

ESTUDIO DE LA REGIÓN REGULADORA
DEL GEN *KICYC1* DE *Kluyveromyces lactis*

ELVIRA RAMIL TOJEIRO

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

**ESTUDIO DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN *KICYC1*
DE *Kluyveromyces lactis***

Memoria para aspirar al grado de Doctora
en Biología, presentada por
Dña. Elvira Ramil Tojeiro

Septiembre de 1997

Foto portada:

Iso-1-citocromo *c* de *Saccharomyces cerevisiae*.

Imagen obtenida del "*Saccharomyces Genome Database*" el 22/10/97.

Cherry , J.M. y col. <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

El presente trabajo: **ESTUDIO DE LA REGIÓN REGULADORA DEL GEN *KICYC1* DE *Kluyveromyces lactis***, presentado por Dña. Elvira Ramil Tojeiro 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, 22 de Septiembre de 1997

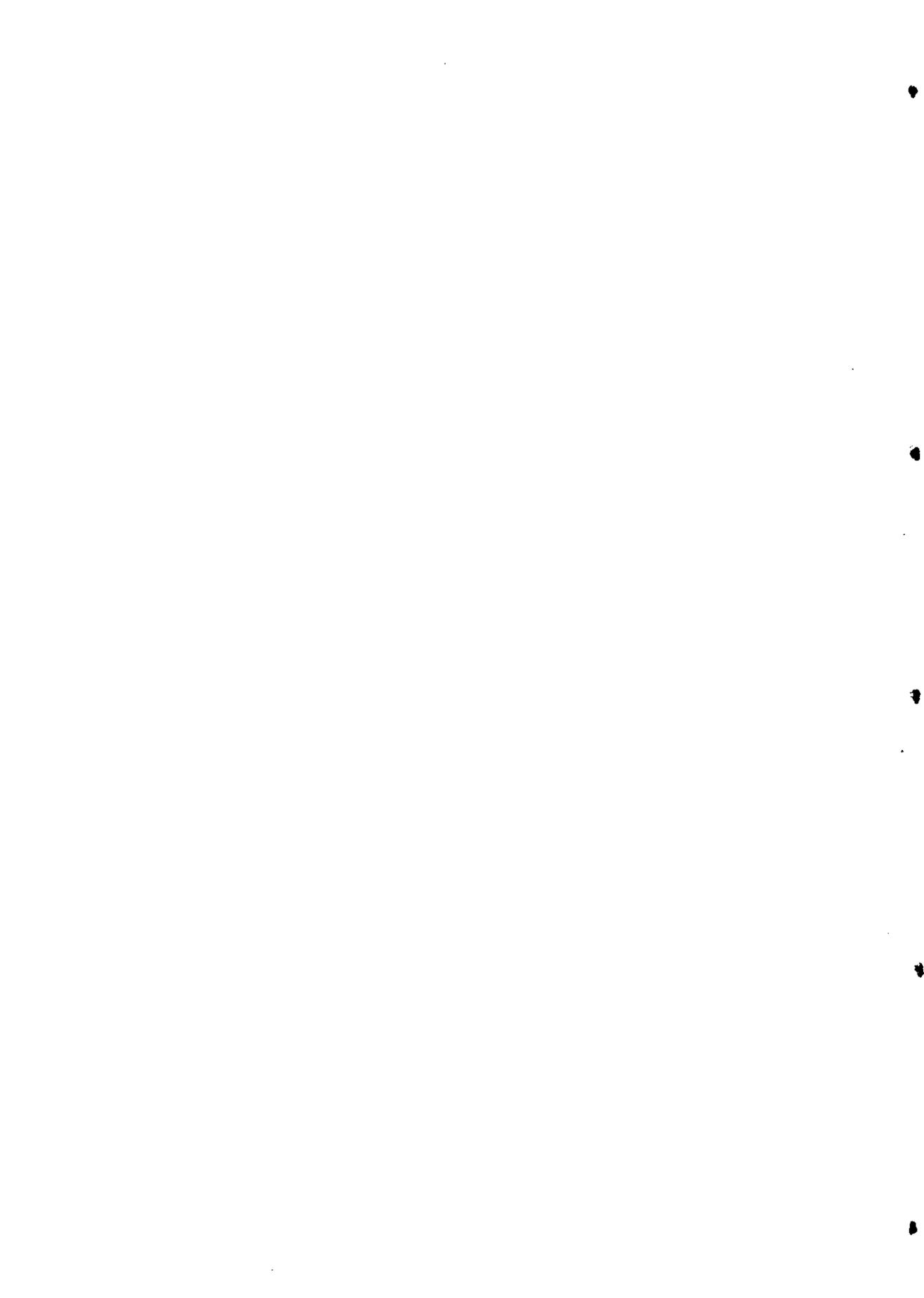


VºBº

LA DIRECTORA DEL TRABAJO

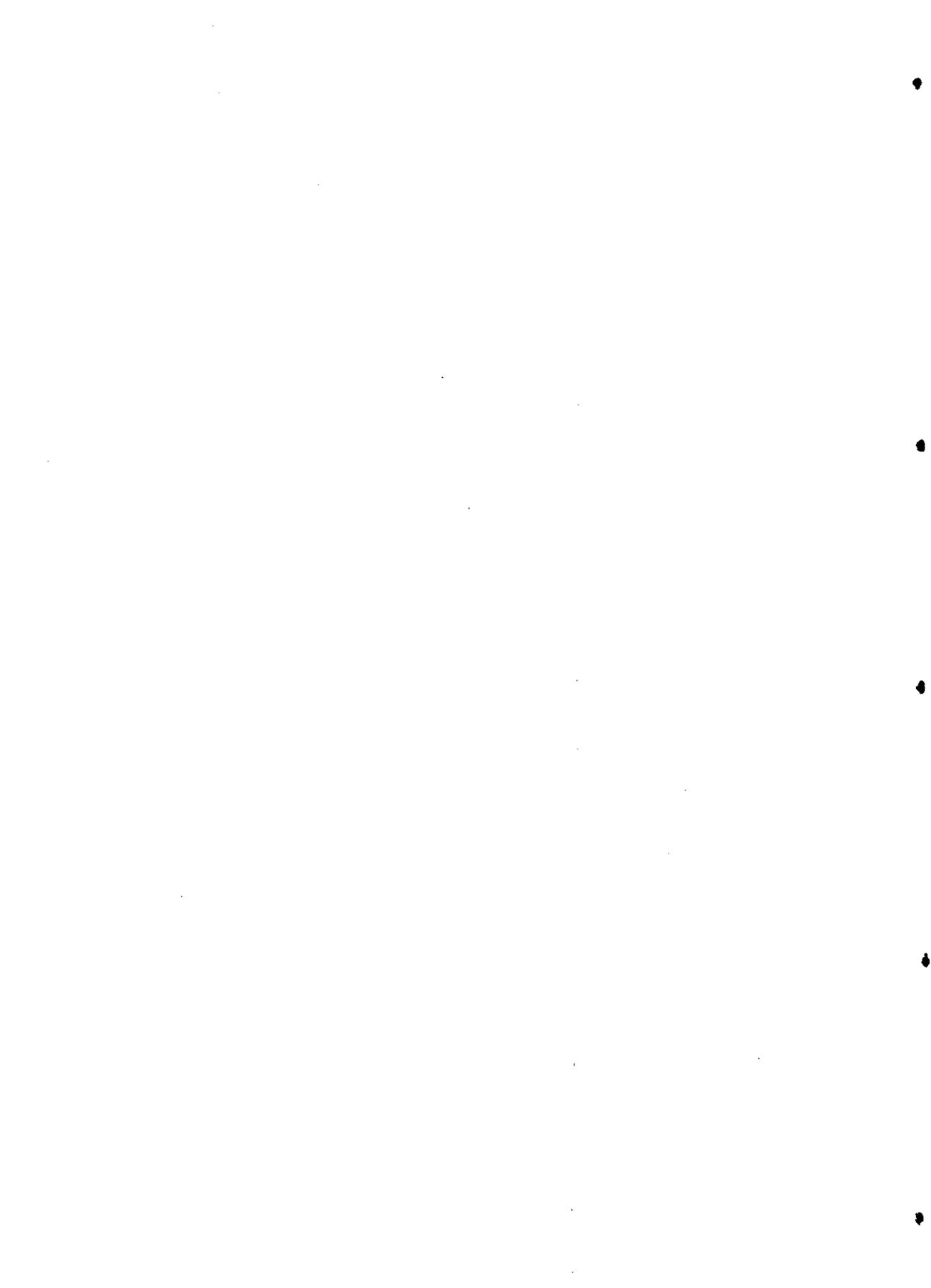
Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva

Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular.



La autora de este trabajo ha disfrutado durante su realización de una beca predoctoral de la Xunta de Galicia de 1992 a 1994, de una beca de investigación de la Diputación Provincial de La Coruña durante el año 1995 y de 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).



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento,

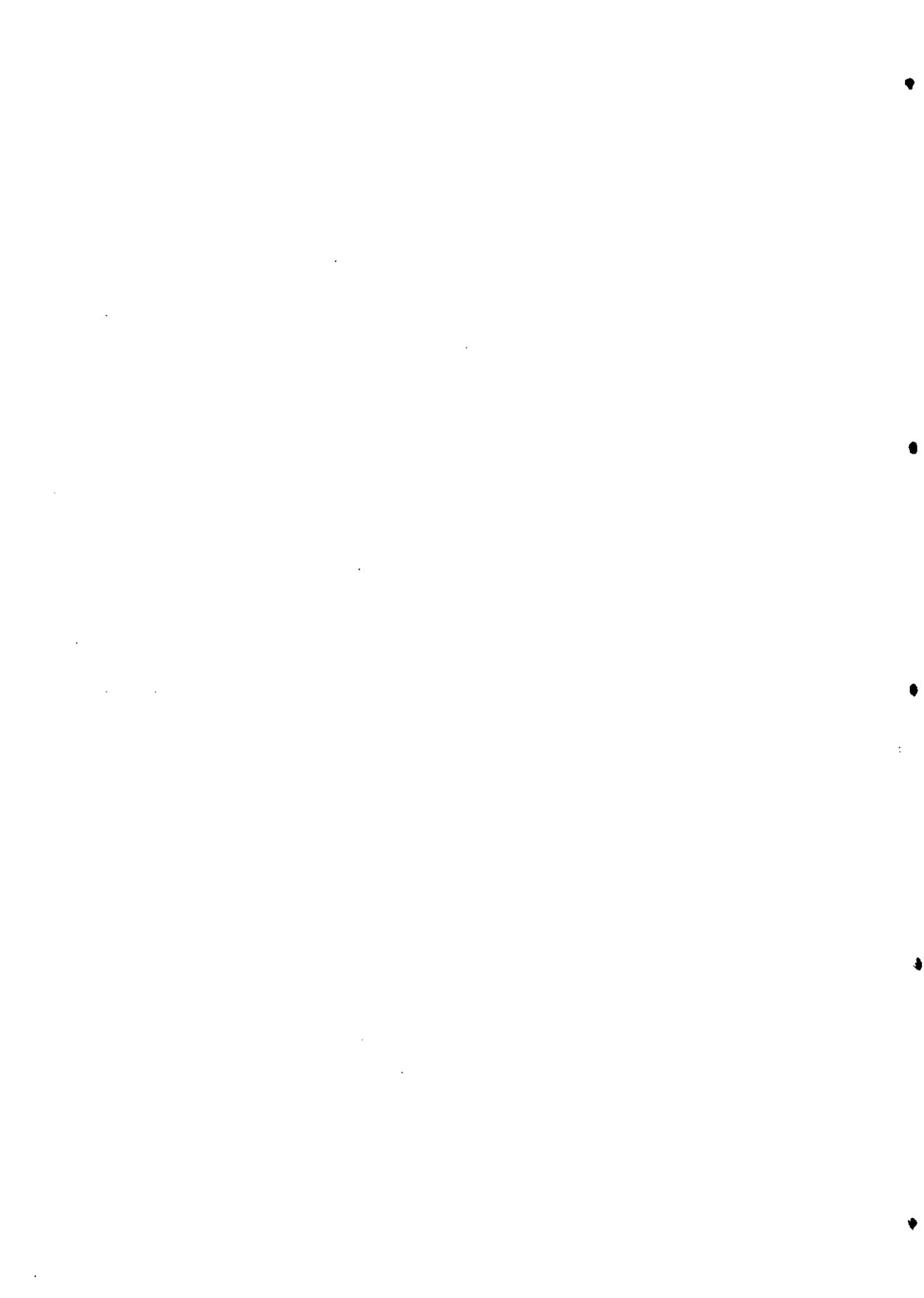
A la Dra. M^a. Esperanza Cerdán Villanueva por haber dirigido la realización del presente trabajo y por todas sus enseñanzas.

A la Dra. M^a Angeles Freire Picos por haberme transmitido su constante entusiasmo por la ciencia.

A la Dras. Ana Rodríguez Torres, Esther Rodríguez Belmonte e Isabel González Siso por la ayuda que me ofrecieron en todo momento. A Manuel Becerra, Belén Tizón, Mónica González Dominguez y Jose Luis Cadahía, por todo el tiempo que hemos compartido con la Biología Molecular y sobre todo por las risas de las "siete de la tarde". También a María Elena Dopico y a María Alvariño por su asistencia técnica, y al resto de compañeros de Fisiología Vegetal, Genética y Microbiología por su colaboración e interés.

Al Dr. Bernard Guiard por su colaboración con los ensayos de retardación y a los Dres. M. Bolotin-Fukuhara, H. Fukuhara y L. Grivell por habernos suministrado líneas y plásmidos de *K. lactis*.

A mi familia y amigos, por su papel esencial en hacer posible este trabajo. En especial, a mis padres y a Luis.



ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Elementos que intervienen en la regulación transcripcional en levaduras | 3 |
| 1.1.1. Elementos <i>cis</i> | 3 |
| 1.1.2. Elementos <i>trans</i> | 5 |
| 1.1.3. La maquinaria transcripcional básica | 5 |
| 1.2. Mecanismos de la regulación de la transcripción | 8 |
| 1.2.1. Activadores transcripcionales | 8 |
| 1.2.2. Coactivadores | 9 |
| 1.2.3. Represión transcripcional | 10 |
| 1.3. Transducción de señales reguladoras de la transcripción en levaduras | 11 |
| 1.4. Regulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas mitocondriales | 13 |
| 1.4.1. Regulación transcripcional por oxígeno | 13 |
| 1.4.1.1. Hemo, una señal intracelular | 13 |
| 1.4.1.2. Genes regulados por hemo | 14 |
| 1.4.1.3. Hap1p | 15 |
| 1.4.1.4. Hap2/3/4/5p | 19 |
| 1.4.1.5. Factores ROX | 21 |
| 1.4.2. Regulación por fuente de carbono | 22 |
| 1.4.2.1. Factores <i>trans</i> implicados en la represión por glucosa | 23 |
| Ssnf1p | 23 |

| | |
|---|-----------|
| Mig1p | 24 |
| Ssn6/Tup1 | 24 |
| 1.5. Factores reguladores multifuncionales de levaduras | 26 |
| 1.5.1. Abf1p | 26 |
| 1.5.2. Cpf1p | 27 |
| 1.5.3. Rap1p | 28 |
| 1.6. Regulación de genes que codifican para citocromo c de levaduras | 28 |
| 1.6.1. Los genes citocromo c en levaduras | 28 |
| 1.6.2. Regulación del gen <i>CYC1</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 29 |
| 1.6.3. Regulación del gen <i>CYC7</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 30 |
| 1.6.4. El gen <i>KICYC1</i> de <i>Kluyveromyces lactis</i> | 31 |
| 1.7. Factores transcripcionales de <i>K. lactis</i> | 32 |
| 1.7.1. Factores específicos de regulación del metabolismo respiro-fermentativo | 32 |
| 1.7.1.1. <i>KIHAP2</i> | 32 |
| 1.7.1.2. <i>KIHAP3</i> | 33 |
| 1.7.1.3. <i>KISNF1</i> | 33 |
| 1.7.1.4. <i>KMIG1</i> | 33 |
| 1.7.1.5. <i>KITUPI</i> | 34 |
| 1.7.2. Factores reguladores multifuncionales | 34 |
| 1.7.2.1. <i>KIABF1</i> | 34 |
| 1.7.2.2. <i>KICPFI</i> | 35 |
| 1.7.2.3. <i>KIRAPI</i> | 35 |
| 1.8. Metabolismo respiro-fermentativo en <i>K. lactis</i> | 36 |

| | |
|--|----|
| 2. OBJETIVOS | 37 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 41 |
| 3.1. Líneas | 43 |
| 3.1.1. Líneas celulares de bacterias | 43 |
| 3.1.2. Líneas celulares de levaduras | 44 |
| 3.2. Medios de cultivo | 45 |
| 3.2.1. Medios de cultivo para bacterias | 45 |
| 3.2.2. Medios de cultivo para levaduras | 48 |
| 3.3. Plásmidos | 52 |
| 3.3.1. Vectores de clonación | 52 |
| 3.3.2. Descripción de algunas construcciones plasmídicas de partida | 53 |
| 3.3.3. Construcciones plasmídicas realizadas en este trabajo | 54 |
| 3.4. Extracción de ácidos nucleicos | 59 |
| 3.4.1. DNA plasmídico de <i>E. coli</i> | 59 |
| 3.4.1.1. Método de la lisis alcalina | 59 |
| 3.4.1.2. Precipitación con polietilenglicol | 60 |
| 3.4.1.3. Método rápido de preparaciones a pequeña escala | 60 |
| 3.4.1.4. Preparación de DNA plasmídico ultrapuro | 61 |
| 3.4.2. Obtención de DNA genómico de <i>K. lactis</i> | 63 |
| 3.4.3. Obtención de RNA total de levaduras | 64 |
| 3.4.4. Medida de la concentración de ácidos nucleicos | 64 |
| 3.4.5. Composición de algunas disoluciones descritas | 65 |

| | |
|--|----|
| 3.5. Métodos de transformación | 66 |
| 3.5.1. Transformación de <i>E. coli</i> | 66 |
| 3.5.1.1. Método de transformación con cloruro cálcico | 66 |
| 3.5.1.2. Método de transformación con cloruro de rubidio | 66 |
| 3.5.2. Transformación de levaduras por el método de Klebe | 67 |
| 3.6. Modificación enzimática del DNA | 68 |
| 3.6.1. Digestion con endonucleasas de restricción | 68 |
| 3.6.2. Digestión con nucleasas ExoIII para generar deleciones | 68 |
| 3.6.3. Digestión con nucleasa Bal31 para generar deleciones internas | 68 |
| 3.6.4. Utilización de polimerasas | 69 |
| 3.6.5. Reacciones de ligamiento | 72 |
| 3.7. Técnicas de electroforesis | 72 |
| 3.7.1. Geles de agarosa | 72 |
| 3.7.2. Geles de poliacrilamida | 74 |
| 3.8. Método de secuenciación de Sanger | 78 |
| 3.9. Técnicas de hibridación | 78 |
| 3.9.1. <i>Southern Blot</i> | 78 |
| 3.9.2. <i>Northern Blot</i> con digoxigenina y radiactivo | 79 |
| 3.10. Ensayos β-galactosidasa | 80 |
| 3.10.1. Permeabilización de células | 81 |

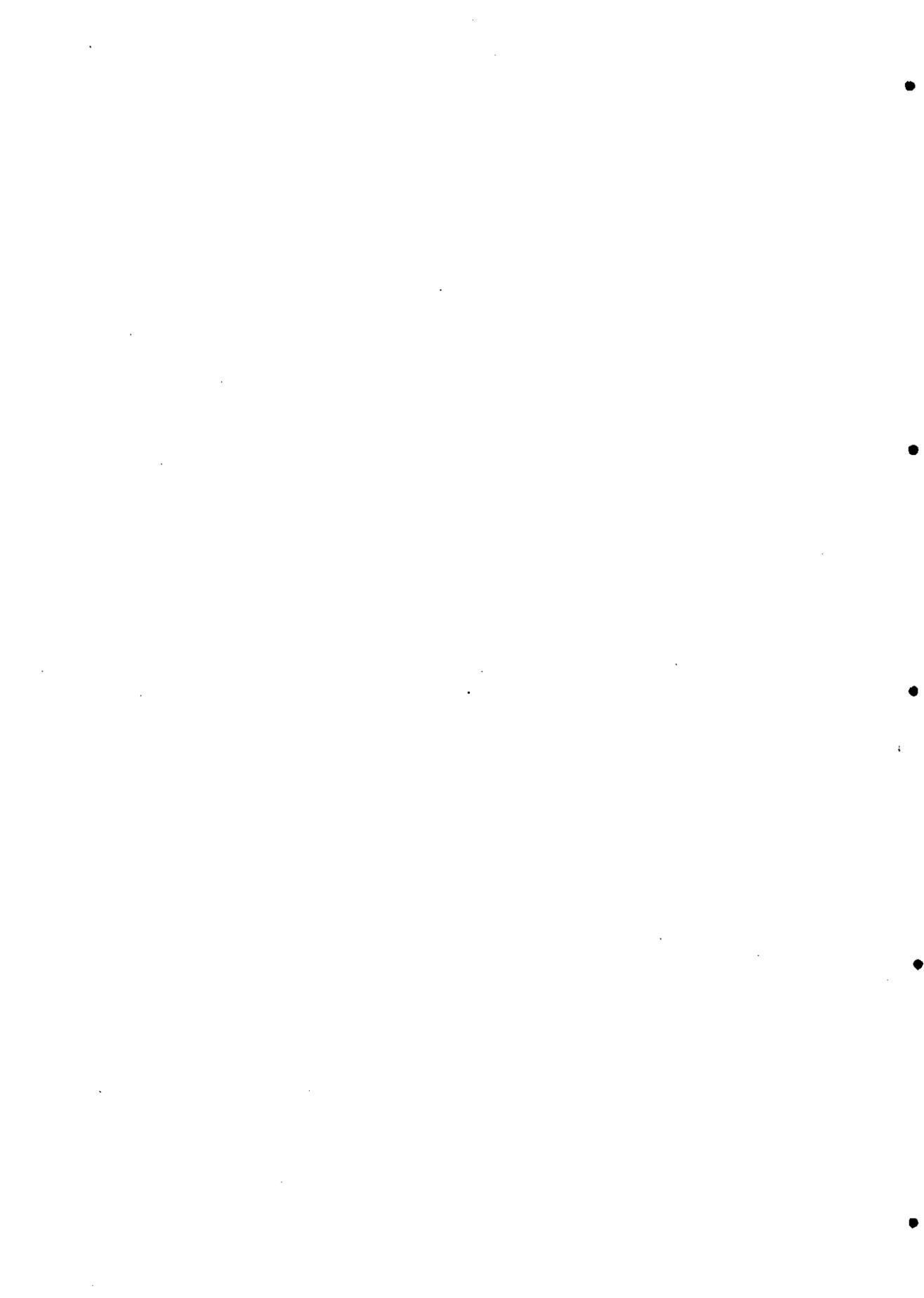
| | |
|--|-----|
| 3.10.2. Obtención de extractos crudos y normalización de la actividad respecto a la concentración de proteína obtenida | 82 |
| 3.11. Interacciones DNA-proteína | 84 |
| 3.11.1. Preparación de extractos de proteínas de levaduras | 84 |
| 3.11.2. Reacciones de unión DNA-proteína in vitro | 85 |
| 3.12. Mutagénesis dirigida por el método de Kunkel | 86 |
| 3.12.1. Protocolos generales | 86 |
| 3.12.2. Reacciones de mutagénesis | 89 |
| 3.13. Programas informáticos | 93 |
| 4. RESULTADOS | 95 |
| 4.1. Secuenciación e identificación de posibles regiones reguladoras | 97 |
| 4.1.1. Subclonación de un fragmento que contiene la región 5' del gen <i>KICYC1</i> | 97 |
| 4.1.2. Secuenciación de la región 5' al gen <i>KICYC1</i> | 99 |
| 4.1.3. Análisis preliminar de la secuencia obtenida | 101 |
| 4.1.4. Identificación de elementos reguladores mediante búsqueda de homologías | 102 |
| 4.2. Expresión de los genes <i>CYC1</i> y <i>CYC7</i> de <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i> | 106 |
| 4.2.1. Obtención de una línea con el gen <i>KICYC1</i> interrumpido | 106 |
| 4.2.2. Construcción de plásmidos portadores de los genes <i>KICYC1</i> , <i>CYC1</i> y <i>CYC7</i> | 108 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.3. Crecimiento de la línea Nulo- <i>KICYC1-Klura3</i> en distintos medios | 108 |
| 4.2.4. Complementación de la línea Nulo- <i>KICYC1-Klura3</i> con diferentes genes citocromo <i>c</i> de levadura | 108 |
| 4.2.5. Expresión heteróloga del gen <i>CYC7</i> en <i>K.lactis</i> | 109 |
| 4.3. Localización de regiones reguladoras mediante deleciones de la región promotora | 111 |
| 4.3.1. Fusión del promotor de <i>KICYC1</i> al gen <i>lacZ</i> de <i>Escherichia coli</i> | 111 |
| 4.3.1.1. Construcción de plásmidos portadores de la fusión | 111 |
| 4.3.1.2. Obtención de deleciones unidireccionales | 112 |
| 4.3.1.3. Obtención de deleciones internas mediante digestiones con nucleasa <i>Bal31</i> | 115 |
| 4.3.2. Medida de la actividad β -galactosidasa en células de levadura transformadas con las diferentes deleciones obtenidas | 115 |
| 4.3.2.1. Deleciones unidireccionales | 117 |
| 4.3.2.2. Deleciones internas | 118 |
| 4.3.2.3. Mutaciones puntuales | 121 |
| 4.4. Interacciones DNA-proteína | 123 |
| 4.4.1. Experimentos de unión DNA-proteína utilizando sondas que contienen el consenso para la unión de ABF1 y CPF1 | 125 |
| 4.4.1.1. Sondas rest1 y olig1 | 125 |
| 4.4.1.2. Sonda rest2. | 126 |
| 4.4.1.3. Ensayos de formación del complejo en distintas condiciones de cultivo | 129 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.2. Experimentos de unión DNA-proteína con secuencias correspondientes a la zona comprendida entre -413 y -333 del promotor de <i>KICYC1</i> | 130 |
| 4.4.2.1. Sondas olig2. y olig3. | 131 |
| 4.4.2.2. Ensayos de competición específica | 132 |
| 4.4.2.3. Formación del complejo DNA-proteína con extractos de las líneas <i>Klhap2</i> y <i>Klhap3</i> | 134 |
| 4.4.2.4. Formación del complejo DNA-proteína en distintas condiciones de crecimiento | 135 |
| 4.4.3. Caracterización funcional de los consensos UAS1A y UAS1B | 136 |
| 4.4.3.1. Expresión heteróloga del gen <i>KICYC1</i> en las líneas de <i>S. cerevisiae</i> ZW10 y ZW13 | 136 |
| 4.4.3.2. Experimentos de unión DNA-proteína con la región homóloga al UAS1A de <i>CYC1</i> y UAS de <i>CYC7</i> | 138 |
| <i>Caracterización de la unión UAS1A-proteína utilizando extractos de K. lactis</i> | 138 |
| <i>Experimentos de unión DNA-proteína con extractos de Saccharomyces enriquecidos en Hap1p</i> | 140 |
| <i>Caracterización del complejo con la sonda pcr1a(-316,-10)</i> | 141 |
| <i>Caracterización del complejo con las sondas pcr1a, (-316,-10), pcr2a(-316,-268) y pcr1b(-316,-210)</i> | 142 |
| <i>Caracterización del complejo formado con la sonda portadora del consenso UAS1A mutado</i> | 143 |
| <i>Ensayos de competición específica con el extracto proteico de la línea de S. cerevisiae 334</i> | 144 |
| 4.4.4. Experimentos de unión DNA-proteína con el fragmento que contiene el consenso UAS2 | 145 |

| | |
|---|-----|
| 5. DISCUSIÓN | 147 |
| 5.1. Efecto de los factores transcripcionales multifuncionales en el promotor de <i>KICYC1</i> | 150 |
| 5.1.1. Abf1p | 150 |
| 5.1.2. Cpf1p | 152 |
| 5.2. Efecto de los factores transcripcionales específicos en el promotor de <i>KICYC1</i> | 154 |
| 5.2.1. Hap1p | 154 |
| 5.2.2. Hap2/3/4/5p | 155 |
| 5.3. Otras secuencias reguladoras presentes en el promotor de <i>KICYC1</i> | 157 |
| 5.4. Expresión heteróloga de los genes <i>CYC1</i> y <i>CYC7</i> de <i>S. cerevisiae</i> y en <i>K. lactis</i> | 159 |
| 5.5. Resumen de las características del promotor de <i>kICYC1</i> | 159 |
| 6. CONCLUSIONES | 161 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 165 |
| Abreviaturas | 185 |

1. INTRODUCCIÓN



1.1. Elementos que intervienen en la regulación transcripcional en levaduras.

Un punto clave de la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas es el inicio de la síntesis de mRNA por la RNA polimerasa II. Muchos de los mecanismos fundamentales de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II están altamente conservados en los organismos eucariotas y presentan similitudes con los organismos procariontes.

En la formación del complejo de transcripción participan dos tipos de elementos, los dependientes de la estructura del DNA en las regiones promotoras (elementos *cis*) y el conjunto de proteínas que intervienen en el inicio de la síntesis de mRNA interaccionando directa o indirectamente con el DNA (factores *trans*).

1.1.1. Elementos *cis*.

Existen dos tipos de elementos *cis*, aquellos que determinan el sitio de inicio de la transcripción y aquellos que determinan la tasa de transcripción génica. Al primer grupo pertenecen los elementos TATA y los elementos iniciadores característicos de los promotores sin TATA (*TATA less*). Los elementos TATA e iniciador están localizados cerca del sitio de inicio de la transcripción y representan los sitios de unión para la maquinaria básica de la transcripción por medio de la proteína TBP de unión a TATA (*TATA Binding Protein*) que es el componente principal del factor general de la transcripción TFIID. La unión de TBP al DNA produce una severa distorsión debido a que las secuencias de unión que contienen dinucleótidos TA se caracterizan por su flexibilidad. Esto explicaría la variabilidad de secuencias ricas en AT que permiten la unión de TBP y la función de la TATA. En promotores sin TATA, TBP también se une a secuencias situadas a unas 30pb del sitio de inicio de la transcripción que no tienen ninguna similitud aparente con los elementos TATA (Künzler y col., 1996).

En levaduras los sitios de inicio de la transcripción parecen estar determinados por secuencias específicas y no por la distancia relativa a las cajas TATA, como sucede en los genes de eucariotas superiores en los cuales la distancia del elemento TATA es determinante. El espacio entre los elementos TATA y los sitios de inicio en levaduras (40-120pb) es mucho más flexible y puede haber varios elementos TATA y varios puntos de inicio de la transcripción. En eucariotas superiores suele haber un elemento TATA y un sitio de inicio que aparecen separados por 25 a 30pb (Struhl, 1989).

El factor general de la transcripción TFIIB actúa como puente entre el elemento TATA y el sitio de inicio del mRNA y resulta esencial para una selección normal del sitio de inicio *in vivo* (Pinto y col., 1992). El factor TFIIB de levaduras y de humanos no es funcionalmente intercambiable, lo cual podría reflejar las diferentes distancias que hay entre el elemento TATA y el sitio de inicio de la transcripción en levaduras y en eucariotas superiores (Struhl, 1995).

Al segundo grupo de elementos *cis* pertenecen las secuencias que son reconocidas por factores reguladores específicos UAS (*Upstream Activation Sequences*) o URS (*Upstream Repression Sequences*), estas últimas también llamadas operadores. Generalmente la represión es mucho más eficiente cuando el operador está entre el elemento UAS y la TATA. Los elementos *upstream*, UAS y URS, son secuencias de 10 a 30pb localizadas de 20 a 1000pb del elemento TATA y son reconocidos por factores de transcripción que son específicos para promotores individuales o grupos de promotores. Estos elementos contienen sitios únicos o múltiples para la unión de proteínas al DNA, y, aunque no son esenciales para el inicio de la transcripción, determinan la regulación de un promotor dado. Los genes sujetos a un control común comparten elementos *upstream* mientras que los genes no regulados coordinadamente contienen diferentes elementos *upstream* (Struhl 1995).

1.1.2. Factores *trans*.

Los factores *trans* pertenecen a su vez a tres grupos diferentes. Un primer grupo serían los factores de transcripción generales que constituyen la maquinaria transcripcional básica junto con la RNA polimerasa II. El segundo grupo lo constituyen los factores transcripcionales específicos de cada promotor que serían los responsables de modular los niveles del mRNA que se produce. Y por último el grupo de los coactivadores o adaptadores.

1.1.3. La maquinaria transcripcional básica.

La RNA polimerasa II está constituida por al menos doce subunidades codificadas por genes diferentes a lo largo del genoma. Cataliza la transcripción de todos los genes que codifican para proteínas y también algunos de los RNAs nucleares pequeños implicados en el proceso de corte-empalme de RNA (Sentenac, 1985). A pesar de la complejidad estructural que presenta la RNA polimerasa II, necesita además otras proteínas auxiliares, factores generales de la transcripción que permiten reconocer las dianas de los promotores y producir una transcripción basal, y factores reguladores específicos de la transcripción y coactivadores que modulan los niveles de transcripción (Nikolov y Bukley, 1997).

Uno de los mecanismos iniciales implicados en el control de la actividad de la maquinaria de transcripción lo constituye la regulación coordinada de la biosíntesis de las subunidades de la RNA polimerasa II, recientemente descrito en levaduras (Jansma y col. 1996). En *Escherichia coli* se ha observado que la síntesis de las proteínas que constituyen el núcleo de la RNA polimerasa I está coordinada para mantener la estequiometría de cada subunidad en el enzima. Las dos subunidades mayores de la RNA polimerasa de bacterias, β y β' , se transcriben a partir del promotor de un mismo operón (Yura y Ishihama, 1979). El estudio de la región *upstream* de los genes que codifican para las dos subunidades mayores de la RNA polimerasa II de levaduras, *RPO21* y *RPO22* ha mostrado que existen similitudes en el tipo, la organización y la función de

los elementos *cis* que regulan su expresión. En ambos aparecen sitios de unión para las proteínas multifuncionales Abf1p y Reb1p y una región rica en T que si se deletionan, producen un descenso de 10 a 30 veces en los niveles de expresión. Además, se ha observado que estos elementos se encuentran en los promotores de otros genes que codifican para otras subunidades de la RNA polimerasa II, ya sea en conjunto o de manera independiente (Jansma y col., 1996; Nouraini y col., 1996). En levaduras este tipo de regulación coordinada se ha observado también en la acción de la proteína Gal4p sobre los promotores de los genes que intervienen en la ruta del metabolismo de la galactosa (Johnston 1987) y en la acción de las proteínas Abf1p y Rap1p sobre la expresión de los genes de proteínas ribosomales (Planta y col., 1995). El factor Abf1p también se ha visto que afecta a la transcripción de los genes *RPC160* y *RPC40*, que codifican para subunidades de la RNA polimerasa III de *S. cerevisiae* (Della Seta y col., 1990).

Los factores generales de transcripción de la RNA polimerasa II se requieren tanto para un eficiente inicio como para la elongación transcripcional. Entre estos factores, que están muy conservados en distintas especies desde *Saccharomyces cerevisiae* a humanos se encuentran TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. Estos factores han sido aislados originalmente en la purificación de extractos capaces de reconstituir la síntesis de mRNA *in vitro* (Zawel y Reinberg, 1993). Cada uno de ellos consta a su vez de varias subunidades proteicas. El conjunto de factores generales de transcripción se cree que está compuesto por aproximadamente 30 polipéptidos (Orphanides y col., 1996) y se estima que en total, el complejo transcripcional activo está formado por más de 50 polipéptidos (Künzler y col., 1996).

En un principio se asumió un ensamblaje del complejo paso a paso. Primero se uniría el factor TFIID mediante su subunidad TBP (*TATA Binding Protein*) al elemento TATA (Burley y Roeder, 1996) y después se irían incorporando los múltiples factores para formar finalmente un complejo activo de pre-inicio de la transcripción (Buratowski y Sharp, 1992). Sin embargo, hay

evidencias de que se produce un ensamblaje anterior en forma de holoenzima independientemente del promotor (Koleske y Young, 1995; George y col., 1995). El holoenzima es un complejo que contiene la RNA polimerasa II multimérica, los factores generales de transcripción TFIIB, TFIIF y TFIIH encargados de localizar el promotor y el complejo multimérico SRB (*Suppressors of RNA polimerase B proteins*) o complejo proteínico mediador requerido para una regulación de la transcripción temporal en respuesta a los factores de transcripción específicos. Además de la holoenzima, se necesitan los factores TFIID, TFIIA y TFIIE para la formación del complejo de pre-inicio activo (Thompson y Young 1995). En la figura 1 se representa un esquema del ensamblaje del complejo de pre-inicio de la transcripción.

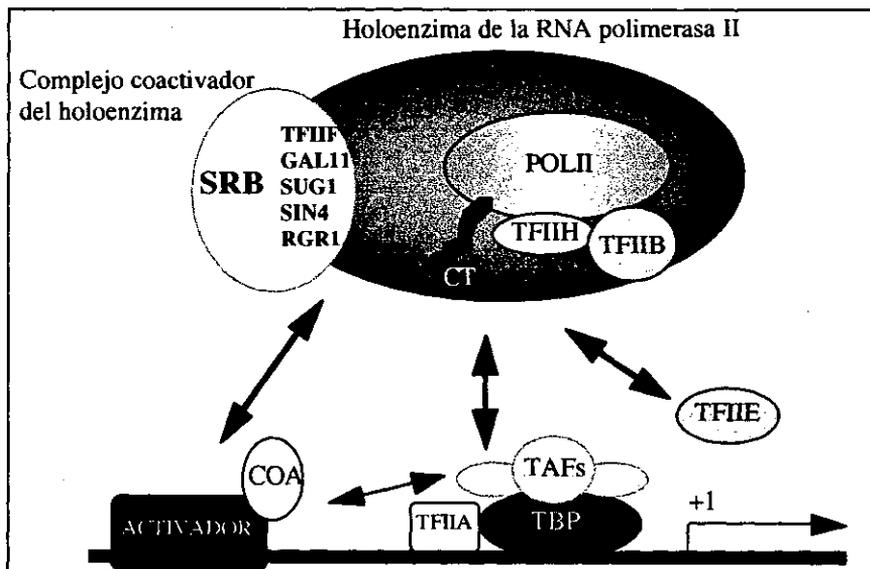


Figura 1. Modelo de ensamblaje de la holoenzima de la RNA polimerasa II en el promotor para formar el complejo de pre-inicio de la transcripción. Se detallan los diferentes factores de transcripción generales (TF), las subunidades TBP (TATA Binding Protein) y TAFs del factor TFIID y los coactivadores (COA).

1.2. Mecanismos de la regulación de la transcripción.

La formación del complejo de inicio de la transcripción de la RNA polimerasa II puede ser modulado por proteínas reguladoras que se unen a elementos UAS o URS. Muchos de ellos han sido clonados y caracterizados y se ha visto que participan en un gran número de interacciones proteína-proteína para ejercer sus efectos a nivel de los distintos pasos del inicio de la transcripción (Verdier, 1990; Svetlov y Cooper, 1995).

1.2.1. Activadores transcripcionales.

Los activadores transcripcionales están compuestos por dominios funcionales distintos, físicamente separados. El dominio de unión al DNA permite reconocer una secuencia específica de DNA mediante una serie de motivos estructurales típicos: homeodominio, dedo de Zinc, cremallera de leucina, hélice-giro-hélice, etc. (Struhl, 1995). Suelen incluir una señal de localización nuclear que permite un posicionamiento de la proteína en el núcleo después de que es traducida en el citoplasma. El dominio de unión al DNA está generalmente asociado con un segundo dominio necesario para la oligomerización de las cadenas polipeptídicas iguales o distintas. Aunque la mayoría de los elementos promotores *upstream* interactúan con un único activador transcripcional, algunos son reconocidos por distintas proteínas, por dímeros o por complejos heteroméricos (Künzler y col., 1996). Muchos factores activadores específicos están presentes a bajas concentraciones intracelulares e interactúan con relativamente pocos promotores. Además hay una clase de activadores multifuncionales (Rap1p, Abf1p y Reb1) que son abundantes, esenciales para el crecimiento y que interactúan en muchos promotores no relacionados entre sí (Struhl, 1995).

Después de la unión a sus sitios de reconocimiento, los factores activadores estimulan la expresión génica a través de un dominio de activación que es funcionalmente distinto, y se encuentra separado físicamente del dominio de

unión al DNA. A menudo los dominios de activación en levaduras son regiones acídicas cortas que siguen siendo funcionales cuando se fusionan a dominios de unión al DNA heterólogos. Aunque la carga negativa es evidentemente importante, el nivel de estimulación transcripcional está también influenciado por residuos hidrofóbicos y otras características que todavía no son bien conocidas (Hahn, 1993). Algunas regiones de activación se vuelven acídicas después de una fosforilación (Sorger y Pelham, 1988; Song y col., 1991), pero no está claro si el incremento de la transcripción se debe a la mayor carga negativa causada por la fosforilación. Los activadores de levaduras no parecen funcionar mediante dominios ricos en glutamina o en prolina como ocurre en activadores de mamíferos, ya que los activadores de este origen no funcionan en células de levaduras (Künzler y col., 1994; Ponticelli y col., 1995). Sin embargo hay otros activadores que no contienen ni regiones acídicas ni regiones susceptibles de ser fosforiladas, por lo que se sugiere que existen otros tipos de dominios de activación (Struhl, 1995).

1.2.2. Coactivadores.

El término de coactivador según propone Guarente (1995) incluye a distintos factores que facilitan la activación transcripcional, si bien no afectan directamente a la transcripción. Serían tanto las proteínas asociadas al holoenzima de la RNA polimerasa (el complejo mediador SRB, Gal11p, Sug1p, Sin4p y Rgr1p) como las proteínas TAFs (*TATA Associated Factors*) integrantes del factor TFIID, así como también el complejo SWI-SNF y las subunidades del complejo adaptador ADA.

Existen variaciones en el concepto de coactivador y en la interpretación de su mecanismo de acción según los distintos autores. Un primer modelo propone que podrían servir como un puente de unión entre los dominios de activación y los componentes de la maquinaria de transcripción básica (Gill y Tjian, 1992). Un segundo modelo propone que pueden no actuar directamente con los activadores, sino que son requeridos para propagar el efecto de una interacción

directa, entre el activador y uno de los factores basales al resto de la maquinaria transcripcional (Choy y Green, 1993). Guarente (1995) describe otros tres modelos diferentes. El modelo de la anti-histona que implicaría una inhibición por parte del activador de la represión ejercida por las histonas unidas al DNA. El modelo hipotético de la localización subnuclear en el que el coactivador traería la unidad transcripcional a una región del núcleo transcripcionalmente activa. Y finalmente, el modelo de la sinapsis entre cromosomas homólogos en un núcleo diploide basado en la observación de que la capacidad de los cromosomas homólogos de aparearse afecta a la expresión génica en los heterocigotos.

1.2.3. Represión transcripcional.

Dada la complejidad que presenta tanto la maquinaria transcripcional básica como el proceso de activación transcripcional, es lógico pensar que la transcripción puede ser reprimida por una gran variedad de mecanismos distintos (Herschbach y Johnson, 1993). Puede producirse una interferencia con la unión del activador al DNA, una interferencia con la maquinaria de la transcripción o bien una interferencia en la actividad del activador unido al DNA.

Hay que diferenciar entre mecanismos de represión generales y específicos. El mecanismo más general de represión que afecta a todos los genes tanto a nivel de la transcripción basal como activada, es el empaquetamiento del DNA en la cromatina (Workman y Buchman, 1993). La forma más simple de mecanismo específico implica la unión de proteínas represoras a las regiones URS.

Los URS pueden estar situados en diferentes posiciones de los promotores, o bien pueden estar solapados con regiones activadoras (UAS) (Struhl, 1995). Los factores represores que se unen a URS probablemente funcionan de manera similar a los activadores mediante una interacción directa o indirecta con la maquinaria de la transcripción. Los dominios de represión activos parecen ser

ricos en los aminoácidos alanina, glutamina o prolina (Cowell, 1994). En levaduras el complejo SSN6/TUP1 media el tipo de represión directa: permite la represión de distintos grupos de genes que están regulados por glucosa, por oxígeno, por el ciclo celular y por lesiones al DNA. Una diana para la represión parece ser la holoenzima de la RNA polimerasa, en particular los componentes del par ciclina-quinasa SRB10 y SRB11 del complejo mediador SRB que son necesarios para que se produzca el máximo nivel de represión (Kuchin y col., 1995).

Hay otros represores que afectan a la maquinaria transcripcional de manera general. MOT1 es un represor general de la transcripción que actúa sobre TBP compitiendo con TFIIA por el sitio de unión a TBP (Auble y col., 1994). El complejo NOT (*Negative On TATA*) define un nuevo mecanismo de represión transcripcional que afecta a la utilización del elemento TATA y que se ha sugerido que es debido a la interacción con algún componente de la maquinaria transcripcional básica (Collart y Struhl, 1994).

Algunos represores pueden actuar sin afectar al aparato transcripcional, mediante interacciones proteína-proteína que bloquean la función de los activadores, bien mediante impedimento estérico o enmascarando sus dominios de activación o de unión al DNA (Ma y Ptashne, 1987).

1.3. Transducción de señales reguladoras de la transcripción en levaduras.

Las proteínas reguladoras *trans* se unen a los elementos *cis* de diversos promotores en respuesta a estímulos externos e internos que afectan al crecimiento y al metabolismo de las células, como por ejemplo el nivel de oxígeno, el tipo de fuente de carbono o nitrógeno, los niveles de fosfatos y la respuesta a feromonas, entre los más estudiados. En muchos casos la unión de una proteína al promotor de un gen supone uno de los últimos pasos en la ruta de transducción de la señal (de Winde y Grivell, 1993). Uno de los mecanismos más estudiados de transducción de señales lo constituye la respuesta a las

feromonas del tipo sexual (*mating*). Una primera respuesta se dispararía a través de la interacción de estas feromonas con receptores en la membrana plasmática, iniciando una cascada de efectos secundarios positivos y negativos que implican la acción de quinasas y fosfatasas e interacciones proteína-proteína (Sprague y Thorner, 1992).

Recientemente se ha caracterizado una proteína, Grr1p, a la que se le ha atribuido un papel central en la transducción de la señal desencadenada por la presencia de glucosa (figura 2). Las mutaciones en el gen *GRR1* (*Glucose Repression Release*) evitan la represión de muchos genes reprimidos por glucosa (Baily y Woodward, 1984) y la inducción de genes *HTX* (*Hexose Transporter Genes*) que codifican para transportadores de glucosa (Özcan y Johnston, 1995). Se ha descubierto que Grr1p está conectada a través de la proteína Skp1p a la maquinaria de proteólisis mediada por la ubiquitina de Rtg1p, un represor de los genes *HTX*. La interacción Grr1p-Skp1p se incrementa con altos niveles de glucosa (Ning y Johnston, 1997). Skp1p ha sido implicada en el complejo de enzimas conjugadas con la ubiquitina que es responsable de la degradación de numerosos factores, entre ellos los reguladores del ciclo celular, las ciclinas Cln1 y Cln2 y el inhibidor de la kinasa dependiente de ciclinas Sic1p (Bai y col. 1996). Este mecanismo proporcionaría a *S. cerevisiae* una vía para acoplar la disponibilidad de nutrientes a la expresión génica y a la regulación del ciclo celular (Ning y Johnston, 1997). Sin embargo queda por resolver si existe alguna conexión de este mecanismo con los factores *trans* que se han identificado como elementos que intervienen en la represión por glucosa y que serán descritos posteriormente.

Podemos afirmar de modo general que el mecanismo de transmisión de la señal desde los efectores hasta los factores específicos de la transcripción es uno de los menos conocidos.

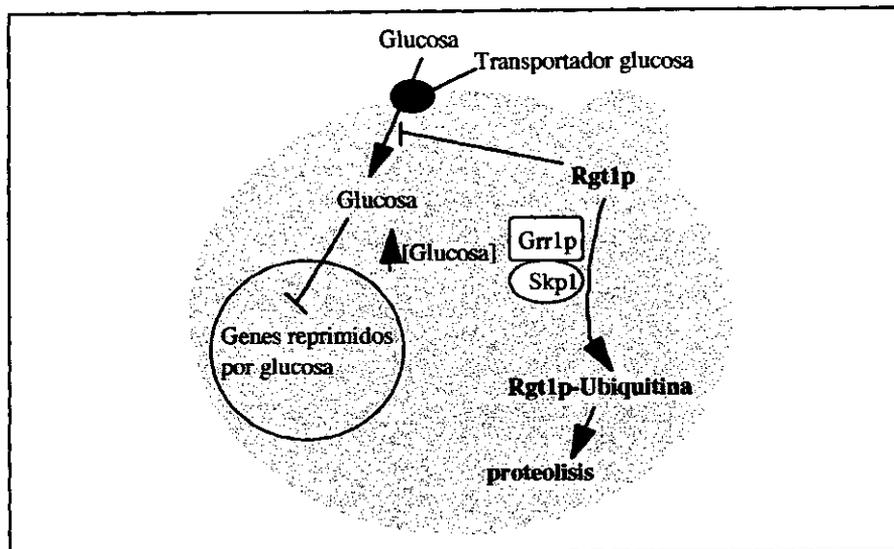


Figura 2. Modelo de transmisión de la señal desencadenada por la glucosa mediado por el complejo Grr1p/Skp1.

