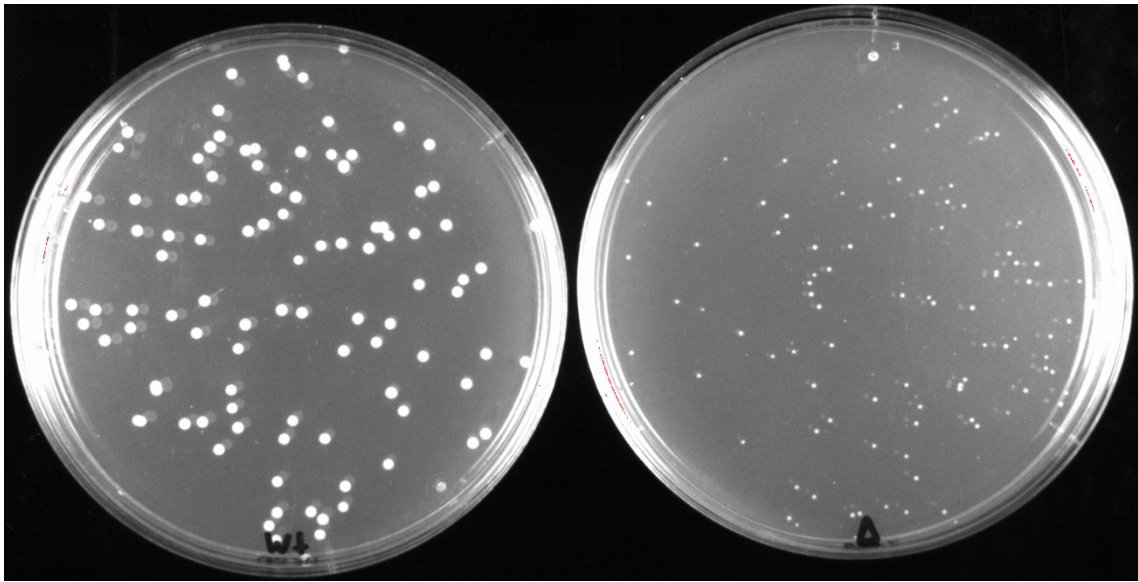


# CARACTERIZACIÓN DEL GEN *KIIXR1* Y SU INFLUENCIA EN LA RESPUESTA AL AGENTE ANTI-CANCERÍGENO CISPLATINO



*Agustín Rico Díaz*

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 2  |
| 2. OBJETIVOS.....  | 4  |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....   | 5  |
| 3.1. Material biológico.....   | 5  |
| 3.2. Medios y condiciones de cultivo.....  | 5  |
| 3.3. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.....   | 7  |
| 3.4. Técnicas analíticas.....  | 11 |
| 3.5. Técnicas electroforéticas.....  | 12 |
| 3.6. Técnicas cromatográficas.....   | 13 |
| 3.7. Ensayos de retardo en gel.....  | 14 |
| 3.8. Herramientas bioinformáticas.....   | 14 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 15 |
| 4.1. Análisis comparativo de la estructura de Ixr1p en <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. lactis</i> ..... | 15 |
| 4.2. Clonación de <i>KLIXR1</i> en un vector lanzadera de <i>S. cerevisiae</i> .....                 | 16 |
| 4.3. Complementación de los fenotipos del nulo $\Delta$ <i>ixr1</i> de <i>S.cerevisiae</i> .....     | 19 |
| 4.4. Obtención de un nulo $\Delta$ <i>ixr1</i> de <i>K. lactis</i> .....                             | 21 |
| 4.5. Fenotipos asociados a la anulación de $\Delta$ <i>ixr1</i> en <i>K. lactis</i> .....            | 26 |
| 4.6. Obtención de una construcción para la purificación de <i>Klixr1p</i> .....                      | 33 |
| 4.7. Interacción de <i>Klixr1p</i> con el promotor de <i>KIHEM13</i> .....                           | 34 |
| 5. CONCLUSIONES.....   | 36 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 37 |

## 1. INTRODUCCIÓN

El cisplatino (cis-diamino-dicloroplatino (II)) es uno de los agentes más usados en el tratamiento de algunos tipos de cánceres, tales como el testicular, de vejiga, de ovario, de cabeza y cuello, cervical, de hígado y colorrectal. Su modo de acción se relaciona con la capacidad que tiene para formar aductos intracatenarios e intercatenarios con moléculas de DNA (Zamble & Lippard, 1995; Jamieson & Lippard, 1999). Sin embargo, la efectividad del cisplatino se ve mermada por el desarrollo de fenómenos de resistencia. Se ha comprobado que estos fenómenos se producen por varias causas, entre las que se incluyen cambios en el funcionamiento de transportadores celulares, potenciamiento del sistema de detoxificación celular o modificaciones en las rutas relacionadas con la muerte celular programada o apoptosis (Stewart, 2007; Köberle *et al.*, 2010). Otra de las posibles causas es la reducción en la expresión de ciertas proteínas con afinidad por el DNA, las cuales se supone que enmascaran el aducto producido por el cisplatino a la acción de sistemas de reparación celular tales como el NER (*Nucleotide excision repair*). Al estar disminuida su cantidad, se ha propuesto que los sistemas de reparación actúan más rápidamente, limitando de esta forma la acción del cisplatino (Huang *et al.*, 2005).

Existe un grupo de proteínas que se caracterizan por la presencia de dominios de unión a DNA denominados HMG (*High mobility group*). Algunos estudios han defendido la relación de proteínas HMG con fenómenos de resistencia al cisplatino (Nagatani *et al.*, 2001; Florea & Büsselberg, 2011). Uno de los genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *IXR1*, expresa una proteína que se caracteriza por presentar dos dominios HMG y tener la capacidad de unirse a DNA platinado (McA Nulty *et al.*, 1996). Diversos ensayos han mostrado que cepas con este gen anulado presentan un fenotipo de resistencia al cisplatino, confirmando su papel en la respuesta a este fármaco (Brown *et al.*, 1993). Ixr1p también está implicada en otros importantes mecanismos celulares como es la respuesta a condiciones de stress oxidativo o de bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia). En este sentido, se ha observado un control de Ixr1p sobre algunos genes hipóxicos como *HEM13*, potenciando su expresión ante condiciones de escasez de oxígeno (Castro-Prego *et al.*, 2010b). A su vez, Ixr1p inhibe genes como *ROX1* en condiciones de hipoxia, viéndose inhibido por Rox1p en presencia de oxígeno (Castro-Prego *et al.*, 2010a). Por otro lado se comprobó que cepas con *IXR1* anulado crecían menos ante condiciones de estrés oxidativo, indicando un papel importante en la

respuesta a estas condiciones. Por otra parte, en *S. cerevisiae* se ha visto que la presencia de metales pesados como el cadmio puede desencadenar indirectamente respuestas ante estrés oxidativo, mediante diferentes mecanismos (Brennan & Schiestl, 1996).

Es evidente que en *S. cerevisiae* *IXR1* tiene un papel importante en el control de varios procesos celulares, algunos de ellos fuertemente relacionados con las condiciones asociadas a procesos tumorales en eucariotas pluricelulares, como es el caso de la insuficiencia de oxígeno. *Kluyveromyces lactis* es una levadura con un metabolismo predominantemente respiratorio, a diferencia de *S. cerevisiae* que es fermentador (González-Siso *et al.*, 2000). La caracterización de un gen homólogo de *IXR1* en *K. lactis* es de interés tanto desde el punto de vista evolutivo como por las posibles aplicaciones clínicas que puedan deducirse. Además, *K. lactis* es un organismo con un gran potencial biotecnológico, utilizado en diversas aplicaciones como el tratamiento de residuos en industrias lácteas o la producción de proteínas heterólogas (González-Siso *et al.*, 2000; González-Siso *et al.*, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

En este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos relacionados con la caracterización funcional del gen *IXR1* de *K. lactis* (*KlIXR1*)

1.- Clonación del gen *KlIXR1* en un vector que permita expresarlo en *S. cerevisiae* a fin de hacer estudios de complementación funcional en esta levadura

2.- Obtención de un *knock-out* del gen en *K. lactis* y análisis fenotípico respecto a su sensibilidad a cisplatino y otros fenotipos relacionados

3.- Obtención de una construcción para la expresión y purificación de la proteína que permita, en trabajos posteriores, su caracterización bioquímica y estructural.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### 3. 1. MATERIAL BIOLÓGICO

##### 3.1.1. Cepas

Se utilizaron varias cepas bacterianas. Se usó la cepa de *Escherichia coli* XL1- Blue de Stratagene® (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZDM15 Tn10* (Tetr)]) en la mayoría de procedimientos, y la cepa BL21(DE3) de Invitrogen® (*F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*) para la expresión de proteína.

Se usaron las cepas de *K. lactis* YRRL-Y1140 o ATCC8585 (*MATa*) y MW190-9b (*MATa, uraA, lac4-8*).

Se usaron varias cepas de *S. cerevisiae*: W303 (*MATa ade2-1 can1-100 leu2-3,112 trp1-100 ura3-52*), BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) de EUROSCARF y BWG1-7a (*MATa ade1-100 leu2-2,112 his4-519 ura3-52*).

##### 3.1.2. Vectores

Para clonar el inserto de interés se usó el vector lanzadera YEplac195 [*ampr ori 2μm lacZ URA3*]. El cassette KanMX4 necesario para la elaboración de la cepa anulada se aisló del plásmido pFA6a-kanMX4 (Wach *et al.*, 1994). Para la expresión de la proteína se usó el vector de expresión pOPTH [*ampr ori 2μm His6*].

#### 3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

El medio usado para el crecimiento de las bacterias fue LB (Luria-Bertani), compuesto por bacto-triptona al 1 %, glucosa al 0,1 %, extracto de levadura al 0,5 % y NaCl al 0,5 %. Como medio selectivo se utilizó LB con ampicilina a una concentración de 77μg/ml o con kanamicina a una concentración de 30 μg/ml.

En el caso de las levaduras se usó como medio general YPD (extracto de levadura al 1%, bactopectona al 0,5 % y D-Glucosa al 0,5 %). En algunos casos se sustituyó la fuente de carbono por galactosa o glicerol, manteniendo la misma concentración utilizada en el caso de la glucosa. La selección se realizó usando medio CM, adecuando en cada caso la composición de aminoácidos o bases nitrogenadas a la auxotrofia a

seleccionar (Zitomer & Hall, 1976), en este caso preparándolo sin uracilo. El medio CM-URA está compuesto por glucosa al 2 %, aminoácidos (60 mg/L de isoleucina y fenil-alanina; 40 mg/L de histidina, leucina, adenina, lisina y tirosina; 30 mg/L de triptófano; y 10 mg/L de arginina, metionina, treonina y lisina) y 67 mL/L de YNB (*Yeast Nitrogen Base*). También se usó como medio de selección YPD suplementado con geneticina a una concentración de 0,3 mg/mL. En el caso de que se preparase medio sólido, se complementaron las mezclas anteriormente citadas con agar al 1,5 %.

Los cultivos de bacterias se dejaron crecer a 37°C durante 24 horas, mientras que los de levaduras se dejaron crecer a 30°C durante 48 horas.

### 3.2.1. Ensayos fenotípicos

Para llevar a cabo los ensayos en placa del efecto del gen *KIIXRI* en la resistencia de la levadura al stress oxidativo, se prepararon placas de medio CM, con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM, 0,4mM, 0,6 mM, 0,8 mM, y 1mM). Por otra parte, a partir de un preinóculo de levadura puesto a crecer en CM 24 horas antes, se llevó el medio a una DO<sub>600</sub> de 0,1. Más tarde se realizaron diluciones seriadas del cultivo hasta una dilución de 10<sup>-5</sup>. Las diluciones se realizaron en una placa multipocillos, utilizando una pipeta multicanal para facilitar el procedimiento. Se vertieron 10 µL de cada dilución de cada una de las 3 cepas ensayadas en cada una de las placas a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después de dejar incubar las placas durante 48 horas a 30 °C, se observó el crecimiento de levaduras que tuvo lugar en cada caso.

De la misma forma se prepararon las placas con concentraciones de cadmio (0, 10, 25 y 50 mM) y de cisplatino (0,5 mM), realizando en este caso el ensayo en placas de YPD.

