	ACT	GGG	ACG	GAC	AAA	AAG	ATG Met	3125
3126	GAA	ACC	AAG	ACC	CTG	ATA	CAC	TCA	GGG	GCT	GCT	AAG	GAG	ATG	AGC	TAT	208
209	Glu	Thr	Lys	Thr	Leu	Ile	His	Ser	Gly	Ala	Ala	Lys	Glu	Met	Ser	Tyr	3173
3174	ACT	GAG	AGG	TAT	AAT	GTC	GCA	CCG	CTA	ATA	CCT	TTG	CCT	GAG	TAT	CTT	224
225	Thr	Glu	Arg	Tyr	Asn	Val	Ala	Pro	Leu	Ile	Pro	Leu	Pro	Glu	Tyr	Leu	3221
3222	TTT	CAT	AGA	TTA	TTT	CAG	CTC	AAC	TGC	CGT	ACT	GTG	TTT	GGA	GTT	GCC	240
241	Phe	His	Arg	Leu	Phe	Gln	Leu	Asn	Cys	Arg	Thr	Val	Phe	Gly	Val	Ala	3269
3270	AAT	TAT	TCA	ACT	GCG	AAA	CTA	TAT	CAA	GCC	ATA	GCA	GCC	AGC	GGG	ATA	256
257	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ala	Lys	Leu	Tyr	Gln	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Gly	Ile	3317
3318	CAG	TGG	ATC	CAA	ACG	ATA	AAT	CAA	TTG	AAC	ACA	TCA	TTT	GCA	GTA	GAT	272
273	Gln	Trp	Ile	Gln	Thr	Ile	Asn	Gln	Leu	Asn	Thr	Ser	Phe	Ala	Val	Asp	3365
3366	GCA	TAC	GGG	AGA	GCT	ATC	GGA	GTG	AGC	TGC	TAC	GTC	ACT	AGC	GAA	TCT	288
289	Ala	Tyr	Gly	Arg	Ala	Ile	Gly	Val	Ser	Cys	Tyr	Val	Thr	Ser	Glu	Ser	3413
3414	GCA	GAA	TTA	GGC	CAT	GTT	AAT	GGT	TTT	TTT	GGA	TCA	TTT	TGT	GAA	TAT	304
305	Ala	Glu	Leu	Gly	His	Val	Asn	Gly	Phe	Phe	Gly	Ser	Phe	Cys	Glu	Tyr	3461
3462	GTT	CCC	ATC	TTA	CAG	GTA	GTC	GTC	TTG	GAA	CAG	TCT	CAT	GAT	CTT	GAG	320
321	Val	Pro	Ile	Leu	Gln	Val	Val	Val	Leu	Glu	Gln	Ser	His	Asp	Leu	Glu	3509
3510	AGG	TTG	ATT	GGA	GAT	GTT	TCA	ATC	TTT	CAT	GAC	GTA	GTG	GAT	GAT	CCT	336
337	Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Val	Ser	Ile	Phe	His	Asp	Val	Val	Asp	Asp	Pro	3557
3558	TCT	GAG	ATA	GAC	AGT	TGT	GTA	CGA	ACG	CTT	TTT	TGG	GGG	AAA	CGC	CCT	352
353	Ser	Glu	Ile	Asp	Ser	Cys	Val	Arg	Thr	Leu	Phe	Trp	Gly	Lys	Arg	Pro	3605
3606	GTT	TAT	ATG	GGC	CTC	CGA	TCG	AAG	GAT	GCC	ACG	AAA	CTT	GTC	CCC	AGT	368
369	Val	Tyr	Met	Gly	Leu	Arg	Ser	Lys	Asp	Ala	Thr	Lys	Leu	Val	Pro	Ser	3653
3654	AGT	TCT	CTA	AAC	GGA	AAC	ATA	GCA	GAT	AAG	ATG	GGC	ATA	AAG	AAC	ACT	384
385	Ser	Ser	Leu	Asn	Gly	Asn	Ile	Ala	Asp	Lys	Met	Gly	Ile	Lys	Asn	Thr	3701
3702	TTC	TTT	CAA	ACG	GAC	ACA	ATA	AAG	AGG	GTT	ATA	GAC	AAA	ATC	ATT	GCC	400
401	Phe	Phe	Gln	Thr	Asp	Thr	Ile	Lys	Arg	Val	Ile	Asp	Lys	Ile	Ile	Ala	3749
3750	GAA	GTT	TAC	GCT	TCA	TCA	AGG	CCA	TTG	ATC	GTG	GTT	GAT	GCA	TTA	ATT	416
417	Glu	Val	Tyr	Ala	Ser	Ser	Arg	Pro	Leu	Ile	Val	Val	Asp	Ala	Leu	Ile	3797
3798	GAT	AGA	TAT	AAT	TAC	AAC	AGC	ACA	ATA	CAA	AAT	TTC	CTA	ACG	GAA	ACA	432
433	Asp	Arg	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Thr	Ile	Gln	Asn	Phe	Leu	Thr	Glu	Thr	3845
3846	GGA	ATA	CCA	TTT	GTG	ACA	ACC	TTA	ATG	TCA	AAA	GGT	TCT	ATT	GAC	GAA	448
449	Gly	Ile	Pro	Phe	Val	Thr	Thr	Leu	Met	Ser	Lys	Gly	Ser	Ile	Asp	Glu	3893
3894	AGC	TTA	CCC	AAC	TTT	GTT	GGG	ACT	TTC	TTA	GGT	ACC	ATG	TCA	CAG	CCC	464
465	Ser	Leu	Pro	Asn	Phe	Val	Gly	Thr	Phe	Leu	Gly	Thr	Met	Ser	Gln	Pro	3941
3942	ATT	GTT	CGA	GAA	TAT	ATG	AAT	AAT	GCA	GAT	TGT	ACG	TTA	ATT	TTA	GGA	480
481	Ile	Val	Arg	Glu	Tyr	Met	Asn	Asn	Ala	Asp	Cys	Thr	Leu	Ile	Leu	Gly	3989

3990	TGT	ATG	ATC	GAA	AAC	TTC	AAA	AAC	TCG	TAC	TGT	AGA	TTC	AAC	TAC	AAG	4037
497	Cys	Met	Ile	Glu	Asn	Phe	Lys	Asn	Ser	Tyr	Cys	Arg	Phe	Asn	Tyr	Lys	512
4038	AGT	AAA	AAC	CAA	ATC	TTA	CTT	TGG	AAT	GAT	AGA	GTT	AAA	ATT	GAA	AAT	4085
513	Ser	Lys	Asn	Gln	Ile	Leu	Leu	Trp	Asn	Asp	Arg	Val	Lys	Ile	Glu	Asn	528
4086	AAT	ATA	ATA	CCT	GAT	ATT	TTA	CTT	CAT	GAA	CTA	CTC	CCA	CAG	CTA	ATA	4133
529	Asn	Ile	Ile	Pro	Asp	Ile	Leu	Leu	His	Glu	Leu	Leu	Pro	Gln	Leu	Ile	544
4134	GCG	TCA	TTA	GAT	ACT	ACC	AAA	ATA	GTA	AAC	TCT	CGT	CCA	GTA	ACA	ATA	4181
545	Ala	Ser	Leu	Asp	Thr	Thr	Lys	Ile	Val	Asn	Ser	Arg	Pro	Val	Thr	Ile	560
4192	CCG	AAT	ATG	ATA	CCC	AGA	GTA	GAA	CCG	CAA	CCG	GTG	ACA	TTT	TTG	CGA	4229
561	Pro	Asn	Met	Ile	Pro	Arg	Val	Glu	Pro	Gln	Pro	Val	Thr	Phe	Leu	Arg	576
4230	CAG	GAG	TAC	CTT	TGG	TTT	AAG	ATG	TCT	ACA	TGG	CTA	AAA	CAA	GGT	GAC	4277
577	Gln	Glu	Tyr	Leu	Trp	Phe	Lys	Met	Ser	Thr	Trp	Leu	Lys	Gln	Gly	Asp	592
4278	GTT	ATT	ATT	TCT	GAA	TCT	GGT	ACC	TCA	GCT	ATT	GGT	CTC	CTA	CAA	CAA	4325
593	Val	Ile	Ile	Ser	Glu	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ile	Gly	Leu	Leu	Gln	Gln	608
4326	AAA	TTC	CCA	GAT	AAT	ACT	AGG	CTA	GTA	TCC	CAA	GCA	ATT	TGG	AAT	TCA	4373
609	Lys	Phe	Pro	Asp	Asn	Thr	Arg	Leu	Val	Ser	Gln	Ala	Ile	Trp	Asn	Ser	624
4374	TCT	GGT	TAT	TCT	ATC	GGT	GCA	TGC	CTT	GGA	ATT	TTG	GCA	GCA	TAT	CGC	4421
625	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Gly	Ala	Cys	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Ala	Tyr	Arg	640
4422	GAT	ATG	GGG	ACA	TTG	GAT	AAG	CAT	AGG	ATT	ATA	TTA	ATG	GTG	GGT	GAT	4469
641	Asp	Met	Gly	Thr	Leu	Asp	Lys	His	Arg	Ile	Ile	Leu	Met	Val	Gly	Asp	656
4470	GGG	TCT	TTA	CAA	TTT	ACT	TTC	CAA	GAA	CTA	AGC	ACC	ATA	TTG	ACG	CAC	4517
657	Gly	Ser	Leu	Gln	Phe	Thr	Phe	Gln	Glu	Leu	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	His	672
4518	GGT	TTT	AAA	CCT	TAC	ATT	TTT	GTA	ATA	AAT	AAT	CAA	GGT	TAT	ACC	GTT	4565
673	Gly	Phe	Lys	Pro	Tyr	Ile	Phe	Val	Ile	Asn	Asn	Gln	Gly	Tyr	Thr	Val	688
4566	GAC	AGA	ACC	TTG	AAT	AGA	GAA	AAG	ACC	CAT	CTG	AAC	GCT	ACA	TAC	TTC	4613
689	Asp	Arg	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Lys	Thr	His	Leu	Asn	Ala	Thr	Tyr	Phe	704
4614	GAT	ATC	CAA	CCG	TGG	GAA	CTA	TTA	AAA	CTC	CCG	TCA	CTT	TTC	TAT	TCC	4661
705	Asp	Ile	Gln	Pro	Trp	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Pro	Ser	Leu	Phe	Tyr	Ser	720
4662	CAA	GAG	TAT	TTC	AAG	AGA	AGA	TGT	ATG	TCG	GTT	GGG	GAA	TTG	AAT	AGT	4709
721	Gln	Glu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Arg	Cys	Met	Ser	Val	Gly	Glu	Leu	Asn	Ser	736
4710	TTA	TTA	AGC	GAT	AAA	GAG	TTC	AAT	AAA	TCC	GAT	CAG	TTG	AAA	ATT	GTA	4757
737	Leu	Leu	Ser	Asp	Lys	Glu	Phe	Asn	Lys	Ser	Asp	Gln	Leu	Lys	Ile	Val	752
4758	GAA	CTA	ATC	CTT	CCA	TCC	ATG	GAT	GTT	CCA	GTA	CTA	CTC	GAT	CCA	CGG	4805
753	Glu	Leu	Ile	Leu	Pro	Ser	Met	Asp	Val	Pro	Val	Leu	Leu	Asp	Pro	Arg	768
4806	GAT	GAC	AGT	AGT	GAT	GAT	GAA	TCT	TCT	CCG	CAG	CAT	AAA	AGA	CCC	AGA	4853
769	Asp	Asp	Ser	Ser	Asp	Asp	Glu	Ser	Ser	Pro	Gln	His	Lys	Arg	Pro	Arg	784
4854	ACG	TGA	AAG	GAG	AAG	GGT	GAA	ACA	GAT	ATC	AGA	GAA	CTT	TCA	CGC	TTC	4901
785	Thr	***															
4902	AAA	TAT	ATA	TAT	TAT	TTA	ATA	AGC	ACT	GAA	CAC	ACA	AGT	ACC	TGC	TTG	4949
4950	GTG	ATC	AGT	CTC	AAT	GTT	AAC	CGC	ATT	ACC	ATT	AAC	AAC	ACG	GCA	CGC	4997
4998	TTT	TCG	TAT	CGG	CAC	TAA	CGA	AGA	GCA	CAC	CAA	AAG	TCA	CGT	GTG	CAT	5045
5046	TAT	ACC	GAT	ATT	CAC	GCA	AAG	AAC	AGA	ATG	AAG	TAA	ATA	AAT	ACT	CTA	5093
5094	TTG	ATG	TCA	AAT	ACA	GAT	AAT	ATG	AGC	GAA	AAA	ATA	TCA	TCT	TCT	CAG	5141
5142	GGT	AAC	ACT	GAT	CAG	AGA	TAT	TCC	AGA	ACC	ATT	ACT	ATT	AAG	TTA	ATT	5189
5190	GTC	ACG	TGC	CGG	TCA	GTA	CGT	ATC	ACG	TGA	CTG	TAA	CAT	ACA	TCA	GCC	5237
5238	AAC	CAA	TCA	GAT	CGC	TTC	CGT	TCA	CAG	TGA	CGT	CCA	ACC	TCT	GAC	AAG	5285
5296	AAT	TGC	TTT	TCC	CCA	CGC	TTT	AAT	CCC	CAT	TAA	GAT	TAC	CC			

Figura 7. Secuencia de la ORF1.

4.4.2. SECUENCIA DE LA ORF2

En la siguiente figura (Fig. 8) se muestra tanto la secuencia de nucleótidos, como la de aminoácidos, de un fragmento de la región secuenciada que contiene la ORF2.

502	GGC	ATC	CGG	TTC	CAG	GAA	AAA	CTA	TAC	TAT	TTG	AAC	AAG	CAA	TCT	TCT	549
550	TCC	TAT	TAA	GTA	ATA	CTA	CGA	AGG	GGC	AAA	CTG	TTC	AGT	AGT	CTG	GCT	597
598	AGT	CAG	TTC	CTA	GAT	TAT	TCT	GTC	AGA	CAA	AAC	ACT	TTT	CTT	GCT	TTC	645
646	TAC	GCA	TAT	ACA	AGG	GAA	GGC	TCT	CAA	CCC	AGT	CAT	GCT	TTC	AGG	CAA	693
694	AAA	AAA	AAA	AAC	TAT	TTC	GAT	TTC	TCT	CTC	CTT	CAA	TTT	TCC	AGT	AAG	741
742	CTG	ATT	CGA	TAC	AAT	AAA	TGT	CTG	GAC	TAA	CAA	AGC	AAT	TTG	CAA	GCA	789
790	GTT	TTA	GTT	TAC	TCT	TTC	CGC	TTA	GTA	TTT	ATT	GTC	TGA	ATA	AAA	CTT	837
838	TGA	GAA	AGA	CAT	GAG	GAC	ATT	GGA	AAA	TTT	TTC	ATT	GAG	CCA	GAC	AAG	885
886	AAA	GAC	GAT	AAA	ACT	GTT	GTT	TTT	AAG	CTG	ATT	CTC	TCC	CCC	CCG	CAT	933
934	AAT	ATT	TTG	AAT	CGG	TGT	GCG	CGT	GTG	TTT	GTG	AGT	GCG	TGT	GCT	GAA	981
982	TAT	TTT	ATT	TTA	CTG	GTC	TTA	GAA	GAC	GTT	GCG	TGT	TTG	AAG	TTT	TTG	1029
1030	GAA	AAT	TTG	GTG	AAA	TTT	AAG	GTA	AAA	AAA	AAA	GAA	CAC	CAA	GAA	CAA	1077
1076	GAC	TTC	GCA	TAT	AAC	AAT	TAA	CAC	ACA	CAG	ACA	GAT	CAA	TCA	CTT	CTT	1125
1126	ATC	TGT	TGT	GAG	AGA	GAA	AGG	ATT	CAG	AGA	AAA	GTG	TGC	ATG	TCA	GCA	1173
1174	TAG	TTT	TAG	TAC	AAT	ACT	CCT	TTT	TTT	TTT	TGA	ATG	AAA	GTT	GGT	GAA	1221
1222	TTG	CTC	GAA	AGT	AGC	GGT	GCC	GGT	GGT	TCA	AGA	Met	Lys	Val	Gly	Glu	240
241	Leu	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Arg	Ser	Ile	Ile	Ala	Tyr	256
1270	ACT	AAC	GAT	AAA	AAC	GCT	GGT	TTT	GAG	ACA	GAG	ATG	GAT	TCC	ATT	TTA	1317
257	Thr	Asn	Asp	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Glu	Met	Asp	Ser	Ile	Leu	272
1318	CCC	AGT	GAT	GAT	TTA	AAA	CAA	GGC	AGT	CTT	CAT	AGT	AAG	AAC	AGT	CAT	1365
273	Pro	Ser	Asp	Asp	Leu	Lys	Gln	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Lys	Asn	Ser	His	288
1366	GGT	AAT	GAT	GTT	AAA	ATC	GTT	CCA	GAT	GAA	GAC	GAA	GTA	ATA	ACC	CGA	1413
289	Gly	Asn	Asp	Val	Lys	Ile	Val	Pro	Asp	Glu	Asp	Glu	Val	Ile	Thr	Arg	304
1414	AGG	ACT	GTG	GTG	AAA	GGC	CAT	TCC	AAG	CCC	GAG	GAG	TCA	GTT	GTT	ATT	1461
305	Arg	Thr	Val	Val	Lys	Gly	His	Ser	Asn	Pro	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Ile	320
1462	TCA	TGC	GGC	ACA	CCT	GAA	ATT	GTG	GGA	AAT	GGT	TGG	TTT	GGT	GTC	GTT	1509
321	Ser	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Ile	Val	Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Gly	Val	Val	336
1510	TTC	AGA	ACA	AAA	GTG	AAA	GAG	ACT	GGG	GAG	GAT	GTT	GTC	ATT	AAG	AAG	1557
337	Phe	Arg	Thr	Lys	Val	Lys	Glu	Thr	Gly	Glu	Asp	Val	Val	Ile	Lys	Lys	352
1558	GTT	CTA	CAG	GAT	AGA	CGG	TTT	AAG	AAT	AGA	GAA	CTG	GAG	ATC	ATG	AAA	1605
353	Val	Leu	Gln	Asp	Arg	Arg	Phe	Lys	Asn	Arg	Glu	Leu	Glu	Ile	Met	Lys	368
1606	TTG	ATC	AGT	GAT	CCG	AAT	TTG	ATC	GAT	TTG	AAG	TAA	TAT	TTG	CTT	GAA	1653
369	Leu	Ile	Ser	His	Pro	Asn	Leu	Ile	Asp	Leu	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Glu	384
1654	CAA	TCG	GAC	CAA	GAA	CTT	TAT	CTA	AAT	TTG	ATT	GTA	GAT	TAC	ATG	CCC	1701
385	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Leu	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ile	Val	Asp	Tyr	Met	Pro	400
1702	ATG	TCT	CTT	TAT	CAA	CGG	CTC	AAA	GAG	TTC	ATT	TCC	TTG	CAT	CAA	CCA	1749
401	Met	Ser	Leu	Tyr	Gln	Arg	Leu	Lys	Glu	Phe	Ile	Ser	Leu	His	Gln	Pro	416
1750	ATG	GAT	CGT	TAC	GAA	ATC	AAG	ATT	TAC	ATG	TTC	CAA	TTG	TTC	AAA	TCT	1797
417	Met	Asp	Arg	Tyr	Glu	Ile	Lys	Ile	Tyr	Met	Phe	Gln	Leu	Phe	Lys	Ser	432

1798	TTA AAC TAT TTG CAT CAA GTG GTC AAT GTC TGC CAT AGA GAC ATC AAA	1845
433	Leu Asn Tyr Leu His Gln Val Val Asn Val Cys His Arg Asp Ile Lys	448
1846	CCA CAG AAT ATT TTG GTG GAT CCA GAT ACT TTA CTG TTG AAA ATC TGT	1893
449	Pro Gln Asn Ile Leu Val Asp Pro Asp Thr Leu Leu Leu Lys Ile Cys	464
1894	GAT TTG GGG TCT GCT AAA CAG TTG AAA CCA AAC GAG CCC AAT GTG TCA	1941
465	Asp Leu Gly Ser Ala Lys Gln Leu Lys Pro Asn Glu Pro Asn Val Ser	480
1942	TAT ATT TGC TCC CGT TAC TAC AGA GCC CCA GAG TTG ATC TTT GGT GCT	1989
481	Tyr Ile Cys Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala	496
1990	ACC AAT TAC ACA ACA AAG ATT GAT ATT TGG TCT GCA GGT TGT GTT ATG	2037
497	Thr Asn Tyr Thr Thr Lys Ile Asp Ile Trp Ser Ala Gly Cys Val Met	512
2038	GCT GAA CTG CTA TTA GGA CAA CCC ATT TTC CCT GGT GAA TCT AAG ATC	2085
513	Ala Glu Leu Leu Leu Gly Gln Pro Ile Phe Pro Gly Glu Ser Lys Ile	528
2086	GAT CAA TTG GTT GAA ATT ATT AAA GTT TTG GGT ACA CCA ACC AGG GAA	2133
529	Asp Gln Leu Val Glu Ile Ile Lys Val Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu	544
2134	GAG ATC TGT TCC ATG AAT GAA AAC TAC TCC GAA CAT AAG TTC CCT CAG	2181
545	Glu Ile Cys Ser Met Asn Glu Asn Tyr Ser Glu His Lys Phe Pro Gln	560
2182	ATC AGA CCG ATC CCA TTG AAT AGG ATC TTC AAG AAG GAA ACA CAG GAA	2229
561	Ile Arg Pro Ile Pro Leu Asn Arg Ile Phe Lys Lys Glu Thr Gln Glu	576
2230	ACT ATA GAC TTA TTA TAC CAT ATC ATG AAA TAT GAT CCT AAT ATC AGA	2277
577	Thr Ile Asp Leu Leu Tyr His Ile Met Lys Tyr Asp Pro Asn Ile Arg	592
2278	TAC AGC GCT TTA CAA TGT ATG TTC AAT TCG ACG TAC TTC ACT GAT ATC	2325
593	Tyr Ser Ala Leu Gln Cys Met Phe Asn Ser Thr Tyr Phe Thr Asp Ile	608
2326	GTC AGC AAC ACC GGG TCG GAC TCA AAC CTT TCG TTG ATC GAT TCT TTA	2373
609	Val Ser Asn Thr Gly Ser Asp Ser Asn Leu Ser Leu Ile Asp Ser Leu	624
2374	CCA TTG CTA CAT TTT GAG GAA AGT GAA TTA CAA GGG TTG TCA TCT AAC	2421
625	Pro Leu Leu His Phe Glu Glu Ser Glu Leu Gln Gly Leu Ser Ser Asn	640
2422	GAT ATA TAT AGA TTG ACT GGC AAA CTG ATA TAG AAC CGA CAA GAC AAA	2469
641	Asp Ile Tyr Arg Leu Thr Gly Lys Leu Ile *** Asn Arg Gln Asp Lys	656
2470	AGG AAA ACT AAA AAC AAA AAA AAA GAC TAG TTG AGA GAA GGA AAT ATG	2517
657	Arg Lys Thr Lys Asn Lys Lys Lys Asp ***	
2518	CAA ATA CAA ATG CAT TAA TGT AAC GTT CTA CCC AGC ACA TCC AAA GAA	2565
2566	AAT GAA ATT AAT ACA CGA AAT TAA TGT GCA TAC AAA TAG TTA CTT CTC	2613
2614	ATA TGC CTA CTT GTT GCA GGC AAC ACC GTT GTT CAA TGC TAT CCT ACG	2661
2662	CTC CCC CCC TTT GCA TAT CAT ATT TCT CTT CAA TTT TAA AGT TCA TTT	2709
2710	CAA TGT CTT TCG GAA AAC CTA TAG TTC TAT CCT GTC CCT AAT AGT GTT	2757
2758	CAT ATT GGG CAG TGG ATT CTT TTT ATT TAT GTT AAG CAT TCC CTA TTC	2805
2806	CTC ACT AGG AAA AGG GCA CTT GGA CAT CAT AAT TCT TCC TTT TAT AGC	2853
2854	AAT ACT TTT CTT TCT AGC TTC CGT CCT ACC TTT TTC ATA CCG GAT TTC	2901
2902	ACC TTG TCA GTT CAT AAT AAT ATC AAT ACT CAC CTA TTA AGA GCC ACA	2949
2950	TGA CGT GCG TGC GAT TGA GTA CTT AAA AAC TAC TGT TAU CTT TTG TCC	2997
2998	ATC	

Figura 8. Secuencia de la ORF2.

4.5. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS CON LAS BASES DE DATOS

Las secuencias de ambas *ORFs* fueron contrastadas con las bases de datos con el fin de averiguar la existencia de secuencias conocidas homólogas. Para ello se utilizaron tanto los programas *Fast* (Pearson, 1990) del *GCG (The Genetic Computer Group)* (Devereux *et al.*, 1984), a través del *Servei de Bioinformàtica* de la Universidad de Valencia, y los programas *Blast* (Karlin y Altschul, 1990; 1993), a través del servidor de *e-mail Blast@ncbi.nlm.nih.gov*.

La ORF1 presenta homología significativa con piruvato descarboxilasas.

El resultado de la búsqueda de homología con la secuencia que contiene la *ORF1* en las bases de datos muestra que dicha *ORF* codifica una proteína con grandes similitudes con piruvato descarboxilasas. En las siguientes tablas se presentan los datos de homología e identidad obtenidos tras el análisis, utilizando distintos programas, así como el tamaño del fragmento de máxima homología (solapamiento). *BlastX*, compara los productos de traducción conceptuales de las seis pautas de lectura posibles de una secuencia bihebra con las bases de datos de proteínas (Tabla 3). *BlastN*, compara una secuencia nucleotídica con las bases de datos nucleotídicas (Tabla 4). *FastN*, hace una búsqueda, por el método de Pearson y Lipman (1988), de similitudes entre una secuencia determinada y la base de datos, y es más sensible que *Blast* en el caso de búsquedas de similitudes entre secuencias de nucleótidos (Tabla 5); y *TFASTA*, que realiza

una búsqueda, también basada en el método de Pearson y Lipman (1988), de similitudes entre una secuencia peptídica determinada y las bases de datos, haciendo una lectura de las seis posibles pautas de lectura antes de iniciar la comparación (Tabla 6).

Tabla 3. Resultado del análisis *BlastX* de la *ORF1*.

<i>BlastX</i>					
<i>Locus</i>	Tamaño (Aa)	% Ident.	Solapamiento	% Homol.	Solapamiento
1 <i>YDL080c</i>	569	39	238	59	235
2 <i>S. cerevisiae PDC1</i>	563	32	140	56	140
3 <i>K. marxianus PDC1a</i>	564	29	138	55	138
4 <i>K. lactis PDCa</i>	564	28	140	52	140
5 <i>S. cerevisiae PDC5</i>	564	27	138	55	138
6 <i>S. cerevisiae PDC6</i>	564	33	121	56	121
7 <i>S. pombe probable PDC</i>	460	21	195	45	195

Tabla 4. Resultado del análisis *BlastN* de la *ORF1*.

<i>BlastN</i>					
<i>Locus</i>	Tamaño (pb)	% Ident.	Solapamiento	% Homol.	Solapamiento
1 <i>S. cerevisiae PDC5</i>	1.689	68	132	68	132
2 <i>H. uvarum PDC</i>	1.692	68	132	68	132
3 <i>YDL080c</i>	1.830	53	188	53	188

Tabla 5. Resultado de la búsqueda de homologías con la *ORF1*, utilizando el programa *FastN*

<i>FastN</i>			
<i>Locus</i>	Tamaño (pb)	% Identidad	<i>Solapamiento</i>
1 <i>H. uvarum PDC</i>	1.692	55	1.243
2 <i>K. marxianus PDC1a</i>	1.692	53	1.107
3 <i>S. cerevisiae PDC1</i>	1.689	54	863
4 <i>S. cerevisiae PDC6</i>	1.689	51	1.084
5 <i>S. cerevisiae PDC5</i>	1.689	54	1.034

Tabla 6. Resultado del análisis *TFastA* de la *ORF1*.

<i>TFastA</i>			
<i>Locus</i>	Tamaño (Aa.)	% Identidad	<i>Solapamiento</i>
1 <i>K. marxianus PDC1a</i>	564	31	533
2 <i>S. cerevisiae PDC1</i>	563	32	528
3 <i>S. cerevisiae PDC6</i>	563	33	528
4 <i>S. cerevisiae PDC5</i>	563	29	533
5 <i>H. uvarum PDC</i>	564	32	526

El resultado de las búsquedas de secuencias homólogas en las bases de datos muestra una preferencia clara por los alineamientos con secuencias que codifican piruvato descarboxilasas. Podría suceder que dichas homologías se debiesen al hecho de que la *ORF1* parece codificar para una proteína que contiene un centro catalítico conservado de unión al cofactor TPP. Esta región conservada existe tanto en la piruvato descarboxilasa como en otros enzimas que requieren la unión a dicho cofactor para su actividad catalítica, tales como la piruvato oxidasa o la acetolactato sintetasa. Si el grado de homología que se refleja en los alineamientos obtenidos por los distintos

programas se debiese únicamente a la presencia de esta región conservada, se esperaría que apareciesen proteínas TPP-dependientes con porcentajes de similitud similares a los de las secuencias de piruvato descarboxilasas. Los alineamientos producidos por el programa *Blast* son muy significativos a este respecto, ya que sólo se muestran los mejores porcentajes de identidad y similitud de los fragmentos de máxima homología, y no de la secuencia completa, o casi completa, como sucede en el caso de las búsquedas con el programa *Fast*. Los porcentajes obtenidos con el programa *Fast*, aun siendo algo más bajos como cabría esperar, no son muy diferentes de los obtenidos con *Blast*. De los primeros cuarenta alineamientos (descontando todo tipo de versiones distintas de un mismo gen) de *BlastX* (secuencia en aminoácidos), tan sólo hay siete secuencias desconocidas, que se encuentran en las bases de datos especificadas como proteínas similares a piruvato descarboxilasas, y siete secuencias distintas a piruvato descarboxilasas, de las cuales 6 son indol-3-piruvato descarboxilasas. Entre las proteínas con similitud a piruvato descarboxilasas se encuentra la *ORF* YDL080c, recientemente identificada como *THI3*, un regulador positivo del metabolismo de la tiamina en *S. cerevisiae*, que contiene un dominio de unión a TPP conservado.

Se realizó un segundo análisis de *BlastX* con la región *KpnI-KpnI*, de 372 pb, que no contiene la secuencia conservada de unión a TPP, para averiguar si, de este modo, descendían los porcentajes de homología o aparecían nuevas secuencias con características distintas. El resultado se puede observar en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Resultado de la búsqueda de secuencias homólogas con el programa *BlastX* utilizando una región de la *ORF1* de 375 pb que no contiene el posible sitio de unión a TPP.

<i>BlastX (KpnI-KpnI)</i>				
<i>Locus</i>	% Ident.	<i>Solapamiento</i>	% Homol.	<i>Solapamiento</i>
1 <i>S. cerevisiae PDC1</i>	28	73	58	73
2 <i>S. cerevisiae PDC5</i>	28	73	58	73
3 <i>K. marxianus PDC1a</i>	28	73	57	73
4 <i>H. uvarum PDC</i>	30	73	60	73
5 <i>S. cerevisiae PDC6</i>	31	54	62	54
6 <i>K. lactis PDCa</i>	27	73	52	73
7 <i>S. pombe (desconocida)</i>	20	108	45	108

En esta tabla se muestra el resultado de búsqueda en *BlastX*, en la que se hacía una petición de los 30 mejores alineamientos. Sin embargo, sólo aparecieron ocho secuencias, de las cuales siete son piruvato descarboxilasas, incluyendo una secuencia aminoacídica desconocida de *Schizosaccharomyces pombe*, identificada en la base de datos como posible piruvato descarboxilasa. En todos los alineamientos, los porcentajes de homología son similares a los obtenidos con las búsquedas en las que se ha utilizado la *ORF* completa.

Esto sugiere que la *ORF1* codifica una proteína con similitudes significativas con otras piruvato descarboxilasas, por lo que se la denominó *KIPDCB*, nombre con la que se envió a la base de datos EMBL, y puede localizarse con el número de acceso *X87929*.

La ORF2 tiene grandes similitudes con la familia de proteínas GSK-3

Se realizó con la ORF2 el mismo análisis de contraste con las bases de datos que se había llevado a cabo con la ORF1 (KIPDCB). Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 8. Resultado del análisis BlastX de la ORF2.

BlastX					
<i>Locus</i>	Tamaño (Aa.)	% Ident.	<i>Solap.</i>	% Homol.	<i>Solap.</i>
1 <i>MDS1/RIM11/ScGSK-3</i>	370	72	220	85	220
2 <i>MRK1</i>	376	61	225	77	225
3 <i>A. thaliana alfa</i>	406	61	192	79	192
4 <i>A. thaliana gamma</i>	410	62	192	80	192
5 <i>Hum. GSK-3 alfa</i>	484	76	133	87	133
6 <i>R. norvegicus tau</i>	421	74	133	87	133
7 <i>Hum. GSK-3beta</i>	463	74	133	87	133
8 <i>R. norvegicus GSK-3 alfa</i>	484	76	133	87	133
9 <i>R. norvegicus GSK-3 beta</i>	421	76	133	87	133
10 <i>D. melanogaster sgg39</i>	575	73	135	86	135
11 <i>D. discoideum</i>	469	68	132	82	132
12 <i>MCK1</i>	376	60	114	76	114

Tabla 9. Resultado del análisis BlastN de la ORF2.

BlastN					
<i>Locus</i>	Tamaño (pb)	% Ident.	<i>Solap.</i>	% Homol.	<i>Solap.</i>
1 <i>ScGSK-3/MDS1/RIM11</i>	1110	67	636	67	636
2 <i>A. thaliana kappa</i>	1128	68	393	68	393
3 <i>A. thaliana dzeta</i>	1239	62	554	62	544
4 <i>MRK1</i>	1128	63	641	63	405
5 <i>Hum. GSK-3 alfa</i>	1452	68	384	68	389
6 <i>D. discoideum</i>	1407	66	388	66	388
7 <i>R. norvegicus alfa</i>	1452	66	390	66	390
8 <i>D. melanogaster zw3/sgg</i>	2202	71	360	71	360
9 <i>R. norvegicus beta</i>	1263	70	385	70	385
10 <i>R. norvegicus tau</i>	1263	70	385	70	385
11 <i>Hum. GSK-3 beta</i>	1263	30	386	70	386
12 <i>MCK1</i>	1128	63	2993	63	299

Tabla 10. Resultado de la búsqueda de homologías con la *ORF2*, utilizando el programa *FastN*

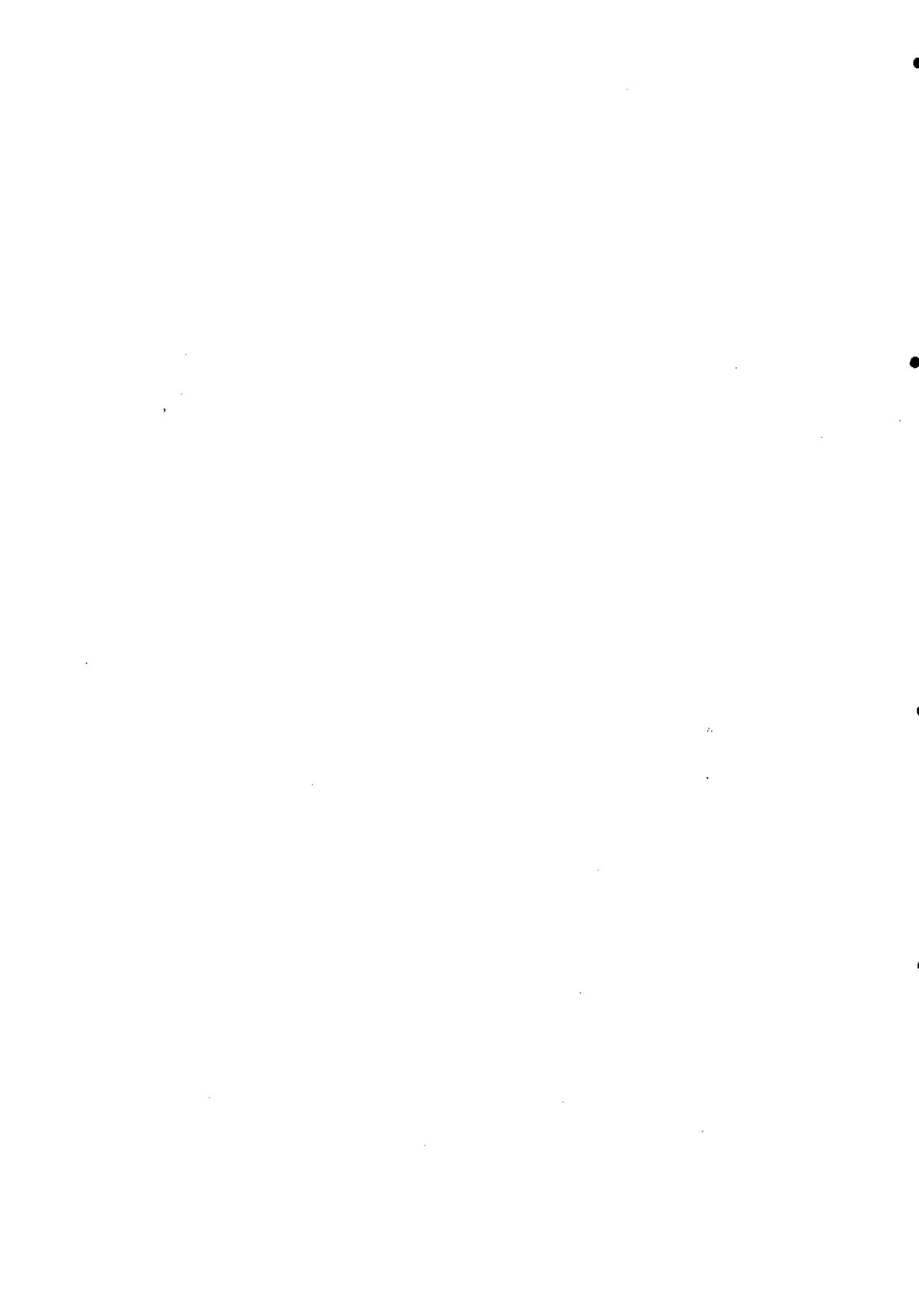
<i>FastN</i>			
<i>Locus</i>	Tamaño (pb)	% Identidad	<i>Solap.</i>
1 <i>MDS1/RIM11/ScGSK-3</i>	1.110	63	972
2 <i>Hum. GSK-3 beta</i>	1.389	62	823
3 <i>D. melanogaster zw3/sgg</i>	2.202	62	856
4 <i>MRK1</i>	1.128	63	834
5 <i>R. norvegicus GSK-3 beta</i>	1.263	63	751
6 <i>R. norvegicus tau</i>	1.263	63	751
7 <i>Hum. GSK-3 beta</i>	1.452	63	751
8 <i>R. norvegicus GSK-3 alfa</i>	1.452	62	758
9 <i>D. discoideum</i>	1.407	62	856
10 <i>A. thaliana AtK-1</i>	1.410	65	186
11 <i>A. thaliana gamma</i>	1.230	62	833
12 <i>MCK1</i>	1.128	57	617

Tabla 11. Resultado del análisis *TFastA* de la *ORF2*.