1.4. Regulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas mitocondriales.

1.4.1. Regulación transcripcional por oxígeno.

1.4.1.1. Hemo, una señal intracelular.

Hemo sirve como grupo prostético de los citocromos y de otras proteínas que unen oxígeno como por ejemplo las catalasas. Su biosíntesis requiere obligatoriamente la presencia de oxígeno y el estado redox de la célula es proporcional al estado redox de la molécula de hemo.

Dado que la biogénesis de las mitocondrias con capacidad respiratoria funcional depende de la presencia de oxígeno molecular como aceptor final de la cadena de transporte electrónico, la mayoría de los genes nucleares que codifican para los distintos componentes de la cadena de transporte electrónico se encuentran regulados a nivel transcripcional por oxígeno (Zitomer y Lowry,

1992). Hay varios hechos en la ruta de su biosíntesis que hacen a hemo un efector ideal para la señalización del oxígeno intracelular. Uno es el requerimiento de oxígeno como aceptor de electrones en dos pasos, el paso catalizado por el enzima coproporfirinógeno III oxidasa, codificado por el gen *HEM13*, para la formación de protoporfirinógeno IX; otro es el catalizado por el enzima protoporfirinógeno IX oxidasa en la formación de la protoporfirina (Labbe-Bois y Labbe, 1990). La respuesta a la señal puede ser rápida ya que los enzimas de la ruta están presentes incluso durante el crecimiento anaeróbico de las células, de forma que la inducción de su síntesis sólo necesita la presencia de oxígeno. El paso limitante de la ruta lo constituye la reacción catalizada por la coproporfirinógeno III oxidasa e incluso éste está fuertemente inducido por bajas concentraciones de oxígeno (Zitomer y Lowry, 1992).

1.4.1.2. Genes regulados por hemo.

La mayoría de los genes activados por hemo en *Saccharomyces cerevisiae* codifican para componentes de la cadena de transporte mitocondrial o para enzimas del ciclo de Krebs (Zitomer y Lowry, 1992).

S. cerevisiae es un organismo anaerobio facultativo que prefiere fermentar en condiciones de adecuada aireación y puede crecer vigorosamente en anaerobiosis si se le suministran algunos metabolitos que sólo se sintetizan en aerobiosis (ácidos grasos insaturados, esteroides y metionina). Durante la adaptación al crecimiento anaerobio, *S. cerevisiae* expresa genes que son de baja expresión en aerobiosis, denominados genes hipóxicos (Zitomer y col., 1997).

Algunos genes que se transcriben preferentemente en condiciones aerobias tienen formas homólogas que se regulan de manera opuesta y por tanto, aumentan su expresión en condiciones de hipoxia. La aparición de parejas de genes que codifican para una misma proteína en dos condiciones distintas es un fenómeno que aparece en *S. cerevisiae* relacionado con la regulación de la expresión génica hemo-dependiente. Ejemplos de estos genes duplicados son los

genes *COX5A* y *COX5B* que codifican para la subunidad V de la citocromo c oxidasa (Cumsky y col. 1987) y los genes *CYCI* y *CYC7* que codifican para el citocromo c, de cuya regulación se hablará en un apartado posterior. También hay dos genes para la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa, *HMG1* y *HMG2* (Thorness y col. 1989), y para el factor de inicio de la traducción TIF51 (*TIF51A* y *TIF51B/ANBI*)(Mehta y col. 1990). La expresión aerobia de los genes hipóxicos está reprimida generalmente por el factor Rox1p (Zitomer y Lowry, 1992). Sin embargo, parece que existen otros mecanismos ya que el gen *DANI* recientemente clonado, cuya función es desconocida, sólo se expresa en condiciones anaerobias y hemo participa en su represión mediante un mecanismo independiente de la proteína represora Rox1p (Sertil y col., 1997).

En pocos casos la regulación por oxígeno no está controlada por hemo. Un ejemplo es el del gen *PET494* que codifica para un factor de traducción que actúa sobre el mRNA del gen mitocondrial *coxIII* cuya expresión es inducida a nivel transcripcional por oxígeno de una manera independiente de hemo (Maryakwas y Fos, 1989). La base molecular de este tipo de regulación por oxígeno todavía es desconocida.

Los mecanismos por los cuales se produce la activación mediada por hemo implican la intervención de factores proteínicos reguladores específicos (HAP: *Heme Activator Protein*) entre los que se encuentran Hap1p y el complejo heteromérico Hap2/3/4/5p.

1.4.1.3. Hap1p.

Arcangioli y Lescure (1985) identificaron a Hap1p como una proteína implicada en la regulación por oxígeno de la expresión del gen *CYCI*. Mediante ensayos de unión DNA-proteína en distintos medios, relacionaron la unión DNA-proteína con la regulación por oxígeno y por hemo. Sousa y Arcangioli (1989) descubrieron que hay dos regiones activadoras UAS1A y UAS1B, en el promotor de *CYCI* que responden individualmente a Hap1p.

Se han identificado secuencias de unión de Hap1p en promotores de distintos genes de *S. cerevisiae*. Aparecen en los genes *CYC1* y *CYC7* que codifican para las dos isoformas de citocromo *c* (Pfeifer y col. 1987, Zitomer y col. 1987), en el gen *HEM13* de la coproporfirógeno oxidasa (Keng, 1992), el gen *CYT1* del citocromo *c1* (Oechsner y col., 1992), el gen *CTT1* de la catalasa T (Winkler y col., 1988) y el gen *CYB2* del citocromo *b2* (Lodi y Guiard, 1991). Estos sitios comparten poca homología entre sí, pero se han obtenido secuencias consenso considerando los nucleótidos más importantes para que se produzca la unión (figura 3). Ha y col. (1996) han propuesto que el consenso de unión de Hap1p es una forma degenerada de la repetición directa de nucleótidos CGGN₃TANCGGN₃TA. La variación existente respecto al consenso en cada promotor regulado por Hap1p influye en la conformación del DNA, y en la capacidad activadora de la proteína Hap1p unida al DNA.

| | |
|------------------------|---|
| <i>CYC1</i> (UAS1A) | AGAC <u>CGG</u> AAAGAT <u>CGG</u> TGAAAAC |
| <i>CYC1</i> (UAS1B) | TGGC <u>CGG</u> GGT <u>TTA</u> <u>CGG</u> ACGATGA |
| <i>CYC7</i> | CCCT <u>CGC</u> TATTAT <u>CGC</u> TATTAGC |
| <i>CTT1</i> | GGAA <u>TGG</u> AGATAA <u>CGG</u> AGGTTCT |
| <i>CYB2</i> | GGCA <u>AGG</u> AGATAT <u>CGG</u> CAGGCTT |
| <i>CYT1</i> | CCGC <u>CGG</u> AAATAC <u>CGG</u> CCGCCCA |
| <i>CYT1</i> (reverse) | CGGC <u>CGG</u> TATTTC <u>CGG</u> CCGCCAA |
| Consenso | <u>CGG</u> NNN <u>TAN</u> <u>CGG</u> NNNTA |

Figura 3. Alineamiento de regiones UAS de Hap1p de distintos genes y secuencia consenso, modificado de Ha y col. (1996).

Hap1p es una proteína de 1483 aminoácidos que presenta un dedo de Zinc, de unión a DNA y de dimerización amino-terminal (entre los residuos 1-148) y un dominio que media la regulación por hemo entre los residuos 244 y 444 (Pfeiffer y col., 1987a y 1989). La unión a hemo depende de la región consenso KCPVDH repetida 7 veces. Su delección produce hemo-independencia y actividad constitutiva de los genes *CYB2*, *CYC1*, *CYC7* y *ERG11* (Fytlovich y col., 1993). En el extremo carboxi-terminal (entre 1309-1483) hay un dominio

de activación altamente ácido. Ushinsky y Keng (1994) describieron una mutación que cambiaba el aminoácido glicina de la posición 235 por aspartato y producía una regulación hemo independiente y Haldi y Guarente (1995) definieron una segunda región hacia el extremo carboxi-terminal, entre las posiciones 1048 y 1052, que controla la respuesta a hemo. El significado de la existencia de múltiples sitios de respuesta a hemo sería el permitir una adaptación fina en función de las variaciones de los niveles de hemo. Una representación esquemática de los dominios de Hap1p puede verse en la figura 4.

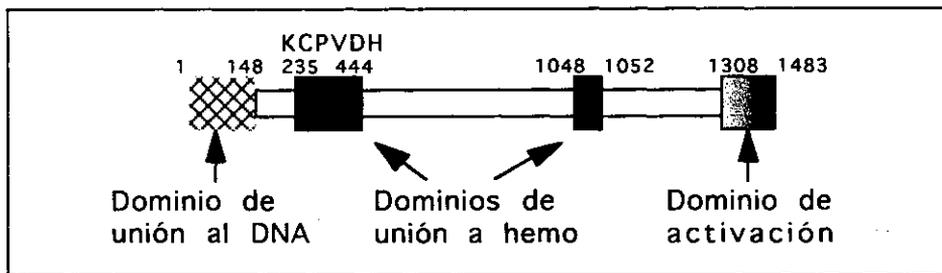


Figura 4. Dominios funcionales de Hap1p.

Según los resultados de Fytlovich y col. (1993) y de Zhang y Guarente (1994), la actividad de Hap1p es función de los niveles de hemo. Se ha propuesto que el dominio de unión a hemo interaccione con un represor celular en ausencia de hemo, reprimiendo la activación de la transcripción. Sin embargo, todavía no ha sido caracterizada ninguna proteína con esta función.

Hap1p pertenece al tipo de proteínas que presentan un dedo de zinc de tipo C6 en el que dos iones de zinc están coordinados con seis cisteínas. Esta estructura se ha relacionado con la formación de complejos con el DNA (Timmerman y col. 1996). Las proteínas de este grupo se unen al DNA en forma de dímero. A diferencia de lo que ocurre con Gal4p y Ppr1, otras dos proteínas de este grupo, Hap1p se une selectivamente a sitios asimétricos de DNA conteniendo dos repeticiones directas de los tripletes CGG. Esta unión asimétrica se atribuyó en un principio al dedo de zinc, de manera que se produciría una interacción asimétrica en los dominios de dimerización que

orientaría a los dedos de zinc para reconocer los tripletes CGG (Zhang y Guarente, 1996). Timmerman y col. (1996) proponen, a partir de resultados de espectroscopía NMR, que la especificidad de las interacciones entre el dedo de zinc y las regiones de unión del DNA se debe a la estructura del péptido de unión y de la hélice de dimerización (figura 5).

Naït-Kaoudjt y col. (1997) proponen un modelo en el que Hap1p se une de diferente manera en función de las características de las secuencias de unión del promotor (figura 5). En la unión del péptido de Hap1p al UAS1A de *CYC1*, se han visto que los dos tripletes son esenciales (figura 5a). En la unión al UAS1-A de *CYB2* sólo está presente un triplete CGG por lo cual se produce la unión a medio sitio que es esencial; el otro medio sitio estabiliza la unión. Una T intermedia que interacciona con uno o dos de los dominios de unión también está implicada en la estabilización (figura 5b). En la unión al UAS de *CYC7*, están presentes dos tripletes CGC que no son equivalentes entre sí sino que de nuevo aparecen dos medios sitios con diferentes afinidades y la T aparece de nuevo implicada en la interacción (figura 5c). La importancia de esta T ya había sido mencionada por Ha y col. (1996).

Recientemente se estudió mediante NMR la interacción del péptido 55-126 de Hap1p con dos fragmentos de DNA de la región del UAS1B de *CYC1* y se llegó a la conclusión de que los tripletes CGG son reconocidos por el dominio del dedo de zinc de la proteína, y que la secuencia intermedia es reconocida por la región N-terminal del péptido de unión que posee un tramo de residuos básicos de arginina y lisina. Este resultado indicaría que la región, localizada a continuación de la región del dedo de zinc, constituida por un pequeño péptido adaptador y un elemento de dimerización, juega un papel en la interacción específica con el DNA a diferencia de lo que ocurre con las proteínas Gal4p y Prr1p (Vuidepot y col., 1997).

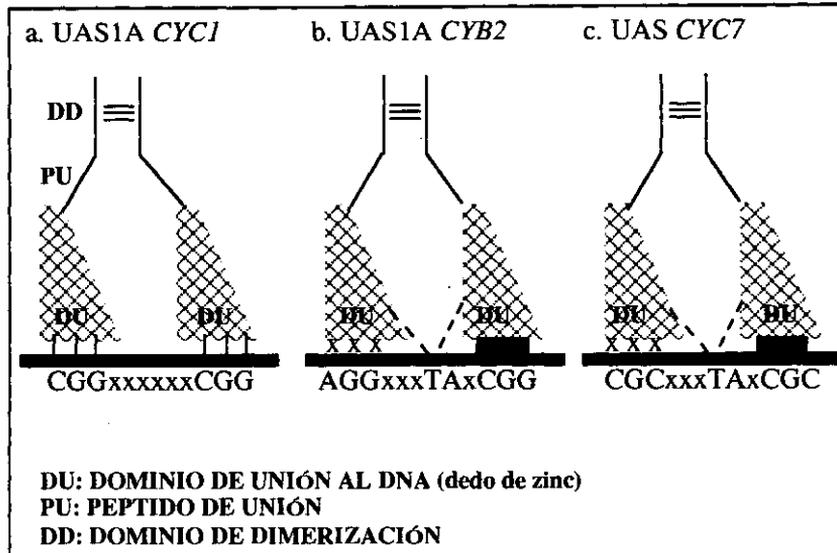


Figura 5. Modelo de unión de Hap1p a distintas secuencias diana según Näit-Kaoudjt y col. (1997). Con tres líneas verticales se indican las dos uniones equivalentes y esenciales. Con una barra en negrita se indica las uniones a "medios sitios" esenciales. Con líneas punteadas y cruces se indican las interacciones que estabilizan la unión.

1.4.1.4. El complejo heteromérico Hap2/3/4/5p.

Está implicado en la regulación dependiente de hemo y de fuente de carbono de un gran número de genes que codifican para proteínas mitocondriales. Sin embargo, ninguna de las proteínas que constituye el complejo es capaz de unir hemo directamente.

En un principio se caracterizó este complejo, también llamado factor de unión a CCAAT, como un complejo heteromérico formado por las proteínas Hap2p, Hap3p y Hap4p. Los genes que codifican para estas proteínas se identificaron porque cuando se mutaban se eliminaba la expresión de los genes de proteínas mitocondriales y las levaduras no crecían en medio con lactato (Pinkham y Guarente, 1985; Pinkham y col., 1987; Hahn y col., 1988 y Forsburg y Guarente, 1989).

Hap2p y Hap3p se unen de manera interdependiente al DNA (Hahn y Guarente, 1988), mientras que Hap4p no se une de manera directa al DNA pero aumenta la capacidad de unión de Hap2p y Hap3p, y se asoció su dominio de activación ácido con la actividad del complejo (Forsburg y Guarente, 1989). Los factores Hap2p y Hap3p presentan homología funcional con los factores CP1B y CP1A de mamíferos que se unen a la caja CCAAT e incluso pueden intercambiarse respectivamente para producir la interacción DNA-proteína *in vitro* (Codosh y col., 1988).

La proteína Hap2p está constituida por una proteína de 265 aminoácidos y la región comprendida entre las posiciones 154-197 parece imprescindible para la unión a Hap3p, además existe un tramo poliglutamina entre las posiciones 120 y 133 y la región carboxi-terminal es altamente básica (Pinkham y col., 1987). Hap3p es una proteína de 144 residuos y, como Hap2p, presenta un dominio de interacción con el DNA (Olesen y col., 1987). La proteína Hap4p, que codifica para una proteína de 553 aminoácidos contiene una corta región básica entre los residuos 54 y 80 y una región altamente ácida en su extremo carboxi-terminal cuya eliminación inactiva la función de la proteína *in vivo*. A éste último dominio se le atribuyó la capacidad de activación del complejo (Forsburg y Guarente, 1989).

El dominio de unión a DNA de Hap2p, juntamente con el dominio de unión al DNA de Hap3p, es capaz de reconocer la caja CCAAT (Xing y col. 1993). La asociación de estas subunidades se lleva a cabo por un dominio denominado SAD (*Subunit Association Domain*) presente en Hap2p y que posee una estructura de hélice α . Al examinar las interacciones entre estos dos factores se encontró que los extractos purificados de Hap2p y Hap3p no podían reconstituir la unión al DNA *in vitro*, por lo cual se pensó en la existencia de un cuarto componente del complejo que se aisló mediante el sistema del doble híbrido (McNabb y col., 1995). Los extractos purificados de Hap2p, Hap3p y Hap5p sí reconstituían la unión a la caja CCAAT *in vitro*, lo que identificaba por primera vez un factor regulador heterotrimérico de unión al DNA.

El complejo Hap2/3/4/5p se ha relacionado con un papel general en la regulación del metabolismo energético, puesto que interviene en la regulación de genes mitocondriales, genes del metabolismo del carbono y genes del metabolismo del nitrógeno (Dang y col. 1996).

1.4.1.5. Factores ROX.

Los mutantes *rox* (*repressor dependent on oxygen*) sobreexpresan el gen hipóxico *CYC7* en condiciones aerobias (Rosenblum-Vos y col., 1991) y se clonaron los genes por complementación de este fenotipo. Los factores Rox1p, Rox3p, Rox4p, Rox5p y Rox6p son proteínas reguladoras y algunas de ellas se han identificado como proteínas que habían sido previamente caracterizadas. Así el gen *ROX4* resultó coincidente con el gen *TUPI* (Zhang y col., 1991), el gen *ROX5* coincidió con el gen *SSN6* y el gen *ROX6* coincidió con el gen *SRB10* (Cadaña, 1996) que codifica para un componente no esencial del complejo mediador de la RNA polimerasa II. De todos los factores ROX caracterizados, Rox1p ha sido el factor que presentó una función más específica en cuanto a la regulación directa del gen *CYC7*.

Rox1p es una proteína represora de genes hipóxicos y de genes anaeróbicos en condiciones aerobias (Lowry y Zitomer, 1984). El gen *ROX1* se encuentra regulado a su vez por Hap1p (Keng, T., 1992) La represión de la transcripción de los genes hipóxicos por el factor Rox1p requiere del complejo correpresor Tup1p/Ssn6 (Tzamarias y Struhl, 1995). Rox1p se une al DNA por una región situada en los primeros 100 aminoácidos que presenta una estructura típica de las proteínas HMG (*High Mobility Group*) que se unen al DNA modificando su estructura (Balasubramanian y col., 1993). Se ha demostrado que los primeros 100 aminoácidos que componen el dominio HMG son los responsables de la unión al DNA y que cuando Rox1p se une al DNA produce una curvatura en el DNA de 90° (Deckert y col., 1995). Recientemente se ha visto que el dominio HMG también es responsable de la oligomerización de Rox1p (Di Flumeri y col., 1996).

ROX3 codifica para una proteína de localización nuclear que es esencial. La delección de su secuencia codificadora es letal y se ha localizado su dominio funcional en la región amino-terminal (Rosenblum-Vos y col., 1991). Recientemente se ha sugerido que esta proteína está implicada en la represión transcripcional mediada por la RNA polimerasa II (Björklund y Kim, 1996) y se ha relacionado con la ruta de respuesta al estrés (Evangelista y col., 1996).

1.4.2. Regulación por fuente de Carbono.

Al igual que otros microorganismos, *Saccharomyces cerevisiae* muestra preferencias por determinadas fuentes de carbono. La glucosa es la fuente de carbono preferida por *S. cerevisiae* y su presencia induce la transcripción de varios genes relacionados con la fermentación y reprime la transcripción de los genes necesarios para la respiración y la utilización de otras fuentes de carbono (Johnston y Carlson, 1992). Un grupo de estos genes, reprimidos por glucosa, lo constituyen los genes que codifican para los enzimas mitocondriales implicados en el ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria. En ausencia de los enzimas requeridos para la respiración, el piruvato resultante de la glucólisis se descarboxila y se reduce a etanol para regenerar el NAD⁺ que se consume en la glucólisis. Como consecuencia, se produce mucho menos ATP que durante la fosforilación oxidativa. Tan pronto como se agota la glucosa, la producción de enzimas mitocondriales se desreprime y el etanol formado comienza a ser metabolizado.

La represión por glucosa de las funciones mitocondriales supone una especialización que refleja el metabolismo fundamentalmente fermentativo que presenta *S. cerevisiae* (Ronne, 1995). La desrepresión que se produce en ausencia de glucosa está mediada por el complejo Hap2/3/4/5p que se describió anteriormente.

1.4.2.1. Factores *trans* implicados en la represión por glucosa.

Ssnf1p.

La serin/treonin-quinasa Snf1p (Cat1p o Ccr1p) juega un papel clave en la desrepresión de todos los genes reprimidos por glucosa. Los mutantes *snf* (*sucrose non fermenting*) son incapaces de usar otra fuente de carbono diferente de la glucosa como por ejemplo sacarosa, galactosa y maltosa porque los genes necesarios se encuentran reprimidos por glucosa (Ronne, 1995). Esta proteína parece tener un papel central como componente de la transducción de la señal mediante interacción con otras proteínas como Snf4p (Cat3p) (Celenza y col., 1989), Sip1p (Yang y col., 1992), Sip2p y Gal83p (Yang y col., 1994).

Recientemente se ha visto que la interacción entre Snf1p y Snf4p está fuertemente regulada por la concentración de glucosa. Jiang y Carlson (1996) han propuesto un modelo para explicar dicha interacción que se representa en la figura 6. Así, a niveles bajos de glucosa Snf4p se une al dominio regulador de Snf1p impidiendo la autoinhibición por ocultamiento del dominio quinasa y favoreciendo su actividad como proteína desrepresora. Cuando los niveles de glucosa son elevados el dominio regulador de Snf1p se une al dominio con actividad quinasa causando su autoinhibición.

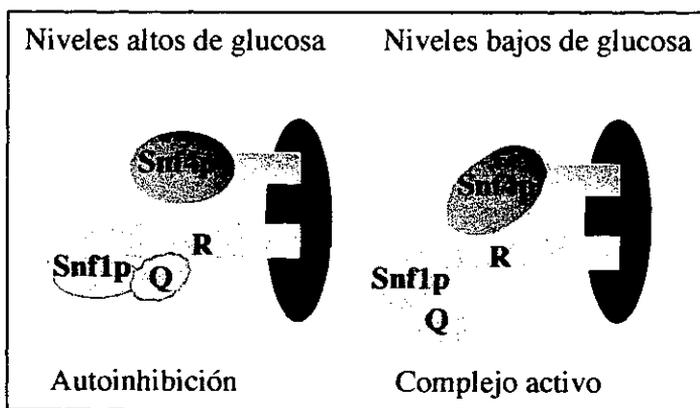


Figura 6. Modelo de la regulación por glucosa de las interacciones entre proteínas en el complejo de la quinasa Snf1p. R: dominio regulador. Q: dominio quinasa.

Mig1p.

Mig1p es una proteína con un dominio de dedo de zinc de tipo C_2H_2 de unión al DNA que funciona como represor transcripcional de los genes reprimidos por glucosa. Pertenece al tipo de proteínas relacionadas evolutivamente que se unen a cajas GC (Lundin y col., 1994), secuencias que se han visto en los promotores de muchos genes regulados por glucosa (Nehlin y col., 1991). Una función de la quinasa Ssn1p sería evitar que Mig1p reprima a sus genes diana en ausencia de glucosa. El mecanismo por el cual Mig1p reprime la transcripción no está claro pero se cree que están implicadas varias proteínas represoras formando un complejo. Mig1p reclutaría al complejo correpresor general que contiene las proteínas Ssn6p y Tup1p (Treitel y Carlson, 1995). Recientemente se ha descrito que un pequeño dominio C-terminal de Mig1p que comprende los últimos 24 aminoácidos media la represión por glucosa dependiente de Mig1p y que dos elementos internos median la inhibición de su actividad en ausencia de glucosa (Östling y col., 1996).

Ssn6p/Tup1p.

Las proteínas Ssn6p y Tup1p se necesitan para la represión de la transcripción de varias rutas reguladoras en las células de levaduras, incluyendo la represión por glucosa y el tipo de *mating* (Keleher y col., 1992). Constituyen un complejo correpresor que media la represión mediante la interacción con proteínas represoras específicas de unión al DNA (Williams y col., 1991).

Las mutaciones *ssn6* y *tup1* tienen múltiples fenotipos entre los que se encuentran: expresión constitutiva de los genes reprimidos por glucosa, floculación dependiente de calcio, defectos en el *mating* de las células de tipo *MAT α* , incapacidad de los diploides homocigóticos para esporular, crecimiento pobre en fuentes de carbono no fermentables como el glicerol y sensibilidad a la temperatura (Rothstein y Sherman, 1980, Trumbly, 1986). Estos fenotipos se cree que son debidos a la imposibilidad de que se produzca represión de diferentes clases de genes.

Ssn6p/Tup1p interacciona con distintos tipos de proteínas represoras de diferentes familias de genes, con la proteína Mig1p (Treitel y Carlson, 1995), con la proteína Rox1p (Zhang y col., 1991), con el represor Mat α 2 (Keleher y col., 1992), con un represor desconocido de los genes inducidos mediante lesiones en el DNA (Zhou y Elledge, 1992) y con el represor Rtg1p de los genes *HXT* que codifican para proteínas transportadoras de glucosa (Özcan y Johnston, 1995).

Ssn6p y Tup1p sólo tienen en común largos tramos de poliglutamina usuales en proteínas reguladoras de proteínas. Ssn6p contiene 10 copias de la repetición de 34 aminoácidos, las repeticiones TPR (*Tetratricopeptide Repeat*) cerca del extremo N terminal que se requieren para su función (Schultz y col., 1990). La proteína Tup1p contiene seis o siete repeticiones, de unos 40 aminoácidos cada una, denominadas WD-40 que se encontraron por primera vez en la subunidad β de las proteínas G (Williams y Trumbly, 1990). Este tipo de estructuras podrían ser responsables de las interacciones proteína-proteína que darán lugar al efecto represor que ejerce el complejo sobre los distintos genes anteriormente mencionados.

El complejo Ssn6p/Tup1p se cree que está formado por cuatro (Varanasi y col., 1996) o tres subunidades de Tup1p (Redd y col., 1997) y una subunidad de Ssn6p y además por otras proteínas adicionales implicadas que incluyen Rox3p, Sin4p, Srb8p, Srb9p, Srb10p y Srb11p y que también han sido identificadas como integrantes del componente mediador de la RNA polimerasa (Björklund y Kim, 1996).

Se han descrito dos mecanismos generales para explicar la represión por Ssn6p/Tup1p: uno sería el control de la posición de los nucleosomas para enmascarar las dianas de los activadores o factores de transcripción (Edmondson y col., 1996) y otro sería la inhibición directa de la maquinaria transcripcional (Balciunas y Ronne, 1995).

Tup1p/Ssn6p reprime la transcripción de muchos promotores (Williams y col., 1991; Keleher y col., 1992) y los factores represores α 2 y Mig1p requieren

la presencia de Tup1p/Ssn6p (Trumbly, 1992). Además el complejo puede tener un efecto activador. Zhang y Guarente (1994) observaron que la proteína Hap1p estaba regulada positivamente por Tup1p/Ssn6p. Cuando se deletaban los genes *TUP1* y *SSN6*, la actividad de Hap1p disminuía. Puesto que *TUP1(ROX4)* y *SSN6(ROX5)* están implicados en la represión de los genes hipóxicos *CYC7* y *ANB1* (Zhang y col. 1991) y los mutantes *hap1* no pueden crecer en fuente de carbono no fermentable, también se atribuye al complejo Tup1p/Ssn6p un papel global en la regulación de genes que están bajo el control del oxígeno (Zhang y Guarente, 1994).

1.5. Factores reguladores multifuncionales de levaduras.

1.5.1. Abf1p.

En *S. cerevisiae* Abf1p (ARS Binding Factor 1) es una proteína multifuncional implicada en la activación y la represión de la transcripción, así como en la replicación del DNA. Presenta un motivo dedo de zinc atípico así como extensiones de poli-asparagina (Verdier, 1990). Entre los múltiples efectos que ejerce sobre la transcripción en levaduras se encuentran: el de represor en los loci silentes del tipo de *mating HMR* y *HML*, activador en la replicación del DNA, activador de varios genes como *YPT1* y *TUB2*, activador en el promotor de *CYC1* (Dorsman y col., 1988) y activador del gen esencial *DED1* en sinergia con elementos ricos en T (Buchman y Kornberg, 1990).

Su secuencia de reconocimiento aparece en la región promotora de más de 80 genes diferentes incluyendo algunos genes de proteínas ribosomales, genes que codifican subunidades de la RNA-polimerasa I y III y algunos genes glicolíticos. En otros genes como *CAR1*, *TRP3*, *COX6* y *QCR8*, Abf1p promueve la activación de la transcripción causada por otros factores específicos como el complejo Hap2/3/4/5p.

Mediante experimentos de posicionamiento de nucleosomas se vió que Abf1p contribuye a la expresión de *QCR8* creando una estructura de cromatina

favorable. La unión de Abf1p genera una ventana libre de nucleosomas de 60-70pb a lo largo de la región promotora flanqueada por una fila de nucleosomas (De Winde y col., 1993). Cuando se aislan del contexto normal del promotor, los sitios de unión de Abf1p sólo pueden activar la transcripción de un gen *reporter* en niveles modestos (Buchman and Kornberg 1990). Tomando estos datos en su conjunto, parece que la unión de Abf1p a un promotor se necesita primariamente para facilitar la unión DNA-proteína de factores activadores a elementos adyacentes de DNA, probablemente creando una región libre de nucleosomas (Planta y col., 1995).

El gen *ABFI* codifica para una proteína de un peso molecular de 82.000Da en la cual los 202 aminoácidos C-terminales constituyen un dominio ácido que es la región supuestamente implicada en la activación de la transcripción. Es interesante que la región 5' del gen *ABFI* contiene cinco sitios potenciales de unión de Abf1p, lo que sugirió que pueda estar auto-regulado transcripcionalmente por su mismo producto (Halfter y col., 1989).

1.5.2. Cpf1p.

El factor Cpf1p (*Centromere and Promoter Factor 1*) también conocido como Cpl y Cbf1, es una proteína de *S. cerevisiae* originalmente identificada como el factor que se une al motivo de DNA centromérico llamado CDEI (*Centromere determining element I*) que está formado por la secuencia consenso RTCACRTG (Mellor y col., 1990). Pertenece a la clase de proteínas que contiene un motivo básico hélice-giro-hélice (HLH: *helix-loop-helix*) y una repetición de 7 leucinas similar a una cremallera de leucinas (ZIP: *leucine zipper*) en la región carboxi-terminal, responsables de la unión al DNA y la dimerización. Los miembros de esta clase de proteínas b/HLH/Z están implicados en la regulación transcripcional y se incluyen en la familia de las proteínas relacionadas con *Myc* (Blackwood y Eisenman, 1991).

La interrupción del gen *CPF1* y la mutación el motivo CPF1 (RTCACRTG) en los centrómeros muestran que Cpf1p se requiere para una función óptima del

centrómero durante la mitosis y la meiosis. La disrupción del gen *CPF1* origina mutantes auxotróficos para la metionina. El motivo CDEI se encuentra en muchos otros sitios del genoma incluyendo secuencias reguladoras. Está en diversos promotores como los de los genes *TRP1*, *GAL2* y los promotores de varios genes de la ruta de la biosíntesis de metionina (*MET25*, *MET16*, *MET2*, *MET14*, *MET8*, *MET3* y *SAM2*). Se ha sugerido que Cpf1p asociado a estos sitios juega un papel en la activación de la transcripción (Mellor y col., 1990). Otra función que también se le atribuye a Cpf1p es la de modulador de la estructura de la proteína (Kent y col., 1994).

1.5.3. Rap1p.

La proteína represora Rap1 es un factor esencial muy abundante y está implicado en diversas funciones en la levadura *S. cerevisiae*. Se une a regiones promotoras de genes ribosómicos y genes que codifican para proteínas de los mecanismos de traducción, a elementos silenciadores del tipo de *matig*, función que comparte con Abf1p (Diffley y col., 1989) y a regiones con la secuencia [(C)₁₋₃A]_n teloméricas. Se le atribuye una función general en la organización de la cromatina (Shore, 1994).

1.6. Regulación de genes que codifican para citocromo *c* de levaduras.

1.6.1. Los genes citocromo *c* en levaduras.

En *S. cerevisiae* se han caracterizado dos genes que codifican para dos isoformas de la proteína citocromo *c*. El gen *CYC1* codifica para el iso-1-citocromo *c* (Smith y col., 1979) y el gen *CYC7* para la iso-2-citocromo *c* (Montgomery y col., 1980). En función de la regulación por hemo que presentan, *CYC1* pertenece al grupo de los genes activados por hemo y *CYC7* al grupo de los genes hipóxicos que se reprimen en presencia de hemo (Zitomer y Lowry, 1992).

La regulación transcripcional de estos genes ha sido ampliamente estudiada, y se ha visto que están regulados por los niveles de oxígeno y por la presencia de fuentes de carbono no fermentables, mediante un mecanismo que se puede considerar general de los genes que codifican para proteínas mitocondriales y que se representa en la figura 7.

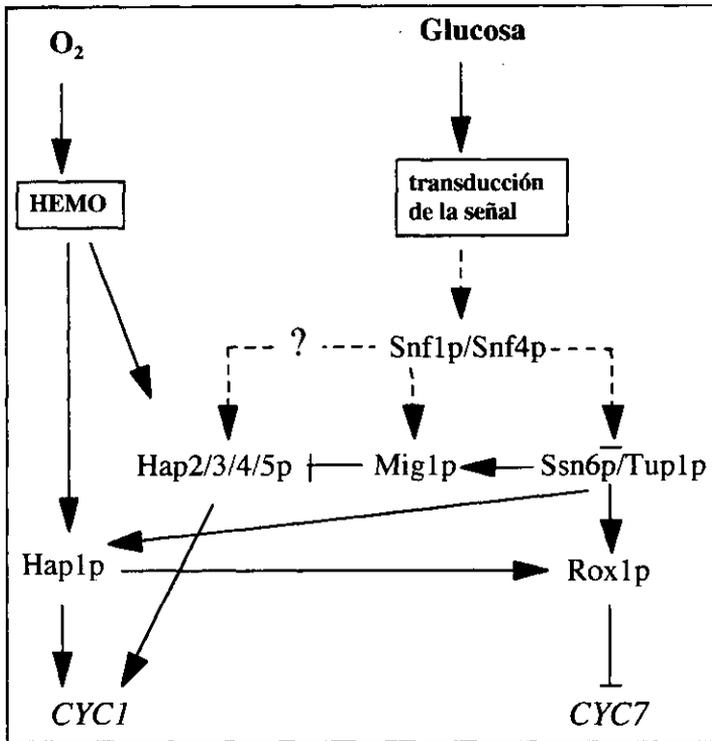


Figura 7. Regulación de los genes citocromo *c* de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.6.2. Regulación del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*.

En el gen *CYC1* codifica para la proteína iso-1-citocromo *c* que es la forma mayoritaria de citocromo *c* en *S. cerevisiae* y su transcripción está inducida por hemo *in vivo* (Guarente y Mason, 1983). En su promotor existen dos regiones UAS fundamentales para su regulación. El UAS1 entre las posiciones -298 y -241, está activado por Hap1p que se une a dos sub-sitios dentro de esta región, UAS1A y UAS1B, ambos necesarios para una máxima actividad (Lalonde y

col., 1986; Pfeifer y col., 1987a). El UAS2, que se encuentra entre las posiciones -230 y -178, está activado por el complejo heteromérico Hap2/3/4/5p (Guarente y col., 1984; McNabb y col., 1995). La descripción de la regulación tanto por los niveles de oxígeno, mediada por Hap1p, como por la fuente de carbono, mediada por el factor heteromérico Hap2/3/4/5p, ha sido paralela al estudio de estos factores de transcripción, como se ha visto en los anteriores apartados. También se ha identificado una secuencia de unión para el factor multifuncional Abf1p en la posición -462 que forma un complejo de retardación DNA-proteína (Dorsman y col., 1988).

1.6.3. Regulación del gen *CYC7* de *S. cerevisiae*.

El gen hipóxico *CYC7* está regulado por los niveles de glucosa y presenta débil inducción por oxígeno a través de la proteína Hap1p (Zitomer y col., 1987; Pfeifer y col., 1987b). Lodi y col., (1996) proponen una variación en el modelo de activación de *CYC7* mediado por Hap1p en la que estaría implicado un factor activador adicional todavía no caracterizado.

CYC7 está inducido por choque térmico y por bajos niveles de cAMP (Pillar y Bradshaw, 1991) y en la fase estacionaria temprana (Laz y col. 1984). Estas características llevaron al estudio de la respuesta global al estrés de *CYC7* (Evangelista y col., 1996). Se relacionó, mediante análisis de deleciones, la respuesta a estrés con tres elementos CCCCT localizados en el promotor (elementos STRE, *Stress Regulatory Element*). Esta respuesta está mediada por el factor Rox3p. Mediante una selección de supresores de una mutación de *ROX3* sensible a la temperatura, se aisló el gen *RTS1* (*Rox Three Suppressor*) que codifica para una proteína, Rts1p, con homología con la subunidad B' de la fosfatasa 2A de conejo (Zolnierwicz y col., 1994). La deleción de *RTS1* causa sensibilidad osmótica, sensibilidad a la temperatura y un incremento del mRNA de *CYC7* bajo todas las condiciones. Rts1p funciona como subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A_o de *S. cerevisiae* (Evangelista y col., 1996). Estos autores propusieron el modelo que se incluye en la figura 8. Sitúan a Rox3p como

receptor de la señal de estrés en el núcleo porque parece actuar después de la fosfatasa y media todas las señales de estrés estudiadas (Evangelista y col., 1996). Rts1p podría actuar a dos niveles diferentes, bien contrarrestando las señales de los diferentes tipos de estrés individualmente, o bien afectando a un único factor que recibe todas las señales.

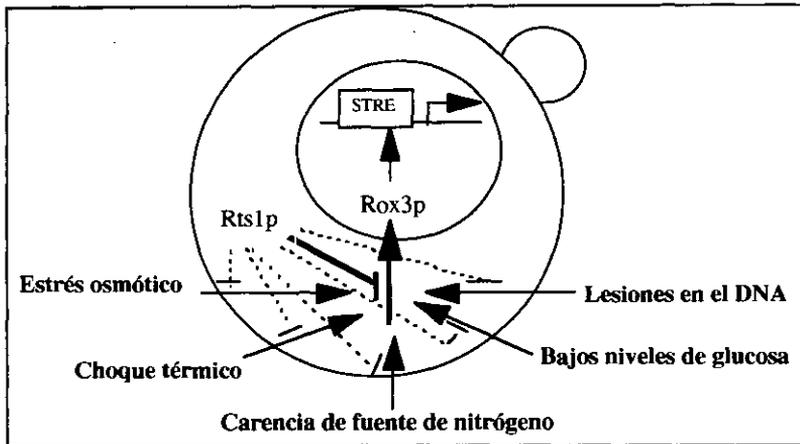


Figura 8. Papeles de Rox3p y Rts1p en la respuesta a estrés de *CYC7* (adaptado de Evangelist y col., 1996).

1.6.4. El gen *KICYC1* de *Kluyveromyces lactis*.

El gen *KICYC1* se aisló por complementación de una línea de *S. cerevisiae* deficiente en citocromo *c*. El gen *KICYC1* codifica para una proteína de 110 aminoácidos que mantiene todos los requerimientos estructurales de un citocromo *c* (Freire-Picos y col., 1993).

Se ha visto que el gen *KICYC1* presenta una homología extensa con los genes citocromo *c* de otras levaduras (Freire-Picos y col., 1995b). La mayor homología se produce con el citocromo *c* de *Hansenula anomala* (Jambón y col., 1997).

El gen *KICYC1* genera dos transcritos de distintos tamaños y está regulado a nivel transcripcional por oxígeno y por glucosa. Mediante expresión heteróloga en líneas de *S. cerevisiae*, se vió que los factores Hap1p y Hap2p intervienen en

su regulación (Freire-Picos y col., 1995a). El nivel de expresión del gen *KICYC1* es elevado en comparación con el del gen *CYC1*, lo que se relaciona con el alto bias en el uso de codones que presenta *KICYC1* (Freire-Picos y col., 1994).

1.7. Factores transcripcionales de *Kluyveromyces lactis*.

Las regiones promotoras de los genes de *K. lactis* contienen sitios potenciales de unión de factores reguladores de *S. cerevisiae*. Los ejemplos son numerosos: *KICYC1* (FreirePicos y col., 1993), *KIQCR7* (Mulder y col., 1994c), *QCR8* (Mulder y col., 1994b), *GAL80* (Zenke y col. 1993), *GALI-GAL10* (Webster y Dickson, 1988), *PFK2* (Heinisch y col., 1993) y otros. Sin embargo, en la mayor parte de los casos todavía no se ha estudiado su verdadero significado funcional.

En los últimos años se han clonado factores reguladores de la transcripción en *K. lactis* homólogos a los de *S. cerevisiae* y se han iniciado estudios de los mecanismos de acción que ejercen sobre la regulación génica.

1.7.1. Factores específicos de regulación del metabolismo respirofermentativo.

1.7.1.1. *KIHAP2*.

El gen *KIHAP2* se clonó por complementación de una línea mutante *hap2* de *S. cerevisiae*. Se obtuvo el mutante nulo y presentaba un fenotipo que, a diferencia de lo que sucede con su homólogo en *S. cerevisiae*, crece normalmente en glicerol, etanol o ácido láctico. *KIHap2p* complementa la función en mutantes *hap2* de *S. cerevisiae* y la región funcional de la proteína está altamente conservada; sin embargo, no parece estar implicada en el control del sistema respiratorio en levaduras (N'Guyen y col., 1995). Estudios recientes de Lodi y col. (comunicación personal) de los genes que codifican para el enzima lactato DH, *KIDL*D y *KICYB2*, han puesto de manifiesto un efecto del

factor Hap2p sobre su regulación. Este efecto sólo se observa en medios completos con lactato y no en medios con glucosa. Esto implicaría un tipo de regulación dependiente de Hap2p en condiciones diferentes de las que intervienen en *S. cerevisiae* y que deben ser analizadas con mayor profundidad.

1.7.1.2. *KIHAP3*.

Se clonó por complementación de una línea mutante *hap3* de *S. cerevisiae*. Codifica para una proteína de 205 aminoácidos en la cual una región central de 90 residuos es altamente homóloga a la de Hap3p de *S. cerevisiae*. A pesar de la homología estructural encontrada, se observó que la interrupción del gen *KIHAP3* no afectaba al crecimiento en fuente de carbono no fermentable y los niveles de mRNA de diversos genes respiratorios tampoco mostraban ninguna variación (Mulder y col., 1994a).

1.7.1.3. *KISFN1*.

Se aisló mediante la complementación del mutante *fog2* de *K. lactis* (Fermentative and Oxidative Growth), que presenta deficiencias en el proceso de desrepresión en ausencia de glucosa. Presenta un porcentaje de homología con Sfn1p de *S. cerevisiae* de un 74,7% en 613 aminoácidos. Las dos proteínas poseen además de una homología estructural, una homología funcional puesto que *KISFN1* complementa la mutación *snf1* de *S. cerevisiae* y los fenotipos de las líneas mutantes de ambos genes son similares (Goffrini y col., 1996).

1.7.1.4. *KIMIG1*.

Se clonó a partir de una librería genómica de *K. lactis*, usando como sonda un fragmento de *K. marxianus* amplificado por PCR a partir de cebadores degenerados diseñados a partir de las homologías de los dedos de zinc de las proteínas Mig1p de *S. cerevisiae* y CREA de *Aspergillus nidulans*. (Dowzer y Kelly, 1991).

KIMig1 presenta la región del dedo de zinc altamente conservada y dos secuencias consenso cortas que podrían tener relación con la regulación por fuente de carbono; tiene una similitud del 56% y una identidad del 38% respecto a la proteína Mig1p de *S. cerevisiae*. Complementa la mutación de la proteína de *S. cerevisiae*, lo que apoya la hipótesis de que presenta funciones similares (Cassart y col., 1995).

1.7.1.5. *KITUPI*.

Fue clonado recientemente por Braun y Johnson (1997) por su capacidad de complementación de la mutación *tup1* de *S. cerevisiae*. Por el momento no se ha caracterizado su papel en la levadura *K. lactis*.

1.7.2. Factores reguladores multifuncionales.

1.7.2.1. *KIABF1*.

Puesto que la delección del gen *ABF1* en *S. cerevisiae* es letal, el gen *KIABF1* fue aislado por complementación de una línea de *S. cerevisiae* a la que se le había reemplazado el promotor de *ABF1* por un promotor que contenía el UAS_{GAL}. Esta construcción sólo permite el crecimiento en un medio con el inductor galactosa; una vez realizada la transformación con una librería de *K. lactis* se seleccionó en un medio con glucosa. El gen *KIABF1* de *K. lactis* es considerablemente más pequeño (482 aminoácidos) que el de *S. cerevisiae* (731 aminoácidos). La comparación de las secuencias aminoacídicas mostró un 65% de similitud y un 49% de identidad, encontrándose diferencias en el contenido de asparagina (Abf1p 14,8%, KIAbf1p 5,6%) debido a la ausencia de las extensiones de asparagina en el gen de *K. lactis*; además la proteína de *K. lactis* es menos rica en ácido aspártico (Abf1p 11,4%, KIAbf1p 7,5%). Ambas diferencias se correlacionan con la diferencia en los valores del pI calculado para las dos proteínas (Abf1p 4,74, KIAbf1p 6,61). Aparecen dos regiones en la

zona N-terminal con alta homología, una de ellas contiene el dedo de zinc similar al de Abf1p (Gonçalves y col., 1992).

Se le arribuye una función similar a la que desempeña en *S. cerevisiae* de acuerdo con los resultados de los ensayos de retardación de los complejos DNA-proteína formados a partir de extractos proteínicos de *K. lactis* (Hoekstra y col. 1992).

1.7.2.2. *KICPF1*.

El gen *KICPF1* que codifica para el factor Cpf1p en *K. lactis* se clonó por complementación del fenotipo mutante auxotrófico para la metionina del mutante *cpfl* de *S. cerevisiae*. Las secuencias aminoácidas de las proteínas KICpf1p y Cpf1p muestran una identidad relativamente baja, del 31%, pero sin embargo presentan una región C-terminal con elevada homología (86%) e identidad (67,2%). Esta región presenta un dominio de unión al DNA con una hélice-giro-hélice básico y una cremallera de leucinas. En contraste con lo que sucede en *S. cerevisiae*, la interrupción del gen *KICPF1* en *K. lactis* es letal (Mulder y col., 1994d).

1.7.2.3. *KIRAPI*.