Para realizar el conteo de colonias viables al tratamiento con cisplatino, se partió de cultivos en medio CM completo con una OD<sub>600</sub> = 1, y se hicieron cuatro diluciones seriadas. De cada muestra diluida hasta 10<sup>-4</sup> se tomaron varias alícuotas de 200 µL, tratando cada una de ellas con diferentes concentraciones de cisplatino (0, 5, 10, 15, 25 y 50 µM). El cisplatino se diluyó en DMSO y al control también se le añadió DMSO. Se incubaron las muestras durante 3 horas a 30 °C en agitación continua, tras lo cual se sembraron con bolas de siembra 50 µL de las distintas alícuotas en placas YPD por triplicado. Finalmente, se incubaron durante 3 días a 30 °C y se hizo recuento en placa de las colonias emergentes.

### 3.2.2. Crecimiento de cultivos en condiciones de hipoxia

Las condiciones de baja concentración de oxígeno se generaron en jarras anaeróbicas, usando el sistema *GasPack EZ-Anaerobe* de BD<sup>®</sup>. Para que fuese posible el crecimiento de las levaduras, se suplementó el medio YPD con ergosterol a una concentración de 20 mg/mL, y Tween 80 0,5 % v/v.

## 3.3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 3.3.1. Extracción de DNA plasmídico

Para realizar el aislamiento de DNA plasmídico se usaron varios kits comerciales, concretamente el *mi-Plasmid Miniprep Kit* de Metabion<sup>®</sup> y el *GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit* de Fermentas<sup>®</sup>. Los procedimientos se realizaron según las recomendaciones del fabricante.

### 3.3.2. Extracción de DNA genómico

El aislamiento del DNA genómico se realizó según métodos previamente descritos (Ausubel, 2002). Se cultivó la levadura en 10 mL de medio líquido YPD toda la noche. Posteriormente se separaron las células del medio mediante centrifugación. Las células se resuspendieron en *Breaking Buffer* (2% tritón 100X, 1% SDS 20%, 100mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8) y se le añadió RNAsa (25 mg/mL). La rotura celular se llevó a cabo utilizando perlas de vidrio. Al mismo tiempo se añadió PCIA (fenol-cloroformo-isoamílico) con el fin de separar las proteínas. Después de añadir buffer 1xTE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y EDTA 1 mM), y centrifugar la muestra, se tomó la fase superior. Más tarde se añadió alcohol a concentraciones decrecientes (al 95% y 70 %) con el fin de precipitar primero y lavar después el DNA que se separó por centrifugación. Finalmente se secó la muestra en bomba de vacío y el DNA se resuspendió en 50 µl de agua y se conservó en la nevera (4°C).

### 3.3.3. Extracción de RNA total

La extracción de RNA se realizó con un kit (NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II de Machery-Nagel<sup>®</sup>) comercial, siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante.



### 3.3.4. Amplificación de DNA mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar PCR de comprobación de candidatos se usó la *DreamTaq polimerase* (Fermentas<sup>®</sup>). Para la amplificación de *KLXR1* se usaron las polimerasas de alta fidelidad *Vent<sup>®</sup>DNA polymerase* de New England Biolabs<sup>®</sup>, y *Pfu Polymerase* de Fermentas<sup>®</sup>.

La mezcla de reacción estándar fue la siguiente: 2  $\mu\text{L}$  de tampón de la polimerasa 10x (25 mM  $\text{MgCl}_2$ ); 1,6  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTPs 2,5 mM; 1  $\mu\text{L}$  de cada cebador 10 pmol/ $\mu\text{L}$  (suministrados por Roche<sup>®</sup> o ISOGEN); 0,2  $\mu\text{L}$  de polimerasa (1U/ $\mu\text{L}$ ); 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA molde (este volumen puede variar en función de la concentración del DNA molde para añadir entre 20 y 100 ng de DNA), y agua destilada hasta un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ .

La programación general de ciclos fue la siguiente: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 6 minutos; 30 ciclos compuestos de una etapa inicial de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, una segunda etapa de hibridación con los cebadores de 30 segundos a una temperatura dependiente de su temperatura de anillamiento y una etapa de elongación a 72°C de una duración de aproximadamente 1 minuto por cada kilobase a amplificar; por último se realizó un ciclo de 7 minutos a 72°C de extensión final.

Los oligonucleótidos utilizados en el trabajo se muestran en la Tabla 1.

| Cebador  | Secuencia   | Template         | Hebra | Sitio restricción | Posición hibridación |
|----------|---|------------------|-------|-------------------|----------------------|
| ECV719   | GGG <u>G</u> CATGCCAGACGGGCCA<br>GACAGC                     | <i>KIIXR1</i>    | W     | <i>SphI</i>       | -698                 |
| ECV720   | GGG <u>G</u> TCGACCGGAATGTACG<br>TTGGATCTGC                 | <i>KIIXR1</i>    | C     | <i>SalI</i>       | +2005                |
| ECV763   | TTT <u>G</u> CGGCCGCTGTTTCGCTAT<br>GTCCTTGGTT               | <i>KIIXR1</i>    | C     | <i>NotI</i>       | +12                  |
| ECV764   | TTT <u>G</u> CGGCCGCGCTGAAGCTG<br>CTGCAG                    | <i>KIIXR1</i>    | W     | <i>NotI</i>       | +1374                |
| ECV765   | GTCTAGCACTCTCCAGTG  | <i>KIIXR1</i>    | W     |                   | -640                 |
| ECV766   | GAGAAGTCGTATATGCCTTCA<br>TTAC                               | <i>KIIXR1</i>    | C     |                   | +1968                |
| ECV808AR | TTAGGAAACCATTGTACATA<br>GATTTGTG                            | <i>KIIXR1</i>    | W     |                   | -822                 |
| ECV809AR | TCCTATTCCACCTTTCAGGAT<br>ACAAC                              | <i>KIIXR1</i>    | C     |                   | +2241                |
| ECV315K2 | GCCTCGACATCATCTGCCAG  | pFA6a-<br>kanMX4 | W     |                   | +1322                |
| ECV314K3 | CGCCTTAATTAACCCGGGGAT                                       | pFA6a-<br>kanMX4 | C     |                   | +45                  |
| AVV21    | GCGG <u>A</u> TTAATATGAATCTCAA<br>TAACCAAGGACATAGC          | <i>KIIXR1</i>    | W     | <i>VspI</i>       | +1                   |
| AVV22    | GGGCA <u>A</u> GCTT<br>TCATTCTGCAGCAGCTTCAGC                | <i>KIIXR1</i>    | C     | <i>HindIII</i>    | +1374                |
| AVV83q   | AAATGGAAGACAACCCGCC   | <i>KITAF10</i>   | W     |                   | +217                 |
| AVV84q   | TTACGAATTTCTGTGTAGCAA<br>GAGC                               | <i>KITAF10</i>   | C     |                   | +315                 |
| AVV85q   | ACCTGGAATGCGGACGG   | <i>KIHEM13</i>   | W     |                   | +558                 |
| AVV86q   | TGTCCAAAGCATCCTTGTGC  | <i>KIHEM13</i>   | C     |                   | +662                 |
| AVV87    | TTTTATCTTGAATGTATGTTG<br>GTTTCAGCCTCTATTTCTCTCG<br>TAGATAGT | <i>KIHEM13</i>   | W     |                   | -388                 |
| AVV88    | TTTACTATCTACGAGAGAAAT<br>AGAGGCTGAACCAACATACA<br>TTCAAGATA  | <i>KIHEM13</i>   | C     |                   | -358                 |

**Tabla 1: Oligonucleótidos usados en el presente trabajo. Las secuencias subrayadas son dianas de restricción. W, cadena Watson; C, cadena Crick.**

### 3.3.5. Manipulación de DNA con enzimas

Para los procedimientos de clonación y en diversas comprobaciones se usaron varias endonucleasas de restricción (Fermentas<sup>®</sup>, New England Biolabs<sup>®</sup> y Roche<sup>®</sup>). Las reacciones se realizaron a 37°C durante 2 horas, usando los tampones suministrados por la casa comercial.

Para hacer los ligamientos entre los insertos y los vectores correspondientes se realizó una mezcla 5:1 (inserto:vector) y se añadió una ligasa (*T4 DNA Ligase* de Fermentas<sup>®</sup>), dejándola actuar durante toda la noche a 4°C.

### 3.3.6. Purificación de DNA

Para la purificación de fragmentos de DNA amplificados en una PCR y fragmentos de agarosa rescatados de geles se usaron los kits comerciales *SpinClean™ Purification Kit* de Metabion<sup>®</sup> y *GeneJET™ PCR Purification Kit* de Fermentas<sup>®</sup>. Para limpiar los restos de enzimas en las reacciones de digestión también se utilizó el *GeneJET™ PCR Purification Kit* de Fermentas<sup>®</sup>.

### 3.3.7. Transformación de bacterias

Se transformaron células competentes de *E. coli* (*XLI-Blue Competent Cells*, Stratagene<sup>®</sup>). Para ello, en primer lugar se descongelaron las células poniéndolas 20 minutos en hielo. Más tarde se añadió a 100 µl de estas células el producto ligado el día anterior. La mezcla se dejó 1 minuto en hielo y se le aplicó un choque térmico a 42°C, durante 45 segundos. Después de resuspender el contenido en 1 mL de LB, se dejaron recuperar a las células durante 30 minutos a 36 °C. Pasado este tiempo se centrifugaron las células a 4.000xg durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y utilizando el *pellet* (≈100µl) para sembrar las placas de LBA o LB kanamicina, dependiendo del vector utilizado. Las placas incubaron durante toda la noche a 36 °C.

También se transformaron cepas BL21 (DE3) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

### 3.3.8. Transformación de levaduras

Para la transformación de levaduras se utilizó el método del acetato de litio. Para llevarlo a cabo, en primer lugar se cultivaron las levaduras en medio de cultivo sólido YPD durante 48 horas a 30 °C. Pasado este tiempo, se resembraron las levaduras, esta

vez en medio líquido YPD, dejándolas crecer 24 horas a la misma temperatura. Más tarde se inocularon 10 mL de medio a una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) de 0,4, dejando crecer el cultivo durante 2 horas a 30 °C, para que finalmente alcanzase una densidad celular correspondiente a una  $OD_{600}$  de 0,6-0,8. Después de precipitar las células de levadura mediante centrifugación a 5000 rpm, se realizó la transformación propiamente dicha, añadiendo PEG, DNA de salmón fragmentado y el plásmido de interés a las células de levadura. Después de cultivar la mezcla a 30°C durante 30 minutos, se incubó con DMSO (Dimetil Sulfoxido de Sigma-Aldrich®) a 42°C durante 7 minutos y se dejaron crecer las células durante 2-3 horas en YPD. Más tarde se volvieron a precipitar las células, resuspendiéndolas finalmente en agua para sembrarlas en placas CM-URA (el vector Yeplac 195 contiene un gen que permite el crecimiento de la levadura en condiciones de deficiencia en uracilo).

Después de dejar crecer las levaduras durante 48 horas a 30 °C, se resembraron un par de colonias en otra placa para ser utilizadas en los ensayos posteriores.

### 3.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 3.4.1. Medida de concentración de ácidos nucleicos

Para la medida de la concentración en la muestra de DNA y RNA se utilizó el *NanoPhotometer* de IMPLEN®.

#### 3.4.2. PCR cuantitativa en tiempo real

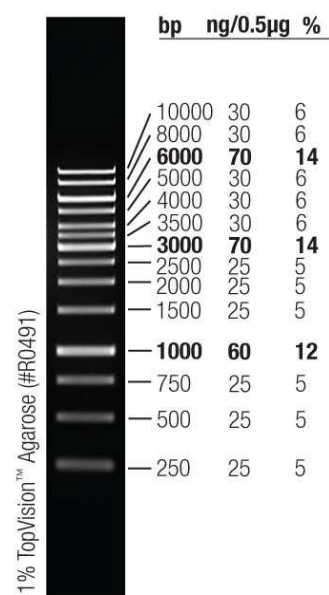
Los ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real se hicieron en un termociclador “Eco Real-Time PCR System” de Illumina®. La mezcla de reacción se realizó siguiendo las instrucciones del *KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Kit* (Kapa biosystems®).

### 3.5. TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS

#### 3.5.1. Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de productos de PCR y digestiones se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles utilizados eran de una concentración de agarosa al 0,7 %, preparados en tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0,04 M, EDTA 1 mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM).