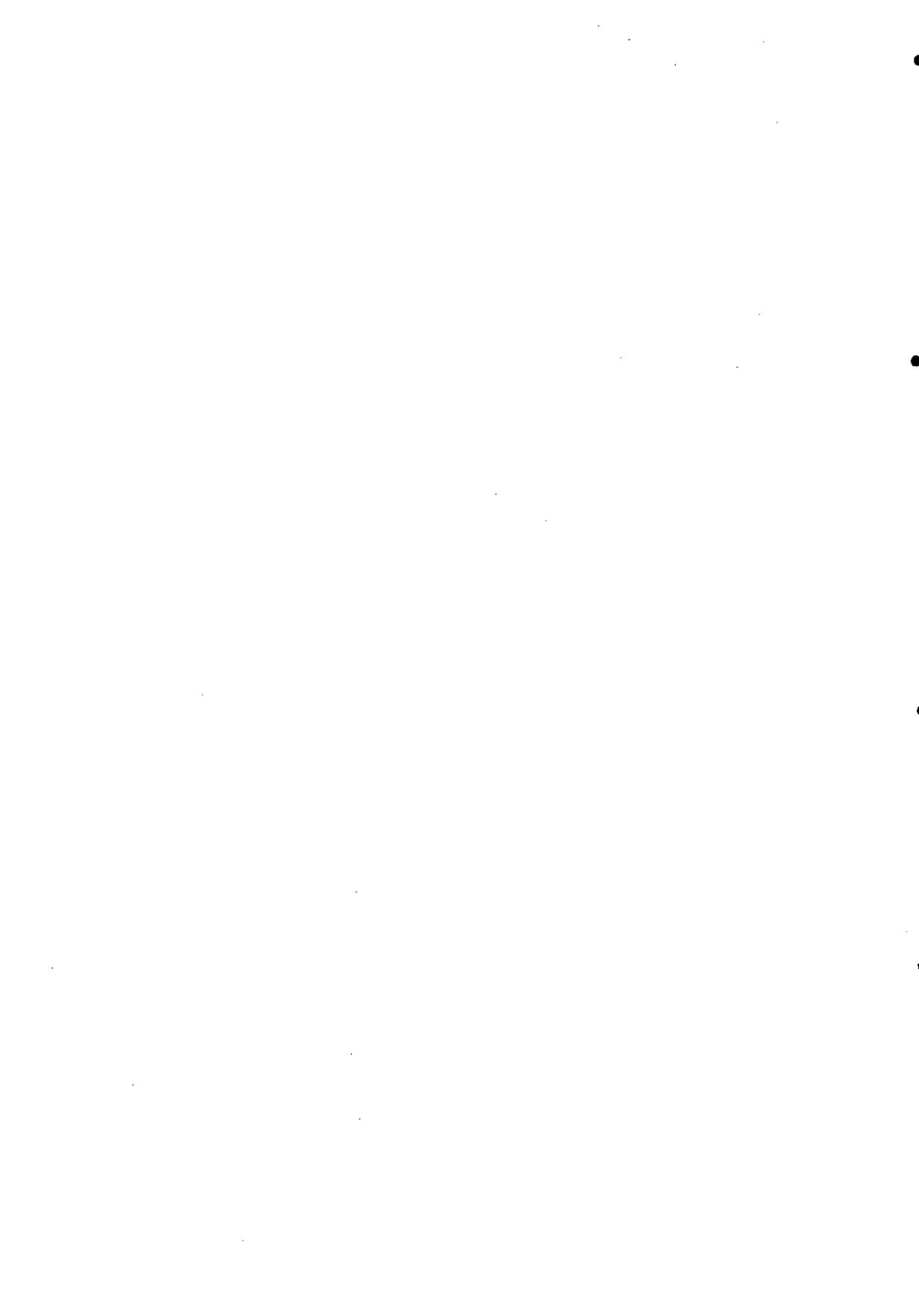
<i>TFastA</i>			
<i>Locus</i>	Tamaño (Aa.)	% Identidad	<i>Solap.</i>
1 <i>MDS1/RIM11/ScGSK-3</i>	370	66	339
2 <i>MRK1</i>	376	57	332
3 <i>S. pombe Skp1</i>	354	48	348
4 <i>R. norvegicus tau</i>	421	50	347
5 <i>Hum. GSK-3 alfa</i>	484	50	347
6 <i>R. norvegicus GSK-3 beta</i>	421	50	347
7 <i>D. discoideum</i>	469	42	389
8 <i>Hum. GSK-3 beta</i>	463	47	396
9 <i>R. norvegicus GSK-3 alfa</i>	484	47	396
10 <i>D. melanogaster sgg10</i>	483	48	371
11 <i>D. melanogaster zw3/sgg</i>	734	48	380
12 <i>MCK1</i>	376	37	324

Como se puede apreciar en las tablas anteriores, el resultado de la búsqueda, sea cual sea el método utilizado, es el mismo. Los porcentajes de homología e identidad mayores se obtienen con el *locus* de *S. cerevisiae* *ScGSK-3/MDS1/RIM11*. Estas homologías, de hasta un 85% en la región catalítica (Hanks *et al.*, 1988), son claramente significativas. El resto de las secuencias de gran homología (no todas representadas en estas tablas) corresponden a Ser/Thr-quinasas de la familia *GSK-3*, hasta el alineamiento con *MCK1*. Se han representado las más significativas, de *S. cerevisiae* (*ScGSK-3/MDS1/RIM11*, *MRK1* y *MCK1*), de mamíferos (*GSK-3 α* y *GSK-3 β* de *Homo sapiens* y *Rattus norvegicus*), de *Drosophila melanogaster* (distintas formas *shaggy*), de *Arabidopsis thaliana* (se han encontrado hasta seis secuencias *shaggy-like*), *Dyctiostelium discoideum* y *Schizosaccharomyces pombe*.

Dada la gran homología de la *ORF2* con las proteínas de la familia *GSK-3*, se la denominó *KIGSK-3*, nombre con el cual fue enviada a la base de datos EMBL, y le ha sido asignado el número de acceso **X87930**.



5. ESTUDIO DEL GEN *KIPDCB*



5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. FUNCIONES RELACIONADAS CON GENES HOMÓLOGOS A KIPDCB

La piruvato descarboxilasa (E.C. 4.1.1.1.) ha sido aislada en levaduras y en semillas de plantas, como en el arroz (Hossian *et al.*, 1996). Es relativamente rara en procariontes, habiendo sido aislada en *Sarcinia ventriculi* (Lowe y Zeikus, 1992) entre otras. Este enzima es una liasa dependiente de pirofosfato de tiamina (TPP), un cofactor termoestable, esencial para una serie de enzimas implicados en el metabolismo de los carbohidratos, como la piruvato descarboxilasa (E.C. 4.1.1.1.), piruvato oxidasa (EC 1.2.3.3.), transcetolasa (EC 2.2.1.1.), o componentes descarboxilantes que forman parte de complejos multienzimáticos, como la piruvato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa. La reacción de descarboxilación se realiza de un modo irreversible en condiciones fisiológicas a pH 6, y requiere la unión con el cofactor, TPP, e iones Mg^{+2} (Eppendorfer *et al.*, 1993; König *et al.*, 1993; Vaccaro *et al.*, 1995). La piruvato descarboxilasa interviene también en la formación de los alcoholes aromáticos, los componentes volátiles más importantes de las bebidas alcohólicas (Derrick y Large, 1993).

La estructura de la piruvato descarboxilasa de *S. cerevisiae* ha sido materia de controversia. Diferentes autores sugirieron en un principio una estructura dimérica o tetramérica compuesta por subunidades idénticas o muy similares. La existencia de dos subunidades distintas no puede ser

explicada por la generación de un posible transcrito de menor tamaño, observado por Kellerman y colaboradores (Kellermann *et al.*, 1986). Este transcrito finalizaría a 46 pb en dirección 5' del codón de terminación y podría dar lugar a la subunidad de menor tamaño. Sin embargo, este segundo transcrito no ha sido encontrado en otras líneas de *S. cerevisiae*. Según algunos autores, la piruvato descarboxilasa aislada de líneas genéticamente definidas y deficientes en varias proteasas, es un tetrámero compuesto por subunidades idénticas de 62 KDa cada una (Ullrich y Leube, 1986). Estudios posteriores indican que en *S. cerevisiae* hay, al menos, dos isoenzimas denominadas α_4 -PDC y $\alpha_2\beta_2$ -PDC (Vaccaro *et al.*, 1995) y otros, sin embargo, que se trata de un homotetrámero (Killenberg-Jabs *et al.*, 1997).

5.1.2. LA PIRUVATO DESCARBOXILASA DE *S. cerevisiae*.

Tres genes estructurales codifican proteínas con actividad piruvato descarboxilasa en S. cerevisiae.

En *S. cerevisiae* existen tres genes que codifican para la piruvato descarboxilasa: *PDC1*, *PDC5* y *PDC6*. Schmitt y Zimmerman aislaron mutantes de *S. cerevisiae* que mostraban una actividad muy reducida, o casi indetectable, de piruvato descarboxilasa en extractos crudos y que eran incapaces de fermentar glucosa Zimmerman (Schmitt y Zimmerman, 1982). Estos mutantes se agruparon en dos grupos de complementación distintos. La mutación *pdcl* era semidominante y uno de los mutantes, *pdcl-8*, era incapaz de crecer en glucosa como única fuente de carbono, y tampoco

presentaba actividad piruvato descarboxilasa detectable *in vitro*. La mutación *pdc2* era recesiva y los mutantes presentaban una actividad piruvato descarboxilasa reducida. Los dobles mutantes *pdcl pdc2* no mostraban ninguna actividad piruvato descarboxilasa y eran incapaces de fermentar en glucosa. Estos fenotipos sugirieron que *PDC1* era el gen estructural para la piruvato descarboxilasa y que *PDC2* estaba involucrado en la regulación de la síntesis o de la actividad del enzima. Posteriormente, se identificaron otros dos genes estructurales, *PDC5* (Hohmann y Cederberg, 1990; Seeboth *et al.*, 1990) y *PDC6* (Hohmann, 1991); y dos genes reguladores no bien caracterizados, *PDC3* (Wright, 1989) y *PDC4* (Tesis doctoral de Seehaus, 1986).

El gen *PDC1*.

El gen *PDC1* (X04675) fue clonado por complementación de la mutación *pdcl-8*. En multicopia, este gen produce un incremento en los niveles de actividad piruvato descarboxilasa y los análisis de *Northern blot* mostraban que este clon hibridaba con mRNA de unas 2000 bases. (Schmitt *et al.*, 1983).

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen mostró que, al igual que en otros genes de elevada expresión, tales como *ADHI* u otros genes que codifican para enzimas glucolíticos, *PDC1* presenta un *CBI* (*Codon Bias Index*) muy elevado, de 0,95. Este índice proporciona una medida del uso preferente de codones, que se corresponde con las especies más abundantes de tRNA. La secuencia nucleotídica de este gen predice una proteína de

563 Aa., con un peso molecular de 62 KDa. En la región 5' de *PDC1* se han encontrado características estructurales, tales como una purina en posición -3 y una timina en posición +6 que suelen encontrarse en otros genes glucolíticos que son de elevada expresión en levaduras. También presenta dos posibles cajas TATA, en la posición -143 (TATATAAA) y otra, menos adaptada al consenso, en la posición -56 (AATTATTAT) (Kellerman *et al.*, 1986).

En el promotor se han encontrado secuencias que determinan la inducción de la transcripción de *PDC1*, de 4 a 30 veces, durante el crecimiento en fuentes de carbono fermentables. Una de ellas es la denominada caja RPG o UAS_{RPG}. Es una secuencia de 13 nucleótidos que se encontró inicialmente en la región 5' de 16 genes ribosómicos (^A/_G^A/_CACCCANNCA^T/_C^T/_C) (Buchman *et al.*, 1988). Generalmente estas secuencias RPG se organizan en tándem, y son el sitio de unión de la proteína multifuncional, Rap1p (TUF) (Moehle y Hinnebusch, 1991; Shore, 1994). Algunos genes que codifican para enzimas que se inducen en presencia de fuentes de carbono fermentables presentan sitios de activación RPG que median la respuesta a fuente de carbono, como *ENO1* (Cohen *et al.*, 1987), *ENO2* (Cohen *et al.*, 1986), *FBP1* (Mercado y Gancedo, 1992), *PCK1* (Mercado y Gancedo, 1992), *PGK1* (Ogden *et al.*, 1986) o *PYK1* (Nishizawa *et al.*, 1989). En el promotor de *PDC1* se ha encontrado una caja RPG, que se encuentra entre las posiciones -636 y -622 pb, respecto del ATG (Butler *et al.*, 1990). La delección de esta secuencia reduce drásticamente la expresión de *PDC1*, y parece ser la responsable de

estimular la expresión tanto en glucosa como en glicerol. Los ensayos de unión a proteínas reguladoras realizados por Butler y colaboradores indican que una proteína se une a la región 5' de *PDC1* que contiene la caja RPG (Butler *et al.*, 1990).

Sin embargo, los máximos niveles de inducción en glucosa parecen depender de la existencia de otra señal, posiblemente repeticiones de la secuencia CTTCC. Este pentámero (o el heptámero GCTTCCA) está implicado en la regulación de genes glucolíticos (Buchman *et al.*, 1988). Mutaciones de esta secuencia en los promotores de los genes *ENO2* y *PYK1*, provocan una reducción de su expresión. Estas secuencias parecen ser posibles sitios de unión a Gcr1p, también llamado GPE (de *GRF/Rap1p potentiador element*), proteína que parece aumentar el efecto de Rap1p sobre la transcripción. En *PDC1* hay una secuencia CTTCC que se solapa con la caja RPG, localizada a -625 pb del ATG; una segunda (que concuerda con el heptámero) se encuentra a -608 pb, y hay otros dos pentámeros más que se solapan a -585 y -581 pb. La pérdida de esta región también provoca una reducción significativa de la expresión de *PDC1* (Butler *et al.*, 1990).

La región entre -631 y -463, que está implicada en la regulación por glucosa contiene, además de la caja RPG y las repeticiones CTTCC, tres repeticiones AA^A/T₇RGCATA localizadas en las posiciones -515, -527 y -560 (Kellermann y Hollenberg, 1988).

La región entre -463 y -286 ha sido implicada en la regulación por etanol. Contiene una cuarta repetición AA^A/T₇RGCATA en -560 (Kellermann y Hollenberg, 1988) y también tiene un sitio de unión de la proteína Abf1p,

un regulador transcripcional de varios genes como, *HOP1* (Gailus-Durner *et al.*, 1996), *QCR8* (de Winde *et al.*, 1993), *COX6* (Trawck *et al.*, 1992) o el gen que codifica para la proteína ribosomal S33 (Hoekstra *et al.*, 1992).

El gen *PDC5*

Inicialmente se consideró que el único gen estructural que codificaba la actividad piruvato descarboxilasa en *S. cerevisiae* era *PDC1*. Sorprendentemente, Schaaff y colaboradores (Schaaff *et al.*, 1989) encontraron que los mutantes por delección del gen *PDC1* (*pdcl*⁰) presentaban un fenotipo distinto a los mutantes puntuales (*pdcl*). Estos mutantes eran capaces de fermentar la glucosa y, además, en los estudios de *Northern blot* aparecía un transcrito del mismo tamaño que el generado por *PDC1*. Estudios previos de *Southern blot* utilizando el gen *PDC1* como sonda, mostraban la existencia de dos *loci* distintos de hibridación, el propio *PDC1* y una segunda secuencia que fue inicialmente considerada como un pseudogen (Schmitt *et al.*, 1983) y que, finalmente, resultó ser *PDC5* (Hohmann y Cederberg, 1990; Seeboth *et al.*, 1990).

El gen *PDC5* (X15668) presenta un *CBI* (*codon bias index*) bastante alto (0,84), pero no tanto como *PDC1* (0,95) o los enzimas glucolíticos de elevada expresión, cuyos *CBI* suelen ser superiores a 0,9. Este gen restablece hasta un 70 - 80% de la actividad piruvato descarboxilasa, capacitando a la línea *pdcl*⁰ para crecer en glucosa incluso cuando la respiración es bloqueada con antimicina A.

La secuencia nucleotídica de este gen predice una proteína de 563 Aa., al igual que *PDC1*, y unos 62,5 KDa, con un 88% de identidad, y un 92% de homología, con la secuencia de *PDC1*. La región 5' de la secuencia nucleotídica presenta una posible caja TATA en la posición -125 (TATATAA), pero no presenta homologías con la región no codificadora de *PDC1*. De hecho, no se ha encontrado ninguna caja RPG, y sólo hay una secuencia CTTCC en la posición -790, y algunos elementos similares a esta secuencia alrededor de la posición -550 (Hohmann y Cederberg, 1990).

A pesar de no haberse encontrado señales de regulación similares a las de *PDC1*, la expresión de *PDC5*, medida en el mutante *pdcl*⁰, parece ser básicamente la misma que la de *PDC1*, con la excepción de que los niveles basales de expresión en condiciones no inductivas (glicerol más etanol) parecen ser menores que la que muestra *PDC1*. La delección de *PDC5* no produce reducción específica de la actividad piruvato descarboxilasa, es más, las líneas salvajes transformadas con plásmidos multicopia con el gen *PDC5* no muestran un incremento de actividad piruvato carboxilasa, al contrario de lo que ocurre con *PDC1* (Hohmann y Cederberg, 1990).

El drástico efecto de la mutación *pdcl-8* sobre la expresión de *PDC5* es mucho más pronunciado en líneas *pdcl-8/pdcl*⁰ que en líneas *pdcl-8/PDC1* (Tabla 12). A nivel transcripcional, en líneas *PDC1* salvajes, el gen *PDC5* apenas se expresa. Sin embargo, en líneas *pdcl*⁰, el gen se transcribe casi en la misma proporción en la que lo hace *PDC1* en líneas salvajes. Curiosamente, el promotor de *PDC1* parece ser mucho más activo en los mutantes *pdcl*⁰, ya que se ha encontrado una mayor cantidad de transcrito

truncado en dichos mutantes (Schaaf *et al.*, 1989), dato corroborado por los ensayos de actividad β -galactosidasa de la fusión del promotor de *PDC1* con el gen *lacZ* de *E. coli* en líneas salvajes y líneas mutantes. Por lo tanto, además de una regulación debida a la inducción por determinados metabolitos y/o NADH, parece existir otro control de autorregulación entre ambos genes de mecanismo desconocido (Seeboth *et al.*, 1990).

Tabla 12. Porcentaje de actividad piruvato descarboxilasa en distintos mutantes de *S. cerevisiae* de distintas líneas diploides y haploides.

Líneas	actividad PDC
<i>PDC1/PDC1</i>	100 %
<i>PDC1/pdc1⁰</i>	80 %
<i>PDC1/pdc1-8</i>	30 %
<i>pdc1⁰</i>	45 %
<i>pdc1-8</i>	>1 %

El gen *PDC6*

Los análisis de *Southern blot* de DNA genómico con un nivel de estringencia muy bajo y utilizando el gen *PDC1* como sonda, mostraron que, al menos, un gen adicional presentaba homologías significativas con *PDC1* y *PDC5* (Hohmann, 1991). Aunque en un principio el autor interpretó que se podría corresponder con el gen *ILV2*, que codifica para la acetolactato sintasa, o bien con otros genes no identificados que pudiesen codificar para enzimas dependientes de TPP, resultados posteriores llevaron a la clonación e identificación de un tercer gen, *PDC6* (X55905) (Hohmann, 1991). La

secuencia nucleotídica de este gen demostró la gran homología que comparte con los otros dos genes estructurales *PDC1* y *PDC5*. La secuencia predice también una proteína de 563 Aa., y los porcentajes de homología e identidad se reflejan en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de identidades entre las secuencias aminoácídicas y nucleotídicas de los tres genes estructurales de la piruvato descarboxilasa de *S. cerevisiae*.

Genes comparados	% Identidad	
	<i>aminoácidos</i>	<i>nucleótidos</i>
<i>PDC1-PDC5</i>	88	92
<i>PDC1-PDC6</i>	88	74
<i>PDC5-PDC6</i>	80	73

A pesar de estos porcentajes de identidad tan elevados, *PDC6* presenta un *CBI* muy bajo (0,29), a diferencia de lo que ocurre con los genes *PDC1* y *PDC5*. Este valor lo clasifica claramente dentro del grupo de genes de muy baja expresión.

La delección de este gen no causa ningún efecto en la actividad piruvato descarboxilasa, ni en las líneas salvajes, ni en ninguno de los mutantes, dobles o simples, de *PDC1* o *PDC5*. El análisis de los mutantes *pdc1⁰ pdc5⁰*, que contienen tan sólo el gen *PDC6* intacto, demuestra que no contribuye a la actividad piruvato descarboxilasa, ya que dicha actividad es indetectable en estos mutantes. Tampoco se ha detectado mRNA de *PDC6* en estos mutantes creciendo en glucosa, pero, sorprendentemente, parece haber una débil expresión en células creciendo en etanol (Hohmann, 1991).

Inicialmente, la ausencia de actividad piruvato descarboxilasa en líneas *pdcl*⁰ *pdcs*⁰ se atribuyó a la ausencia en *PDC6* de una cisteína en posición 222 que parecía importante en la actividad catalítica del enzima. Tanto en *PDC1*, como en *PDC5*, existen dos cisteínas conservadas Cys221 y Cys222. Se ha sugerido que estas cisteínas juegan un papel importante en la actividad piruvato descarboxilasa (Baburina *et al.*, 1994). Sin embargo, *PDC6* puede funcionar como un gen estructural para la actividad piruvato descarboxilasa cuando se fusiona con el fuerte promotor de *PDC1*. Dicha fusión no parece ser suficiente para sustituir completamente al gen *PDC1*, ya que sólo se alcanza un 50% de actividad en líneas *pdcs*⁰. Esto sugiere que pueda haber secuencias en la región codificadora del gen que puedan intervenir en la regulación o bien, que como resultado de la construcción, se sintetice un mensajero menos estable (Hohmann, 1991).

Por otro lado, la autorregulación observada en la expresión de *PDC1* y *PDC5*, no parece funcionar en la fusión *PDC1-PDC6*, ya que la expresión de *PDC6* no puede sustituir totalmente la actividad piruvato descarboxilasa de la línea salvaje de *PDC1* y, al mismo tiempo, la proteína híbrida no impide la expresión de *PDC5* como lo haría Pdc1p, ya que *PDC5* sigue expresándose, aunque en menor medida que en las líneas *pdcl*⁰ (Hohmann, 1991).

Características de actividad y crecimiento de los distintos mutantes piruvato descarboxilasa de S. cerevisiae

Hohman (Hohman, 1991) agrupó los distintos mutantes de los genes estructurales de la piruvato descarboxilasa de acuerdo con su actividad y características de crecimiento.

Grupo I

Lo componen las líneas salvajes, o todos aquellos mutantes que contienen todavía el gen *PDC1* salvaje: *PDC1/PDC5/PDC6*; *PDC1/pdc5⁰/PDC6*; *PDC1/PDC5/pdc6⁰*; *PDC1/pdc5⁰/pdc6⁰*.

Estas líneas presentan una actividad piruvato descarboxilasa máxima y su crecimiento es igual al de las líneas salvajes en todas las fuentes de carbono estudiadas, con la particularidad de que los mutantes *pdc5⁰* y *pdc5⁰ pdc6⁰*, parecen tener mayor actividad piruvato descarboxilasa que la línea salvaje en etanol.

Grupo II

Este grupo está formado por los mutantes *pdc1⁰* y *pdc1⁰ pdc6⁰*, que todavía conservan una copia salvaje del gen *PDC5*.

En estos mutantes, la deficiencia de *PDC1* es parcialmente compensada por *PDC5* en glucosa, con un 75% de actividad piruvato descarboxilasa. Sin embargo, sólo presentan un 10% de actividad respecto a

la línea salvaje en etanol. Mientras que el crecimiento en glucosa de estas líneas no se ve apenas reducido, cuando se añade un inhibidor de la respiración, como la antimicina A, estos mutantes presentan en las curvas de crecimiento periodos de latencia más prolongados y el tiempo de duplicación generacional es dos veces mayor que el de las líneas salvajes estudiadas en las mismas condiciones. Presentan, además, un crecimiento algo más lento en galactosa. La mutación *pdc6⁰* no parece tener efecto, ni sobre la actividad enzimática, ni sobre el crecimiento de estos mutantes.

Grupo III

Está formado por los mutantes que no presentan actividad piruvato descarboxilasa detectable, ni en glucosa, ni en etanol: *pdc1⁰ pdc5⁰* y *pdc1⁰ pdc5⁰ pdc6⁰*.

Estos mutantes, como cabría esperar, crecen muy lentamente en glucosa, debido a la represión catabólica de la respiración en *S. cerevisiae*, y no son capaces de crecer en glucosa cuando se bloquea la respiración con antimicina A. Curiosamente, estos dos mutantes también crecen muy lentamente en galactosa, azúcar que no induce una total represión catabólica de la respiración por lo que, *a priori*, deberían crecer igual que la línea salvaje en esta fuente de carbono. Se ha descrito un crecimiento de estos mutantes más lento en etanol (Hohmann, 1991), sin embargo, este dato contrasta con los resultados obtenidos por Flikweert y colaboradores (Flikweert *et al.*, 1996). Estos autores observan que en medio completo, con etanol como única fuente de carbono, el crecimiento de las líneas que portan

uno, dos o tres genes interrumpidos, no difiere significativamente del de la línea salvaje, dato concordante con el hecho de que la piruvato descarboxilasa no interviene en el metabolismo del etanol.

Se ha observado que los mutantes en los genes *PDC1* y *PDC5*, que carecen de actividad piruvato descarboxilasa, no crecen, o lo hacen muy lentamente, en medios sintéticos con glucosa como única fuente de carbono tanto en *batch* como en cultivos en quimiostato controlando la entrada de glucosa para mantenerla a baja concentración. Si la represión por glucosa de la respiración fuese el único factor que afectase al crecimiento de los mutantes que carecen de actividad piruvato descarboxilasa, en estas condiciones de cultivo deberían crecer. Sin embargo, el crecimiento sólo se produce si se adiciona una fuente de dos carbonos, como el acetato o el etanol (Flikweert *et al.*, 1996).

Estos autores sugieren que esta deficiencia puede ser debida a que en estas líneas, la única reacción que puede conducir a la formación de acetil-CoA desde piruvato, es la descarboxilación oxidativa que cataliza la piruvato deshidrogenasa en el interior de la mitocondria. El acetil-CoA es un precursor de la síntesis de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, lípidos y algunos aminoácidos. La síntesis de lípidos se realiza en el citoplasma, por lo que sería necesario el transporte de acetil-CoA desde el interior de la mitocondria al citoplasma. En muchos sistemas biológicos esta barrera puede ser salvada por el citrato, que transporta grupos acetilo a través de la membrana interna mitocondrial, mediante su posterior escisión, por la ATP-citrato liasa, en oxalacetato y acetil-CoA; sin

embargo, este enzima está ausente en *S. cerevisiae* (Ratledge y Evans, 1989).

***PDC2*, gen necesario para la máxima actividad piruvato descarboxilasa.**

El gen *PDC2* fue identificado en una búsqueda de genes supresores de mutaciones que afectaban a la actividad piruvato descarboxilasa en *S. cerevisiae*. La secuencia nucleotídica predice una proteína de 925 Aa., mucho mayor que las de los otros genes *PDC*, y no presenta homología con ninguno de los tres genes estructurales *PDC1*, *PDC5* y *PDC6*. En la región 5' se encuentran dos posibles cajas TATA en -142 y -119. No se han encontrado otras características significativas. Al contrastar la secuencia de aminoácidos con las bases de datos, tampoco aparecen características que puedan relacionar esta proteína con otras conocidas. Únicamente se ha visto que los mayores porcentajes de homología se obtienen con proteínas ricas en serina y asparragina, entre las que se encuentran diversos factores de regulación (Hohmann, 1993).

Aunque se han descrito una serie de reguladores generales de la transcripción de enzimas glucolíticos, el producto del gen *PDC2* parece regular específicamente a la piruvato descarboxilasa. La delección del gen *PDC2* conduce a una fuerte reducción de la expresión de *PDC1* y, en los mutantes *pdcl*⁰, no hay expresión detectable de *PDC5*. El producto de este gen no parece estar involucrado en la inducción por glucosa, ya que la fusión *P_{PDC1}-lacZ* muestra que el promotor de *PDC1* todavía se ve inducido en

dicha fuente de carbono en mutantes *pdc2⁰* (Hohmann, 1993). El mecanismo de regulación por *PDC2* y la autorregulación que parece existir entre los productos de *PDC1* y *PDC5* no se conoce. *Pdc2p* podría ser uno entre varios factores que activen la expresión de *PDC1*, y el único factor, o parte del único complejo, de activación de *PDC5*. También podría tomar parte en los procesos de autorregulación entre *PDC1* y *PDC5*, ya que la actividad piruvato descarboxilasa en sí misma no parece ser la señal determinante de esta autorregulación, dado que los mutantes *pdcl-8* acumulan piruvato de igual modo que lo hacen los mutantes *pdcl⁰* y, sin embargo, no consiguen activar el promotor de *PDC5*. También se desconoce si *Pdc2p* es capaz de unirse a DNA o si interacciona con proteínas que lo hacen (Hohmann, 1993).

5.1.3. LA PIRUVATO DESCARBOXILASA DE *K. lactis*.

En *K. lactis* se ha encontrado un gen que codifica para la actividad piruvato descarboxilasa *KIPDCA* (X85968), que es capaz de complementar la incapacidad de crecer en glucosa en presencia de antimicina A de la mutación *rag6* (Bianchi *et al.*, 1996).

La secuencia nucleotídica de este gen presenta grandes homologías con los genes *PDC1*, *PDC5* y *PDC6* de *S. cerevisiae* y otros genes estructurales que codifican la actividad piruvato descarboxilasa en otras levaduras. El alineamiento con las secuencias aminoácidas de estos genes muestra un alto grado de conservación, sobre todo en el sitio de unión a TPP (GSDS-X₂₃-NN) que comparten todas las piruvato descarboxilasas

identificadas hasta el momento (Hawkins *et al.*, 1989). Al igual que los genes *PDC1* y *PDC5*, la desviación en el uso de codones sinónimos, en este caso calculada mediante el índice CAI (*Codon Adaptation Index*), es alta ($PDC1_{CAI}=0,83$; $PDC5_{CAI}=0,73$; $KIPDCA_{CAI}=0,83$).

En la región 5' de la secuencia codificadora se han encontrado dos posibles cajas TATA en las posiciones -119 y -178. Se han identificado, además, varias secuencias características del promotor de *PDC1*. Hay una posible caja RPG, con tan sólo una diferencia de la secuencia consenso en posición -87, y otra, con dos diferencias, en posición -625. También se han encontrado varios sitios CTTCC de unión a Rap1p en las posiciones -593, -598, -768, -913 y -1172. Otra similitud se observa en el hecho de que se han encontrado seis secuencias repetitivas de nueve nucleótidos (${}^T/GAAATGA^G/T$) que se encuentran en una localización similar a las secuencias repetidas $AA^A/T^T/RGCATA$ de *S. cerevisiae* (Tesis Doctoral de S. Menart, 1993).

La expresión de *KIPDCA* es inducida por glucosa. Esta inducción parece mucho mayor que en *S. cerevisiae* ya que, tras el crecimiento en YP o en etanol, la adición de sólo un 2% de glucosa provoca un incremento en la transcripción de *KIPDCA* de unas 50 veces. Esta inducción es menor en medios sintéticos, alcanzando sólo un incremento de 10 veces tras la adición de un 2% de glucosa, y sólo de 5 veces tras la adición de 2% de glucosa más 3% de etanol.

La transcripción de *KIPDCA* se ve reprimida cuando se bloquean los primeros pasos de la glucólisis, ya que se ve afectada por mutaciones *rag1*

(transportador de azúcares de baja afinidad), *rag5* (hexoquinasa) y *rag2* (fosfoglucosa isomerasa). Esto indica que la expresión de este gen depende, al igual que sucede en *S. cerevisiae*, de ciertas señales glucolíticas. La expresión de *KIPDCA*, sin embargo, no es dependiente del transportador de glucosa de alta afinidad, lo que sugiere que dicha expresión es dependiente de un flujo glucolítico elevado.

Los mutantes *KlfdcA*⁰ no pueden crecer en glucosa en presencia de antimicina A e, independientemente de la fuente de carbono utilizada, no muestran producción de etanol ni actividad piruvato descarboxilasa detectable. Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, los mutantes *KlfdcA*⁰, y los mutantes *rag3* (regulador de *KIPDCA*, homólogo a *PDC2*), crecen en glucosa a la misma tasa que la línea salvaje y pueden crecer en medio sintético y a elevadas concentraciones de glucosa (Bianchi *et al.*, 1996).

En *K. lactis*, por lo tanto, la interrupción de la ruta fermentativa no afecta a la capacidad de crecimiento de la levadura en glucosa en condiciones aeróbicas, lo que demuestra que el flujo de la glucólisis y la generación de piruvato no debe exceder la capacidad del ciclo de los ácidos tricarbónicos, como parece ocurrir en *S. cerevisiae*. Además, en esta levadura debe haber un mecanismo alternativo, ausente en *S. cerevisie*, mediante el cual se genere el acetyl-CoA citoplasmático necesario en las reacciones de biosíntesis.

5.1.4. *THI3*, UN REGULADOR DE ELEVADA HOMOLOGÍA CON PIRUVATO DESCARBOXILASAS.

En *S. cerevisiae* los enzimas que intervienen en la ruta de biosíntesis de tiamina se reprimen a nivel transcripcional cuando se acumulan intracelularmente altos niveles de TPP (Kawasaki *et al.*, 1990). El gen *THI80* codifica para el enzima tiamina pirofosfoquinasa (EC 2.7.6.2.) que cataliza la fosforilación directa de la tiamina a partir de ATP para formar TPP (Nosaka *et al.*, 1993). La regulación de este gen tiene lugar principalmente a nivel transcripcional, mediante dos factores reguladores positivos codificados por los genes *THI2* y *THI3* (Nishimura *et al.*, 1992a; Nishimura *et al.*, 1992b).

Estos genes reguladores afectan también a la expresión de los enzimas que participan en la biosíntesis de tiamina, y a la fosfatasa ácida reprimible por tiamina. Además *THI3*, pero no *THI2*, controla el sistema de transporte de tiamina al interior de la célula (Nishimura *et al.*, 1992b).

El gen *THI3* muestra una elevada homología con las piruvato descarboxilasas. De hecho, la secuencia de este gen no estaba disponible, como tal, en las bases de datos. En la última búsqueda realizada a través de MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*), con motivo de la redacción de esta memoria (Mayo de 1997), encontramos que una de las *ORFs* de función desconocida obtenida en el Proyecto de Secuenciación del Genoma de Levadura, YDL080c, y que aparecía como una piruvato descarboxilasa putativa, había sido identificada como *THI3*. En el siguiente

dendograma se muestra la relación filogenética entre *THI3* y distintos genes que codifican para piruvato descarboxilasas en levaduras.