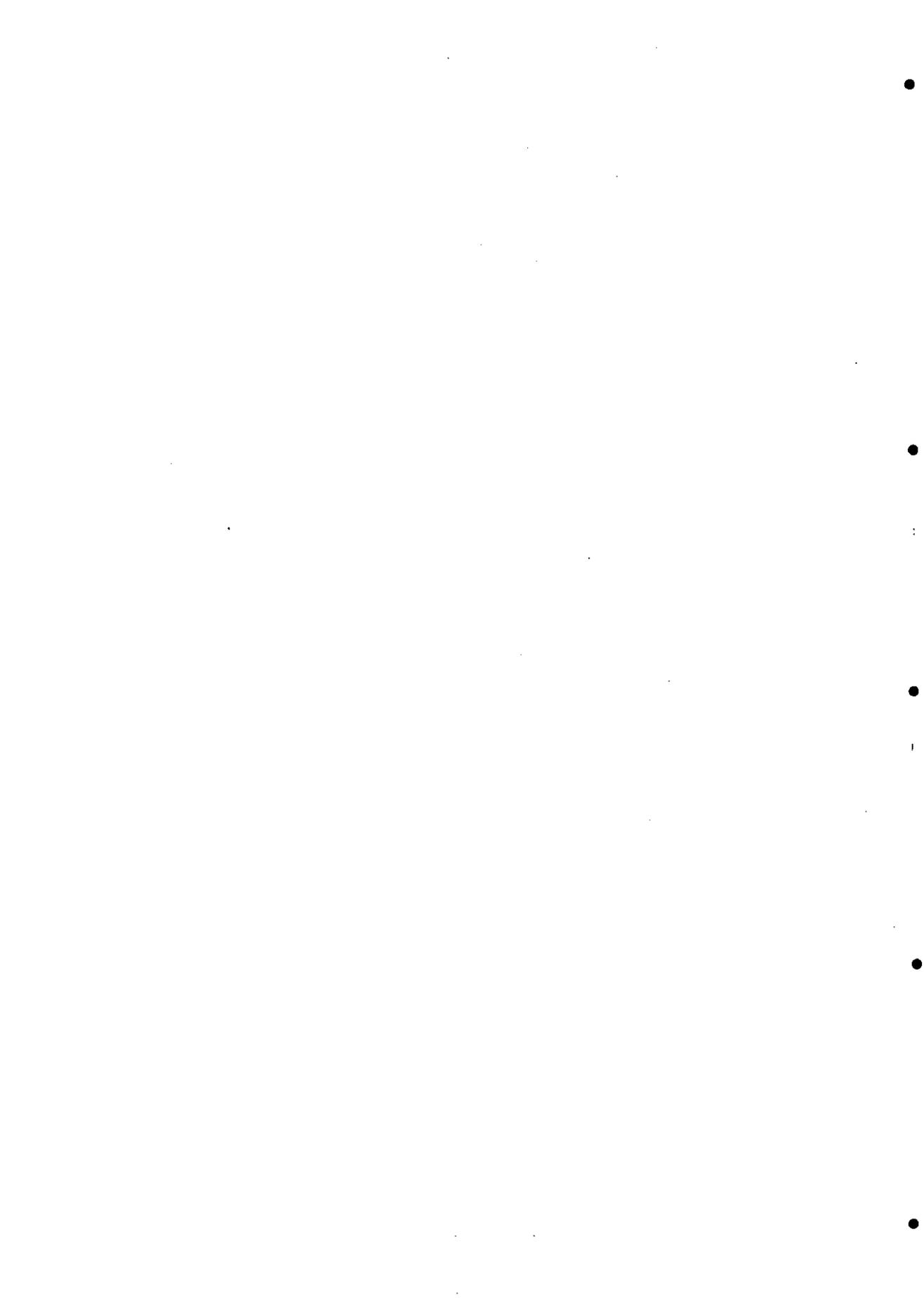
El gen *KIRAPI* presenta una gran similitud con su homólogo en *S. cerevisiae*; sin embargo, no complementa los mutantes *rap1*, lo que sugiere que los dominios esenciales para la función de la proteína no están presentes en *K. lactis* (Larson y col., 1994)

1.8. Metabolismo respiro-fermentativo en *K. lactis*.

Las levaduras no constituyen un grupo homogéneo en cuanto se refiere a su metabolismo energético. Hay especies que en condiciones aerobias prefieren las rutas fermentativas y otras que prefieren las rutas respiratorias. En *S. cerevisiae*, la respiración representa sólo un 10% del metabolismo energético, mientras que en *K. lactis* la respiración predomina sobre la fermentación (Gancedo y Serrano, 1989).

Se ha puesto de manifiesto que *K. lactis* (organismo *Crabtree* negativo) presenta una respiración no limitada y no reprimida por glucosa en condiciones plenamente oxidativas (González Siso y col., 1996). En contraposición, *S. cerevisiae* es un prototipo de levadura *Crabtree* positiva que produce etanol en presencia de oxígeno, presenta una capacidad de respiración limitada y muestra una importante represión por glucosa. A fin de entender a nivel molecular los mecanismos que posibilitan la existencia de una respiración no limitada en *K. lactis*, en este trabajo se aborda el estudio de la región promotora del gen *KICYC1* que codifica para un transportador de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

2. OBJETIVOS



El gen *KICYC1* de *Kluyveromyces lactis* se diferencia del gen *CYC1* de *S. cerevisiae* en dos aspectos relevantes. Por una parte, los niveles de mRNA son superiores para *KICYC1*. Por otra, *KICYC1* origina dos transcritos de distinto tamaño, a diferencia de la existencia de un único transcrito en *CYC1*.

Para poder determinar las bases moleculares que establecen la elevada expresión de *KICYC1* en *K. lactis*, nos hemos propuesto los objetivos que se resumen a continuación y que pretenden alcanzar un mayor conocimiento sobre el funcionamiento del promotor de *KICYC1*.

1. Identificación de posibles señales reguladoras en el promotor.

1.1. Subclonación y secuenciación de un fragmento que contiene la región promotora del gen *KICYC1*.

1.2. Identificación de regiones reguladoras mediante búsqueda de homologías con señales consenso de factores reguladores.

2. Comprobación de la funcionalidad del promotor del gen *KICYC1* en el control de la expresión de otros genes de levaduras.

2.1. Obtención de una línea mutante conteniendo el gen *KICYC1* interrumpido por el gen *URA3* y complementación de esta mutación por plásmidos portadores de los genes *KICYC1*, *CYC1* y *CYC7*.

2.2. Construcción de un plásmido portador del *CYC7* con el promotor del gen *KICYC1* y estudios de expresión heteróloga en *K. lactis*.

3. Determinación funcional de regiones reguladoras del promotor mediante fusiones al gen *lacZ* de *Escherichia coli* y estudio de la actividad β -galactosidasa en distintas construcciones conteniendo deleciones unidireccionales e internas del promotor.

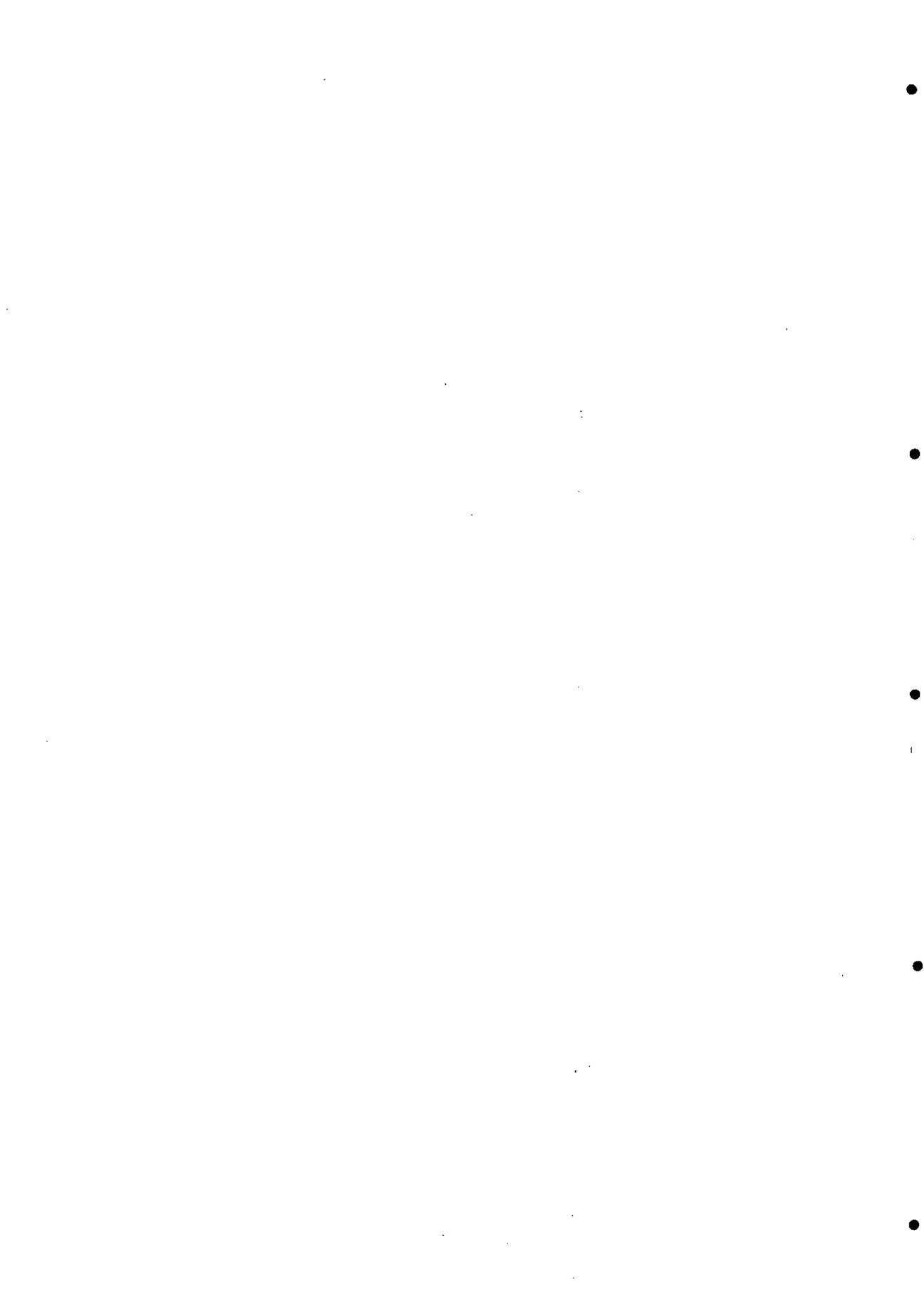
4. Modificación de algunas señales reguladoras comunes con el promotor de *CYCI* mediante mutagénesis dirigida y estudio funcional del efecto producido.

5. Estudio de la interacción de distintas secuencias de la región promotora del gen con proteínas.

5.1. Ensayos de retardación utilizando las diferentes regiones reguladoras caracterizadas y extractos proteicos de *K. lactis*.

5.2. Ensayos de retardación con extractos proteicos de *Sc334*, una línea superproductora de Hap1p..

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Líneas celulares.

3.1.1. Líneas celulares de bacterias.

Escherichia coli:

| LÍNEA | GENOTIPO | REFERENCIA |
|-------|---|-----------------------------|
| HB101 | <i>supE44, hsdS20 (rBmB), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1</i> | Bolivar y Backman, 1979. |
| JM101 | <i>supE, thiΔ(lac-proAB), F'[traΔ36proAB⁺, lacI^q lacZΔM15]</i> | Messing, 1979 |
| JM109 | <i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ(lac-proAB)</i> | Yanish-Perron y col., 1985. |
| DH5α | <i>endA1, hsdR17(r_km_k⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA(Na1⁺), relA1, Δ(lacZYA-argF)_{U169}, (φ80 lacZ ΔM15)]</i> | Hanahan y col 1991 |
| CJ236 | <i>dut1, ung1, thi1, relA1/pCJ105 (Cm^r)F'</i> | Joyce, 1984 |
| TG1 | <i>Δ(lac-proAB), supE, thi1, hsdΔ5, F'traD36, proA⁺B⁺, lacI, lacZ (ung⁺ dut⁺)</i> | Gibson, 1984 |

Crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares de bacterias en el laboratorio.

Los cultivos en medios líquidos se realizaron en matraces o en tubos en una estufa con agitación a una temperatura de 37°C.

Las líneas celulares de bacterias se conservaron habitualmente en la nevera sembradas en placas y se resembraron periódicamente. Las líneas transformadas con plásmidos que contenían genes marcadores de resistencia a ampicilina se conservaron en placas de medio LB suplementado con ampicilina. La línea CJ236 se conservó en placas de medio 2xYT suplementado con cloranfenicol.

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

3.1.2. Líneas celulares de levaduras.

Kluyveromyces lactis:

| Línea celular | Genotipo | Referencia |
|---------------|--|---|
| NRRL-Y1140 | <i>MATa</i> | Jong y Edwards, 1990 CBS 2359, ATCC 8585 |
| MW190-9B | <i>MATa, lac4-8, Klura3, Rag⁺</i> | Wésolowski-Louvel |
| MW98-8C | <i>MATa, rag1, rag2, Klura3, metA1, argA</i> | Bianchi y col., 1987 |
| MW270-7B/16 | <i>MATa, leu2, Klura3, metA1, HAP2::ScURA3</i> | Wésolowski-Louvel |
| WMH7302-D1 | <i>MATa, leu2, Klura3, trp1, metA1, adeR, his2-2, HAP3::ScLEU2</i> | Muldery col. 1994a |
| KI32144 | <i>MATa, his</i> | Mas y col., 1974. ATCC 32144 |
| Klhem1 | <i>MATa, lac4-8, Klura3, Rag⁺, Klhem1</i> | González Domínguez y col. 1997 |

Saccharomyces cerevisiae:

| Línea celular | Genotipo | Referencia |
|---------------|---|---------------------------|
| ZW13 | <i>MATa, trp1-1, leu2-3, leu2-112, his4-519, cyc1-1, cyp3-1(cyc7), Gal⁻</i> | Zitomer y col., 1987 |
| ZW10 | <i>MATα, trp1-1, leu2-3, leu2-112, his4-519, cyc1-1, cyp3-1(cyc7), gal, CYP1-16 (hap1)</i> | Zitomer y col., 1987 |
| BWG-7a | <i>MATα, adel-100, leu2-2, leu2-112, his4-519, ura3-52</i> | Guarente y Mason, 1983 |
| LPY22 | <i>MATa, adel-100, leu2-2, leu2-112, his4-519, ura3-52, Δhap1::LEU2, ΔUAS2-CYC1 rho⁺</i> | Turcotte y Guarente, 1992 |
| Sc334 | <i>MATa, pep4-3, prb1-1122, ura3-52, leu2-3, leu2-112, reg1-501, gal1</i> | Fytlovich y col., 1993 |

Crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares de levaduras en el laboratorio.

Los cultivos de levaduras en medio líquido se realizaron en general en matraces con agitación a 30°C.

Para la extracción de proteínas y de RNA en condiciones de hipoxia los cultivos creciendo en medio YP se conectaron a una bala de gas N₂ al 99% durante dos horas. Los cultivos se pararon cambiando la temperatura de 30°C a 0°C antes de desconectar el burbujeo con N₂.

Las líneas celulares de levadura se conservaron habitualmente sembradas en placas YPD-0,5% en la nevera, tras haber sido cultivadas a 30°C durante uno o dos días. Se resembraron periódicamente cada dos o tres meses.

Para el mantenimiento de las líneas de levaduras a largo plazo se inocularon en medio YPD-0,5% o CM, se dejaron crecer en agitación a 30°C, se les añadió glicerol estéril hasta un 50% y se congelaron a -80°C.

3.2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon en agua destilada, con un suplemento de un 1,5% de agar bacteriológico para los medios sólidos en placas *Petri*. Se esterilizaron en un autoclave durante 20min a 120°C y 2Ba de presión.

3.2.1. Medios de cultivo para bacterias

Medio LB (Luria-Bertani)

| | |
|----------------------|-------|
| Bactotripton | 1 % |
| Extracto de levadura | 0,5 % |
| Cloruro sódico | 0,5 % |
| D-glucosa | 0,1 % |

Medio LBA (LB suplementado con ampicilina)

Medio LB suplementado con 40-80 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. El antibiótico se añadió una vez esterilizado el medio, cuando alcanzaba una temperatura de 60-65°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.

Placas LBA/X-Gal+IPTG.

Son placas de medio LBA suplementadas con 1mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactosido (X-Gal) y 2mg de isopropil-tio- β -D-galactosido (IPTG). Se utilizaron para la selección de colonias bacterianas transformadas con plásmidos portadores del gen *lacZ* que codifica para el enzima β -galactosidasa.

Generalmente en este plásmido el gen marcador contiene un sitio *MCS* (sitio de clonaje múltiple, *Multiple Cloning Site*) con diversos sitios de restricción únicos que, aunque no interrumpen la pauta de lectura abierta del gen, conducen a la inactivación del mismo cuando se le introduce un fragmento de DNA. De este modo, en medios suplementados con X-Gal (un sustrato cromogénico) e IPTG (un inhibidor del represor *lac* e inductor, por tanto, del gen *lacZ*), las células que muestran un fenotipo *lac*⁺ dan lugar a colonias de color azul, y las líneas que portan el gen interrumpido (*lac*⁻) son incapaces de utilizar la fuente de carbono que produce los metabolitos coloreados y dan lugar a colonias blancas que pueden ser seleccionadas.

Medio YT

| | |
|----------------------|-------|
| Bactotripton | 1 % |
| Extracto de levadura | 0,5 % |
| Cloruro sódico | 0,5 % |

Medio SOC

| | |
|----------------------|--------|
| Bactotripton | 2 % |
| Extracto de levadura | 0,5 % |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |

Se ajustó el pH a 7 con KOH 1M

Medio 2xYT.

| | |
|----------------------|-------|
| Bactotripton | 1,6 % |
| Extracto de levadura | 1 % |
| Cloruro sódico | 0,5 % |

Medio 2xYT-cloranfenicol

Medio 2xYT suplementado con 33µg/ml de cloranfenicol. Se utilizó para cultivar y mantener la línea CJ236 portadora del plásmido pCJ105 que confiere la resistencia al antibiótico.

Placas de medio H

| | |
|---------------------|-------|
| Bactotripton | 1 % |
| Cloruro sódico | 0,5 % |
| Agar bacteriológico | 1,5 % |

Top agar.

| | |
|----------------|--------|
| Bactotripton | 1 % |
| Cloruro sódico | 0,5 % |
| Agar | 0,65 % |

Se esterilizó y se conservó sólido, fundiéndolo en un horno de micro-ondas antes de usar.

Placas de medio mínimo M9.**Disolución A (500ml)**

| | |
|---------------------------|-------|
| KH_2PO_4 | 15 g |
| NaH_2PO_4 | 30 g |
| NH_4Cl | 5 g |
| NaCl | 2,5 g |

Suspensión B (450ml)

| | |
|------|-------|
| Agar | 7,5 g |
|------|-------|

Se esterilizaron A y B por separado, se dejaron enfriar hasta unos 65°C y se mezclaron 50ml de A con los 450ml de B. Se añadieron, mientras se agitaba, 5ml de una disolución de glucosa al 20% y 50µl de una disolución 1M de CaCl_2 , ámbas estériles y 500µl de una disolución de MgSO_4 1M y 250µl de una disolución de tiamina al 1% esterilizadas por filtración a través de un tamaño de poro de 0,2µm. Se vertieron las placas inmediatamente después. Este medio se utilizó para los cultivos de preparaciones de DNA plasmídico ultrapuro y para seleccionar el episoma F' en la línea TG1.

3.2.2. Medios de cultivo para levaduras.

Medio YP

| | |
|----------------------|----|
| Bacto peptona | 2% |
| Extracto de levadura | 1% |

Se suplementó con D-glucosa (**YPD**) o con glicerol (**YPG**). Se variaron los porcentajes de la fuente de carbono según se indica en cada experimento.

CM (Medio completo)

También llamado SC (*Synthetic Complete*). Se preparó según Zitomer y col. (1976).

Para 1 litro:

5ml de mezcla de aminoácidos -His (200X)

20g de la fuente de C deseada

Se añadieron los siguientes aminoácidos:

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

Se omitió el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico.

Después de esterilizar se dejó enfriar hasta unos 65 °C y se añadieron 67ml de YNB estéril.

Mezcla de aminoácidos -His 200x: (aa200x)

Para 1 litro:

| | |
|------|---------------|
| 2 g | Arginina |
| 12 g | Isoleucina |
| 8 g | Lisina |
| 2 g | Metionina |
| 2 g | Treonina |
| 12 g | Fenil-alanina |

YNB

Para 1 litro:

| | |
|--------|--------------------------|
| 50 ml | Mezcla de vitaminas 300X |
| 100 ml | Sales traza 150X |
| 75 g | Sulfato amónico* |
| 15 g | KH_2PO_4 |
| 7,5 g | MgSO_4 |
| 1,5 g | NaCl |
| 1,5 g | CaCl_2 |

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

Mezcla de vitaminas 300X:

Para 1 litro:

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

Sales traza 150X:

Para 1 litro:

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

Placas CM-Lactato

Se prepararon con la composición del medio completo CM y como fuente de carbono se añadió lactato al 2%. Éste se esterilizó por separado mezclándose antes de verter sobre las placas.

Placas X-GAL (Rose y col. 1990)

10xPBSS (*Phosphate-buffer stock solution*)

| | | Para 1 litro: |
|---|--------|---------------|
| KH ₂ PO ₄ | 1 M | 136,1 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,15 M | 19,8 g |
| KOH | 0,75 M | 42,1 g |

Se ajustó el pH a 7 (importante para que el X-Gal pueda ser utilizado por las levaduras como sustrato) y se esterilizó. Se guardó a temperatura ambiente.

1000xMSS (*Mineral stock solution*)

| | | Para 100 ml |
|--------------------------------------|-------|-------------|
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,8 M | 19,72 g |
| FeCl ₃ | 2 mM | 32 mg |

Se esterilizó y se guardó a temperatura ambiente. Se forma un precipitado naranja muy fino que es necesario redisolver antes de usar.

300x Vitaminas (ver placas CM).

aa-DM (*Drop Mix*) (Modificación del descrito por Sherman, 1979)

| | Para 61 ml: |
|--------------|-------------|
| Adenina | 40 mg |
| Arginina | 20 mg |
| Histidina | 20 mg |
| Leucina | 60 mg |
| Lisina | 30 mg |
| Triptófano | 20 mg |
| Metionina | 20 mg |
| Fenilalanina | 50 mg |
| Treonina | 100 mg |
| Tirosina | 30 mg |
| Uracilo | 20 mg |

Se omitió el aminoácido utilizado como marcador auxotrófico. Se esterilizó y se guardó en la nevera.

Para 500 ml de placas:

| Disolución 1 | |
|--------------|----------------|
| 50 ml | PBSS |
| 0,5 ml | MSS |
| 2 ml | 300x Vit |
| 12,5 ml | aa-DP |
| 185 ml | agua destilada |

| Disolución 2 | |
|--------------|----------------------------------|
| 7,5 g | Agar |
| 10 g | Fuente de C (glucosa o glicerol) |
| 250 ml | agua destilada |

Se esterilizaron las disoluciones 1 y 2 por separado, se esperó que la temperatura fuese menor de 65 °C y se añadieron a la disolución 1 20mg del sustrato cromogénico X-Gal disuelto en 1 ml de DMF. Se mezclaron las dos disoluciones y se vertieron las placas.

Placas FOA (Rose y col. 1990).

El ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) se puede usar para seleccionar mutantes que no pueden usar el ácido orótico como fuente del anillo de pirimidina. Las células salvajes convierten el 5-FOA en monofosfato de 5-fluororótidina por conjugación con el pirofosfato de fosforibosil (PRPP) y posteriormente se descarboxila para formar monofosfato de 5-fluoro-uridina (5-FUMP). Estos dos pasos están catalizados por los enzimas productos de los genes *URA5* y *URA3* respectivamente. La fluorodeoxiuridina, que se forma inevitablemente después, es un potente inhibidor de la timidilato sintasa y resulta tóxico para las células. Los dos pasos de la síntesis de uridina que hacen falta para convertir 5-FOA en 5-FUMP pueden ser mutados para bloquear su utilización, siempre que se suministre uracilo para permitir la formación de UMP por la denominada ruta salvaje. Tanto los mutantes *ura3* como los mutantes *ura5* pueden crecer en medio que lleva 5-FOA (Sikorski y Boecker, 1991).

Para 100 ml de placas:

| Disolución 1 | | <u>aa-mix:</u> | |
|--------------|-------------------------|----------------|------------|
| 6,7 ml | YNB | 200 mg | Triptófano |
| 0,5 ml | aa-200x (ver placas CM) | 200 mg | Histidina |
| 40 mg | aa-mix | 400 mg | Leucina |
| 5 mg | URACILO | 200 mg | Tirosina |
| 45 ml | agua destilada | 50 mg | Adenina |
| Disolución 2 | | | |
| 2 g | Agar | | |
| 2 g | Glucosa | | |
| 50 ml | agua destilada | | |

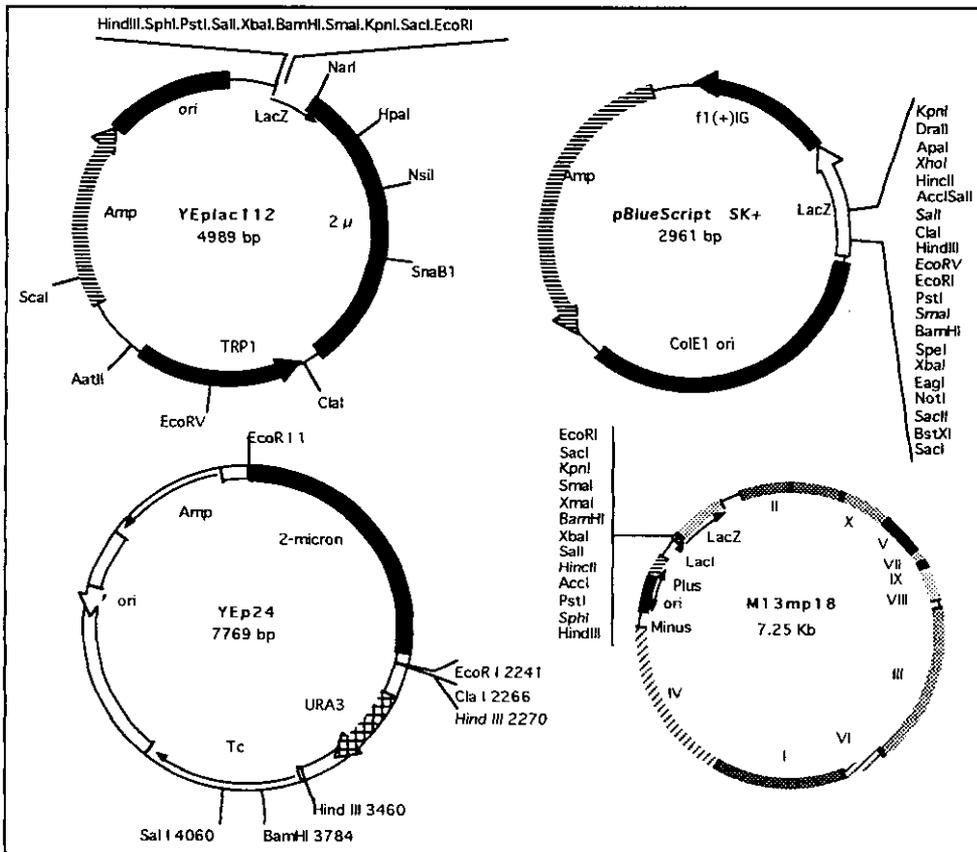
Se esterilizaron por separado. Se añadieron 5ml de una disolución 20mg/ml de 5-FOA (esterilizada por filtración) a la disolución 1 y a continuación se mezcló con la disolución 2 y se vertió sobre las placas.

3.3. Plásmidos.

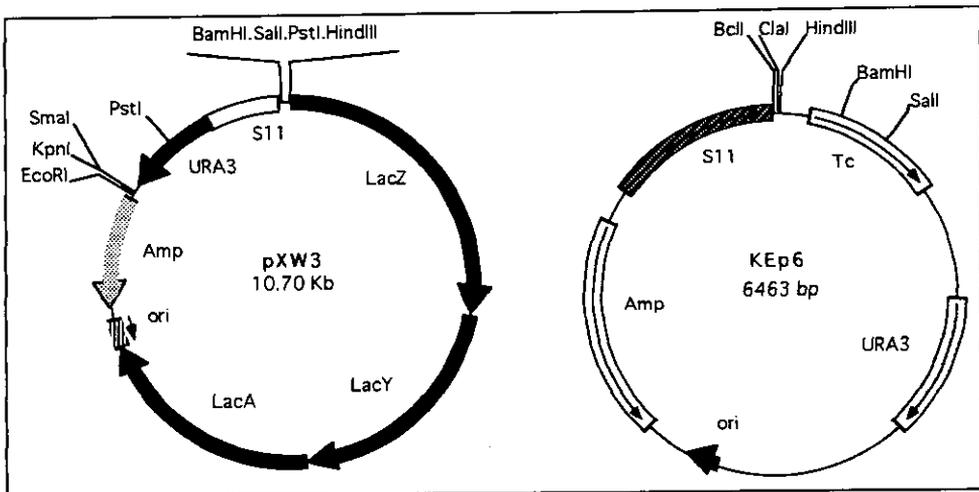
3.3.1. Vectores de clonación.

Se utilizaron los siguientes vectores de *E. coli* y levaduras:

- YEplac112** (2 μ m, TRP1, Amp, ori, lacZ) Gietz y Sugino, 1988.
- YCplac22** (CEN4, TRP1, Amp, ori, lacZ) Gietz y Sugino, 1988.
- pBlueScriptSK+** Stratagene®.
- YEp24** Botstein y col., 1979.
- M13mp18** Yanish-Perron y col., 1985.
- pXW3** Chen y col., 1992)
- KEp6** Wésolowski-Louvel y col, 1996.



Vectores de clonación.

Vectores de clonación de *K. lactis*.

3.3.2. Descripción de algunas construcciones plasmídicas de partida.

Las siguientes construcciones conteniendo el gen *KICYC1* habían sido previamente obtenidas en nuestro laboratorio y sirvieron de partida a las realizadas con motivo de este trabajo.

pEC1: clon original que contiene el gen *KICYC1*. Consiste en un fragmento de unos 9.800pb inserto en el sitio *BamHI* del vector YEp24 en el que se construyó la librería genómica de *K.lactis*.

pART1: fragmento *BamHI-Sall* de pEC1 de un tamaño de unos 4.000 pb clonado en YEplac112.

pART10: fragmento *PstI-PstI* de 1903 pb pART1 que contiene la secuencia codificadora del gen *KICYC1*, con unos 376 pb de la región 5' y unos 1200pb de la región 3' en YEplac112.

pART6: fragmento *PstI-HindIII* de 520pb que contiene 376pb de la región 5' y 144pb de la *ORF* (*Open Reading Frame*, pauta de lectura abierta) del *KICYC1*, en YEplac112.

pCAF10: fragmento *PstI-PstI* de pART10 de 1900pb clonado en el sitio *PstI* de YCplac22.

pBSNulo: contiene el gen *KICYC1* interrumpido en la posición 136 *HindIII* con el gen *URA3* de *S. cerevisiae* obtenido a partir de YEp24.

3.3.3. Construcciones plasmídicas realizadas en este trabajo.

pARTpre5: fragmento *HindIII-HindIII* de unos 1900 pb de pART1, que incluye hasta el sitio *HindIII* en la posición 146 de la *ORF* de *KICYC1* clonado en el sitio *HindIII* de YEplac112 (ver Fig. 9 de resultados).

pART5: fragmento *PstI-PstI* de unos 1500 pb de pARTpre5, que abarca desde el *PstI* del *MCS* hasta el *PstI* de la posición -376 respecto al ATG y que se clonó en el sitio *PstI* del vector YEplac112. En pART5, el fragmento *HindIII-PstI* está en la misma orientación que en pART10, de manera que se libera al digerir pART5 con *HindIII*.

pART1/5: orientación contraria a la de pART5, al digerirlo con *HindIII* la construcción se vuelve lineal. Se utilizó en alguna de las reacciones de secuenciación.

pART3 = p(Δ AluI): se digirió pART6 con *SmaI* y *HindIII* y la banda de 600pb se rescató y se cortó con *AluI*. Se obtuvieron dos fragmentos, el mayor es el que contiene la región 5' y se clonó en el sitio *SmaI* de YEplac112. Contiene 378 pb del promotor y un par de codones de la región codificadora.

pART1+2: se digirió pART5 con *EcoRI* y se rescató la banda de aproximadamente 500pb que se cortó con *Asp718*. El fragmento de 372pb *EcoRI-Asp718* se clonó en YEplac112. Este subclón fue utilizado en la secuenciación.

p1H: digestión de pART5 con *PstI* y *EcoRI* y el fragmento que se escinde se digirió con *HindII*. El fragmento *HindII-HindII* resultante se clonó en el sitio *SmaI* de YEplac112.

KEp6-ScCYC1: se clonó el fragmento *HindIII-BamHI* del plásmido pCYC1(2.4) que contiene el gen *CYC1* de *S. cerevisiae* en el plásmido KEp6.

KEp6-ScCYC7: se clonó el fragmento *BamHI-ClaI* del plásmido pCFW10 que contiene el gen *CYC7* de *S. cerevisiae*, en los plásmidos KEp6 y pSK1.

KEp6-KICYC1: se clonó el fragmento *Sall-Sall* del plásmido pART10 que contiene el gen *KICYC1* de *K. lactis*, en los plásmidos KEp6 y pSK1.

pCAF5: fragmento *HindIII-PstI* de pART5 clonado en YCplac22.

pCAF11: fragmento *PstI-PstI* de pART10 de 1900pb clonado en el sitio único *PstI* de pCAF5 de manera que se añaden 1500pb correspondientes a la región 5'. Contiene un fragmento de la región 5' del gen *KICYC1* de 1810pb. Se comprobó que la orientación era igual que la del clon original.

pCAF12: fragmento *PstI-PstI* de pART3 clonado en el sitio *PstI* único de pCAF5. Se comprobó la orientación que resultó igual a la del clon original. Esta construcción incluye el ATG de inicio de la traducción del gen y una región *upstream* de unos 1810 pb.

pCAFA y pCAF1/A: fragmento *PstI-PstI* de pART10 rescatado y digerido con *HinfI*. Se rescató la banda de 900pb, se rellenaron los extremos cohesivos con DNA polimerasa de T4 y se clonó en *SmaI* del vector YCplac33. Estos plásmidos contienen la *ORF* del gen *KICYC1* y 55 pb de su región 5'.

pBS12-2: fragmento *Sall-HindIII* de pCAF12 clonado en el *MCS* de pBlueScriptIIISK+. Contiene una región 5' de unos 1810 pb igual que pCAF12 pero con más enzimas de restricción disponibles en el *MCS* para sucesivas construcciones.

pXW3-3Z (p3Z): fragmento *BamHI-BamHI* de 376pb de la región 5' del gen *KICYC1* obtenido a partir del plásmido pART3 que se clonó en el sitio *BamHI* del plásmido de fusión pXW3.

pXW3-12X (p12Z): fragmento *BamHI- BamHI* de 1810pb de la región 5' del gen *KICYC1* obtenido a partir del plásmido pBS12-2 y que se clonó en el sitio *BamHI* del plásmido de fusión pXW3.

pBS12-2Δ *EcoRV*: se eliminó un fragmento de 717pb *EcoRV-EcoRV* de pBS12-2 que se extiende desde el sitio *EcoRV* del *MCS* de hasta el segundo sitio *EcoRV* de la secuencia correspondiente a pART5 de manera que resulta un promotor con 822pb de la región 5' del gen *KICYC1*.

del12-2: deleción del clon pBS12-2 obtenida mediante el sistema de generación de deleciones *Erase a Base*[®] de Promega digiriéndolo con *SacII*(extremo 3'-protuberante que protege de la acción de *ExoIII*) y *HindIII*(extremo sobre el que actuó *ExoIII*). La extensión de la deleción se comprobó por secuenciación llegando hasta la posición -868 del ATG.

del10-1: deleción obtenida por el mismo proceso que la anterior. Su extensión se comprobó por secuenciación llegando hasta la posición -530 pb del ATG.

del10-9: deleción obtenida por el mismo proceso que la anterior. La extensión de la deleción se comprobó por secuenciación llegando hasta la posición -876 pb del ATG.

p129X: contiene el promotor de 870 pb. Se construyó a partir del plásmido pdu12-2 digerido con *Bam*HI y el fragmento de unas 870 pb se clonó en el sitio *Bam*HI de pXW3.

p9Z: contiene el promotor de 868pb clonado en el vector de fusión pXW3 después de hacer las siguientes modificaciones: se eliminaron los sitios *Sal*I y *Pst*I del MCS de pXW3 digiriendo con las enzimas de restricción y rellenando los extremos en presencia del adaptador *Hind*III. Se eliminaron los sitios *Eco*RI y *Bam*HI mediante el mismo procedimiento pero introduciendo el adaptador *Sal*I. Se secuenció para comprobar que el promotor de 870 estaba *in frame* con el gen *lacZ*.

Serie de deleciones unidireccionales, du: plásmidos portadores de diferentes tamaños de la secuencia de la región 5' de *KICYCI* que conforman un grupo de deleciones en sentido 5' → 3' y que se fusionaron al gen *lacZ* del vector pXW3 en pauta de lectura. Se denominaron en orden decreciente de tamaño du9 → du17 y se describe su extensión exacta en el apartado correspondiente de resultados.

Serie de deleciones internas, di: plásmidos portadores de deleciones internas obtenidas con nucleasa *Bal*31, a partir del sitio *Pst*I de la posición -376 del promotor de *KICYCI* fusionadas en pauta de lectura al gen *lacZ* del plásmido de fusión pXW3. Su extensión se comprobó mediante secuenciación y se describen las posiciones en el apartado correspondiente de los resultados.

M13mp18-p800: fragmento de 829pb *Bam*HI-*Eco*RI de pBS12-2Δ*Eco*RV clonado en el vector M13mp18.

md-UAS1A: plásmido M13mp18-p800 con una mutación puntual en el sitio UAS1A del promotor de *KICYC1* que se describe en el apartado de mutagénesis dirigida en materiales y métodos.

md-UAS2: plásmido M13mp18-p800 con una mutación puntual en el sitio UAS2 del promotor de *KICYC1* que se describe en el apartado de mutagénesis dirigida en materiales y métodos.

md-CCAAT: plásmido M13mp18-p800 con una mutación puntual en la caja CCAAT de la posición -352 del promotor de *KICYC1* que se describe en el apartado de mutagénesis dirigida en materiales y métodos.

pmdUAS1A/*lacZ*: se intercambió el fragmento *Pst*I-*Pst*I del plásmido p9Z por fragmento *Pst*I-*Pst*I de 380pb derivado de mdUAS1A.

pmdUAS2/*lacZ*: mismo proceso que la construcción anterior a partir de mdUAS2.

pmdCCAAT/*lacZ*: mismo proceso que la construcción anterior pero a partir de mdCCAAT.

3.4. Extracción de ácidos nucleicos.

3.4.1. DNA plasmídico de *E. coli* (Sambrock y col. 1989, Ausubel y col. 1995).

3.4.1.1. Método de la lisis alcalina.

Se inocularon 1,5ml de medio LB, para preparaciones a pequeña escala, o 25ml para preparaciones a gran escala, conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 40-80 μ g/ml. Se incubó a 37°C durante toda una noche con agitación. A continuación se explica el método de extracción a pequeña escala, siendo el proceso a gran escala igual pero con cantidades de reactivos proporcionales al volumen de cultivo de partida. Se centrifugaron las células en tubos *ependorf* 1min a 8.000r.p.m. Se eliminó el medio y se resuspendieron las células en 100 μ l de la disolución I (glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris-HCl 25mM pH 8.0) agitando en *vortex*. Se añadieron 200 μ l de la disolución II fresca (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Se mezcló por inversión rápidamente dos o tres veces, hasta conseguir una viscosidad homogénea. Se añadieron después 150 μ l de la disolución III (60% de acetato potásico 5M, 11,5% de ácido acético glacial(v/v), pH 4.8). Se agitó suavemente durante unos 10s. Se centrifugó 5min a 12.000r.p.m. y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Para la extracción de proteínas se añadió un volumen igual de PCIA (ver apartado 4.5). Se mezcló en *vortex* y se centrifugó 5 min a 8.000r.p.m. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. En los casos en que el sobrenadante permanecía turbio, se repitió este último paso hasta obtener una fase clara. Se precipitó el DNA añadiéndole a la preparación anterior 2 volúmenes de etanol al 95%, frío. Se mezcló bien y se centrifugó durante 10min a 12.000r.p.m. Se retiró el sobrenadante y se lavó el sedimento con 1 volumen de etanol al 70%. Se centrifugó 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se secó en un desecador a vacío y se resuspendió en tampón 1xTE agitándolo en *vortex*.

El rendimiento aproximado obtenido en cada preparación fue de unos 10 μ g para las de escala pequeña y de unos 300 μ g para las de gran escala. Las

preparaciones se conservaron congeladas a -20°C hasta su uso.

3.4.1.2. Precipitación con polietilenglicol.

Partiendo de una preparación de DNA obtenida mediante lisis alcalina, se trató con RNAsaA (ver apartado 4.5), a una concentración final de $0,03\mu\text{g}/\mu\text{l}$, a 37°C durante 30min. Se extrajo la RNAsa con PCIA y se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 del volumen de acetato sódico 3M. Se lavaron los restos de sales con etanol al 70% y se secó el DNA al vacío. Se resuspendió en $80\mu\text{l}$ de agua estéril y se añadieron $16\mu\text{l}$ de NaCl 5M y $100\mu\text{l}$ de polietilenglicol PEG6000 13% (p/p). Se incubó en hielo 20min y se centrifugó 5min a 13.000r.p.m. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol de 70%, se secó al vacío y se resuspendió en aproximadamente $20\mu\text{l}$ de agua estéril.

El rendimiento medio obtenido por este procedimiento fue de $20\mu\text{g}$ de DNA puro.

3.4.1.3. Método rápido de preparaciones a pequeña escala.

Se utilizó el método de lisis por calor para comprobaciones rápidas. Se centrifugaron 1,5ml de cultivo del día anterior en un tubo *eppendorf* a 8000r.p.m durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se añadieron $350\mu\text{l}$ de tampón STET (sacarosa 8%, Tris-HCl 0,01M, EDTA 0,05M, tritón 0,5%, pH 8) al precipitado de células. Se agitó en *vortex* durante uno o dos minutos y se le añadió $20\mu\text{l}$ de lisozima 10mg/ml, volviéndose a agitar durante otros 30s. Se hirvió la mezcla durante 40s y se centrifugó a 13000r.p.m. durante 10min. El precipitado mucoso obtenido se retiró del fondo del tubo utilizando un palillo estéril. Se precipitó el sobrenadante con un volumen de isopropanol y un décimo del volumen de acetato sódico 3M pH 5. Se centrifugó a 13000r.p.m. durante 5min y se lavó el precipitado de DNA con etanol al 70%. Se secó al vacío y se resuspendió en $20\mu\text{l}$ de $\text{I}\times\text{TE}$.

El rendimiento fue similar al de las preparaciones mediante el método de

lisis alcalina. Este método se utilizó sólo cuando se usaron células de líneas portadoras de la mutación *endA1* (Holmes y Quigley, 1981).

3.4.1.4. Preparación de DNA plasmídico ultrapuro.

La técnica de purificación de DNA plasmídico mediante gradientes de cloruro de cesio y bromuro de etidio, si bien es laboriosa, tiene la ventaja de producir DNA plasmídico de un alto grado de pureza. Este DNA se empleó para secuenciar y para el rescate de bandas de DNA de tamaño menor de 300pb de geles de agarosa y de poliacrilamida no desnaturalizantes.

Partiendo de un cultivo de 25ml en medio LBA de las bacterias portadoras del plásmido a purificar, se inoculó un litro de medio mínimo M9. Tras media hora de agitación a 37°C, se añadieron 10ml de una disolución 5mg/ml de ampicilina y una hora mas tarde 5ml de una disolución 10mg/ml de Uridina. Los cultivos crecieron hasta alcanzar una A_{550} comprendida entre 0,5 y 0,7. Llegados a este punto se añadieron 5ml de una disolución de 34mg/ml (en etanol al 95%) de cloranfenicol y se continuó el cultivo durante toda la noche.

Las células se recogieron por centrifugación a 5000r.p.m. durante 5min y a una temperatura de 4°C. El botón celular se lavó dos veces en 100ml de tampón 1xTE. Posteriormente las células se resuspendieron en 13 ml de la disolución Tris-sacarosa(sacarosa 25%, Tris 0,05M, pH 8) pasándolas a un tubo de policarbonato de ultracentrífuga y se añadieron 2ml de una disolución 10mg/ml de lisozima; tras mezclar suavemente, las muestras se incubaron en hielo durante 10min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 0,35ml de EDTA 0,5M que fueron mezclados con suavidad y se procedió a una segunda incubación de 10min en hielo; seguidamente se añadieron 7ml de tampón TX-100 (Tris-HCl 0,05M pH 8, Tritón X-100 0,1%) y se agitó por inversión hasta la observación de un aumento en la viscosidad. Tras otra incubación de 15min en hielo, las muestras se centrifugaron a 30.000r.p.m. durante 90min y a 4°C en una ultracentrífuga *Beckman* en un rotor de ángulo fijo VTi-70.

Al sobrenadante recogido se le añadió 1ml de sarcosil (N-laurilsarcosina) al 10% (p/v) agitándose y 1g de CICs y 0,06ml de una disolución 10mg/ml bromuro de etidio por ml de sobrenadante; generalmente se ajustó el volumen a 23ml (con tampón 1xTE) y se añadieron 1,38ml de bromuro de etidio y 23g de CsCl. Las muestras se centrifugaron en tubos *Quick-seal* de 30 ml, completando el volumen del tubo con aceite mineral, en un rotor VTi-50 (*Beckman*) a 40.000r.p.m. durante un tiempo superior a 16h a 10°C. En el gradiente formado aparecen una o dos bandas visibles a la luz UV, siendo la inferior (generalmente más gruesa y nítida) la que contiene el plásmido en forma circular y sin mellas, se pinchó con una aguja hipodérmica y se aspiró con ayuda de una jeringuilla. Se hizo una segunda centrifugación en tubos *Quick-seal* de 5 ml durante toda la noche en un rotor VTi-65 (*Beckman*) a 50.000 rpm y a una temperatura de 10°C. Se aisló la banda fluorescente conteniendo el plásmido y se procedió a la eliminación del bromuro de etidio mediante lavados con igual volumen de isopropanol, eliminándose la fase del alcohol (fase superior) que iba arrastrando el bromuro de etidio hasta que se observó la fase inferior transparente.

Tras dializar durante toda la noche frente a 500ml de tampón 1xTE en cámara fría, el DNA se dejó precipitar a -20°C varias horas en doble volumen de etanol al 95%, añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3M pH 5. Posteriormente se centrifugó a 12.000r.p.m. 10-15min y se lavó dos veces el sedimento con etanol al 70%. Una vez secado al vacío se resuspendió en 500 μ l de tampón 1xTE y se determinó la concentración de plásmido por espectrofotometría, obteniéndose, por término medio, 1 μ g/ μ l de DNA puro.

3.4.2. Obtención de DNA genómico de *Kluyveromyces lactis*.

Se empleó el método según se describe. Se partió de cultivos de 100ml una vez alcanzada la fase estacionaria, las células se centrifugaron a 5.000r.p.m. durante 3min y se lavaron con 10ml de la disolución I (sorbitol 1M, EDTA 0,1M) tras lo cual, se resuspendieron en 10 ml de disolución II de extracción (sorbitol 0,9M, EDTA 50mM, NaH₂PO₄ 50mM pH 7,5, β-mercaptoetanol 14mM). La mezcla se pasó a tubos *corex*, se añadieron 0,5ml de liticasa, previamente disuelta a una concentración de 5g/ml en agua y se agitó suavemente durante 30min a 30°C. Tras este período de incubación, se añadió SDS hasta una concentración final del 1% y se mezcló suavemente. Se incubó durante 20min a 60°C sin agitación. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente, se hicieron una o varias extracciones con 1,5 volúmenes de PCIA saturado con tampón 1xTE, agitando suavemente, para evitar que se produjesen roturas en el DNA. Las fases se separaron por centrifugación a 5.000r.p.m. durante 10min, hasta conseguir una fase acuosa lo más limpia de proteínas posible. Para completar la extracción de proteínas, la fase acuosa se incubó durante 2-4h en hielo con acetato potásico 5M (pH4,8) en una proporción 1:5 y se centrifugó 15min a 10.000r.p.m. Se recuperó 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 ovillo típico de DNA y se centrifugó durante 5min a 5.000r.p.m. Una vez precipitado, el DNA se lavó una o dos veces con etanol al 70% para eliminar restos de sales y se secó a vacío durante unos 5min para resuspenderlo en 1xTE.

3.4.3. Obtención de RNA total de levaduras.

La extracción de RNA total se realizó según el método de Zitomer y Hall (1976). El agua con la que se prepararon las disoluciones empleadas se trató previamente con dietil-pirocarbonato (DEPC) al 0,1% como describen Sambrook y col.(1989). Los cultivos de levaduras se realizaron en medio YP con la fuente de carbono deseada hasta que alcanzaron una A_{600} comprendida entre 0,5 y 0,9 y se pararon incubándolos en hielo hasta que la boca del matraz estuviese fría.

A partir de este momento se trabajó con guantes y con el material frío. Las células se precipitaron y lavaron una vez con tampón 1xRE (Tris 0,1M, LiCl 0,1M, EDTA 0,1mM, β -mercaptoetanol 10mM, pH 7,4). En este punto se conservaron las células a -20°C hasta el día siguiente o a -70°C durante más tiempo, o bien se continuó el proceso con las células frescas. Se resuspendieron en 1,5ml de 1xRE para la disrupción celular con perlas de vidrio de 2-4mm, en 9-10 pulsos de 20s de agitación en *vortex* que se alternaron con incubaciones en hielo. A continuación se añadieron 2ml de 1xRE con SDS1% y se realizaron extracciones con PCIA, equilibrado con tampón 1xRE, hasta obtener una fase acuosa clara que se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol al 95% y 1/10 de acetato sódico 3M pH 5. Las muestras precipitadas se lavaron dos veces en etanol al 70% y una vez secas se resuspendieron en agua bidestilada estéril y tratada con DEPC.

Se midió la concentración del RNA obtenido mediante espectrofotometría y se conservó congelado a -80°C en alícuotas hasta su uso.

3.4.4. Medida de la concentración de ácidos nucleicos.

Se midió en un espectrofotómetro *Cary* (*Varian*) la A_{260} de una disolución de las preparaciones de DNA ($5\mu\text{l}$ en 1ml de tampón 1xTE o agua), de RNA o de *ssDNA* ($4\mu\text{l}$ en 1ml) y de oligonucleótidos ($2\mu\text{l}$ en 1ml). La concentración se calculó sabiendo que una unidad de A_{260} es equivalente a una concentración de

DNA de 50 μ g/ml, de RNA o *ssDNA* de 40 μ g/ml y de oligonucleótidos de 20 μ g/ml. La pureza de la preparación se estimó mediante la relación A_{260}/A_{280} , siendo el valor óptimo de 1,8 para el DNA y de 2 para el RNA.