El voltaje utilizado para llevar a cabo las electroforesis fue de 65 V. Se usó como referencia de tamaños moleculares el marcador *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas®) (Figura 1). Para visualizar el DNA se añadió a la muestra el intercalante GelGreen™ (Biotium®) a una concentración 1X. Se visualizaron las muestras exponiendo los geles a luz UV en un transiluminador *Molecular Imager Gel Doc XR+* (BioRad®).

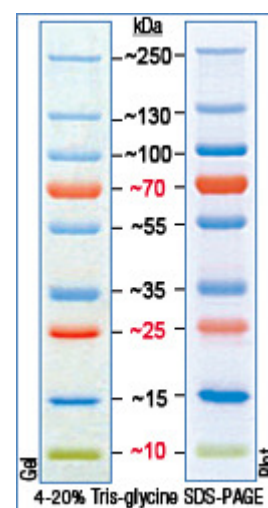


0.5 µg/lane, 8 cm length gel,

**Figura 1: Tamaños moleculares del marcador *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas®)**

#### 3.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para realizar el análisis de proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) empleando un sistema *Mini Protean II* (BioRad). El gel separador se preparó al 10% de acrilamida y 0,1% SDS y el gel concentrador al 5% de acrilamida. Las muestras se diluyeron al 50% con tampón de carga (Tris-HCl 0,12 M pH 6,8, SDS al 6%, glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol al 15% y azul de bromofenol 0,0025%) y se desnaturalizaron mediante una incubación a 95°C durante 5 minutos. La cubeta se rellenó hasta cubrir el gel con tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% pH 8,3). Se usó como marcador de referencia el *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas®) (Figura 2).



**Figura 2: Tamaños moleculares del marcador *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (Fermentas®)**

Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje de 160 V.

La tinción de los geles se llevó a cabo sumergiéndolos en una solución precalentada de Azul de Coomassie en ácido acético (*Coomassie brilliant*

blue 0,1%; Ác. acético 10%) durante 10 minutos en agitación suave. Después de la tinción se realizó un lavado en una solución de ácido acético 10% para retirar el exceso de colorante. Para tomar imágenes de los geles se usó el equipo *Molecular Imager Gel Doc XR+* (BioRad®).

### 3.6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

#### 3.6.1. Cromatografía de afinidad: Purificación de la proteína unida a un epítipo de histidinas

Se partió de un cultivo de 2 L y cuando presentaba una  $OD_{600}=1$ , se indujo la expresión de la proteína añadiendo 2 mL de IPTG. Pasadas 3 horas, se centrifugó el cultivo a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, resuspendiendo las células en 10 mL de tampón NaCl 100 mM, Tris 50 mM a pH 8, en el que anteriormente se disolvieron inhibidores de proteasas (*Complete Mini EDTA-free* de Roche®). Posteriormente, se lisó la suspensión celular usando un sonicador *Vibra-Cell VCX130* (Sonics®), realizando ciclos de sonicación de 2 segundos al 100% de amplitud, con descansos de 8 segundos en hielo, durante un total de 7 minutos. El extracto de lisado se centrifugó a 13.000 r.p.m, durante 25 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se filtró a través de membranas (Analypore®) de 22 µm de poro para eliminar restos celulares.

Se utilizó una columna *HisTrap™HP Column* (GE Healthcare®) que se caracteriza por presentar cationes  $Ni^{2+}$  acomplejados, lo que le confiere afinidad por las histidinas. Después de cargar la columna con el extracto crudo, ésta se conectó a un sistema *AKTA® Prime Plus* (GE Healthcare®). Se eluyó la muestra con un buffer NaCl 100 mM, Tris 50 mM pH8, 500mM Imidazol (Sigma-Aldrich®), a un flujo constante de 3 mL/min.

Las alícuotas obtenidas fueron concentradas a través de filtros de centrifuga Ultra Ultracell-30K (Amicon®) que retienen moléculas de peso molecular mayor a 30 KDa.

### 3.7. ENSAYOS DE RETARDO EN GEL (EMSA)

Después de hibridar ambos oligonucleótidos complementarios entre sí, se realizó el marcaje radiactivo. Para ello se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de cebadores (se encontraba a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ ) con 5  $\mu\text{L}$  de *buffer 10X H* (Takara<sup>®</sup>), 3  $\mu\text{L}$  de nucleótidos dNTPs marcados con isótopo radiactivo ( $\alpha^{32}\text{P}$  dATP), 1  $\mu\text{l}$  del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (Fermentas<sup>®</sup>), y 36  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se realizó la reacción a 37 °C durante 1 hora. El producto se purificó mediante columnas de exclusión molecular con Sephadex G-50 saturado con STE (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM y SDS 1%). Se seleccionaron las fracciones de radiactividad mayor con un contador Geiger (*mini-monitor G-M tube serie 900* de Morgan<sup>®</sup>). Más tarde se determinaron las c.p.m. (cuentas por minuto) de cada una de las fracciones seleccionadas con un contador de centelleo (*Wallac System 1410<sup>TM</sup> liquid scintillation counter* de Pharmacia<sup>®</sup>), escogiéndose las que presentasen unos valores en torno a 10.000 c.p.m.

Se mezclaron 3  $\mu\text{L}$  de DNA marcado con 4  $\mu\text{L}$  de la proteína purificada. Además se añadieron 1-2 ng de DNA salmón como *carrier*. Se usó como tampón de la reacción una mezcla de HEPES (4(2-hidroxietil)-1-1 ácido piperazineetanosulfónico) 20 mM pH7,8, NaCl 0,1 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, EDTA 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 7 mM y glicerol 10%; llevando la mezcla a un total de 15  $\mu\text{L}$ . Después de dejar incubar la muestra durante 20 minutos a 14 °C, se cargó en un gel de poliacrilamida no desnaturizante (PAGE), realizándose una electroforesis, y secando más tarde el gel al vacío y a 80 °C durante 1 hora en un secador *Gel Dryer GD-3* (Owl Scientific Plastics<sup>®</sup>) sobre un papel de filtro. Se dejó este filtro sobre una película autorradiográfica *Lumifilm Chemiluminescent Detection Film* (Roche<sup>®</sup>) durante 48 horas a -80°C. Finalmente, la película fue revelada con soluciones reveladoras y fijadoras de AGFA<sup>®</sup>.

### 3.8. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Las secuencias utilizadas en el trabajo se obtuvieron de varias bases de datos: del NCBI (*National Center for Biotechnology Information* accesible a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de Génolevures (<http://genolevures.org/>) y de SGD (*Saccharomyces Genome Database*, <http://www.yeastgenome.org/>).

Para el estudio de homología entre secuencias se usaron herramientas informáticas como el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA DE Ixr1p EN *S. cerevisiae* y *K. lactis*

Para seleccionar el producto proteico de *K. lactis* que presentase mayor homología con Ixr1p de *S. cerevisiae* se sometió la secuencia aminoacídica de este último a un BlastX sobre el genoma de *K. lactis*. El resultado fue que el producto proteico de la ORF KLLA0E18481 fue la que presentaba mayores semejanzas (similitud del 34,4 % e identidad del 26,7%). Un análisis más profundo indicó que las secuencias se encontraban más conservadas en su extremo carboxilo-terminal, concretamente en la región en la que se encuentran los dos dominios de unión HMG, los cuales también aparecen en *K. lactis* (figura 3).

a)

```
Ixr1p      ---MNTGISPKQDDASNSNLLNIGQDHSLQYQGLEHNDSQYRDASHQTPHQYLNQFQAQP 57
KlIxr1p    MNLNNGQHSEHQDLMYSGEQEHAQQGHGVPVSMQVQSPQSYHMLSGQHSAGQVNSGNSNS 60
          * * * :**  .. : *.*. : . :. .*: * * . :*: :.:.

Ixr1p      QQQQQQQQQQQQQQQQAPYQGHFQQSPQQQQQNVVYPLPPQSLTQPTSQSQQQQQQQQQQ 117
KlIxr1p    VPAQSGVQSSQAGAGHPMAGGNGAGYSQYQFHNYFAPQNSMGGVANSSEQGVSSLPLQMQ 120
          *. *. * :. : * : . * * : * : * . . . :*: . . * *

Ixr1p      QYANSNSNSNNVNVNALPQDFGYMQQTGSGQNYPTINQQQFSEFYNSFLSHLTQKQINP 177
KlIxr1p    MQMPMPGHQVSDAMLNQILAQFNQRQQNQPES-----QQQQQAQV 160
          .. :. :. :* : :*. ** .*.                               *: :.

Ixr1p      SVTGTGASSNNSNNNVSSGNNSTSSNPAQLAASQLNPATAAAAAANNAAGPASYSLSQL 237
KlIxr1p    QAAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAHAASMQQHYGQAAGQISPRYYA 220
          .. : : * : : : : : : : : : : : : : * : * : . : : : : : : *

Ixr1p      PQVQRYYPNMNALSSLLDPSSAGNAAGNANTATHPGLLPPNLQPQLTHHQQMQQQLQL 297
KlIxr1p    QQQIMDSQVQIPSQFQLGGQSGGSGGAVNAAGVPPGGAG----- 260
          * : : : . : * . * . * . * . * : * * **

Ixr1p      QQQQLQQQQQLQQQHLLQQQQQLQQQHHLQQQQQQQQHPVVKKLSSTQSRIERRKQLK 357
KlIxr1p    -----AQRGGNQPGPKSGKRSAGSASPSTINGSGKTAQPPVKKLSITQIRIAKRKELK 313
          * : : : * : . : : . : : : : * : * * * * * * * * * * * * *

Ixr1p      KQGPKRPSSAYFLFSMIRNELLQGFPEAKVPELSKLASARWKELTDDQKPKPFYEEFRIN 417
KlIxr1p    KQGPKRPSSAYFLFSIRPELLKQYPDAKVPPELSKLSSAKWKSMTDEEKKPFDFQFKTN 373
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ixr1p      WEKYRVVRDAYEKILPPKRPSPFFIQFTQEIRPTVVKENPDKGLIEITKII GERWRELDP 477
KlIxr1p    WEKYRIARKKYEETLPPKRPSPFFLQFTKDIRPLLVEEQPKTLIEITKLI GERWRELDG 433
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Ixr1p      AKKAEYTETYKRLKEWESCYPDENDPNGNPTGHSHWAMNMLNMDTKIMENQDSIEHIT 537
KlIxr1p    PSKQKTYTDSYKRLKEWESYAEHEAFAAAE----- 464
          . * : * : * * : * * * * . * . : .

Ixr1p      ANAIDSVTGSNSNSTNPNTFVSPPIISLQQQPLQQQQQQQQQQHMLLADPTNGSIKNE 597
KlIxr1p    -----
```



b)

```
MNLNNQGHSEHQDLMYSGEQEHAQQGHGVPVSMQVQSPQSYHMLSGQHSAGQVNSGNSNSVPAQSGVQSS
QAGAGHPMAGGNGAGYSQYQFHNYFAPQNSMGGVANSSEQGVSSLPLQMOMQMPMPGHQVSDAMLNQILA
QFNQRQONQPGSQQQQQAQVQAAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAHAASMOQHYGQA
AGQISPRYYAQQQIMDSQVQIPSQFQFLGGQSGGSGSNAVNAAGVPGGAGAQRGGNQPQPKSGKRSAGS
ASPSTNGSGKTAQPPVKKLSITQTRIAKRKELKKQPKRPSAYFLFSISIRPELLKQYPPDAKVPKLSKL
SSAKWKSMTDEEKKPFFDQFKTNWEKYRIARKKYEETLPPKRPSGPFLQFTKDIRPLLVEEQPKTLIEI
TKLIGEKWRELDGSPKQKYTDSYKLLKKEWEEESYAEHEAEAAAAE
```

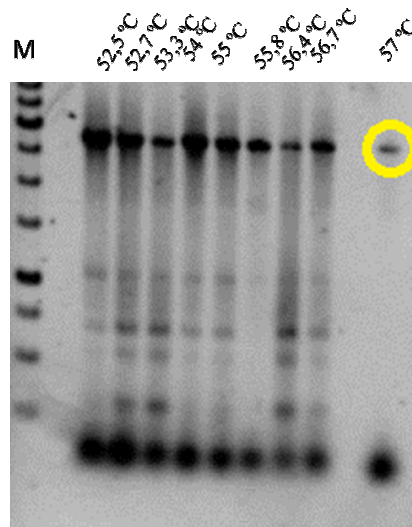
c)

```
MNLNNQGHSEHQDLMYSGEQEHAQQGHGVPVSMQVQSPQSYHMLSGQHSAGQVNSGNSNSVPAQSGVQSS
QAGAGHPMAGGNGAGYSQYQFHNYFAPQNSMGGVANSSEQGVSSLPLQMOMQMPMPGHQVSDAMLNQILA
QFNQRQONQPGSQQQQQAQVQAAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAQAHAASMOQHYGQA
AGQISPRYYAQQQIMDSQVQIPSQFQFLGGQSGGSGSNAVNAAGVPGGAGAQRGGNQPQPKSGKRSAGS
ASPSTNGSGKTAQPPVKKLSITQTRIAKRKELKKQPKRPSAYFLFSISIRPELLKQYPPDAKVPKLSKL
SSAKWKSMTDEEKKPFFDQFKTNWEKYRIARKKYEETLPPKRPSGPFLQFTKDIRPLLVEEQPKTLIEI
TKLIGEKWRELDGSPKQKYTDSYKLLKKEWEEESYAEHEAEAAAAE
```

Figura 3: a) Alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de *Ixr1p* y *KIxr1p*; b) Secuencia aminoacídica de *KIxr1p*. Las letras rojas indican la región en la que los aminoácidos están más conservados con respecto a la secuencia de *Ixr1p* de *S. cerevisiae*; c) Secuencia aminoacídica de *KIxr1p*. Las letras amarillas indican la región en la que se identificaron los dos dominios HMG.