Dendrogram for family 01335:

PILEUP of: @Infam_01335.Codes March 17, 1997 02:19

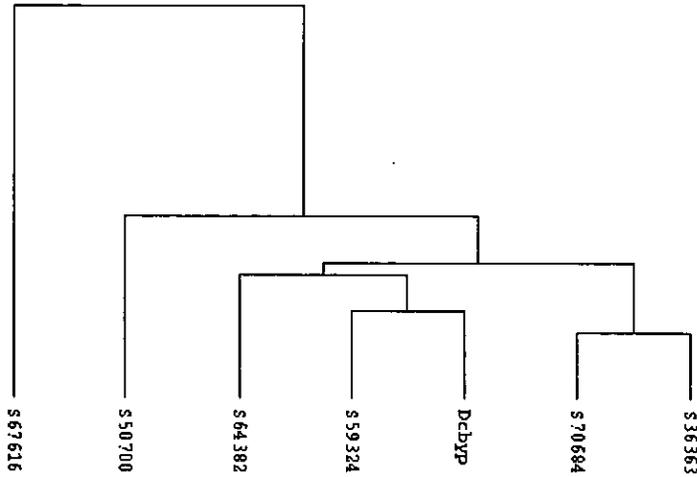


Figura 9. Dendograma de la familia 01335 según el alineamiento realizado por MIPS.

- DCBYP piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) 1 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- S36363 piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) (*Kluyveromyces marxianus*)
- S59324 piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) 5 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- S50700 piruvato descarboxilasa. (*Hanseniaspora uvarum*)
- S64382 piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) 6 (*Saccharomyces cerevisiae*)
- S67616 probable proteína de membrana YDL080c (*Saccharomyces cerevisiae*)
- S70684 piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) (*Kluyveromyces marxianus var. lactis*)

5.2. RESULTADOS

5.2.1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN CODIFICADORA

En la figura 10 se muestra el análisis comparativo, mediante el programa Clustal V (Higgins *et al.*, 1992), de la proteína deducida a partir de la secuencia nucleotídica de *KIPDCB* con otras proteínas piruvato descarboxilasas de distintas levaduras. El alineamiento refleja que la homología entre las distintas proteínas es similar a lo largo de toda la secuencia. El sitio teórico de unión a TPP [GSDS-(X₂₃)-NN], que se encuentra conservado en todos los enzimas piruvato descarboxilasas identificados hasta el momento (Hawkins *et al.*, 1989), está también presente en la secuencia aminoacídica deducida a partir de la *ORF* de *KIPDCB*.

KIPDCB	METKTLIHSGAAKEMSYTERYNVAPLIPPEYLFHRLFQLNCRTVFGVA-
YDL080c	MNS-----SYTQRYALPKCIAISDYLFHRLNQLNIHTIFGLSG
KmPDC1A	MSE-----ITLGRYLFRERLKQVEVQTIIFGLPG
ScPDC1	MSE-----ITLGKYLFRERLSQVNCNTVFGLP
SCPDC6	MSE-----ITLGKYLFRERLKQVNVNTIIFGLPG
SCPDC5	MSE-----ITLGKYLFRERLSQVNCNTVFGLP
HuPDC	MSE-----ITLGRYVFERIKQVGVNTIIFGLPG
KIPDCA	MSE-----ITLGRYLFRERLKQVEVQTIIFGLPG
	* . * . * . * . * . * . * . *

	<u>Glu51</u>	<u>Cys69</u>
KIPDCB	NYSTAKLYQAI AASGIQWIQTINQLNTSFAVDAYGRAIGVSCYVTS-ESA	
YDL080c	EFSMPLLDKLYNIPNLRWAGNSNELNAAYAADGYSRLKGLGCLITTFGVG	
KmPDC1A	DFNLSLLDKIYEVPGMRWAGNANELNAAYAADGYARLKGMACVITTFGVG	
ScPDC1	DFNLSLLNKLYEVKGMRWAGNANELNAAYAADGYARIKGMSCIIITTFGVG	
SCPDC6	DFNLSLLDKIYEV DGLRWAGNANELNAAYAADGYARIKGLSVLVITTFGVG	
SCPDC5	DFNLSLLNKLYEVKGMRWAGNANELNAAYAADGYARIKGMSCIIITTFGVG	
HuPDC	DFNLSLLDKIYEVEGLRWAASLNELNAAYAADGYSRIKGLGVIIITTFGVG	
KIPDCA	DFNLSLLDNIYEVPGMRWAGNANELNAAYAADGYARLKGMSCIIITTFGVG	
	... * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	

K1PDCB ILLHELLPQLIASLDTTKIVNSRPVTIPNMI PRVEPQPVTF-LRQEYLWF
 YDL080c LSIKLLLQKILANLDES-KLSYQPSQPSMMVPRPYFAGNVLLRQEWVWN
 KmPDC1A VQMKFVLQKLLTKVKDA-AKGYKVPVPHAPRDNKPVADSTPLKQEWVWT
 ScPDC1 VQMKFALQKLLDAIPEV-AKDYKPVAVPARVPI TKSTPANTPMKQEWMMWN
 SCPDC6 VQMKFALQNLKVI PDV-VKGYKSVPVPTKT PANKGVPASTPLKQEWLWN
 SCPDC5 VQMKFALQKLLDAIPEV-AKDYKPVAVPARVPI TKSTPANTPMKQEWMMWN
 HuPDC VQMKFVLQKLLIAKVGAK-IANYSVPVVPAGLPKNAPVADSTPLKQEWLWN
 K1PDCA VQMKFALQKLLTKVADA-AKGYKVPVVPSEPEHNEDVADSTPLKQEWVWT

. . . * * * * *

K1PDCB KMSTWLKQGDVII ISESGTSAIGLLQOKFPDNTRLVSOAIWNSSGYSIGAC
 YDL080c EISHWFQPGDIIITETGASAFGVNQTRFPVNTLGISQALWGSVGYTMGAC
 KmPDC1A QVGKFLQEGDVVLTETGTSAFGINQTHFPNDTYGISQVLWGSIGFTGGAT
 ScPDC1 QLGNFLREGDIVIAETGTSAFGINQTTFTPDVYAIQVQLWGSIGFTVGAL
 SCPDC6 ELSKFLQEGDVII ISETGTSAFGINQTI FPKDAYGISQVLWGSIGFTTGAT
 SCPDC5 QLGNFLREGDIVIAETGTSAFGINQTTFTPDVYAIQVQLWGSIGFTVGAL
 HuPDC ELGFELEEGDIVTETGTSAFGINQTRFPTDAYGISQVLWGSIGYSVGAM
 K1PDCA QVGEFLREGDVVITETGTSAFGINQTHFPNNTYGISQVLWGSIGFTTGAT

. . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *

K1PDCB LGILAAAYRDMGT---LDKHRILMLVGDGSLQFTFQELSTILTHGFKPYI
 YDL080c LGAEFAVQEIINKDKFPATKHRVILFMGDGAFQLTVQELSTIVKWLTPYI
 KmPDC1A LGAAFAAEEDPKK-----RVILFIGDGSLSQLTVQEI STMIRWGLKPYL
 ScPDC1 LGATMAAEELDPKK-----RVILFIGDGSLSQLTVQEI STMIRWGLKPYI
 SCPDC6 LGAAFAAEEDPNK-----RVILFIGDGSLSQLTVQEI STMIRWGLKPYL
 SCPDC5 LGATMAAEELDPKK-----RVILFIGDGSLSQLTVQEI STMIRWGLKPYI
 HuPDC VGATFAAEELDKAK-----RVILFVGDGSLQLTVQEIACLIRWGLKPYI
 K1PDCA LGAAFAAEEDPKK-----RVILFIGDGSLSQLTVQEI STMIRWGLKPYL

* . * . . * . * . . * . * . . * . * . . * . * . . * . * . . *

K1PDCB FVINNNQGYTVDRTLNRKETHLNATYFDIQPWELLKLP SLFYSQEYFKRRC
 YDL080c FVMNNQGSYVDR-FLHHRSD--ASYDDIQPWNYLGLLRRVFGCTNYETKKI
 KmPDC1A FVLNNDGYTIER-LIHG-ET--AQYNCIQSWKHLDLLPTFGAKDYEAVRV
 ScPDC1 FVLNNDGYTIEK-LIHG-PH--AEYNEIQGWDHLALLPTFGARNYETHRV
 SCPDC6 FVLNNDGYTIEK-LIHG-PH--AEYNEIQTWDHLALLPFGAKKYENHKKI
 SCPDC5 FVLNNDGYTIEK-LIHG-PH--AEYNEIQGWDHLALLPTFGARNYETHRV
 HuPDC FVLNNDGYTIEK-LIHG-PT--AQYNMIQNWKQLRYLTNFGATDYEAIPV
 K1PDCA FVLNNDGYTIER-LIHG-ET--AQYNCIQNWQHLLELLPTFGAKDYEAVRV

** . * . * * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

K1PDCB MSVGEINSLSDKFEFNKSDQLKIVELI LPSMDVPV-LLDPRDSSDDESS
 YDL080c ITVGEFRSMISDPNFATNDKIRMI EIMLP PRDVPQALLDRWVVEKEQSKQ
 KmPDC1A ATTGEWNKLTDDKFKQENSKIRLIEVMLPVMDAPSNL----VKQAQLTAS
 ScPDC1 ATTGEWEKLTQDKDFQDNSKIRMI EVMPLVFDAPQNL----VKQAQLTAA
 SCPDC6 ATTGEWDALTTDSEFQKNSVIRLIELKLPVFDAPESL----IKQAQLTAA
 SCPDC5 ATTGEWEKLTQDKDFQDNSKIRMI EVMPLVFDAPQNL----VKQAQLTAA
 HuPDC KTVGEWKKLTADPAFKKNSTIRLIEVFLPEMDAPSSL----VAQANLTAA
 K1PDCA STTGEWNKLTDEKFDNTRIRLIEVMLPTMDAPSNL----VKQAQLTAA

. * . * . * * . * . * . * . * . * . * . * . *

K1PDCB	PQH ^{K} R ^{R} PRT-----
YD1080c	VQEENENSSAVNTPTPEFQ ^{Q} PL ^{L} KK ^{N} Q ^{V} GY
KmPDC1A	INAK ^{Q} E-----
ScPDC1	TNAK ^{Q} -----
SCPDC6	TNAK ^{Q} -----
SCPDC5	TNAK ^{Q} -----
HuPDC	INAK ^{Q} D-----
K1PDCA	SNAK ^{N} -----

Figura 10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de piruvato descarboxilasas de distintas levaduras. La región conservada, común para la mayoría de los enzimas dependientes de TPP, está señalada en un recuadro. Los residuos en **negrita** están conservados en el motivo mencionado. Las cuatro **cisteínas** conservadas, en las posiciones 69, 152, 211 y 222, se señalan en **negrita** y **subrayadas**. El glutamato conservado de la posición 51 también está indicado.

5.2.2. COMPARACIÓN DEL USO DE CODONES DE DISTINTOS GENES QUE CODIFICAN PIRUVATO DESCARBOXILASAS

El uso de codones de un gen está relacionado con su nivel de expresión (Bennetzen y Hall, 1982). El índice ICDI (*Intrinsic deviation codon index*), definido por Freire-Picos y colaboradores (Freire-Picos *et al.*, 1994), tiene un rango teórico de valores, al igual que el CBI (*Codon bias index*) (Bennetzen y Hall, 1982), comprendido entre 0 y 1. Un gen con un alto *bias*, que tienda a utilizar un único codón por aminoácido, tomará el máximo valor para este índice, 1, mientras que un gen que utilice indistintamente cualquier codón para un determinado aminoácido, tomará un valor de 0. Este índice presenta la ventaja de que no requiere el conocimiento previo de los codones óptimos de la especie.

En la tabla 14 se muestran los valores del ICDI de varios genes que codifican piruvato descarboxilasas en distintas levaduras.

Tabla 14. Uso de codones de genes que codifican piruvato descarboxilasas en distintas levaduras.

<i>Organismo</i>	<i>Gen</i>	<i>ICDI</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>PDC1</i>	0.66
<i>S. cerevisiae</i>	<i>PDC5</i>	0.50
<i>S. cerevisiae</i>	<i>PDC6</i>	0.15
<i>H. uvarum</i>	<i>PDC</i>	0.64
<i>K. marxianus</i>	<i>PDC1a</i>	0.72
<i>K. lactis</i>	<i>KIPDCA</i>	0.62
<i>K. lactis</i>	<i>KIPDCb</i>	0.097

Los resultados indican que, en la mayoría de los casos, los genes estructurales que codifican piruvato descarboxilasas son de elevada expresión. Como se esperaba, el valor de ICDI para el gen de *S. cerevisiae* *PDC6* (Hohmann, 1991) es muy bajo en comparación con los otros dos genes estructurales de piruvato descarboxilasas de esta levadura, ya que su expresión es mínima. El gen *KIPDCB* presenta un valor ICDI todavía menor que el gen *PDC6*, lo que sugiere que también se trata de un gen de muy baja expresión.

5.2.3. ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *KIPDCB*

En la figura 11 se muestra una secuencia de 900 pb que contiene la región promotora de *KIPDCB*. En esta región se encuentran tres secuencias similares a la caja TATA descritas por Struhl (Struhl, 1989). Hay tres secuencias consenso de unión a la proteína Gcr1p, dos secuencias CTTCC y una secuencia GMWTCCW. La mutación del gen *GCR1* produce una

reducción en los niveles de la mayoría de los enzimas glucolíticos, tanto en fuentes de carbono fermentables como no fermentables (Clifton y Fraenkel, 1981). Gcr1p es un regulador positivo de genes glucolíticos que se une a la secuencia consenso GMWTCCW. Esta secuencia se ha encontrado en numerosos genes como *ADH1*, *APA1*, *CRY1*, *CYC1*, *ENO1*, *ENO2*, *GPM1*, *PGK1*, *PYK1*, *RP29*, *TEF1* y *TEF2* (Svetlov y Cooper, 1995). La proteína Gcr1p interacciona con otras proteínas para llevar a cabo la activación, como Rap1p, que se une a las cajas RPG ($^A/G^A/cACCCANNCA^T/c^T/c$), que también se encuentra en los promotores de genes que son inducidos por glucosa, como *FBP1*, *PCK1* (Mercado y Gancedo, 1992), *PGK1* (Tsang *et al.*, 1990), y genes que codifican para piruvato descarboxilasas, como *PDC1* (Butler y McConell, 1988), *KIPDCA* (Bianchi *et al.*, 1996) y *PDC* de *Kluyveromyces marxianus* (Holloway y Subden, 1993).

Otra proteína que interacciona con la caja RPG es Gcr2p, que también es un regulador positivo de genes glucolíticos (Uemura y Fraenkel, 1990; Uemura y Jigami, 1992). En el promotor de *KIPDCB* no se han encontrado secuencias de unión a Rap1p (cajas RPG), pero sí una secuencia de unión al factor Bas1p, un regulador positivo que se une, en combinación con otros factores, como Bas2p y Rap1p, a la secuencia TCCGGTA encontrada en los promotores de varios genes *ADE* y el gen *HIS4* (Svetlov y Cooper, 1995).

```

-900 ACAGGAACTATAGACTTATTATACCATATCATGAAATATGATCCTAATATCAGATACAG
-840 CGCTTTACAATGTATGTTCAATTCGACGTACTTCACTGATATCGTCAGCAACACCGGGTC
-780 GGACTCAAACCTTTCGTTGATCGATTCTTTACCATTGCTACATTTTGAGGAAAGTGAATT
-720 ACAAGGGTTGTCATCTAACGATATATATAGATTGACTGGCAAACCTGATATAGAACCAGACA
-660 AGACAAAAGGAAAACATAAAACAAAAAAGACTAGTTGAGAGAAGGAAATATGCAAAT
-600 ACAAATGCATTAATGTAACGTTCTACCCAGCACATCCAAAGAAAATGAAATTAATACACG
-540 AAATTAATGTGCATACAAATAGTTACTTCTCATATGCCTACTTGTTCAGGCAACACCGT
-480 TGTTCAATGCTATCCTACGCTCCCCCTTTGCATATCATATTTCTCTTCAATTTAAAG
-420 TTCATTTCAATGTCTTTCGGAAAACCTATAGTTCTATCCTGTCCCTAATAGTGTTTCATAT
-360 TGGGCAGTGGATTC TTTTATTTATGTTAAGCATTCCCTATTCCTCACTAGGAAAAGGGC
-300 ACTTGGACATCATAATTCTTCC TTTTATAGCAATACTTTTCTTTCTAGCTTCCGTCCTAC
-240 CTTTTTCATACCGGATTTTACCTTGTGAGTTTATAATAATATCAATACTCACCTATTAAG
-180 AGCCACATGACGTGCGTGCGATTGAGTACTTAAAAACTACTGTTACCTTTTGCCATCGT
-120 GTAACTTGCATTTTCTTTGTCACATTTTCTGTACAAGAACTAACTTGACAAAATTGAT
-60 TTTCTTGAAGAGAAGTGAATTAAGTTAACAGGAATATACTGGGACGGACAAAAAG
+1 ATG 3'

```

Figura 11. Secuencia nucleotídica de la región 5' del gen *KIPDCB*. Dos secuencias con similitud a las cajas TATA aparecen indicadas con subrayado punteado. Los consensos de unión a Gcr1p en negrita y doble subrayado. El consenso de unión a Bas1p se señala en recuadro en la hebra complementaria.

5.2.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *KIPDCB*.

5.2.4.1. SUBCLONADO DEL GEN *KIPDCB*

Para realizar el análisis funcional del gen *KIPDCB* se hizo necesario volver a clonar el fragmento de DNA que contiene la *ORF1* completa y la región 5' del promotor. Para ello, un fragmento *AvaII*-*AvaII*, de unos 4.300 pb se insertó en el único sitio *SmaI* de dos vectores de clonación,

episómicos, YEplac112 y YEplac195. Las construcciones se muestran en la figura 12.

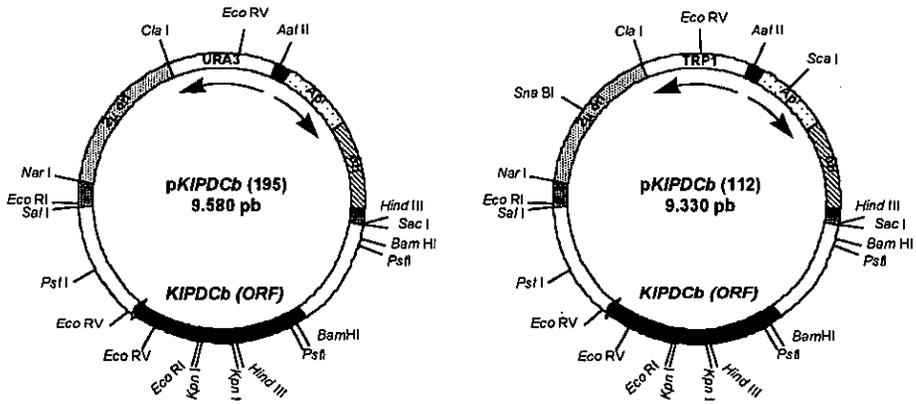


Figura 12. Construcciones de clonación del gen *KIPDCB* en los vectores episómicos, YEplac195 y YEplac 112.

5.2.4.2. ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT

Southern con DNA genómico de Kluyveromyces lactis

Se extrajo el DNA genómico total de la línea NRRL-Y1140 y se digirió con varios enzimas de restricción para contrastar el patrón de bandas obtenidas con el esperado. El *Southern blot* se hibridó con el fragmento *BamHI-HinIII*, de 572 pb, obtenido a partir del clon pKIPDCB(195) (Fig.12).

El patrón de restricción obtenido en la figura 13 coincide con el patrón de bandas esperado a partir del mapa de restricción del clon original pEC1. En las condiciones de hibridación utilizadas, 55°C, hay hibridación mayoritaria de la sonda con un sólo fragmento de DNA genómico, no obteniéndose hibridación cruzada con el gen *KIPDCA*.

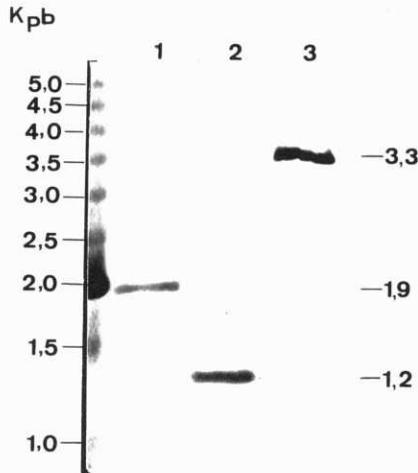


Figura 13. Análisis de *Southern blot* del DNA genómico total de la línea de *K lactis* NRRL-Y1140. Digestiones: 1. *Pst*I, 2. *Bam*HI+*Eco*RV, 3. *Bcl*II. M. Marcador de pesos moleculares 500bp *DNA Ladder* de *GibcoBRL*.

5.2.4.3. COMPLEMENTACIÓN DEL DOBLE NULO *pdcl*⁰ *pdcs*⁰ DE *S. cerevisiae*

Para comprobar si el gen *KIPDCB* en multicopia puede complementar el fenotipo asociado al doble mutación de *S. cerevisiae* *pdcl*⁰ *pdcs*⁰, se transformó la línea YSH5.125.-1C, incapaz de crecer en glucosa, con el

plásmido multicopia pKIPDCB(112). Los transformantes se seleccionaron en placas CM-TRP, con etanol al 3% como fuente de carbono. No se encontró ningún transformante capaz de restablecer la capacidad de crecer en glucosa.

5.2.4.4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN

Análisis mediante RT-PCR

El gen *KIPDCB* presenta un uso de codones muy bajo, con un ICDI menor a 0,1, lo que es característico de genes de baja expresión y nos resultó imposible detectar un transcrito mediante análisis por *Northern blot*. Para averiguar si la *ORF1* se transcribe, aunque lo haga a muy bajos niveles, se decidió detectar el posible mRNA mediante un primer ciclo de tratamiento con una retrotranscriptasa y posteriores amplificaciones del DNA obtenido mediante una polimerasa. Para ello, se extrajo el RNA total de la línea de *K. lactis* NRRL-Y1140 *ura⁻* cultivada en distintas fuentes de carbono YPG-3%, YPF-3%, YPD-3% e YPD-8%. También se extrajo el RNA total de la misma línea transformada con pKIPDCB(195) creciendo en YPD-3%. También se determinó si el gen se expresa en la línea de *S. cerevisiae* YSH.125.-2C transformada con pKIPDCB(112). Los oligonucleótidos utilizados amplifican una región de 1.085 pb de la zona interna de la *ORF*. 160 µg de RNA total se fijaron a las membranas de captura, las cuales se dividieron en dos, tratando una parte únicamente con polimerasa, sin el primer ciclo con retrotranscriptasa, con el fin de asegurar que el resultado

obtenido se debe a la amplificación de DNA sintetizado a partir de un hebra molde de RNA, y no de trazas de DNA que pudiese haber en la muestra.

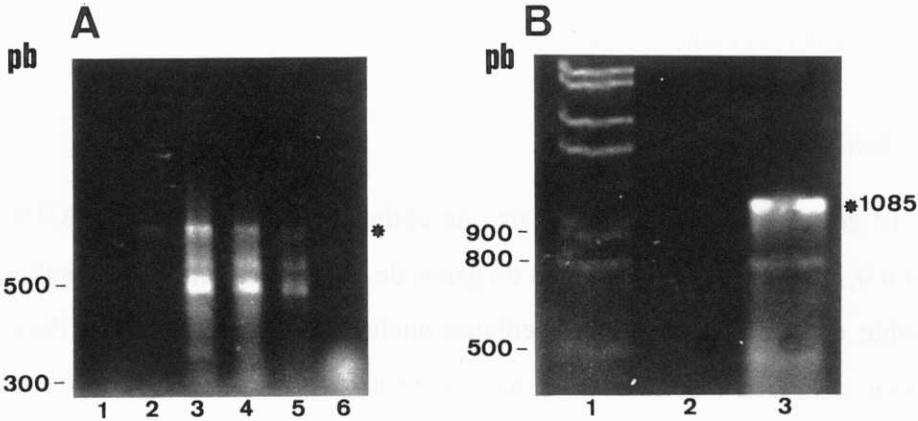


Figura 14. A. RT-PCR a partir de RNA de *K. lactis* NRRL-Y1140 *uraⁱ* no transformada (pocillos 1-3, 5) o transformada con pKIPDCB(195) (pocillo 4). 1. YPG-3%, 2: YPF-3%, 3 y 4 YPD-3%, 5: YPD-8%, 6: Control *Hella* del kit. **B.** RT-PCR a partir de RNA de *S. cerevisiae* YSH5.125.-2C (*pdcl⁰*) transformada con pKIPDCB(195) creciendo en YPD-3%. 1: DNA marcador, 2: control negativo sin RT, 3: amplificación con RT y *Taq* DNA polimerasa.

Como se puede observar en la figura 14, tanto en *K. lactis* como en *S. cerevisiae* se obtiene una banda del tamaño esperado, y otras bandas de menor tamaño, menores de 500 pb, debidas a amplificaciones no específicas.

Estudios de expresión mediante ensayos β -galactosidasa

La cuantificación a través de *RT-PCR* requiere una cuidadosa puesta a punto de la técnica, junto con el empleo de marcadores internos de amplificación, por ello nos pareció más sencillo realizar los análisis de regulación fusionando el promotor a un gen marcador, el gen *lacZ* de *E. coli*. Para ello se fusionó un fragmento de unos 1.000 pb, que comprende la región 5' del gen hasta el codón ATG de iniciación de *KIPDCB*, al gen *lacZ* que se encuentra en el plásmido de *pXW3 Δ PstI* (Fig. 15) y se insertó en el sitio *SalI-PstI* de *pXW3*. Se comprobó que la construcción resultante, *P_{PDCB}-lacZ*, contenía el promotor en pauta de lectura con el gen *lacZ* mediante secuenciación.

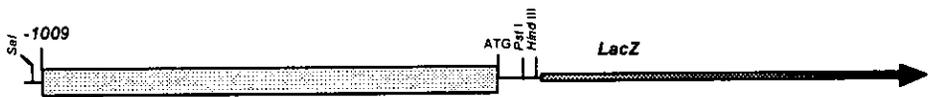


Figura 15. Esquema de la fusión del promotor del gen *KIPDCB* con el gen *lacZ* del vector *pXW3 Δ PstI*. La numeración indica las posiciones relativas al codón de iniciación.

Con esta construcción se transformó la línea de *K. lactis* MW190-9b y los transformantes se sembraron en placas CM-URA/X-Gal con distintas fuentes de carbono (Fig. 16). Los transformantes se mantuvieron en condiciones selectivas en todo momento, para evitar la pérdida de plásmidos. También se realizó un estudio de la expresión en medios carentes de fuente de carbono o nitrógeno (Fig. 17). Como se puede observar, no existen

grandes diferencias de expresión, además los niveles de actividad son muy bajos indicando que se trata de un promotor muy débil; sólo se observa inducción significativa en etanol.

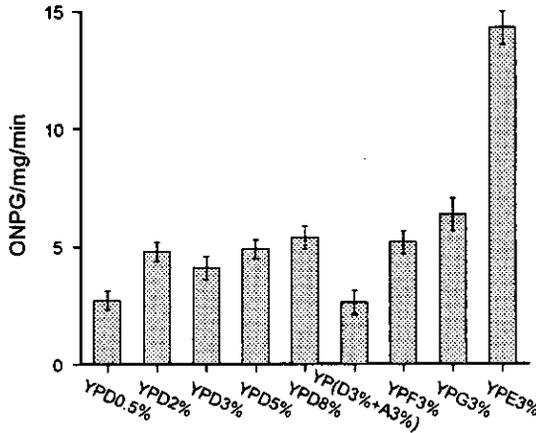


Figura 16. Actividad β -galactosidasa de la fusión P_{KIPDCb} - $lacZ$ en distintas fuentes de carbono. Entre paréntesis se muestra la A_{600} alcanzada por cada cultivo.

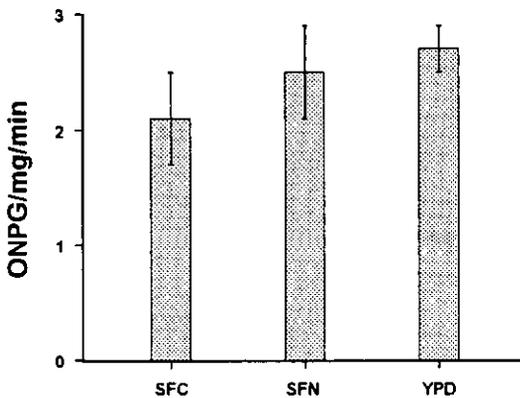


Figura 17. Respuesta del promotor de $KIPDCB$ a estrés nutricional. Entre paréntesis se indica la A_{600} alcanzada por cada cultivo. SFC: Sin fuente de carbono (1,7), SFN: Sin fuente de nitrógeno (1,8), YPD: YPD-0,5%.

5.2.4.5. INTERRUPCIÓN DEL GEN *KIPDCB*

La interrupción del gen *KIPDCB* se realizó por inserción del plásmido integrativo $pKlpdcb\Delta(211)$ (Fig. 18). Este plásmido se construyó por inserción del fragmento *Bam*HI-*Hind*III de 572 pb en el sitio *Bam*HI-*Hind*III del vector integrativo *YIplac211*.

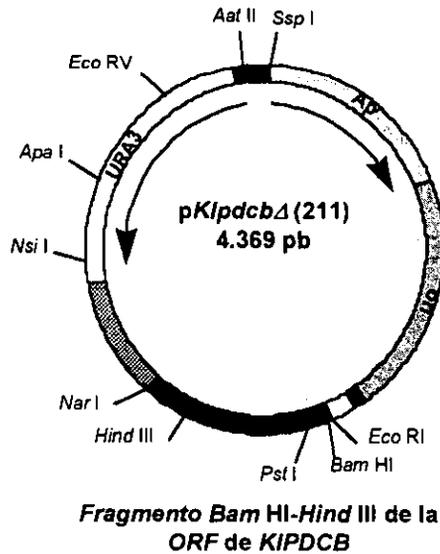


Figura 18. Construcción $pKlpdcb\Delta(211)$ utilizada para la interrupción del gen *KIPDCB* tanto en la línea MW190-9b como PMI/C_1 .

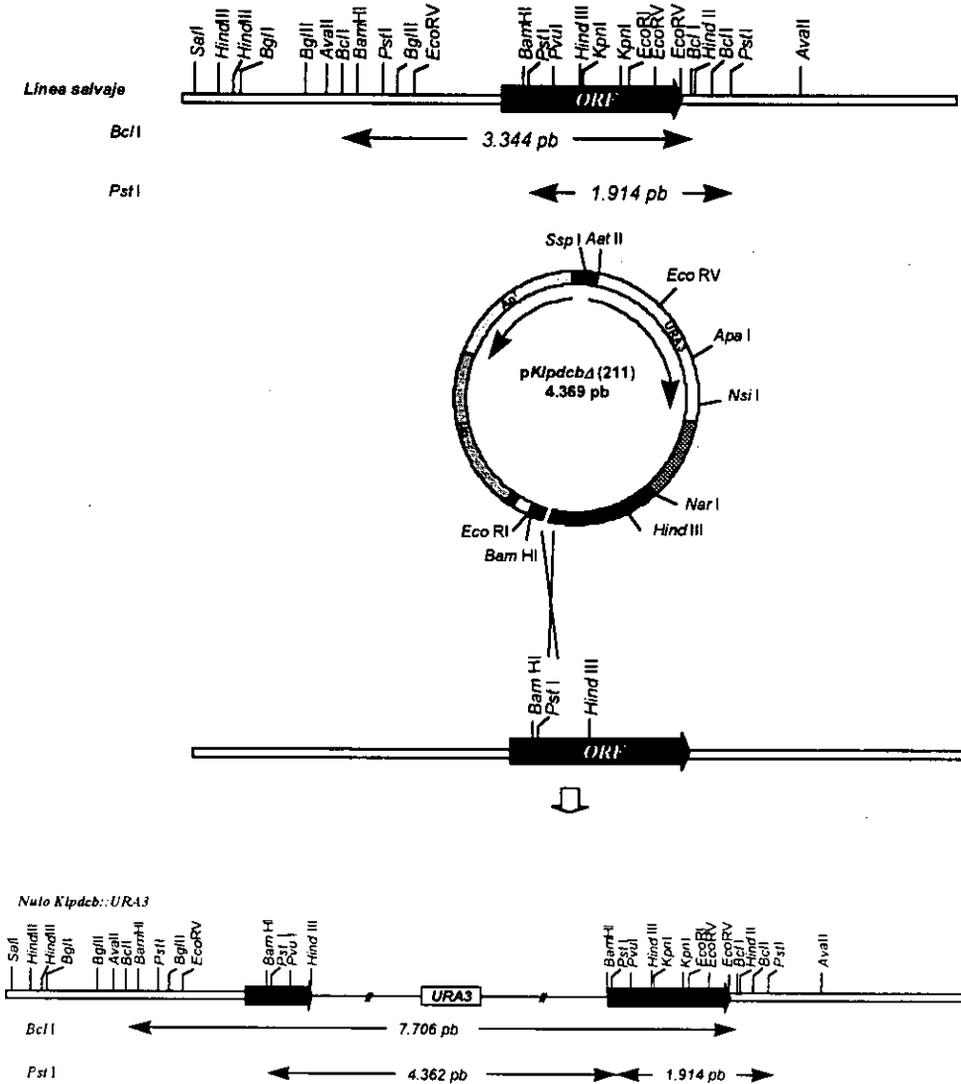


Figura 19. Esquema de la estrategia de interrupción del gen *KIPDCB* en las líneas de *K. lactis* MW190-9b y PM1/C₁.

La construcción resultante, pKlpdcb Δ (211), se cortó con el enzima de restricción *Pst*I que presenta un sitio único de corte, y se transformaron dos líneas de *K. lactis*, la línea MW190-9b y la línea PMI/C₁, con el fin de conseguir un doble mutante *KlpdcA::ura3 KlpdcB::URA3* (Fig. 19). Los transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecer en CM-URA y fueron analizados mediante *Southern blot* (Fig. 20). La sonda utilizada para dicho análisis fue el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI, de 1.046 pb, que contiene la mayor parte de la *ORF* de *KIPDCB*.

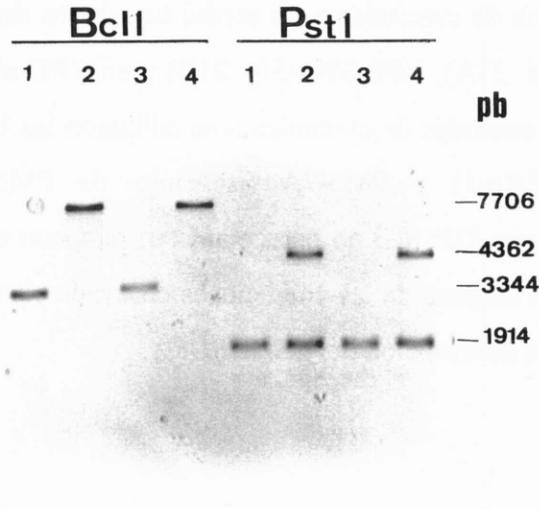


Figura 20. *Southern blot* del DNA genómico total extraído de las líneas MW190-9b y MW190-9b *Klpdcb::URA3* (ERp-1), y PMI/C₁ y PMI/C₁ *Klpdcb::URA3* (ERp-2). Como sonda se utilizó el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI de 1.046 pb que contiene la mayor parte de la *ORF* de *KIPDCB*. 1. MW190-9b, 2. ERp-1, 3. PMI/C₁, 4. ERp-2.

5.2.4.6. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DEL MUTANTE *ERp-1* Y DEL DOBLE MUTANTE *ERp-2* EN DISTINTAS FUENTES DE CARBONO.

Se comprobó el crecimiento de la línea con el alelo nulo de *KIPDCB* en placas de medio complejo con distintas fuentes de carbono: glucosa, etanol, acetato y glicerol. El gen no es esencial para el crecimiento en ninguno de estos medios. La línea es también capaz de crecer en medio YP, sin fuente de carbono, y en medios sintéticos (CM) suplementados con las mismas fuentes de carbono.

Para cuantificar el crecimiento de los mutantes *PDC* en *K. lactis* se realizó un análisis de crecimiento en medio líquido en distintas fuentes de carbono: YP (Fig. 21A), YPE-3%. (Fig. 21B) y en YPD al 0,5%, 2% y 5% (Fig. 22). Como controles de crecimiento se utilizaron las líneas MW190-9b (isogénica de *ERp-1*) y PM6-7A (isogénica de *PMI/C*, *ERp-2*). La interrupción del gen *KIPDCB* no parece afectar, tampoco cuantitativamente, al crecimiento en ninguna de las condiciones ensayadas, contrariamente a lo que sucede con la interrupción del gen *KIPDCA*.