3.4.5. Composición de algunas disoluciones descritas en varias técnicas.

PCIA (Fenol: cloroformo:alcohol isoamílico)

| | |
|-------|--------------------|
| 24 ml | Fenol |
| 24 ml | Cloroformo |
| 1 ml | Alcohol isoamílico |

Se mezclaron un volumen de fenol fundido a 65°C con un volumen de cloroformo y con dos volúmenes de tampón 1xTE o 1xRE para equilibrar el pH. Se agitó vigorosamente durante varios minutos, tras los cuales se dejó la mezcla a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se separó completamente la fase acuosa que se retiró por aspiración. Se repitió este proceso dos o tres veces. Tras el último equilibrado se añadieron 1/25 volúmenes (8ml) de alcohol isoamílico a la mezcla. Se conservó en oscuridad a 4 °C.

CIA (Cloroformo-alcohol isoamílico):

| | |
|-------|--------------------|
| 24 ml | Cloroformo |
| 1 ml | Alcohol isoamílico |

Tampón 1xTE

| | |
|------------------------------------|-------|
| Tris | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| Se ajustó el pH a 7,5 o 8 con HCl. | |

Disolución *stock* de RNAsa A

Se preparó una disolución de 5 mg/ml en agua estéril que se calentó a 100°C durante 10min para eliminar restos de DNAsas. Se dejó enfriar lentamente y se conservó congelada en alícuotas. La concentración utilizada más frecuentemente para eliminar restos de RNA de las preparaciones de DNA de las digestiones de restricción fue de 0,1 μ g/ml.

3.5. Métodos de transformación.

3.5.1. Transformación de *E. coli*

3.5.1.1. Método de transformación con cloruro cálcico (Cohen y col. 1972).

Preparación de células competentes.

Con este procedimiento se prepararon las células competentes de las líneas HB101, JM101 y JM109. Se partió de un cultivo de 100ml de YT inoculado con 1 ml de un cultivo fresco previo. Se dejó crecer hasta alcanzar una A_{550} de 0.6 (2-3 horas). Se recolectaron las células centrifugando a 5000r.p.m. durante 5min a 4°C. Se resuspendió en 50ml de NaCl 10mM frío. Se centrifugó a 5000r.p.m. durante 5min a 4°C y se resuspendió en 50ml de $CaCl_2$ 100mM frío. Se incubó 20min en hielo. Se centrifugaron a 5000r.p.m. durante 5min a 4°C. Las células se resuspendieron finalmente en 3 ml de $CaCl_2$ 100mM frío. Para conservar las células congeladas a -80°C se añadió igual volumen de una disolución de $CaCl_2$ 100mM al 30% de glicerol y se repartieron en alícuotas.

Transformación.

Se añadieron 400 μ l de $CaCl_2$ 100mM frío en un tubo *ependorf*. Se incubó en hielo durante unos minutos y se añadieron 100 μ l de células competentes recién descongeladas. Se añadió el DNA plasmídico y se incubó a 0°C durante 20min. Se dió un choque térmico incubando 2 min a 42°C. Se añadió 1ml de LB y se incubó 1h a 37°C. Se centrifugó a 5000r.p.m. y se retiró el sobrenadante y las células transformadas se sembraron extendiéndolas en placas LBA o LBA/X-Gal+IPTG.

3.5.1.2. Método de transformación con cloruro de rubidio (Kushner 1978).

Preparación de células competentes.

Se utilizó este protocolo para la línea DH5 α . La línea fue cultivada en 100ml de medio SOC hasta que alcanzó una A_{550} de 0,5, momento en el que se paró el crecimiento enfriando el matraz en hielo durante unos 10min. Las células

se centrifugaron a 4°C a 5000r.p.m. durante 5min. Al precipitado celular se le añadieron 30ml de tampón Tfb-1 (Rb Cl₂ 100mM, MnCl₂ 50mM, acetato potásico 30mM, CaCl₂ 10mM y glicerol 15%, pH5,8) en frío. Se volvió a centrifugar y se resuspendieron las células en 4ml de tampón Tfb-2 (MOPS 10mM pH7, RbCl₂ 10mM, CaCl₂ 75mM y glicerol15%) y se repartieron en alícuotas para congelarlas a -80°C.

Transformación.

Se descongeló una alícuota de 100µl de células competentes y se añadió el DNA plasmídico. Se incubó 20min en hielo y se dió un choque térmico a 42°C durante 90s. A continuación, se añadieron 400µl de medio LB y se incubó durante 45-60min a 37°C. Las células transformadas se centrifugaron a 3000r.p.m. y se sembraron en placas LBA o LBA/X-Gal+IPTG.

3.5.2. Transformación de levaduras por el método de Klebe (Klebe 1983).

Para la transformación de levaduras se utilizó el método de Klebe y col. (1983). Se partió de 10ml de células de levadura de un cultivo a una A₆₀₀ de aproximadamente 0,7. Se centrifugaron a 3500r.p.m. y se lavaron con 5ml de la disolución A (sorbitol 1M, bicina 10mM, etilén glicol 3%, KCl 1,25M y CaCl₂ 30mM pH8,35) y se añadió un 5% de dimetil-sulfósido (DMSO) después de esterilizar. Las células se resuspendieron en 0,2ml de esta solución y a continuación se congelaron en nieve carbónica (10-15min). En ese tiempo se les añadió el DNA plasmídico transformante en un volumen de 20µl; posteriormente se sometieron 5min a un choque térmico a 37°C con agitación fuerte en un baño de agua. Tras añadir 1,5ml de solución B (PEG1000 40%, bicina 200mM pH8,35) se incubó a 30°C durante 1h; transcurrido ese tiempo se centrifugaron y lavaron en 1,5ml de solución C (NaCl 0,15 M, bicina 10mM pH8,35). Las células se sembraron en placas CM con el contenido en aminoácidos correspondiente, según la auxotrofía.

3.6. Modificación enzimática del DNA.

3.6.1. Digestion con endonucleasas de restricción.

El DNA se digirió con enzimas de restricción de *Boehringer-Manheim*. Para cada enzima se emplearon las condiciones recomendadas. El tiempo de digestión fue de 1-4 horas.

3.6.2. Digestión con nucleasas *ExoIII* para generar deleciones (sistema *Erase a base*[®] de *Promega*).

La nucleasa *ExoIII* digiere específicamente DNA de extremos romos y 5' protuberantes, pero no extremos 3' protuberantes ni extremos romos modificados con nucleótidos α -fosforotioato. Este sistema se utilizó para generar deleciones unidireccionales de distintos tamaños que fueron empleadas en la secuenciación.

Se digirió el DNA plasmídico con dos enzimas de restricción del *MCS*, una que dejaba extremos 5' protuberantes o romos sobre la que actuaría *ExoIII* y otra que dejaba extremos 3' protuberantes protegiendo el extremo que no se quería delectar. Se purificó el DNA y se digirió con *ExoIII* a 22°C tomando alícuotas cada 20s que a su vez se trataron con nucleasa *S1*. La nucleasa *S1* digiere específicamente DNA monocatenario de manera que elimina las posibles colas que pueda producir *ExoIII*. Posteriormente se paró la reacción con EDTA a una concentración 5mM, se rellenaron los extremos protuberantes con el fragmento *Klenow* de la DNA-polimerasa, incubando en presencia de la enzima a 37°C 30min y a continuación se añadieron tampón de ligamiento y DNA ligasa de T4. Se incubó 2h a temperatura ambiente, se transformaron células bacterianas según se ha descrito anteriormente y se analizaron los clones obtenidos.

3.6.3. Digestión con nucleasa *Bal31* para generar deleciones internas.

Se usó la nucleasa *Bal31* de *Boehringer-Mannheim* con un tampón de incubación compuesto por Tris-HCl 20mM, NaCl 600mM, MgCl₂ 12,5mM,

EDTA 1mM a pH7,2. Debido a su actividad como exonucleasa 3'→5' en el DNA de doble hebra y su actividad exonucleasa 5'→3' en el DNA monohebra, cuando actúa sobre DNA en forma lineal lo va digiriendo por los dos extremos de manera que se generan deleciones bidireccionales. Esta propiedad se aplicó para generar deleciones internas en el promotor del gen *KICYC1*.

Se añadieron 0,5 unidades para aproximadamente 5µg de DNA previamente digerido con el enzima de restricción *PstI* y purificado. Se incubó a 30°C y se tomaron alícuotas de la reacción cada minuto, parando la reacción mediante la extracción del enzima con fenol. Se precipitó con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 volumen de acetato sódico 3M, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en tampón 1xTE. Posteriormente se purificaron las bandas correspondientes a las distintas alícuotas de un gel de agarosa, en el cual se comprobaba simultáneamente la extensión de la deleción del fragmento. El DNA así obtenido se trató con DNA-polimerasa de T4 para rellenar los extremos protuberantes que se hubieran originado y se hizo una reacción de ligamiento en presencia del adaptador *PstI*. Finalmente se transformaron células de *E. coli* y se analizaron los distintos clones obtenidos.

3.6.4. Utilización de polimerasas.

DNA polimerasa de T4: (*Boehringer Mannheim*) se usó, tanto para rellenar extremos protuberantes 5' como para eliminar extremos protuberantes 3', en la construcción de plásmidos recombinantes y para la síntesis de la segunda hebra del fago en la mutagénesis dirigida. La adición de la proteína *T4-gene-32* se recomienda en la mutagénesis porque estimula la síntesis de DNA *in vitro* y estabiliza regiones de DNA monohebra favoreciendo la replicación.

Fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (*Boehringer Mannheim*): tiene actividad polimerasa 5'→3', actividad exonucleasa 3'→5' y carece de actividad exonucleasa 5'→3' igual que la DNA-polimerasa de T4. Se

empleó para el marcaje mediante digoxigenina y para el marcaje isotópico de sondas tanto por anillamiento al azar o *random primed* (en las sondas utilizadas en *Northern blots*) como por marcaje terminal 3' (en las sondas utilizadas en las reacciones de unión DNA-proteína).

DNA polimerasa de bacteriófago T7: se utilizó una forma obtenida por manipulación genética *in vitro*, la *SequenaseTM version 2.0*. Esta polimerasa carece completamente de actividad exonucleasa 3'→5' y posee baja actividad exonucleasa 5'→3', lo que la hace adecuada para la secuenciación del DNA.

DNA Polimerasa de *Taq*: (Boehringer Mannheim)

Se aisló originalmente de *Thermus aquaticus*. Tiene una actividad polimerasa 5'→3' muy alta y carece de actividad exonucleasa 5'→3'. Esta polimerasa es estable en incubaciones prolongadas a elevadas temperatura y puede por tanto, ser empleada para amplificar fragmentos de DNA mediante reacciones en cadena de la polimeras (PCR).

Reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Se amplificaron mediante esta técnica 9 fragmentos de diferentes tamaños del promotor del gen utilizando oligonucleótidos o cebadores diseñados para crear un sitio 5' *EcoRI* y un sitio 3' *HindIII* (Tabla I).

Los reactivos utilizados y las condiciones en las que se desarrollaron las diferentes reacciones fueron:

- Polimerasa de *Taq* (5 U/ μ l) y Tampón 10X (Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM, pH 8,3) de la casa comercial *Boehringer-Mannheim*.
- dNTPs de la casa comercial *Boehringer-Mannheim* a una concentración de partida de 100 mM que se diluyeron a una concentración de 2,5mM.
- cebadores de la casa comercial *Pharmacia* a una concentración de entre 1,3 y 1,4 mg/ml que se diluyeron hasta una concentración de 2 μ M.

- como DNA molde se utilizó un fragmento lineal *AccI*-*AccI* de unas 1581 pb del promotor rescatado a partir del plásmido pCAF11 digerido con *AccI*. Se hicieron tres diluciones a partir de una concentración de aproximadamente de 5ng/ μ l (1:10, 1:100 y 1:1000) y de ellas se utilizó la dilución 1:1000 tras una primera comprobación de la eficacia de la amplificación.
- la reacción se desarrolló a una concentración 1x del tampón, 0,25mM de dNTPs, 0,2 μ M de los cebadores 1 y 2, y 0,65 U de enzima *Taq*.
- se desnaturalizó el DNA molde antes de añadir la *Taq* incubando durante 10min a 95°C.
- se añadió rápidamente la DNA-polimerasa de *Taq* y se inició una serie de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1min de anillamiento a 57°C y 2min de extensión a 70°C.
- para la amplificación de los fragmentos du14 (cebadores d14 y d18) y du17 (cebadores d17 y d18) se aumentó el número de ciclos a 45.

Tabla I. Cebadores utilizados para la amplificación por PCR de diferentes fragmentos de la región promotora. La secuencia en minúsculas corresponde a los sitios de restricción añadidos.

| Cebador | Posición | Secuencia | %GC | T _m |
|---------|----------|---------------------------------|------|----------------|
| d9 | -780 | 5'-ttaggatccAGCACTGAACACAC-3' | 53 | 40 |
| d10 | -687 | 5'-ttaggatccCGAAGAGCACACC-3' | 61 | 42 |
| d11 | -596 | 5'-ttaggatccCAGATAATATGAGCG-3' | 40 | 42 |
| d12 | -475 | 5'-ttaggatccTACATCAGCCAACC-3' | 50 | 38 |
| d13 | -413 | 5'-ttaggatccGCTTTTCCCCACG-3' | 61 | 42 |
| d14 | -338 | 5'-ttaggatccGTCTCAGAGGCTTC-3' | 57 | 36 |
| d15 | -280 | 5'-ttaggatccGATAGACTTGTTC-3' | 35 | 42 |
| d16 | -211 | 5'-ttaggatccGTATGGCACTATG-3' | 50 | 36 |
| d17 | -140 | 5'-ttaggatccGTTTCTTTAGCAAGTC-3' | 37,5 | 44 |
| d18 | -8(-) | 5'-tataagcttgCTGGCATTATGACTT-3' | 40 | 38 |

%GC: contenido en G y C en porcentaje

T_m: Temperatura de *melting* calculada según 2°C(A+T)+4°C(G+C)

(-): hebra 3'→5' o hebra de Crick

3.6.5. Reacciones de ligamiento.

Se empleó la DNA ligasa de T4 de *Boehringer Mannheim* con el tampón suministrado con el enzima. Los ligamientos se realizaron en un volumen de 10 μ l añadiendo un volumen variable de DNA (generalmente una proporción 1:10 de vector e inserto a clonar) y .1U de ligasa. Se incubó 2-4 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C cuando el ligamiento era de extremos cohesivos. Cuando el ligamiento era de extremos romos se incubó a 18-22°C toda la noche y los vectores se trataron con fosfatasa alcalina de *Boehringer Mannheim* para eliminar el fosfato del extremo 5' del DNA y así favorecer el ligamiento con el inserto. En las reacciones en presencia de adaptadores sintéticos (oligonucleótidos con la secuencia de un determinado enzima de restricción) éstos habían sido previamente fosforilados con el enzima polinucleótido quinasa de *Boehringer Mannheim*.

3.7. Técnicas de electroforesis.

Se emplearon como método de separación de las moléculas de DNA en función de su carga eléctrica y su peso molecular a través del tamiz que constituyen las moléculas entrelazadas de los geles.

3.7.1. Geles de agarosa.

La agarosa en disolución acuosa, fundida y posteriormente enfriada genera un gel. Los geles de agarosa permiten un rango de separación en función de su concentración y del tamaño molecular de los fragmentos a separar (Sambrook y col., 1989).

Geles de agarosa no desnaturalizantes

Se prepararon con agarosa entre un 0,7 y 2% en tampón 1xTAE (el mismo utilizado para la electroforesis).

Para determinar el peso molecular de los distintos fragmentos, se hicieron migrar diferentes marcadores de peso molecular al mismo tiempo que las muestras a 50-120V, según el tamaño y la concentración del gel. El tiempo de migración fue determinado en función de la separación de los colorantes del azul de carga.

Tampón 1xTAE:

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

Azul de carga:

| | |
|-------|----------------------------|
| 3 ml | Glicerol (30%) |
| 25 mg | Azul de bromofenol (0,25%) |
| 25 mg | Xilen-cianol (0,25%) |
| 7 ml | Agua destilada |

Purificación de fragmentos a partir de geles de agarosa

Se utilizó el *Kit Gene Clean[®] BIO-101 Inc* para el aislamiento de fragmentos de DNA, de un tamaño de hasta 300 pb, a partir de muestras separadas por electroforesis en geles de agarosa (0,7-2%) con objeto de utilizarlos posteriormente como sondas, o bien para su posterior clonación en vectores. El rendimiento estimado de recuperación es de aproximadamente un 80%.

Geles de agarosa-formaldehído desnaturalizantes

Se utilizaron para la separación de RNA a una concentración de agarosa del 1,5% en tampón 1xMOPS (el mismo utilizado para la electroforesis). Una vez disuelta la agarosa, se dejó enfriar hasta unos 65°C. Alcanzada esa temperatura, se le añadió un 6% de formaldehído (agente desnaturalizante) y se vertió inmediatamente.

Las muestras de RNA, 20-50µg en 10µl de H₂O tratada y 20µl de tampón de desnaturalización, se incubaron 5min a 65°C y se enfriaron rápidamente en

hielo hasta ser cargadas en el gel. Antes de cargar el gel se añadió 1,5 μ l de azul de carga a cada muestra.

Las electroforesis se realizaron a 4°C, generalmente a 100V durante dos a cuatro horas dependiendo de la separación observada en los azules de carga.

Tampón 20xMOPS

| | |
|---|-------|
| MOPS | 0,4 M |
| Acetato sódico | 0,1 M |
| EDTA | 20 mM |
| Preparado con agua tratada con DEPC, se ajustó el pH a 7 y se guardó a 4°C en oscuridad | |

10xAzul de carga

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

Tampón de desnaturalización

| | |
|-----------------------|--------|
| Formamida desionizada | 24 % |
| 20xMOPS | 10 % |
| Formaldehído | 8,9 % |
| Agua tratada | 57,1 % |

Tinción de los geles de agarosa

Los geles se tiñeron por inmersión en una disolución (tratada con DEPC para los geles de RNA) del agente intercalante bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/ml durante 5-15 min. Se lavaron con agua destilada y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

Fotografiado de los geles de agarosa

Los geles, expuestos a luz UV 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 15s. Se utilizó un filtro rojo Cokin[®] R2.

3.7.2. Geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se utilizaron para secuenciación, para los ensayos de unión DNA-proteína y para la visualización y/o aislamiento de fragmentos de DNA de menos de 500 pb. Los geles se prepararon a concentraciones de poliacrilamida entre un 4 y un 7%.

Visualización de los geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida no desnaturalizantes se tiñeron con bromuro de etidio o bien se utilizó la tinción de plata. Para este último procedimiento se sumergieron los geles en 200ml de una disolución al 0,1% de ácido acético y 10% de etanol durante 30min con agitación. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con agua destilada y se incubaron otros 30min en AgNO_3 al 0,1%. Se lavaron de nuevo varias veces con agua destilada y se cubrieron con una disolución al 1,5% de NaOH y 0,18% de formaldehído hasta que aparecieron las bandas. En ese momento, se paró la reacción con varios lavados de agua y los geles se secaron en un desecador de geles al vacío durante media hora.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de acrilamida.

Una vez escindida la banda conteniendo el fragmento de DNA de nuestro interés, se procedió a deshacer la poliacrilamida mecánicamente, presionándola con una punta de pipeta dentro de un tubo *eppendorf*. Tras lo cual se añadieron 500 μl de 1xTE y se incubaron los tubos con agitación a 37° C durante 2-3 horas. Se centrifugó a 13.000r.p.m. durante 10min rescatándose la fase superior, con el DNA disuelto en el tampón, que queda separada de la acrilamida. Se añadió un volumen igual al retirado, se agitó y se repitió la centrifugación para una mejor recuperación del DNA disuelto. Posteriormente se hizo una extracción con PCIA, seguida de una precipitación con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 de acetato sódico 3M pH 5. Las muestras se resuspendieron en el volumen deseado de agua bidestilada estéril o tampón 1xTE.

Geles de secuenciación.

Se prepararon al 7% a partir de una disolución *stock* que se conserva en oscuridad a 4°C y cuya composición se indica a continuación:

Mezcla para geles al 7%:

| | <u>para 500 ml</u> |
|-------------------|--------------------|
| Urea | 210 g |
| Acrilamida al 45% | 78,1 ml |
| 10xTBE | 50 ml |

Disolución de Acrilamida al 45%:

| | <u>para 500 ml</u> |
|----------------|--------------------|
| Acrilamida | 217,5 g |
| Bis-acrilamida | 7,5 g |

10xTBE

| | <u>para 500 ml</u> |
|----------------------|--------------------|
| Tris (900mM) | 54 g |
| Ácido bórico (900mM) | 27,5 g |
| EDTA (40mM) | 7,4 g |

Se tomaron 70ml de mezcla para geles al 7% y se añadieron 250 µl de APS 10% y 50 µl de TEMED, se mezcló todo bien y se inyectó en un molde constituido por dos cristales con una separación de 0,4mm. Uno de los cristales del molde se siliconizó previamente con una disolución al 5% de dicloro-dimetil-silano en cloroformo. Una vez polimerizado el gel, se procedió a la electroforesis vertical en tampón 1xTBE. Antes de cargar las muestras se esperó que el gel alcanzara una temperatura entre 50 y 55°C aplicando un voltaje de unos 1800-2000V. Después de cargar las muestras la electroforesis se mantuvo a una potencia de 90W durante un tiempo variable durante el cual se hicieron dos o tres cargas (de 2 a 8h), dependiendo de la extensión que se quería secuenciar.

Tras finalizar la electroforesis se separó uno de los cristales y el gel pegado al otro cristal se bañó con una disolución de ácido acético al 5% para quitar el exceso de urea y luego se adhirió a un papel de filtro grueso y se secó en un desecador de geles al vacío durante 1h.

Geles de poliacrilamida al 4% para ensayos de retardación.

| | |
|-------------------|-------------------|
| | <u>para 50 ml</u> |
| Acrilamida al 45% | 4,4 ml |
| 10xTBE | 5 ml |

Se añadieron 350 μ l de APS 10% y 50 μ l de TEMED antes de inyectar el gel en un soporte de un grosor de 1mm y unas dimensiones de 15x15cm. A fin de visualizar el frente de corrido las muestras se cargaron con 1,5 μ l de una disolución de azul de bromofenol al 0,25%. La electroforesis vertical se realizó en tampón 1xTBE (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 4mM, pH 8,3) a 25mA durante 2-3 horas (hasta que el azul de bromofenol alcanzaba el borde extremo del gel). Se separaron los cristales y el gel se adhirió a un papel de filtro para ser secado en un desecador de geles al vacío durante media hora.

Autorradiografías de los geles de secuenciación y de unión DNA-proteína.

Los geles de secuenciación y de unión DNA-proteína se visualizaron tras exponer los geles secos a películas de rayos X *Agfa Curix* en carcasas con pantalla amplificadora durante un tiempo estimado en relación a la señal detectada con el contador *Geiger* (16h normalmente) y revelarlos. Las autorradiografías obtenidas se fotografiaron con película *Kodalith Ortho Film 6556* de *Kodak*, con una exposición de 1s y apertura de diafragma 11.

3.8. Método de secuenciación de sanger (Sanger y col. 1977).

Se emplearon el *Kit Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing* y los nucleótidos marcados α -³²P-dATP o α -³⁵S-dATP (de *Amersham LIFE SCIENCE, Inc.*) para la secuenciación del clon de 1434 pb de pART5, así como para la comprobación de diferentes construcciones plasmídicas realizadas. El DNA molde se preparó a partir de DNA plasmídico bicatenario mediante una desnaturalización alcalina o bien se utilizó *ssDNA* obtenido a partir del vector M13mp18 y de sus clones derivados. Se siguió el procedimiento recomendado en el *Kit* para realizar las reacciones de secuenciación. Posteriormente se desnaturalizaron las muestras por calor (2min a 75°C) y se cargaron en geles de poliacrilamida en una célula de secuenciación de *Biorad*.

3.9. Técnicas de hibridación.

3.9.1. Southern Blot (Southern, 1975).

El DNA digerido se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. La transferencia del DNA a las membranas *nytran NY-13* de porosidad 0,45 μ m (Scheider and Schuell) se realizó mediante el sistema *VacuGene* de *Pharmacia*, a 50mBa durante 2 min con solución de desnaturalización (NaOH 0,4M, NaCl 1,5M) y unos 20-30min con solución de neutralización (Tris-ClH 0,5M, pH7,8, NaCl 1,5M). Una vez transferido el DNA a membranas, éste se fijó mediante luz UV durante 3-5min. Las membranas se guardaron en bolsas de plástico selladas.

El marcaje de la sonda y la hibridación de la membrana se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones para *Southern blots* del *Digoxigenin DNA Labeling and Detection Kit* de la casa comercial *Boehringer Mannheim*.

3.9.2. Northern Blot con digoxigenina y radiactivo.

Para los experimentos de *Northern* (Alwine y col., 1977) los marcajes de las sondas y la hibridación se realizaron mediante incorporación de digoxigenina o P^{32} .

Después de la electroforesis en geles de formaldehído, tras fotografiar el RNA ribosómico, se hizo una transferencia a membranas *nytran NY-13* de *Scheider&Schuell* (para los *Northern* con digoxigenina) o bien a membranas de *nylon* con cargas positivas de *Boehringer Mannheim* (para los *Northern* radiactivos), mediante el sistema *VacuGene* de *Pharmacia*, a 50 mBa durante 1h, utilizando como tampón de transferencia 10xSSC. El RNA se fijó durante 3min por exposición a la luz UV.

Northern mediante marcaje con digoxigenina.

El marcaje de la sonda y la hibridación de la membrana se realizó según las recomendaciones para *Northern* descritas en el manual acerca del marcaje con digoxigenina *Genius System User's Guide* de *Boehringer Mannheim* (Cat.Nº101023).

Northern mediante marcaje isotópico.

El marcaje de la sonda se realizó mediante cebadores aleatorios, (*random primed*), utilizando el *Kit Prime a Gene® Labelling System* (*Promega*) basado en la técnica descrita por Feinberg y Vogelstein (1983). La sonda marcada se purificó del isótopo no incorporado mediante cromatografía en columnas de *Sephadex-G50* como se explica en el apartado de reacciones de unión DNA-proteína. La fracción que contenía la sonda marcada se utilizó directamente previa desnaturalización incubando a 100°C durante 5min y enfriamiento en hielo otros 5min.

Los filtros con el RNA se prehibridaron en botellas durante 1h a 65°C en un horno de hibridación (*Minihybridisation oven* de *Appligene*) con 50ml de disolución de hibridación (Na_2HPO_4 0,5M pH 7,2, SDS 7%, EDTA 1mM).

Transcurrido ese tiempo, se retiró parte de la solución de hibridación, dejando unos 5-10ml a los que se les añadió la sonda desnaturalizada. Se incubó toda la noche a 65°C.

Tras retirar la disolución de hibridación, se hicieron una serie de lavados para eliminar los restos de sonda no unida a la membrana. Se hizo un primer lavado de 1min a 65°C con 10ml de tampón 2xSSC, un segundo lavado de 5min a 65°C con 20ml de una disolución 2xSSC y SDS 0,1% y un último lavado a temperatura ambiente 5min con la disolución anterior. La membrana se expuso a una película de rayos X y se reveló posteriormente.

20xSSC

| | |
|--|--------------------|
| | <u>para 500 ml</u> |
| ClNa 3M | 88 g |
| Citrato sódico 0,3M | 44 g |
| Preparada con agua tratada con DEPC, esterilizada y conservada a temperatura ambiente. | |

3.10. Ensayos β -galactosidasa.

En este trabajo se obtuvieron fusiones del promotor del gen *KICYC1* incluyendo el codón de inicio de la traducción ATG con la secuencia codificadora del gen *lacZ* de *Escherichia coli* en el vector pXW3. Como sustrato cromogénico para la β -galactosidasa se empleó ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido).

En los primeros ensayos realizados se empleó un método de permeabilización de las células basado en el de Guarente (1983) y posteriormente para los ensayos de las delecciones el método descrito por Mount y col. (1996) en el que se utilizan extractos proteicos. Estos métodos se describen a continuación.

3.10.1. Permeabilización de células.

Se inoculó un cultivo de 2-3 ml de medio en CM-Ura (o el medio selectivo adecuado) con la línea de levadura transformada con el plásmido portador de la fusión *lacZ*. Al día siguiente se inoculó de nuevo en proporción 1:100 en medio rico YPD-4% y YPG-2% y se dejaron crecer las células hasta una A_{600} entre 0,7 y 1. Se tomaron 10 ml, se centrifugaron y se lavaron una vez con tampón Z (Na_2HPO_4 100mM, NaH_2PO_4 40mM, KCl 10mM, MgSO_4 1,6mM y 2,7ml de β -mercaptoetanol por litro de disolución, pH 7) resuspendiéndose posteriormente en 2ml del mismo. Se añadieron 3 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS 0,1% con una pipeta *pasteur*. Se agitó fuertemente en *vortex* durante 15s y se incubó a 30°C durante unos 10min. Se añadieron 400 μ l de sustrato ONPG 4mg/ml a cada extracto. Se dejó pasar el tiempo de reacción adecuado hasta la aparición de un color amarillo pálido. Se tomaron dos muestras de 1ml a tiempos diferentes, parándose la reacción con 0,5ml de Na_2CO_3 1M. Se centrifugaron las células y se midió la A_{420} del sobrenadante en el espectrofotómetro. Se calcularon las unidades de actividad normalizando la medida con el valor de la A_{600} , el volumen del cultivo, y el tiempo de la reacción, según la siguiente fórmula:

$$A.E. = \frac{A_{420} \times 1000}{A_{600} \times \text{tiempo} \times \text{volumen}}$$

Puesto que Miller describió por primera vez un ensayo de actividad β -galactosidasa utilizando como sustrato ONPG (Miller 1972), a las unidades *arbitrarias* que se obtienen según la relación anterior se las denomina unidades Miller.

3.10.2. Obtención de extractos crudos y normalización de la actividad respecto a la concentración de proteína obtenida.

Condiciones de los cultivos

Las condiciones en las que se realizó el cultivo que se iba a tomar como preinóculo se basaron en la lectura del trabajo de Betina y col. (1995) quienes partían de un cultivo de 5 ml iniciado con un *pool* de cinco colonias. En este trabajo se modificaron estas condiciones y se iniciaron pre-cultivos con 750 μ l de medio selectivo CM-Ura, inoculados con cinco colonias transformantes seleccionados al azar y que se dejaron crecer hasta la fase estacionaria. Se congelaron en glicerol al 50% a -80°C hasta hacer el inóculo de los cultivos de medida. En ese momento se descongelaron las muestras y se inocularon, en una proporción 1:1000, en 15ml de medio selectivo CM-Ura. Se dejó crecer toda la noche, y al día siguiente, se empezó la extracción de proteínas una vez que el cultivo había alcanzado una A_{600} entre 0,7 y 1. Se hicieron por lo menos tres ensayos de cada tipo de deleción, de manera que cada resultado representa un promedio de la actividad de al menos 15 colonias.

Obtención de extractos de proteína soluble (Mount y col., 1996)

Se precipitaron 10 ml de cultivo a una A_{600} entre 0,7 y 1 (en la mitad aproximadamente de la fase logarítmica) y se lavaron con 2 ml de tampón Z frío. Tras lavar las células en tampón Z se congeló el sedimento a -80 °C, de manera que la extracción de proteínas se hiciese al mismo tiempo y en unas condiciones similares en cada grupo de deleciones estudiado. Previamente se comprobó que la congelación no afectaba a la actividad observada. Las células se descongelaron lentamente en hielo y se resuspendieron en 0,25ml de tampón Z frío. Se añadieron 0,5g de perlas de vidrio de 0,4-0,5 mm, y se hicieron 3 pulsos de 30s de agitación en *vortex* y 30s de incubación en hielo para la ruptura de las células. Se añadieron 0,75ml de tampón Z (cuando se partió de pocas células se omitió este paso) y se agitó 10s en *vortex*. Se centrifugó a 5.000r.p.m.

en un rotor de eje móvil durante 5min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se transfirió a un tubo *ependorf* y se conservó en hielo. Se cuantificó la concentración de proteína en los extractos mediante el método de Bradford (1976) utilizando como disolución patrón seroalbúmina bovina.

Ensayo β-galactosidasa (Mount y col., 1996).

Se hicieron dos reacciones para cada muestra de extracto. Una con 100μl de extracto y 900μl de tampón Z y otra con 50μl de extracto y 950μl de tampón. Se incubaron los tubos a 30°C y se añadió 200μl de ONPG 4mg/ml. Se agitó en vortex y rápidamente se incubó de nuevo a 30°C hasta que empezaba a aparecer el color amarillo. Se paró la reacción añadiéndole 400μl de una disolución de Na₂ CO₃ 1,25M. Se midió la A₄₂₀ de las muestras y se calculó la actividad enzimática (A.E.) mediante la fórmula:

$$A.E. = \frac{A_{420}}{\text{proteína} \times \text{tiempo} \times 0,0045}$$

donde A₄₂₀ es la absorbancia de la reacción a una longitud de onda de 420nm, proteína son los mg de proteína total empleada en el ensayo, tiempo los minutos transcurridos durante la reacción y 0,0045 es el coeficiente de extinción molar del ONPG en las condiciones ensayadas. Las unidades resultantes fueron por tanto, nmoles de ONPG/mg/min. El resultado de cada ensayo representaba la media de la A.E. observada de las dos reacciones realizadas.

Las medias y las desviaciones *standard* de las A.E. obtenidas para cada tipo de fusión promotor-*lacZ* se calcularon mediante el programa estadístico *StatGraphics Plus*.

3.11. Interacciones DNA-proteína.

3.11.1. Preparación de extractos de proteínas de levaduras.

Se empleó el método descrito originalmente por Zachariae y col. (1993) con algunas modificaciones. Se partió de 1 litro de medio rico de levaduras que había alcanzado una A_{600} próxima a 3. Las células se centrifugaron a 7.000r.p.m. a 4°C durante 10min y se lavaron una vez con agua destilada esteril fría y otra vez con el tampón TAMEG (TrisHCl 0,2M pH 7,8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3M, MgCl_2 10mM, EDTA 1mM, glicerol 10%) también previamente enfriado en hielo. Mientras se hicieron los lavados se traspasaron las células a tubos de polipropileno de 30ml. El sedimento se resuspendió en 1 ml por gramo de células obtenido del mismo tampón y se añadieron perlas de vidrio de 0,45-0,55mm hasta la mitad del volumen.

Se añadieron inhibidores de proteasas a las siguientes concentraciones finales: pepstatina 4 μ M, leupeptina 4 μ M, aprotinina 2 μ g/ml, β -mercaptoetanol 2 μ M y por último PMSF 0,1mM. Tras unos 10-15 pulsos de 20s de agitación en *vortex* y 20s en hielo, las muestras se centrifugaron en un rotor de ángulo fijo *Beckman* JA-20 durante 15min a 8.000r.p.m. Se pasó el sobrenadante, conteniendo el extracto crudo de proteínas a tubos de polialómero de 10ml y se completó el volumen del tubo con aceite mineral. Se centrifugó 90min a 40.000 r.p.m. en un rotor basculante *Beckman* SW40Ti a 4°C. Se recuperó el sobrenadante conteniendo la fracción *S-100* purificada y se congeló en alícuotas de 50 μ l utilizando nitrógeno líquido. Se conservaron a -80°C hasta su uso en los ensayos de unión DNA-proteína. La concentración de proteínas final se midió por el método de Bradford (1976), obteniéndose una concentración media de unos 15 mg/ml.

Preparación de extractos enriquecidos en Hap1p.

La síntesis de la proteína Hap1-p se indujo a partir del plásmido pYCYPI portador del gen *CYP1(HAP1)* con el promotor de *GAL10-CYC1* (Fytlovich y

col. 1993). Se cultivó la línea de *S. cerevisiae* Sc334 transformada con pYCYP1 en YPD-2% hasta una A_{600} de 2, se añadió al cultivo galactosa hasta una concentración de 2% y se incubó durante 4 horas más a 30°C. La A_{600} en el momento de parar el cultivo era de 2,5. Se siguió con el proceso de obtención de extractos de proteína explicado en el apartado anterior.

3.11.2. Reacciones de unión DNA-proteína *in vitro*

Marcaje de la sonda.

Se marcaron por término medio 0,6-1 μ g de DNA con 2,5 μ l de α -dATP³² y 1 μ l del fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa, incubándose 1h a 37°C en un volumen de reacción final de 50 μ l de tampón de unión DNA-proteína (KCl 0,625mM, Tris-HCl 0,275mM, MgCl₂ 15mM, DTT 2mM, dGTP 0,025mM, dCTP 0,025mM y dTTP 0,025mM). Se paró la reacción añadiendo 5 μ l de EDTA 0,25mM.

La sonda marcada se purificó mediante cromatografía en columnas de *Sephadex G50*. Para ello se prepararon columnas empaquetando la resina hidratada con tampón STE (Tris-HCl 10mM pH8, NaCl 100mM, EDTA 1mM) en pipetas *pasteur*. Se aplicó la mezcla de reacción a la parte superior de la columna y se añadieron 300 μ l de tampón STE, se deshechó el volumen saliente. Se añadieron otros 200 μ l de tampón STE y se recogió el volumen eluido en un tubo *ependorf*. Se repitió este último paso cinco veces y la radiactividad incorporada en las fracciones eluidas se midió con un contador de centelleo de partículas beta (*Wallac System 1410TM Liquid scintillation counter* de *Pharmacia*), correspondiendo el primer pico de aumento de radiactividad a la muestra que contenía la sonda marcada. La sonda se precipitó con dos volúmenes de etanol al 95% y 1/10 de acetato sódico 3M pH 5, incubándose toda la noche a -20°C y centrifugándose a 17.000r.p.m. durante media hora. Se lavó con etanol al 70% una vez y secó al vacío, resuspendose en un volumen apropiado para tener aproximadamente 10⁴c.p.m./ μ l.

Reacción de *Binding*.

Se incubó la sonda marcada (1-15ng/ μ l y $\approx 10^4$ c.p.m./ μ l) con el extracto de proteína (1-20 μ g) y con *DNA carrier* (0,1-2,5 μ g) en tampón de unión DNA-proteína (HEPES/NaOH 20mM pH 7,8, NaCl 0,1M, MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM, β -mercaptoetanol 7mM, glicerol 10%) en un volumen final de 15 μ l. Como *DNA carrier* se utilizó DNA de timo de ternera sonificado 5min. Se incubó a 25 °C durante 20 min.

3.12. Mutagénesis dirigida por el método de Kunkel (Kunkel, 1985). *Kit de Boehringer Mannheim*[®].

3.12.1. Protocolos generales.

Preparación de células competentes CJ236 y TG1.

Se inoculó una colonia de *E. coli* TG1 o de *E. coli* CJ236 en 10ml de 2xYT o 2xYT-cloranfenicol respectivamente. Se incubaron los cultivos durante la noche a 37°C. Al día siguiente se inocularon 200ml de medio, con 2 ml de cultivos frescos de la noche anterior y se incubaron con agitación aproximadamente 2 horas a 37°C hasta alcanzar una A₅₅₀ de 0,6. Se paró su crecimiento metiéndolos en hielo durante unos 15min. Se centrifugaron las células 5min a 8000r.p.m. en un rotor previamente enfriado a 4°C y se retiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 50ml de la disolución MgCl₂ 100mM fría. Se centrifugó de nuevo 5min, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células a continuación en 2ml de solución CaCl₂ (100 mM) fría llevándose a un volumen final de 100ml. Se incubó en hielo entre 60 y 90min. Se hizo una nueva centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 2ml de una disolución 15% glicerol y 85mM CaCl₂. Después se añadieron 7 ml de la misma solución agitando suavemente y por último se repartió todo el volumen en alícuotas de 300 μ l en tubos *ependorf* que se

congelaron inmediatamente en etanol/hielo seco y se guardaron a -70°C durante varios meses.

Transformación de E. coli.

Se inocularon 20 ml de 2xYT con 1 gota de un cultivo fresco de CJ236 o TG1 y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una A_{550} de 0,1. Se fundió *top agar* en el micro-ondas dejándose enfriar hasta 48°C , manteniéndose en un baño de agua. Se descongeló una alícuota de $300\mu\text{l}$ de células competentes manteniéndolas en hielo y se le añadió el DNA. Se incubó en hielo durante 60min y posteriormente se dió un choque térmico en un baño a 42°C durante 3min volviéndose después al hielo. Se añadieron en un tubo de 10ml, $50\mu\text{l}$ y $200\mu\text{l}$ de las células transformadas y $300\mu\text{l}$ de células de *E. coli* en fase exponencial del cultivo inicial. Para la selección azul/blanco se añadieron además $40\mu\text{l}$ de X-Gal al 2% y $40\mu\text{l}$ de IPTG 100mM directamente sobre la mezcla anterior. Cuidadosamente se añadieron 3ml del *top agar* mezclando todo con suavidad y vertiendolo inmediatamente en una placa de medio H. Se esperó que solidificase el *top agar* para dar la vuelta a las placas e incubarlas a 37°C toda la noche.

Siembra de los transformantes obtenidos.

Cada placa de lisis derivada de una célula transformada se calcula que contiene aproximadamente de 10^8 a 10^{10} fagos. Las placas de lisis se pincharon y absorbieron del agar usando una pipeta *pasteur* estéril, y se inocularon en 1ml de medio 2xYT al que se añadieron $50\mu\text{l}$ de cultivo estacionario de CJ236 o TG1 y se agitaron durante tres horas. Se centrifugó brevemente y se guardó el sobrenadante a 4°C para una nueva transfección.

Determinación del título de fagos.

La determinación del número de fagos es importante para estimar la incorporación de uracilo en el DNA.

Para determinar el grado de incorporación de uracilo en el DNA, el título de fago marcado con uracilo se determina tanto en CJ236, que es portadora de las mutaciones *dut*⁻ y *ung*⁻ como en TG1 (*dut*⁺, *ung*⁺). El gen *dut* codifica para la dUTPasa y el gen *ung* codifica para la uracil-N-glicosilasa encargada de eliminar los restos de uracilo que se incorporan al DNA. Cuanto más alta es la tasa de incorporación de uracilo en el genoma del fago, más baja es la eficacia de formación de calvas en TG1 debido a la degradación del DNA-uracilo por la uracil-N-glicosilasa.

En ambas cepas se siguió el mismo protocolo: se inoculó una colonia de CJ236 o de TG1 en 10 ml de medio y se incubaron los cultivos toda la noche a 37°C. Se diluyeron 10 μ l de sobrenadante de fago en 990 μ l de tampón 1xTE (dilución 1×10^2). Se hizo otra dilución de 100 μ l de la dilución 1×10^2 en 900 μ l de tampón TE (dilución 1×10^3) y se continuó diluyendo de la misma manera hasta una dilución final de 1×10^{10} .

Título de fagos en *E. coli* CJ236: a 0,2ml de un cultivo en fase estacionaria se añadieron 100 μ l de cada una de las diluciones de 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{10} y se incubaron a temperatura ambiente durante 10min.

Título de fagos en *E. coli* TG1: a 0,2ml de un cultivo en fase estacionaria se añadieron 100 μ l de cada una de las diluciones de 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 y se incubaron a temperatura ambiente 10min.

Se fundió el *top* agar y se conservó a 48°C hasta que se añadieron 3ml a cada dilución de fagos, mezclándose todo cuidadosamente y de inmediato se vertió la mezcla en placas H. Se incubó a 37° C toda la noche.

El título de fagos se expresó en unidades formadoras de colonias (pfu) por mililitro, calculado mediante la relación:

$$\text{número calvas} \times \text{factor de dilución} \times 10 = \text{pfu/ml}$$

Cálculo de la incorporación de Uracilo.

La diferencia entre el valor de pfu/ml en *E. coli* CJ236 y el valor de pfu/ml en *E. coli* TG1 corresponde al valor de la incorporación de uracilo. Este valor debe estar entre 10^5 y 10^6 .

3.12.2. Reacciones de mutagénesis.

Obtención de la construcción M13mp18 portadora del fragmento de promotor a mutar.

Se clonó el fragmento *EcoRI-BamHI* del plásmido pBS12-2 Δ *EcoRV* de 829 pb del promotor, en el vector M13mp18 digerido con *EcoRI* y *BamHI*. El plásmido resultante se denominó M13mp18-p800.

Se transformó CJ236 con *dsDNA* (o *DNA RF*) de M13mp18-p800 y las calvas transformantes se utilizaron para transfectar CJ236 y así obtener un *ssDNA* rico en uracilo, como se explica en el apartado siguiente.

Transfección.

Se inoculó una colonia de CJ236 en 10ml de medio 2xYT-cloranfenicol y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente se inoculó 1 ml de este cultivo en 20ml de 2xYT-cloranfenicol y 40 μ l de una disolución de uridina (0,125 μ g/ μ l) y se agitó a 37°C aproximadamente 45min hasta una A_{550} de 0,5. En esta fase se añadieron aproximadamente 10^8 pfu de M13mp18-p800 (según titulación previa) y se cultivó con agitación a 37°C durante 5-6h. Se centrifugaron las células 20min a 12.000r.p.m. y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de un tamaño de poro de 0,45 μ m a tubos de centrifuga de polipropileno. Se retiraron 50 μ l de sobrenadante de fago para determinar la tasa de incorporación de uracilo, conservándose a 4°C. A 20ml de sobrenadante de fago se añadió 40 μ l de RNasa A (2,5mg/ml) y 5ml de una solución PEG8000 20%/NaCl 2.5M. Se mezcló por inversión del tubo y se incubó a 4°C toda la noche. Tras centrifugar a 12.000r.p.m., se retiró el sobrenadante. Se resuspendió

el sedimento de fagos obtenido en 300 μ l de tampón concentrado en sales (Tris-HCl 100mM, NaCl 300mM, EDTA 1mM, pH 8) y se incubó la solución de fagos 30min en hielo. Posteriormente se centrifugó 5min, se recuperó el sobrenadante con los fagos ricos en uracilo (fagos-uracilo) y se guardó a 4°C.

Se determinó la tasa de incorporación de uracilo mediante el título de fagos en ambas líneas de *E. coli* como se describió en el apartado de protocolos generales. Los fagos-uracilo crecen pobremente en TG1 porque el DNA-uracilo se degrada por la actividad intracelular de la uracil glicosilasa y la endonucleasa AP. Cuando la tasa fue menor de 10⁵ se repitió la transfección con fagos obtenidos del primer ciclo de transfección. En general se hicieron dos ciclos de transfección en CJ236 para obtener dicho DNA-uracilo.

Preparación de DNA molde rico en uracilo.

Se mezcló el *pool* de fagos-uracilo obtenido según lo explicado en el apartado anterior con 2 volúmenes de PCIA y se agitó en *vortex* durante 1min. Se centrifugó brevemente y se pasó la fase acuosa a un tubo limpio. Para recuperar los restos de sobrenadante rico en fagos-uracilo se añadieron 100 μ l de tampón TE a la fase del fenol, se agitó el tubo 40s, se centrifugó brevemente y se juntó esta fase acuosa con la anterior. Se hizo una segunda extracción con fenol a las fases acuosas recogidas. A continuación se hicieron varias extracciones hasta que se veían transparentes las dos fases. Después se efectuaron dos extracciones con CIA. A la fase acuosa se le añadió 1/10 del volumen de acetato amónico 7,8M y 2,5 volúmenes de etanol al 99% preenfriado a -20°C. Se incubó 60min en un baño de etanol y hielo seco. Se centrifugó 15min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se hizo un lavado con etanol 90% y se centrifugó 10min y se decantó el sobrenadante con cuidado. El sedimento se secó al vacío 5min y se resuspendió en 20 μ l de tampón TE.

La concentración del DNA molde obtenido se calculó midiendo la A₂₆₀. El rendimiento obtenido en nuestros experimentos fue de entre 0,5 y 2 μ g/ μ l.

Anillamiento con el cebador.

Se usaron como cebadores los oligonucleótidos que se incluyen en la Tabla II. Las sustituciones o cambios en las secuencias consenso UAS1A, UAS2 y CCAAT(-352) diseñadas en estos oligonucleótidos se hicieron de manera que originaran en el proceso de mutagénesis una diana de restricción *KpnI* única y que iba a permitir la identificación de los mutantes.

Tabla II . Oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida de UAS1A, UAS2 y CCAAT(-352).

| Cebador | Posición | Secuencia |
|---------|----------|-----------------------------------|
| mdUAS1A | -285 | 5' -CGGGAACAGGTACCAAGACAC-3' |
| mdUAS2 | -186 | 5' -GAAATTATCAAGGTACCGTAGTGCGC-3' |
| mdCCAAT | -338 | 5' -CTTTTTTCTCGTCCGGTACCCCGTTG-3' |

Se subrayaron los nucleótidos mutados.