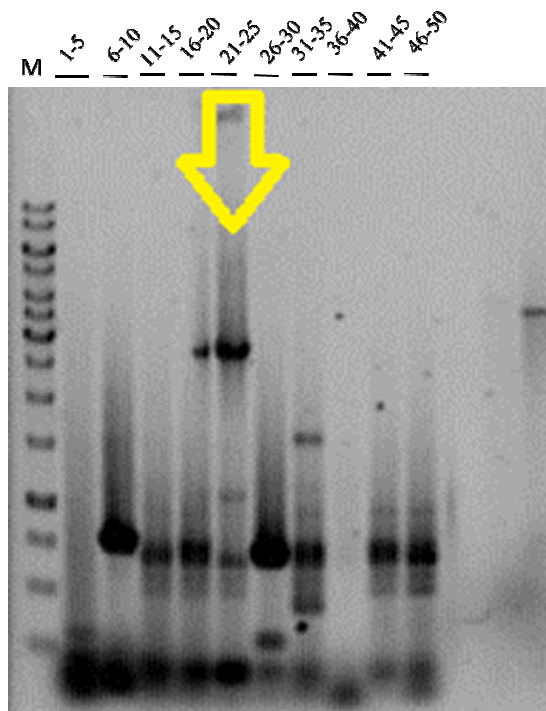
#### 4.2. CLONACIÓN DE *KIIXR1* EN UN VECTOR LANZADERA DE *S. cerevisiae*

A partir del DNA genómico de la cepa de *K. lactis* YRRL-Y1140 se realizó una PCR para amplificar el fragmento a clonar incluyendo el gen *KIIXR*, caracterizado por su homología con el de *S. cerevisiae*. Los cebadores utilizados fueron ECV 719 y ECV 720 (Tabla 1). La PCR se hizo en gradiente (52,5-57°C) para optimizar la temperatura de hibridación. Después de realizar la PCR y de limpiar el producto de PCR de sales, las muestras se analizaron en un gel de agarosa. La muestra indicada en la figura 4 fue la que se utilizó en el resto del experimento.



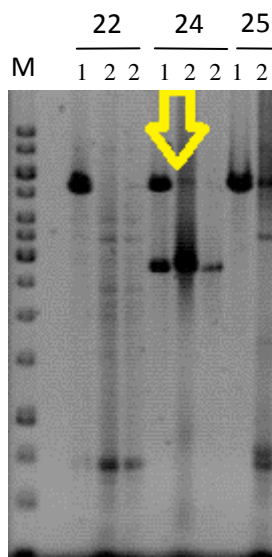
**Figura 4:** Imagen del gel de agarosa realizado con los productos de PCR del inserto de interés (2.724 pb), llevadas a cabo a distintas temperaturas de hibridación (indicadas en la parte superior de los carriles). La banda específica corresponde a la indicada con el círculo amarillo.

Más tarde se digirió el DNA de la muestra con las enzimas de restricción *SalI* y *NotI*, específicas para las dianas de restricción que se incluyeron en los cebadores ECV 719 y ECV 720. A su vez se digirió el vector lanzadera YEplac 195 con las mismas enzimas. Después de realizar el ligamiento entre el vector y el inserto, y transformar bacterias con el producto, se obtuvo el DNA plasmídico de los candidatos. Para la verificación de los candidatos se realizaron pruebas por PCR. Se comprobaron 50 candidatos, agrupándolos en grupos de 5 y más tarde verificando dentro de cada grupo los positivos. La banda esperada debía tener un tamaño de 2.724 pb (Figura 5).



**Figura 5:** Imagen del gel de agarosa de los productos de PCR (ECV719 y ECV720) realizadas con 50 colonias candidatas, agrupadas en grupos de 5. La amplificación indicada por la flecha amarilla fue la que produjo un resultado satisfactorio (banda de 2.724 pb).

En la verificación de los candidatos dentro del grupo de 5 seleccionado, además de la PCR de comprobación, también se realizó una digestión con *SalI* y *NotI* para observar si estaba presente el inserto (Figura 6).



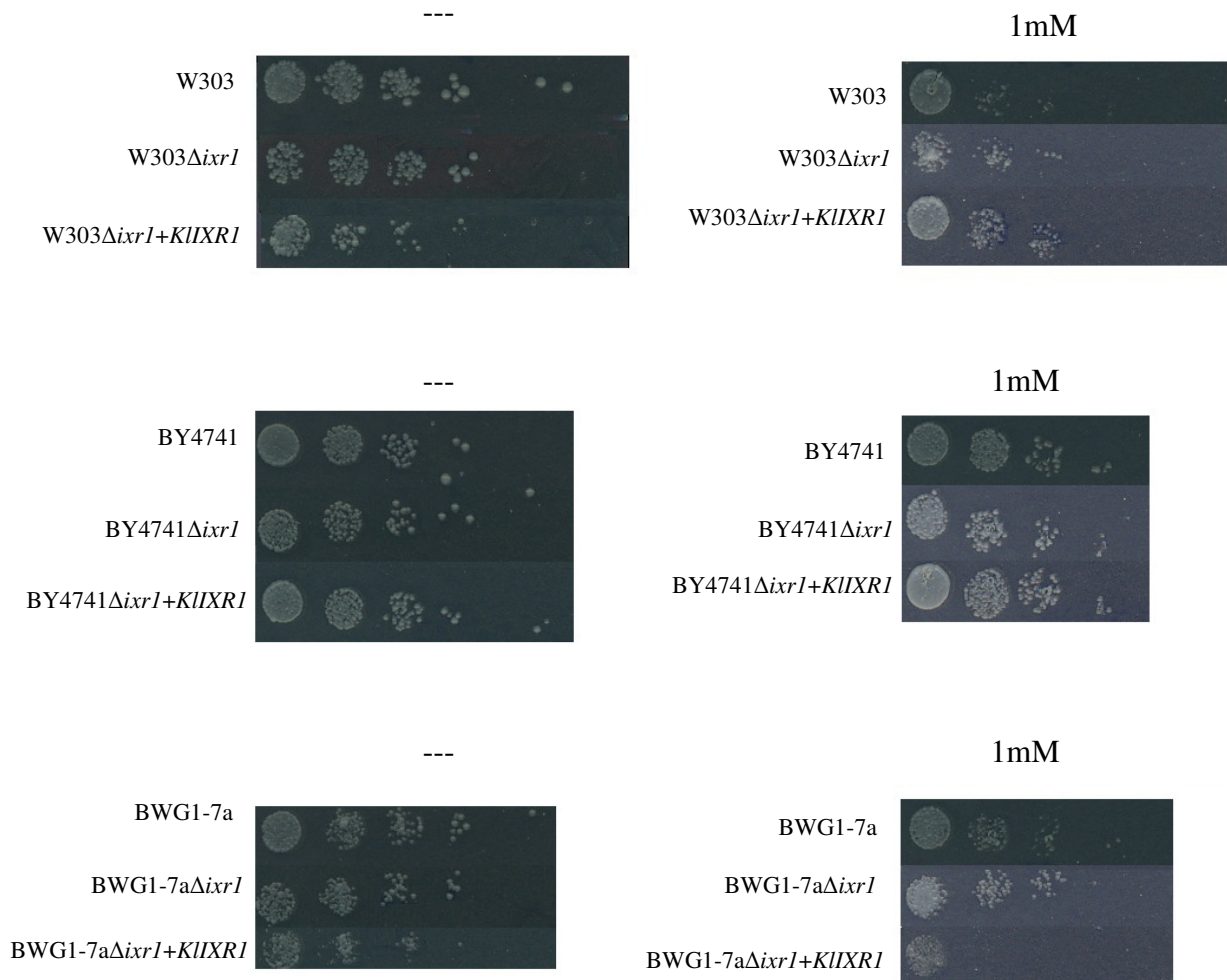
**Figura 6:** Imagen del gel de agarosa de las digestiones y de los productos de PCR realizadas con los candidatos 22, 24 y 25. La banda específica se muestra en la colonia 24 (flecha amarilla). 1: Digestión con *SalI* y *NotI*(bandas de 5.229 pb y 2.730 pb), 2: PCR con ECV719 y ECV720 (banda de 2.724 pb).

#### 4.3. COMPLEMENTACIÓN DE LOS FENOTIPOS DEL NULO $\Delta ixr1$ DE *S.cerevisiae*

Se transformaron distintas cepas de *S. cerevisiae* (W303, BWG1-7a y BY4741) y sus correspondientes derivados  $\Delta ixr1$  previamente obtenidos en el laboratorio (Rodríguez Lombardero *et al.*, 2012) con el vector Yeplac195 original y con el vector recombinante que contiene el clon de *KIIXR1*.

##### 4.3.1. Complementación de la sensibilidad a agua oxigenada

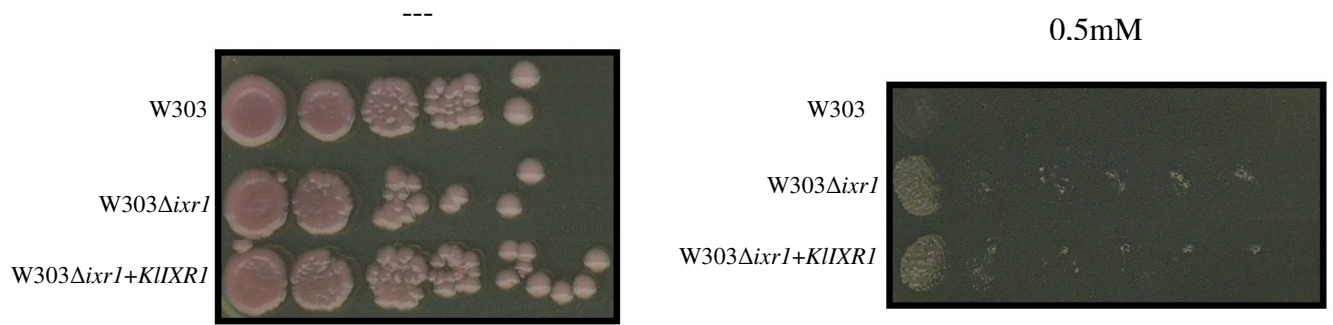
En el caso de los ensayos de complementación del vector en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a  $H_2O_2$  (Figura 7), a concentraciones elevadas (1mM) se observa que las cepas  $\Delta ixr1$  son ligeramente sensibles al tratamiento, tal y como se ha publicado anteriormente (Castro-Prego *et al.*, 2010a). Además, en la cepa  $\Delta ixr1$  transformada con el vector que incluye el gen *KIIXR1*, el gen de *K. lactis* parece complementar la función del gen *IXR1* de *S. cerevisiae*, indicando la posible función de *KIIXR1* en la respuesta a condiciones de estrés oxidativo. De todas formas las diferencias entre el crecimiento de las distintas cepas no es muy notable por lo que sería interesante en futuros experimentos medir la respuesta a estrés oxidativo por otros métodos más sensibles o, en el caso de la cepa BY4741 que es la más resistente, repetir estas medidas con mayor concentración de  $H_2O_2$ .