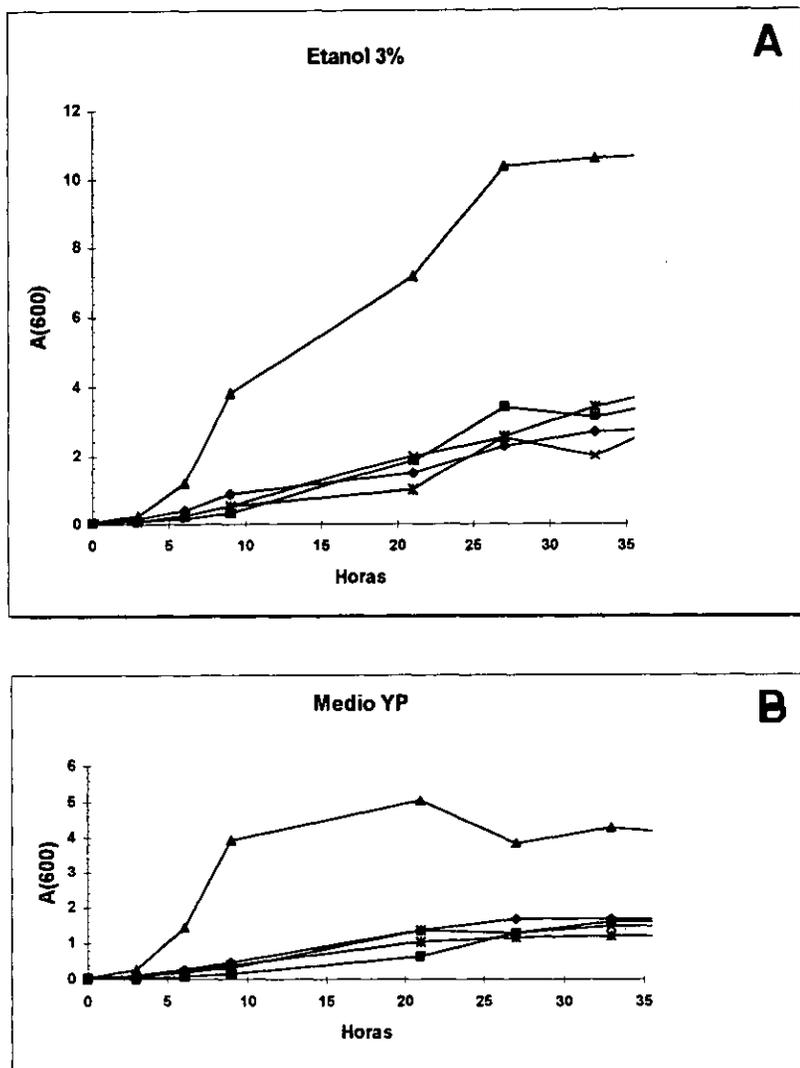


Figura 21. Crecimiento de los mutantes *KlpcA* y *KlpcB*, respecto a las líneas salvajes, en YPE-3% (A) e YP (B). —■— MW190-9b; —◆— ERp-1 (*KlpcB*⁰); —▲— PM6-7A; —✱— PMI/C1 (*KlpcA*⁰); —✱— ERp-2 (*KlpcA*⁰ *KlpcB*⁰).

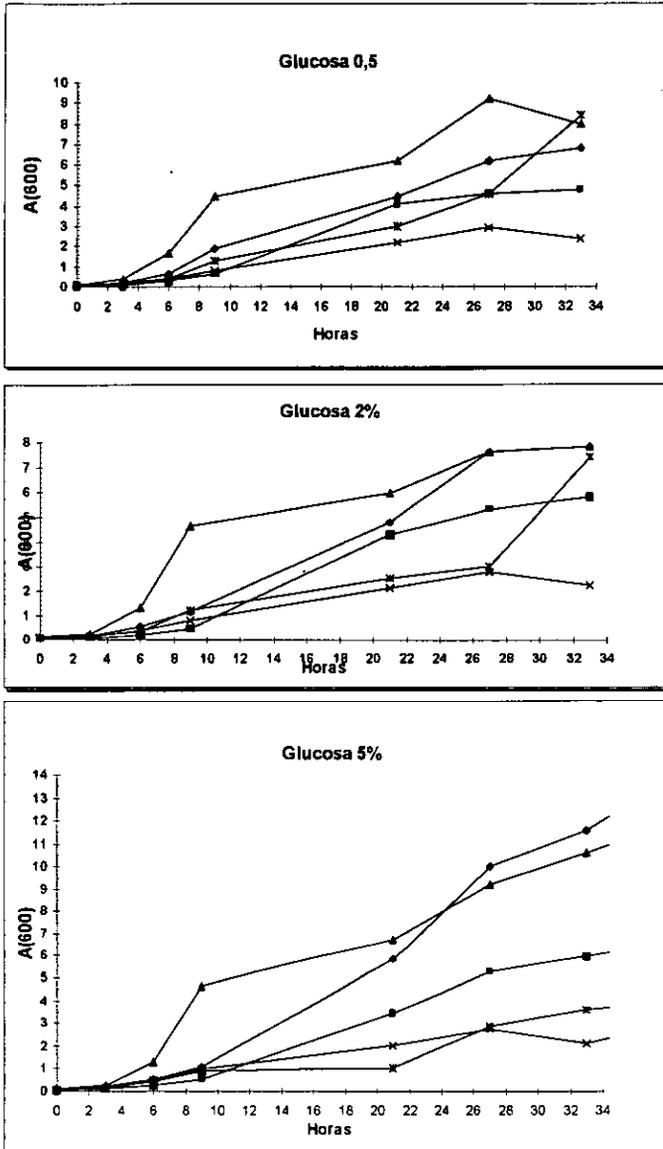


Figura 22. Crecimiento de los mutantes *KlpdcA* y *KlpdcB* respecto a las líneas salvajes, en YPD a distintos porcentajes.) —■— MW190-9b; —◆— ERp-1 (*KlpdcB*⁰); —▲— PM6-7A; —✕— PMI/C1 (*KlpdcA*⁰); —✱— ERp-2 (*KlpdcA*⁰ *KlpdcB*⁰).

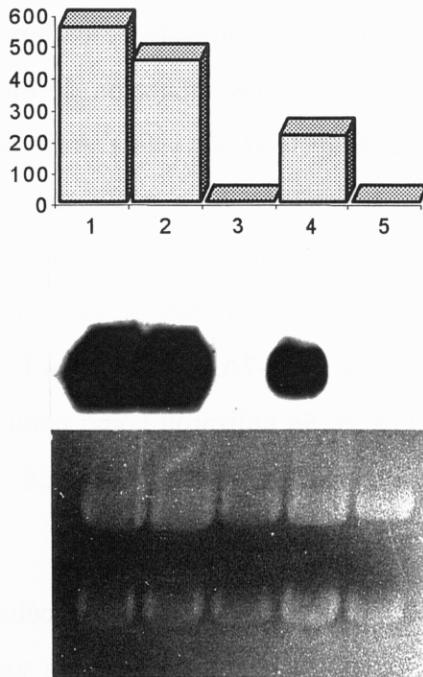
5.2.4.7. EXPRESIÓN DE *KIPDCA* EN LA LÍNEA *ERp-1* (*KlfdcB::URA3*)

En *S. cerevisiae* la expresión del gen *PDC5* se induce cuando no hay expresión de *PDC1* (Hohmann y Cederberg, 1990), lo que ha sugerido una posible autorregulación de la síntesis de piruvato descarboxilasa. En *K. lactis* cuando se anula el gen *KIPDCA* no hay inducción de otro gen estructural para piruvato descarboxilasa (Bianchi *et al.*, 1996). A fin de comprobar si la proteína codificada por el gen *KIPDCB*, a pesar de no tener actividad piruvato descarboxilasa, puede regular la expresión de *KIPDCA* se analizaron, mediante *Northern blot*, los niveles de expresión de *KIPDCA* en las líneas salvajes MW190-9b y PM6-7A, y en la línea *ERp-1* en la que se ha interrumpido el gen *KIPDCB*. Se utilizaron como controles negativos de la expresión de *KIPDCA* las líneas *PMI/C₁* (*KlfdcA::uraA'*) y *ERp-2* (*KlfdcA::uraA' KlfdcB::URA3*).

La extracción de RNA se realizó a partir de células cultivadas en medio sintético con glucosa como fuente de carbono. La sonda se generó por amplificación, mediante *PCR*, de un fragmento de DNA genómico de unos 800 pb, utilizando los oligonucleótidos *PDCA-S* y *PDCA-2*, tal y como se muestra en la figura 23 B.

Los resultados obtenidos (Fig. 23 A) indican que la interrupción del gen *KIPDCB* no afecta a la expresión del gen *KIPDCA*.

A



B

PDCA-S: (+155) 5' GAACGCTGCTTACGCTGC 3'

PDCA-2: (+1.021) 5' GCAGCATCGGCAACCTTA 3'

Figura 23. A. Análisis de la expresión del gen *KIPDCA* en las líneas: 1. MW190-9b, 2. ERp-1, 3. ERp-2, 4. PM6-7A, 5. PMI/C₁. **B.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento de DNA utilizado como sonda que contiene la región interna de la *ORF* de *KIPDCA*. Entre paréntesis se indican las posiciones relativas al codón de iniciación del nucleótido subrayado.

5.2.4.8. CRECIMIENTO DE *ERp-1* EN AUSENCIA DE TIAMINA

Dado que recientemente la *ORF* YDL080c, clasificada inicialmente como una piruvato descarboxilasa putativa, ha sido identificada como el gen *THI3*, que codifica para un regulador de la biosíntesis de tiamina, se planteó la posibilidad de que *KIPDCB* pudiese estar relacionado con esta ruta biosintética en *K. lactis*.

Para comprobar si el crecimiento de *ERp-1* se ve afectado por la ausencia de tiamina, se inocularon las líneas *ERp-1* y *MW190-9b* en medio líquido CM-URA y CM respectivamente. Tras alcanzar una A_{600} de 0,3, las células se lavaron con agua destilada estéril y se sembraron 5 μ l de diluciones seriadas 1:10 sobre placas CM-URA-THI, en el caso de la línea *ERp-1*, y en CM-THI en el caso de la línea isogénica *MW190-9b*.

En la figura 24 se puede observar que la interrupción de *KIPDCB* lleva a una disminución en el crecimiento de la levadura en medios carentes de tiamina, sin embargo, el gen no es esencial en estas condiciones de crecimiento.

CM-URA-THI

ERp-1

CM-THI

MW190-9b

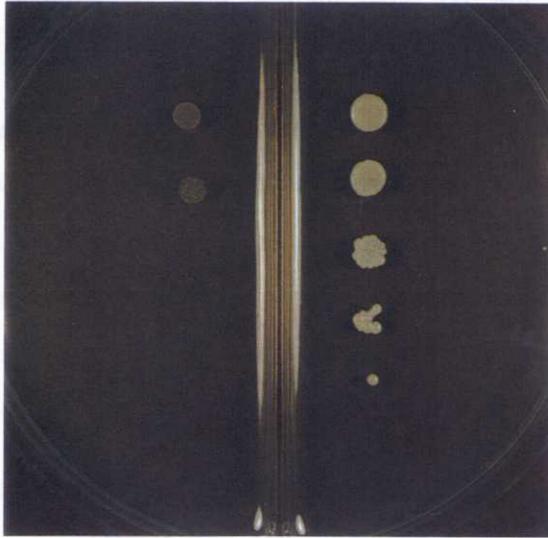


Figura 24. Crecimiento de las líneas ER-p1 (*Kl_{pdcB}::URA3*) y MW190-9b en CM-URA-THI y CM-THI respectivamente.

5.3. DISCUSIÓN

El estudio de la región 5' del gen *KICYCI* había revelado la existencia de un pequeño fragmento de DNA con homología con genes que codifican para piruvato descarboxilasas en otras levaduras. Dadas las diferencias existentes en el metabolismo respiro-fermentativo de las levaduras *K. lactis* y *S. cerevisiae* nos pareció de interés caracterizar este gen, extendiendo la secuenciación en dirección 5'. La secuencia nucleotídica presenta homologías con las secuencias de los tres genes *PDC* clonados en *S. cerevisiae*, siendo mayor el grado de homología con el gen *PDC1* (Tabla 5).

En el transcurso de nuestro trabajo de secuenciación, el grupo de M. Wésolowski-Louvel publicó la existencia de un único gen que codifica para la piruvato descarboxilasa funcional en *K. lactis* (Bianchi *et al.*, 1996). Estos autores describieron que al anular el gen *KIPDCA* no hay actividad piruvato descarboxilasa, no se produce la inducción de la transcripción de otro gen estructural, y la línea es incapaz de crecer en glucosa en presencia de antimicina A. Esto contrasta con la situación en *S. cerevisiae* en la que al anular el gen *PDC1* se produce expresión de *PDC5* (Seeboth *et al.*, 1990).

Los resultados descritos por el grupo de M. Wésolowski-Louvel nos sugirieron la posibilidad de que *KIPDCB* fuese un gen de baja expresión, similar a *PDC6* de *S. cerevisiae*. Los datos que demuestran bajos niveles de expresión para el gen *KIPDCB* provienen de varias evidencias experimentales. En primer lugar, el gen presenta un valor del índice *ICDI* muy bajo, característico de genes de baja expresión (Rodríguez-Belmonte *et*

al., 1996). Además, no es posible llegar a detectar un transcrito mediante *Northern blot*, incluso utilizando cargas de RNA total elevadas, de hasta 30µg, y sondas marcadas con una gran actividad específica. Cuando el promotor se fusiona al gen marcador *lacZ* de *E. coli* se comprueba que, efectivamente, es un promotor muy débil en las condiciones ensayadas. La ausencia de cajas RPG en el promotor de *KIPDCB* que se encuentran en *PDC1* podría ser uno de los elementos condicionantes de la baja expresión.

A pesar de su bajo nivel de expresión, es posible comprobar que la *ORF* se transcribe utilizando una técnica de elevada sensibilidad como la *RT-PCR*. Con esta técnica hemos podido detectar la presencia de un transcrito, tanto en medios con glucosa como en fructosa, y también expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, transformando la línea YSH5.125.-2C (*pdcl*⁰) con el plásmido pKIPDCB(195), portador del gen *KIPDCB* (Fig.12). Además, el promotor, aunque débil, demuestra ser activo.

En *S. cerevisiae* es frecuente encontrar genes de gran homología a nivel de secuencia y que codifican para proteínas funcionalmente análogas, pero con un distinto nivel de expresión. Por ejemplo, *S. cerevisiae* tiene dos genes que codifican para la proteína citocromo *c*, *CYC1* y *CYC7*, siendo el primero el responsable de la síntesis de un 95% de la proteína total, mientras que el segundo sólo aporta el 5% restante (Laz *et al.*, 1984). Algo parecido sucede con la subunidad *b* de la citocromo oxidasa (Hodge *et al.*, 1989). El significado de estas "segundas copias" de menor expresión siempre ha sido un tema de discusión, y se ha sugerido que desempeñan un papel importante en los procesos de transición de unas condiciones del medio a otras, como

por ejemplo en la adaptación de condiciones aeróbicas a anaeróbicas (Lowry y Zitomer, 1984). Una situación similar podría ser aplicable a los genes que codifican para piruvato descarboxilasas en *S. cerevisiae*. Se ha sugerido que el gen *PDC1* codifica para el isoenzima de mayor relevancia funcional, mientras que la proteína Pdc5p podría ser necesaria para alcanzar una actividad piruvato descarboxilasa óptima en determinadas condiciones fisiológicas, como por ejemplo durante la germinación de las esporas, y Pdc6p durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Hohmann, 1991). Sorprendentemente, aunque la expresión de *PDC6* es muy débil comparada con la de *PDC1* o *PDC5*, se produce un incremento en etanol, algo inesperado dado que las piruvato descarboxilasas catalizan un paso irreversible en la fermentación a etanol, y no parece ser una actividad enzimática relacionada con el metabolismo gluconeogénico (Hohmann, 1991).

Las piruvato descarboxilasas conservan cuatro cisteínas en las posiciones 69, 152, 221 y 222 (Fig. 10). Las dos piruvato descarboxilasas activas en *S. cerevisiae* conservan las cuatro posiciones. Inicialmente se consideró que la baja actividad piruvato descarboxilasa de Pdc6p era debida a la ausencia de la cisteína 222, sin embargo, en la actualidad, hay varias evidencias experimentales contrarias a esta interpretación. Baburina y colaboradores (Baburina *et al.*, 1994) han demostrado que no es la cisteína 222 la que resulta imprescindible para la activación por sustrato, sino la 221. Además, la proteína PdcAp de *H. uvarum*, que tiene actividad piruvato descarboxilasa, sólo conserva la cisteína 221 y no la 222, exactamente igual

que lo que ocurre con *PDC6* (Holloway y Subden, 1994). Finalmente, la proteína de fusión que contiene 45 Aa. del extremo amino terminal de *PDC1* fusionado a 520 Aa. del extremo carboxilo terminal de *PDC6*, y que contiene sólo la cisteína de la posición 221, tiene actividad piruvato descarboxilasa (Zeng *et al.*, 1993). Todas la piruvato descarboxilasas activas conservan, al menos, la cisteína 221, sin embargo, ésta no parece ser la única condición necesaria para la actividad, ya que *PDC6* conserva dicha cisteína pero tiene muy baja actividad debida a su débil promotor (Hohmann, 1991). *KIPDCB* conserva únicamente las cisteínas de las posiciones 69 y 152, pero no el par 221-222. *KIPDCB* carece también del residuo glutamato de la posición 51, que aparece conservado en el resto de las piruvato descarboxilasas, y que es necesario tanto para la unión del cofactor TPP, como para la actividad catalítica (Killenberg-Jabs *et al.*, 1997).

La baja actividad del promotor de *KIPDCB* en glucosa, medio en el que se induce la expresión de genes que codifican para piruvato descarboxilasas de levaduras (Fig. 16), unida a la carencia de la cisteína 221 necesaria para la activación por sustrato, permiten explicar el hecho de que al interrumpir el gen *KIPDCA* no se observe actividad piruvato descarboxilasa ni capacidad de crecimiento en glucosa en presencia de antimicina A en *K. lactis* (Bianchi *et al.*, 1996). Hemos comprobado que el gen *KIPDCB* en multicopia no es capaz de complementar la deficiencia de actividad piruvato descarboxilasa del doble mutante *pdcl⁰ pdc5⁰* de *S. cerevisiae*. Este dato no puede ser interpretado exclusivamente por una alteración estructural de la proteína que originase la pérdida de la actividad

enzimática, ni por la baja actividad del promotor, ya que los activadores transcripcionales *PDC2* de *S. cerevisiae* y su homólogo *RAG3* en *K. lactis*, no son funcionalmente intercambiables (Prior *et al.*, 1996) y, por tanto, la ausencia de activación en el sistema heterólogo no puede ser tampoco descartada.

Al analizar el efecto originado por la interrupción de gen *KIPDCB*, hemos podido comprobar que el gen no es esencial para *K. lactis* en ninguno de los medios preparados con distintas fuentes de carbono, como glucosa, etanol, glicerol o acetato. Tampoco, desde un punto de vista cuantitativo, pueden observarse diferencias de crecimiento en medio líquido complejo, utilizando, como fuente de carbono, glucosa o etanol (Figs. 21 y 22).

De los datos expuestos puede concluirse que *KIPDCB* no es un gen estructural que codifique para una piruvato descarboxilasa funcional. *K. lactis*, aunque es capaz de fermentar en condiciones aeróbicas, tiene un metabolismo principalmente respiratorio (Gancedo y Serrano, 1989) y, en este sentido, es menos dependiente de genes relacionados con la fermentación que *S. cerevisiae*, por eso no resulta sorprendente que presente tan sólo un gen funcional. Nuestro trabajo ha demostrado sin embargo, que el genoma de *K. lactis* contiene, al menos, otra *ORF* con homología a piruvato descarboxilasas. Funcionalmente no sería equiparable a *PDC5*, puesto que no se activa al interrumpir *KIPDCA*.

El mecanismo de regulación de los tres genes que codifican para piruvato descarboxilasas en *S. cerevisiae* es complicado. Cuando *PDC1* se expresa, incluso aunque su expresión de lugar a una proteína no funcional

debido a mutaciones puntuales, no es posible detectar transcrito de *PDC5*. De hecho, éste sólo se expresa cuando no hay proteína como consecuencia de la interrupción de la *ORF* (Schaaff *et al.*, 1989; Seeboth *et al.*, 1990). Estos datos llevaron a proponer un mecanismo de autorregulación que podría funcionar a nivel transcripcional. La interrupción del gen *KIPDCB* no influye sobre los niveles de expresión de *KIPDCA* a nivel de mRNA, lo que descarta la posibilidad de que *KIPDCB*, aunque sin actividad enzimática, pudiera conservar un efecto regulador sobre la expresión del gen *KIPDCA*.

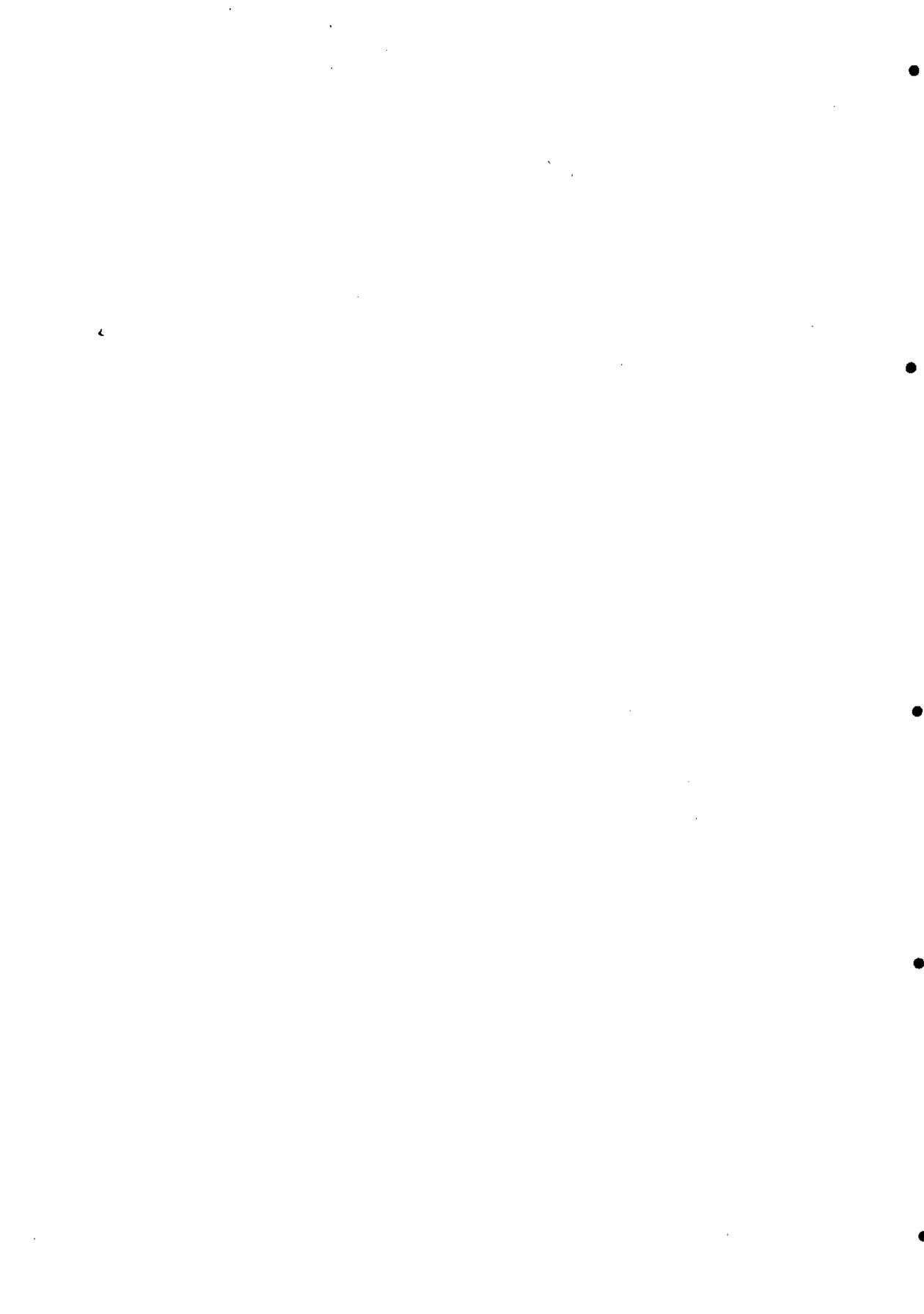
El reciente hallazgo de que en *S. cerevisiae* la *ORF* YDL080c, considerada como una posible piruvato descarboxilasa, es alélica al gen *THI3*, regulador de la biosíntesis y el transporte de tiamina, nos hizo considerar la posibilidad de que el gen *KIPDCB* desempeñase una función similar en *K. lactis*.

La interrupción de *KIPDCB* lleva, efectivamente, a una notable disminución de la capacidad de crecimiento en medios carentes de tiamina (Fig. 24). En *S. cerevisiae* la mutación *thi3* produce una disminución en el sistema de transporte de tiamina y una reducción en la actividad de diversos enzimas relacionados con su biosíntesis; pero no es un gen esencial, probablemente porque existen otros genes reguladores que pueden activar la ruta de la biosíntesis, como es el caso de *THI2*, aunque sin afectar al transporte (Nishimura *et al.*, 1992a).

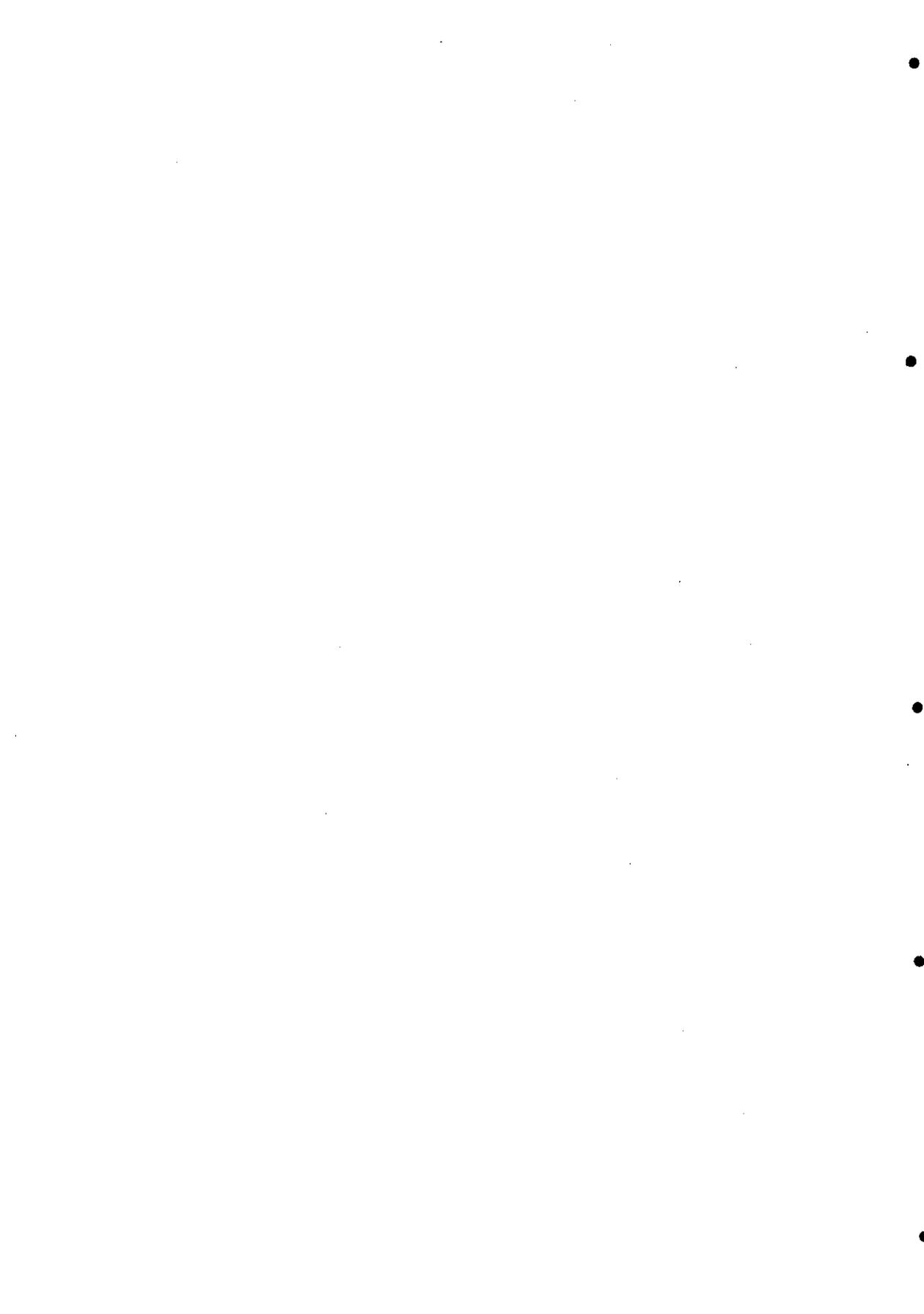
El pirofosfato de tiamina, TPP, es un cofactor de las piruvato descarboxilasas y otros enzimas relacionados. También es un efector negativo de la biosíntesis de tiamina y la señal intracelular de la

disponibilidad de tiamina en el medio (Nosaka *et al.*, 1993). Además de *THI2* y *THI3*, el gen *PDC2*, que es un regulador de la expresión de *PDC1* y *PDC5*, ha sido identificado como un tercer regulador transcripcional de la biosíntesis de tiamina. También se ha podido demostrar que *PDC5*, que normalmente se expresa muy poco en presencia de glucosa cuando *PDC1* es funcional, está reprimido por tiamina (Hohmann, comunicación personal).

Esto sugiere un mecanismo de regulación interdependiente para los genes que participan en la biosíntesis del cofactor y de los genes que codifican para proteínas que dependen de la unión al cofactor para su actividad catalítica. La clonación de *KIPDCB* y su posible participación en el transporte y/o la biosíntesis de la tiamina sugiere que este mecanismo está conservado en levaduras como *S. cerevisiae* y *K. lactis*, que difieren en su metabolismo respiro-fermentativo.



6. ESTUDIO DEL GEN *KIGSK-3*



6.1. INTRODUCCIÓN

La fosforilación es uno de los mecanismos predominantes de regulación por modificación post-transcripcional en eucariotas. Muchas de las quinasas descritas están implicadas en procesos de regulación que han sido conservados evolutivamente, como es el caso de las proteínas que intervienen en el ciclo celular, en la estimulación de la mitosis o las quinasas que responden a AMPc, las cuales se han encontrado en numerosos organismos, desde las levaduras hasta el hombre.

Casi todos los procesos que implican la recepción de una señal presentan un mecanismo de regulación bastante complejo en el que la fosforilación suele formar parte de algún paso crítico en la transmisión o en la amplificación de dicha señal. Este es el caso, por ejemplo, de la respuesta celular a factores de crecimiento u otros agentes que inducen la mitosis; en la mayoría de los casos, la señal es transmitida mediante la activación secuencial de una serie de proteína-quinasas citoplasmáticas, lo que, en términos generales, se denominan cascadas de Ser/Thr-quinasas.

En mamíferos, la cascada MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) parece ser una vía general de transmisión de señales que regula una serie de procesos estimulados por agentes extracelulares. Existen múltiples cascadas MAPK responsables de la transmisión de distintas señales a través del citosol hasta sus dianas nucleares específicas. Dichas cascadas, en estos momentos, están siendo el foco de atención de numerosas investigaciones ya que, recientemente, han sido implicadas en la regulación de una gran

variedad de procesos celulares, tales como diferenciación, desarrollo, ciclo celular e, incluso, en la transmisión de señales oncogénicas.

Una de las cascadas MAPK de transmisión de señales mejor conocida en mamíferos es la cascada ERK (*Extracellular signal regulated protein kinases*), implicada en la respuesta hormonal, y que regula procesos de proliferación, diferenciación y desarrollo. Esta cascada ha sido de particular interés porque se ha observado que muchos oncogenes codifican proteínas que transmiten señales mitógenas a dicha cascada. Uno de los efectores finales de esta cascada es la Ser/Thr-quinasa GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*).

Esta quinasa se descubrió inicialmente por su capacidad de activar una fosfatasa de tipo I y de fosforilar la glucógeno sintetasa. Más tarde se observó que también estaba implicada en la regulación de otros enzimas metabólicos, como la ATP-citrato liasa y la acetil-CoA carboxilasa, y en la regulación de factores de la transcripción, como CREB, AP-1, c-Jun, c-Myb y c-Myc. (Hardy *et al.*, 1995). GSK-3 también induce la fosforilación de la proteína tau, que se encuentra fosforilada de modo anormal en cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer (Mandelkow *et al.*, 1992; Pei *et al.*, 1997) y es rápidamente inactivada como respuesta a la insulina, fosforilando el factor de iniciación eIF-2B (Cross *et al.*, 1995; Welsh y Proud, 1993).

Se han aislado dos isoformas de esta proteína tanto en humanos como en cerebro de rata (Woodgett, 1990; Ishiguro *et al.*, 1993), denominadas GSK-3 α y GSK-3 β . Estas dos isoformas tienen actividad quinasa autónoma y presentan similares, aunque no idénticas, preferencias por determinados

sustratos (Hughes *et al.*, 1992). La forma α codifica una proteína de unos 51 KDa, y la forma β codifica una proteína de 47 KDa, con una identidad entre ellas del 85% en su secuencia aminoacídica (Woodgett, 1990). Ambas tienen, a su vez, una homología muy significativa con la secuencia de *zeste-white3/shaggy* (*zw3⁸⁸*) de *Drosophila melanogaster*, un gen homeótico implicado en programas de desarrollo (Bourois *et al.*, 1990; Siegfried *et al.*, 1990; 1992; Woodgett, 1991; Plyte *et al.*, 1992). Ambas subunidades son proteínas de unión a microtúbulos (Mandelkow *et al.*, 1992) y se encuentran en elevados niveles en el cerebro (Woodget, 1990). GSK-3 β es idéntica a la quinasa I de la proteína tau (*TPK1*) (Pines, 1993).

Se han clonado numerosos genes en distintos organismos que presentan una gran similitud con los miembros de esta familia, como en *S. cerevisiae* (Neigeborn y Mitchell, 1991; Shero y Hieter, 1991; Bowdish *et al.*, 1994; Puzzis *et al.*, 1994; Hardy *et al.*, 1995; Casamayor *et al.*, 1996; Hunter y Plowman, 1997), *Arabidopsis thaliana* (Bianchi *et al.*, 1994; Jonak *et al.*, 1995), *Dyctiostelium discoideum* (Harwood *et al.*, 1995), *Medicago sativa* (alfalfa) (Pay *et al.*, 1993), entre otros.

Aunque el mecanismo de regulación de los enzimas de mamíferos no es muy conocido, parece que ambas formas, al igual que la quinasa de la mosca de la fruta, se encuentran fosforiladas en una tirosina conservada. Tanto la actividad como la función, al menos de la forma β , parecen ser dependientes de esta fosforilación. Este residuo tirosina está conservado en todos los miembros de la familia GSK-3 y es equivalente al requerido para la actividad de las quinasas MAP, aunque, a diferencia de éstas, GSK-3 parece

estar fosforilada, y por lo tanto activa, en células que no están en división (Hughes *et al.*, 1993). También se ha observado que ambas formas, α y β , son inactivas cuando están fosforiladas en la Ser 9 y Ser 21, respectivamente, y que pueden ser reactivadas, al menos *in vitro*, por la fosfatasa PP-2A (Sutherland *et al.*, 1993).

En *S. cerevisiae* se han encontrado cuatro genes relacionados con la familia GSK-3, *MCK1*, *MDS1/RIM11/ScGSK-3*, *MRK1* y, recientemente, tras el proceso de secuenciación del genoma de esta levadura, se ha encontrado una cuarta *ORF* que codifica una proteína de características similares a las de esta familia, YOL128C.

6.1.1. EL GEN *MCK1*

El gen *MCK1* fue identificado inicialmente por Dailey y colaboradores (Dailey *et al.*, 1990) como *YPK1*. Estos autores purificaron y caracterizaron un enzima capaz de fosforilar residuos de tirosina en polímeros de Glu y Tyr. La actividad se encontraba asociada a una proteína de 40 KDa, fosforilada en tirosina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, una vez clonado el gen que codificaba dicha proteína (40p), observaron que la secuencia aminoacídica presentaba más parecido con proteínas previamente descritas y clasificadas en otro grupo distinto, las serin-quinazas

Inicialmente, la mayoría de las proteín-quinazas habían sido clasificadas en dos grupos basándose en la especificidad por el aminoácido que se fosforila en la proteína sustrato (Hanks *et al.*, 1988). Una clase, las

Ser/Thr-quinasas, modifican serina, treonina o ambos aminoácidos; la otra clase, las tirosin-quinasas, fosforilan sólo tirosinas. Sin embargo, recientemente se han descrito proteínas con la capacidad "dual" de fosforilar tirosina y serinas o treoninas (Lim *et al.*, 1993). Mck1p pertenece a una nueva clase de quinasas capaz de fosforilar los tres hidroxí-aminoácidos, ya que lleva a cabo la autofosforilación, tanto en tirosina como en serina, y fosforila sustratos exógenos exclusivamente en serina y treonina (Lim *et al.*, 1993).