Los cebadores usados (Tabla II) se fosforilaron previamente siguiendo las condiciones que se describen a continuación. Partiendo de unos 200pmoles de cebador se añadieron: 3 μ l de Tris-HCl 1M, 1,5 μ l de MgCl₂ 0,2M, 1,5 μ l DTT 0,1M y 13 μ l de ATP 1mM, llevándose a un volumen final de 30 μ l. Se mezcló todo bien y se añadieron 5 unidades del enzima polinucleótido quinasa T4. Se incubó a 37°C durante 45min. Se inactivó la enzima incubando a 65°C durante 10min y después se precipitó el cebador con etanol y acetato sódico incubando 1 hora a -80°C y centrifugando después a 17.000r.p.m. durante 1 hora.

El anillamiento de un cebador sintético depende de la relación molde/cebador. Se pipetearon en un tubo *ependorf* los volúmenes de molde y cebador en una proporción 1:20 (0,1 pmoles de molde y 2 pmoles de cebador). Se añadieron 2 μ l de tampón de anillamiento 10x(Tris-HCl 200mM, MgCl₂ 20mM, NaCl 500 mM, pH 7,7) para un volumen final de 20 μ l.

Se mezcló todo y se colocaron los tubos en un baño a 70°C, se apagó y se dejó enfriar hasta 30°C en aproximadamente 40min (1°C/min). Se enfriaron a continuación en hielo.

Síntesis de la segunda hebra.

Manteniendo las muestras en hielo se añadieron 2 μ l de tampón de síntesis (Tris-HCl 100mM, MgCl₂ 50mM, DTE 20mM, dATP 5mM, dCTP 5mM, dGTP 5mM, dTTP 5mM, ATP 10mM, pH 7,75), 1 μ l de ligasa de T4 (1U/ μ l), 1 μ l de DNA polimerasa T4 (1U/ μ l) para un volumen final de 24 μ l. Se añadió 1 μ g de *T4 gene 32 Protein* a la mezcla de síntesis para asegurar una polimerización completa de la segunda hebra. Se mezcló todo cuidadosamente y se incubó en hielo 5min. Después se incubó a 25°C 5min y a 37°C 90min. Se colocó la mezcla de reacción de síntesis en hielo de nuevo. Se añadieron 80 μ l de tampón de paro (Tris-ClH 10mM, EDTA 1mM, pH 8) y se transformó TG1 con 3-10 μ l de la disolución final. La síntesis se pudo visualizar en un gel de agarosa al 1% con una muestra de 10 μ l.

3.13. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Análisis de restricción, búsqueda de ORFs.

DNASIS HITACHI™ (copyright of Hitachi Software Engineering Co., LTD).

DNA™ Strider 1.2. Christian Marck. Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire. Bât. 142. Centre d'Etudes de Saclay. 91191 Gif-sur-Yvette, France.

Análisis de homologías de secuencias de genes.

GCG®FastA program (Pearson, 1990).

Búsqueda de secuencias consenso de factores de transcripción.

GCG®Findpatterns program: busca sitios potenciales de unión de factores de transcripción comparando la secuencia estudiada con la base de datos *GCG-Tfsites.dat*.

Patternsearch 1.1 (GBF-Braunschweig): programa que busca sitios potenciales de unión de factores de transcripción comparando con la base de datos TRANSFAC3.2 & TRRD3.4.

MatInspector 2.1 (Quandt y col., 1995): programa que busca sitios potenciales de unión de factores de transcripción usando matrices de la base de datos TRANSFAC3.2.

Bases de datos de factores de transcripción.

GCG-Tfsites.dat. Genetic Computer Group. University Research Park. Madison WI, USA.

TRANSFAC-The Transcription factor Database(Wingender y col., 1997). (GBF-Braunschweig). <http://transfac.gbf.de/>

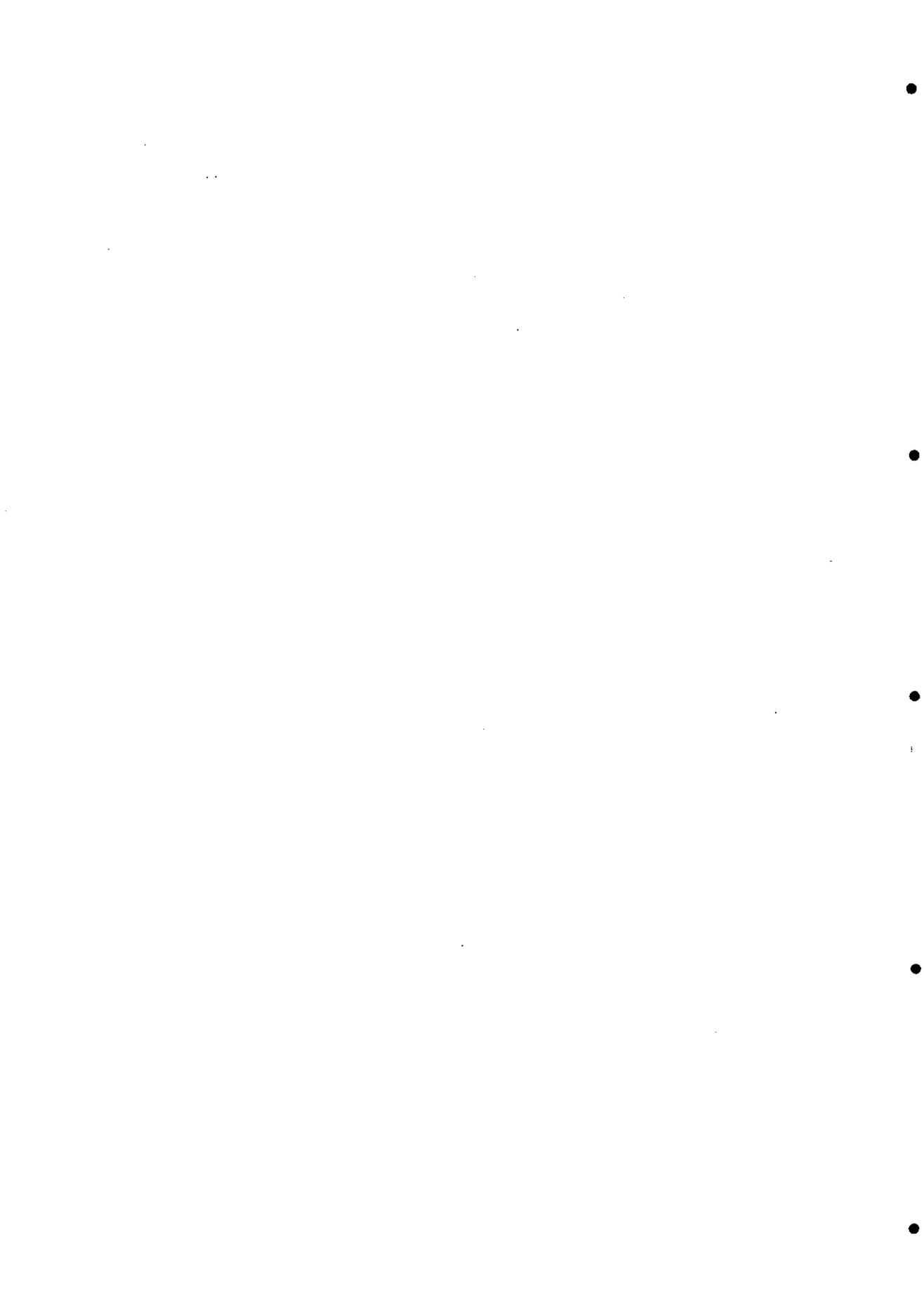
Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung. El proyecto GBF: "Molecular Bioinformatics of Gene Regulation" se ocupa de agrupar a

nivel teórico las secuencias de regiones y elementos reguladores del genoma que controlan la transcripción en una base de datos y de desarrollar programas informáticos que ayuden a identificar supuestas estructuras de promotores o de activadores y a sugerir sus funciones.

Estadística.

StatGraphics Plus (Statistical Graphics Corporation) version 1.2.

4. RESULTADOS



4.1. Secuenciación e identificación de posibles regiones reguladoras.

4.1.1. Subclonación de un fragmento que contiene la región 5' del gen *KICYC1*.

Trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio permitieron la clonación del gen *KICYC1* y la secuenciación completa de la *ORF* y de 380pb en dirección 5' del ATG (Freire Picos y col., 1993). Para tener un conocimiento más detallado de la región promotora era necesario estudiar una zona más amplia. Por este motivo, se planteó la secuenciación de un subclón que abarcara la región inmediatamente anterior a la región ya secuenciada.

A partir del clon pART1, en el cual se identificó inicialmente el gen *KICYC1*, se escindió el fragmento *HindIII-HindIII* de 1900pb y se clonó en el vector YEplac112, obteniéndose el plásmido pARTpre-5. El inserto clonado contenía el fragmento *PstI-HindIII* de 517pb que ya había sido previamente secuenciado y que se eliminó digiriendo pARTpre-5 con *PstI* y clonando el fragmento de aproximadamente 1400pb en el sitio *PstI* de YEplac112. En la construcción resultante, pART5, el fragmento *HindIII-PstI* estaba en la misma orientación respecto al *MCS* que el clon original pART1 (figura 9).

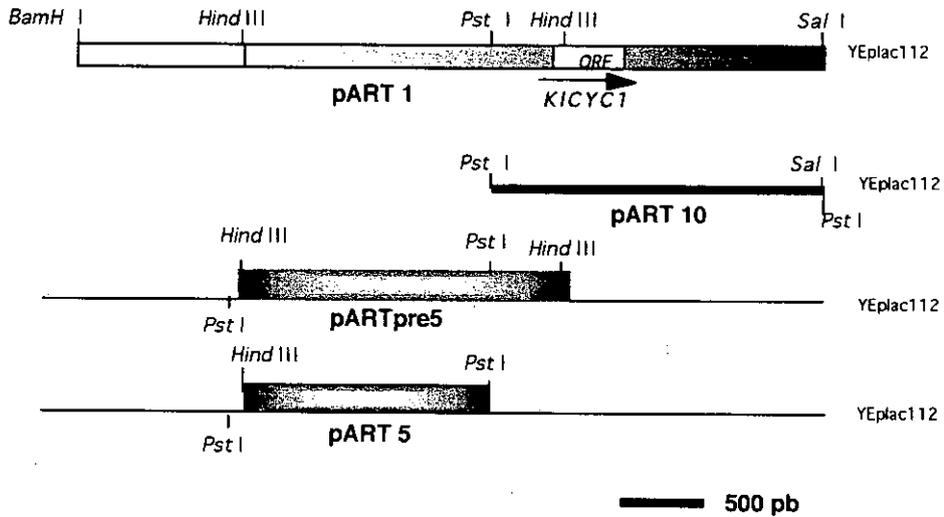


Figura 9. Esquema de la subclonación de pART5.

Se digirió pART5 con diferentes enzimas de restricción y tras analizar los productos de la digestión en geles de agarosa o acrilamida, se delimitaron las posiciones de los sitios de restricción que se muestran en la figura 10.

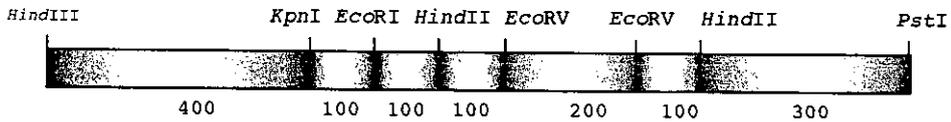


Figura 10. Mapa de restricción de pART5.

4.1.2. Secuenciación de la región 5' al gen *KICYC1*.

Se obtuvieron distintos subclones de pART5 y a partir de pBS12-2, construcción que porta el fragmento de 1810pb en dirección 5' al gen *KICYC1*, se obtuvieron deleciones unidireccionales por el sistema de *Erase a base*. En la figura 11 se incluyen las construcciones obtenidas que se utilizaron para secuenciar, así como los cebadores utilizados en la reacción y la extensión de la lectura en cada caso.

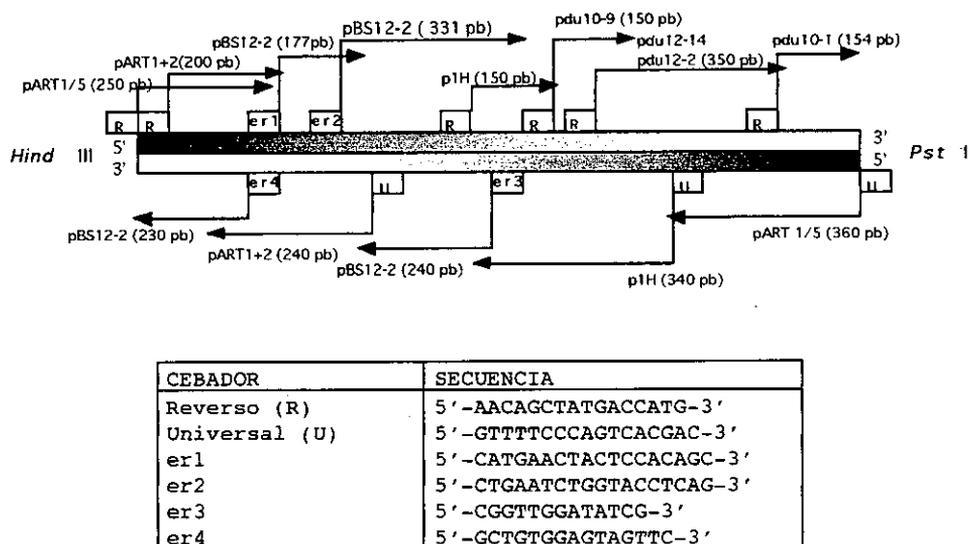


Figura 11. Estrategia de secuenciación de pART5. Se detallan los plásmidos y los cebadores utilizados en cada reacción. Los cebadores er1, er2, er3 y er4 fueron diseñados para secuenciar las zonas que no se solapaban. La extensión secuenciada en cada reacción se incluye entre paréntesis.

La secuencia obtenida de 1439pb ha sido depositada en la base de datos EMBL con el número de acceso X87929. Esta secuencia se ensambló con la anteriormente secuenciada obteniéndose una región 5' a la *ORF* de *KICYC1* de 1810pb (figura12).

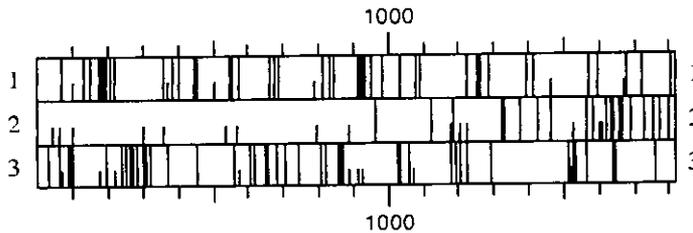
La secuencia descrita constituyó el punto de partida para los estudios realizados con el fin de delimitar una región promotora que incluyese todos los elementos que intervienen en la expresión del gen *KICY1* y su regulación.



Figura 12. Secuencia de 1810pb de la región 5' del gen *KICY1*. En la posición 1434 se señala el sitio *PstI*.

4.1.3. Análisis preliminar de la secuencia obtenida:

Mediante el programa informático *DNA Strider*TM se obtuvo el mapa de posibles *ORFs* de este fragmento así como una lista de los sitios de restricción únicos que aparecen en esta secuencia (figura 13).



Barra completa: codones *STOP* (TAA, TAG and TGA).
 Media barra: codones ATG de inicio.
 1, 2 y 3 hacen referencia a las tres tramas de lectura de la hebra de Watson.

| Enzima | Sitio de restricción | Posición | Enzima | Sitio de restricción | Posición |
|-------------------|----------------------|----------|-------------------|----------------------|----------|
| <i>Hind</i> III | a/agctt | 1 | <i>Nco</i> I | c/catgg | 882 |
| <i>Bsp</i> H I | t/catga | 217 | <i>Sca</i> I | agt/act | 895 |
| <i>Age</i> I | a/coggt | 319 | <i>Alw</i> I | ggatc | 905 |
| <i>Acc</i> I | gt/mkac | 361 | <i>Bsp</i> M I | acctgc | 1049 |
| <i>Bsa</i> I | ggtctc | 419 | <i>Hpa</i> I | ggt/aac | 1073 |
| <i>Eco</i> R I | g/aattc | 475 | <i>Boe</i> F I | acggc | 1097 |
| <i>Nsp</i> I | rcatg/y | 500 | <i>Ear</i> I | ctcttc | 1125 |
| <i>Nsp</i> 7524 I | r/catgy | 500 | <i>Bsp</i> 1286 I | gdgch/c | 1128 |
| <i>Nsp</i> C I | rcatg/y | 500 | <i>Hgi</i> A I | gwgw/c | 1128 |
| <i>Sph</i> I | gcatg/c | 500 | <i>Afl</i> III | a/crygt | 1144 |
| <i>Nru</i> I | tcg/cga | 526 | <i>Sna</i> B I | tac/gta | 1314 |
| <i>Bst</i> U I | cg/cg | 527 | <i>Aat</i> II | gacgt/c | 1374 |
| <i>Ase</i> I | at/taat | 562 | <i>Aha</i> II | gr/cgyc | 1374 |
| <i>Bsi</i> Y I | ccnnnnn/nngg | 727 | <i>Pst</i> I | ctgca/g | 1434 |

Figura 13. Mapa de *ORFs* a partir de la secuencia de pART5 (parte superior) y sitios de restricción únicos de dicha secuencia (parte inferior).

Puesto que en la trama 2 de la hebra 5'→3' se detectó la existencia de un fragmento de *ORF* de 872pb se comparó, mediante el programa *FastA* (Pearson, 1990) la secuencia de pART5 obtenida, con las secuencias de genes recopiladas en las bases de datos a través de un alineamiento dual. La zona correspondiente a la pauta abierta de lectura presentó gran homología con genes que codifican

para piruvato decarboxilasas, con un porcentaje de identidad de un 55,9% y un solapamiento de 874pb. El estudio de esta región con homología con piruvato decarboxilasas ha dado lugar a la caracterización de un gen que interviene en la regulación del metabolismo de la tiamina (Rodríguez Belmonte, 1997).

La posición relativa de la *ORF* vecina y ensayos preliminares en los que se fusionaron distintos fragmentos del promotor del gen *lacZ* permitieron determinar desde qué punto se debía considerar la zona promotora a estudiar que quedó delimitada a una región de 868pb (figura 14).

4.1.4. Identificación de elementos reguladores mediante búsqueda de homología.

En el estudio previamente realizado sobre una secuencia promotora de sólo 376pb se habían localizado secuencias con homología a los elementos reguladores presentes en los promotores de los genes citocromo *c* de *S. cerevisiae*, *CYC1* y *CYC7* (Freire Picos y col., 1993) se buscaron homología de forma manual con secuencias consenso que aparecían en los genes citocromo *c* de *S. cerevisiae*, *CYC1* y *CYC7*. Se localizaron así, las secuencias homólogas al consenso de reconocimiento de la proteína Hap1p (UAS1A y UAS1B) en las posiciones -306 y -259 respecto al ATG, la secuencia homóloga al consenso de reconocimiento del complejo multimérico Hap2/3/4/5p (UAS2) en la posición -207, varias cajas TATA en las posiciones -184, -171, -91, -66 y -15 y en la posición -126 una secuencia de 34pb rica en pirimidinas similar a la que presenta el gen *CYC1* (McNeil y Smith, 1988).

A fin de extender el estudio a la región promotora de 868pb se hizo una comparación de esta secuencia con las siguientes bases de datos de sitios de reconocimiento de reguladores transcripcionales: GCG-Tfsites.dat (TFD, versión 7.4) y GBF-TRANSFAC Sites (versión 3.4) mediante los programas informáticos: GCG®*FINDPATTERNS*, *MATINSPECTOR* (versión 2.1) y *PATTERNSEARCH* (versión 1.1). Se estudiaron solamente las homología con

factores de levaduras. Como resultado de esta búsqueda *bioinformática* se localizaron, además de las regiones previamente descritas, dos cajas CCAAT en las posiciones -352 y -463, sitios potenciales de acción del complejo multimérico Hap2/3/4/5p. También se localizaron un sitio ABF1 (ARS Binding Factor 1) en la posición -698 y tres sitios CPF1(Centromere Promoter Factor 1) en las posiciones -670, -513 y -492. En la posición -409 apareció una región con homología con el consenso de unión de la proteína represora Mig1p y en la posición -352 un sitio de reconocimiento para Rox1p. En la tabla III se resume la información obtenida. En la tabla III se muestra la homología de los consensos con la secuencia y en figura 14 se detallan las posiciones de las secuencias *cis* localizadas.

Tabla III. Búsqueda de homología con distintos consensos de factores de transcripción.

| Secuencia consenso | Factor de transcripción | Referencia | Identidades encontradas |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|--|
| CGGNNNTANCGGNNNTA | Hap1p | Ha y col., 1996 | 3/ 0 CGGNNNTANCGGNNNTA -285 CGGPAACATCGGTCAPC -301 |
| CGGNNNTANCGGNNNTA | Hap1p | Ha y col., 1996 | 4/ 0 CGGNNNTANCGGNNNTA -254 CGGTTTACGTGTTTAA -238 |
| CCAAT | Hap2/3/4p | Chodosh y col., 1988 | 0/ 0 CCAAT -463 CCAAT -459 -352 CCAAT -348 |
| TNATTGGT | Hap2/3/4p | Forsburg y Guarente, 1989 | 4/ 0 TNATTGGT -204 ACTBTGGT -197 |
| RTCryNNNNNACG | ABF1 | Dorsman y col., 1988 | 1/ 0 RTCryNNNNNACG -698 ATCGCCACTACG -686 |
| RTCACRTG | CPF1 | Mellor y col., 1990 | 0/ 0 RTCACRTG -670 GTCACGIG -661 -513 GTCACGIG -506 -492 ATCACGIG -484 |
| YYYATTGTTCT | Rox1p | Lowry y col., 1990 | 2/ 0 YYYATTGTTCT -345 CTCATTGGTTT -356 |
| WWWWWASRCCCC | Mig1p | Griggs y Johnston, 1990 | 2/ 0 WWWWSRCCCC -392 TTTCGGCQCCC-409 |

W: T o A Y: pirimidinas, C o T K: G o T
S: C o G R: purinas, A o G M: A o C

4.2. Expresión de los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae* y *KICYC1* de *K. lactis*.

4.2.1. Obtención de una línea con el gen *KICYC1* interrumpido.

La interrupción génica se llevó a cabo según el método *One Step* (Rothstein, 1991) en la línea celular de *K. lactis* MW190-9B que es portadora de las mutaciones *uraA* y *lac4-8*. Se empleó la construcción plasmídica pBSNulo1 (amablemente cedida por M.A.Freire Picos), que consta del gen *KICYC1* interrumpido, en el sitio *HindIII* de la posición 136 de la pauta de lectura abierta, por el gen *URA3* de *S. cerevisiae*, todo ello clonado en el vector pBlueScriptSK+. Se utilizó el gen *URA3* de *S. cerevisiae* porque es intercambiable funcionalmente con el gen *KIURA3* (Shuster y col., 1987), presentando la proteína codificada por este último una identidad en secuencia de aminoácidos de un 81% con el gen *URA3* (Wésolowski-Louvel y col., 1996). Se transformó MW190-9B con el fragmento, de un tamaño de aproximadamente 3000pb, que se excinde al cortar pBSNulo1 con *Sall*. Se seleccionaron las colonias transformantes *URA*⁺ y se sembraron en placas CM-Lactato hasta identificar una colonia transformante que era incapaz de crecer sobre esta fuente de carbono, revelando la posible interrupción del gen *KICYC1*. A fin de comprobar que la integración había sido correcta, se hizo un *Southern Blot* con DNA genómico obtenido de un cultivo de la colonia candidata y de la línea MW190-9B en medio YPD-0,5%. Se digirió el DNA con los enzimas de restricción *Sall* y *PstI*, y se analizó la digestión mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Se transfirió el DNA a una membrana de nylon como se explica en Materiales y Métodos y se hibridó con el fragmento *PstI-PstI* de pART10 marcado con digoxigenina. Tras el revelado de la membrana (figura 15A), el resultado observado señalaba que se había producido integración, pues el fragmento que contiene la integración se excinde al cortarlo con *PstI* originando dos fragmentos de 500 pb y de 1400 pb. Al cortar con *Sall* se confirmó también la integración, ya que la banda aumenta de tamaño respecto a

la línea salvaje. A la línea portadora de la integración se le denominó Nulo-*Klcy1*.

Debido a que los plásmidos portadores de las secuencias de replicación propias de *K. lactis* llevan el marcador URA3, porque hasta ahora la mayoría de las líneas mutantes auxotróficas obtenidas de *K. lactis* son *Klura3*, interesaba que la línea mutante *Klcy1* fuera también mutante *ura-*. Para ello se sometió a la línea Nulo-*Klcy1* a mutagénesis y selección en placas FOA (Sikorski y Boeckle, 1991) para obtener colonias *Klura3* capaces de crecer en presencia de FOA e incapaces de crecer en medio CM-Ura y en medio no fermentable CM-Lactato. Se escogió uno de los mutantes obtenidos y se aisló su DNA genómico con el fin de comprobar de nuevo si se mantenía la interrupción del gen *KICYC1* (figura 15B). A esta línea celular se le llamó Nulo-*Klcy1-Klura3*.

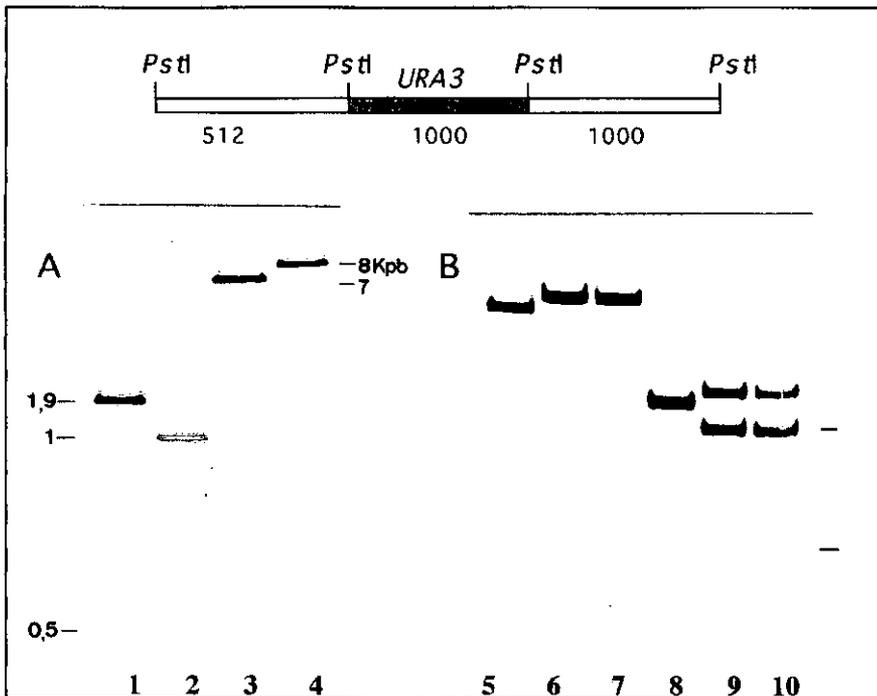


Figura 15. Experimentos de *Southern* realizados con DNA genómico de las levaduras MW190-9B(1, 3, 5 y 8) y sus derivadas: Nulo-*Klcy1*(2, 4, 6 y 9) y Nulo-*Klcy1-Klura3*(7 y 10), digeridas con los enzimas *PstI* (1, 2, 9 y 10) y *Sall* (3, 4, 5, 6 y 7).

4.2.2. Construcción de plásmidos portadores de los genes *KICYC1*, *CYC1* y *CYC7* y de señales de replicación propias de plásmidos de *K. lactis*.

Se clonaron los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae* y el gen *KICYC1* de *K. lactis* en el vector KEp6 que contiene la secuencia S11 de replicación autónoma de *K. lactis* según se describe en materiales y métodos. Se obtuvieron así las construcciones KEp6-*ScCYC1*, KEp6-*ScCYC7* y KEp6-*KICYC1*.

4.2.3. Crecimiento de la línea Nulo-*KICYC1-ura3* en distintos medios.

La línea Nulo-*Klcy1-ura3* no crecía ni en CM-lactato ni en YPG-2%. En placas YPD-0,5% presentaba un fenotipo *petite*, que estaba de acuerdo con la deficiencia respiratoria de la levadura (figura 16).

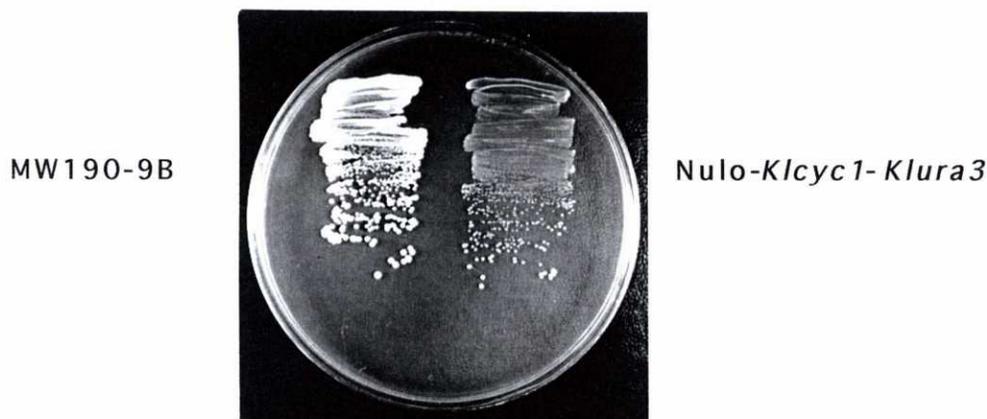


Figura 16. Crecimiento de MW190-9B y de Nulo-*Klcy1-Klura3* en YPD-2%.

4.2.4. Complementación de la línea Nulo-*Klcy1-Klura3* con diferentes genes citocromo *c* de levadura.

Con el fin de comprobar la complementación de la línea Nulo-*Klcy1-Klura3*, con diferentes genes citocromo *c* de levaduras se realizaron transformaciones con plásmidos KEp6-*ScCYC1*, KEp6-*ScCYC7*) y KEp6-*KICYC1*. Las colonias transformantes *ura*⁺ obtenidas se sembraron en

placas CM-lactato-2% como única fuente de carbono (figura 17), observándose la recuperación de la función respiratoria en todos los casos. No se observó ninguna diferencia de crecimiento entre las líneas con los distintos citocromo *c*.



Figura 17. Complementación de la línea Nulo-Klcy1-Klura3 con diferentes genes citocromo *c* de levaduras en placas CM-2%lactato.

4.2.5. Expresión heteróloga del gen *ScCYC7* en *K. lactis*.

Ya que el gen *CYC7* de *S. cerevisiae*, de baja expresión en condiciones aerobias, era capaz de complementar en un plásmido multicopia a la delección de *KICYC1* nos pareció interesante determinar los niveles de expresión heteróloga de este gen en *K. lactis*, tanto cuando se expresa bajo el control de su propio promotor como cuando se pone bajo el control del promotor de *KICYC1*. Para ello se delecionó la región UAS del gen *CYC7* hasta la posición -142 del promotor a partir del plásmido KEp6-*ScCYC7* digiriendo con *XhoI* y *BamHI*, eliminando el fragmento de 600pb y añadiendo un adaptador *BamHI*. En el sitio *BamHI* de la construcción obtenida se clonó el fragmento *HinfI-BamHI* de 874pb de pCAF12 que contiene 861pb de la región 5' del gen *KICYC1*. Se comprobó la orientación del inserto mediante secuenciación. A esta construcción se la denominó pUASKI-*CYC7*.

Se transformó la línea mutante Nulo-Klcy1-Klura3 con los plásmido pUASKI-*CYC7* y KEp6-*CYC7* y se extrajo RNA de cultivos de los

transformantes creciendo en medio CM-glucosa 4% y CM-glicerol 2%. Se hizo un *Northern* utilizando como sonda el fragmento *PstI-PstI* de pART10. El resultado mostró que la expresión aumenta considerablemente cuando se cambia el promotor de *CYC7* por el de *KICYC1* lo que indica la mayor eficiencia de este promotor (figura 18). El tamaño del mRNA aumentó cuando el gen *CYC7* se encontraba bajo la regulación del promotor del gen *KICYC1*. Este resultado indica que en la construcción pUASKI-*CYC7*, el gen *CYC7* se transcribe desde el sitio de inicio del gen *KICYC1*, localizado en posición 5' respecto al de *CYC7* (ver esquema en la figura 18).

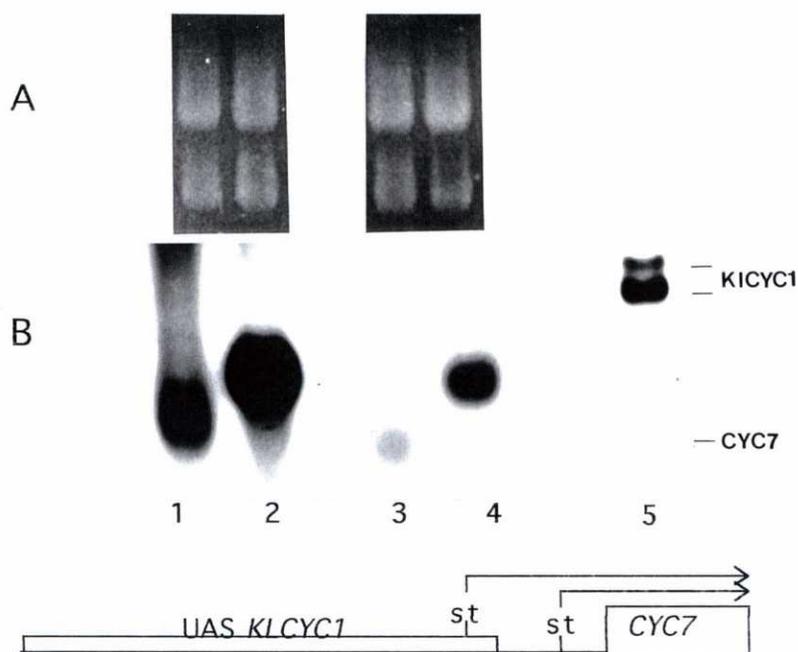


Figura 18. Análisis de RNA de la línea *Nulo-Klcy1-Klura3* transformada con plásmidos *KEp6-ScCYC7*, *pUASKI-CYC7* y *KEp6-KICYC1*. A. Tinción del gel de RNA con bromuro de etidio como control de carga. B. *Northern* hibridado con la sonda de *CYC7* (1-4) y con la sonda de *KICYC1* (5). 1: expresión del gen *CYC7* con su promotor en medio CM-glicerol2%. 2: expresión del gen *CYC7* con el promotor de *KICYC1* en medio CM-glicerol2%. 3: expresión del gen *CYC7* con su promotor en medio CM-glucosa4%. 4: expresión del gen *CYC7* con el promotor de *KICYC1* en medio CM-glucosa4%. 5: expresión del gen *KICYC1* en medio YPG-2%.

4.3. Localización de regiones reguladoras funcionales mediante deleciones de la región promotora.

4.3.1. Fusión del promotor de *KlCYC1* al gen *lacZ* de *Escherichia coli*.

4.3.1.1. Construcción de plásmidos portadores de la fusión.

A partir de los plásmidos pART3 y pBS12-2 descritos en Materiales y Métodos, se excindieron los fragmentos *Bam*HI-*Bam*HI conteniendo 376pb y 1810pb de la región promotora y se clonaron en el sitio *Bam*HI del vector de fusión pXW3. Se comprobó la orientación correcta tanto con un análisis de restricción como comprobando su expresión analizando la actividad β -galactosidasa, en placas X-Gal-glucosa-2%, de células de MW190-9B transformadas con las construcciones. Así, se obtuvieron dos plásmidos portadores de dos tamaños distintos de promotor fusionados al gen *lacZ*, **p3Z** con un promotor de 376pb y **p12Z** con un promotor de 1810pb. De esta primera prueba en placas X-Gal se dedujo que había expresión en ambas construcciones, si bien la coloración azul era más intensa en los transformantes p12Z, lo que indicaba que era importante extender el estudio del promotor a una zona más amplia. Se construyó también el plásmido **p9Z** portador de un promotor de 868pb fusionado al gen *lacZ*.

En la figura 19 podemos ver la actividad β -galactosidasa en placas X-Gal-glucosa-2% de la línea MW190-9B de *K.lactis* transformada con los tres plásmidos y la cuantificación a partir de células cultivadas en medio YPD-4% y YPG-2% por el método de permeabilización celular. Se observó que los valores de actividad eran mayores en medio YPG-2%, lo que apoyaba la existencia de regulación por fuente de carbono. Los valores de actividad fueron muy bajos en proporción con lo observado en placa, por lo que los sucesivos ensayos se hicieron a partir de células creciendo en medio CM para evitar la pérdida de plásmido y se cuantificó la actividad β -galactosidasa en extractos por el procedimiento de Mount y col. (1996) que se explica en Materiales y Métodos.

| FUSIÓN <i>lacZ</i> | YPD-4% | YPG-2% | EXTENSIÓN | Placa X-Gal |
|--------------------|------------|------------|-----------|--|
| p3Z | 4 ± 0,5 | 11 ± 0,9 | -376pb |  |
| p9Z | 3,6 ± 0,4 | 12,4 ± 1,6 | -868pb |  |
| p12Z | 3,7 ± 2 | 6,8 ± 1 | -1810pb |  |
| pXW3 | 0,3 ± 0,07 | 0,7 ± 0,3 | Control |  |

A.E. en unidades Miller

Figura 19. Actividad β-galactosidasa de la línea MW190-9B transformada con los plásmidos pXW3, p3Z, p9Z y p12Z creciendo en placas X-Gal-glucosa2%(*ura*) y cuantificación de la actividad en células permeabilizadas.

4.3.1.2. Obtención de deleciones unidireccionales del promotor.

Se amplificaron mediante *PCR* una serie de fragmentos del promotor de diferentes extensiones y se clonaron en el vector pXW3 portador del gen *lacZ*. (figura 20A). Se muestra el patrón de restricción de las construcciones obtenidas digeridas con *Bam*HI y *Hind*III. La deleción du12 dió lugar inesperadamente a la aparición de dos bandas, por tanto se repitió el ligamiento, obteniéndose una construcción que rendía el patrón esperado y que fue comprobada mediante secuenciación. En la figura 20B se muestra la actividad β-galactosidasa en placas X-Gal de células transformadas con las construcciones obtenidas.

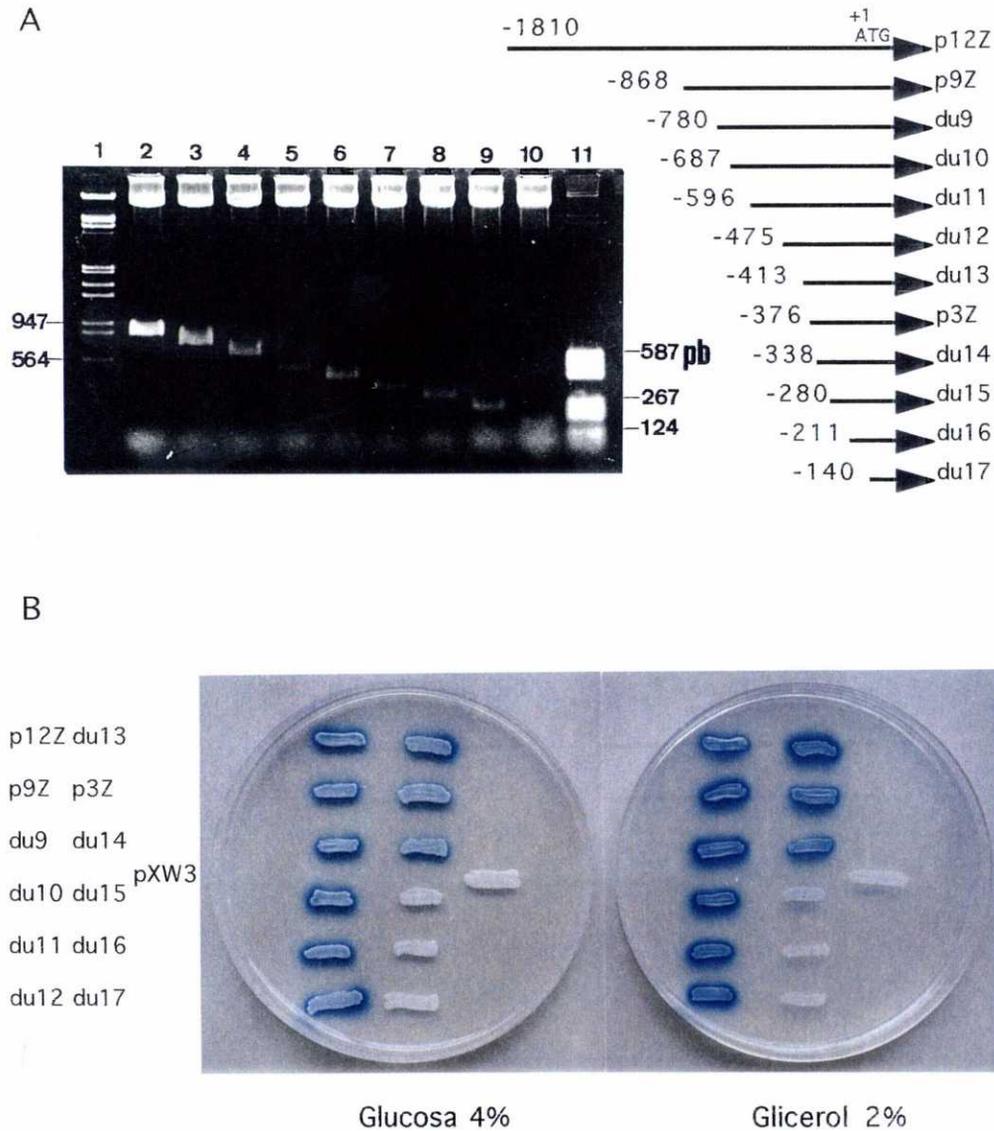
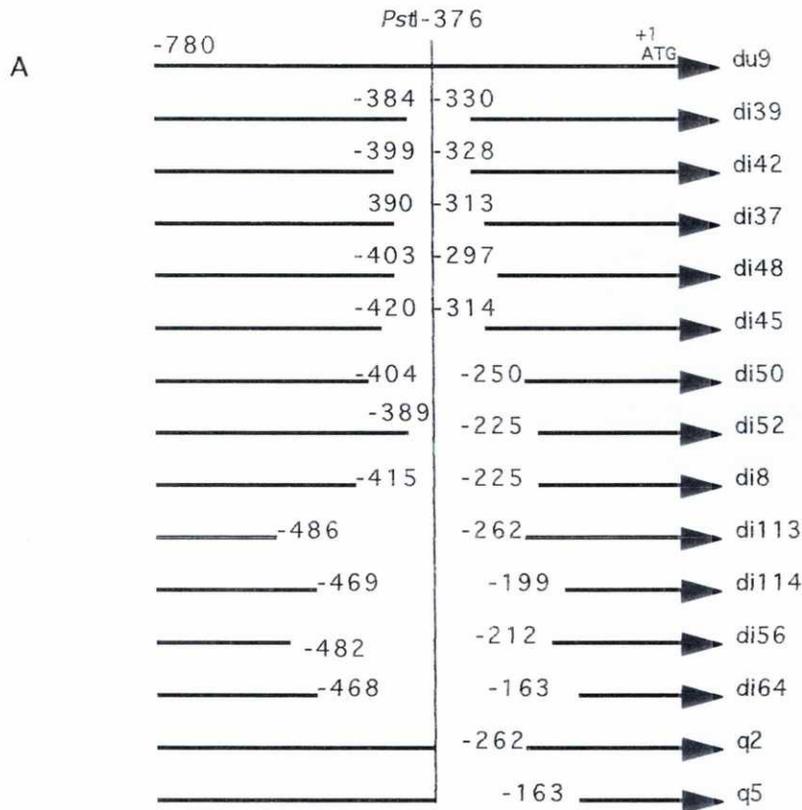


Figura 20. A. Esquema de los diferentes fragmentos del promotor de *K1CYC1* amplificados por *PCR*. Se incluyen también los tamaños de p3Z, p9Z y p12Z. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las construcciones obtenidas tras clonar dichos fragmentos en el vector pXW3. 1: Marcador de pesos moleculares III de *Boehringer-Mannheim*. 2-10: du9, du10, du11, du12, du13, du14, du15, du16 y du17. 11: marcador de pesos moleculares V de *Boehringer-Mannheim*.

B. Actividad β -galactosidasa en placas X-Gal-glucosa 4% y X-Gal-glicerol 2% de la línea MW190-9B transformada con las distintas deleciones unidireccionales.



B



Figura 21. A. Esquema de las deleciones internas obtenidas mediante digestión con *Bal31* a partir del plásmido du9.

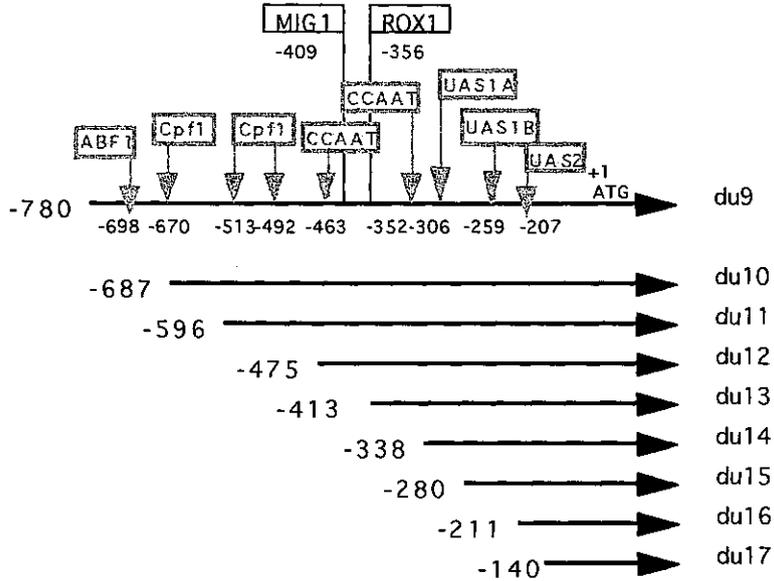
B. Actividad β -galactosidasa en placas X-Gal-glucosa2% y X-Gal-glicerol de la línea MW190-9B transformada con las distintas deleciones internas.

4.3.1.3. Obtención de deleciones internas del promotor mediante digestiones con nucleasa *Bal31*.

Se obtuvieron deleciones internas mediante la nucleasa *Bal31* a partir del plásmido du9. Se digirió du9 con *PstI* y el fragmento lineal obtenido se digirió con nucleasa *Bal31* que se dejó actuar a diferentes tiempos generándose deleciones de diferentes extensiones (Materiales y Métodos). Los distintos fragmentos originados se ligaron en presencia del adaptador *PstI*. Los clones obtenidos se analizaron y la extensión exacta del fragmento delecionado se comprobó mediante secuenciación de cada una de las deleciones obtenidas. En la figura 21 se puede ver un esquema de los diferentes fragmentos delecionados y la actividad β -galactosidasa de células transformadas con las construcciones derivadas.

4.3.2. Medida de la actividad β -galactosidasa en células de levadura transformadas con las diferentes deleciones obtenidas.

Para el análisis cuantitativo se transformó la línea MW190-9B con las deleciones seleccionadas y se cultivaron los transformantes en medio CM con deficiencia en uracilo y como fuente de carbono glucosa al 4% o glicerol al 2%. Los cultivos se iniciaron a partir de cinco colonias de cada tipo de transformante bajo las condiciones que se explican en materiales y métodos. Se hicieron extractos de proteína según el método de Mount y col. (1996) y se calcularon los niveles de actividad en nanomoles de o-nitrofenol producido por miligramo de proteína y por minuto. Se realizaron un número de entre 3 y 12 ensayos para cada tipo de deleción, analizándose por tanto, un número de 15 a 60 transformantes individuales. Se hicieron las medias de los resultados de cada tipo de deleción y se calculó el error estándar mediante el programa estadístico *StatGraphics plus*.



| | GLUCOSA 4% | | GLICEROL 2% | | f |
|------|------------|----|-------------|----|-----|
| | Media ± ES | n | Media ± ES | n | |
| du9 | 1969 ± 137 | 30 | 3458 ± 239 | 29 | 1,7 |
| du10 | 1265 ± 77 | 6 | 2749 ± 305 | 6 | 2,1 |
| du11 | 1443 ± 126 | 5 | 2675 ± 165 | 6 | 1,8 |
| du12 | 2290 ± 302 | 12 | 5074 ± 491 | 12 | 2,2 |
| du13 | 1299 ± 46 | 6 | 2224 ± 308 | 6 | 1,7 |
| du14 | 822 ± 81 | 6 | 650 ± 88 | 4 | 0,8 |
| du15 | 127 ± 8 | 6 | 216 ± 17 | 6 | 1,7 |
| du16 | 15 ± 1 | 6 | 31 ± 2 | 4 | 2,1 |
| du17 | 11 ± 0.7 | 6 | 25 ± 2 | 6 | 2,2 |
| pXW3 | 63 ± 10 | 6 | 99 ± 17 | 6 | 1,6 |

Figura 22. Valores de actividad β-galactosidasa de las deleciones unidireccionales en nmoles de o-nitrofenol por mg de proteínas totales y por min. ES: error estándar individual. f: factor de desrepresión calculado mediante la relación de la actividad en medio CM-glicerol 2% y en medio CM-glucosa 4%. n: número de medidas.