**Figura 7: Resultados del ensayo en placas en ausencia y en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1mM) con cepas W303, BY4741 y BWG1-7a de *S. cerevisiae*.**

#### 4.3.2. Complementación de la sensibilidad cisplatino

En el caso de las placas enriquecidas con cisplatino (Figura 8), se observa que el crecimiento de las levaduras es similar en las cepas  $\Delta$ *ixr1* de *S. cerevisiae* y en las mismas cepas transformadas con el gen *KlIXR1*. Por lo tanto se puede decir que *KlIXR1* no complementa en este caso la función que ejerce *IXR1* en la resistencia al cisplatino en *S. cerevisiae*.

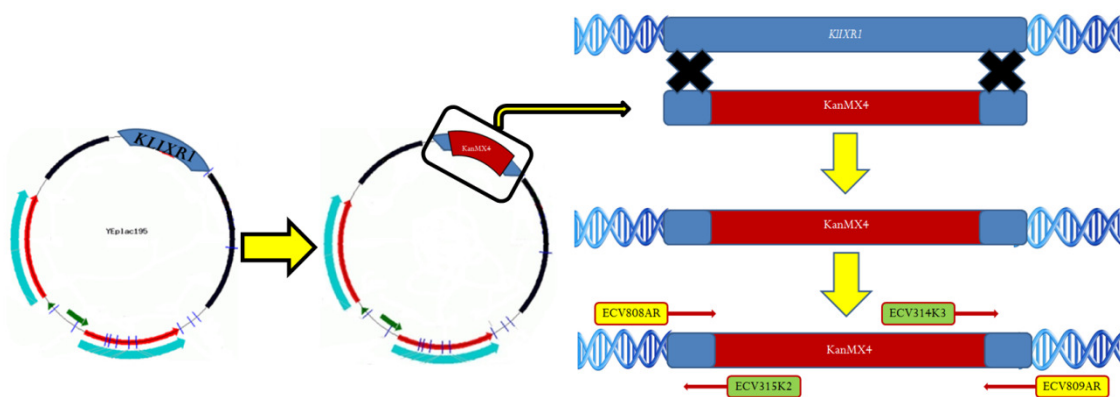


**Figura 8: Resultados del ensayo en placas con cisplatino a una concentración de 0,5 mM con cepas W303 de *S. cerevisiae*.**

Los resultados no son los esperados desde el punto de vista de la hipótesis que relaciona la unión de los dominios HMG al DNA platinado con el aumento de la sensibilidad de las células al cisplatino (Huang *et al.*, 2005), ya que los dominios HMG se encuentran conservados en la proteína de *K. lactis*, y sugieren que otros dominios menos conservados juegan un papel importante en esta respuesta.

#### 4.4. OBTENCIÓN DE UN NULO $\Delta ixr1$ DE *K. lactis*

El procedimiento utilizado aparece resumido en la figura 9.

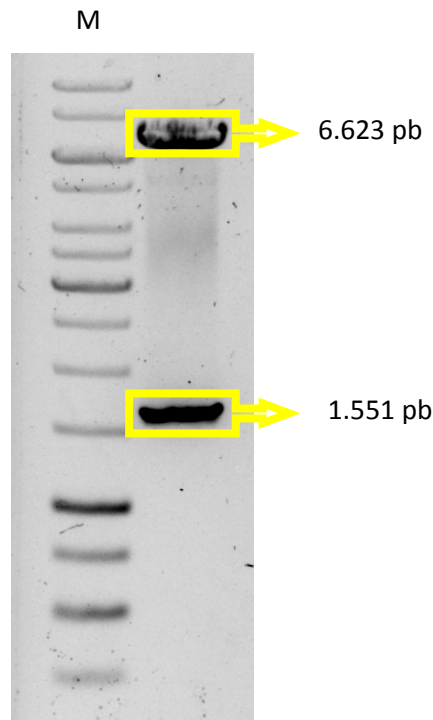


**Figura 9: Esquema de los pasos seguidos para la elaboración de la cepa defectiva en el gen *KlIXR1*.**

En primer lugar se realizó una PCR inversa para amplificar la construcción con el gen *KIIXRI* obtenida en la primera parte del proyecto (4.2.) y diseñando los cebadores de modo que amplifiquen desde los dos extremos del gen pero en orientaciones divergentes. De esta forma se podrá producir recombinación homóloga con el DNA genómico de la levadura, y anulación del gen. En la reacción se usaron los oligonucleótidos ECV 763 y ECV 764 (Tabla 1), que incluyen la diana de restricción *NotI*. Se usó la enzima *DreamTaq polimerase*, la temperatura de hibridación fue de 58°C, y el tiempo de extensión por ciclo de PCR, 7 minutos (6.623 pb).

Por otra parte, se aisló DNA del plásmido pFA6a-kanMX4 que contiene una construcción que incluye el gen de resistencia a geneticina *KanMX4*. Se digirió tanto el producto de PCR como el plásmido con la enzima de restricción *NotI*. En el caso del producto de PCR, se limpió el digerido de restos de enzima. En el caso del plásmido, se separaron los dos fragmentos obtenidos en un gel de agarosa, rescatándose el de menor tamaño (1.551 pb), que es el que contenía el gen de resistencia a geneticina.

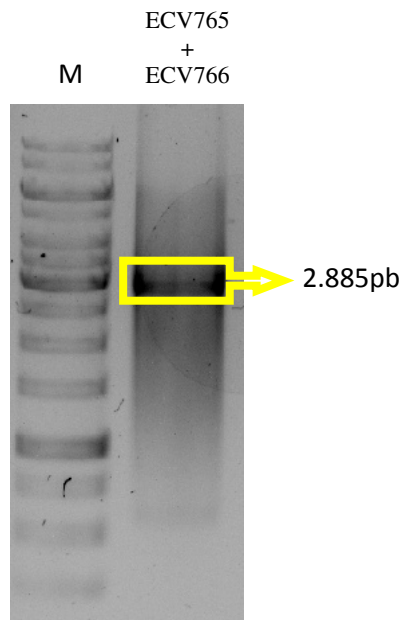
Posteriormente se ligaron ambos productos, transformándose más tarde cepas de *E. coli* *XLI-Blue*, y haciéndolas crecer en medio LB enriquecido con kanamicina. Se extrajo el DNA plasmídico de las células transformadas, para más tarde digerirlo con *NotI*, y poder verificar las construcciones mediante electroforesis en un gel de agarosa. La figura 10 muestra la identificación del producto de la digestión con la enzima *NotI* de la construcción con el gen *KIIXRI* sustituido por un gen de resistencia al antibiótico kanamicina (y que confiere resistencia a geneticina en levaduras). La banda de mayor tamaño (6.623 pb) corresponde al vector Yeplac195 linearizado y sin inserto. La banda menor (1.551 pb) corresponde al inserto con el gen de resistencia a kanamicina, y los fragmentos del promotor y del terminador de *KIIXRI* necesarios para que tenga lugar posteriormente la recombinación homóloga en las levaduras.



**Figura 10:** Imagen del gel de agarosa realizado con el producto de la digestión con *NotI* de la construcción candidata. La banda superior (6.623pb) corresponde al vector linearizado, mientras que la inferior (1.551pb) corresponde al inserto necesario para que tenga lugar posteriormente la recombinación homóloga en cepas de levadura.

Una vez obtenida y comprobada la construcción deseada, se procedió a transformar una cepa de *K. lactis* (MW190-9B) con este DNA. Para ello en primer lugar se realizó una PCR para amplificar el cassette de recombinación. Se usaron los cebadores ECV 765 y ECV 766 (Tabla 1). La temperatura de hibridación fue de 54 °C y el tiempo de extensión por ciclo fue de 3 minutos, obteniéndose un producto de PCR de 2.885 pb. La imagen de la figura 11 corresponde a un gel de agarosa mostrando el producto de PCR amplificado con los cebadores ECV 765 y ECV 766, que permiten amplificar el cassette que se utiliza para transformar las cepas de levadura, y que recombina de forma homóloga con la región que se desea anular.

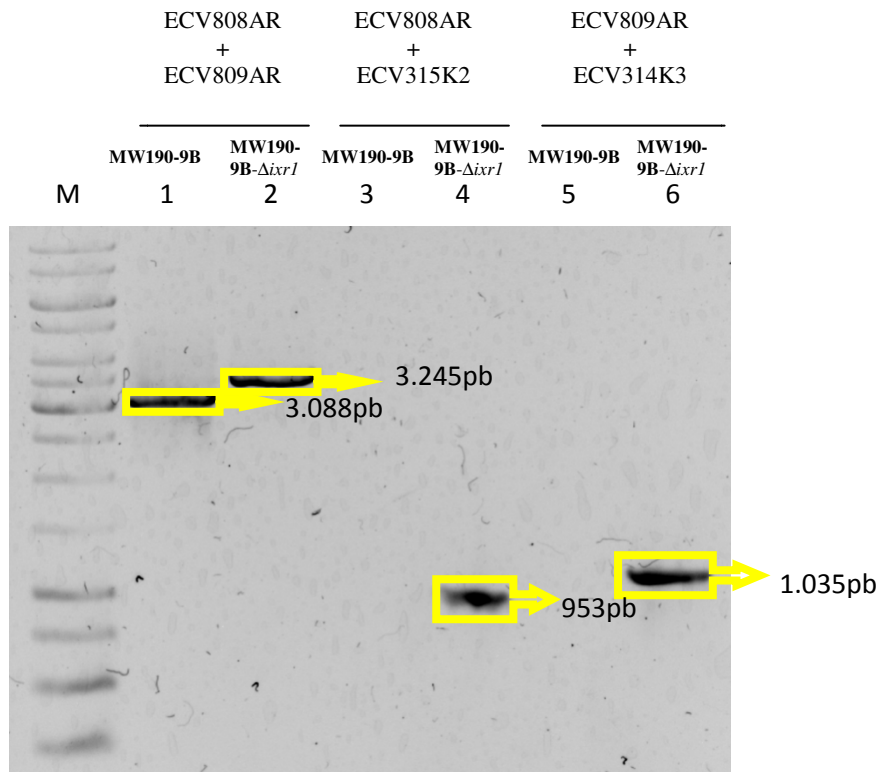




**Figura 11: Imagen del gel de agarosa del producto de PCR (ECV765 y ECV766) que se utiliza como cassette de recombinación para la anulación del gen *KIIXRI*.**

A continuación se transformaron con el DNA obtenido en la PCR del cassette de anulación, cepas MW190-9B de *K. lactis*, dejando crecer las levaduras en placas de YPD-geneticina. Después de 48 horas de crecimiento a 30°C, se aislaron las colonias candidatas. Posteriormente se aisló el DNA genómico, realizando a continuación una PCR de comprobación. Se usaron como cebadores dos externos al cassette (ECV808AR y ECV809AR), y dos que anillan en el cassette de kanamicina (ECV315K2 y ECV314K3) (secuencia de oligonucleótidos disponibles en Tabla 1).

La figura 12 muestra una imagen del gel de agarosa con productos de distintas PCRs realizadas sobre DNA genómico de cepas *K. lactis* MW190-9B silvestres, y con el gen *KIIXRI* anulado por recombinación homóloga. Los carriles 1 y 2 corresponden a productos de PCRs con dos cebadores externos (ECV808AR y ECV809AR) a la región en la que tiene lugar la anulación del gen. Se observa una diferencia de tamaño entre la cepa silvestre y la anulada de acuerdo con el diseño esperado. Los siguientes carriles corresponden a productos de PCRs realizadas con combinaciones de cebadores externos a la región de anulación (ECV808AR y ECV809AR) e internos al gen de resistencia a kanamicina (ECV315K2 y ECV 314K3) Se observa que en el caso de las cepas silvestres no tiene lugar la amplificación por no contener el gen de resistencia a kanamicina, mientras que en la cepa mutante se obtienen los tamaños de amplicones esperados.