Mck1p presenta gran similitud en ciertos aspectos con las quinasas MAP, como son el tamaño y la homología de la secuencia aminoacídica; el hecho de que las quinasas MAP también están fosforiladas en dos aminoácidos *in vivo* (en el caso de las quinasas MAP en Tyr y Thr), y la similitud en la especificidad de sustrato, ya que tanto Mck1p como las quinasas MAP fosforilan MBP (*Myelin basic protein*), MAP-2 (*Microtubule-associated protein-2*) y la proteína tau de modo eficaz, aunque, en algunos casos, modifican residuos distintos (Lim *et al.*, 1993).

Sin embargo, Mck1p difiere bastante de la familia de las quinasas MAP en cuanto a su regulación. Las quinasas MAP poseen un motivo conservado -TEY-, y la fosforilación tanto de la Thr como de la Tyr es esencial para la actividad; además, esta activación de las quinasas MAP por fosforilación de este sitio conservado parece ser debida a la acción de otra quinasa, una quinasa de la quinasa MAP (MAPKK). Por el contrario, la fosforilación del residuo Tyr en Mck1p es consecuencia de una autofosforilación, y no parece ser necesaria para su actividad catalítica (Lim *et al.*, 1993).

Estos datos, junto con el hecho de que comparte una gran homología con la glucógeno sintetasa quinasa-3 de mamíferos, y otros genes homólogos clonados en distintos organismos, sugieren que Mck1p participa en rutas de regulación diferentes a las rutas en las que están implicadas las quinasas MAP en mamíferos.

Se ha observado que el gen *MCK1* juega tres importantes papeles en *S. cerevisiae*: es un activador transcripcional de *IME1*, está implicado en la maduración de esporas y facilita la actividad centromérica durante la mitosis.

6.1.2. FUNCIÓN DE *MCK1* EN LA SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA

El mantenimiento de una ploidía cromosómica correcta en las células eucariotas durante la división mitótica, requiere la conjunción de una serie de procesos complejos que están perfectamente controlados temporalmente, gracias a un sistema en el que interviene la maquinaria del ciclo celular. Un componente esencial del aparato mitótico es el cinetocoro, una estructura macromolecular compleja que juega un papel crítico en la segregación cromosómica durante la mitosis y la meiosis, ya que proporciona el sitio de anclaje del cromosoma al huso mitótico. Aunque en eucariotas el cinetocoro está morfológicamente bien definido, se sabe muy poco acerca de las proteínas específicas que son necesarias para su correcto funcionamiento.

El DNA centromérico de *S. cerevisiae* ha sido ya aislado y está perfectamente caracterizado. La función centromérica plena se localiza en el

locus CEN, una secuencia de tan sólo 125 pb. Este *locus* está organizado en tres dominios, dos secuencias altamente conservadas (CDEI, de 8 pb, y CDEIII, de 25 pb) que se encuentran flanqueando una zona central rica en A+T (CDEII) (Hieter *et al.*, 1985; Clarke, 1990). Los análisis de mutaciones y deleciones sobre estas regiones en diversas levaduras indican que tanto las secuencias CDEI como CDEII no son absolutamente esenciales, pero son necesarias para una estabilidad óptima de los cromosomas. Sin embargo, la secuencia denominada CDEIII es esencial para la función centromérica.

Shero y Hieter (Shero y Hieter, 1991) analizaron un gran número de mutaciones de DNA centromérico, observando sus efectos sobre la segregación mitótica. En un determinado grupo de mutaciones se producían emparejamientos cromosómicos parciales, dando lugar a una tasa de pérdida de los mismos de 10 a 50 veces mayor a lo normal. Estos mutantes fueron utilizados como base para la búsqueda de supresores. Con estos experimentos identificaron dos secuencias de DNA, que denominaron *CMS1* y *CMS2*, de (*Centromere mutant suppressor*). *CMS1* resultó ser el gen previamente clonado por Dailey y colaboradores, *TPK1* (Dailey *et al.*, 1990), y fue renombrado posteriormente como *MCK1* (*Meiosis and centromere regulator kinase*) para reflejar la implicación de este gen en el control de la transmisión cromosómica y en la inducción de la meiosis. En multicopia, el gen *MCK1* suprime dos mutaciones similares del DNA centromérico CDEIII, sin embargo, no afecta a mutaciones con deficiencias comparables en CDEI o en CDEII (Shero y Hieter, 1991), por lo tanto, su actividad parece bastante específica en este punto.

La interrupción del gen (Shero y Hieter, 1991) demostró que no es esencial para el crecimiento a 30°C, sin embargo, los mutantes *mck1⁰* presentan dos fenotipos potencialmente informativos: letalidad condicional a 11°C y un lento crecimiento en benomil, una droga que desestabiliza los microtúbulos y que ha sido muy utilizada para la identificación de genes implicados en la función de los mismos (Hoyt *et al*, 1990; Stearns *et al*, 1990). En presencia de esta droga, o durante el crecimiento a temperaturas semi-permisivas, el mutante muestra un incremento en la tasa de pérdida de cromosomas. Esto sugiere que Mck1p podría estar implicada en una ruta bioquímica importante para la segregación mitótica. Se cree que la β -tubulina es la única diana intracelular del benomil (Thomas *et al*, 1985), por lo tanto, el hecho de que la mutación *mck1⁰* sea hipersensible a esta droga, hace suponer que Mck1p está relacionada con la función de los microtúbulos. Podría ser, por ejemplo, importante para la estabilidad del huso mitótico fosforilando una proteína asociada a los microtúbulos. Según este modelo, la supresión de las mutaciones centroméricas en CDEIII (las cuales, por sí mismas, producen un descenso en la estabilidad de las interacciones con los microtúbulos), se explicaría por un incremento compensatorio en la estabilidad general de los microtúbulos provocada por un incremento en la dosis génica de *MCK1*. De hecho, los microtúbulos se desestabilizan a bajas temperaturas, y la interrupción del gen *MCK1* es sensible a dichas temperaturas (Shero y Hieter, 1991).

Durante los periodos pre-mitótico y meiótico se producen numerosos procesos de desfosforilación en la célula. Hay muchas proteínas que se

encuentran específicamente fosforiladas en el estado G₂ tardío del ciclo celular y que se desfosforilan justo antes de la mitosis (Westwood. *et al*, 1985; Lohka *et al*, 1987; Nurse, 1990). Los centros organizadores de los microtúbulos (incluidos los cinetocoros), contienen fosfoproteínas (Davies *et al*, 1983; Vandre *et al*, 1984) y algunas de esas fosfoproteínas se sabe que forman parte del complejo que se une CDEIII.

Se ha caracterizado un complejo multimérico de unos 240 KDa, que se une al locus CDEIII (Lechener y Carbon, 1991). Este complejo, denominado CBF3, es aparentemente esencial para la función del centrómero. *In vitro* se une al DNA centromérico salvaje, sin embargo, un único cambio en un determinado sitio de la secuencia de CDEIII impide esta unión, provocando una inactivación de la función centromérica. (Ng y Carbon, 1987; Lechener y Carbon, 1991). El complejo CBF3 está formado por tres subunidades de 110, 64 y 58 KDa. Los genes que codifican dos de estas subunidades han sido caracterizados. Determinadas mutaciones en el gen *CBF2*, que codifica para la subunidad de 110 KDa, dan lugar a una serie de defectos en la segregación cromosómica (Goh y Kilmartin, 1993; Doheny *et al.*, 1993), lo que confirma el papel esencial de esta subunidad *in vivo*. El gen *CTF13* codifica la subunidad de 58 KDa. (Doheny *et al.*, 1993), y el mutante *ctf13* produce una segregación de cromosomas incorrecta a temperaturas permisivas y el paro de la división celular a temperaturas restrictivas, formando grandes células gemantes que se detienen al llegar a la fase G₂ y presentan un huso mitótico corto (Doheny *et al.*, 1993). Además de un posible sitio de unión a DNA, encontrado en la proteína Cbf2p, las

secuencias aminoacídicas de ambas subunidades no presentan características que revelen funciones conocidas.

También ha sido clonado un gen, denominado *DBF5* (Jiang *et al.*, 1993), que codifica una proteína de 55 KDa, que contiene una secuencia repetitiva KKD/E cerca del extremo carboxilo. Esta secuencia es similar a los conocidos dominios de unión a microtúbulos de las proteínas MAP-1A y 1B (*Microtubule-associated protein*). Se ha visto que la proteína Cbf5p se une a los microtúbulos *in vitro*. Sin embargo las proteínas que carecen de este dominio altamente cargado en el extremo carboxilo no son capaces de llevar a cabo esta unión. Las células en división que contienen un gen *CBF5* truncado en el secuencia C-terminal, y que dan lugar a una proteína que contiene sólo tres copias de la repetición KKD/E, presentan un retraso en el ciclo después de la replicación del DNA en la fase G1/M, mientras que la ausencia total de la proteína da lugar al paro de la mayoría de las células en G1/S. También se ha visto que la sobreexpresión del gen *CBF5* suprime el efecto causado por las mutaciones *cbf2/ndc10*, que son sensibles a la temperatura, lo que sugiere una asociación directa o indirecta de la Cbf5p con la subunidad de 110 KDa. del complejo CBF3 *in vivo*. (Jiang *et al.*, 1995).

Se ha observado que el gen *MCK1*, en elevado número de copias, es capaz de suprimir la sensibilidad a temperaturas no permisivas que provocan determinadas mutaciones tanto en el gen *CBF2*, como en el gen *CBF5*. También se ha demostrado que Mck1p es capaz de fosforilar residuos Thr en la proteína Cbf2p *in vitro* (Jiang *et al.*, 1995). Esto apoya la teoría de que las

dianas intracelulares de Mck1p podrían ser alguna de las proteínas de unión al DNA centromérico aunque, aparentemente, no sería la única quinasa capaz de fosforilar el complejo CBF3, o algún componente del mismo, ya que *MCK1* no es un gen esencial.

6.1.3. *MCK1* COMO ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL DE *IME1*

La meiosis y la formación de esporas en *S. cerevisiae* están sujetas a dos tipos de regulación. Una depende de las condiciones ambientales, y es transmitida a través de distintas rutas, siendo una de ellas mediada por la proteína-quinasa dependiente de cAMP (Matsumoto *et al.*, 1983; Cameron *et al.*, 1988). Una reducción de la actividad de esta quinasa, en medios con carencias nutritivas, está asociada con la expresión de *IME1* (*Inducer of meiosis*), un elemento clave para la entrada de las células en meiosis. Un incremento en la actividad de la quinasa dependiente de cAMP impide la expresión de *IME1*, incluso en medios de esporulación (Matsuura *et al.*, 1990). Las señales a las que responde esta ruta de regulación no están del todo claras.

Un segundo grupo de genes transmite la señal del tipo celular. Sólo las células a/α , típicamente diploides, que expresan los productos $a1$ y $\alpha2$, pueden entrar en meiosis cuando hay escasez de glucosa y nitrógeno en el medio de cultivo. Las proteínas $a1$ y $\alpha2$ son los productos de los alelos *MATa* y *MAT α* , respectivamente (Herskowitz, 1988). Los productos de estos genes interactúan para formar un represor transcripcional (Goutte y

Johnson, 1988; Dranginis, 1990) que impide la expresión de un inhibidor de la meiosis, *RME1* (*Regulator of meiosis*), cuyo producto bloquea la expresión de *IME1* (Mitchell y Herskowitz, 1986; Kassir *et al.*, 1988; Covitz *et al.*, 1991). Por otro lado, $\alpha 1$ - $\alpha 2$ permite, de un modo indirecto, una elevada expresión de un regulador positivo de la meiosis, el producto de *IME4*, que estimula, a su vez, la expresión de *IME1* (Shah y Clacncy, 1992). Para que se produzca un elevado nivel de expresión de *IME4* en células α/α , es necesaria la ausencia de nitrógeno, por lo tanto, *IME4* transmite no sólo una señal génica específica, sino también una señal nutricional. Dado que $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se expresan juntos, normalmente en células diploides, esta señal genética asegura que la esporulación se produzca sólo en células capaces de producir esporas haploides viables.

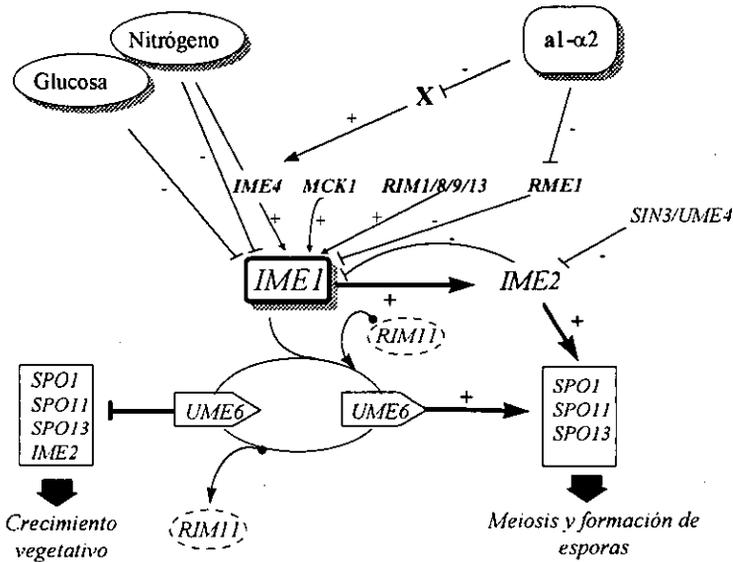


Figura 25. Esquema general de regulación de la meiosis en *S. cerevisiae*.

Ambas señales, genéticas y nutricionales, estimulan la expresión del activador de la meiosis *IME1*. Uno de los principales papeles de este regulador es estimular la expresión de genes específicos de la esporulación (Smith y Mitchell, 1989; Mitchell *et al.*, 1990; Engebrecht y Roeder, 1990; Kihara *et al.*, 1991).

Uno de los genes específicos de la esporulación de expresión más temprana es *IME2* (Yoshida *et al.*, 1990) que, a su vez, activa otros genes específicos de la esporulación. El producto de *IME1*, sin embargo, puede activar la expresión de genes específicos de la esporulación de un modo independiente de *IME2*. *IME1*, no sólo está regulado negativamente por el producto de *RME1*, sino que también está sujeto a una retroregulación. En células diploides, con capacidad de esporular, la transcripción de *IME1* es transitoria, y dependiente de las múltiples señales comentadas. Sin embargo, en diploides que presentan una disrupción del gen *IME2*, o del propio *IME1*, se observa una acumulación continua del transcrito de *IME1*, lo que sugiere que esta autorregulación se manifiesta a través de *Ime2p*, o de un gen cuya expresión, o bien la actividad de su producto, requiera *Ime2p* (Shefer-Vaida *et al.*, 1995). Sin embargo, se desconoce el mecanismo de esta autorregulación, ya que no existen evidencias de que *Ime1p* se una a su propio promotor (Shefer-Vaida *et al.*, 1995), ni de que se una al promotor de *IME2* (Smith *et al.*, 1993).

Neigeborn y Mitchell (Neigeborn y Mitchell, 1991) hicieron una búsqueda de genes que, en alto número de copia, fuesen capaces de superar el bloqueo meiótico producido como consecuencia de un incremento en la

expresión del regulador negativo *RME1*. Para ello, utilizaron una línea diploide a/α transformada con un plásmido multicopia que portaba el gen *RME1*. El resultado del análisis fue la clonación de un gen distinto a *IME1* y a *IME2* que, inicialmente denominaron *IME3*. Sin embargo, la secuencia del gen demostró que se trataba del gen previamente clonado, *YPK1* (Dailey *et al.*, 1990) y que estaba siendo paralelamente estudiado por Shero y Hieter (Shero y Hieter, 1991), *MCK1*.

Los mutantes *mck1⁰* acumulan ascas inmaduras, aunque todos los mutantes retienen cierta capacidad de esporular. Esta esporulación residual sugiere la posibilidad de la existencia de una segunda quinasa que pudiese actuar sobre el/los sustrato/s de *MCK1*, o bien, la existencia de alguna ruta de regulación paralela que conduzca también a la activación de la esporulación. Un incremento en la dosis génica de *MCK1* acelera la esporulación. Este fenotipo es debido a que *MCK1* regula positivamente al activador *IME1*. En multicopia, *MCK1* produce un incremento en la expresión de *IME1*, lo que conduce a una aceleración de la esporulación, sin embargo, en los mutantes *mck1⁰* se ha observado que la expresión de *IME1* se ve reducida. No se conoce, sin embargo, cómo *MCK1* ejerce su control sobre la expresión de *IME1*. El estudio del promotor de *MCK1*, mediante ensayos β -galactosidasa, indican que *MCK1* no responde a las señales generales que inducen la esporulación, ya que no responde ni al tipo celular, ni a las carencias nutricionales. De hecho, su expresión es constitutiva y el producto de *MCK1* es activo en células vegetativas (Neugeborn y Mitchell, 1991). Sí parece que actúa, o bien por debajo del nivel regulador de *RME1*,

o bien, de modo paralelo, ya que la sobre-expresión de *MCK1* no inhibe la transcripción del regulador negativo *RME1*.

Las mutaciones *mck1* producen también una morfología anormal de las ascas. Este fenotipo parece ser independiente del papel regulador de *MCK1* sobre *IME1*, ya que en mutantes *mck1⁰* que sobre-expresan *IME1*, al poner a este gen bajo el control de un promotor inducible, como el del gen *GAL1*, se produce un porcentaje de esporulación igual al de las células salvajes *MCK1*. Sin embargo, se acumulan ascas esféricas inmaduras de las mismas características que los mutantes *mck1⁰* no transformados con *P_{GAL1}-IME1* (Neigeborn y Mitchell, 1991).

Claramente, muchos genes están implicados en la regulación de *IME1*. Su y Mitchell (1993a) aislaron distintos mutantes que afectan a la expresión de *IME2*, denominados mutantes *rim* (*Regulator of IME2*). Varios de estos grupos de complementación, *RIM1*, *RIM8*, *RIM9* y *RIM13*, que estos autores designan como genes de la ruta *RIM1*, estimulan la transcripción de *IME1*, al igual que *MCK1*, pero a través de una ruta independiente, ya que los fenotipos causados por las mutaciones de estos genes son algo diferentes.

Los mutantes *mck1* crecen bien a 17°C pero, a esta temperatura, son hipersensibles al benomil (Shero y Hieter, 1991). Sin embargo, los mutantes *rim1/8/9/13* crecen muy mal a 17°C, pero no son sensibles al benomil. Los mutantes *mck1* acumulan ascas inmaduras, pero retienen un 2% de la capacidad de esporular. Los mutantes *rim1/8/9/13* acumulan un mayor número de ascas inmaduras pero, a diferencia de lo que ocurre con los mutantes *mck1*, las ascas son capaces de madurar, finalmente, tras largos

periodos de incubación. La morfología de las colonias también es diferente entre estos dos tipos de mutantes, ya que la interrupción de *MCK1* da lugar a la formación de colonias de tipo rugoso, mientras que, en los mutantes *rim1/8/9/13*, las colonias son de aspecto liso (Su y Mitchell, 1993a).

Si bien las distintas combinaciones posibles de interrupciones entre los genes *MCK1*, *RIM1* y *IME4* todavía permiten la expresión de *IME2* y la esporulación, el triple mutante no. Esto sugiere que los tres genes actúan a través de rutas independientes para estimular la expresión de *IME2* y, por consiguiente, la esporulación. La presencia de tres segmentos similares a dedos de zinc y una región ácida, que parecen ser esenciales para la actividad de Rim1p, sugieren que esta proteína pudiese ser un activador transcripcional (Su y Mitchell, 1993b). Se desconoce si Rim1p activa la expresión de *IME1* directamente o si lo hace a través de *RIM8*, *RIM9* o *RIM13*, que parecen funcionar en la misma ruta de *RIM1* (Su y Mitchell, 1993a)

6.1.4. EL GEN *MDS1/RIM11/ScGSK-3*

ScGSK-3, como gen homólogo a genes de la familia GSK-3

Este gen ha sido aislado, al igual que *MCK1*, por diversos grupos de investigación. Bianchi y colaboradores (Bianchi *et al.*, 1993) utilizaron dos oligonucleótidos degenerados derivados de la región catalítica de *GSK-3* de mamíferos para amplificar una región de DNA de *S. cerevisiae* mediante

PCR. Con esta técnica consiguieron clonar dos fragmentos diferentes. Tras la secuenciación, se comprobó que uno de los clones correspondía al gen ya identificado como *MCK1*. El otro clon, sin embargo, resultó ser un nuevo gen, con una *ORF* de 1110 pb, que predecía una proteína de 370 aminoácidos con un peso molecular estimado de 42,9 KDa. La secuencia aminoacídica presentaba las características típicas de la familia *GSK-3*, y una gran homología con los miembros de la familia *GSK-3*, del orden de 53-62% de identidad (en la región catalítica de 66-69%), por lo que denominaron a esta *ORF* *ScGSK-3*. Esta identidad era mucho mayor, incluso, que la que compartía con *MCK1*, que era de tan sólo un 34% (38% en la región catalítica). Otros autores aislaron este gen por vías totalmente independientes pero muy relacionadas con las funciones que presenta el gen *MCK1*. *MDS1* fue clonado como un supresor de varios fenotipos del mutante *mck1*, relacionados con su función centromérica (Puzzis *et al.*, 1994). *RIM11* fue clonado como resultado de una selección de mutantes de la meiosis en *S. cerevisiae* y localizado en una región del cromosoma *XIII* muy cercana al gen *CIN4* (Mitchell y Bowdish, 1992). Tras el análisis del contenido de los plásmidos que contenían fragmentos del clon original, se constató que el gen *RIM11* era idéntico a *MDS1* (Bowdish *et al.*, 1994).

MDS1 como supresor de la mutación mck1⁰

El hecho de que la sobre-expresión de *MCK1* pudiese suprimir los fenotipos generados por mutaciones en la región CDEIII, así como el hecho de que los mutantes *mck1* mostrasen una elevada tasa en la pérdida de

cromosomas en benomil, indicaban, como ya se ha apuntado, que *MCK1* debe estar implicado en algún proceso de la segregación cromosómica. Puzzis y colaboradores (Puzzis *et al.*, 1994) explotaron el fenotipo sensible a bajas temperaturas de los mutantes *mck1* para la selección de genes que, en alto número de copia, pudiesen suprimir dicho fenotipo. Su teoría se basaba en que tales genes deberían codificar sustratos de *MCK1*, o bien factores que desempeñasen algún papel en un paso posterior en la ruta de regulación de *MCK1*. Alternativamente, no descartaban la posibilidad de aislar genes con especificidad de sustrato similar a la de *MCK1*, que podrían fosforilar componentes de la ruta de regulación de *MCK1* cuando se sobre-expresaban.

Por este método, de hecho, clonaron un gen que, al igual que *MCK1*, codifica una Ser/Thr-quinasa. La interrupción del gen *MDS1* tampoco es letal, lo que sugiere que, en el hipotético caso de que ambas proteínas tuviesen funciones redundantes, debe haber más quinasas en *S. cerevisiae* implicadas en tales funciones. Al contrario de lo que ocurre con los mutantes *mck1⁰*, las células que portan la interrupción de *MDS1* crecen de modo normal en todas las temperaturas ensayadas y no son sensibles al benomil. La interrupción de *MCK1* produce un defecto en la meiosis en células diploides, pero los mutantes consiguen esporular, al menos, un 2% respecto a la línea salvaje. En el caso de la interrupción de *MDS1*, se produce un bloqueo antes de la primera división meiótica, indicando que el producto de este gen es totalmente necesario para completar el proceso de meiosis (Puzzis *et al.*, 1994).

En alto número de copia, *MDS1* es capaz de suprimir los fenotipos sensibles a bajas y altas temperaturas, pero no así la pérdida de cromosomas durante el crecimiento en benomil de los mutantes *mck1⁰*. Además, al contrario de lo que ocurre con *MCK1*, la presencia de *MDS1* en multicopia no suprime la pérdida de fragmentos cromosómicos no esenciales en mutaciones puntuales de la secuencia CDEIII (Puzzis *et al.*, 1994).

Una de las funciones atribuidas a la *GSK-3* de mamíferos es la de controlar el metabolismo de glucógeno, a través de la fosforilación e inactivación de la glucógeno sintetasa. La interrupción de *MDS1* no tiene ningún efecto sobre el contenido de glucógeno en las células. La interrupción de *MCK1* da lugar a una reducción en el almacenamiento de glucógeno, justo lo contrario de lo que se espera al perder un regulador negativo de la glucógeno sintetasa. O bien la fosforilación de glucógeno sintetasa no produce el efecto regulador que se le atribuía en mamíferos, o el mecanismo de regulación es distinto en *S. cerevisiae*. Otra posibilidad que estos autores apuntan es la de que pueda existir otro gen en *S. cerevisiae* que sea funcionalmente homólogo a *GSK-3* y que sí esté relacionado con el metabolismo del glucógeno (Puzzis *et al.*, 1994).

Al contrario de lo que ocurre con *MCK1*, hay pocas evidencias de que *MDS1* codifique un factor necesario para la segregación normal de cromosomas. Es posible que Mds1p sea capaz de fosforilar algún factor(es) implicado(s) en la segregación cromosómica que, normalmente, son el sustrato de Mck1p, aunque con una menor especificidad, y que el incremento en la dosis de Mds1p pueda compensar la pérdida de Mck1p. De hecho,

tanto *MDS1* como *MCK1*, codifican quinasas con especificidad de sustrato similar al de *GSK-3* de mamíferos (Puzzis *et al.*, 1994).

RIM11 como activador meiótico de IME1.

La entrada en la meiosis, como ya se ha comentado, viene acompañada de un incremento en la expresión de *IME1*, cuyo producto, Ime1p, activa la expresión de *IME2* y otros genes meióticos. *IME1* transmite dos tipos de señales, una de tipo nutricional, carencia de fuente de carbono y nitrógeno, y otra que trasmite la señal del tipo celular diploide.

Tras el agotamiento de nitrógeno en presencia de glucosa, las células inician una transición morfológica desde la forma de levadura a la forma pseudohifal (Gimeno *et al.*, 1992). El agotamiento de nitrógeno en presencia de fuentes de carbono no fermentables induce a las células a entrar en el ciclo meiótico. Estas dos señales, determinan la disponibilidad de Ime1p en las células. La transcripción de *IME1* es reprimida por glucosa y sólo se detecta un nivel muy bajo de expresión cuando el acetato es la única fuente de carbono. (Kassir *et al.*, 1988). El agotamiento de nitrógeno, por el contrario, induce la transcripción de *IME1* (Kassir *et al.*, 1988). Sin embargo, cuando en condiciones experimentales se induce la expresión de *IME1* en cultivos vegetativos, tanto en glucosa como en acetato, poniendo la ORF bajo el control de un promotor inducible, los genes específicos de la meiosis no se expresan, y la meiosis no se induce. Esto sugiere que el agotamiento de nutrientes no es únicamente necesario para la activación

transcripcional de *IME1*, sino también para la activación de *Ime1p*, o bien, para la expresión o activación de un factor adicional (Sherman *et al.*, 1993).

La señal del tipo celular se refleja tanto en el hecho de que los niveles de expresión de *IME1* son mayores en células *a/α* que en células *a* o *α* bajo condiciones de carencias nutricionales, como en el hecho de que un incremento en la dosis de *IME1* permite también a las células haploides entrar en meiosis (Kassir *et al.*, 1988). Una expresión inadecuada (ectópica) de *IME1*, al ponerlo bajo el control del promotor *GAL1*, permite a las células haploides *a* y *α* expresar genes meióticos (Smith *et al.*, 1990).

La expresión de *IME1* es tóxica en células haploides que se encuentran en un medio con carencias nutricionales, posiblemente, porque *Ime1p*, en estas condiciones, las dirige hacia la meiosis (Mitchell y Bowdish, 1992). Esta toxicidad es mucho mayor en mutantes *rad52*, que presentan una incapacidad para reparar las roturas de la doble hebra de DNA en los cromosomas, roturas que se producen durante la meiosis (Sun *et al.*, 1989; Prakash *et al.*, 1993; Dutta *et al.*, 1996).

Basándose en este principio de letalidad, Mitchell y Bowdish (Mitchell y Bowdish, 1992) utilizaron una línea haploide *P_{GAL1}-IME1 rad52::LEU2* para seleccionar mutantes espontáneos resistentes a la toxicidad que provoca la sobreexpresión de *IME1* en medios de esporulación (*Spo*). Era de esperar también que apareciesen mutantes *Spo^r* con defectos tanto en el propio *P_{GAL1}-IME1*, como en *IME2* utilizando este tipo de

búsqueda. De este modo fueron identificados, además, dos nuevos genes, *RIM11* y *RIM16*.

El principal papel de Rim11p es estimular la esporulación, ya que los mutantes *rim11⁰* provocan un defecto absoluto en la esporulación y causan, también, un severo defecto en la transcripción de genes tempranos de la meiosis, como *IME2*, *RIM4*, *SPO13* y *HOP1*, pero no de *IME1*. Todos estos genes presentan varias características comunes: poseen sitios URS1 en el promotor, dependen de Ime1p para su expresión y, al menos dos (*IME2* y *SPO13*) están regulados negativamente por Sin3p y Ume6p (Bowdish y Mitchell, 1993; Steber y Esposito, 1995).

UME6 codifica una proteína de unión a DNA que se une al sitio URS1, una secuencia específica que se encuentra en la región 5' de muchos genes, incluyendo los genes que se expresan al inicio de la meiosis (Anderson *et al.*, 1995). El propio *RIM11* tiene un sitio URS1 (TACCGCCCA) en la posición -526 respecto al codón de iniciación (Bowdish *et al.*, 1994). Varios genes específicos de la meiosis contienen, además, otros sitios reguladores positivos adyacentes a URS1, como T₄C en *IME2*, o UAS_H en *IME1* o *HOP1* (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996).

Ume6p es un regulador negativo de genes específicos de la meiosis en células vegetativas, sin embargo, parece convertirse en un activador de estos mismos genes bajo condiciones que inducen la meiosis (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996). Tanto la represión vegetativa como las señales de activación de la meiosis son transmitidas al sitio URS1 directamente a través de Um6p. Dado que Ime1p no se une al DNA directamente, se ha propuesto que esta proteína

pueda activar la expresión de los genes específicos que se expresan al inicio de la meiosis mediante la asociación con Ume6p para unirse al sitio URS1 (Steber y Espósito, 1995).

Ume6p parece unirse a un dímero de Ime1p (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996). Rim11p podría ser necesaria para la dimerización de Ime1p y para la interacción con Ume6p. Dicha interacción es inhibida por la presencia de glucosa y depende del agotamiento de nitrógeno. Para que se lleve a cabo es necesario, también, que Ime1p esté fosforilada por Rim11p. Sin embargo, no se sabe cómo Rim11p media la señal nutricional. Rim11p interactúa con Ime1p incluso en condiciones vegetativas (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996), pero podría fosforilar a Ime1p sólo en condiciones de carencia nutritiva, fosforilación que podría conducir tanto a la asociación de Ime1p con Ume6p, como a su propia autoasociación para formar el dímero. Sin embargo, no se ha determinado si la fosforilación de Ime1p por Rim11p está regulada por nutrientes, por lo que el mecanismo mediante el cual Rim11p transmite la señal nutricional no queda del todo claro (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996).

6.1.5. EL GEN *MRK1*

Este gen *MRK1* (*Mds1p related kinase*) fue clonado por Hardy y colaboradores (Hardy *et al.*, 1995) utilizando dos oligonucleótidos degenerados correspondientes a la secuencia de la GSK-3 β de cerebro de rata y amplificando el DNA genómico mediante *PCR*. El producto de dicha *PCR* fue utilizado posteriormente como sonda, para analizar una librería de

DNA genómico de levaduras. De este modo, aislaron un único clon cuya secuenciación reveló la existencia de una *ORF* que predecía una proteína de 375 aminoácidos, con un peso molecular de unos 43 KDa. La secuencia presentaba una gran homología con los miembros de la familia *GSK-3*, así como las características compartidas por la proteína-quinasa descritas por Hanks y colaboradores (Hanks *et al.*, 1988).

Al igual que *MCK1* y *MDS1*, *MRK1* no es un gen esencial, ya que su interrupción da lugar a células viables. Tampoco se han observado defectos en el crecimiento y morfología de los mutantes *mrk1⁰*. Todos los estudios en distintas fuentes de carbono y a distintas temperaturas indican que no hay diferencias respecto a la línea parental en estas condiciones. Tampoco se observan diferencias en cuanto a la acumulación de glucógeno. Los triples mutantes *mck1⁰*, *mds1⁰*, *mrk1⁰* también son viables, y no presentan fenotipos distintos respecto al crecimiento en distintas fuentes de carbono, sensibilidad a temperatura o supervivencia a choque térmico respecto a la línea *mck1⁰ mds1⁰* (Hardy *et al.*, 1995).

6.1.6. LA *ORF* *YOL128C*

Durante el proyecto de secuenciación del DNA genómico de *S. cerevisiae*, se ha encontrado una nueva *ORF*, que codifica una proteína de 375 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 43.2 KDa (Casamyor *et al.*, 1996; Hunter y Plowman, 1997). La secuencia aminoacídica que

predice esta *ORF* presenta grandes homologías con los miembros de la familia *GSK-3*, fundamentalmente con el gen *MCK1* de *S. cerevisiae*.

Hasta el momento los procesos meióticos en *Kluyveromyces* no han sido estudiados, sin embargo se ha observado que los diploides son mucho más inestables que en *S. cerevisiae* (Wésolowski-Louvel *et al.*, 1996). La identificación de la *ORF2*, descrita previamente en este trabajo, como una proteína-quinasa de la subfamilia de las *GSK-3* implicada en los procesos de meiosis en levadura abre las posibilidades de estudio de la regulación de este proceso en *K. lactis*.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA REGIÓN CODIFICADORA

La secuencia aminoacídica de las proteínas de la familia *GSK-3* presenta un porcentaje de homología muy elevado a lo largo de todo el dominio catalítico, presentando, en todos los casos, los once dominios conservados característicos de Ser/Thr-quinasas descritos por Hanks y colaboradores (Hanks *et al.*, 1988), así como los 18 residuos invariables, o casi invariables, en todas las proteína-quinasas conocidas. También aparece conservado un motivo de unión a ATP y un residuo de tirosina que parece estar sujeto a regulación por fosforilación en *GSK-3* de mamíferos y en el gen *shaggy/zeste white3* de *D. melanogaster*. Esta similitud desciende considerablemente fuera del dominio catalítico, aunque algunas secuencias presentan residuos conservados fuera de este dominio, como la secuencia FDEL, que aparece inmediatamente después del dominio catalítico de algunos genes, pero no aparece, por ejemplo, en *MRK1* o en *MCK1* de *S. cerevisiae* (Fig. 26).

El alineamiento de la proteína deducida a partir de la secuencia codificadora de *KIGSK-3* con varias proteínas de la familia *GSK-3*, como *MDS1/RIM11/ScGSK-3* y *MCK1* de *S. cerevisiae*, *GSK-3 β* de humanos y *shaggy/zeste white3* de *D. melanogaster*, mediante el programa Clustal V (Higgins *et al.*, 1992), muestra que la secuencia aminoacídica de *KIGSK-3*

contiene todos los dominios definidos por Hanks y colaboradores (Hanks *et al.*, 1988) de las proteín-quinasas. Presenta, además, varios motivos característicos de la familia *GSK-3*, que incluyen secuencias muy conservadas en esta familia, a excepción de *MCK1*, que sólo presenta el motivo SYICSR/YRAPEL altamente conservado. También presenta el motivo de unión a ATP y la tirosina conservada, tal y como se puede observar en la figura 26. Esta homología es particularmente elevada en aquellos dominios implicados en el reconocimiento del sustrato (VI-VIII) (Taylor *et al.*, 1992).