4.3.2.1. Deleciones unidireccionales.

Los valores de actividad enzimática de las células transformadas con las deleciones unidireccionales se recogen en la figura 22.

La disminución de la actividad al eliminar el fragmento comprendido entre la posición -780 y -687, que incluye el consenso para Abf1p, indica un posible efecto activador de esta región sobre el promotor.

Entre las posiciones -596 y -475 parece haber una región negativa, pues hay un aumento significativo entre du11 y du12. En esta última se eliminan las tres secuencias consenso para Cpf1p detectadas en el promotor y los resultados apuntan a un efecto represor de este factor.

En el resto de las deleciones hasta du16 pierden paulatinamente regiones positivas pues la actividad enzimática va disminuyendo también. La mayor disminución de la actividad se produce en el paso de la deleción du14 a la deleción du15 (disminuye unas 6,5 veces en glucosa y 3 veces en glicerol) lo que coincide con la eliminación del consenso UAS1A. La actividad observada en du16 y du17 alcanza niveles próximos al control sin promotor y la actividad residual que presenta la deleción du15 podría ser atribuible a la permanencia de UAS1B. Se concluyó por tanto que el promotor dejaba de ser funcional con un tamaño menor de -211pb y que las señales que corresponden a los consensos UAS1B y UAS2 no tienen efecto activador importante por sí solas.

Respecto a la represión en glucosa, o desrepresión en glicerol, se observó que en general en todas las deleciones es muy baja. Esto estaría de acuerdo con lo observado previamente por Freire-Picos y col. (1995a), Mulder y col. (1994a), Mulder y col. (1994b) y Zaror y col. (1993) que han señalado que en *K. lactis* la represión por glucosa tiene una menor importancia que en *S. cerevisiae*. En la deleción du14 parece perderse el efecto de represión, por lo que en un principio se pensó que la región comprendida entre las posiciones -413 y -338 fuese la responsable de esta regulación. De hecho esta región contiene un consenso para la unión de Mig1p (represor) y una caja CCAAT necesaria para la desrepresión mediada por el complejo Hap2/3/4/5p en ausencia de glucosa. Sin

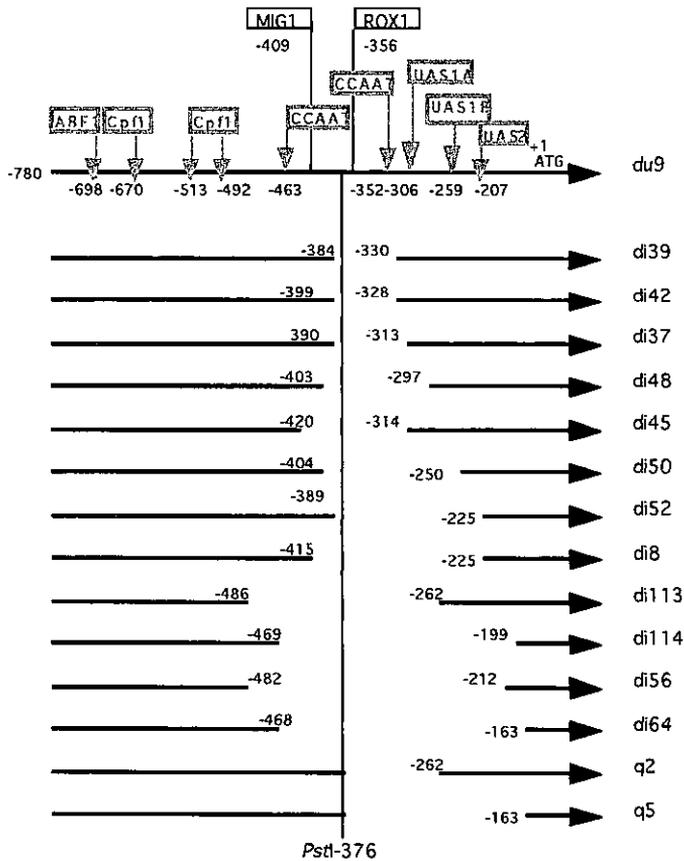
embargo, el efecto observado en du14 no se corresponde con el observado en varias deleciones internas que habían perdido esta misma región y que siguen manteniendo la desrepresión en glicerol (ver di39, di42, di37, di48 y di45, figura 23).

4.3.2.2. Deleciones internas.

Los valores de actividad β -galactosidasa obtenidos para las deleciones internas se muestran en la figura 23.

El efecto de la zona entre -384 y -313 sería positivo puesto que en di39, di42, di37, di48 y di45 la actividad disminuye respecto al control. Así se define una región positiva que estaría incluida en la región positiva entre -413 y -338, delimitada en el apartado anterior al comparar du13 a du14.

En las deleciones di50, di52 y di8: hay un ligero aumento de actividad respecto a las deleciones anteriores. Todas estas deleciones la región entre -404 y -225 que incluye la región positiva que acabamos de definir (-384, -313) y el consenso UAS1A al que se le ha atribuido un efecto positivo al comparar la deleción du14 con la du15 (zona entre -338 y -280). Cabe pensar que estas deleciones de gran tamaño que suponen la pérdida de más de 100pb del promotor impliquen una reordenación estructural de los elementos restantes que permita actuar de modo efectivo a elementos situados en la región entre -780 y -687. Sin embargo, este efecto no puede estar basado únicamente en la aproximación de estas regiones positivas a puntos cercanos al punto de inicio de la transcripción ya que el acortamiento de la región intermedia supone también el acercamiento de una región negativa localizada entre las posiciones -687 y -596 y que, por algún tipo de reordenación estructural, no ejerce ya su efecto negativo sobre la actividad del promotor.



| | GLUCOSA 4% | | | GLICEROL 2% | | | f |
|--------------|------------|----|--|-------------|----|------|---|
| | Media ± ES | n | | Media ± ES | n | | |
| <i>du9</i> | 1969 ± 137 | 30 | | 3559 ± 239 | 29 | 2,8 | |
| <i>di39</i> | 910 ± 105 | 6 | | 1851 ± 79 | 6 | 2 | |
| <i>di42</i> | 1018 ± 47 | 6 | | 1724 ± 101 | 6 | 1,7 | |
| <i>di37</i> | 904 ± 78 | 6 | | 1892 ± 139 | 6 | 2,1 | |
| <i>di48</i> | 1198 ± 81 | 6 | | 1929 ± 165 | 6 | 1,6 | |
| <i>di45</i> | 1181 ± 93 | 6 | | 1707 ± 287 | 6 | 1,4 | |
| <i>di50</i> | 3251 ± 335 | 12 | | 3083 ± 382 | 10 | 0,95 | |
| <i>d52</i> | 2517 ± 230 | 12 | | 5924 ± 2600 | 12 | 2,3 | |
| <i>di8</i> | 2324 ± 276 | 12 | | 3405 ± 238 | 12 | 1,5 | |
| <i>di113</i> | 1010 ± 74 | 6 | | 1027 ± 31 | 6 | 1 | |
| <i>di114</i> | 102 ± 13 | 6 | | 61 ± 2,5 | 6 | 0,6 | |
| <i>di56</i> | 50 ± 6 | 6 | | 43 ± 5,8 | 6 | 0,9 | |
| <i>di64</i> | 149 ± 75 | 6 | | 166 ± 8 | 6 | 1,1 | |
| <i>q2</i> | 2009 ± 104 | 6 | | 3 317 ± 106 | 6 | 1,6 | |
| <i>q5</i> | 649 ± 16 | 6 | | 979 ± 51 | 4 | 1,5 | |

Figura 23. Actividad β -galactosidasa de las delecciones internas en nmoles de *o*-nitrofenol por mg de proteínas totales y por min. ES: error estándar individual. f: factor de desrepresión calculado mediante la relación de la actividad en medio CM: glicerol 2% y glucosa 4%. n: número de medidas.

En la deleción di113, la actividad disminuye respecto del control. Esta deleción abarca una región entre -486 y -262, y en ella se pierde toda la región positiva antes delimitada (entre -475 y -225) incluyendo las dos regiones CCAAT, el consenso KICPF1 de la posición -492 y el UAS1A. Aunque se han eliminado gran parte de los elementos positivos presentes en el promotor, también se ha eliminado el consenso KICPF1 de la posición -492 y sin embargo, sigue manteniendo aproximadamente la mitad de la actividad del control.

El grupo formado por las deleciones di114, di56, di105 y di64 presenta una actividad muy baja, lo que corrobora la escasa importancia del UAS2 para mantener la actividad del promotor, como ya se había visto en las deleciones unidireccionales. En la deleción di64 hay una pérdida adicional del UAS2 respecto a las otras deleciones de este grupo y sin embargo, tiene una actividad similar a ellas.

Las quimeras q2 y q5, se obtuvieron subclonando los fragmentos (-262, +1) y (-163, +1) de di113 y di64, en un plásmido que contenía toda la región situada 5' respecto al sitio *Pst*I sin deleccionar. En q2 la actividad no varía respecto al control du9 a pesar de haber perdido la región UAS1A responsable de la interacción con Hap1p. Este dato sugiere que las regiones positivas localizadas en posición 5' respecto al sitio *Pst*I pueden llegar a suplir la activación mediada por Hap1p a través del UAS1A. Si observamos la actividad β -galactosidasa que corresponde a la deleción q5, es mucho menor que la de q2. Al comparar los elementos adicionales que han sido eliminados, vemos que q5 ha perdido también la región UAS1B. Cabe pensar que las secuencias positivas localizadas en posición 5' respecto de *Pst*I necesiten la presencia de un sitio de unión para Hap1p para poder ejercer dicho efecto, aunque este sitio UAS1B, conservado en q2 y no en q5, represente un consenso menos adecuado que UAS1A respecto a la interacción con Hap1p.

4.3.2.3. Mutaciones puntuales.

Ya que las cajas CCAAT han sido relacionadas con la desrepresión mediada por el complejo Hap2/3/4/5p, y a pesar de que los datos obtenidos en las deleciones no apoyaban la participación de estos elementos en la desrepresión del gen *KICYC1*, se decidió comprobarlo mediante mutagénesis dirigida. Se mutó la caja CCAAT de la posición -352 y también la región UAS2 que aunque no contiene una caja CCAAT muestra una coincidencia extensa con la región UAS2 del gen *CYC1* que es capaz de unir el complejo Hap2/3/4/5p. El resultado de los ensayos β -galactosidasa, realizados en células transformadas con construcciones del promotor mutado fusionado a *lacZ*, mostró que la actividad no se veía afectada con los cambios puntuales realizados (figura 24).

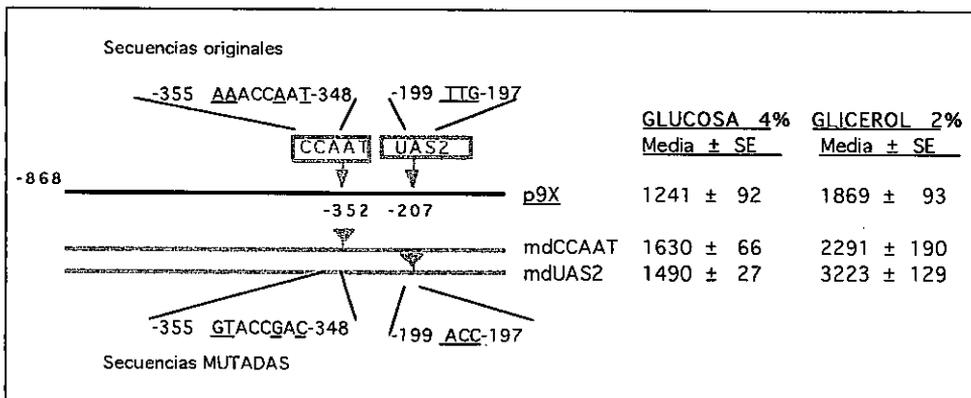


Figura 24. Valores de la actividad β -galactosidasa de las fusiones portadoras de las mutaciones dirigidas mdCCAAT y mdUAS2. SE: error estándar.

También se obtuvo un promotor con el consenso UAS1A mutado que se fusionó con el gen *lacZ* y posteriormente se cuantificaron los niveles de β -galactosidasa en los transformantes (figura 25).

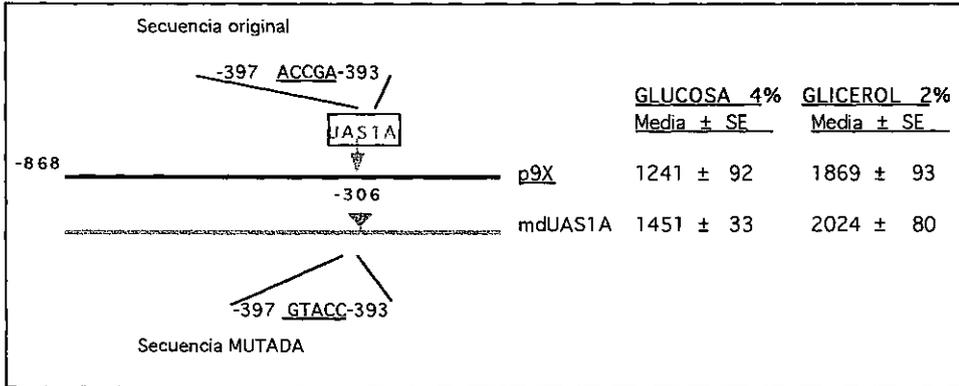


Figura 25. Valores de la actividad β -galactosidasa de las fusiones portadoras de la mutación dirigida mdUAS1A. SE: error estándar.

No se observó tampoco ningún efecto de la mutación UAS1A en la actividad β -galactosidasa, lo que se atribuyó de nuevo a una posible activación mediada por el resto de los factores positivos que intervienen en la regulación del gen *KICYC1*, y a la presencia de "medio sitio" para la unión de Hap1p en el UAS1A mutado.

4.4. Interacciones DNA-proteína.

Para la realización de estos experimentos, se obtuvieron extractos de proteína de células de *K. lactis* creciendo en medio YPG-2% y se hicieron ensayos de retardación para determinar qué regiones del promotor tenían capacidad de formar complejos con proteínas de unión a DNA. Para ello se marcaron tanto oligonucleótidos sintéticos como fragmentos de restricción que contenían los consensos de unión a proteínas.

La utilización de oligonucleótidos como sondas, si bien simplifica la interpretación de resultados porque se estudian sitios reguladores aislados, tiene la desventaja de que puede no reflejar lo que sucede *in vivo* donde la secuencia consenso aparece en un entorno determinado. La posible cooperación entre distintas regiones reguladoras pasaría inadvertida.

Las secuencias que se estudiaron desde el punto de vista de su capacidad de interacción específica con proteínas fueron las que contienen las regiones de unión de Abf1p y Cpf1p, la que contiene el consenso UAS1A y UAS1B para la unión de Hap1p, la que contiene la región UAS2 homóloga al UAS2 de unión del complejo multimérico HAP2/3/4/5p en *S. cerevisiae* y la secuencia localizada entre las posiciones -413 y -333, que en el análisis de deleciones había mostrado tener un efecto activador.

La primera sonda utilizada en los ensayos de retardación contenía el sitio de unión de Abf1p y tres consensos de unión de Cpf1p y se obtuvo a partir del fragmento de restricción *Bam*HI-*Pst*I de 315pb (sonda rest.1, tabla IV). También se preparó otra sonda que contenía el sitio ABF1 y el sitio CPF1 de la posición -670 (sonda rest.2, tabla IV) a partir del plásmido q28 (portador de una deleción del promotor entre -599 y -376).

Las sondas que contenían el UAS1A-UAS1B y el UAS2, se obtuvieron mediante la digestión con *Cfo*I del fragmento *Pst*I-*Hind*III de 211pb obtenido a partir del plásmido di34 (portador de una deleción del promotor entre -407 y -316). De la digestión con *Cfo*I se obtenían dos fragmentos, uno de 103pb

(sonda rest.3, tabla IV) que era el que contenía UAS1A-UAS1B y otro de 211pb (sonda rest.4, tabla IV) que contenía el UAS2.

Tabla IV. Fragmentos de restricción usados como sondas.

| SONDA | Plásmido | Digestión | Tamaño (pb) | Intervalo de la secuencia | Consensos |
|--------|----------|---|-------------|---------------------------|-------------|
| rest.1 | di64 | <i>Bam</i> HI+ <i>Pst</i> I | 315 | (-780,-465) | ABF1/3xCPF1 |
| rest.2 | q28 | <i>Sal</i> I+ <i>Pst</i> I | 269 | (-780,-599) | ABF1/1XCPF1 |
| rest.3 | di34 | <i>Pst</i> I+ <i>Hind</i> III+ <i>Cfo</i> I | 103 | (-314,-212) | UAS1A-UAS1B |
| rest.4 | di34 | <i>Pst</i> I+ <i>Hind</i> III+ <i>Cfo</i> I | 211 | (-211,+1) | UAS2 |

Las sondas del consenso CPF1 de la posición -492 (olig.1, tabla V), la región que aparece entre -413 y -384 (olig.2, tabla V) y la región entre -503 y -474 (olig.3, tabla V) se obtuvieron a partir de oligonucleótidos sintéticos (tabla V). Los oligonucleótidos de tipo A se anillaron con los de tipo B en cantidades equimolares a 70°C dejándose enfriar lentamente durante unos 40min y luego se conservaron congelados hasta su uso como DNA bicatenario. También se utilizaron sondas obtenidas por PCR que se incluyen en la tabla VI.

Tabla V. Oligonucleótidos usados como sondas de DNA y como DNA competidor.

| Oligonucleótido | Posición | Secuencia |
|-----------------|----------|---|
| olig.1 A | -503 | 5'-AATTCGGTCAGTACGTATCACGTGACTGTAACATAG-3' |
| olig.1 B | -474 | 5'-AATTCATATGTTACAGTCACGTGATACGTACTGACCG-3' |
| olig.2 A | -413 | 5'-AATTCGCTTTTCCCACGCCTTTAATCCCCATTAAG-3' |
| olig.2 B | -384 | 5'-AATTCCTTAATGGGGATTAAGCGTGGGAAAAGCG-3' |
| olig.3 A | -361 | 5'-AATTCACGGGAAACCAATGAGAAAAAGTCTCAG-3' |
| olig.3 B | -333 | 5'-AATTCAGAGACTTTTTTCTCATTGGTTTCCCGTTG-3' |

A: hebra de Watson. B: hebra de Crick.

olig.1: Sonda S(-503, -474)

olig.2: Sonda S(-413, -384)

olig.3: Sonda S(-361, -333)

Tabla VI. Fragmentos obtenidos por PCR usados como sondas.

| SONDA | Plásmido DNA molde | Tamaño (pb) | Intervalo de la secuencia | Consensos |
|---------|--------------------|----------------|------------------------------|-------------|
| pcr.1.a | di34 | 306 | (-316,-10) | UAS1 y UAS2 |
| pcr.1.b | di34 | 106 | (-316,-210) | UAS1 y UAS2 |
| pcr.1.c | di34 | | (-338,-10) | UAS1 y UAS2 |
| pcr.2.a | di34 | 48 | (-316,-268) | UAS1A |
| pcr.2.b | di34 | 30 | (-305,-275) | UAS1A |
| pcr.3 | di34 | 31 | (-262,-231) | UAS1B |
| pcr.4 | M13mp18-mdUAS1A | 306 | (-338,-10) | UAS1Amutado |

Las sondas se marcaron con α -dATP³² en los extremos protuberantes 5' con el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Estas sondas se incubaron con los extractos proteicos, obtenidos según las condiciones ya descritas, y los complejos formados se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Los resultados de los experimentos obtenidos para cada sonda utilizada se detallan en los apartados siguientes.

4.4.1. Experimentos de unión DNA-proteína utilizando sondas que contienen el consenso para la unión de Abf1p y Cpf1p.

4.4.1.1. Sondas rest.1 y olig.1.

Se hizo un primer experimento de caracterización de complejos como se observa en la figura 26 (A y C), con concentraciones de proteína crecientes y dos concentraciones de DNA *carrier* (DNA de timo de ternera). El complejo observado en los dos casos se atribuyó a la unión de Cpf1p y se verificó la especificidad del unión DNA-proteína mediante la competición con fragmentos de DNA sin marcar como se muestra en la figura 26 (B y D). La banda caracterizada con las dos sondas se consideró que era la formada por el factor CPF1p como se indica en la figura 26. En la parte A y B de la figura se observa otra banda de menor tamaño que podría corresponder con la unión a Abf1p. Esta

banda desaparece también en el ensayo de competición y su tamaño relativo al complejo formado por Cpf1p se corresponde con datos publicados en el promotor de *KIQCR8* (Mulder y col., 1995).

Cabe señalar que pese a la existencia de tres sitios de unión para Cpf1p en el fragmento rest.1, siempre aparece una única banda de retardación, lo que apoyaría la idea de que sólo uno de ellos es reconocido con alta afinidad por la proteína. Cuando la concentración de proteína aumenta puede haber uniones a los sitios de menor afinidad y se observa un complejo de mayor tamaño.

4.4.1.2. Sonda rest.2.

Se hizo un experimento de retardación con una sonda en la que se eliminaban los consensos CPF1 de las posiciones -513 y -492 (sonda rest.2 fragmento de 269pb entre -780 y -599) (figura 27). Se observaban dos bandas atribuidas a Abf1p y a Cpf1p (figura 27A). El tamaño de la banda CPF1 se incrementaba al aumentar la concentración de proteína. Para ver la especificidad de dicha banda se hicieron experimentos de competición tanto con la misma sonda rest.2 sin marcar, como con la sonda olig.1 con el consenso CPF1 de la posición -492 (figura 27B). Se observó competición con ambos fragmentos lo cual sólo se explicaría teniendo en cuenta que la sonda marcada llevaba el consenso CPF1 de la posición -670 que podría ser el que mantuviese la formación del complejo, en ausencia de los otros dos.

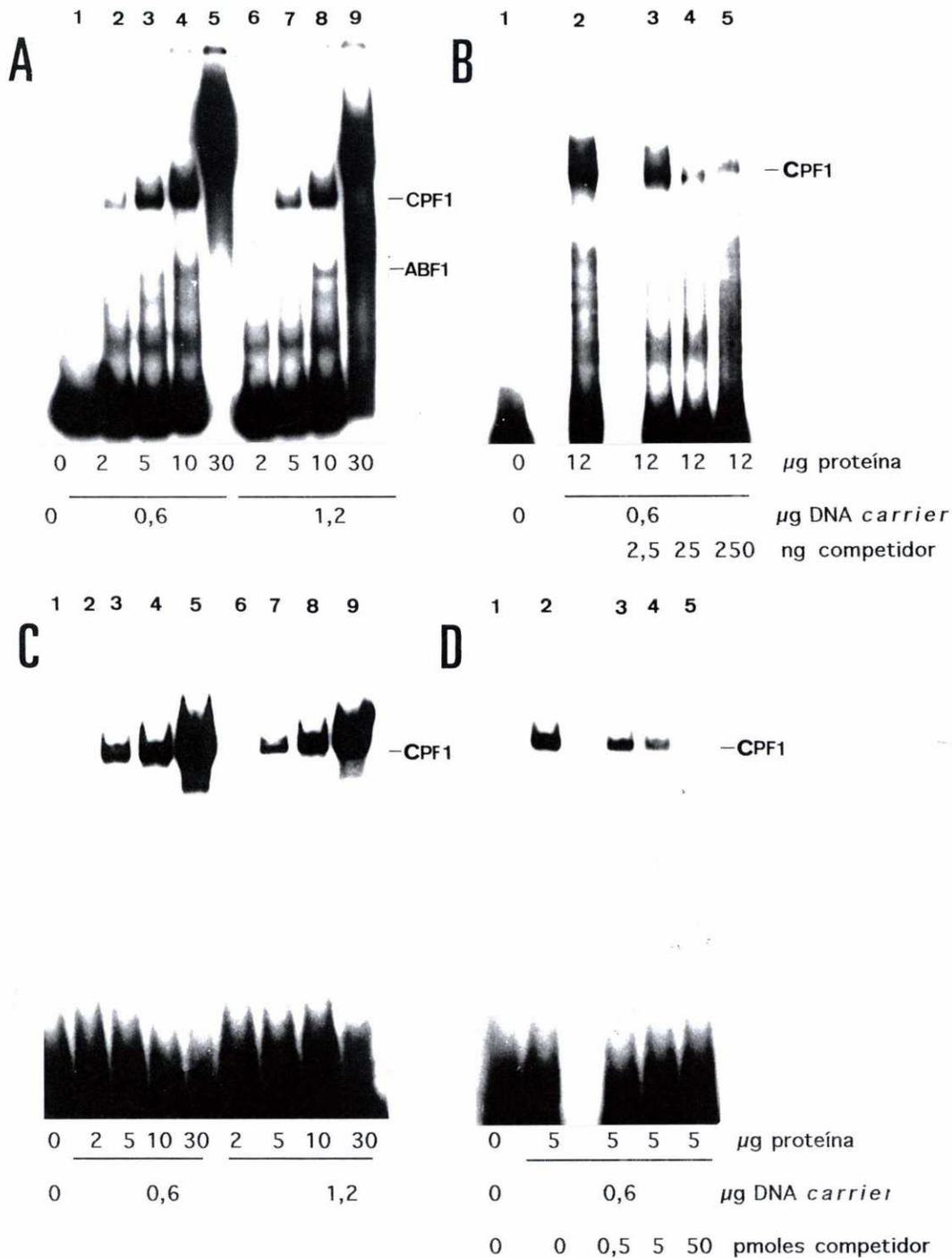


Figura 26. Experimentos de unión DNA-proteínas con los consensos presentes en la región del promotor entre -780 y -465. A y B: sonda rest.1. C y D: sonda olig.1. A y C: caracterización de complejos. B y D: Competición específica con las sondas sin marcar. Los extractos proteicos se hicieron a partir de células de *K. lactis* creciendo en medio YPG-2%.

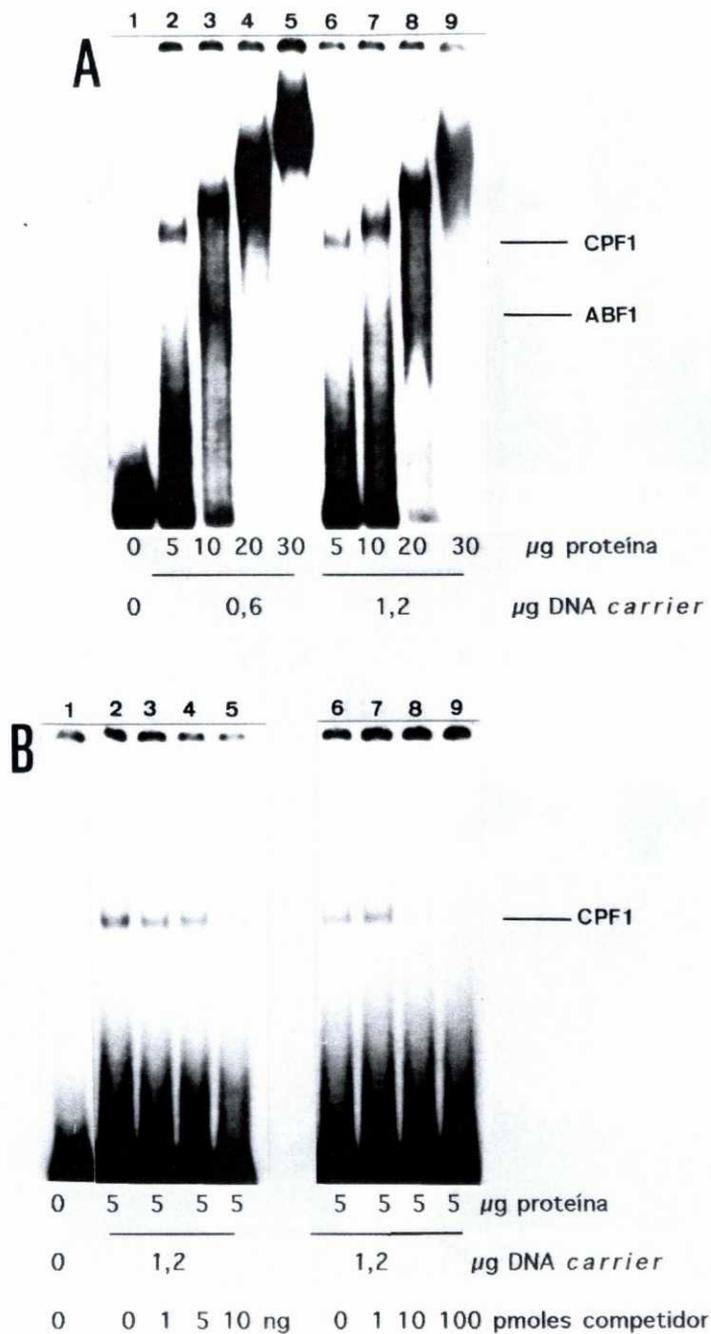


Figura 27. A. Caracterización de complejos DNA-proteína con la sonda de rest.2. B. Ensayos de competición específica: competición con el fragmento rest.2 sin marcar (3-5) y competición con olig.1 sin marcar (7-9). Extracto proteico de Y1140 en YPG-2%.

4.4.1.3. Ensayos de formación del complejo en distintas condiciones de cultivo.

Se hicieron cultivos de la línea de *K. lactis* Y1140 en medio YPD-4%, en medio YPD-4% con burbujeo de N₂ durante dos horas antes de parar el cultivo, en medio YPG-2% y en medio YPG-2% al que se le añadió un 4% de glucosa dos horas antes de parar el cultivo. Se extrajo proteína de las células en fase estacionaria y a la vez se extrajo RNA de las mismas células para tener un control de la expresión del gen *KICYC1* (figura 28).

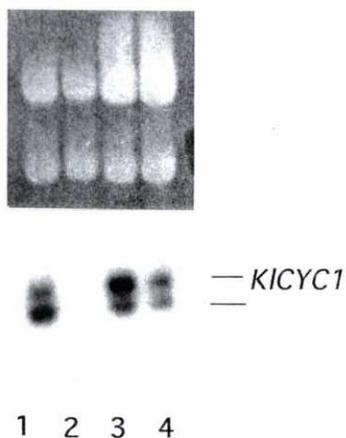


Figura 28. Análisis de RNA total extraído de Y1140 creciendo en diferentes medios: 1: YPD-4%. 2: YPD-4% en condiciones de hipoxia. 3: YPG-2%. 4: YPG-2% con un choque de dos horas con glucosa al 4%. Se hibridó con la sonda *PstI-PstI* de pART10 conteniendo el gen *KICYC1*. Se cargaron 20µg de RNA y se muestra el gel teñido con bromuro de etidio en el que se visualiza el RNA ribosómico como control de carga (parte superior de la figura).

Se hicieron ensayos de unión DNA-proteína con los extractos proteicos de los diferentes medios y las sondas rest.2 conteniendo el sitio ABF1 y el sitio CPF1(-670), y olig.1 conteniendo el sitio CPF1(492). Los resultados (figura 29) indicaron que el complejo se formaba en todas las condiciones de cultivo ensayadas.

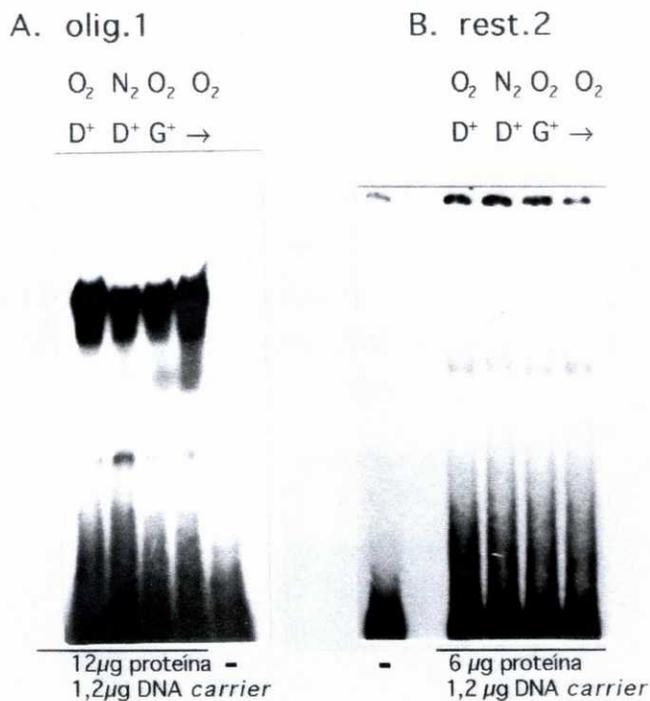


Figura 29. Formación de complejos DNA-proteína a partir extractos proteicos de cultivos en diferentes condiciones: D⁺= YPD-4%, G⁺= YPG-2%, (→)= YPG-2%→4%glucosa, N₂=hipoxia y O₂=aerobiosis. A: sonda olig.1. B: sonda rest.2. (-): sonda sin proteína.

4.4.2. Experimentos de unión DNA-proteína con secuencias correspondientes a la zona comprendida entre -413 y -333 del promotor de *KICYC1*.

Mediante los ensayos de delección se observó un efecto regulador en la región que abarcaba desde -413 hasta -333. Esta región contenía un consenso CCAAT de la posición -352 y una región que presentaba una repetición directa de la secuencia TCCCCAY, entre -413 y -384, que nos pareció de interés para su estudio. Se usaron dos fragmentos incluidos en esta región, olig.2 y olig.3 (Tabla V) como sondas para detectar interacciones específicas con proteínas extraídas de *K. lactis* creciendo en medio YPG-2%.

4.4.2.1. Sondas olig.2 y olig.3.

En los primeros experimentos de caracterización se observó la aparición de una banda ténue y un halo intenso y difuso (figura 30) tanto con la sonda olig.2(-413, -384) como con la sonda olig.3 (-362, -333). El complejo formado presentaba una migración similar con ambas sondas aunque era más débil con la sonda olig.2.

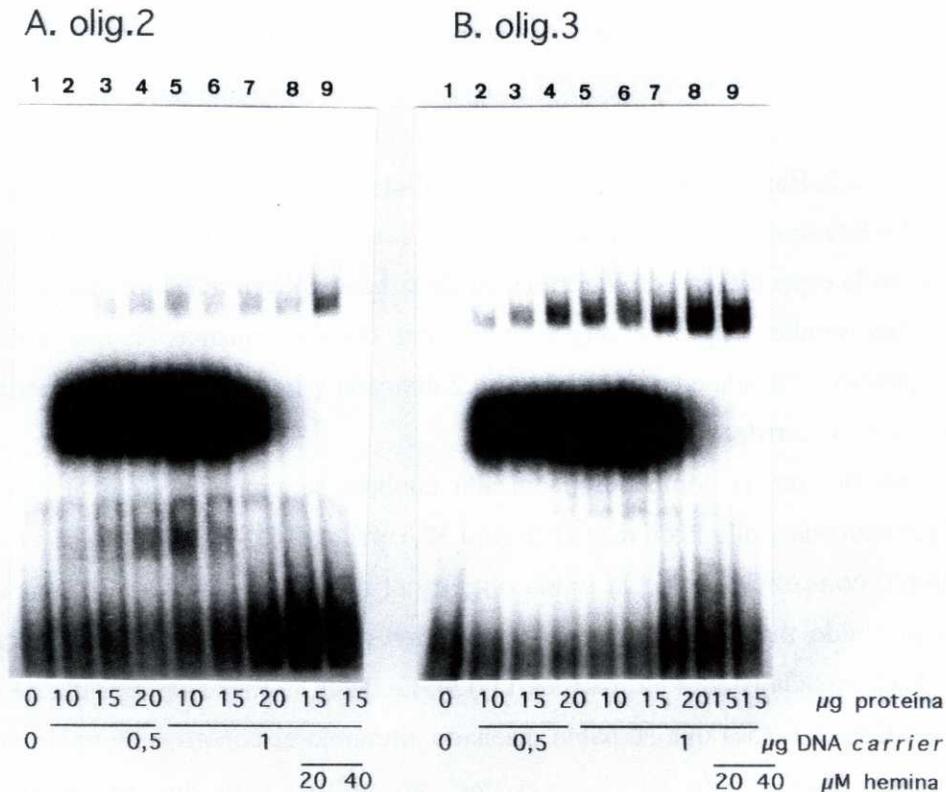


Figura 30. Caracterización de complejos DNA-proteína formados utilizando como sondas, A: olig.2 (conteniendo la secuencia repetida TCCCCA) y B: olig.3.

Puesto que se esperaba para este promotor una regulación por oxígeno, se ensayó la reacción de unión DNA-proteína con diferentes concentraciones de hemina (figura 30 pocillos 7, 8 y 9), observándose que en estas condiciones disminuía el halo difuso que aparecía debajo de la banda de retardación y se incrementaba la nitidez de la banda. Una vez comprobado que la desaparición del halo no se debía ni a la presencia en la reacción de etilen-glicol (utilizado para preparar la disolución de hemina), ni al azul de carga, y que el complejo no se formaba como consecuencia de la adición de hemina a la reacción (se ensayaron reacciones control sin proteína y con hemina en las que no se formaba la banda) se hicieron ensayos de competición.

4.4.2.2. Ensayos de competición específica.

Se llevaron a cabo ensayos de competición con las sondas sin marcar y se observó la especificidad de la formación de la bandas (figura 31). Se comprobó que las sondas olig.2 y olig.3 competían consigo mismas y que había competición cruzada entre la sonda olig.2 marcada y la sonda olig.3 sin marcar (figura 31A, carriles 6 y 7).

Se vio que la competición cruzada también se producía entre la sonda olig.3 marcada y olig.2 sin marcar (figura 32, carriles 7-9). Y además también se observó competición entre la sonda olig.3 y el fragmento sin marcar *PstI-PstI* del plásmido mdCCAAT que contiene 376pb del promotor con la secuencia CCAAT mutada (figura 32, carriles 11-13). Es decir, la mutación dirigida de la caja CCAAT (-352) que se había diseñado alterando el consenso de unión del complejo Hap2/3/4/5p de *S. cerevisiae*, no influye para que se produzca retardación, lo que indica que aunque la sonda contiene la caja CCAAT ésta no es responsable de la formación de este complejo. En este mismo experimento también se incluyó la reacción de unión DNA-proteína a partir de un extracto de la línea de *K. lactis* con el gen *KIHEM1* interrumpido y se vio que a pesar de que *in vitro* la adición de hemina a la reacción favorece la formación del complejo, *in vivo* dicho complejo se sigue formando incluso cuando la ruta de la

4.4.2.3. Formación del complejo DNA-proteína con extractos de las líneas *Klhap2* y *Klhap3*.

La secuencia CCAAT es un consenso definido para la unión del complejo multimérico Hap2/3/4/5p en una serie de genes relacionados con funciones respiratorias que se desreprimen en ausencia de glucosa. A pesar de que ya pensábamos que el complejo observado no incluía a las proteínas KlHap2p y KlHap3p, pues había competición específica con una sonda en la que se había mutado una caja CCAAT (figura 32), decidimos hacer un abordaje funcional más directo partiendo de extractos proteicos obtenidos a partir de líneas de *K. lactis* que contenían los genes *KIHAP2* y *KIHAP3* delecionados, amablemente cedidas por M. Bolotin-Fukuhara y L. Grivell. Los resultados obtenidos confirmaron que la formación de la banda de retardación era independiente de la presencia o ausencia de las proteínas KlHap2p y KlHap3p (figura 33).

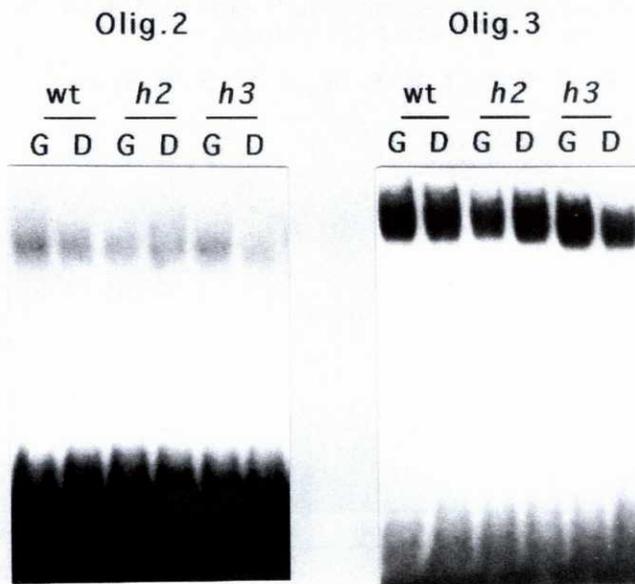


Figura 33. Experimentos de unión DNA-proteína con la sonda olig.2 (carriles 1-6) y con la sonda olig.3 (carriles 7-12) utilizando extractos proteicos de Y1140 (wt), de MW270-7B/16 (*hap2*: h2) y de WMH7302 (*hap3*: h3) creciendo en medio YPG-2%(G) y en medio YPD-4%(D). Se añadieron 6µg de proteína , 1,2µg de *carrier* en todas las reacciones y 40µM de hemina.

4.4.2.4. Formación del complejo DNA-proteína en distintas condiciones de crecimiento.

Considerando que la formación del complejo se veía favorecida con la presencia de hemina *in vitro* y aunque ya se había demostrado (figura 32) que el complejo era independiente de la disponibilidad de hemo *in vivo*, se estudió la capacidad de unión a DNA de proteínas extraídas de células de *K. lactis* creciendo en medios con diferentes fuentes de carbono (fermentables y no fermentables) y en condiciones de hipoxia. Los resultados mostraron que el complejo se formaba en todas las condiciones ensayadas (figura 34). El análisis de expresión génica mediante *Northern*, usando células de los mismos cultivos a partir de los cuales se extrajeron proteínas (figura 28), mostraba que había diferencias de expresión de *KICYC1* que garantizaban las condiciones de la extracción; la regulación de *KICYC1* seguía el patrón previamente descrito disminuyendo la expresión en hipoxia y mostrando una pequeña represión en glucosa (Freire Picos y col., 1995).

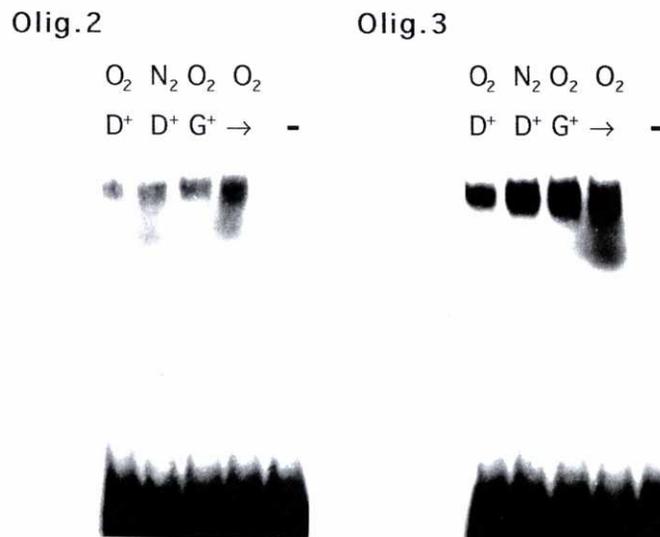


Figura 34. Formación de complejos DNA-proteína con las sondas olig.2 y olig.3 utilizando extractos proteicos de cultivos en diferentes condiciones:

D⁺= YPD-4%, G⁺= YPG-2%, (→)= YPG-2%→4%glucosa, N₂=hipoxia y O₂=aerobiosis. A: sonda olig 1. B: sonda rest.2. (-): sonda sin proteína.

Se añadieron 12μg de proteína, 1,2μg de DNA *carrier* y 40μM de hemina a todas las reacciones.

4.4.3. Caracterización funcional de los consensos UAS1A y UAS1B.

4.4.3.1. Expresión heteróloga del gen *KICYC1* en las líneas de *S. cerevisiae* ZW10 y ZW13.

Puesto que se observó la presencia de regiones consenso para la unión de Hap1p al promotor del gen *KICYC1*, se estudió el efecto que tenía dicha proteína sobre la expresión del gen bajo el control del promotor de 376pb (datos publicados, Freire Picos *et al.*, 1995) y con una región promotora más extensa que abarca la región analizada en este trabajo.

Se hicieron experimentos de expresión heteróloga del gen *KICYC1* en las líneas mutantes para los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae*, ZW10 y ZW13. La línea ZW10 es además mutante para el gen *HAP1*. Se transformaron estas líneas con los plásmidos pCAF10 y pCAF11 descritos en Materiales y Métodos, portadores del gen *KICYC1* con un promotor de 376pb (pCAF10) y con un promotor de 1810pb (pCAF11) y se extrajo RNA de cultivos creciendo en medio YPG-2%. El experimento de *Northern* se llevó a cabo utilizando como sonda el fragmento de 1900 pb *PstI-PstI* del plásmido pART10 marcado con digoxigenina.

La deficiencia de Hap1p mostró un efecto sobre la expresión, en ZW10 la expresión era menor con ambos tamaños de promotor (figura 35) .

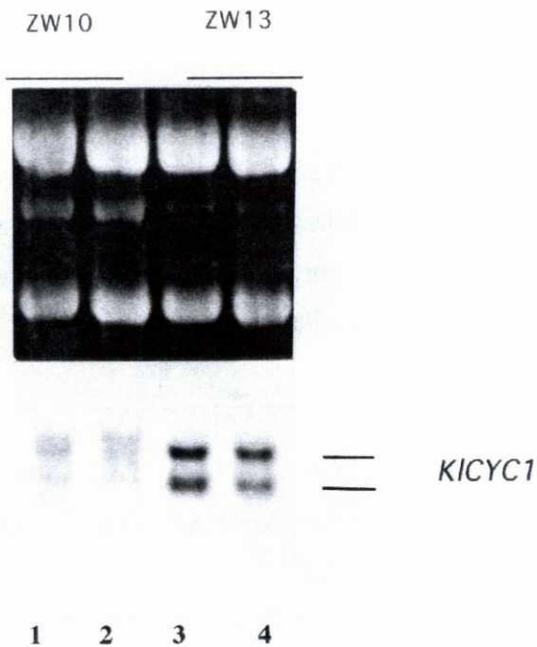


Figura. 35. Análisis de RNA de las líneas de *S. cerevisiae* ZW10 y ZW13 transformadas con los plásmidos portadores del gen *KICYC1* con dos tamaños de promotores diferentes: pCAF10 (promotor de 376 pb) y pCAF11 (promotor de 1810 pb). 1: ZW10 transformada con pCAF10. 2: ZW10 transformada con pCAF11. 3: ZW13 transformada con pCAF10 y 4: ZW13 transformada con pCAF11. El RNA se extrajo a partir de cultivos creciendo en medio YPG-2%. A: tinción del RNA ribosómico con bromuro de etidio como control de carga. B: membrana hibridada con una sonda conteniendo *KICYC1* marcada con digoxigenina.

4.4.3.2. Experimentos de unión DNA-proteína con la región homóloga al UAS1A de *CYCI* y UAS de *CYC7* (sonda rest.3).

En el siguiente esquema (figura 36) se muestra la homología que presenta el sitio UAS1A y UAS1B localizado en el promotor de *KICYCI* respecto a la secuencia consenso propuesta por Ha y col. (1996) que se tomó de referencia para la realización de estos experimentos.

| | | | | | |
|-------------------------------|------|-----|-----------------|-----|------------------|
| <i>KICYCI</i> (UAS1A) | ATTT | CGG | GAACA <u>T</u> | CGG | TCAAGAC |
| <i>KICYCI</i> (UAS1B) | TTTT | CGG | TTTA <u>A</u> G | TAG | TTAA <u>A</u> AA |
| Consenso (Ha y col., 1996) | | CGG | NNNT <u>A</u> N | CGG | NNNT <u>A</u> |

Figura 36. Esquema de las homología de diferentes regiones de unión de la proteína Hap1p.

Caracterización de la unión UAS1A-proteína utilizando extractos de proteína de *K. lactis*.

Se hicieron diferentes experimentos con el fin de caracterizar un complejo DNA-proteína con la sonda que contiene el sitio homólogo al UAS1A, consenso de unión de la proteína Hap1p. Se utilizaron tres líneas distintas de *K. lactis* : MW98-8C, Y1140 y K132144 y no apareció ningún complejo con los extractos proteicos derivados de ellas.