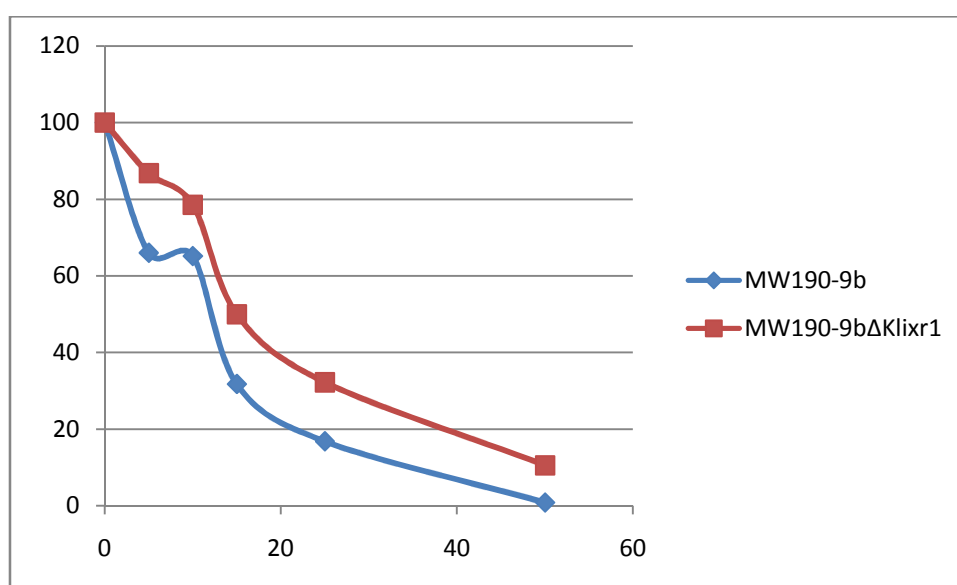
**Figura 12: Imagen del gel de agarosa con productos de distintas PCRs realizadas sobre DNA genómico de cepas de *K. lactis* MW190-9B silvestres y con el gen *KIIXR1* anulado por la inserción del cassette con el gen de resistencia a kanamicina. M: marcador de pesos moleculares; 1, 3, y 5: Productos de PCRs realizadas sobre DNA genómico de la cepa silvestre; 2, 4 y 6: Productos de PCRs realizadas sobre DNA genómico de la cepa MW190-9B- $\Delta$ *ixr1***

La consecución de la cepa MW190-9B con el gen *KIIXR1* anulado fue el primer y fundamental paso para poder llevar a cabo análisis funcionales del papel de este gen en *K. lactis*.

## 4.5. FENOTIPOS ASOCIADOS A LA ANULACIÓN DE $\Delta ixr1$ EN *K. lactis*

### 4.5.1. Sensibilidad a cisplatino

Los ensayos realizados de recuento de colonias dieron como resultado que en las cepas  $\Delta Klir1$  se da un mayor porcentaje de colonias viables respecto al control, en comparación con el registrado en las cepas silvestres (MW190-9B) (figura 13). Este fenómeno es similar al observado en *S. cerevisiae* con el gen *IXR1*, y sugiere que en *K. lactis* *Klir1* puede tener también un papel en la respuesta al cisplatino, aportando cierta sensibilidad a este citostático (Brown *et al.*, 1993).



**Figura 13:** Gráfica de la viabilidad de colonias tratadas con concentraciones crecientes de cisplatino. El eje de abscisas se refiere a la concentración de cisplatino ( $\mu\text{M}$ ), y el eje de ordenadas corresponde al porcentaje de colonias supervivientes respecto a la placa control.

También se llevaron a cabo ensayos en placa comparando el crecimiento de MW190-9B y de MW190-9B- $\Delta ixr1$ , haciendo crecer las colonias en medio suplementado con cisplatino. Sorprendentemente, los resultados (figura 14) no coinciden con los mostrados en la figura 13. De todas formas, esta aparente contradicción puede ser debida a un sesgo producido por las diferencias existentes en el crecimiento entre las cepas incluso en ausencia de cisplatino y que se comenta más detalladamente en el apartado 4.5.2.

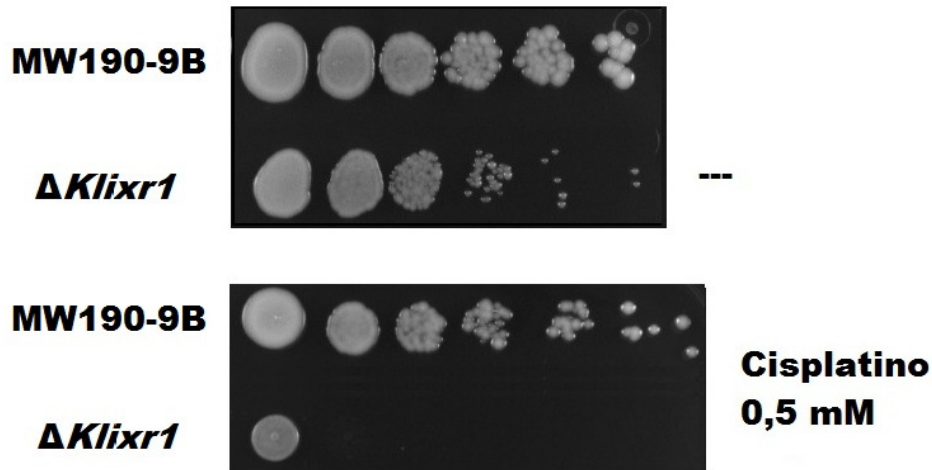
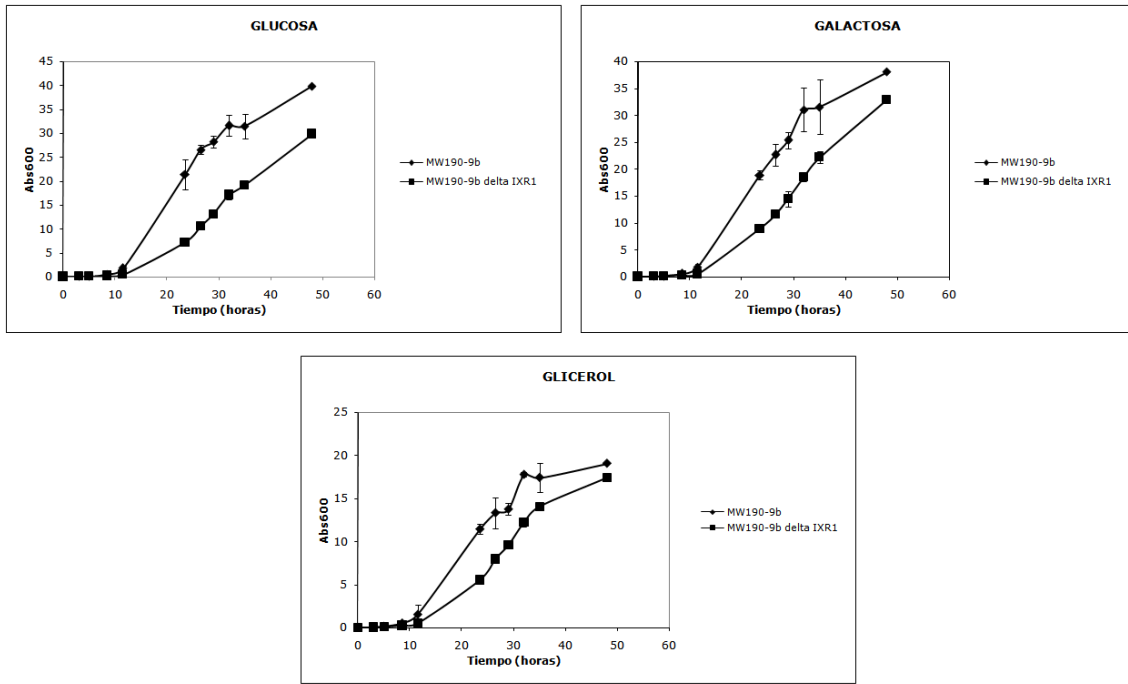


Figura 14: Resultados del ensayo en placas con cisplatino (0,5mM) en el que se compara el crecimiento de la cepa MW190-9B de *K. lactis* y la cepa con el gen *KLIXR1* anulado.

#### 4.5.2. Efectos en el crecimiento

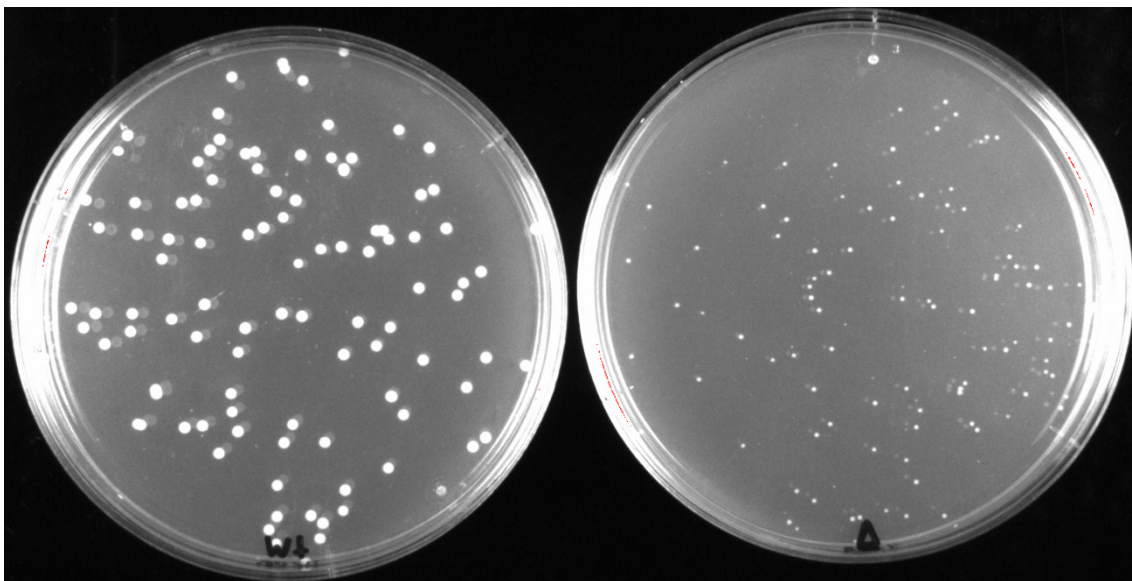
Se realizaron curvas de crecimiento para comprobar si se evidenciaban diferencias entre la cepa silvestre (MW190-9B) y  $\Delta Klixr1$ . Para ello se prepararon cultivos de YP enriquecidos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, galactosa y glicerol, todos ellos a una concentración del 2 %). Se realizaron 3 réplicas de 50 mL por cada fuente de carbono y cepa. Las medidas de crecimiento se realizaron durante 48 horas, midiendo la  $DO_{600}$  cada 2-3 horas.

Las gráficas (figura 15) muestran que existen diferencias en el crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa con el gen anulado en los medios con las distintas fuentes de carbono ensayadas. Se observa un menor crecimiento en la cepa con el gen anulado.



**Figura 15:** Curvas de crecimiento de cepas MW190-9B y  $\Delta Klixr1$  en medios suplementados con diferentes fuentes de carbono (glucosa, galactosa y glicerol).

También se observó que al crecer las levaduras en placas de cultivo, tanto en fuentes de carbono fermentables como no fermentables, las colonias de la cepa silvestre mostraban un tamaño considerablemente mayor que las de la cepa  $\Delta Klixr1$  (figura 16).



**Figura 16:** Colonias de la cepa silvestre (MW190-9B) (izquierda de la imagen) y  $\Delta Klixr1$  (derecha de la imagen) crecidas en placas de cultivo con medio YP suplementado con glicerol, tras 48 horas de crecimiento a 30 °C.

Los resultados sugieren que la delección de *KlIXR1* afecta a la capacidad de crecimiento de *K. lactis*, por lo que este gen podría estar implicado en el control del metabolismo respiratorio. Esto demuestra el interés en conocer el funcionamiento y regulación de este gen, de cara a futuras aplicaciones biotecnológicas

#### 4.5.3. Sensibilidad a agua oxigenada

Los ensayos realizados comparando la sensibilidad de las cepas de *K. lactis* MW190-9B ante la presencia de  $H_2O_2$ , dan como resultado una aparente sensibilidad aumentada cuando se produce la anulación del gen *KlIXR1* (figura 17). Esto coincide con el fenotipo observado en cepas de *S. cerevisiae* con *IXR1* anulado (Castro-Prego *et al.*, 2010a), y apoya el posible papel de *KlIXR1* en potenciar la respuesta ante el estrés oxidativo, estando este mecanismo conservado aparentemente en levaduras.