				I
K1GSK-3	-----	-----	-----	SCGTPEIVGNGSFGV
MDS1	-----	-----	-----	SFPTTEVVGHNSFGV
MRK1	-----	-----	-----	SYPTTEVVGHGSGV
HsGSK	-----	-----	KDGSKVTTVVATPGQGPDRPQEVSYTDTKVI	GHNSFGV
DmZw3	LARTQSCVSWTKVVQKFKNILGRDGSKITTVVATPGQGTDRVQEVSYTDTKVI			GHNSFGV
MCK1	-----	VKEYRKI	-----	SRGARGV
consensus				* * * * *
		II	III	IV
K1GSK-3	VFRTKVKETGED---	VVIKKVLQDRRFKNRELEIMKLI	SHPNLIDLKYYFLE-QSD-QE	
MDS1	VFATVIQETNEK---	VAIKKVLQDKRFKNRELEIMKML	SHINIDLKYYFFYERDSQ-DE	
MRK1	VVTTVIIETNQK---	VAIKKVLQDRRYKNRELEIMKML	CHPNVTGLQYYFYEKDEE-DE	
HsGSK	VYQAKLCDSGEL---	VAIKKVLQDKRFKNRELQIMRKL	DHCNIVRLRYFFYSSGEKKDE	
DmZw3	VFOAKLCDTIGEL---	VAIKKVLQDRRFKNRELQIMRKL	EHCNIVKLLYFFYSSGEKRDE	
MCK1	VVQAYLTQDKKNWLG	FAIKKVP	PAHTEYKSR	ELQILRIADHPNIVKLLQYFFTHLSPQDNK
consensus	*	****	****	* * * * *
	V		VIA	VIB
K1GSK-3	LYLNLIVDYMPSLYQLRKEFISLHQ	PMDRYEIKIYMFQ	LFKSLNYLHQVVNV	CHRDIKP
MDS1	IYLNLI	EYMPQSLYQLRHRHFVHQRT	PMSRLEIKYMFQ	LFKSLNYLHHFANV
MRK1	VYLNVL	VDYMPQSLYQLRHRHFVNLKMQMP	RVVEIKFYAYQLFKALNYLHN	VPRICHRDIKP
HsGSK	VYLNVL	DYVPETVYRVARHYSRAKQTL	LPVIYVKLYMYQLFRSLAYI	HSGF-I
DmZw3	VFLNL	VLEIYIPETVYKVARQYAKTKQ	TIPINFIRLYMYQLFRSLAYI	HSLG-I
MCK1	VYQHL	AAMECLPETLQIEINRYVTNKLE	MPKHIRLYTYQIARGMLYLH	GLG-V
consensus	... ****


```

K1GSK-3      MKVGELLESSGAGGSRSI IAYTNDKNAGFETEMDSILPSSDDLKQGSLHSK
MDS1         MNI-----QSN
              *..                               *.

K1GSK-3      NSHGNDVKIVPDEDEVI TRRTVVKGHSNPEESVVISCGTPEIVGNNGSFGV
MDS1         NSPNLSNNIVSKQVYAHPPPTI----DPNDPVQISFPTTEVVGHGSFGV
              **   .***. . . . . *...* ** * *...*****

K1GSK-3      VFRTKVKETGEDVVIKKVLQDRRFKNRELEIMKLI SHPNLIDLKYYFLE-
MDS1         VFATVIQETNEKVAIKKVLQDKRFKNRELEIMKMLSHINIIDLKYFFYER
              ** * ..** * * *****.*****. ** *...* *

K1GSK-3      QSDQELYNLNLI VYMPMSLYQRLKEFISLHQPM DRYEIKIYMFQLFKSLN
MDS1         DSQDEIYLNLI LEYMPQSLYQRLRHFVHQRT PMSRLEIKYMFQLFKSLN
              *.**.*...*****.*** *****..* . ** * *** *****

K1GSK-3      YLHQVNVCHRDIK PQNILVDPDTLL LKICDLGSAKQLKPN EPNVSYICS
MDS1         YLHGFANVCHRDIK PQNLLVDPETWSLKL CDFGSAKQLKPT EPNVSYICS
              ***. *****.***. * **.*...***** *****

K1GSK-3      RYYRAPELIFGATNYTTKIDIWSAGCVMAELL LGQPIFPGESKIDQLVEI
MDS1         RYYRAPELIFGATNYTNQIDIWSSGCVMAELL GQPMFPGESGIDQLVEI
              *****.*****.*****.***** *****

K1GSK-3      IKVLGTPTREEICSMNENYSEHKFPQIRPIPLNRIFK KETQETIDLLYHI
MDS1         IKILGTPSKQEI CSMNPNYMEHKFPQIKPIPLSRVFKKEDDQTV EFLADV
              **.*...***** ** *****.***.*.*** ..*...* ..

K1GSK-3      MKYDPNIRYSALQCMFNSTYFTDIVSNTGSDSNLSLIDSLPLLHFES-E
MDS1         LKYDPLERFNALQCLC-SPYFDELKLDGKINQIT--TDLKLLEFDENVE
              .**** *...*. * ** .. * .. . * **.*.* *

K1GSK-3      LQGLSSNDIYRLTGKLI----
MDS1         LGHLSPELSSVKKKLYPKSK
              * **... . **
    
```

Figura 27. Alineamiento de la secuencia completa de las proteínas K1Gsk-3p de *K. lactis* y Mds1p de *S. cerevisiae*.

6.2.2. COMPARACIÓN DEL USO DE CODONES CON OTROS GENES DE LA FAMILIA GSK-3

En la siguiente tabla se muestran los valores del ICDI (Freire-Picos *et al.*, 1994) de varios genes de la familia GSK-3 y de KIGSK-3 (Tabla 15).

Tabla 15. Medida del uso de codones sinónimos en genes de la familia GSK-3 de distintos organismos.

<i>Organismo</i>	<i>Gen</i>	<i>ICDI</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MDS1/RIM11/ScGSK-3</i>	0.14
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MRK1</i>	0.14
<i>S. cerevisiae</i>	<i>MCK1</i>	0.14
<i>H. sapiens</i>	<i>GSK-3α</i>	0.09
<i>D. melanogaster</i>	<i>shaggy/zeste white3</i>	0.08
<i>K. lactis</i>	<i>KIGSK-3</i>	0.16

Los resultados muestran que los genes de esta familia presentan valores de ICDI menores a 0,2, lo que sugiere que se trata de genes de baja expresión. El gen *KIGSK-3* presenta un valor de ICDI muy similar a los obtenidos para esta familia.

6.2.3. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DE KIGSK-3

En la figura 28 se muestra la secuencia nucleotídica de 840 pb previa al codón ATG de iniciación en la que se indican los elementos encontrados que se citan a continuación. La búsqueda de consensos se realizó a través del

programa FindPatterns del paquete GCG (Devereux *et al.*, 1984) o mediante el programa DNAsis (© de Hitachi Software Engineering Co., LTD).

```

-840 CCCCTTTCCTATCGGCTACCCCTTGCTCCATTTGCTCCTTGATCCCTGCCTAGGTGGCCCT
-780 GAGTGGCTTCCCTGCTTGTTCTTCTGGATGTGATCGGACTAACGGAGAAGTACTCACGAA
-720 CTTCCACTTTTCCCTGGCATCCGGTTCAGGAAAACTATACTATTTGAACAAGCAATCT
-660 TCTTCCTATTAAGTAATACTACGAAGGGGCAAACCTGTTCACTAGTCTGGCTAGTCAGTTT
-600 CTAGATTATTCTGTCCAGACAAAACTTTTCTTGCTTCTACGCATATACAAGGGAAGGC
-540 TCTCAACCCAGTCATGTCTTTCAGGCAAAAAAAAAAACTATTTTCGATTTCTCTCTCCTT
-480 CAATTTTTCCAGTAAGCTTGATTGGATACAATAAATGTCTGGACTAACAAAGCAATTTGCAA
-420 GCAGTTTTAGTTTACTCTTTCCGCTTAGTATTTATTGTCTGAATAAACTTTGAGAAAGA
-360 CATGAGGACATTGGAAAATTTTTCATTGAGCCAGACAAGAAAGACGATAAACTGTTGTT
-300 TTTAACCTTGATTCTCTCCCCCGCATAAATTTTGAATCGGTGTGCGCGTGTGTTTGTC
-240 AGTGCGTGTGCTGAATATTTTATTTTACTGGTCTTAGAAGACGTTGCGTGTTTGAAGTTT
-180 TTGGAAAATTTGGTGAAATTTAAGTAAAAAAAAAAGAACACCAAGAACAAGACTTCGCA
-120 TATAACAATTAACCACACACAGACAGATCAATCACTTTTATCTGTTGTGAGAGAGAAAGG
-60 ATTCAGAGAAAAGTGTGCATGTCAGCATAGTTTTTAGTACAATACTCCTTTTTTTTTTTGA
+1 ATG 3'

```

Figura 28. Secuencia nucleotídica de la región promotora del gen *KIGSK-3*. Las secuencias consenso están indicadas y son discutidas en el texto. Las posibles cajas TATA se indican con subrayado punteado; un consenso CACACA aparece en negrita; las repeticiones CTTCC en negrita y doble subrayado; sitios de unión para Gcn4p en una caja gris; consensos T₄C en negrita y subrayado. UAS_H aparecen en un recuadro.

En la región promotora del gen *KIGSK-3* se han encontrado dos secuencias similares a las cajas TATA descritas por Struhl (Struhl, 1989) en las posiciones -120 y -274, que se muestran en la figura 26 subrayadas con líneas punteadas. También aparece en posición la -108 una secuencia CACACA, que ha sido encontrada frente al codón ATG de iniciación de

varios genes de *S. cerevisiae*, por ejemplo en *CYCI* (McNeil, 1988) y que parece necesaria para la eficaz transcripción de los genes (Stiles *et al.*, 1981). Esta secuencia también se ha encontrado el gen de *K. lactis KIADHI* (Saliola *et al.*, 1990)

Ogden y colaboradores (Ogden *et al.*, 1986) identificaron tres repeticiones de la secuencia CTTCC en el promotor del gen *PGK1* de *S. cerevisiae*. Estas repeticiones, situadas hasta a -450 pb respecto del ATG, no son esenciales para la activación de la transcripción, pero parecen ser necesarias para la máxima expresión del gen. Cada bloque CTTCC contribuye a la expresión de *PGK1* de un modo distinto. Esta secuencia se ha encontrado en otros genes de *S. cerevisiae*, como *ENO1* (Cohen *et al.*, 1987), *ENO2* (Cohen *et al.*, 1987), *PDC1* (Butler y McConnell, 1988). En el promotor de *KIGSK-3* se encuentran tres repeticiones CTTCC en las posiciones -774, -720 y -659.

Un factor de regulación que se encuentra tanto en células haploides como en diploides, UBF (*UAS_H binding factor*) se une a la secuencia consenso UAS_H del gen *HOP1*, cuyo producto es necesario para la sinapsis y correcto emparejamiento de los cromosomas homólogos durante la primera división meiótica. Esta secuencia UAS_H se ha encontrado en la región promotora de varios genes específicos de la meiosis y de otros que se expresan durante el crecimiento vegetativo. En los genes específicos de la meiosis, este sitio, al igual que ocurre con la secuencia consenso TTTTCNNCG (T4C), está invariablemente ligado al sitio URS1 de unión a Ume6p. Algunos genes, como *DMC1*, *REC104* o *RED1* (Prinz *et al.*, 1995)

presentan tanto un UAS_H como un T₄C, junto con URS1, en su secuencia promotora. En el gen *HOP1* la regulación de la transcripción depende de ambos motivos, UASH y URS1. El sitio URS1 proporciona la regulación dependiente del ciclo celular (represión mitótica, activación durante la fase temprana de la meiosis y, probablemente, inactivación durante el resto de las fases de la meiosis). UAS_H es esencial para la activación transcripcional no específica del gen, mediando la activación parcial del gen tanto durante el crecimiento vegetativo como durante la esporulación (Prinz *et al.*, 1995). La desviación de la secuencia consenso de UAS_H, TNTGN^A/TGT, podría estar correlacionada con una reducción en la eficacia de unión con el factor UBF y, por lo tanto, con la activación de la transcripción. Este fenómeno también parece ocurrir en el caso del motivo T₄C (Bowdish y Mitchell, 1993). Dos secuencias, que se ajustan perfectamente a la secuencia consenso del motivo UAS_H, se han encontrado en el promotor de *KIGSK-3* en las posiciones -90 y -80. Aparecen también varias secuencias T₄C, pero se desvían algo de la secuencia TTTTCNNCG, siendo más común la secuencia TTTTCCNNTG.

Mediante el programa *FindPatterns* del paquete de programa *GCG* y utilizando como base de datos el fichero *Tfsites.dat* del propio *GCG*, se encontraron varias secuencias consenso de unión a la proteína reguladora Gcn4p. Esta proteína se une a una secuencia TGACTC en los promotores de varios genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos, cuya expresión responde a los niveles de compuestos nitrogenados en el medio, estimulando su síntesis (Hinnebush, 1988). Además reduce el consumo de aminoácidos en reacciones de biosíntesis ya que, tanto en mamíferos como en levaduras,

disminuye la tasa de síntesis de proteínas, mediante inactivación del factor eIF-2a por fosforilación (Hinnebush, 1994). Este proceso es considerado como un mecanismo adaptativo cuyo fin es el de conservar las fuentes nutricionales y limitar la división celular bajo condiciones de crecimiento adversas (Mager y Kruijff, 1995).

6.2.4. ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *KIGSK-3*

Para la realización del estudio funcional del gen *KIGSK-3* fue necesario volver a clonar un fragmento que contuviese la *ORF* completa, así como la región del promotor.

6.2.4.1. SUBCLONADO DEL GEN *KIGSK-3*

Para la clonación de la *ORF* más alejada de *KICYC1*, que contiene el gen *KIGSK-3*, se insertó el fragmento *HindIII* (355)-*HindIII* (3.893) de unas 3,5 Kb en el sitio *HindIII* del sitio múltiple de clonación del plásmido episómico, *YElac112*, y el plásmido centromérico *YCplac22*. Los plásmidos resultantes se muestran en la figura 29.

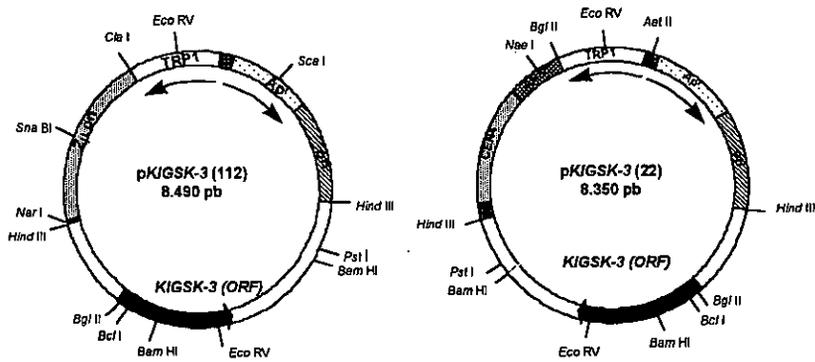


Figura 29. Construcciones de clonación del en *KIGSK3* en los vectores episómico YEplac112 y centromérico YCplac22.

6.2.4.2. ANÁLISIS DE SOUTHERN BLOT

Southern con DNA genómico de K. lactis.

El DNA genómico total de dos líneas de *K. lactis*, NRRL-Y1140, de la cual procede el clon original pEC1, y MW-98-8C se digirió con los enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RV. Como control se utilizó el plásmido pEC1 digerido con los mismos enzimas. Se utilizó como sonda el fragmento *Bam*HI-*Bam*HI, de 1.500 pb, procedente de la construcción pERB1.4 y que contiene parte de la *ORF2*.

Como se puede observar en la figura 30, el DNA genómico de ambas líneas de *K. lactis* ofrece el mismo patrón de restricción que el plásmido original pEC1, utilizando la sonda de *ORF2*, lo que confirma que el subclón obtenido hibrida a 65°C de manera específica con una sola región.

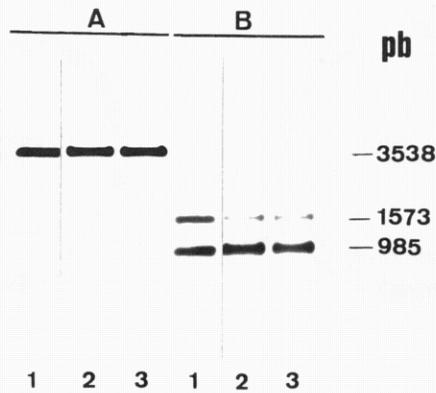


Figura 30. Análisis de *Southern blot* del DNA genómico total de dos líneas de *K. lactis* utilizando como sonda el inserto de pERB1.4 *Bam*HI-*Bam*HI de unos 1.500 pb que contiene parte de la *ORF2*. **A.** Digestión con *Hind*III, **B.** Digestión con *Hind*III+*Eco*RV. 1. Clon pEC1, 2. MW190-9b, 3. NRRL-Y1140.

6.2.4.3. INTERRUPCIÓN DEL GEN *KIGSK-3*

Para la interrupción del gen *KIGSK-3* se construyó un plásmido integrativo que contiene un fragmento *Bgl*II-*Bgl*II, de 883 pb, perteneciente a la región interna de la *ORF*. Este fragmento se insertó en el sitio *Bam*HI del vector YIplac211. La construcción resultante, pKlgsk-3Δ(211) (Fig. 31), se cortó con el enzima *Bcl*I para transformar la línea de *K. lactis* MW190-9b *uraA*⁻. Las colonias transformantes se cultivaron en medio líquido CM-URA para recomprobar el fenotipo URA⁺. Sólo las colonias capaces de crecer en medio líquido selectivo fueron analizadas posteriormente. Para ello, se les extrajo el DNA genómico total y se digirió con *Hind*III para ser

comprobadas mediante *Southern blot*, utilizando como sonda el mismo fragmento *Bgl*II-*Bgl*II que se utilizó para la construcción. Un número elevado de transformantes contenían una banda de menor y/o menor tamaño además de la banda salvaje *Hind*III-*Hind*III, de 3.500 pb que no se correspondían con el patrón observado en la interrupción correcta. Estos candidatos fueron descartados, pero su elevada frecuencia de aparición sugiere la posibilidad de que existan otros genes de elevada homología con los que se produce recombinación homóloga, o bien a la superior tasa de recombinación no homóloga que se produce en esta levadura respecto a *S. cerevisiae*. Sólo una colonia en la que no aparecía la banda de 5.300 pb fue considerada para un posterior análisis de *Southern blot* con otras enzimas de restricción. El patrón obtenido concuerda con el esperado si el gen *KIGSK-3* está interrumpido por la construcción pKlgsk-3 Δ (211). En la figura 32 se muestra un esquema del evento de recombinación esperado y en la figura 31 el patrón de restricción obtenido.

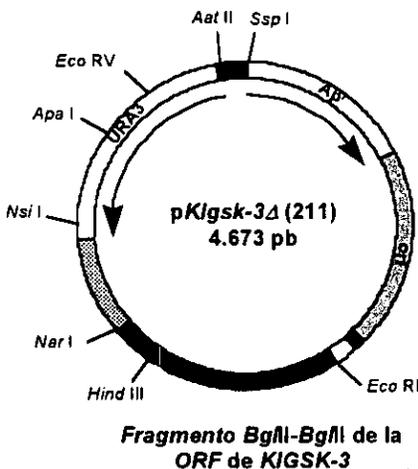


Figura 31. Construcción pKlgsk-3 Δ (211) utilizada para la interrupción del gen *KIGSK-3* en la línea MW190-9b.

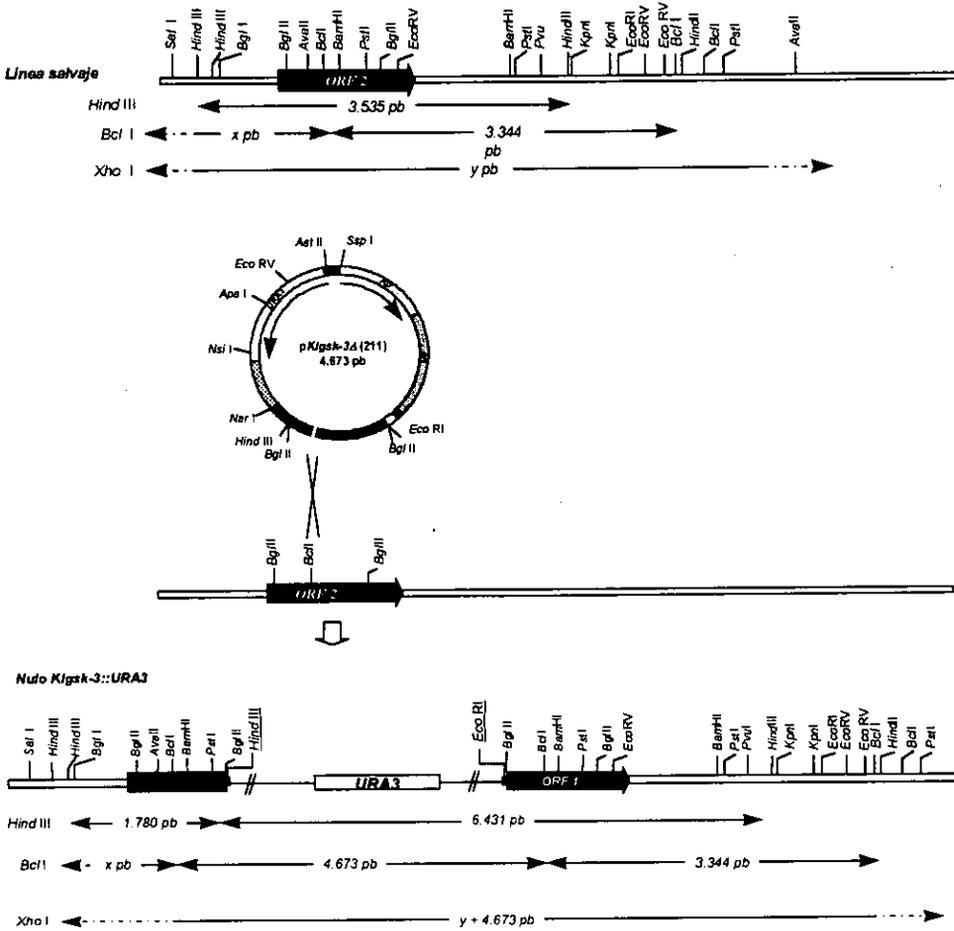


Figura 32. Esquema de la estrategia de construcción del nulo *Klgsk-3::URA3* en la línea de *K. lactis* MW190-9b.

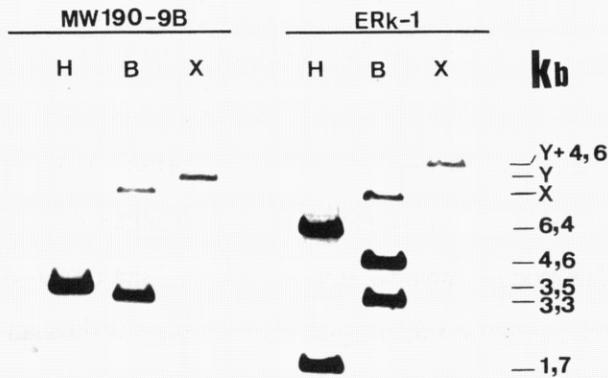


Figura 33. *Southern blot* del DNA genómico total extraído de la línea MW190-9b y el candidato nulo *Klgsk-3::URA3*. La sonda utilizada fue el fragmento *Bg*II-*Bg*II de 883 pb, que contiene gran parte de la *ORF* de *KIGSK-3*. **H.** *Hind*III, **B.** *Bcl*I, **X.** *Xho*I.

6.2.4.4. ANÁLISIS FENOTÍPICO DEL MUTANTE NULO *Klgsk-3::URA3*

Para el estudio fenotípico del nulo de *KIGSK-3* se realizó un primer análisis de crecimiento en YP con distintas fuentes de carbono, glucosa, glicerol y etanol a tres temperaturas distintas, 14°C, 30°C y 37°C. Para ello, se cultivaron la línea ERk-1 y la línea isogénica MW190-9b, salvaje para el gen *KIGSK-3*, así como las líneas de *S. cerevisiae* YPH1024, YPH1025 y 1788 AOE375::*TRP1*, que tienen anulados los genes *MDS1*, *MCK1* y *YOL128c* respectivamente, y la línea de *S. cerevisiae* salvaje FY73, en

medio líquido YPD-0,5% hasta alcanzar una A_{600} de 0,2-0,3. En ese punto del cultivo, las células se diluyeron hasta que ambos cultivos alcanzaron la A_{600} de 0,19 y se sembraron 5 μ l de cada cultivo sobre las placas antes de cultivarlas a las temperaturas mencionadas. De este modo se pudo observar que el mutante es capaz de crecer en los distintos medios ensayados a 30°C, sin embargo, a 37°C el mutante es incapaz de crecer, tanto en glucosa como en etanol. Esta incapacidad no existe a 14°C. Tampoco se observa una incapacidad del mutante de crecer a elevadas temperaturas en glicerol, lo que sugiere una sensibilidad específica a altas temperaturas del mutante *Klgsk-3::URA* en estos medios con glucosa o etanol (Fig. 34).

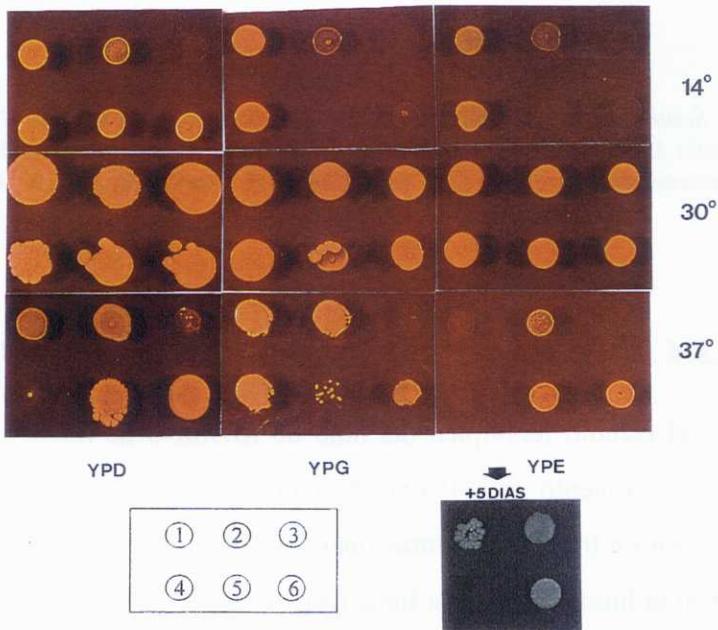


Figura 34. Crecimiento en distintas fuentes de carbono a 14°C y 37°C de las líneas de *S. cerevisiae* y *K. lactis*. 1. MW190-9b, 2. 1788 (*ORF YOL123c* interrumpida), 3. YPH1025 (*mck1::HIS3*), 4. ERk-1 (*Klgsk-3::URA3*), 5. FY73, 6. YPH1024 (*mcs1::TRP1*).

A 30°C se observa crecimiento de todas las líneas en todos los medios y fuentes de carbono. A 14 °C no se observa ningún fenotipo para la línea de *K. lactis* ERk-1. En glucosa únicamente presenta fenotipo termosensible la línea *mck1::HIS3* de *S. cerevisiae*; en otras fuentes de carbono no fermentables como etanol y glicerol, *S. cerevisiae* crece claramente peor que *K. lactis* independientemente de las mutaciones que afectan a los genes relacionados con GSK-3. A 37°C hay un fenotipo termosensible en glucosa y en etanol para la línea de *K. lactis* ERk-1, como le sucede a la línea de *S. cerevisiae mck1::TRP1*, pero no así en glicerol.

Con el fin de comprobar si la incapacidad de crecer a 37°C en glucosa es debida a una sensibilidad del mutante a estas condiciones y no a un posible efecto del tamaño del inóculo vertido sobre la placa, se realizó un segundo experimento en medio líquido. Para ello, las líneas ERk-1 y MW190-9b se sembraron en YP-Glucosa 3% y se cultivaron en agitación a 30°C y 37°C. Las curvas de crecimiento se pueden observar en la figura 35 y corroboran los resultados en placa.

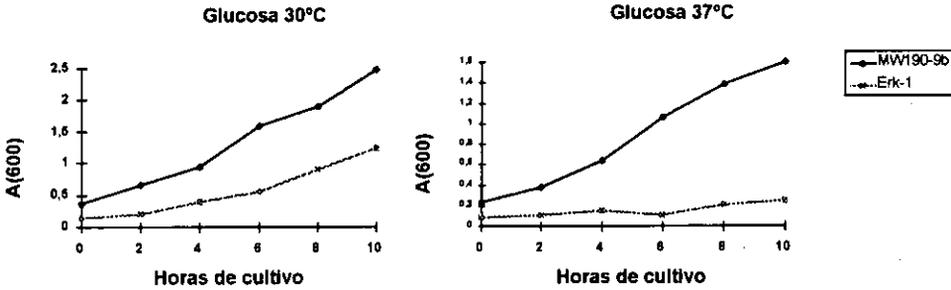


Figura 35. Diferencias en la capacidad de crecimiento de las líneas MW190-9b y el mutante nulo ERk-1 en glucosa a 30 y 37°C.

Fenotipo de sensibilidad a benomil.

El benomil es un compuesto que tiene la capacidad de producir desestabilización de microtúbulos. En *S. cerevisiae*, *MCK1* está relacionado con la función centromérica y se ha propuesto que durante la fase vegetativa puede intervenir en la estabilidad de los microtúbulos, de forma que la interrupción de este gen lleva a un incremento en la sensibilidad a benomil y a bajas temperaturas, y a un incremento en la pérdida de cromosomas (Shero y Hieter, 1991). En la figura 36 se compara el crecimiento de la línea de *K. lactis* salvaje y la línea ERk-1 en una serie de diluciones seriadas 1:10 en placas YPD con benomil y puede comprobarse que la interrupción del gen no causa fenotipo de sensibilidad a dicha droga.

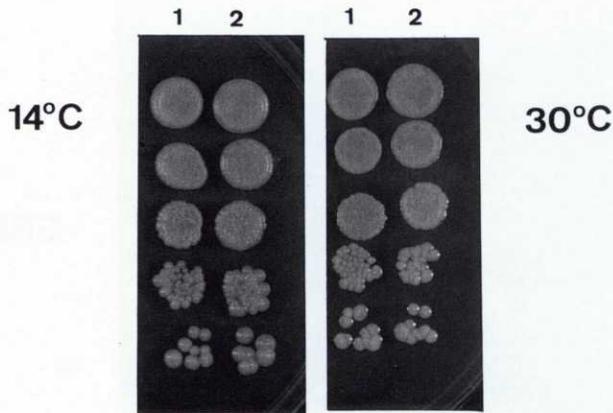
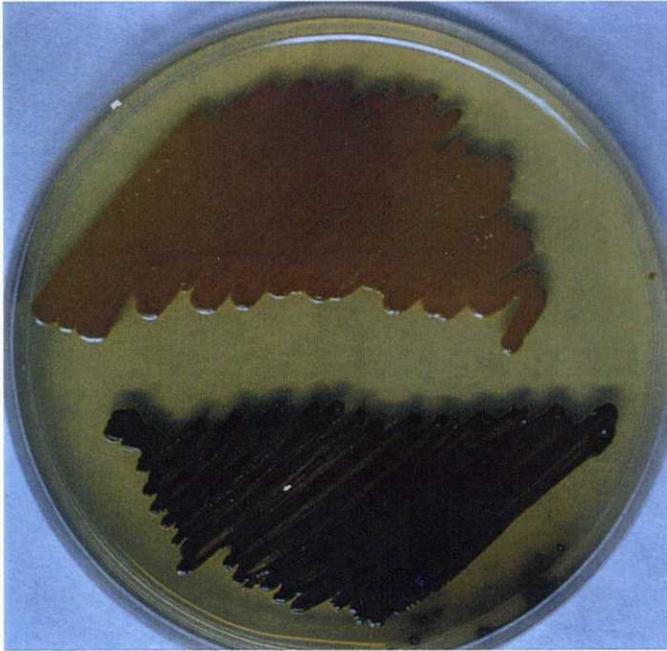


Fig. 36 Comprobación de la sensibilidad frente a benomil. 1. MW190-9b, 2. ERk-1.

En *S. cerevisiae* la disrupción del gen *MCK1* da lugar a una reducción en el almacenamiento de glucógeno que no se observa al interrumpir *MDS1*. En el caso del gen *KIGSK-3* pudimos comprobar que hay una clara diferencia en la acumulación de glucógeno en la línea salvaje o en la que porta el alelo interrumpido (Fig.37).

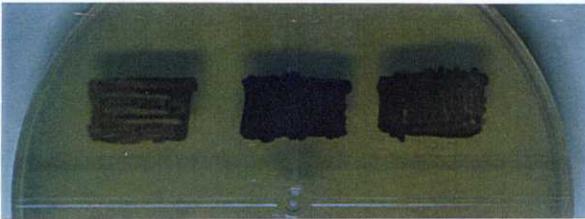
A



ERk-1

MW190-9b

B



1

2

3

Fig. 37 Comprobación del fenotipo de acumulación de glucógeno. **A.** Líneas ERk-1 y MW190-9b tras la tinción de I₂. **B.** Comparación entre mutantes de *S. cerevisiae* y el de *K. lactis* 1. YHP1025 (*mck1::HIS3*), 2. YPH1024 (*mds1::TRP1*), 3. ERk-1 (*Klgsk-3::URA3*).

6.2.4.5. ANÁLISIS DE COMPLEMENTACIÓN

La línea ERk-1 presenta un fenotipo de sensibilidad a altas temperaturas y de acumulación de glucógeno similar al encontrado en los mutantes *mck1::HIS3* de *S. cerevisiae*, sin embargo la homología de *KIGSK-3* es más alta con *MDS1*. Dado que *MDS1* se aisló como un supresor del fenotipo termosensible del mutante *mck1::HIS3*, analizamos la posibilidad de que *KIGSK-3* pudiese complementar esta mutación. Para ello transformamos la línea YHP1025, *mck1::HIS3*, con el plásmido pKIGSK-3(112) (episómico). Se partió de una única colonia transformada y cultivada en medio líquido selectivo a 30°C, tras lo cual, cada cultivo se diluyó hasta una A_{600} de 0,2 sembrándose 5µl de dichos cultivos y 5µl de diluciones seriadas de los mismos.

Los resultados obtenidos demuestran que se produce complementación en multicopia (Fig. 38) y que la línea transformada es capaz de crecer a 37°C y a 14°C. Observamos que el plásmido episómico que no contenía el gen era también capaz de mejorar en cierta medida la capacidad de crecimiento del mutante a temperaturas no permisivas a 37°C. Este efecto se había observado previamente con un plásmido 2µ utilizado como control en la complementación de *mck1::HIS3* con *MDS1* (Puzzis et al., 1994).

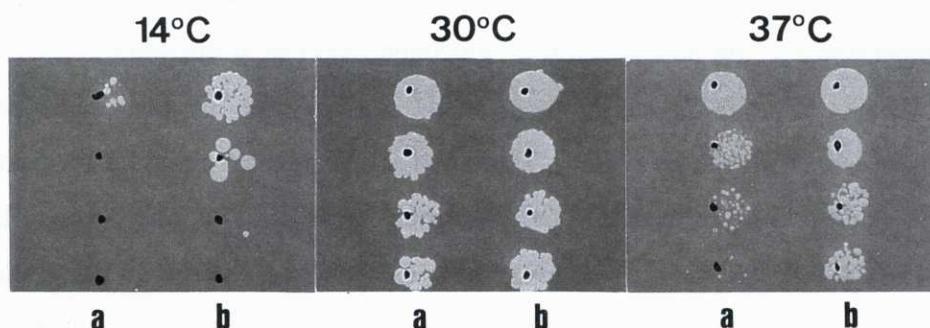


Figura 38. Crecimiento de la línea YH1025 *mck1::TRP1* en placas selectivas CM-TRP a 14°C, 30°C y 37°C, transformada con **a.** YEplac112, **b.** pKIGSK-3 (112).

6.2.4.6. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN

Estudios de expresión mediante ensayos β -galactosidasa

A fin de analizar la respuesta del promotor de *KIGSK-3* a distintos factores de estrés, se fusionó dicho promotor al gen *lacZ* del plásmido pXW3 Δ PstI (Fig. 39), tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Se comprobó mediante secuenciación que la construcción resultante, *P_{GSK-3}-lacZ* contenía el ATG del promotor de *KIGSK-3* en pauta de lectura con el gen *lacZ* de *E. coli*.

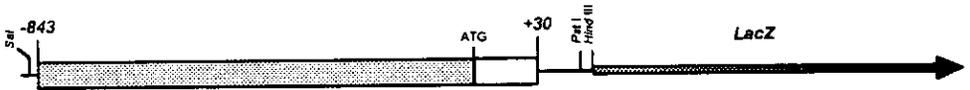


Figura 39. Esquema de la fusión del promotor de *KIGSK-3* con el gen *LacZ* del vector pXW3. La numeración indica las posiciones respecto al codón de iniciación.

Esta construcción se utilizó para transformar la línea de *K. lactis* MW190-9b. Los transformantes se seleccionaron en placas X-Gal (-URA). Para realizar el ensayo β -galactosidasa, una media de seis colonias azules se inocularon en los medios correspondientes y se mantuvieron siempre bajo presión selectiva, en medio CM-URA, para evitar la pérdida de plásmidos. Los resultados, que se muestran en las siguientes figuras (Figs. 40, 41 y 42), son la media de tres ensayos de cultivos independientes.

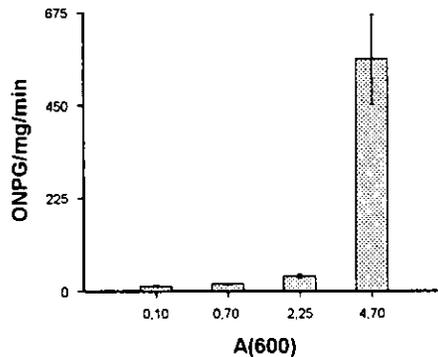


Figura 40. Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de la fusión P_{GSK-3} -*LacZ*. Las células se cultivaron en medio selectivo CM-URA a 30°C. En el eje x se indican los valores de A_{600} alcanzados por el cultivo en cada punto de la toma de muestra.