Se consideró la posibilidad de que la concentración de esta proteína en el extracto total fuese tan baja que no permitiese visualizar el complejo de retardación por lo que se hicieron diversos ensayos para enriquecer el extracto en la proteína Hap1p. Se concentraron los extractos mediante filtración con una membrana *Microcon-Amicon*[®] con tamaño de poro para concentrar proteínas de un tamaño mayor de 100KDa. Puesto que en *S. cerevisiae* Hap1p tiene un tamaño de 1483 (163KDa) este método podría servir para tener un extracto enriquecido en esta proteína, pero el resultado obtenido en los ensayos de retardación también fue negativo. Otra condición ensayada fue la concentración

de los extractos proteicos por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ según las condiciones descritas por Lodi y col. (1996) y que resultan adecuadas para la visualización de un complejo homólogo en *S. cerevisiae*. El mejor resultado obtenido utilizando esta técnica se muestra en la figura 37 en la que se partió de cultivos a $A_{600}=0,8$ y $A_{600}=2,1$. Se producía retardación y la fase del cultivo influía en la formación del complejo, existiendo mayor retardación en el caso de los extractos obtenidos a partir de cultivos en $A_{600}=0,8$. Sin embargo tras muchos intentos, no pudieron mejorarse los resultados a partir de extractos de *K. lactis*, por lo que se decidió comprobar si se producía una unión específica con el factor Hap1p de *S. cerevisiae* obtenido a partir de la línea Sc334, sobreproductora de Hap1p y cedida amablemente por B. Guiard, según se describe a continuación.

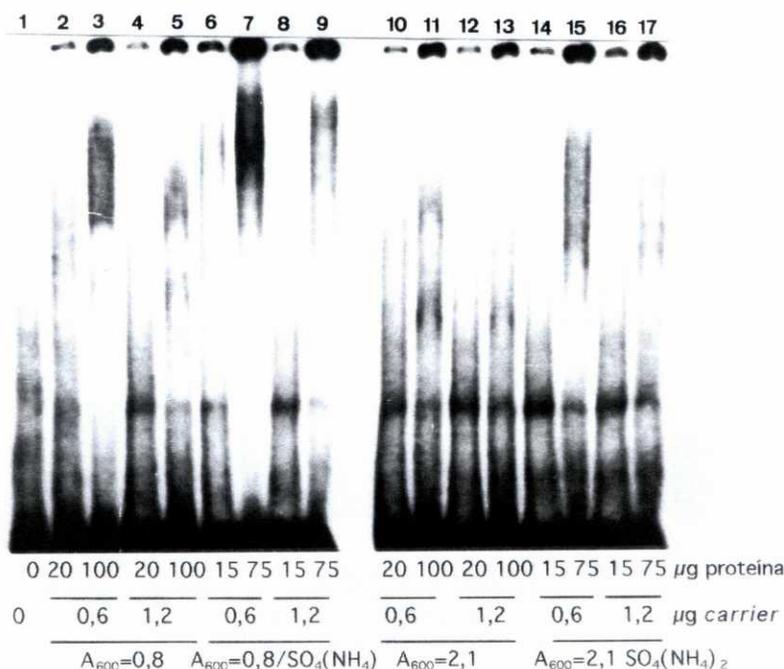


Figura 37. Experimentos de unión DNA-proteína con la sonda rest3 del consenso UAS1. Se usaron extractos proteicos de Y1140 en varias condiciones: 2-5: a partir de cultivos en fase exponencial ($A_{600}=0,8$), 6-9: a partir extracto de cultivos a una $A_{600}=0,8$ que se concentraron por precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 10-13: a partir de cultivos a una $A_{600}=2,1$ y 14-17: a partir de cultivos a una $A_{600}=2,1$ que se concentró por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El control de la sonda sin proteína se puede ver en el pocillo 1.

Experimentos de unión DNA-proteína con extractos de *Saccharomyces* enriquecidos en Hap1p.

Se hicieron ensayos de retardación con extractos proteicos de la línea Sc334 de *Saccharomyces cerevisiae* sobreproductora de Hap1p (Fytlovich y col., 1993) y se obtuvo un complejo nítido y específico según revelan los ensayos de competición con la sonda rest.3 conteniendo el UAS1A y el UAS1B (figura 38). Los buenos resultados obtenidos nos animaron a completar el estudio en colaboración con el Profesor Bernard Guiard (CNRS associé à l'Université Pierre et Marie Curie, Francia). Se estudiaron varias regiones del promotor.

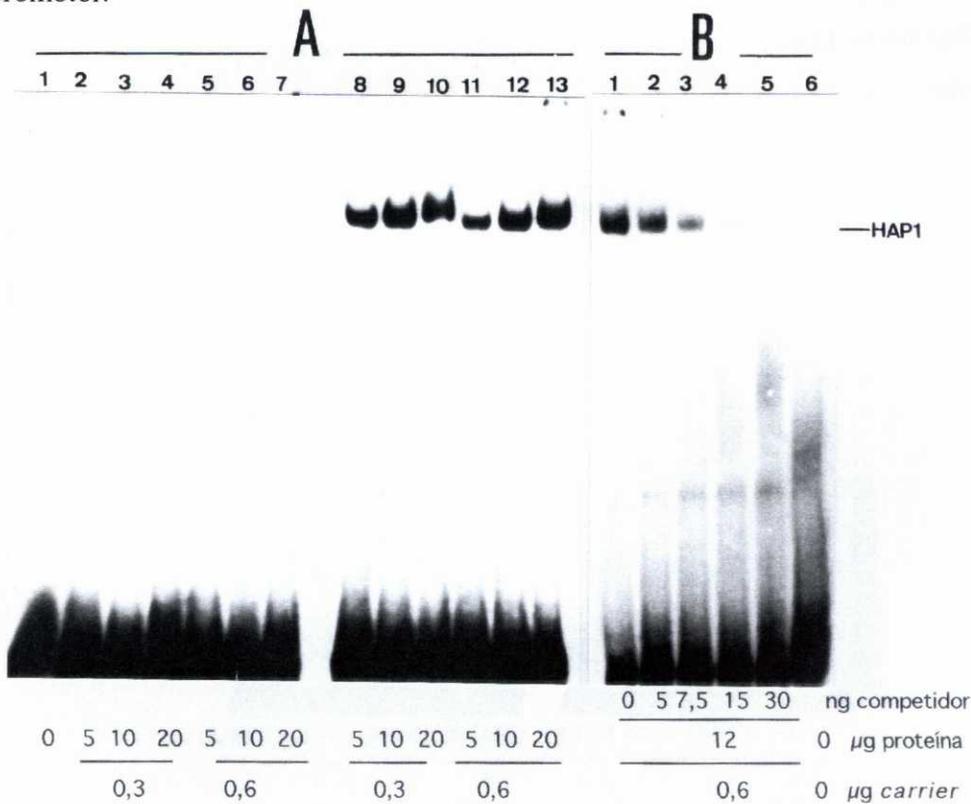


Figura 38. A. Ensayo de retardación con extractos proteicos de Y1140 creciendo en YPG-2% (2-7) y de *S.c.*334 creciendo en YP-galactosa 2%(8-13) con la sonda rest3.
B. Ensayo de competición específica con el fragmento rest3 sin marcar. Se añadieron 12µg de extracto de proteína de Sc.334 y 0,6µg de DNA carrier. 1: reacción sin competidor. 2-5: 5ng, 7,5ng, 15ng y 30ng de competidor. 6: control sin proteína.

Caracterización del complejo con la sonda *pcr1a* (-316,-10).

En primer lugar se utilizó una sonda que contenía la secuencia entre las posiciones -316 y -10, amplificada por *PCR*, observándose la aparición de un posible complejo intenso y otro superior que sólo aparecía al aumentar la concentración de proteína. Este complejo secundario se pensó que podría deberse a la interacción con el sitio UAS1B (figura 39).

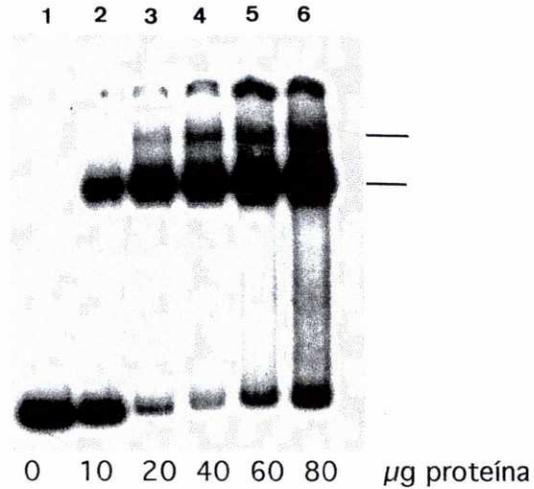


Figura 39. Experimentos de retardación de extracto de Sc334 con la sonda *pcr1a*, conteniendo los sitios UAS1 de *KICYCI*. 1: control sin proteína. 2: 10µg de proteína, 3: 20µg, 4: 40µg, 5: 60µg y 6: 80µg de extracto de proteínas.

Caracterización del complejo con las sondas *pcr1a* (-316, -10), *pcr2a* (-316, -268) y *pcr1b* (-316, -210).

Se hizo entonces un ensayo con distintos tamaños de sonda obtenidas por PCR. (figura 40). La sonda *pcr1a* contenía la secuencia desde -316 hasta la posición -10, la sonda *pcr2* sólo incluía el sitio UAS1A (de -316 a -268) y la sonda *pcr1b* contenía tanto UAS1A como UAS1B (de -316 a -210). El resultado indicaba que la segunda banda superior efectivamente estaba asociada al UAS1B, puesto que cuando no se incluía en la sonda el sitio UAS1B desaparecía.

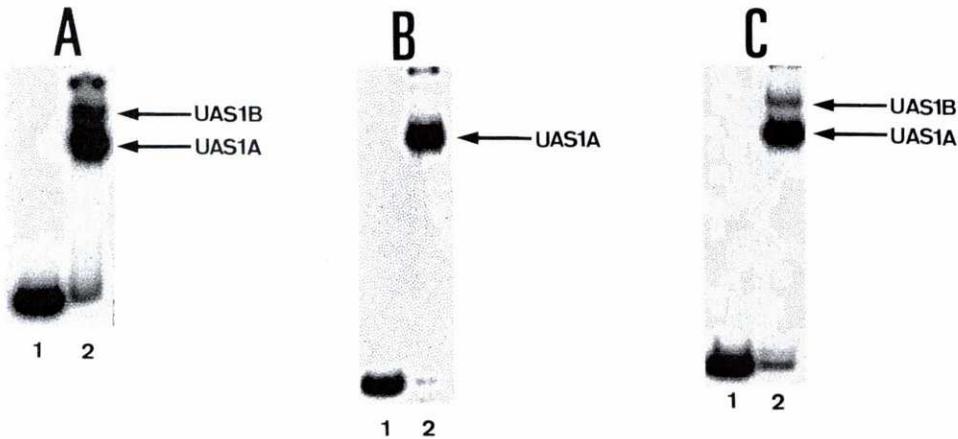


Figura 40. Experimentos de retardación de extracto de *S.c.334* con diferentes sondas. A: *pcr1a*, B: *pcr2a* y C: *pcr1b*. Carril 1: control sin proteína. Carril 2: 40µg de proteína.

Caracterización del complejo formado con la sonda portadora del consenso UAS1A mutado.

Puesto que el complejo formado con el extracto de *S.c.334* era específico para la secuencia estudiada, se decidió hacer ensayos de unión DNA-proteína con una sonda que contenía la mutación mdUAS1A descrita en Materiales y Métodos en el apartado de mutagénesis dirigida (tabla III). Se amplificó por PCR la secuencia entre -338 y -10 a partir del plásmido M13mp18-mdUAS1A (pcr4).

El resultado mostró que el complejo se formaba con mucha menor intensidad cuando se usaba la sonda mutada (figura 41). La presencia de tan solo "medio sitio" de la repetición directa necesaria para una interacción óptima con Hap1p sería responsable de la interacción más débil observada en el mutante.

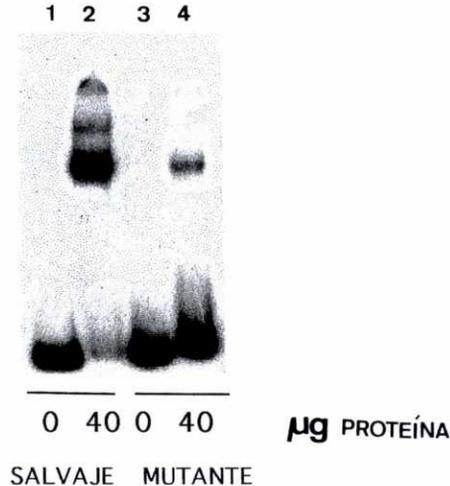


Figura 41. Experimentos de retardación de extracto de *Sc 334* con las sondas entre -338 y -10 conteniendo la secuencia de UAS1 salvaje, pcr1c (1y2) y la secuencia mutada pcr4 (3 y 4). Se añadieron 40µg de proteína.

Competición específica con el extracto proteico de la línea Sc334.

Para comprobar la especificidad de la unión de Hap1p al UAS1A se hizo un ensayo de competición específica con un fragmento de 30pb que contiene sólo el UAS1A amplificado por PCR, pcr2b (entre -305 y -275).(figura 42A). Se observó claramente la competición y este resultado complementaba el observado en la figura 38B.

Por último, en la figura 42B, se vió que la región UAS1A, mutada, y con menor capacidad para unir Hap1p, compite con la región UAS1B (sonda pcr3).

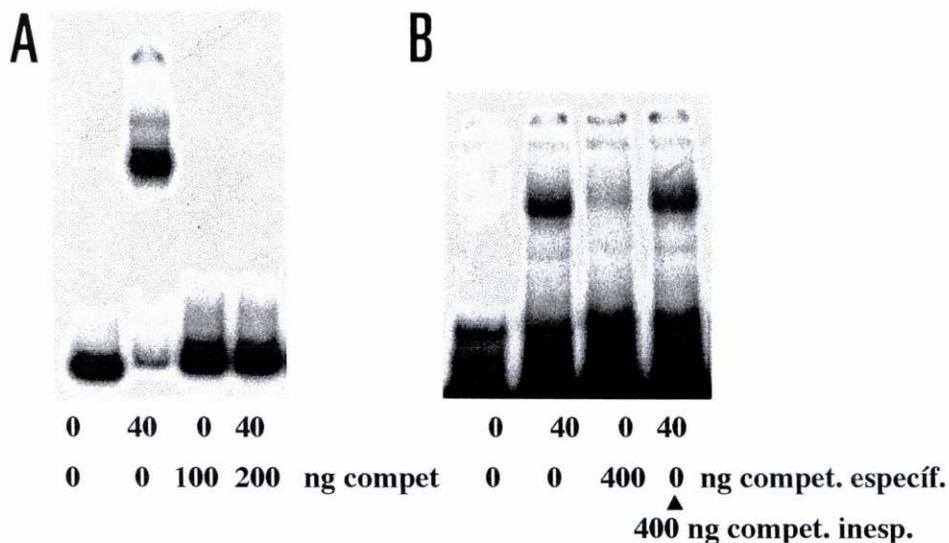
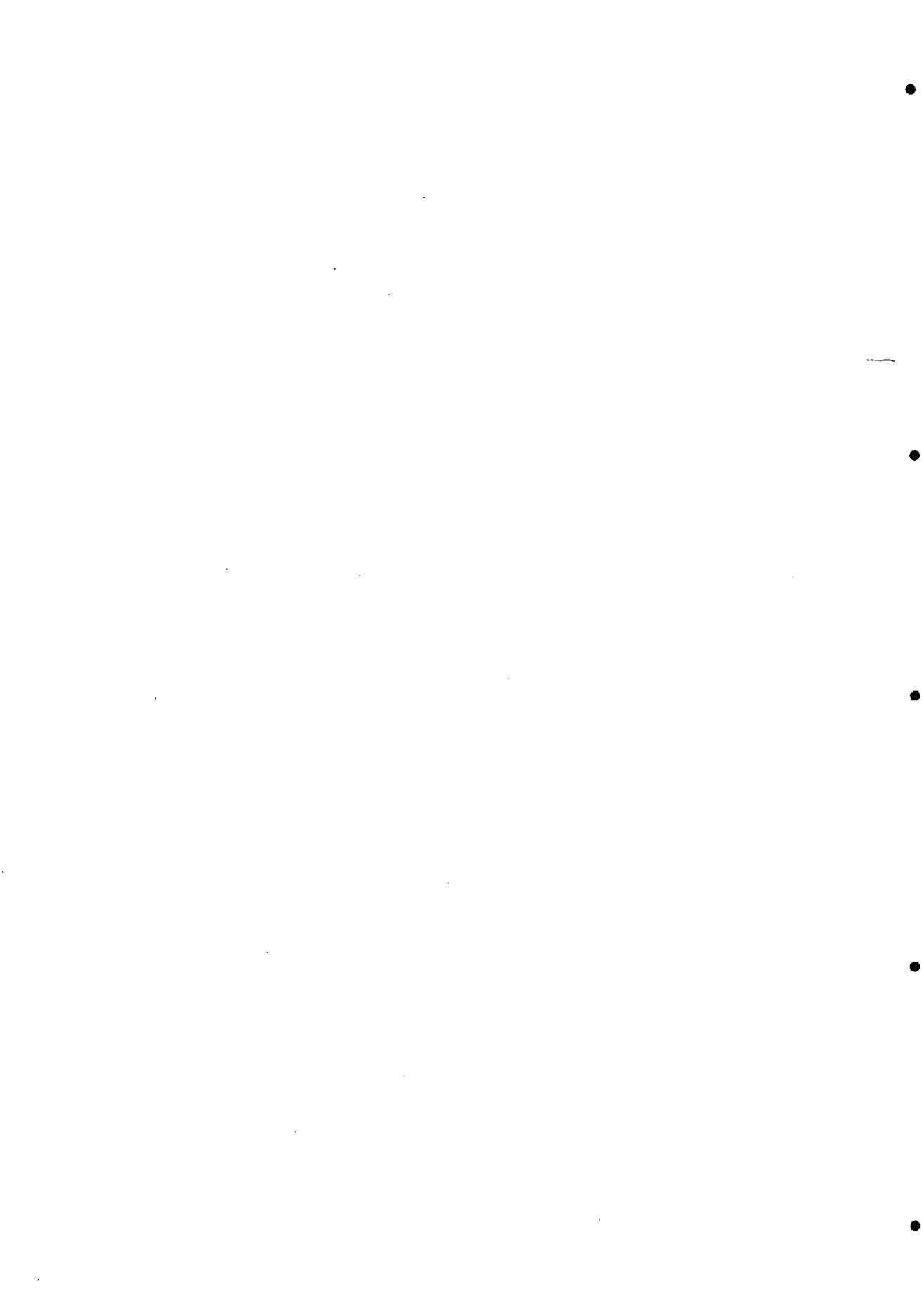


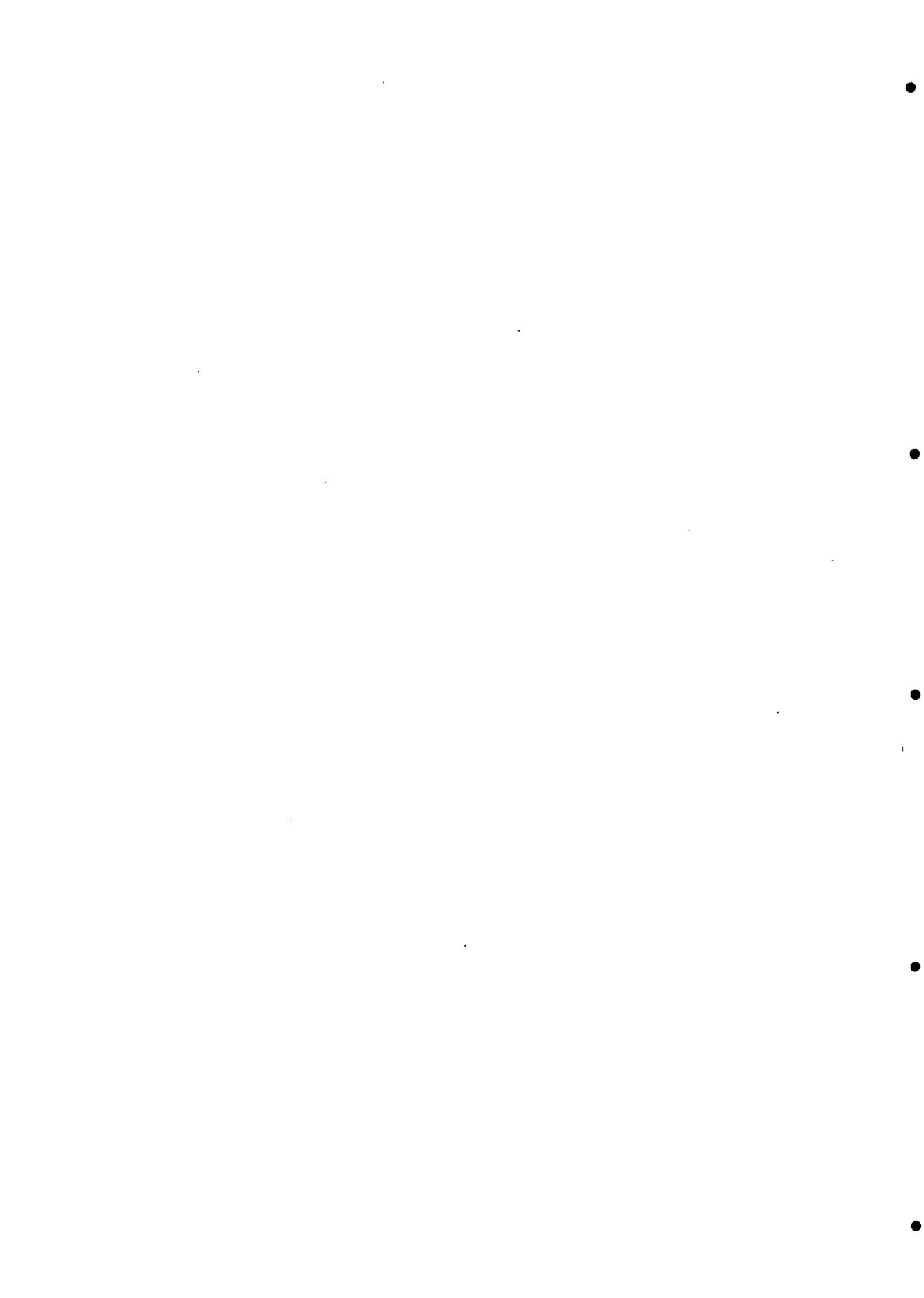
Figura 42. A. Experimentos de competición entre la sonda amplificado por PCR de entre -316 y -10 marcada (pcr1a) y el oligonucleótido de 30pb que contiene específicamente el sitio UAS1A. Las reacciones se llevaron a cabo con 40µg de extracto proteico de Sc334 (2-4) y reacción control sin proteína (1). Se añadieron 100ng (3) y 200ng (4) de DNA competidor. B. Competición entre sonda amplificada por PCR pcr4 (entre -338 y -10 que lleva el UAS1A) y el oligonucleótido pcr3 de 31pb entre -262 y -231 que contiene el sitio UAS1B. Se añadieron 40µg de proteína (2-4) y en 1 no se añadió proteína. En la reacción B3 se añadieron 400ng de competidor y en la 4 se añadió como competidor inespecífico (compet. inesp) un oligonucleótido de 26pb: (5'-CAGCAGACCCCCACCGCCCGCATCCC-3).

4.4.4. Experimentos de unión DNA-proteína con el fragmento que contiene el consenso UAS2.

Se usó como sonda la secuencia de 211pb que se corresponde con las primeras 211pb en posición 5' respecto del ATG del gen *KICYC1* (sonda rest.4) y extractos de proteína total de *K. lactis*. Aunque había retardación no se formaba ninguna banda nítida que pudieramos caracterizar, pues al añadir más DNA *carrier* el complejo no se formaba. En colaboración con el Profesor Guiard, se han hecho intentos de obtener el complejo de retardación con las proteínas Hap2p y Hap3p de *S. cerevisiae* purificadas y por el momento tampoco se ha obtenido ningún resultado.



5. DISCUSIÓN



Existen numerosas diferencias entre la fisiología de *K. lactis* y la de *S. cerevisiae* que pueden estar relacionadas con la expresión de genes del metabolismo respiratorio y fermentador en ambas levaduras (González-Siso y col. 1996). El hecho de que el gen *KICYC1* se exprese más que el gen *ScCYC1*, se puede relacionar con el metabolismo fundamentalmente respiratorio que presenta *K. lactis* frente al metabolismo fermentador de *S. cerevisiae*. En condiciones aerobias otro hecho diferenciador, citado por diversos autores, consiste en que la represión catabólica (represión por glucosa y desrepresión en fuente de carbono no fermentable) no tiene mucha importancia en *K. lactis* (Mulder y col., 1995, Wésolowski-Louvel y col., 1996 y González Siso y col., 1996).

En un estudio anterior (Freire Picos y col., 1993) se describió la secuencia de 371pb de la región 5' del promotor de *KICYC1* y se localizaron elementos reguladores potenciales basándose en las semejanzas con las señales *cis* que aparecen en el promotor del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*. En el presente trabajo se ha ampliado el estudio de la región 5' hasta 1810pb, delimitando un promotor funcional en una secuencia de 868pb. Se ha comprobado la importancia que presenta la región que incluye el consenso UAS1A para la unión del factor Hap1p. Se ha localizado además una región activadora entre las posiciones -465 y -421 que es capaz de formar un complejo DNA-proteína hasta el momento no asociado con ninguna proteína reguladora conocida. En este promotor se han encontrado secuencias consenso para las proteínas reguladoras multifuncionales Abf1p y Cpf1p que son también importantes en el control de la transcripción. La distancia de estos consensos respecto al punto de inicio entra dentro de los márgenes descritos para promotores de levaduras, de 100 a 1500pb (Struhl, 1989); por ejemplo, en el gen *MOX* de *Hansenula polymorpha*, la región promotora es de 1500pb (Gödecke y col. 1994), en el gen *CYT1* de *S. cerevisiae* es de 766pb (Oechner y col. 1992) y en el gen *KILAC4* de *K. lactis* 679pb (Ruzzi y col., 1987).

5.1. Efecto de los factores transcripcionales multifuncionales en el promotor de *KICYC1*.

5.1.1. Abf1p.

Hemos podido comprobar que la eliminación de la región situada 5' respecto de la posición -687, y que incluye el consenso para el factor multifuncional Abf1p, se traduce en una disminución de la actividad β -galactosidasa del promotor fusionado al gen *lacZ* (figura 22), indicando un efecto regulador positivo. Esto está de acuerdo con el papel descrito hasta ahora para Abf1p, como activador en algunos promotores, o como modulador de la estructura de la cromatina excluyendo nucleosomas o curvando el DNA (*DNA bending*) y favoreciendo la acción de otros factores (Planta y col., 1995). En efecto, Abf1p se ha asociado con la exclusión de los nucleosomas en el promotor del gen *QCR8* que codifica para la subunidad VIII del complejo *bcl* mitocondrial (De Winde y col., 1993).

Existe un homólogo funcional de Abf1p en *K. lactis*. Gonçalves y col. (1992) han clonado el gen que codifica para Abf1p en *K. lactis* y hay genes de *K. lactis* que están regulados por esta proteína, por ejemplo, el gen ribosomal S33 (Hoekstra y col. 1992).

Aunque Abf1p es considerado un factor regulador general que mantiene altos los niveles de transcripción, se ha relacionado también con la desrepresión en ausencia de glucosa. Se ha visto que la fosforilación de Abf1p activa de manera diferencial a los genes *COX6* y *ADH1* en función de la fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento, siendo mayor en medio con glicerol que en medio con glucosa (Silve y col., 1992; Yoo y col., 1995). Sin embargo, los datos obtenidos con el gen *KICYC1* demuestran que en la construcción *du10*, en la que la región de unión a Abf1p ha sido eliminada, sigue existiendo desrepresión en glicerol (figura 22).

Los ensayos de retardación sugieren una interacción de una proteína de *K. lactis* con el consenso de Abf1p presente en el promotor de *KICYC1*. La

banda observada es muy débil (figura 26) y su adecuada caracterización requerirá futuros estudios con el factor purificado. Una posible interpretación a estos resultados podría basarse en la escasa afinidad de la unión (Hoekstra y col., 1992, Mulder y col., 1995) a pesar de ser una proteína abundante (Gonçalves y col., 1992). Además, en el promotor de *KIQCR8* se ha visto que KlAbf1p interacciona muy débilmente con su región consenso, pero presenta la posibilidad de formar un complejo heteromérico con KICpf1p que interacciona con el promotor a través del consenso de KICpf1p (Mulder y col., 1995).

La unión del factor Abf1p a los promotores de genes de *S. cerevisiae* tiene unas características distintas a la interacción que se produce en *K. lactis*. Mulder y col. (1994b) comparando los genes homólogos *QCR8* y *KIQCR8*, han encontrado que el complejo Abf1p-DNA que se forma con extractos de *S. cerevisiae* es mayor y más intenso que el que se forma en *K. lactis* (De Winde y Grivell, 1995). Dorsman y col. (1988) demostraron que Abf1p forma un complejo específico y estable con su correspondiente consenso en el promotor del gen *CYCI* de *S. cerevisiae*.

La aparición simultánea de los consensos para Abf1p y para Hap2/3/4/5p que hemos constatado en el promotor de *KICYCI* (figura 14) también se ha observado en otros genes de levaduras que codifican para proteínas mitocondriales, entre ellos el gen *CYCI* antes mencionado (Trawick y col. 1992; De Winde and Grivell, 1993; Betina y col. 1995; Dorsman y col., 1988). Esto sugiere que esta configuración de los dos consensos puede ser importante en la biogénesis mitocondrial (De Winde y Grivell, 1992). Otro punto interesante a considerar es la presencia de sitios de unión para Abf1p en genes altamente expresados, por ejemplo *ADHI* que es uno de los genes con más alta expresión en *S. cerevisiae* y en el que no se ha encontrado ningún otro elemento capaz de controlar la regulación de un modo carbono-dependiente además de Abf1p (Yoo y col., 1995).

5.1.2. Cpf1p.

Cpf1p se ha descrito que puede interaccionar tanto sobre elementos de los centrómeros como sobre promotores de genes (Mellor y col., 1990). Cpf1p puede actuar como activador de la transcripción pero también como represor (Mellor y col., 1990); De Winde y Grivell, 1992).

El gen *KICPFI* ha sido clonado (Mulder y col. 1995) y resultó ser esencial en *K. lactis*, contrariamente a lo que sucede en *S. cerevisiae*. Aunque la estructura de Cpf1p de *S. cerevisiae* y KICpf1p presentan notables diferencias, la región C-terminal que es responsable de la unión al DNA, se conserva y KICpf1p puede complementar la mutación en *S. cerevisiae*.

En el promotor de *KICYCI* la eliminación de la región entre -687 y -475 produce un aumento de la expresión del gen por lo que se le atribuye un efecto negativo (figura 22). Esta región contiene tres consensos de unión para Cpf1, si bien los dos primeros de las posiciones -670 y -513, se desvían en un nucleótido respecto de la secuencia de unión de KICpf1p que aparece en el gen *KIQCR8* (Mulder y col., 1994b).

Mediante ensayos de retardación en gel hemos podido comprobar que la región que contiene los consensos de unión para Cpf1p forma una banda específica. La caracterización de esta banda se ve dificultada por el hecho de que la delección del gen *KICPFI* resulta ser letal en *K. lactis* (Mulder y col., 1994) por lo que no resulta posible comprobar la desaparición de la banda en el mutante. El complejo se forma utilizando como sonda el fragmento de -780 a -465, que contiene tres consensos para la unión en las posiciones -670, -515 y -492 (figuras 26, A y B). También con el fragmento entre -780 y -599, que contiene únicamente el de la posición -670 (figura 27) y cuando se utiliza como sonda un oligonucleótido sintético de -504 a -474 que contiene el sitio de unión de la posición -492 (figuras 26. C y D). Este oligonucleótido compite también por la unión con el fragmento de -780 a -599, que contiene el consenso de la posición -670. El tamaño del complejo formado, y su posición relativa respecto al complejo atribuido a Abf1p de acuerdo con los resultados de Mulder (Mulder

y col, 1995), indica que KICpf1p se une en forma de dímero, lo que estaría de acuerdo con la conservación del sitio de dimerización en la proteína de *K. lactis* (Mulder y col., 1994d). Además es probable que este complejo pueda reclutar otras proteínas (McKenzie y col., 1993) entre ellas Abf1p (Mulder y col., 1995). El mayor retardo del complejo observado a medida que incrementa la concentración de proteína estaría de acuerdo con esta hipótesis (figuras 26A y 27A).

El hecho de que incluso en el fragmento que contiene los tres consensos de unión para Cpf1p se observe sólo un complejo de retardación, podría deberse a una diferente afinidad por estos sitios. Con bajas concentraciones de proteína se detectaría únicamente la unión del factor a uno de ellos y el incremento de la concentración permitiría formar complejos con las otras regiones de menor afinidad, incrementando el tamaño del complejo (figuras 26A y 27A). Sin embargo, esta interpretación no concuerda con la similar intensidad observada para los complejos que se forman con las distintas sondas. Futuros estudios utilizando sondas de idéntico tamaño pero con mutaciones diferenciales en cada uno de los consensos serán necesarios para intentar resolver esta cuestión, que además se ve complicada por el hecho de que se puedan formar heterómeros con otras proteínas.

El complejo formado con Cpf1p se observa en distintas condiciones de cultivo, medios ricos en glucosa, en glicerol, en una transición de glicerol a glucosa y en condiciones de hipoxia (figura 29). Esto indica que la acción mediada por este complejo es constitutiva en las condiciones ensayadas. La eliminación de las regiones de unión a Cpf1p en las deleciones unidireccionales tampoco produce ninguna variación en el factor de desrepresión respecto al promotor nativo (figura 22).

5.2. Efecto de factores transcripcionales específicos en el promotor de *KICYC1*.

5.2.1. Hap1p.

La delección de las regiones UAS1A y UAS1B, situadas en las posiciones -306 y -254 en el promotor de *KICYC1* y que contienen consensos de unión de la proteína Hap1p, causa una gran disminución en la expresión, lo que concuerda con el efecto activador de la transcripción que ejerce esta proteína (figura 22).

Las secuencias presentes en el promotor se ajustan al consenso óptimo propuesto por Ha y col. (1996), como puede observarse en la figura 36. Sin embargo, no se ha llegado a detectar una proteína de *K. lactis* que se una a esta región de modo específico mediante ensayos de retardación en gel. O bien está en bajas concentraciones como ocurre con Hap1p de *S. cerevisiae* (Flytovich y col., 1993) o tiene una baja afinidad por el consenso. Sin embargo, los consensos UAS1A y UAS1B presentes en el promotor de *KICYC1* son reconocidos por la proteína Hap1p de *Saccharomyces cerevisiae*, como se ha podido observar en los ensayos de unión DNA-proteína a partir de la línea de *S. cerevisiae* Sc334 sobreproductora de la proteína (figuras 38 y 39). Este resultado explicaría el efecto observado sobre la expresión heteróloga del gen *KICYC1* en la línea mutante *hap1* de *S. cerevisiae*, ZW10 (Freire Picos y col. 1995a y este trabajo, figura 35). Se han llevado a cabo ensayos de competición entre diferentes fragmentos de la región UAS1 que indican que Hap1p reconoce predominantemente el UAS1A, mientras que con UAS1B se forma un complejo DNA-proteína más débil y de mayor tamaño (figuras 40 y 41). La unión de Hap1p disminuye notablemente cuando se utiliza como sonda marcada el consenso UAS1A mutado, lo que está de acuerdo con la necesidad de reconocer dos regiones CGG de unión a la proteína (figura 41). La mutación utilizada sólo afecta a un medio sitio del consenso de unión con Hap1p y mantiene uno de los tripletes CGG. Dada la gran variabilidad que presenta Hap1p en la interacción con los promotores de distintos genes (figura 3), esta mutación permitiría

teóricamente la unión a través de un "medio sitio". Esto explicaría también que no se observe variación en la activación del promotor utilizando la fusión *lacZ* mdUAS1 (figura 25) y que se siga produciendo interacción con Hap1p en los ensayos de retardación aunque en menor medida que con la sonda salvaje (figura 41). Esta unión a través de medio sitio, puede ser desplazada por competición con la región UAS1B que también contiene un solo triplete CGG (figura 42B).

5.2.2. Hap2/3/4/5p.

El control simultáneo por Hap1 y por Hap2/3/4/5p se ha observado en una serie de genes que codifican proteínas mitocondriales de *S. cerevisiae*: *CYC1* (Guarente y col., 1984), *CYTb2* (Lodi y Guiard, 1991), *CYT1* (Oechsner y col., 1992), *COX6* (Trawick y col., 1992), *QCR2* (Dorsman y Grivell, 1990).

En *S. cerevisiae*, el complejo Hap2/3/4/5p es responsable de la desrepresión en ausencia de glucosa. Las proteínas Hap2p, Hap3p y Hap5p son esenciales para la actividad de unión al DNA. Hap4p, aunque no es esencial para la unión, es responsable de la activación transcripcional (McNabb y col., 1995). La síntesis de Hap4p está reprimida por glucosa, y la dependencia de la actividad transcripcional respecto de la fuente de carbono parece que está dirigida por la disponibilidad de esta última subunidad (Forsburg y Guarente, 1989a).

El consenso para Hap2/3/4/5p UAS2, localizado en la posición -207 del gen *KICYC1* muestra una identidad alta con el UAS2 del gen *CYC1* de *S. cerevisiae* (Forsburg y Guarente, 1989) y aunque la coincidencia en el núcleo del consenso es escasa, la región de homología se extiende más allá de la caja CCAAT (Freire Picos y col., 1993). Sin embargo su eliminación no muestra ningún efecto sobre la actividad del promotor (figura 22). Tampoco se observa ningún efecto, ni en medio con glucosa ni en medio con glicerol, cuando se muta dicho consenso (figura 24).

Los tres genes homólogos *KIHAP2* (NGuyen y col. 1995), *KIHAP3*

(Mulder y col. 1994b) y *KIHAP4* (Bolotin-Fukuhara, comunicación personal) ya han sido clonados en *K. lactis* y el efecto fisiológico cuando se interrumpe su expresión no es el mismo que en *S. cerevisiae*. Tanto la línea *Klhap2* como la línea *Klhap3* son capaces de crecer en medio no fermentable, a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae* en que los mutantes no tienen competencia respiratoria. Una posible explicación es que los genes relacionados con la respiración no se vean afectados por un complejo heteromérico homólogo a Hap2/3/4/5p como ha sido descrito (NGuyen y col., 1995). Los efectos que puedan ejercer las proteínas Hap4p (clonado en *K. lactis*, pero aún no caracterizado, comunicación personal de Bolotin-Fukuhara) y Hap5p (cuyo gen todavía no ha sido clonado) pueden ser claves a la hora de saber si el complejo heteromérico existe o no en *K. lactis*, y si es capaz de unirse al consenso UAS2 o a una caja CCAAT. Datos recientes han puesto de manifiesto que los genes que codifican para lactato DH en *K. lactis*, *KIDL*D y *KICYB2*, están sujetos a regulación por *KIHap2p* y este efecto sólo se observa en medios completos con lactato y no en medios con glucosa (comunicación personal, Tiziana Lodi). Es por tanto probable que el complejo se forme y pueda llegar a ser activo en determinadas condiciones o sobre determinados promotores. Nuestros datos indican que el promotor de *KICYC1* no está sujeto a regulación dependiente de UAS2 y Mulder observó, utilizando la sonda de *KICYC1* que le facilitamos, que *KICYC1* no se ve afectada por la delección de *KIHAP3* (Mulder y col., 1994a).

Además del consenso UAS2 que no mostró ninguna acción sobre el promotor, hay otras dos secuencias CCAAT en las posiciones -463 y -352. Los datos obtenidos permiten afirmar que no participan en la formación de un complejo de activación dependiente de *KIHap2p* o *KIHap3p*, ni tampoco están claramente relacionadas con la desrepresión del promotor. Aunque se ha observado la formación de un complejo utilizando como sonda la región (-361,-333) que incluye la caja CCAAT de la posición -352, los ensayos con extractos de proteína de las líneas mutantes *hap2* y *hap3*, mostraron que la proteína que se une no se ve afectada por estas mutaciones (figura 33). Cuando

se utiliza para la competición una sonda que contiene la caja CCAAT mutada se observa una disminución en la formación del complejo (figura 32) lo que indica que esta caja CCAAT no participa en la interacción.

En las deleciones du14 y di113 que han perdido las dos cajas CCAAT de las posiciones -463 y -352, la tasa de desrepresión disminuye y el mismo efecto se obtiene con la deleción di50 en la que sólo se ha perdido la caja CCAAT de la posición -352. Sin embargo, la mutagénesis realizada sobre la secuencia CCAAT de la posición -352 no afecta a la desrepresión del gen en glicerol (figura 24). La desrepresión no puede por tanto relacionarse con esta secuencia CCAAT. De todas formas cabe señalar que el factor de desrepresión es muy pequeño en todas las medidas realizadas si se compara con el existente en *CYC1* de *S. cerevisiae* que es de cuatro (Zitomer y Hall, 1976).

5.3. Otras secuencias reguladoras presentes en el promotor de *KICYC1*.

El resultado más interesante en el estudio del promotor de *KICYC1* en relación con las diferencias que presenta respecto del gen *CYC1* de *S. cerevisiae*, deriva de la presencia de una región activadora adicional localizada entre las posiciones -475 y -338. Al eliminar esta región en las deleciones du13, du14, di39, di42, di37, di48 y di45 se produce una disminución en la actividad β -galactosidasa (figuras 22 y 23).

Se realizaron en ensayos de retardación utilizando dos sondas incluidas en esta región que comprenden dos secuencias que abarcan desde la posición -413 a la -384 (sonda olig.2) y desde la posición -361 a la -333 (sonda olig.3). Con ambas se ha observado la formación de complejos de retardación (figura 30) que presentan movilidades semejantes, lo que nos llevó a estudiar si existía competición entre ellos como efectivamente sucede (figuras 31 y 32). El complejo que se forma con la sonda olig.2 es más débil que el que se forma con la sonda olig.3 (figura 30). El hecho de que los complejos DNA-proteína sean fácilmente detectables indica que es una proteína abundante o tiene una afinidad

muy alta y no hace falta una purificación o enriquecimiento previo para poder visualizar la interacción.

Al analizar esta región se encontró una zona con la repetición directa $T^T/A^T/A^T$ TCCCCAN₅T $T^T/A^T/A^T$ TCCCCA desde la posición -407 hasta la posición -389, incluida en la sonda S2. El hecho de que haya una competición entre las dos sondas podía deberse a una coincidencia de la secuencia TTTCCC de 6 nucleótidos que aparece en ambas regiones. La secuencia $T^T/A^T/A^T$ TCCCC se ha encontrado también en el promotor del gen *KIADH4* (número de acceso a EMBL A23388), una vez en perfecta coincidencia y dos veces más con un error de dos nucleótidos. Este resultado es interesante desde el punto de vista de que el gen *KIADH4* y el gen *KICYC1* son genes de alta expresión y podrían tener esta región reguladora en común. La secuencia $T^T/A^T/A^T$ TCCCC no corresponde a ningún consenso de factores reguladores conocidos.

Los datos obtenidos hasta el momento no permiten conocer la naturaleza del factor que se une a la región consenso. La mayor parte de los datos experimentales apuntan a que esté implicado en una activación constitutiva. La adición de hemina tiene un efecto positivo en la nitidez del complejo formado pero la interacción no es hemo-dependiente. Por una parte no depende de la disponibilidad de oxígeno, ya que usando extractos de células creciendo durante dos horas bajo condiciones hipóxicas, el complejo se sigue observando (figura 34). Este resultado se podría explicar si la supuesta proteína reguladora se sintetiza tanto en condiciones aeróbicas como en condiciones de hipoxia, o bien, si la vida media de la proteína permite que haya la cantidad necesaria para detectar la unión aunque ya haya cesado su síntesis. Además el complejo sigue detectándose cuando se hacen ensayos con la línea de *K. lactis* mutante para el gen *Klhem1* (figura 32). La formación del complejo también es independiente de que la fuente de carbono sea glucosa o glicerol.

5.4. Expresión heteróloga de los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae* en *K. lactis*.

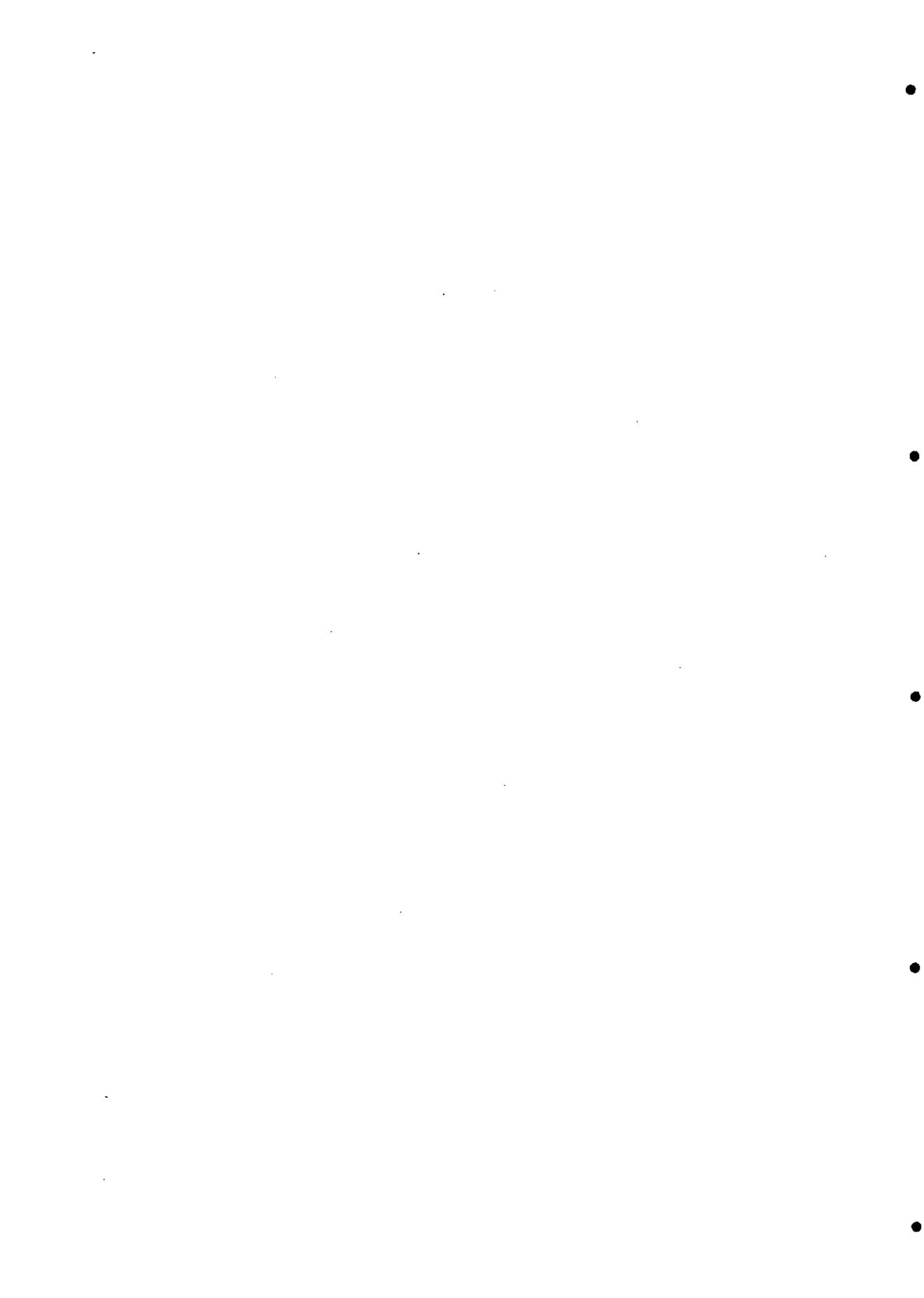
La expresión heteróloga del gen *KICYC1* en *S. cerevisiae* ya había sido demostrada (Freire Picos y col., 1995a). En este trabajo hemos podido comprobar que los genes *CYC1* y *CYC7* de *S. cerevisiae* se expresan en una línea mutante de *K. lactis* en la que se ha delecionado el gen *KICYC1*, ya que ambas son capaces de complementar la incapacidad de crecimiento en lactato causada por la deleción (figura 17). Puesto que *CYC7* es un gen de baja expresión en condiciones aerobias quisimos analizar sus niveles de expresión en *K. lactis*. Los resultados del *Northern* (figura 18) revelan que el nivel de expresión aumenta cuando su promotor es sustituido por el de *KICYC1*. Esto puede atribuirse a varios factores, la mejora en el consenso para la unión de Hap1p que en el promotor de *CYC7* es muy poco eficiente y la existencia de elementos *cis* adicionales en el promotor de *KICYC1* que lo convierten en un gen de alta expresión.

5.5. Resumen de las características del promotor de *KICYC1*.

Los resultados obtenidos al analizar el promotor de *KICYC1* indican que varios factores contribuyen de un modo aditivo para conseguir un promotor muy activo en condiciones aerobias que posibilite una elevada expresión de citocromo *c*. Entre los factores positivos se encuentran Abf1p, Hap1p y un factor activador no caracterizado. Hap1p es el principal factor implicado en la regulación hemo-dependiente y los otros factores ejercerían un papel potenciador no regulado, al menos en las condiciones ensayadas. La escasa variación de expresión observada en condiciones de crecimiento en glucosa o glicerol puede ser interpretada como consecuencia de la ineficacia de la desrepresión mediada por el complejo Hap2/3/4/5p ya que, como hemos visto, las secuencias habitualmente reconocidas por este complejo no son funcionalmente importantes en el promotor de *KICYC1*. Una explicación alternativa, y tal vez adicional, surge al considerar que el consenso de unión para

Mig1p, factor relacionado con la represión por glucosa, se encuentra incluido dentro de la región de unión del factor activador. Es posible que el mecanismo represor sea inoperativo debido a su desplazamiento por este factor y su caracterización resultará por tanto clave para comprender el mecanismo global de activación y regulación del promotor de *KICYC1*.