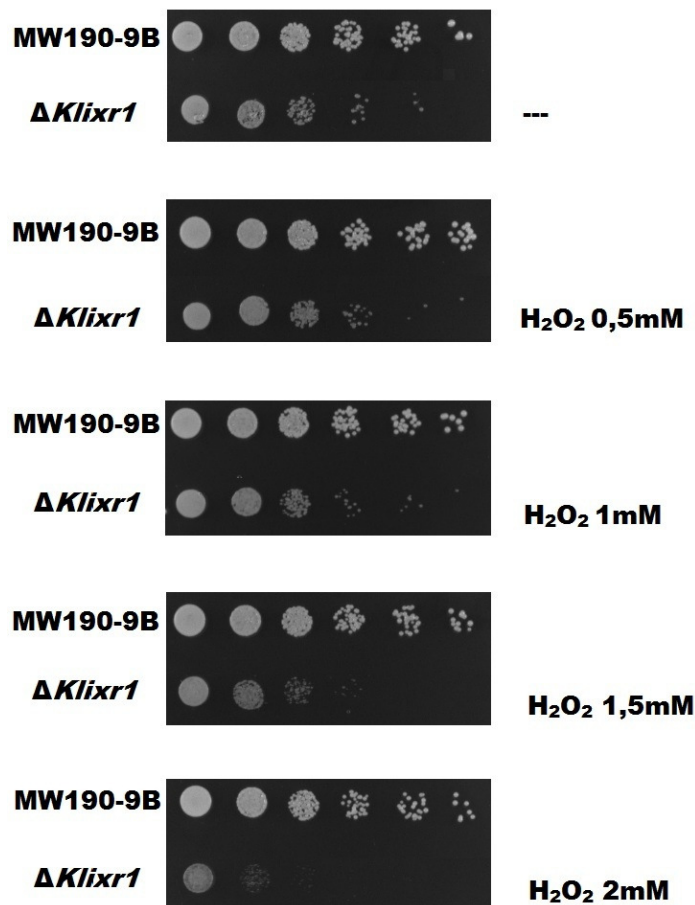


Figura 17: Resultados del ensayo en placas a distintas concentraciones de  $H_2O_2$  (0mM, 0,5mM, 1mM, 1,5mM y 2mM) en el que se compara el crecimiento de la cepa MW190-9B de *K. lactis* y la cepa con el gen *KlIXR1* anulado.

#### 4.5.4. Sensibilidad a Metales

En el caso de los ensayos en placa realizados para comprobar la sensibilidad de la cepa MW190-9B- $\Delta$ *Klixr1* comparada con la cepa silvestre ante la presencia de cadmio, se observa una sensibilidad aumentada en la cepa deficiente de *KIIXR1* (figura 18).

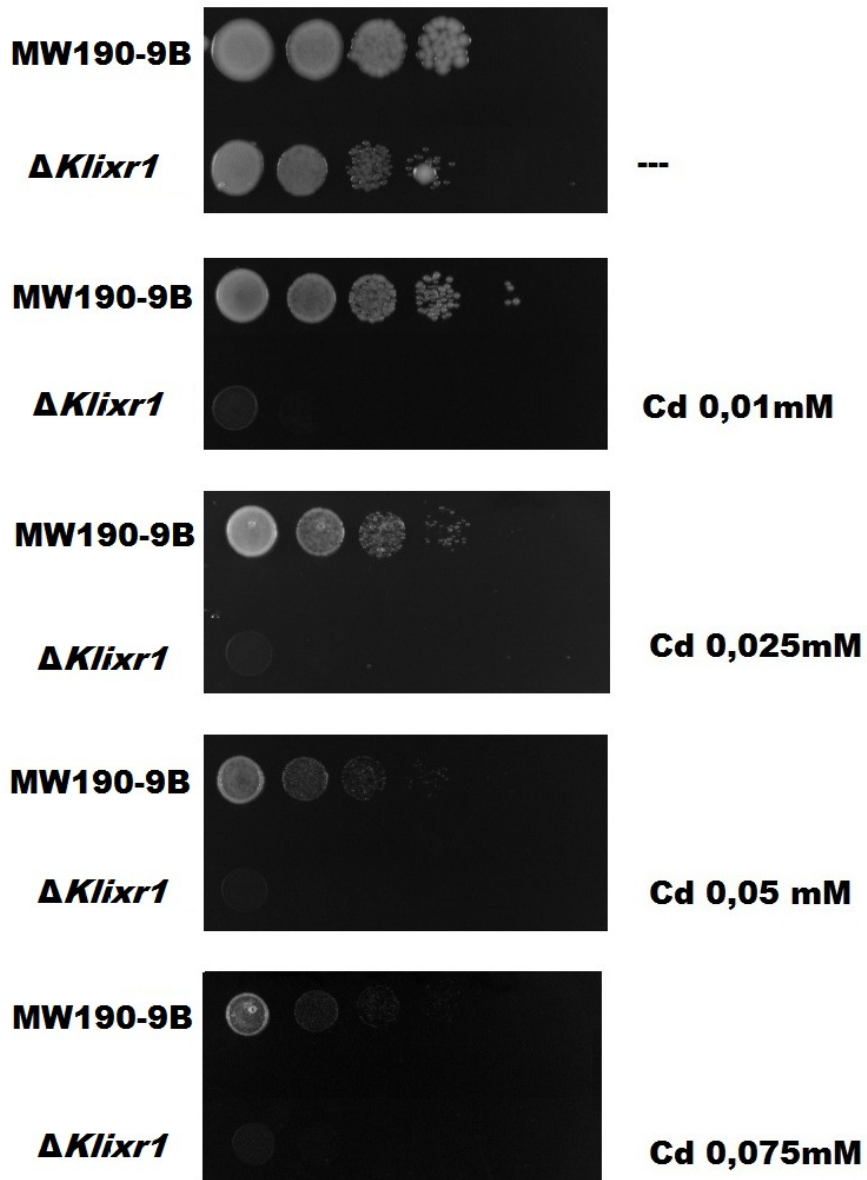


Figura 18: Resultados del ensayo en placas a distintas concentraciones de Cadmio (0mM, 0,01mM, 0,025mM, 0,05mM y 0,075mM) en el que se compara el crecimiento de la cepa MW190-9B de *K. lactis* y la cepa con el gen *KIIXR1* anulado.

#### 4.5.5. Efectos sobre la expresión de *KIHEM13* en normoxia e hipoxia

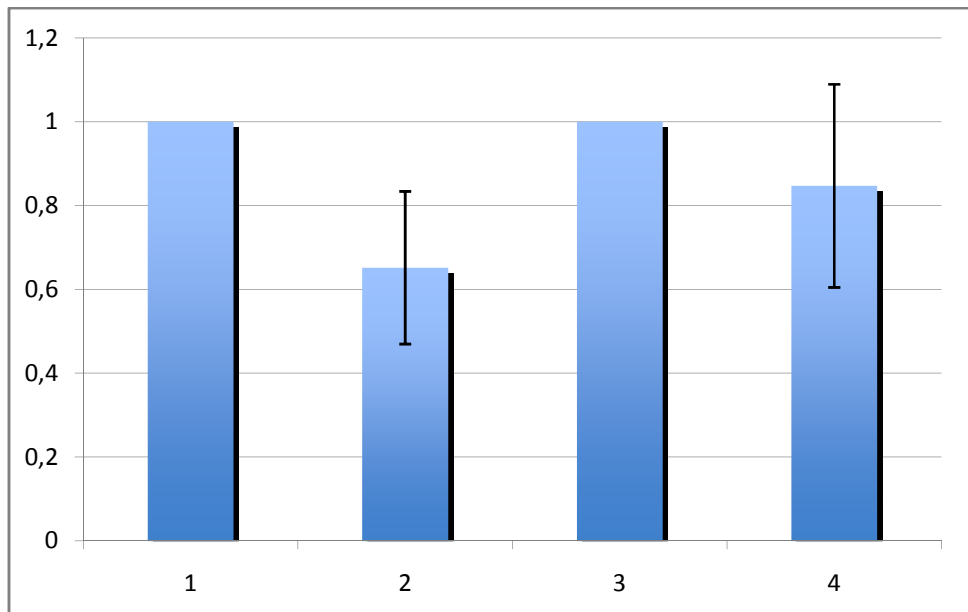
El gen *HEM13* de *S. cerevisiae* se encuentra regulado positivamente en hipoxia por Ixr1p (Castro-Prego *et al.*, 2010b). Este gen codifica para la enzima coproporfirinógeno oxidasa que participa en la biosíntesis del grupo hemo. El homólogo de *HEM13* en *K. lactis*, *KIHEM13* se encuentra bastante conservado evolutivamente, complementando la función de *HEM13* en cepas deficientes en este gen en *S. cerevisiae* (Blanco *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la proteína codificada por estos genes lleva a cabo un paso clave en la biosíntesis de hemo, el cual tiene un papel importante como regulador de factores respiratorios, sería de gran interés comprobar si la regulación de Ixr1p sobre *HEM13* también se produce en *K. lactis*. En este caso, se comprobó mediante ensayos de PCR cuantitativa si los niveles de expresión de *KIHEM13* variaban en respuesta a la ausencia de *KIIXR1* en las cepas con el gen anulado. Así mismo, los ensayos se realizaron tanto en normoxia como en hipoxia.

Para llevar a cabo los análisis de expresión, en primer lugar se prepararon cultivos de 10 mL de YPD en matraz de las cepas MW190-9B y MW190-9B- $\Delta$ *Ixr1*. Los cultivos se hicieron crecer en condiciones de normoxia y de hipoxia. Se realizaron tres réplicas biológicas de cada cepa en cada una de las condiciones de cultivo. Después de parar el crecimiento por enfriamiento en hielo cuando la OD<sub>600</sub> se encontraba en torno a 0,8, se centrifugaron 3 mL de cada cultivo a 13.000 r.p.m. a 4 °C, resuspendiendo el precipitado en un tampón con Sorbitol a una concentración 1M y con EDTA a 10 mM. Seguidamente se realizó la extracción de RNA. Después de cuantificar las muestras, se diluyeron hasta alcanzar una concentración de RNA de 100 ng/μL.

En los ensayos de PCR cuantitativa se usó como gen control o *housekeeping* la ORF KLLA0D17204g de *K. lactis*, posible homólogo al gen *TAF10* (subunidad del complejo TFIID y SAGA implicado en la iniciación de la transcripción de la DNA polimerasa II). El gen control se amplificó con los oligonucleótidos AVV83q y AVV84q, mientras que *KIHEM13* se amplificó con AVV85q y AVV86q (Tabla 1).

El análisis estadístico de los datos apoya una regulación positiva de *KIIXR1p* sobre *KIHEM13*, ya que las cepas  $\Delta$ *KIIXR1* muestran menor expresión de *KIHEM13* con respecto a los niveles de la cepa silvestre (figura 19). A pesar de que estas diferencias se manifiestan tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hipoxia (p-valor<0,01), son más significativas cuando el crecimiento es en normoxia (p-valor<0,001).





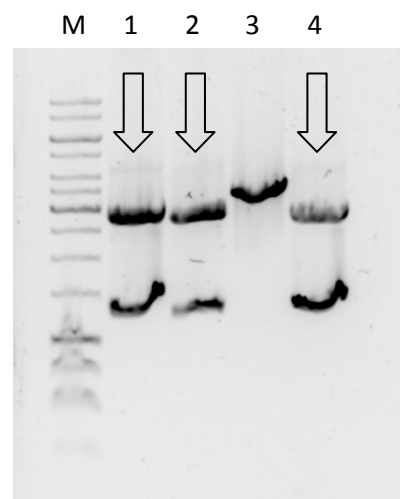
**Figura 19:** Gráfica de la expresión de *KIHEM13* en cepas de *K. lactis* silvestres (MW190-9B) y  $\Delta ixr1$  crecidas en condiciones de normoxia e hipoxia. 1: MW190-9B en condiciones de normoxia; 2:  $\Delta ixr1$  en condiciones de normoxia; 3: MW190-9B en condiciones de hipoxia; 4:  $\Delta ixr1$  en condiciones de hipoxia; 2 se encuentra normalizado respecto a 1, y 4 se encuentra normalizado respecto a 3.