Los resultados que se observan en la figura 40 indican que la expresión del promotor de *KIGSK-3* se ve incrementada cuando se alcanza la fase estacionaria. Sin embargo, esto podría ser debido a una diferencia en la expresión del gen en distintas fases del cultivo, o bien una respuesta al agotamiento de alguna fuente nutricional. Para comprobar este punto, se realizó un segundo experimento en el que se ensayó la actividad del promotor en células creciendo en un medio sin fuente de carbono y en un medio sin fuente de nitrógeno. Para ello, un cultivo inicial, en medio completo selectivo CM-URA, se llevó hasta una A_{600} de 0,1. En ese momento, el cultivo se lavó y se repartió en tres medios distintos. Un cultivo permaneció en las mismas condiciones de crecimiento, en medio CM-URA, para utilizar como control. Los dos cultivos restantes se realizaron en medio completo, con aminoácidos como única fuente de carbono, y en medio completo sin ningún aporte de fuente nitrogenada. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 30°C durante seis horas. Dado que los cultivos sin fuente de carbono o nitrógeno crecen mucho más lentamente, se tomó una alícuota del cultivo normal, a las tres horas de crecimiento, para utilizar como segundo control, con un valor de A_{600} más próximo a los alcanzados por los cultivos con carencias nutricionales. Los resultados se muestran en la figura 41.

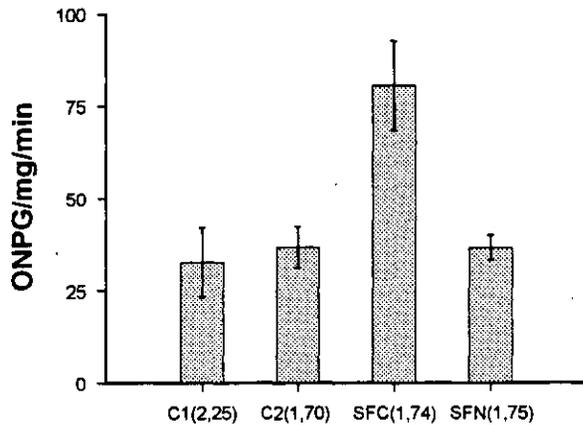


Figura 41. Efecto de la carencia de fuente de carbono o nitrógeno en el medio de cultivo sobre la expresión de la fusión P_{GSK-3} -*lacZ*. **C1** y **C2**. Cultivos control creciendo en medio completo -URA. **SFC**. Cultivo creciendo en medio -URA, con aminoácidos como única fuente de carbono. **SFN**. Medio sin ningún aporte de nitrógeno (sin aminoácidos y sin sulfato amónico en el suplemento de YNB). Los valores de A_{600} alcanzados por los cultivos se indican entre paréntesis.

La carencia de fuente de nitrógeno parece no tener efecto sobre la expresión de P_{GSK-3} -*lacZ*, dado que alcanza los mismos valores de actividad β -galactosidasa que en cultivos creciendo en medio completo. Por el contrario, la falta de fuente de carbono en el medio sí afecta a la expresión, incrementándola en 2,5 veces si consideramos el dato del cultivo que presentó aproximadamente la misma A_{600} ($\approx 1,7$).

Con el fin de estudiar si la expresión de *KIGSK-3* es sensible a la temperatura, se realizó un tercer ensayo β -galactosidasa a distintas

temperaturas. Un cultivo inicial se realizó en CM-URA (glucosa 2%) a 30°C hasta alcanzar una A_{600} de $\approx 0,7$. Este cultivo se subdividió en tres, manteniéndolos en el mismo medio, pero a 14°C, 30°C y 37°C, durante dos horas y media. Transcurrido este tiempo, se tomaron muestras de cada cultivo para medir la actividad β -galactosidasa. Dos alícuotas, pertenecientes al cultivo mantenido a 30°C, se sometieron durante quince y veinte minutos a un choque térmico de 42°C antes de ser analizadas. Los resultados se pueden ver en la figura 42.

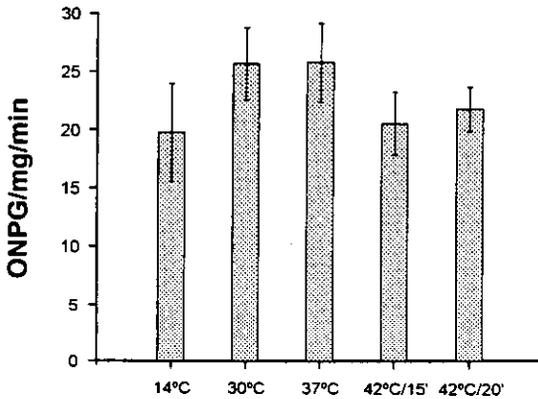


Figura 42. Efecto de la temperatura sobre la expresión de $P_{GSK-3-lacZ}$. 14°C. 90 min de cultivo a 14°C, 30°C. 90 min de cultivo a 30°C, 37°C. 90 min de cultivo a 37°C, 42°C/15'. Choque térmico a 42°C de 15 min, 42°C/20'. Choque térmico a 42°C 20 min.

La expresión de $P_{GSK-3-lacZ}$ no parece verse afectada por la temperatura en las condiciones ensayadas. Tampoco se observa un incremento en la expresión como consecuencia del choque térmico a 42°C.

Análisis de Northern blot

Los resultados obtenidos al analizar la expresión del promotor de *KIGSK-3* indicaban que el gen se activa en medios sin fuente de carbono. Dado que ésta es una de las señales que inducen la esporulación, decidimos analizar la expresión del gen en distintas líneas haploides y diploides en distintos medios relacionados con la inducción de la esporulación. Este análisis se llevó a cabo mediante *Northern blot* y los resultados obtenidos se muestran en la figura 43. La línea diploide a/α se obtuvo por cruzamiento de las líneas ATCC32143 y ATCC32144.

Para realizar este estudio, las células se cultivaron en medio completo CM y medios CM-HIS,-ADE,-LEU, para mantener el diploide. Tras alcanzar una A_{600} aproximada de 0,7, parte del cultivo se paró para extraer el RNA en este punto del crecimiento. Otra parte del cultivo se dejó crecer hasta alcanzar una A_{600} de 3. Una tercera parte del cultivo se lavó dos veces en agua bidestilada estéril para retirar el medio con glucosa. Una vez lavadas las células, se transfirieron al mismo medio completo, pero con aminoácidos como única fuente de carbono, y se dejó crecer durante cuatro horas más antes de la extracción de RNA; o alternativamente a un medio de

esporulación, tomándose muestras a las dos, cuatro y seis horas de iniciado el cultivo.

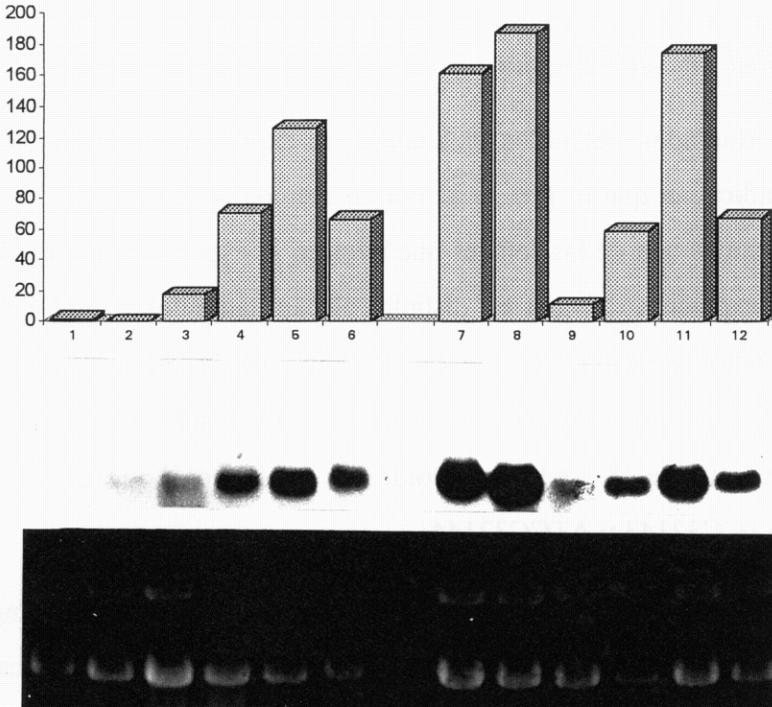


Figura 43. Análisis de la expresión del gen *KIGSK-3* en líneas haploides y diploides. Como sonda se utilizó el fragmento *Bg*III-*Bg*III de 883 pb. 1. Control de ausencia de expresión en la línea ERk-1, 2. MW190-9b $A_{600} = 0,7$ 3 Diploide (ATCC32143/ATCC32144) $A_{600} = 0,7$, 4. Haploide a (ATCC32144) $A_{600} = 0,7$, 5. Haploide tras 4h en un medio sin fuente de carbono, 6. Haploide $A_{600} = 3$, 7. Diploide $A_{600} = 3$, 8. Diploide tras 4h sin fuente de carbon, 9. Diploide $A_{600} = 0,7$, 10. Diploide tras 2h en medio de esporulación, 11. Diploide tras 4h en medio de esporulación, 12. Diploide tras 6h en medio de esporulación.

Se observa que en las líneas haploides hay una inducción en ausencia de fuente de carbono en el medio, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente sobre la expresión del promotor fusionado a *lacZ*. En la línea diploide este efecto es mucho más acusado y también se observa incremento de la expresión cuando la densidad celular alcanza una A_{600} de aproximadamente 3, más próxima a la fase estacionaria del cultivo. Como corresponde a genes implicados en el inicio de la meiosis, se observa un incremento transitorio de expresión cuando las células son transferidas desde un medio rico en glucosa a un medio de esporulación.

6.3. DISCUSIÓN

La secuencia nucleotídica de *KIGSK-3* revela, según el análisis de *FastA*, una homología máxima con el gen *MDS1* de *S. cerevisiae* (62,9% de identidad) y también presenta gran homología con otras secuencias relacionadas como el gen *GSK3-β* de humanos, el gen *zw3/sgg* de *D. melanogaster* o *MRK1* de *S. cerevisiae*. Los restantes genes que aparecen clasificados como de alta homología pertenecen también al grupo de genes GSK-3. *KIGSK3* es el primer gen perteneciente a este grupo que ha sido clonado en *K. lactis*. En la bibliografía aparecen otros seis genes relacionados dentro del grupo de levaduras, cuatro de ellos en *S. cerevisiae*: *MCK1*, *MDS1*, *MRK1* y *YOL128c* (Hunter y Plowman, 1997), uno en *Schizosaccharomyces pombe* (Plyte *et al.*, 1996) y uno en *Candida albicans* (Whiteway *et al.*, 1991). Todos estos genes presentan en levaduras un uso de codones no muy restrictivo y los valores calculados para el *ICDI* sugieren que no son genes de alta expresión en levaduras, hecho que puede relacionarse con su función reguladora. También para el gen *KIGSK3* es válida esta afirmación sobre el uso de codones.

En *S. cerevisiae* existen al menos 113 genes que codifican para proteínas-quinasa, lo que representa aproximadamente un 2% del genoma. Estas proteínas están implicadas en una gran diversidad de funciones y cascadas de amplificación de señales que controlan el ciclo celular, la esporulación, la respuesta a feromonas y otras señales. La familia GSK-3 de *S. cerevisiae* está formada por un pequeño número de genes, 4, si se

compara con *Arabidopsis thaliana* en la que se han encontrado ya 6 genes y seguramente este número se incrementará cuando se complete la secuenciación de todo su genoma. Sin embargo en mamíferos el número es más reducido, por ejemplo en humanos y en *Rattus norvegicus* sólo se han encontrado dos genes pertenecientes a esta familia. El mayor número de genes presentes en el genoma de levadura y de plantas está también relacionado con una mayor diversidad de funciones para las proteínas que codifican.

El gen *KIGSK3* codifica para una proteína de 414 aminoácidos con una M_r de 47 KDa y que muestra homología con el grupo de las Ser/Thr- proteín-quinasas. En la actualidad son conocidas las secuencias de un elevado número de proteínas con actividad proteín-quinasa, y algunas estructuras han podido ser determinadas a nivel de difracción de rayos X. Todos estos datos hacen posible clasificar a las proteín-quinasas en distintos grupos relacionados con su estructura y función. Sin embargo la homología suele estar limitada al dominio catalítico y disminuye muy notablemente fuera de esta región. Al efectuar un alineamiento de la proteína KIGsk-3p con otras proteínas de la familia GSK3 comprobamos que existe una gran homología a nivel de la región catalítica y que conserva los 11 dominios descritos para las proteín-quinasas por Hanks y colaboradores (Hanks *et al.*, 1988). Entre ellos destacan el dominio I, II, y VII. El dominio I contiene el sitio de unión a ATP, GXGXYG. El dominio II contiene una lisina que aparece conservada y que está en relación con la actividad quinasa ya que la mutación de este residuo elimina la actividad quinasa de Mck1p (Neigeborn

and Mitchell, 1991). El dominio VIII contiene una tirosina que puede ser fosforilada, de hecho en Mck1p se ha visto una actividad autofosforilante sobre este residuo (Lim *et al.*, 1993).

La homología de secuencia a nivel de proteína indica claramente que el gen *KIGSK-3* codifica para una proteína que presenta la mayor homología con la codificada por el gen *MDS1* en una amplia región que se extiende más allá del centro catalítico. Precisamente estas regiones, que no pertenecen al dominio catalítico común a quinasas, son las que determinan una especificidad funcional. Por ejemplo a pesar de que tanto las proteínas humanas GSK-3 α y GSK-3 β tienen un 88% de identidad en el dominio quinasa, sólo una de ellas (β) es capaz de sustituir a la proteína *zeste-white3/shaggy* de *D. melanogaster*. El gen *MDS1* fue aislado como un supresor en multicopia del fenotipo de letalidad a temperaturas no permisivas de 16 o 37°C que presenta la mutación *mck1^o* (Puzzis *et al.*, 1994) y esta función supresora también la hemos podido comprobar en *S. cerevisiae* utilizando el gen *KIGSK-3*. Aunque la secuencia de *KIGSK-3* tiene también una gran homología con *MCK1*, sus funciones no parecen completamente análogas porque la sensibilidad a benomil, relacionada con la estabilidad de microtúbulos y presente en los mutantes *mck1::HIS3* no se observa en *Klgsk-3::URA3*.

La funciones de las proteínas de la familia GSK-3 de levaduras sólo se han descrito para Mck1p y Mds1p, permaneciendo la incógnita sobre las otras dos. A pesar de su gran homología con la Gsk-3p de mamíferos, que participa en la cascada de regulación del metabolismo del glucógeno,

inactivando mediante fosforilación a la glucógeno sintetasa, en levaduras no presentan esta función. El glucógeno representa la más importante reserva de carbohidratos en gran variedad de organismos y su regulación está relacionada con la fase de crecimiento celular, con los niveles de glucosa y con las condiciones de estrés. Estas condiciones que pueden inducir la acumulación de glucógeno son la entrada en la fase estacionaria, la carencia de nitrógeno en el medio y el choque térmico (Lillie y Pringle, 1988). La interrupción del gen *MCK1* provoca un descenso en los niveles de acumulación de glucógeno, efecto opuesto al esperado si actuase como en mamíferos, mientras que la interrupción de *MDS1* o *MRK1* no produce ningún efecto sobre la reserva de glucógeno (Puzzis *et al.*, 1994; Hardy *et al.*, 1995). La interrupción de *KIGSK-3* disminuye la acumulación de glucógeno, como hemos podido comprobar utilizando la tinción con I_2 (Fig. 37). Este fenotipo está ausente en *mds1::TRP1* de *S.cerevisiae*. La proteína *Klgsk-3p*, aunque más directamente relacionada con *Mds1p*, podría sin embargo desempeñar en *K.lactis* algunas funciones que en *S.cerevisiae* desempeña *Mck1p*, pero no las relacionadas con la estabilidad de microtúbulos. Dada la gran similitud entre todos los miembros de esta familia de proteínas, no resulta sorprendente que a lo largo del proceso evolutivo funciones diversas hayan quedado asignadas a proteínas diferentes en distintas especies. La propia proteína *Mck1p* de *S.cerevisiae* es un ejemplo de esta diversidad de funciones, a pesar de pertenecer a la familia *GSK-3* está relacionada con la función centromérica ausente en el resto de los componentes de la familia. Se ha propuesto que en otras especies en que no

se han encontrado homólogos a *MCK1*, esta función debe desempeñarla otro/s gen/es de la familia (Bianchi *et al.*, 1993).

En *S.cerevisiae* ni *MDS1* ni *MCK1* son esenciales para el crecimiento vegetativo, y lo mismo sucede respecto del gen *KIGSK3* en *K. lactis*. Las funciones atribuidas hasta el momento al gen *MDS1* quedan restringidas a la activación de los genes necesarios en las primeras etapas de la meiosis, sin embargo el gen *MCK1* participa no sólo en la meiosis sino en los procesos de maduración de ascas y también en fase vegetativa fosforilando proteínas de unión a CDEIII y que son responsables del correcto emparejamiento de los cromosomas metafásicos. Las mutaciones en *MCK1* producen fenotipos de sensibilidad a altas o bajas temperaturas que se ponen de manifiesto durante el crecimiento vegetativo, sin embargo no se han descrito fenotipos asociados a esta fase de crecimiento para las mutaciones en *MDS1*. La interrupción de *KIGSK-3* va asociada a un fenotipo de letalidad a 37°C que se pone de manifiesto en medios de glucosa o etanol, pero no en glicerol. Esta diferente termosensibilidad, dependiendo del medio de cultivo, puede ser explicada de varias maneras, por ejemplo por un efecto protector del glicerol sobre cambios asociados a la membrana celular y que pudieran producir la lisis celular a elevadas temperaturas.

Durante el inicio de la meiosis, se ha postulado una posible interacción entre Mds1p y los reguladores meióticos Ume6p e Ime1p. Ume6p puede actuar como un regulador negativo de la expresión de genes meióticos durante la fase vegetativa, pero se convierte en un regulador positivo de estos mismos genes en el proceso de activación meiótica. Esta

bifuncionalidad ha sido atribuida a una posible interacción con un dímero de Ime1p asociado a su vez con Mds1p (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996). Ume6p también participa en otros mecanismos de regulación que suceden durante el crecimiento vegetativo, por ejemplo se ha descrito su papel como regulador positivo y negativo de genes relacionados con la biosíntesis de fosfolípidos (Jackson y Lopes, 1996). Aunque en *S. cerevisiae* *IME1* no se expresa durante la fase vegetativa, *UME6* y *MDS1* sí lo hacen (Bowdish y Mitchell, 1994; Jackson y Lopes, 1996), esto podría indicar que Mds1p pudiese tener también alguna función reguladora durante el crecimiento vegetativo. Nuestro hallazgo de que la interrupción del gen *KIGSK-3* tiene fenotipos asociados a la fase vegetativa y su homología con Mds1p apoyan esta hipótesis.

El análisis de la secuencia del promotor de *KIGSK-3* revela la presencia de secuencias consenso que son comunes a los promotores de otros genes de levaduras. En las posiciones -90 y -80 aparecen dos regiones que se ajustan perfectamente al consenso denominado UAS_H. Este consenso fue identificado por vez primera en el promotor del gen *HOP1* (Vershon *et al.*, 1992) y posteriormente ha sido identificado en un gran número de genes que están relacionados con la meiosis y también en otra serie de genes no relacionados con ella. Prinz y colaboradores (Prinz *et al.*, 1995) analizaron una serie de 25 promotores en los que se encuentra este motivo y dedujeron un consenso TNTGN^A/TGT. Esta secuencia tiene un papel activador sobre la transcripción y se ha demostrado, en el caso de los promotores de *HOP1*, *ZIP1*, *IME1* y *SPO11* que es capaz de interaccionar específicamente *in vitro*

con una proteína que todavía no ha sido bien caracterizada. Las variaciones en el consenso determinan diferente afinidad por la unión de este factor que es muy débil en el caso de *ZIP1* (Prinz *et al.*, 1995).

En las posiciones -713, -574, -477 y -341 aparecen coincidencias imperfectas con la región denominada T₄C y cuyo consenso es TTTTCNNCG. Las T₄C, del mismo modo que las UAS_H, se han encontrado en genes meióticos y en genes relacionados con funciones vegetativas. En unos casos puede existir una sola de estas secuencias, por lo que se les han atribuido funciones intercambiables, y en otros aparecen ambas. En muchos genes meióticos se encuentran asociadas a un elemento regulador negativo, situado siempre en posición 3', denominado URS1 y que interacciona con el regulador transcripcional Ume6p reprimiendo a dichos genes durante la fase vegetativa y activándolos durante la fase meiótica, a través de una interacción proteína-proteína de Ume6p con Ime1p que es dependiente de la presencia de Mds1p (Rubin-Bejerano *et al.* 1996). El gen *MDS1* de *S. cerevisiae* presenta en su región promotora un consenso URS1, sin embargo el gen se expresa tanto en condiciones vegetativas como durante la meiosis, y el mantenimiento de esta expresión depende de la existencia de un gen *IME1* funcional. La presencia del sitio URS1 en este gen no parece por tanto ejercer un papel represor en condiciones vegetativas, lo que contrasta con la represión debida a Ume6p en estas condiciones y que se se manifiesta en otros genes de la meiosis temprana como *IME1*, sin embargo se observa una inducción transitoria cuando los diploides se transfieren a un medio de esporulación (Bowdish and Mitchell, 1993).

La situación en el gen de *K. lactis* parece ser diferente ya que no se ha detectado ningún URS1, por lo cual no aparece una señal clara que pudiese ser responsable de la represión en condiciones vegetativas y de la inducción en fase meiotica. Los análisis de *Northern blot* revelan que efectivamente el gen se transcribe en la fase vegetativa, y dado que el promotor contiene otras secuencias activadoras, UAS_H y T₄C, podemos suponer que el gen se encuentra bajo su control. Estas secuencias son probablemente también responsables de la inducción del gen en líneas diploides que son transferidas a medios de esporulación y un futuro análisis funcional del promotor es necesario para verificar esta hipótesis.

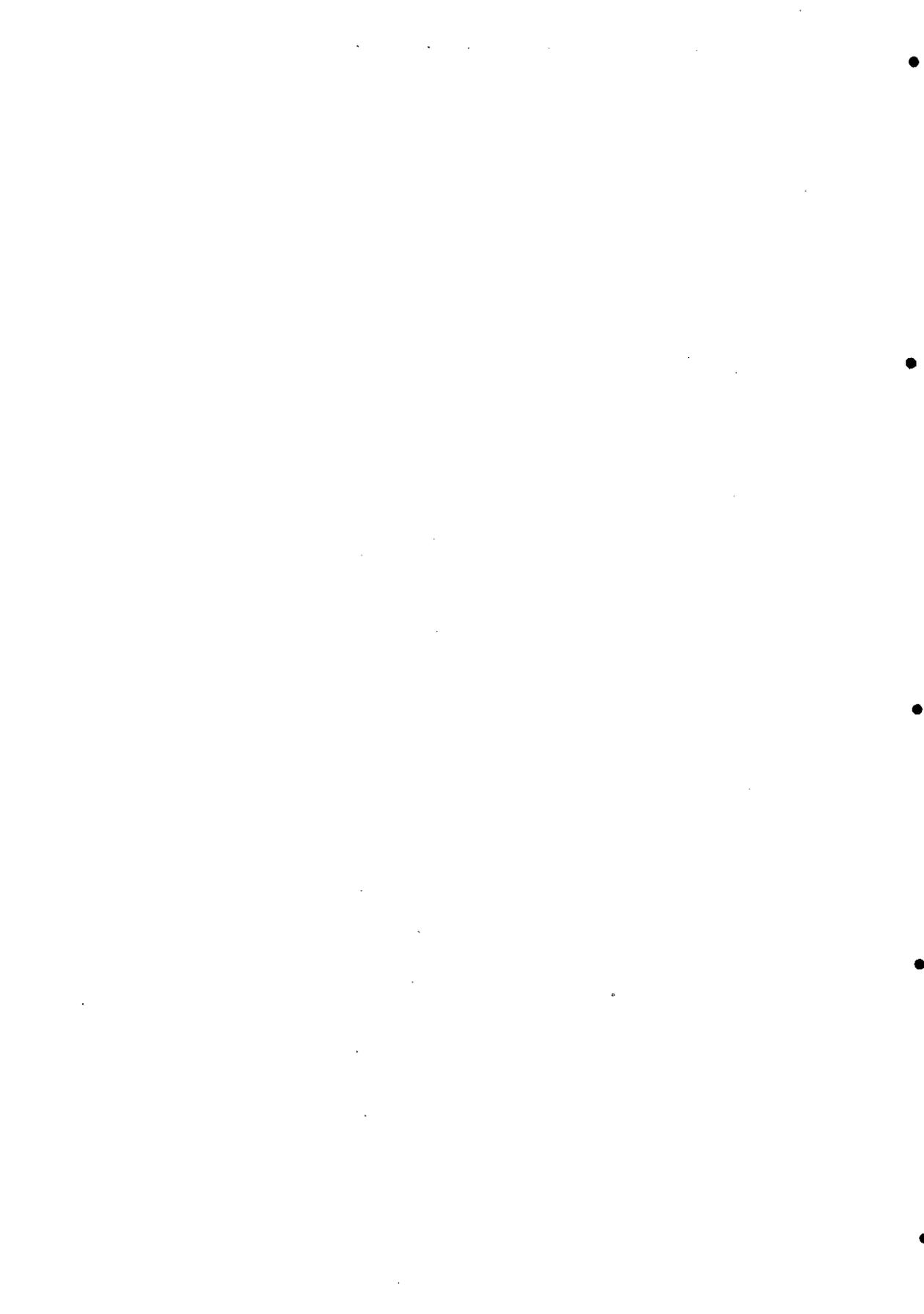
La expresión del gen *KIGSK-3* se induce en fase estacionaria y hemos podido comprobar que también hay inducción en ausencia de fuente de carbono pero no en ausencia de fuente de nitrógeno. El agotamiento de la fuente de carbono que acompaña a la fase estacionaria puede ser precisamente el responsable de la inducción observada en estas condiciones. Entre las señales desencadenantes de la expresión de genes meióticos tempranos se encuentran la privación de fuente de carbono y de nitrógeno. Aunque se conoce que ambas señales actúan sobre el inductor *IME1* directamente, o en el caso de la carencia de nitrógeno mediante la desrepresión de *IME4*, que a su vez activa a *IME1*, hasta el momento no se ha encontrado ningún regulador que pueda transmitir la señal de carencia de fuente de carbono a *IME1*. Sin embargo hay evidencias indirectas de que *MSD1* pueda estar implicado en esta señalización. Una de ellas proviene de los datos de Smith y colaboradores que encontraron que la región C-terminal

de Ime1p proporciona tanto la dependencia de *MDS1* para su activación, como la respuesta a carencias a fuentes de carbono y de nitrógeno. Además *MDS1* estimula la acumulación de mRNA de *IME1* causada en estas mismas condiciones (Smith *et al.*, 1993). Rubin-Bejerano y colaboradores (Rubin-Bejerano *et al.*, 1996) demostraron que Mds1p fosforila a Ime1p únicamente en condiciones de carencia de nutrientes, a pesar de que es capaz de interaccionar con este factor incluso en condiciones vegetativas.

El hecho de que hayamos visto que el gen *KIGSK-3* homólogo a *MDS1* incrementa su expresión en ausencia de fuentes de carbono sugiere que este mecanismo pueda actuar como un elemento potenciador de la fosforilación de Ime1p en estas condiciones al aumentar los niveles de la proteína-quinasa fosforilante.

La clonación y caracterización de genes implicados en la meiosis en la levadura *K. lactis* es necesaria para disponer de datos sobre el nivel de actuación de la proteína KIGsk-3p y su posible interacción con otros factores implicados en esta regulación.

7. CONCLUSIONES



1. Se ha secuenciado una región de DNA de 5.500 pb del cromosoma VI de *K. lactis* en la que se han encontrado dos pautas abiertas de lectura. Una de ellas, *KIPDCB*, presenta homología con piruvato descarboxilasas y la otra, *KIGSK-3*, con proteínas-quinasas de la familia GSK3.

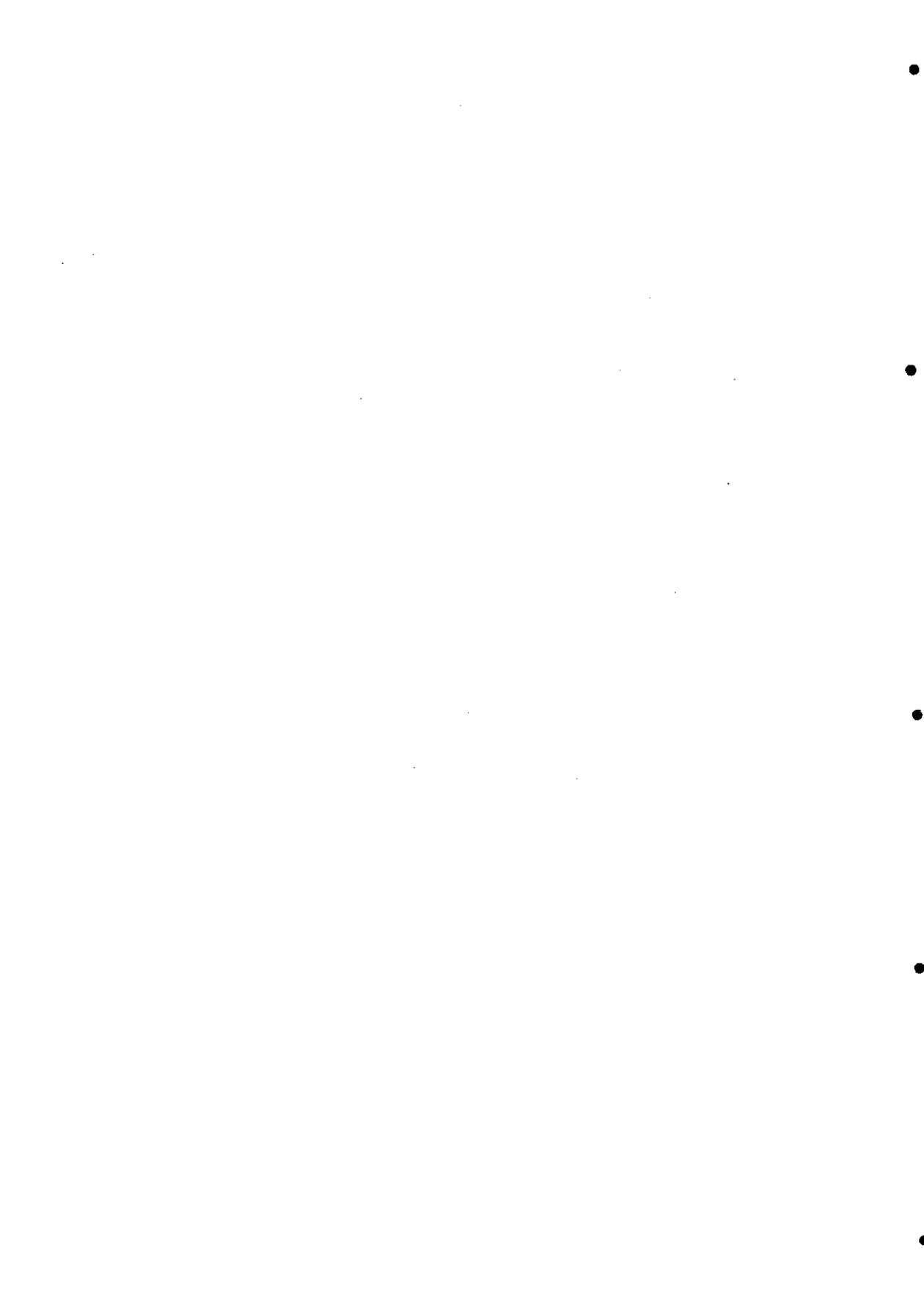
El gen *KIPDCB*

2. El análisis de la secuencia del gen *KIPDCB*, de 1.734 pb, muestra que codifica para una proteína de 577 aminoácidos con un M_r de 65KDa.
3. La interrupción del gen en una línea haploide revela que no es esencial para el crecimiento de la levadura en ninguna de las condiciones ensayadas, utilizando fuentes de carbono fermentables y no fermentables.
4. En multicopia el gen no es capaz de complementar la doble mutación *pdcl⁰ pdc5⁰* de *S. cerevisiae*.
5. El gen se transcribe pero los niveles de expresión son muy bajos debido a que su promotor es poco activo en las condiciones que inducen la expresión de genes que codifican para piruvato descarboxilasas en otras levaduras.

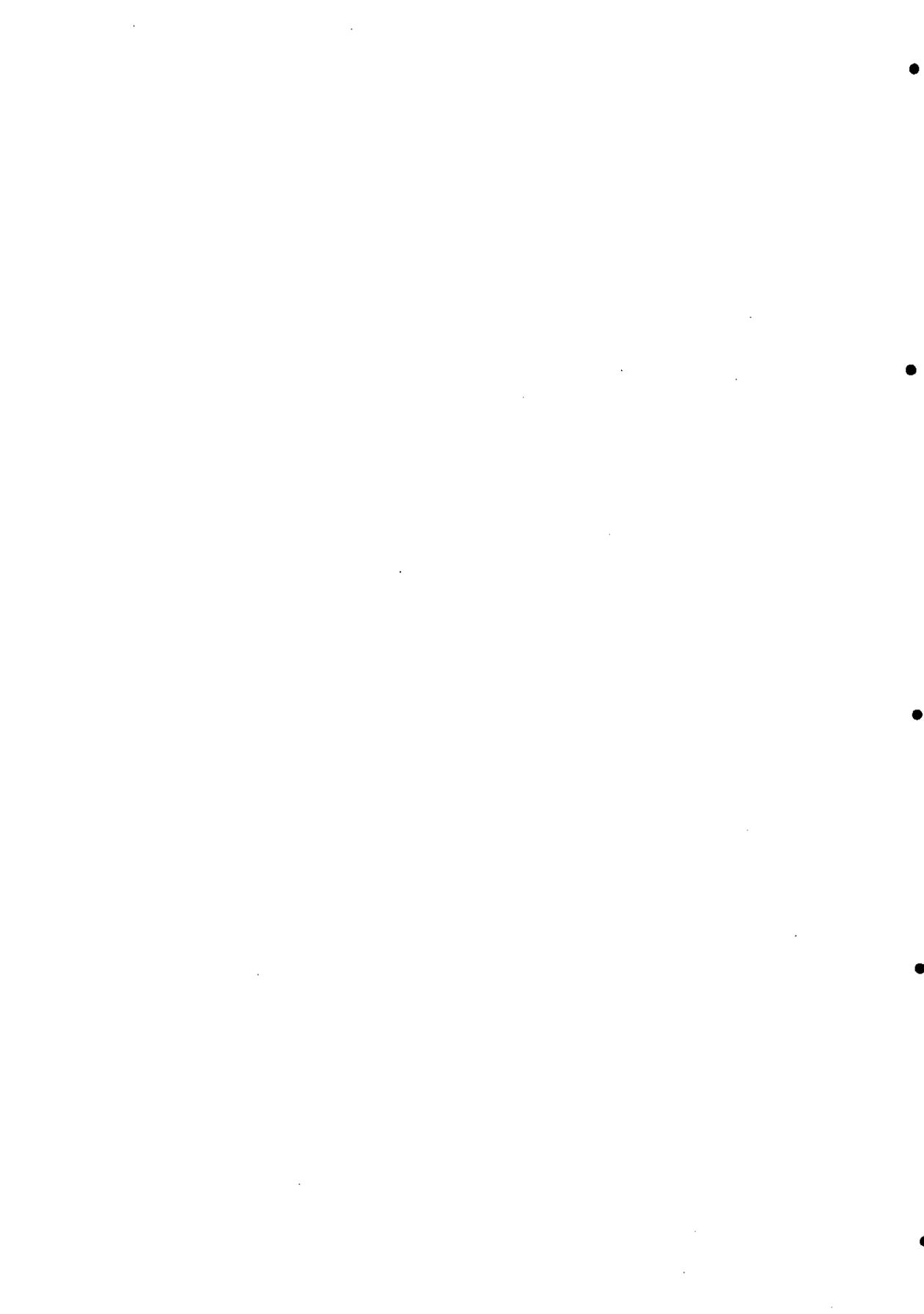
6. En el promotor del gen no se encuentran cajas RPG características de muchos genes de alta expresión relacionados con el metabolismo de la glucosa, entre ellos *PDC1*, de *S. cerevisiae*.
7. *KIPDCB* no es análogo funcionalmente a *PDC5* de *S. cerevisiae*, ya que no se activa al interrumpir el gen *KIPDCA*.
8. El análisis de la secuencia de la proteína KIPdcBp muestra que carece de varios elementos determinantes de la actividad piruvato descarboxilasa, como el glutámico de la posición 51 y las cisteínas de las posiciones 221 y 222. Sin embargo, conserva el sitio de unión a TPP.
9. No parece existir un mecanismo de interregulación entre la expresión de *KIPDCA* y *KIPDCB*, ya que la interrupción de *KIPDCB* no modifica los niveles de expresión de *KIPDCA* en medios con glucosa.
10. La interrupción del gen *KIPDCB* produce una drástica disminución del crecimiento de *K. lactis* en medios carentes de timina. Este fenotipo, junto con el parecido estructural de *THI3*, un regulador positivo de la biosíntesis y el transporte de la tiamina en *S. cerevisiae*, con proteínas piruvato descarboxilasas, sugiere la participación de *KIPDCB* en la regulación del transporte y/o metabolismo de tiamina en *K. lactis*.