6. CONCLUSIONES



1. La región funcional del promotor del gen *KICYC1* se extiende unos 868pb respecto del ATG. Contiene consensos de unión para factores transcripcionales fundamentalmente activadores, con excepción de la región situada entre -596 y -475 que tiene un efecto represor.

2. La región comprendida entre -868 y -475 contiene consensos de unión para factores reguladores multifuncionales que ejercen su acción sobre un amplio grupo de genes de levaduras. En la posición -698 hay un consenso para la unión de Abf1p y en las posiciones -670, -513 y -492 hay consensos para la unión de Cpf1p. En el caso de los consensos de Cpf1p se ha podido demostrar una interacción específica con proteínas de *K.lactis*. Esta interacción DNA-proteína se produce en todas las condiciones ensayadas: medios con glucosa o glicerol como fuente de carbono y medios aeróbicos o hipóxicos.

3. La región comprendida entre -475 y -338 contiene elementos activadores. Dos secuencias comprendidas en esta región y que tienen en común el motivo TTTCCC, son capaces de unir específicamente proteínas de *K. lactis*, estableciéndose una competición entre ellas. Esta región, de carácter activador, parece actuar de manera constitutiva. La formación de los complejos DNA-proteína es independiente de los niveles de oxígeno, de la presencia de hemo, de la fuente de carbono y de las mutaciones *Klhap2* y *Klhap3*.

4. Las regiones UAS1A y UAS1B, situadas en -306 y -259, contienen secuencias que se ajustan al consenso de unión para el factor regulador Hap1p. Ambas regiones parecen tener importancia en la activación del promotor y aunque no se ha podido probar una interacción directa con proteínas de *K. lactis*, sí son capaces de interaccionar específicamente con el factor Hap1p de *S. cerevisiae*.

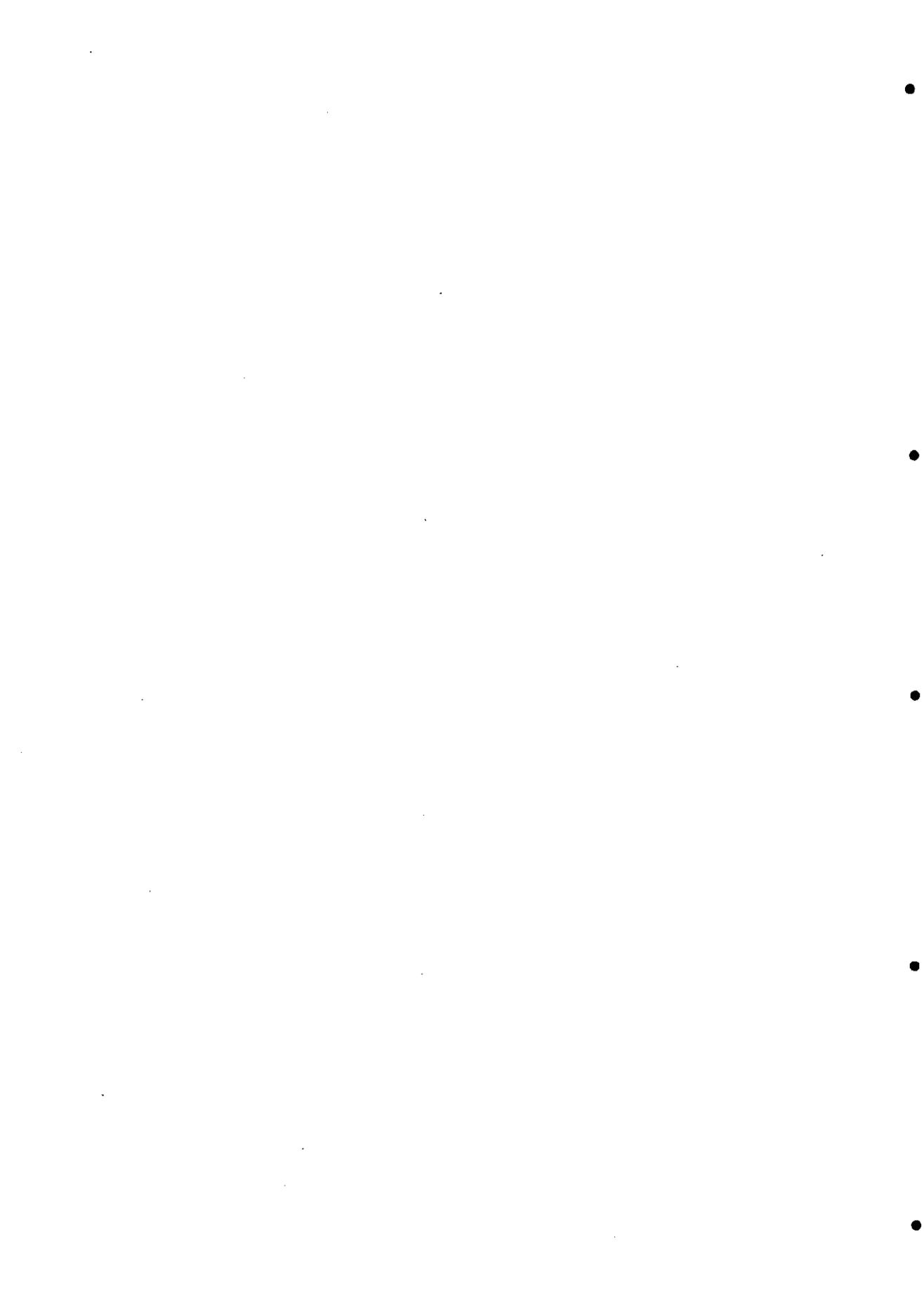
5. La región UAS2, localizada en la posición -207, carece de efecto sobre el promotor de *KICYC1*. Esta conclusión se deduce de los resultados de las

deleciones. Tampoco fue posible poner de manifiesto una interacción DNA-proteína ni utilizando extractos de *K.lactis*, ni extractos de *S. cerevisiae* enriquecidos en Hap2p y Hap3p.

6. La represión catabólica ejercida por la glucosa sobre el promotor de *KICYC1* es pequeña si la comparamos con la existente en el gen homólogo de *S. cerevisiae*. El efecto desrepresor que tiene lugar en medios con fuentes de carbono no fermentables no puede ser atribuido a la región UAS2, ni a las cajas CCAAT localizadas en las posiciones -463 y -352.

7. La utilidad del promotor de *KICYC1* para sobre-expresar otros genes queda de manifiesto en la alta expresión observada al fusionarlo con el gen *ScCYC7*.

7. BIBLIOGRAFÍA



- Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. 1977.
Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74: 5350.
- Arcangioli, B. and Lescure, B. 1985.
Identification of proteins involved in the regulation of yeast iso-1-cytochrome c expression by oxygen.
EMBO J. 4: 2627-2633.
- Auble, D.T., Hansen, K.E., Mueller, C.G.F., Lane, W.S., Thorner J. and Hahn, S. 1994.
MOT1, a global repressor of RNA polymerase II transcription inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism.
Genes Dev. 8: 1920-1934.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1995.
Current protocols in molecular biology.
John Wiley and Sons, Inc.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. 1996.
SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box.
Cell 86: 263-274.
- Bailey, R.B. and Woodward, A. 1984.
Isolation and characterization of a pleiotropic glucose repression resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Gen. Genet. 193: 507-512.
- Balasubramanian, B., Lowry, C.V. and Zitomer, R.S. 1993.
The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif.
Mol. Cell. Biol. 13: 6071-6078.
- Balciunas, D. and Ronne, H. 1995.
Three subunits of the RNA polymerase II mediator complex are involved in glucose repression.
Nucl. Acids Res. 23: 4421-4425.
- Betina, S, Gavurnikova, G., Haviernik, P., Sabová, L. and Kolarov, J. 1995.
Expression of the AAC2 gene encoding the major mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled at the transcriptional level by oxygen, heme and HAP2 factor.
Eur.J.Biochem. 229: 651-657.
- Bianchi M.M., Falcone, C., Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M., Frontali, L. and Fukuhara, H. 1987.
Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 μ m circular plasmid pKD1.
Curr. Genet. 12: 185-192.
- Björklund, S. and Kim, Y-J. 1996.
Mediator of transcriptional regulation.
Trends Biochem. Sci. 21: 335-337.

- Blackwood, E.M. and Eisenmann, R.N. 1991
Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA binding complex with myc.
Science **251**: 1211-1217.
- Bolivar, F. and Backman, K. 1979.
Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors.
Methods Enzymol. **68**: 245.
- Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, S. and Davis, R.W. 1979.
Sterile host yeast (SHY): an eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments.
Gene **8**: 17-24.
- 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.
- Braun, B.R. and Johnson, A.D. 1997.
Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1.
Science **277**: 105-109.
- Buchman, A.R. and Kornberg, R.D. 1990.
A yeast ARS-binding protein activates transcription synergistically in combination with other weak activating factors.
Mol. Cell. Biol. **10**: 887-897.
- Buratowski, S. and Sharp, P. 1992.
Initiation of transcription by RNA polymerase II. In: *Transcriptional regulation* (McKnight, S.L. and Yamamoto, K.R., Eds.)pp. 227-246. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Burley, S.K. and Roeder, R.G. 1996.
Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID).
Ann. Rev. Biochem. **65**: 769-799.
- Cadahía Rodríguez, J.L. 1996.
Clonación del gen *ROX6* de *Saccharomyces cerevisiae*.
Tesis de Licenciatura. Universidad de La Coruña.
- Cassart, J.-P., Georis, I., Östling, J., Ronne, H. and Vandenhoute, J. 1995.
The MIG1 repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces Cerevisiae*.
FEBS Lett. **371**: 191-194.,1995
- Celenza, J.L., Eng, F.J. and Carlson, M. 1989.
Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase.
Mol. Cell. Biol. **9**: 5045-5054.
- Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M. and Fukuhara, H. 1992.
Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*.
Mol. Gen. Genet. **233**: 97-105.

- Chodosh, L.A., Olesen, J., Hahn, S., Baldwin, A.S., Guarente, L. and Sharp, P.A. 1988.
A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable.
Cell **53**: 25-35.
- Choy, B. and Green, M.R. 1993.
Eukariotic activators function during multiple steps of preinitiation complex assembly.
Nature **366**: 531-536.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. 1972.
Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**: 2110-2114.
- Collart, M.A. and Struhl, K. 1994.
NOT(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3 and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization.
Genes Dev. **8**: 525-537.
- Cowell, I.G. 1994.
Repression versus activation in the control of gene transcription.
Trends Biochem. Sci. **19**: 38-42.
- Cumski, M.G., Trueblood, C.E., Ko, C. and Poyton, R.O. 1987.
Structural analysis of 2 genes encoding divergent forms of cytochrome *c* oxidase subunit V.
Mol. Cell. Biol. **7**: 3511-3519.
- Dang, V.-D., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M. and Daighan-Fornier, B. 1996.
The CCAAT Box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms.
J. Bacteriol. **178**: 1842-1849.
- Deckert, J., Rodriguez Torres, A. M., Simon, J. T. and Zitomer, R. S. 1995
Mutational analysis of Rox1, a DNA-Bending repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **15**: 6109-6117.
- Della Seta, F., Treich, I., Buhler, J.M. and Sentenac, A. (1990).
ABF1 binding sites in yeast RNA polymerase genes.
J. Biol. Chem. **265**: 15168-15175.
- De Winde, J.H. and Grivell, L.A. 1992.
Global regulation of mitochondrial biogenesis in yeast: ABF1 and CPF1 play opposite roles in regulating expression of the *QCR8* gene, encoding subunit VIII of the mitochondrial ubiquinol cytochrome *c* oxidoreductase.
Mol. Cell. Biol. **12**: 2872-2883.
- De Winde, J.H. and Grivell, L.A. 1993.
Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*.
Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology **46**: 51-91.
- De Winde, J.H. and Grivell, L.A. 1995.
Regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Intricate interplay between general and specific transcription factors in the promoter of the *QCR8* gene.
Eur. J. Biochem. **233**: 200-208.

- De Winde, J.H., Van Leeuwen, 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.
- Diffley, J.F.X. and Stillman, B. 1989.
Similarity between the transcriptional silencer binding proteins ABF1 and RAP1.
Science **246**:1034-1038
- Di Flumieri, C., Liston, P., Acheson, N.H. and Keng, T. 1996.
The HMG domain of the ROX1 protein mediates repression of *HEM13* through overlapping DNA binding and oligomerization functions.
Nucl. Acids Res. **24**: 808-815.
- Dorsman, J.C. and Grivell, L.A. 1990.
Expression of the gene encoding subunit II of yeast QH2:cytochrome c oxidoreductase is regulated by multiple factors.
Curr. Genet. **17**: 459-464.
- Dorsman, J.C., Van Heeswijk, W.C. and Grivell, L.A.1988.
Identification of two factors which bind to the upstream sequences of a number of nuclear genes coding for mitochondrial proteins and to genetic elements important for cell division in yeast.
Nucleic Acids Res. **16**: 7287-7301.
- Dowzer, C.E.A. and Kelly, J.M. 1991.
Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*.
Mol. Cell. Biol. **11**: 5701-5709.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M. and Roth, S.Y. 1996.
Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4.
Genes Dev. **10**: 1247-1259.
- Evangelista, C.C., Jr., Rodríguez-Torres, A.M., Limbach, M.P. and Zitomer, R.S. 1996.
Rox3 and RTS function in the global stress response pathway in Baker's yeast.
Genetics **142**: 1083-1093.
- Feinberg, A.P. and Vogelsten, B. 1984.
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132**: 6-13.
- Forsburg, S.L. and Guarente, L. 1989
Identification and characterization of HAP4 a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer.
Gene. Dev. **3**: 1166-1178.
- Freire-Picos, M.A., Rodríguez Torres, A.M., Ramil, E., Cerdán, M.E., Breunig, 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, M.I., Rodríguez Belmonte, M.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**: 35-41.

- Freire-Picos, M.A., Hollenberg, C.P., Breunig, K.D. and Cerdán, M.E. 1995a.
Regulation of cytochrome *c* expression in the aerobic respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*.
FEBS Lett. **360**: 39-42.
- Freire-Picos, M.A., Rodríguez Torres, A.M and Cerdán, M.E. 1995b.
Yeast phylogenetic relationships based on cytochrome *c* sequences.
Microbios **81**: 23-27.
- Fytlovich, S., Gervais, M., Agrimont, C. and Guiard, B. 1993.
Evidence for an interaction between the *CYP1(HAPI)* activator and a cellular factor during heme-dependent transcriptional regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO J. **12**: 1209-1218.
- Gancedo, C. and Serrano, R. 1989.
Energy-yielding metabolism.
In: The yeast. Rose, A.H. and Harrison, J.S. Ed. Academic Press. London.
- George, C.P., Lira-De Vito, L.M., Wampler, S. L. and Kadonaga, J.T. 1995.
A spectrum of mechanism for the assembly of the RNA polymerase II transcription preinitiation complex.
Mol. Cell. Biol. **15**: 1049-1059.
- Gibson, T.J. 1984.
Studies on the Epstein-Barr virus genome.
Ph.D. Thesis, Cambridge University, England.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. 1988.
Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutageniced yeast genes lacking restriction sites.
Gene **74**: 527-534.
- Gill, G. and Tjian, R. 1992.
Eukaryotic coactivators associated with the TATA box binding protein.
Curr. Opin. Genet. Dev. **2**: 236-242.
- Godecke, S., Eckart, M., Janowiz, Z.A. and Hollemberg, C.P. 1994
Identification of sequences responsible for transcriptional regulation of the strongly expressed methanol oxidase-encoding gene in *Hansenula Polymorpha*.
Gene **139**: 35-42.,
- Goffrini, P., Ficarelli, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P.P. and Ferrero, I. 1996.
FOG1 and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*.
Curr. Genet. **29**: 316-326.
- González-Domínguez, M., Méndez-Carro, C. and Cerdán, M.E. 1997.
Isolation and characterization of the *KIHEM1* gene in *Kluyveromyces lactis*.
Yeast **13**: 961-971
- González-Siso, M.I., Ramil, E., Freire-Picos, M.A. and Cerdán, M.E. 1996.
Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Ethanol production and the Crabtree effect.
Enzyme Microb. Technol. **18**: 585-591.

- Gonçalves, P.M., Maurer, K., Mager, W.H. and Planta, R.J. 1992.
Kluyveromyces contains a functional ABF1-homologue.
Nucleic Acids Res. **20**: 2211-2215.
- Griggs, D.W. and Johnston, M. 1991.
Regulated expression of the *GAL4* activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression.
- Guarente, L. 1983.
Yeast promoters and *lacZ* fusions designed to study expression of cloned genes in yeast.
Methods Enzymol. **101**: 181-191.
- Guarente, L. 1984
Yeast promoters: positive and negative elements.
Cell **36**: 799-800.
- Guarente, L. 1995.
Transcriptional coactivators in yeast and beyond.
Trends Biochem. Sci. **20**: 517-521.
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P. and Alani, E. 1984.
Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*.
Cell **36**: 503-511.
- Guarente, L. and Mason, T. 1983.
Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* via an upstream activation site.
Cell **32**: 1279-1286.
- Ha, N., Hellauer, K. and Turcotte, B. 1996.
Mutations in target DNA elements of yeast HAP1 modulate its transcriptional activity without affecting DNA binding.
Nucleic Acid Res. **24**: 1453-1459.
- Hahn, S. 1993.
Structure (?) and function of acidic transcription activators.
Cell **72**: 481-483.
- Hahn, S. and Guarente, L. 1988
Yeast HAP2 and HAP3: transcriptional activators in a heteromeric complex.
Science **240**: 317-320.
- Hahn, S., Pinkham, J., Wei, R., Miller, R. and Guarente, L. 1988.
The *HAP3* regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts.
Mol. Cell. Biol. **8**: 655-663.
- Haldi, M. L. and Guarente, L. 1995.
Multiple domains mediate heme control of the yeast activator HAP1
Mol. Gen. Genet. **248**: 229-235.
- Halfter, H., Kavety, B. Vandekerckhove, J., Fieffer, F. and Gallwitz, D. 1989.
Sequence expression and mutational analysis of *BAF1*, a transcriptional activator and ARS1-binding protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
EMBO J. **8**: 3029-3037.

- Hames, B.D. and Higgins, S.J. Editors. 1993.
Gene transcription: A practical approach, pp 321-345.
IRL Press at Oxford University Press.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, R. 1991.
Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria.
Methods Enzymol. **24**: 63-112.
- Heinisch, J., Kirchrath, L., Liesen, T., Vogelsang, K. and Hollenberg, C.P. 1993.
Molecular genetics of phosphofructokinase in the yeast *Kluyveromyces lactis*.
Mol. Microbiol. **8**: 559-570.
- Herschbach, B.M. and Hohnson, A.D. 1993.
Transcriptional repression in eukaryotes.
Annu. Rev. Cell Biol. **9**: 479-509.
- 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.
- Holmes, D.S. and Quigley, M. 1981.
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids.
Anal. Biochem. **114**: 193-197.
- Janbon, G., Rustchenko, E.P., Klug, S., Scherer, S. and Sherman, F. 1997.
Phylogenetic relationships of fungal cytochromes c.
Yeast **13**: 985-990.
- Jansma, D.B., Archambault, J., Mostachfi, O. and Friesen, J.D. 1996.
Similar upstream regulatory elements of genes that encode the two largest subunits of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*.
Nucl. Acids Res. **24**: 4543-4551.
- Jiang, R. and Carlson, M. 1996.
Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex.
Genes Dev. **10**: 3105-3115.
- Johnson, P.F. and Mcknight, S.L. 1989.
Eukaryotic transcriptional regulatory proteins.
Annu. Rev. Biochem. **58**: 799-839.
- Johnston, M. 1987.
A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*.
Microbiol. Rev. **51**: 458-476.
- Johnston, M. and Carlson, M. 1992.
Regulation of carbon and phosphate utilization.
In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression. pp193-281.
CSH Laboratory Press.
- Jong, S.C. and Edwards, M.L.S. (Eds). 1990.
American Type Culture Collection catalogue of yeast. 18th de Rockville, M.D.

- Joyce, C.M. and Grindley, N.D.F. 1984.
Method for determining whether a gene of *Escherichia coli* is essential: Application to the *polA* gene.
J. Bacteriol. **158**: 636.
- Keleher, C., Reed M.J., Schultz, J., Carlson, M. and Johnson, D. 1992.
Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast.
Cell **68**: 709-719.
- Keng, T. 1992.
HAP1 and *ROX1* form a regulatory pathway in the repression of *HEM13* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **12**: 2616-2623.
- Kent, N. A., Tsang, J. S. H., Crowther, D. J. and Mellor, J. 1994.
Chromatin structure modulation in *Saccharomyces cerevisiae* by centromere and promoter factor 1.
Mol. Cell. Biol. **14**: 5229-5241.
- Klebe R.J., Harriss J.V., Sharp D., Douglas M.G. 1983.
A general method for polyethyleneglycol-induced transformation of bacteria and yeast.
Gene **25**:333-341.
- Koleske, A.J. and Young, R.A. 1995.
The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene replication.
Trends Biochem. Sci. **20**: 113-116.
- Kuchin, S., Yeghiayan, P. and Carlson, M. 1995.
Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**: 4004-4010.
- Kunkel, T.A. 1985.
Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 488-492.
- Kunkel, T.A. 1987.
Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.
Methods Enzymol. **154**: 367-383.
- Künzler, M., Braus, G.H., Georgiev, O., Seipel, K., Schaffner, W. 1994.
Functional differences between mammalian transcription activation domains at the yeast GAL1 promoter.
EMBO J. **13**: 641-645.
- Künzler, M., Springer, C. and Braus, G. 1996.
The transcriptional apparatus required for mRNA encoding genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* emerges from a jigsaw puzzle of transcription factors.
FEMS Microbiol. Rev. **19**: 117-136.
- Kushner, S.R. 1978.
An improved method for transformation of *E. coli* with ColEI derived plasmids.
In *Genetic Engineering* (H.W. Boyer and S.Nicosia, eds) pp.17-23.
Elsevier. Amsterdam.

- Labbe-Bois, R. and Labbe, P. 1990.
Tetrapyrrole and heme biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. p. 235-285. In: Harry A. Dailey (ed.), Biosynthesis of heme and chlorophylls, McGraw-Hill Publishing Co., N.Y.
- Lalonde, B., Arcangioli, B. and Guarente, L. 1986.
A single yeast upstream activation site UAS1 has two distinct regions essential for its activity.
Mol. Cell. Biol. **6**: 4640-4696.
- Larson, G. P., Castanotto, D., Rossi, J. J. and Malafa, M.P. 1994.
Isolation and functional analysis of a *Kluyveromyces lactis* RAP1 homologue.
Gene **150**: 35-41.
- Laz, T.M., Pietras, D.F. and Sherman, F. 1984.
Differential regulation of the duplicated iso-cytochrome *c* genes in yeast.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 4475-4479.
- Lodi, T. and Guiard, B. 1991.
Complex transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYB2* gene encoding cytochrome *b₂*: CYP1(HAP1) activator binds to the *CYB2* Upstream Activation Site
- Lodi, T., Petrochilo, E., Gaisne, M. and Verdière, J. 1996
Characterization of a promoter mutation in the *CYP3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* which cancels regulation by Cyp1p (Hap1p) without affecting its binding site.
Mol. Gen. Genet. **253**: 103-110.
- 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.
- Lowry, C.V., Cerdan, M.E. and Zitomer, R.S. 1990.
A hypoxic consensus operator and a constitutive activation region regulate the ANB1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **10**: 5921-5926.
- Lundin, M., Nehlin, J.O. and Ronne, H. 1994.
Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1.
Mol. Cell. Biol. **14**: 1979-1985.
- Ma, J. and Ptashne, M. 1987.
The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80.
Cell **50**: 237-242.
- Marykwas, D.L. and Fox, T.D. 1989.
Control of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene *PET494*: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen.
Mol. Cell. Biol. **9**: 484-491.
- Mas, J., Celis, E., Pina, Brunner, A. 1974.
Effect of O₂, ergosterol and sterol precursors on the mating ability of *Kluyveromyces lactis*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **61**: 613-670.

- McKenzie, E.A., Kent, N.A., Dowell, S.J., Moreno, F., Bird, L.E. and Mellor, J. 1993.
The centromere and promoter factor 1, CPF1, of *Saccharomyces cerevisiae* modulates gene activity through a family of factors including SPT21, RPD1 (SIN3), RPD3 and CCR4.
Mol. Gen. Genet. **240**: 374-384.
- McNabb, D. S., Xing, Y. and Guarente, L. 1995.
Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding.
Gene Dev. **9**: 47-58.
- McNeil, J.B. 1988.
Functional characterization of a pyrimidine-rich element in the 5' noncoding region of the yeast iso-1-cytochrome *c* gene.
Mol. Cell. Biol. **8**: 1045-1054.
- Mehta, K.D., Leung, D., Lefebvre, L. and Smith, M. 1990.
The *ANB1* locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the protein synthesis initiation factor eIF-4D.
J. Biol. Chem. **265**: 8802-8807.
- Mellor, J., Jiang, W., Funk, M., Rathjen, J., Barnes, C.A., Hinz, T., Hegemann, J.H. and Philippsen, P. 1990.
CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters.
EMBO J. **9**: 4017-4026.
- Messing, J. 1979.
A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13.
Recomb. DNA Tech. Bull. **2**: 43
- Miller, J.H. 1972.
Experiments in Molecular Genetics.
CSH Laboratory
CSH, NY.
- Montgomery, D.L., Leung, D.W., Smith, M., Shalit, P., Faye, G. and Hall, B.D., 1980.
Isolation and sequence of the gene for iso-2-cytochrome C in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**: 541-545.
- Mount, R.C., Bernadette, E.J. and Hadfield, C. 1996.
Reporter gene systems for assaying gene expression in yeast.
In: *Methods in molecular biology*, Vol. 53: Yeast protocols. Edited by I. Evans. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Mulder, W., Scholten, I.H.J.M., De Boer, R.W. and Grivell, L.A. 1994a.
Sequence of the *HAP3* transcription factor of *Kluyveromyces lactis* predicts the presence of a novel 4-cysteine zinc-finger motif.
Mol.Gen.Genetics **245**: 96-106
- 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 bc 1-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*.
Biochim. Biophys. Acta **1219**: 713-718.

- Mulder, W., Scholten, I.H.J.M., Room, H. and Grivell, L.A. 1994c.
Isolation and characterisation of the linked genes *APA2* and *QCR7*, coding for Ap4A phosphorilase II and the 14kDa subunit VII of the mitochondrial bc1-complex in the yeast *Kluyveromyces lactis*.
Biochem. Biophys. Acta **1219**: 719-723.
- Mulder, W., Winkler, A.A., Scholten, I.H.J.M., Zonneveld, B.J.M., De Winde, J.H., Steensma, H. and Grivell, L.A. 1994d.
Centromere promoter factors (CPF1) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* are functionally exchangeable, despite low overall homology.
Curr. Genet. **26**: 567.
- Mulder, W., Scholten, I.H.J.M. and Grivell, L.A. 1995.
Distinct transcriptional regulation of a gene coding for a mitochondrial protein in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* despite similar promoter structures.
Mol. Microbiol. **17**: 813-824.
- Nait-Kaoudjt, R., Williams, R., Guiard, B. and Gervais, M. 1997.
Some DNA targets of the yeast CYP1 transcriptional activator are functionally asymmetric. Evidence of two half-sites with different affinities.
Eur. J. Biochem. **244**: 301-309.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M. and Ronne, H. 1991.
Control of yeast *GAL* genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response.
EMBO J. **10**: 3373-3377.
- Nguyen, C., Bolotin-Fukuhara, M., Wésolowski-Louvel, M. and Fukuhara, H. 1995.
The respiratory system of *Kluyveromyces lactis* escapes from HAP2 control.
Gene **152**: 113-115.
- Nikolov, D.B. and Burley, S.K. 1997.
RNA polymerase II transcription initiation: A structural view.
Proc. Natl. Acad. USA **94**: 14-22.
- Nouraini, S., Hu, J., McBroom, L.D.B. and Friesen, J.D. 1996.
Mutations in an ABF1p binding site in the promoter of yeast *RPO26* shift the transcription start sites and reduce the level of *RPO26* mRNA.
Yeast **12**: 1339-1350.
- Oechsner, U., Hermann, H., Zollner, A., Haid, A. and Bandlow, W. 1992.
Expression of yeast cytochrome *c₁* is controlled at the transcriptional level by glucose, oxygen and haem.
Mol. Gen. Genet. **232**: 447-459.
- Olesen, J., Hahn, S. and Guarente, L. 1987.
Yeast HAP2 and HAP3 activator both bind to the *CYCI* Upstream Activation Site, UAS2 in an interdependent manner.
Cell **51**: 953-961.
- Orphanides, G., Lagrange, T. and Reinberg, D. 1996.
The general transcription factors of RNA polymerase II.
Genes Dev. **10**: 2657-2683.
- Östling, J., Carlberg, M. and Ronne, H. 1996.
Functional domains in the Mig1 repressor.
Mol. Cell. Biol. **16**: 753-761.

- Özcan, S. and Johnston, M. 1995.
Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose.
Mol. Cell. Biol. **15**: 1564-1572.
- Pearson, W. 1990.
Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA.
Methods in Enzymol. **183**: 63-98.
- Pfeifer, K., Arcangioli, B. and Guarente, L. 1987a.
Yeast HAP1 activator competes with the factor RC2 for binding to the Upstream Activation Site UAS1 of the *CYC1* gene.
Cell **49**: 9-18.
- Pfeifer, K., Prezant, T. and Guarente, L. 1987b.
Yeast HAP1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence.
Cell **49**: 19-27.
- Pfeifer, K., Kim, K.-S., Kogan, S. and Guarente, L. 1989.
Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator.
Cell **56**: 291-301.
- Pillar, T.M. and Bradshaw, R.E. 1991.
Heat shock and stationary phase induce transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* iso-2-cytochrome *c* gene.
Curr. Genet. **20**: 185-188.
- Pinkham, J. and Guarente, L. 1985.
Cloning and molecular analysis of the *HAP2* locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **5**: 3410-3416.
- Pinkham, J., Olesen, J. and Guarente, L. 1987.
Sequence and nuclear localization of the yeast HAP2 protein, an activator of transcription.
Mol. Cell. Biol. **7**: 578-585.
- Pinto, I. Ware, D.E. and Hampsey, M. 1992.
The yeast *SUA7* gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB is required for normal start site selection in vivo.
Cell **68**: 977-988.
- Planta, R.J., Gonçalves, P.M. and Mager, W.H. 1995.
Global regulators of ribosome biosynthesis in yeast.
Biochem. Cell Biol. **73**: 825-834.
- Ponticelli, A.S., Pardee, T.S. and Struhl, K. 1995.
The glutamine-rich activation domains of human Sp1 do not stimulate transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **15**: 983-988.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. and Werner, T. 1995.
MatInd and MatInspector-New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.
Nucleic Acids Res. **23**: 4878-4884.

- Redd, M.J., Arnaud, M.B. and Johnson, A.D. 1997.
A complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription *in vitro*.
J. Biol. Chem. **17**: 11193-11197.
- Rodríguez Belmonte, M.E. 1997.
Estudio de los genes *KIPDCB* y *KIGSK-3* de la levadura *Kluyveromyces lactis*.
Tesis Doctoral. Universidad de La Coruña.
- Ronne, H. 1995.
Glucose repression in fungi.
Trends Genet. **11**: 12-17.
- Rose, M., Winston, F. and Hieter, P. 1990.
Methods in yeast genetics. A laboratory course manual.
Cold Spring Harbour. New York. CSH Lab. Press.
- Rosenblum-Vos, L.S., Rhodes, L., Evangelista, C.C., Jr., Boayke, K.A. and Zitomer, R.S. 1991.
The *ROX3* gene encodes an essential nuclear protein involved in *CYC7* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **11**: 5639-5647.
- Rothstein, R. 1991.
Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast.
Methods Enzymol. **194**: 281-301.
- Rothstein, R.J. and Sherman, F. 1980.
Genes affecting the expression of cytochrome *c* in yeast: genetic mapping and genetic interactions.
Genetics **91**: 871-889.
- Ruzzi, M., Breunig, K.D., Ficca, A.G and Hollenberg, C.P. 1987.
Positive regulation of the β -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an Upstream Activation Site that shows homology to the *GAL* Upstream Activation Site of *Kluyveromyces lactis*.
Mol. Cell. Biol. **7**: 991-997.
- Sambrook, K.I., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989.
Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Edition.
CSH Laboratory Press. NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, S.A. 1977.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467.
- Schultz, J., Marshall-Carlson, L. and Carlson, M. 1990.
The N-terminal TPR region is the functional domain of Ssn6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **10**: 4744-4756.
- Sentenac, A. 1985.
Eukaryotic RNA polymerases.
CRC Crit. Rev. Biochem. **18**: 31-90.

- Sertil, O., Cohen, B.D., Davies, K.J.A. and Lowry, C.V. 1997.
The *DAN1* gene of *S. cerevisiae* is regulated in parallel with the hypoxic genes, but by a different mechanism.
Gene **192**: 199-205.
- Sherman, F., Fink, G.R. and Lawrence, C.W. 1979.
Methods in Yeast Genetics.
CSH Laboratory.
- Shore, D. 1994
RAP1: A protean regulator in yeast.
Trends Gen **10**: 408-412.
- Shuster J.R., Moyer D., Irvine B. 1987.
Sequence of the *Kluyveromyces lactis* *URA3* gene.
Nucleic Acids Res **15**: 8573
- Sikorski, R.S. and Boeke, J.D. 1991.
In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast.
Method Enzymol. **194**: 302-318.
- Silve, S., Rhode, P.R., Coll, B., Campbell, J., and Poyton, R.O. 1992.
ABF1 is a phosphoprotein and plays a role in carbon source control of *COX6* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **12**: 4197-4208.
- Song, O-K., Dolan, J.W., Yuan, Y-I, Fields, S. 1991.
Pheromone-dependent phosphorylation of the yeast STE12 protein correlates with transcriptional activation.
Genes Dev. **5**: 741-750.
- Sorger, P.K. and Pelham, H.R.B. 1988.
Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation.
Cell **54**: 855-864.
- Sousa, R. and Arcangioli, B. 1989.
A point mutation in the *CYC1* UAS1 creates a new combination of regulatory elements that activate transcription synergistically.
EMBO J. **8**: 1801-1808.
- Southern, E.M. 1975.
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98**: 503-517.
- Sprague, G.F. and Thorner, J.W. 1992.
Pheromone response and signal transduction of *Saccharomyces cerevisiae*.
In: *The molecular and cellular biology of the Yeast Saccharomyces crevisiae: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Struhl, K. 1989.
Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast.
Ann. Rev. Biochem. **58**: 1051-1077.
- Struhl, K. 1995.
Yeast transcriptional regulatory mechanisms.
Ann. Rev. Genetics **29**: 651-674.

- Svetlov, V. and Cooper, T.G. 1995.
Review: compilation and characteristics of dedicated transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*.
Yeast 11: 1439-1484.
- Thompson, C.M. and Young, R.A. 1995.
General requirement for RNA polymerase II holoenzymes *in vivo*.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 4587-4590.
- Thorness, M., Schafer, W., D'Ari, L. and Rine, J. 1989.
Positive and negative transcriptional control by heme of genes encoding 3-hydroxy-3-metilglutaril coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. 9: 5702-5712.
- Timmerman, J., Vuidepot, A-L., Bontems, F., Lallemand, J-Y., Gervais, M., Shechter, E. and Guiard, B. 1996.
¹H, ¹⁵N, resonance assignment and three-dimensional structure of CYP1(HAP1) DNA-binding domain.
J. Mol. Biol. 259: 792-804.
- Trawick, J.D., Wright, R.M. and Poyton, R.O. 1989.
Transcription of yeast *COX6*, the gene for cytochrome c oxidase subunit VI is dependent on heme and the *HAP2* gene.
J. Biol. Chem. 264: 7005-7008.
- Treitl, M.A. and Carlson, M. 1995.
Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, repressor/activator protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3132-3136.
- Trumbly, R.J. 1986.
Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* mutants constitutive for invertase synthesis.
J. Bacteriol. 166: 1123-1127.
- Trumbly, R.J. 1992.
Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Microbiol. 6: 15-21.
- Turcotte, B. and Guarente, L. 1992.
HAP1 positive control mutants specific for one of two binding sites.
Gene. Dev. 6: 2001-2009.
- Tzamarias, D. and Struhl, K. 1994.
Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional corepressor complex.
Nature 369: 758-761.
- Ushinsky, S.C. and Keng, T. 1994.
A novel allele of *HAP1* causes uninducible expression of *HEM13* in *S. cerevisiae*.
Genetics 136: 819-831.
- Varanasi, U.S., Klis, M., Mikesell, P.B. and Trumbly, R.J. 1996.
The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits.
Mol. Cell. Biol. 16: 6707-6714.
- Verdier, J.M. 1990.
Regulatory DNA-binding proteins in yeast: an overview.
Yeast 6: 271-297.

- Vuidepot, A.L., Bontems, F., Gervais, M., Guiard, B., Shechter, E. and Lallemand, J.Y. 1997.
NMR analysis of CYP1(HAP1) DNA binding domain-CYC1 upstream activation sequence interactions: recognition of a CGG trinucleotide and of an additional thymine 5bp downstream by the zinc cluster and the N-terminal extremity of the protein.
Nucleic Acids Res. **25**: 3042-3050.
- Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K. and Fukuhara, H. 1996.
Kluyveromyces lactis.
In: *Nonconventional yeast in biotechnology. A handbook.* pp139-201.
Klaus Wolf Editor. Springer.
- Williams, F.E. and Trumbly, R.J. 1990.
Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol. Cell. Biol. **10**: 6500-6511.
- Williams, F.E., Varanasi, U. and Trumbly, R.J. 1991.
The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex.
Mol. Cell. Biol. **11**: 3307-3316.
- Wingender, E., Kel, A.E., Kel, O.V., Karas, H., Heimeyer, T., Dietze, P., Knuettel, R., Romaschenko, A.G. and Kolchanov, N.A. 1997.
TRANSFAC, TRRD and COMPEL: Towards a federated database system on transcriptional regulation.
Nucleic Acids Res. **25**: 265-268.
- Winkler, H., Adam, G., Mattes, E., Schanz, M., Harting, A. and Ruis, M. 1988.
Co-ordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins: a binding site for the HAP1(CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (CTT1).
EMBO J. **7**: 1799-1804.
- Workman, J.L. and Buchman, A.R. 1993.
Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription.
Trends Biochem. Sci. **18**: 90-95.
- Xing, Y., Fikes, J.D. and Guarente, L. 1993.
Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box binding domain.
EMBO J. **12**: 4647-4655.
- Yang, X., Hubbard, E.J.A. and Carlson, M. 1992.
A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system.
Science **257**: 680-682.
- Yang, X., Jiang, R. and Carlson, M. 1994.
A family of protein containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex.
EMBO J. **13**: 5878-5886.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985.
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**: 103-119.
- Yoo, H.-Y., Jung, S.-Y., Kim, Y.-H., Kim, J., Jung, G. and Rho, H. M. 1995.
Transcriptional control of the *Saccharomyces cerevisiae* ADH1 gene by autonomously replicating sequence binding factor 1.
Curr. Microbiol. **31**: 163-168.

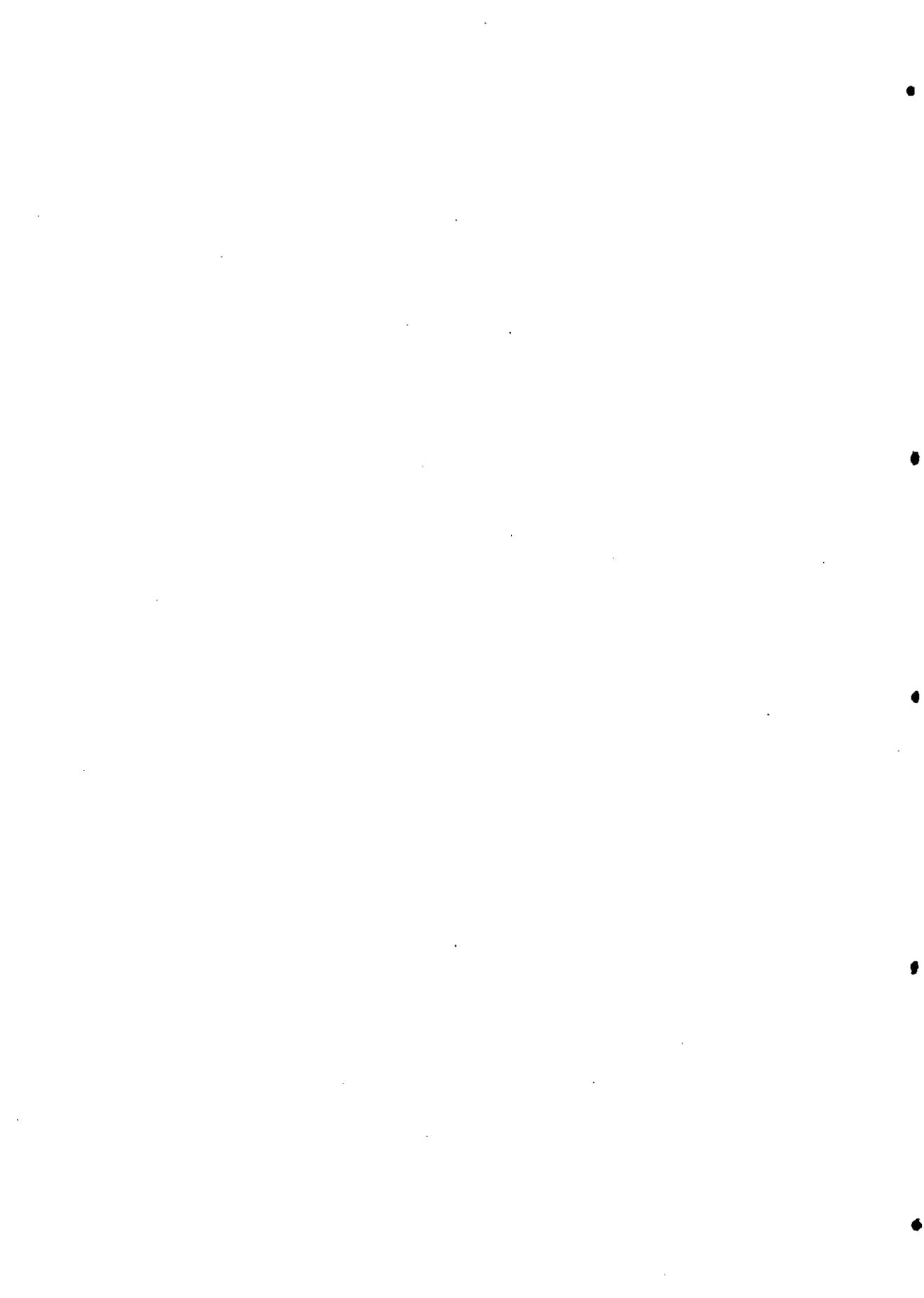
- Youderian, P., Bouvier, S. and Susskind, M., 1982.
Sequence determinants of promotes activity.
Cell 30: 843-853.
- Yura, T. and Ishihama, A. 1979.
Genetics of bacterial RNA polymerases.
Ann. Rev. Genet. 13: 59-97.
- Zacharie, W., Kuger, P. and Breunig, K.D. 1993.
Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator *LAC9 (KIGALA)*.
Nucleic Acids Res. 21: 69-77.
- Zaror, I., Marcus, F., Tung, J. and Shuster, J. 1993.
Fructose-1,6-biphosphatase of the yeast *Kluyveromyces lactis*.
Eur. J. Biochem. 212: 193-199.
- Zawel, L. and Reinberg, D. 1993.
Initiation of transcription by RNA polymerase II: A multi-step process.
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 44: 67-108.
- Zenke, F., Zachariae, W., Lunkes, A. and Breunig, K.D. 1993.
Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon.
Mol. Cell. Biol. 13: 7566-7576.
- Zhang, L. and Guarente, L. 1994.
HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme.
J. Biol. Chem. 20: 14643-14647.
- Zhang, L. and Guarente, L. 1996.
The C6 zinc cluster dictates asymmetric binding by HAP1.
EMBO J. 15: 4676-4681.
- Zhang, M., Rosenblum-Vos, L.S., Lowry, C.V., Boakye, D.A. and Zitomer, R.S. 1991.
A yeast protein with homology to the β -subunit of G proteins is involved in control of heme-regulated and catabolite-repressed genes.
Gene 97: 153-161.
- Zhou, Z. and Elledge, S.J. 1992.
Isolation of *ctr* mutants constitutive for transcription of the DNA damage inducible gene *RNR3* in *Saccharomyces cerevisiae*.
Genetics 131: 851-866.
- Zitomer, R.S. and Hall, B.D. 1976.
Yeast cytochrome c messenger RNA *in vitro* translation and specific immunoprecipitation of the *CYC1* gene product.
J. Biol. Chem. 251: 6320-6326.
- Zitomer, R.S., Limbach, M.P., Rodríguez-Torres, A.M., Balasubramanian, B., Deckert, J. and Snow, P.M. 1997.
Approaches to the study of Rox1 repression of the hypoxic genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
Methods: A Companion to Methods Enzymol. 11: 279-288.
- Zitomer, R.S. and Lowry, C.V. 1992.
Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*.

Microbiol. Rev. **56**: 1-11.1080

Zitomer, R.S, Sellers, J.W., McCarter, D.W, Hastings, G.A., Wick, P. and Lowry, C.V. 1987.
Elements involved in oxygen regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYC7* gene.
Mol. Cell. Biol. **7**: 2212-2220.

Zolnierowicz, S.C., Csontos, C., Bonder, J., Verin, A., Mumby, M.C. y col. 1994.
Diversity of regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain.
Biochemistry **33**: 11858-11867.

Abreviaturas



ADN o DNA ácido desoxirribonucleico

ssDNA single stranded DNA o ADN monocatenario

dsDNA double stranded DNA o ADN bicatenario

AE actividad enzimática

ARN o RNA ácido ribonucleico

BRL Bethesda Research Laboratories

BrEt bromuro de etidio

°C grados centígrados

CSH *Cold Spring Harbor Laboratory*

DEPC dietil-pirocarbonato

DMF dimetil-formamida

DMSO dimetil-sulfósido

DTE ditioeritritol

DTT ditioneitol

ddNTPs didesoxi-nucleótido-tri-fosfato

dNTPs desoxi-nucleótido-tri-fosfato

EDTA ácido etilenodiaminotetracético

GBF-Braunschweig *Gesellschaft fuer Biotechnologische Forschung*

GCG *Genetic Computer Group*

h hora

IPTG *isopropylthio-β-D-galactoside*

MCS (*Multiple Cloning Site*) sitio de clonación múltiple

min minuto

MOPS Ácido 3-[N-Morfolino]-propano-sulfónico

Nucleótidos

A base nitrogenada o nucleótido adenina

C base nitrogenada o nucleótido citosina

G base nitrogenada o nucleótido guanina

T base nitrogenada o nucleótido timina

ONPG *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido

ORF *Open Reading Frame* (pauta abierta de lectura)

pb pares de bases

PEG polietilen glicol

p/p porcentaje en peso

r.p.m. revoluciones por minuto

s segundos

tfsites *transcription factor sites* (sitios para factores de transcripción)

Tm temperatura de *melting* (temperatura de fusión del DNA)

U unidades

UAS *Upstream Activation Site* o sitio de activación 5' anterior

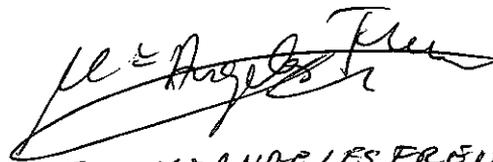
UV luz ultravioleta

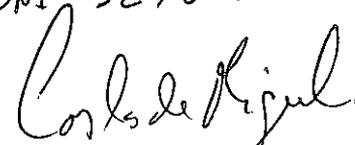
X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido

YNB *Yeast Nitrogen Base* o base nitrogenada para levaduras

EL TRIBUNAL OTORGA POR UNANIMIDAD
LA CALIFICACION DE APTO "CUM LAUDE"


Fdo. M. Paz Suarez Rondero
DNI 10.777.991


FDO: M. ANGELES FREIRE
DNI: 32760558


Fdo CARLOS DE MIGUEL VÁZQUEZ
DNI: 30.427.447


Fdo Rosaura Rodicio
DNI 10.035201


Asdo. Javier Batlle Fornodon
DNI. 1470.780

EN LA CORUÑA 7 - NOVIEMBRE - 1997

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759519

1997
TD
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
AREA DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR



UNIVERSIDADE DA CORUÑA