El gen *KIGSK-3*

11. El análisis de la secuencia de *KIGSK-3*, de 1.245 pb, revela que codifica para una proteína de 414 aminoácidos y una M_r de 47 KDa.
12. En el promotor del gen *KIGSK-3* se encuentran secuencias coincidentes con los consensos T₄C y UAS_H, que están relacionados mayoritariamente con genes meióticos y también en otros como *GAL1* y *GAL10*.
13. La interrupción del gen *KIGSK-3* demuestra que no es esencial para su crecimiento en condiciones vegetativas. Hay varios fenotipos asociados a esta interrupción; ausencia de crecimiento en glucosa y etanol a 37°C, y disminución del almacenamiento de glucógeno. Sin embargo, no presenta sensibilidad al benomil.
14. La expresión del gen *KIGSK-3* se induce tanto en las líneas haploides como diploides en ausencia de fuente de carbono. Asimismo, en la línea diploide se produce un incremento transitorio de la expresión cuando las células son transferidas a un medio de esporulación.



8. BIBLIOGRAFÍA



- ANDERSON, S.F., STEBER, C.M., ESPOSITO, R.E. AND COLEMAN, J.E. (1995). UME6, a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, contains a C-terminal Zn₂Cs₆ binuclear cluster that binds the URS1 DNA sequence in a zinc-dependent manner. *Protein Sci.* **4**: 1832-1843.
- BABURINA, I., GAO, Y., HU, Z. AND JORDAN, F. (1994). Substrate activation of brewers' yeast pyruvate decarboxylase is abolished by mutation of cysteine 221 to serine. *Biochemistry* **33**: 5630-5635.
- BENNETZEN, J. AND HALL, B.D. (1982). Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **257**: 3026-3031.
- BIANCHI, M.M., FALCONE, C., JIE, C.X., WESOŁOWSKI-LOUVEL, M., FRONTALI, L. AND FUKUHARA, H. (1987). Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 μM circular plasmid pKD1. *Curr. Genet.* **12**: 185-192.
- BIANCHI, M. M., TIZZANI, L., DESTRUELLE, M., FRONTALI, L. AND WESOŁOWSKI-LOUVEL, M. (1996). The petite negative yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing pyruvate decarboxylase activity. *Mol. Microbiol.* **19**: 27-36.
- BIANCHI, M.W., PLYTE, S.E., KREIS, M. AND WOODGETT, J.R. (1993). A *Saccharomyces cerevisiae* protein-serine kinase related to mammalian glycogen synthase kinase-3 and the *Drosophila melanogaster* gene *shaggy* product. *Gene* **34**: 51-56.
- BIANCHI, M.W., GUIVARC'H, D., THOMAS, M., WOODGETT, J.R. AND KREIS, M. (1994). Arabidopsis homologs of the shaggy and GSK-3 protein kinases: molecular cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **242**: 337-345.
- BOTSTEIN, D., FALCO, S.C., STEWAT, S.E., BRENNAN, M., SCHERER, S., STINCHCOMB, D.T., STRUHL, K. AND DAVIS, R.W. (1979). Sterile host yeast (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**: 17-24.

- BOUROIS, M., MOORE, P., RUEL, L., GRAU, Y., HEITZLER, P. AND SIMPSON, P. (1990). An early embryonic product of the gene *shaggy* encodes a serine/threonine protein kinase related to the CDC28/cdc2⁺ subfamily. *EMBO J.* **9**: 2877-2884.
- BOWDISH, K. AND MITCHELL, A. P. (1993). Bipartite structure of an early meiotic upstream activation sequence from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2172-2181.
- BOWDISH, K. S., YUAN, H. E. AND MITCHELL, A. P. (1994). Analysis of *RIM11*, a yeast protein kinase that phosphorylates the meiotic activator *IME1*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7909-7919.
- BOYER, H.W. AND ROULLAND-DUSSOIX, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- BREUNIG, K.D. AND KUGER, P. (1987). Functional homology between the yeast regulatory proteins *GAL4* and *LAC9*: lac9-mediated transcriptional activation in *Kluyveromyces lactis* involves protein binding to a regulatory sequence homologous to the *GAL4* protein-binding site. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4400-4406.
- BUCHMAN, A. R., LUE, N.F. AND KORNGBERG, R.D. (1988). Connections between transcriptional activators, silencers and telomeres as revealed by functional analysis of a yeast DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5086-5099.
- BUTLER, G. AND MCCONELL, D.J. (1988). Identification of an upstream activation site in the pyruvate decarboxylase structural gene (*PDC1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **14**: 405-412.

- BUTLER, G., DAWES, I.W. AND MCCONNELL, D.J. (1990). TUF factor binds to the upstream region of the pyruvate decarboxylase structural gene (*PDC1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gen. Genet.* **223**: 449-456.
- CAMERON, S., LEVIN, L., ZOLLER, M. AND WINGLER, M. (1988). cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **53**: 555-566.
- CASAMAYOR, A., KHALID, H., BALCELLS, L., ALDEA, M., CASAS, C., HERRERO, E. AND ARINO, J. (1996). Sequence analysis of a 13.4 kbp fragment from the left arm of chromosome XV reveals a malate dehydrogenase gene, a putative Ser/Thr protein kinase, the ribosomal L25 gene and four new open reading frames. *Yeast* **12**: 1013-1020.
- CLARKE, L., (1990). Centromeres of budding and fission yeasts. *Trends. Genet.* **6**: 150-154.
- CLIFTON, D AND FRAENKEL, D.G. (1981). The *gcr* (glycolysis regulation) mutation of *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **256**: 13074-13078.
- COHEN, R., HOLLAND, J.P., YOKOI, T., HOLLAND, M.J. (1986). Identification of a regulatory region that mediates glucose-dependent induction of the *Saccharomyces cerevisiae* enolase gene *ENO2*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2287-2297.
- COHEN, R., YOKOI, T., HOLLAND, J.P., PEPPER, A.E., HOLLAND, M.J. (1987). Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene *ENO1* is mediated by positive and negative *cis*-acting regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2753-2761.
- COVITZ, P.A., HERSKOWITZ, I. AND MITCHELL, A.P. (1991). The yeast *RME1* gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1- α 2. *Genes Dev.* **5**: 1982-1989.
- CROSS, D.A.; ALESSI, D.R.; COHEN, P., ANDJELKOVICH, M. AND HEMMINGS, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**: 785-789.

- DAILEY, D., SCHIEVEN, G. L., LIM, M. Y., MARQUARDT, H., GILMORE, T., THORNER, J. AND MARTIN, G.S. (1990). Novel yeast protein kinase (*YPK1* gene product) is a 40-kilodalton phosphotyrosyl protein associated with protein-tyrosine kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6244-6256.
- DAVIES, F.M., TSAO, T.Y., FOWLER, S.K. AND RAO, P.N. (1983). Monoclonal antibodies to mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 2926-2930.
- DERRICK, S. AND LARGER, P.J. (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2783-2792.
- DEVEREUX, J., HAEBERLI, P., AND SMITHIES, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- DICKSON, R.C. AND MARKIN, J.S. (1980). Physiological studies of β -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142**: 777-785.
- DICKSON, R.C., DICKSON, L.R. AND MARKIN, J.S. (1979). Purification and properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **137**: 51-61.
- DOHENY, F.K., SORGER, P.K., HYMAN, A.A., TUHENDREICH, S., SPENCER, P. AND HIETER, P. (1993). Identification of essential promoters of the *S. cerevisiae* cinetokore. *Cell* **73**: 761-774.
- DRANGINIS, A.M. (1990). Binding of yeast $\alpha 1$ and $\alpha 2$ as a heterodimer to the operator DNA of a hoploid-specific gene. *Nature* **347**: 682-685.

- DUTTA, K., DATTA, G., AND VERMA, N. C. (1996). Effect of nitrogen starvation on DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **42**: 27-37.
- ENGBRECHT, J. AND ROEDER, G.S. (1990). *MER1*, a yeast gene required for chromosome pairing and genetic recombination, is induced in meiosis. *Mol. Cel. Biol.* **10**: 2379-2389.
- EPPENDORFER, S., KONIG, S., GOLBIK, R., NEEF, H., LEHLE, K., JAENICKE, T., SCHELLENBERGER, A. AND HÜBNER, G. (1993). Effects of metal ions, thiamine diphosphate analoges and subunit interactions on the reconstitution behaviour of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. *Biol. Chem. H.-S.* **374**: 1129-1134.
- FERRERO, I., ROSSI, C., LANDINI, M.P. AND PUGLISI, P.P. (1978). Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite repression of the petite-negative yeast *K.lactis*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **80**: 340-348.
- FLIKWEERT, M.T., VAN DER ZANDEN, L., JANSSEN, W.M.TH.M., STEENSMAN, H.Y., VAN DIJKEN, J.P. AND PRONK, J.T. (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* **12**: 247-257.
- FREIRE-PICOS, M.A., RODRIGUEZ-TORRES, A.M., RAMIL, E., CERDAN, M.E., BREUNING, K.D., HOLLENBERG, C.P. AND ZITOMER, R.S. (1993). Sequence of a cytochrome *c* gene from *Kluyveromyces lactis* and its upstream region. *Yeast* **9**: 201-204.
- FREIRE-PICOS, M.A., GONZÁLEZ-SISO, RODRÍGUEZ-BELMONTE, E., RODRÍGUEZ-TORRES, A.M, RAMIL, E. AND CERDÁN, M.E (1994). Codon usage in *Kluyveromyces lactis* and in yeast cytochrome *c*-encoding genes. *Gene* **139**, 43-49.
- GAILUS-DURNER, V., XIE, J., CHINTAMANENI, C. AND VERSHON, A. K. (1996). Participation of the yeast activator Abf1 in meiosis-specific expression of the *HOP1* gene. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2777-2786.

- GANCEDO, C. AND SERRANO, R. (1989) Energy-yielding metabolism. En: The Yeasts, 2nd edn, vol. 3. (Rose, A. H. and Harrison, J.S. Eds.), pp. 205-259. Academic Press, New York.
- GIETZ, R.D. AND SUGINO, A. (1988). *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking their restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- GIETZ, R.D. AND WOODS, R.A. (1994) en High efficiency transformation with lithium acetate. (Johnston, J.R. Eds.) pp. 121-134, IRL Press, Oxford, UK.
- GIMENO, C.J., LJUNGAHL, P.O., STYLES, C.A. AND FING, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**: 1077-1090.
- GODECKE, A. AND BREUNIG, K.D. (1990). The *LAC4-LAC12* intergenic region of *Kluyveromyces lactis* is one large divergently acting promoter. *Yeast* (15 Congreso Internacional De La Haya) **6**: 05-57a.
- GODECKE, A., ZACHARIAE, W., ARVANITIDIS, A. AND BREUNIG, K.D. (1991). Coregulation of the *Kluyveromyces lactis* lactose permease and β -Galactosidase genes is achieved by interaction of multiple *LAC9* sites in a 2.6 kbp divergent promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5351-5358.
- GOH, P. AND KILMARTIN, J.V. (1993). *NDC10*: a gene involved in chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **121**: 503-512.
- GOUTTE, C. AND JOHNSON, A.D. (1988). $\alpha 1$ protein alters the DNA binding specificity of $\alpha 2$ repressor. *Cell* **52**: 875-882.
- HANAHAH, H. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-780.

- HANKS, S.K., QUINN, A.M. AND HUNTER, T. (1988). The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**:42-52.
- HARDY, T. A., WU, D. AND ROACH, P. J. (1995). Novel *Saccharomyces cerevisiae* gene *MRK1*, encoding a putative protein kinase with similarity to mammalian glycogen synthase kinase-3 and *Drosophila zeste-white3/shaggy*. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **208**: 728-734.
- HARWOOD, A.J., PLYTE, S.E., WOODGETT, J., STRUTT, H. AND KAY, R.R. (1995). Glycogen synthase kinase 3 regulates cell fate in *Dictyostelium*. *Cell* **80**: 139-148.
- HAWKINS, C.F., BORGES, A. AND PERHAM, R.N. (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.* **255**: 77-82.
- HERSKOWITZ, I. (1998). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 536-553.
- HIETER, P., HEGEMANN, J.H., THOMAS, M., DAVIS, R.W. AND PHILIPPSEN, P. (1985). Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell* **42**: 913-921.
- HIGGINS, D.G., BLEASBY, A.J. AND FUCHS, R. (1992). CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *CABIOS* **8**: 189-191.
- HINNEBUSH, A.G. (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of the amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**: 248-273.
- HINNEBUSH, A.G. (1994). Translational control of GCN4: an in vivo barometer of initiation-factor activity. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 409-414.

- HODGE, M.R., KIM, G., SINGH, K. AND CUMSKY, M.G. (1989). Inverse regulation of the yeast *COX5* genes by oxygen and heme. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1958-1964.
- HOEKSTRA, R., MORADAS FERREIRA, P., BOOTSMAN, T.C., MAGER, W.H. AND PLANTA, R.J. (1992). Structure and expression of the ABF1-regulated ribosomal protein S33 gene in *Kluyveromyces*. *Yeast* **8**: 949-959.
- HOHMANN, S. (1991). *PDC6*, a weakly expressed pyruvate decarboxylase gene from yeast, is activated when fused spontaneously under the control of the *PDC1* promoter. *Curr. Genet.* **20**: 373-378.
- HOHMANN, S. (1993). Characterisation of *PDC2*, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **241**: 657-666.
- HOHMANN, S. AND CEDERBERG, H. (1990). Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes *PDC1* and *PDC5*. *Eur. J. Biochem.* **188**: 615-621.
- HOLLOWAY, P. AND SUBDEN, R.E. (1993). The isolation and nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* **24**: 274-277.
- HOSSAIN, M. A., HUQ, E., GROVER, A., DENNIS, E. S., PEACOCK, W. J. AND HODGES, T. K. (1996). Characterization of pyruvate decarboxylases genes from rice. *Plant Mol. Biol.* **31**: 761-770.
- HOYT, M.A., STEARNS, T. AND BOTSTEIN, D.(1990). Chromosome instability mutants of *Saccharomyces cerevisiae* that are defective in all microtubule mediated process. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 223-234.

- HUGHES, K., PULVERER, B.J., THEOCHAROUS, P. AND WOODGETT, J.R. (1992). Baculovirus-mediated expression and characterization of rat glycogen synthase kinase-3 beta, the mammalian homologue of the *Drosophila melanogaster zeste-white3/supper* (*sgg*) homeotic gene product. *Eur J. Biochem.* **203**:305-311.
- HUGHES, K., NIKOLKAKI, E., PLYTE, S.E., TOTTY, N.F. AND WOODGETT, J.R. (1993). Modulation of the glycogen synthase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **12**: 803-808.
- HUNTER, T., AND PLOWMAN, G.D. (1997). The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci.* **22**: 18-22.
- ISHIGURO, K., SHIRATSUCHI, A., SATO, S., OMORI, A., ARIOKA, M., KOBAYASHI, S., UCHIDA, T. AND IMAHORI, K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* **325**: 167-172.
- JACKSON, J.C. AND LOPES, J.M. (1996). The yeast *UME6* gene is required for both negative and positive transcriptional regulation of phospholipid biosynthetic gene expression. *Nucleic Acids Res.* **24**: 1322-1329.
- JIANG, W., LIM, M.Y., YOON, H.J., THORNER, J., MARTIN, G.S. AND CARBON, J. (1995). Overexpression of the yeast MCK1 protein kinase suppresses conditional mutations in centromere-binding protein genes *CBF2* and *CBF5*. *Mol. Gen. Genet.* **246**: 360-366.
- JONAK, C., HEBERLE-BORS, E. AND HIRT, H. (1995). Inflorescence-specific expression of AtK-1, a novel *Arabidopsis thaliana* homologue of shaggy/glycogen synthase kinase-3. *Plant Mol. Biol.* **27**: 217-221.
- JONG, S.C. AND EDWARDS, M.L.S (Eds.). (1990). American Type Culture Collection Catalogue of Yeasts. 18th de Rockville, M.D.
- KARLIN, S. AND ALTSCHUL, S.F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2264-2268.

- KARLIN, S. AND ALTSCHUL, S.F. (1993). Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5873-5877.
- KASSIR, Y., GRANOT, D. AND SIMCHEN, G. (1988). *IME1*, a positive regulatory gene of meiosis in *S. cerevisiae* *Cell* **52**: 853-862.
- KAWASAKI, Y., NOSAKA, K., KANEKO, Y., NISHIMURA, H. AND IWASHIMA, A. (1990). Regulation of thiamine biosynthesis in *S. cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **172**: 6145-6147.
- KELLERMANN, E., SEEBOTH, P.G. AND HOLLENBERG, C.P. (1986). Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (*PDC1*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **14**: 8963-8977.
- KELLERMAN, E. AND HOLLENBERG, C.P. (1988). The glucose-and ethanol-dependent regulation of *PDC1* from *Saccharomyces cerevisiae* by two distinct promoter regions. *Curr. Genet.* **14**: 337-344.
- KIHARA, K., NAKAMURA, M., AKADA, R. AND YAMASHITA, I. (1991). Positive and negative elements upstream of the meiosis-specific glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **266**: 383-392.
- KILLENBERG-JABS, M., KÖNIG, S., EBERHARDT, I., HOHMANN, S. AND HÜBER, G. (1997). Role of Glu51 for cofactor binding and catalytic activity in pyruvate decarboxilase from yeast studied by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **36**: 1900-1905.
- KLEBE, R.J., HARRIS, J.V., SHARP, Z.D. AND DOUGLAS, M.G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.

- KÖNIG, S., SUERGUN, D., KOCH, M.H., HUBNER, G. AND SCHELLENBERGER, A. (1993). The influence of the effectors of yeast pyruvate decarboxylase (PDC) on the conformation of the dimers and tetramers and their pH-dependent equilibrium. *Eur. Biophys J.* **22**: 185-194.
- LACHANCE, M.A. (1993). *Kluyveromyces*: systematics since 1970. *Antonie Van Leeuwenhoek* **63**: 95-104.
- LAZ, T.M., PIETRAS, D.F. YSHERMAN, F.(1984). Differential regulation of the duplicated isocytochrome *c* genes in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* **81**: 4475-4479.
- LECHENER, J. AND CARBON, J., (1991). A240-KD multisubunit protein complex (CPF3) is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* **64**: 717-725.
- LILLIE, S.H. AND PRINGLE, J.R. (1980). Reserve carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143**: 1384-1394.
- LIM, M-Y., DAILEY, D., MARTIN, G. S. AND THORNER, J. (1993). Yeast *MCK1* protein kinase autophosphorylates at tyrosine and serine but phosphorylates exogenous substrates at serine and threonine. *J. Biol. Chem.* **268**: 21155-21164.
- LLOYD, A. T. AND SHARP, P. M. (1992). CODONS: A microcomputer program for codon usage analysis. *J. Heredity* **83**: 239-240.
- LODI, T., O'CONNOR, D., GOFFRINI, P. AND FERRERO, I. (1994). Carbon catabolite repression in *Kluyveromyces lactis*: isolation and characterization of the *KIDLD* gene encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome *c* oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 622-629.
- LOHKA, M.K., KYES, I.L., AND MALLER, J.L. (1987). Metaphase protein phosphorylation in *Xenopus laevis* eggs. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 760-768.

- LOWE, S.E. AND ZEIKUS, G. (1992). Purification and characterization of pyruvate decarboxylase from *Sarcinia ventriculi*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 803-807.
- LOWRY, C.V. AND ZITOMER, R.S. (1984). Oxygen regulation of aerobic and anaerobic genes mediated by common factor in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 6129-6133.
- MAGER, W. H. AND DE KRUIFF, A. J. J. (1995). Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol. Rev.* **59**: 506-531.
- MANDELKOW, E.M.; DREWERS, G., BIERNAT, J., GUSTKE, N., VAN LINT, J., VANDENHEEDE, J.R., MANDELKOW, E. (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.* **314**: 315-321.
- MAS, J., CELIS, E., PIÑA, E. AND BRUNNER, A. (1974). Effect of O₂, ergosterol and sterol precursors on the mating ability of *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**: 613-620.
- MATSUMOTO, K., UNO, I. AND ISHIKAWA, T. (1983). Initiation of meiosis in yeast mutants defective in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **32**:417-423.
- MATSUURA, A., TREININ, M., MITSUZAWA, H., KASSIR, Y. UNO, I. AND SIMCHEN, G. (1990). The adenylate cyclase/protein kinase cascade regulates entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* through gene *IME1*. *EMBO J.* **9**: 3225-3232.
- MCNEIL, J.B. (1988). Functional characterization of a pyrimidine-rich element in the 5'-noncoding region of the yeast iso-1-cytochrome *c* gene. *Mol. Cel. Biol.* **8**: 1045-1054.
- MENART, S. (1993). Construction d'une banque de fusions traductionnelles chez *Kluyveromyces lactis*: recherche de promoteurs forts et caracterisation d'un transporteur du systeme a haute affinite du glucose. Tesis Doctoral. Universite de Paris-Sud Centre D'Orsay.

- MERCADO, J.J. AND GANCEDO, J.M. (1992). Regulatory regions in the yeast *FBP1* and *PCK1* genes. *FEBS Let.* **311**: 110-114.
- MESSING, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**: 20-48.
- MITCHELL, A.P. AND BOWDISH, K.S. (1992). Selection for early meiotic mutants in yeast. *Genetics* **131**: 65-72.
- MITCHELL, A.P. AND HERSKOWITZ, I. (1986). Activation of meiosis and sporulation in yeast repression of the *RME1* product in yeast. *Nature* **319**: 738-742.
- MITCHELL, A.P., DRISCOLL, S.E. AND SMITH, H.E. (1990). Positive control of sporulation-specific genes by the *IME1* and *IME2* products *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2104-2110.
- MOEHLE, C.M. AND HINNEBUSCH, A.G. (1991). Association of RAP1 binding sites with stringent control of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2723-2735.
- MOUNT, R.C., JORDAN, B.E. AND HADFIELD, C. (1996). Reporter gene systems for assaying gene expression in yeast. *Methods in Mol. Biol.* **53**: 239-248.
- MULDER, W., SCHOLTEN, I. H. J. M., ROOM, H. AND GRIVELL, L. A. (1994a). Isolation and characterisation of the linked genes *APA2* and *QCR7*, coding for Ap4A phosphorilase II and the 14kDa subunit VII of the mitochondrial bcl-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Biophys. Acta* **1219**: 719-723.
- MULDER, W., SCHOLTEN, I. H. J. M., NAGELKERKEN, B. AND GRIVELL, L. A. (1994b). Isolation and characterisation of the linked genes, *FPS1* and *QCR8*, coding for farnesyl-diphosphate synthase and the 11 kDa subunit VIII of the mitochondrial bcl-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**: 713-718.

- NEIGEBORN, L. AND MITCHELL, A. P. (1991). The yeast *MCK1* gene encodes a protein kinase homolog that activates early meiotic gene expression. *Genes Dev.* **5**: 533-548.
- NISHIMURA, H., KAWASAKI, Y., KANEKO, Y., NOSAKA, K. AND IWASHIMA, A. (1992a). Cloning and characterization of a positive regulatory gene, *THI2 (PHO6)*, of thiamin biosynthesis in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* **297**: 155-158.
- NISHIMURA, H., KAWASAKI, Y., KANEKO, Y., NOSAKA, K. AND IWASHIMA, A. (1992b). A positive regulatory gene, *THI3*, es required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **174**: 4701-4706.
- NISHIZAWA, M., ARAKI, R AND TERANISHI, Y.(1989). Identification of an upstream activation sequence and an upstream repressible sequence of the pyruvate kinase gene of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 442-451.
- NG, R. AND CARBON, J., (1987). Mutational and in vitro protein-binding studies on centromere DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4522-4534.
- NOSAKA, K., KANEKO, Y., NISHIMURA, H. AND IWASHIMA, A. (1993). Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *S. cerevisiae*. *J. BIOL. CHEM.* **268**: 17440-17447.
- NURSE, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**: 503-508.
- OGDEN, J.E., STANWAY, C., KIM, S., MELLOR, J. KINGSMAN, A.J. AND KINGSMAN, S.M. (1986). Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *PGK* gene depends on an upstream activation sequence, but does not require TATA sequences. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 4335-4343.

- PAY, A., JONAK, C., BOEGRE, L., MESKIENE, I., MAIRINGER, T., SZALAY, A., HEBERLE-BORS, E. AND HIRT, H. (1993). The MsK family of alfalfa protein kinase genes encodes homologues of shaggy/glycogen synthase kinase-3 and shows differential expression patterns in plant organs and development. *Plant J.* **3**: 847-856.
- PEARSON, W.R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Method. Enzymol.* **183**: 63-98.
- PEI, J.-J., TANAKA, T.; TUNG, Y.-C., BRAAK, E., IQBAL, K. AND GRUNDKE-IQBAL, I. (1997). Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**: 70-78.
- PINES, J. (1993). Cyclins and cyclin-dependent kinases; take your partners. *Trends. Biochem. Sci.* **18**: 195-197.
- PLYTE, S., HUGHES, K., NIKOLAKAKI, E., PULVERER, B. AND WOODGETT, J.R. (1992). Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. *Biochim. Biophys. Acta.* **1114**: 147-162.
- POCH, O., LHOE, H., DALLERY, V., DEBEAUX, F., FLEER, R. AND SODOYER, R. (1992). Sequence of the *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase: comparison with prokaryotic enzymes and secondary structure analysis. *Gene* **118**: 55-63.
- PRAKASH, S., SUNG, P. AND PRAKASH, L. (1993). DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 33-70.
- PRINZ, S., KLEIN, F., AUER, H., SCHWEIZER, D. AND PRIMING, M. (1995). A DNA binding factor (UBF) interacts with a positive regulatory element in the promoters of genes expressed during meiosis and vegetative growth in yeast. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3449-3456.
- PRIOR, C., TIZZANI, L., FUKUHARA, H. AND WESOLOWSKI-LOUVEL, M. (1996). *RAG3* gene and transcriptional regulation of the pyruvate decarboxylase gene in *Kluyveromyces lactis*.

- PUZZIS, J.W., HARDY, T.A., JOHNSON, R.B., ROACH, P.J., AND HIETER, P. (1994). *MDS1*, a dosage suppressor of an *mck1* mutant, encodes a putative yeast homolog of glycogen synthase kinase 3. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 831-839.
- RATLEDGE, C. AND EVANS, C.T. (1989). Lipids and their metabolism. En: *The Yeasts*, 2nd edn. (Rose, A.H. and Harrison, J.S. Eds.), pp. 367-455. Academic Press, New York,
- RODRÍGUEZ-BELMONTE, E., FREIRE-PICOS, M.A., RODRÍGUEZ-TORRES, A.M., GONZÁLEZ-SISO, M., CERDÁN, M.E. AND RODRÍGUEZ-SEIJO, J.M (1995). PICDI, a simple program for codon bias calculation. *Mol. Biotechnol.* **5**: 191-195.
- ROSE, M AND BOTSTEIN, D. (1983). Construction and use of gene fusions to LacZ (β -galactosidase) that are expressed in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3252-3259.
- RUBIN-BEJERANO, I., MANDEL, S., ROBZYK, K. AND KASSIR, Y. (1996). Induction of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on conversion of the transcriptional repressor Ume6 to a positive regulator by its regulated association with the transcriptional activator Ime1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 2518-2526.
- SALMERON, J.M., SCOTT, J.R., LANGDON, D. AND JOHNSTON, S.A. (1982). Interaction between transcriptional activator protein *LAC9* and negative regulatory protein *GAL80*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 2950-2956.
- SALIOLA, M., SHUSTER, J.R. AND FALCONE, C. (1990). The alcohol dehydrogenase system in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **6**: 193-204.
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T. AND FRITSCH, E.F. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.
- SANGER, F., NICKLEN, S. AND COULSON, S.A. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

- SCHAAFF, I., GREEN, J. B. A., GOZALBO, D. AND HOHMANN, S. (1989). A deletion of the *PDC1* gene for pyruvate decarboxylase of yeast causes a different phenotype than previously isolated point mutations. *Curr. Genet.* **15**: 75-81.
- SCHMITT, H. D. AND ZIMMERMANN, F. K. (1982). Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. *J. Bacteriol.* **151**: 1146-1152.
- SCHMITT, H. D., CIRIACY, M. AND ZIMMERMANN, F. K. (1983). The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 247-252.
- SEEBOTH, P. G., BOHNSACK, K. AND HOLLENBERG, C. P. (1990). *pdcl* Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of *PDC5*, a gene homologous to *PDC1*. *J. Bacteriol.* **172**: 678-685.
- SEEHAUS, T. (1986). Tesis Doctoral. Technische Hochschule Darmstadt, Darmstadt, Alemania.
- SHAH, J.C. AND CLANCY, M.J. (1992). *IME4*, a gene that mediates *MAT* and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* **12**: 1078-1086.
- SHEFER-VAIDA, M., SHERMAN, A., ASHKENAZI, T., ROBZYK, K. AND KASSIR, Y. (1995). Positive and negative feedback loops affect the transcription of *IME1*, a positive regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Genet.* **16**: 219-228.
- SHERMAN, A., SHEFER, M., SAGEE, S. AND KASSIR, Y. (1993). Post-transcriptional regulation of *IME1* determines initiation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 375-384.
- SHERO, J. H. AND HIETER, P. (1991). A suppressor of centromere DNA mutation encodes a putative protein kinase (*MCK1*). *Genes Dev.* **5**: 549-560.

- SHORE, D. (1994). RAP1: a protein regulator in yeast. *TIG* **10**: 408-412.
- SIEGFRIED, E., PERKINS, L.A., CAPACI, T.M. AND PERRIMON, N. (1990). Putative protein kinase product of the *Drosophila* segment polarity gene *zeste-white3*. *Nature* **345**: 825-829.
- SIEGFRIED, E., CHOU, T.B. AND PERRIMON, N. (1992). *Wingless* signaling acts through *zeste-white3*, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* **71**: 1167-1179.
- SISO, M.I.G., RAMIL, E., CERDÁN, M.E. AND FREIRE-PICOS, M.A. (1996). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect. *Enzyme Microb. Technol.* **18**: 585-591.
- SMITH, H.E. AND MITCHELL, A.P. (1989). A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Cell. Biol.* **9**: 2142-2152.
- SMITH, G.E., SU, S.S.Y., NEIGEBORN, K., DRISCOLL, S.E. AND MITCHELL, A.P. (1990). Role of *IME1* expression in control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6103-6113.
- SMITH, H. E., DRISCOLL, S. E., SIA, R. A. L., YUAN, H. E. AND MITCHELL, A. P. (1993). Genetic evidence for transcriptional activation by the yeast *IME1* gene product. *Genetics* **133**: 775-784.
- STEARNS, T., HOYT, M.A. AND BOTSTEIN, D. (1990). Yeast mutants sensitive to anti-microtubule drugs define three genes that regulate microtubule function. *Genetics* **124**: 251-262.
- STEBER, C. M. AND ESPOSITO, R. E. (1995). *UME6* is a central component of a developmental regulatory switch controlling meiosis-specific gene expression *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 12490-12494.

- STILES, J.I., SZOSTAK, J.W., YOUNG, A.T., WU, R., CONSAUL, S. AND SHERMAN, F. (1981). DNA sequence of a mutation in the leader region of the yeast iso-1-cytochrome *c* mRNA. *Cell* **25**: 277-284.
- STRUHL, K. (1989). Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 1051-1077.
- SU, S.S.Y. AND MITCHELL, A.P. (1993a). Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**: 67-77.
- SU, S.S.Y. AND MITCHELL, A.P. (1993b). Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucl. Acids Res.* **21**: 3789-3797.
- SUN, H., TRECO, D., SCHULTES, N.P. AND SZOSTAK, J.W. (1989). Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion. *Nature* **338**: 87-90.
- SUTHERLAND, C., LEIGHTON, I.A. AND COHEN, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: New kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* **296**: 15-19.
- SVETLOV, V. AND COOPER, T. G. (1995). Review: Compilation and characteristics of dedicated transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 1439-1484.
- TAYLOR, S.S., KNIGHTON, D.R., ZHENG, J.H., TENEYCK, L.F. AND SOWADSKI, J.F. (1992). Structural framework for the protein kinase family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**: 429-462.
- THOMAS, J., NEFF, N AND BOTSTEIN, D. (1985). Isolation and characterization of mutations in the β -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **112**: 715-734.

- TRAWICK, J.D., KRAUT, N., SIMON, F.R. AND POYTON, R.O. (1992). Regulation of yeast *COX6* by the general transcription factor ABF1 and separate HAP2-and heme-responsive elements. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2302-2314.
- TSANG, J.S.H., HENRY, Y.A.L., CHAMBERS, A., KINGSMAN, A.J AND KINGSMAN, M. (1990). Phosphorylation influences the binding of the yeast RAPI protein to the upstream activating sequence of the *PGK* gene. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7331-7337.
- UEMURA, H. AND FRAENKEL, D.G.. (1990). *gcr2*, a new mutation affecting glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6389-6396.
- UEMURA, H. AND JIGAMI, Y. (1992). Role of *GCR2* in transcriptional activation of yeast glycolytic genes. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3834-3842.
- ULLRICH, J. AND LEUBE, J. (1986). Pyruvate decarboxylase from an almost protease-free yeast. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367**: 8538.
- VACCARO, J. A., CRANE III, E. J., HARRIS, T. K. AND WASHABAUGH, M. W. (1995). Mechanism of reconstitution of brewers' yeast pyruvate decarboxylase with thiamin diphosphate and magnesium. *Biochemistry* **34**: 12636-12644.
- VANDRE, D.D., DAVIS, F.M., RAO, P.N. AND BORIS, G.G. (1984). Phosphoproteins are components of mitotic microtubule organizing centers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 4439-4443.
- WELSH, G.I. AND PROUD, C.G. (1993). glycogen synthase kinase-3 is rapidly inactivated in response to insulin and phosphorylates eukaryotic initiation factor eIF-2B. *Biochem. J.* **294**: 625-629.
- WESOŁOWSKI-LOUVEL, M. AND FUKUHARA, H. (1995). A map of the *Kluyveromyces fragilis* genome. *Yeast* **11**: 211-218.

- WESOŁOWSKI-LOUVEL, M., BREUNIG, K.D. AND FUKUHARA, H. (1996). *Kluyveromyces lactis*. In: Nonconventional yeasts in biotechnology. (Wolf, K. Ed.), pp. 139-201. Springer, Berlin.
- WESTWOOD, J.T., CHURCH, R.B. AND WAGENAAR, E.B. (1985). Changes in protein phosphorylation during the cell cycle of Chinese hamster ovary cell. *J. Biol. Chem.* **260**: 10308-10313.
- WHITEWAY, M., DIGNARD, D. AND THOMAS, D.Y. (1991). Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9410-9414
- WINDE(De), J.H., LEEUWEN(VAN), H.C. AND GRIVELL, A.L. (1993). The multifunctional regulatory proteins Abf1 and Cpf1 are involved in the information of a nuclease-hypersensitive region in the promoter of the *QCR8* gene. *Yeast* **9**: 847-857.
- WOODGETT, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* **8**: 2431-2438.
- WOODGETT, J.R. (1991). A common denominator linking glycogen metabolism, nuclear oncogenes and development. *Trends. Biochem. Sci.* **16**: 177-181.
- WRIGHT, A.P.H., PNG, H.L. AND HARTLEY, B.S. (1989). Identification, cloning and characterization of a new gene required for the pyruvate decarboxylase activity. *Curr. Genet.* **15**: 171-176.
- YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J. AND MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strain: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- YOSHIDA, M., KAWAGUCHI, H., SAKATA, Y., KOMINAMI, K., HIRANO, M., SHIMA, H., AKADA, R. AND YAMASHITA, I. (1990). Initiation of meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* requires a novel protein kinase homologue. *Mol. Gen. Genet.* **211**: 176-186.

ZACHARIAE, W., KUGER, P. AND BREUNIG, K.D. (1993). Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator *LAC9* (*K1GAL4*). *Nucleic Acids Res.* **21**: 69-77.

Zeng, X., Farrenkopf, B., Hohmann, S., Dyda, F., Furey, W. and Jordan, F. (1993). Role of cysteines in the activation and inactivation of brewers' yeast pyruvate decarboxilase investigated with a *PDC1-PDC6* fusion protein. *Biochemistry* **32**: 2704-2709.

1997
TD

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
AREA DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759548