Los resultados apoyan un efecto de activación de *KIIXR1p* sobre el gen *KIHEM13*, tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hipoxia. Esto coincide con lo observado en los homólogos de estos genes en *S. cerevisiae* en hipoxia (Castro-Prego *et al.*, 2010b). Sin embargo, en el caso de *K. lactis* también se observa un efecto en normoxia, que además es más pronunciado que el observado en hipoxia.

#### 4.6. OBTENCIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN PARA LA PURIFICACIÓN DE *KIIXR1p*

Para expresar *KIIXR1p*, se clonó la ORF del gen *KIIXR1* en el vector de expresión pOPTH. Este vector se caracteriza por incluir en la región amino-terminal del inserto clonado una cola de histidinas que facilita la purificación de la proteína. Para la amplificación del inserto se diseñaron oligonucleótidos con dianas de restricción *VspI* y *HindIII* compatibles con los extremos que quedan en el vector después de digerirlo con las endonucleasas *NdeI* y *HindIII*. La PCR se realizó usando como DNA molde la construcción en YepLac195 obtenida en el apartado 4.2. La temperatura de hibridación se ajustó a 57°C. Los oligonucleótidos usados fueron AVV21 y AVV22 (Tabla 1).

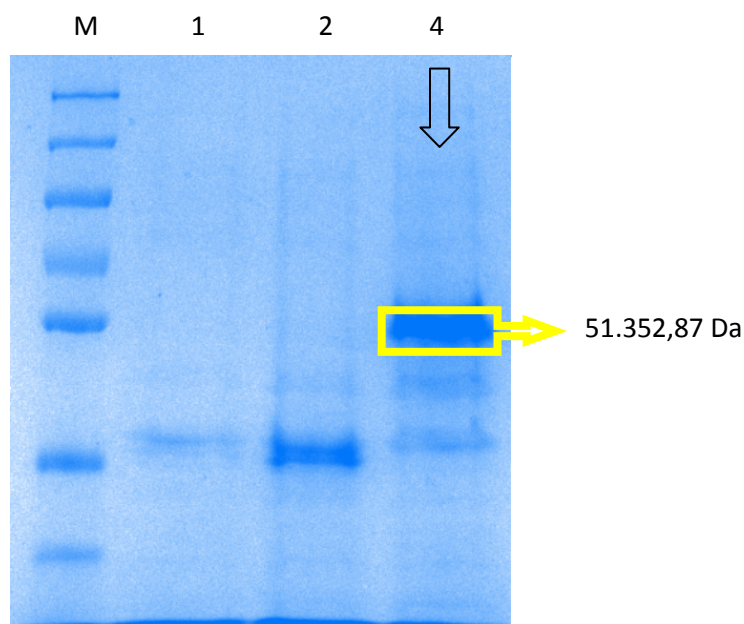
Después de digerir el vector con las enzimas correspondientes y rescatar de un gel de agarosa el fragmento de 2.743 pb, se realizó el ligamiento con el producto de PCR digerido con *VspI* y *HindIII*. Con el producto del ligamiento se transformaron cepas bacterianas competentes *XLI-Blue*, haciéndolas crecer en placas LBA. Después de aislar el DNA plasmídico de los candidatos, se comprobó que el inserto con la ORF de *KIIXRI* se había integrado en el plásmido correctamente. La Figura 20 muestra el gel de agarosa de la digestión con las enzimas *NdeI* y *HindIII*, de varios plásmidos aislados de colonias candidatas a contener la construcción deseada (pOPHTH-*KIIXRI*). Como se puede observar, en tres de los cuatro candidatos se obtienen los fragmentos de DNA del tamaño esperado (en este caso, de 2.743 y 1.272 pb).



**Figura 20:** Imagen del gel de agarosa realizado con el producto de la digestión con *NdeI* y *HindIII* de la construcción candidatas. La banda superior (2743pb) corresponde al vector linealizado, mientras que la inferior (1272pb) corresponde al inserto que incluye la ORF de *KIIXRI* fusionada a una cola de histidinas. Las flechas indican los candidatos seleccionados.

Con DNA plasmídico de las construcciones positivas se transformaron cepas bacterianas *BL21-DE3* con alta capacidad de inducción. Las células transformadas se cultivaron en LBA hasta una  $OD_{600}=1$ , siendo posteriormente inducidas con 0,1 mM de IPTG (*isoproyl- $\beta$ -D-thiogalactopyrnoside* de Fermentas<sup>®</sup>). Tras 3 horas de incubación, se aisló el extracto proteico de cada candidato para comprobar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) la correcta expresión de la proteína de interés. El tamaño de la banda fue el esperado según la secuencia de aminoácidos de la ORF (51352,87 Da). Como se puede ver en la figura 21, la inducción de la expresión se

produjo tan sólo en una de ellas. La secuenciación posterior confirmó la correcta clonación del gen sin ninguna mutación indeseada.



**Figura 21:** Imagen del gel SDS-PAGE, que muestra la expresión proteica de cada una de las cepas candidatas. El candidato indicado por la flecha muestra una expresión elevada de una proteína al nivel de la masa molecular teórica de *KIxr1p* (51.352,87 Da).

#### 4.7. INTERACCION DE *KIxr1p* con el promotor de *KIHEM13*

Para comprobar si se producía interacción entre *KIxr1p* y el promotor de *KIHEM13* se realizó un ensayo EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*), una técnica que comprueba la capacidad de unión entre DNA y proteínas *in vitro*. Como *KIxr1p* fue expresado en el vector pOPTH, que añade al inserto clonado una cola de histidinas amino-terminal, se purificó la proteína utilizando columnas cromatográficas con cationes  $\text{Ni}^{2+}$  acomplejados, los cuales tienen afinidad por las histidinas.

Después de purificar la proteína se realizó el EMSA. Para comprobar la interacción de secuencias de DNA específicas del promotor del gen *KIHEM13* con la proteína *KIxr1p*, se diseñaron los cebadores AVV87 y AVV88 a partir dicha secuencia (secuencia de oligonucleótidos disponible en Tabla 1). Se seleccionó para el diseño (figura 22) una zona del promotor de *KIHEM13* (abarca desde el nucleótido -388 a -358 con respecto al inicio de la ORF) que incluía una secuencia similar a la consenso identificada en *HEM13* para la unión de *Ixr1p* en *S. cerevisie* (Castro-Prego *et al.*, 2010b).

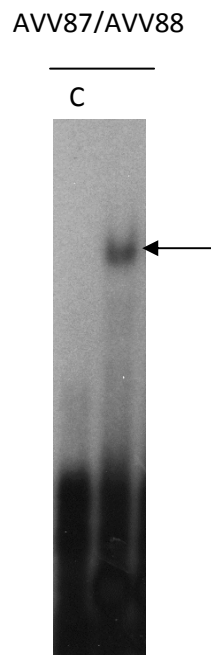
```

CTTCAGCTTGAAATAAGTTATCACTGAAAAACAAAGCCAGTAGAAAACATGAGCACAGTG
TATTCTTTGACTCTCACGGCTACATTACAAGAAATGTATCTAACTGTATGGAGCTAATAC
TATTTGATACCATACTACCAAGGTTTCATGTTAACAAGCTAGTAGGTCTATTGTTTTCTAA
TTGTTTCTGTGTATATTGTATTCCAATCGGCACCTTACGTGGCATAACACGGAAAGAAAACC
AGGAAGACCCCTTTTTCTCATAGAAAAGTCATGAGAATCATAAACTGAAAAGAGGAACGA
TAGGGATTCGAACCCTCGGCTTGTACTGCTCACCTGTCAACACGTGATCCCGACTTTTTAT
AAAAAAGCAAAAAGCGGCTACTACTCATTCTCGAAACTTTTCAGTTTGCATGAACCCT
CGAACCCTCGGCTCGGTTACCACAAACACATCACCTAATATGCATTAGCCTAAGCTGACA
TAATCAAAATTTTCGTATCCTAGCTGTCAATTCATCGTAACTGCCAACCTCGTATTGATAAT
AGGCACGGTACTCCGAGCATATCACTCGATAGCCTTTTTCTTGACCCAATTTTACTCGCTC
CATCAATGTCGTATCTTGAATGTATGTTGGTTCAGCCTCTATTTCTCTCGTAGATAGTAG
TATGTTCGAATGGTTCCACTTGACCTTTTTTTTTTCAGTATATACGGTTTAAACACTAAACG
AATGCTGACGCCTATGTCTCCGTTTCAGACCATAATAATGATACAGTAGTGTATTATATT
CATCTTGTGGTGCTCGGACTGCCACTATTGTGATGAGATTCTTGTATCTCGTATCTTTTC
CTCTTCTGTATGCGGTGAAAAGTAGCTAGCCTTTTTTTCTTCAATTACCTTTATCCAAAT
TATCACCAGGTCTGAATCTTGAAGTCTGCTTGGTTTTTTGGATTTTTTTTTTTTGGACTATA
TTAACGAAAGTGAATTATCCATTTCAGCTACCAACTGAAATGA

```

**Figura 22: Secuencia nucleotídica de la región *upstream* de la ORF de *KIHEM13*. El triplete con fondo verde indica el codón de inicio de la ORF. La secuencia con fondo azul indica la región homóloga a la secuencia consenso de unión a *Ixr1p*, definida en el promotor de *HEM13* de *S. cerevisiae*.**

Los resultados (figura 23) indican que se produce unión entre *KIxr1p* y la secuencia promotora de *KIHEM13*, lo que concuerda con la existencia de una función reguladora entre *KIxr1p* sobre el promotor de *KIHEM13*, tal y como se observó en los estudios de los niveles de expresión génica de *KIHEM13* incluidos en el apartado 4.5.5.



**Figura 23: Ensayo EMSA realizado sobre *KIxr1p*, usando sondas marcadas radioactivamente con las secuencias seleccionadas del promotor de *KIHEM13*. C: control sin proteína.**

## **5. CONCLUSIONES**

1. Se ha clonado satisfactoriamente el gen *KIIXR1* en un vector lanzadera, y se han realizado ensayos de complementación sobre cepas de *S. cerevisiae* con *IXR1* anulado. Se ha visto en ensayos en placas suplementadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que *KIIXR1* complementa la función de resistencia ante estrés oxidativo observada anteriormente en *IXR1*. En el caso de los ensayos realizados con placas suplementadas con cisplatino, no se complementan las funciones observadas para *IXR1* en *S. cerevisiae*.
2. Se ha obtenido una cepa de *K. lactis* MW190-9B con *KIIXR1* anulado. Con ella se han realizado ensayos funcionales en los que se apoya el posible papel de *KIIXR1* en la respuesta ante el estrés oxidativo, en la sensibilidad al cisplatino y en la resistencia al cadmio en *K. lactis*. Por otra parte, se ha comprobado que la anulación de *KIIXR1* reduce el crecimiento de la levadura y el tamaño de sus colonias, sugiriendo una función importante del gen en el metabolismo respiratorio. Además, los análisis de expresión realizados apoyan la existencia de una regulación positiva de *KIIXr1p* sobre *KIHEM13*, tanto en normoxia como en hipoxia, aunque más acentuada en normoxia.
3. Se ha clonado la ORF de *KIIXR1* en un vector de expresión, expresando de forma exitosa *KIIXr1p* en cepas bacterianas BL21(DE3). Se ha purificado parcialmente *KIIXr1p* mediante cromatografía de afinidad con el fin de realizar un ensayo EMSA entre la proteína y el promotor de *KIHEM13*. El ensayo realizado confirma una interacción *in vitro* entre *KIIXr1p* y el promotor de *KIHEM13*.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ausubel, F. M. (2002). Current protocols in molecular biology (Vol. 2). *Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience*.
- Blanco, M., Becerra, M., González-Siso, M.I., Cerdán, M. E. (2005). Functional characterization of *KIHEM13*, a hypoxic gene of *Kluyveromyces lactis*. *Can. J. Microbiol.* 51: 241-59.
- Brennan, R. J., Schiestl, R. H. (1996). Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research* 356(2):171-8.
- Brown S.J., Kellett P.J., Lippard S.J. (1993). Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin. *Science*. 261(5121):603-5.
- Castro-Prego R., Lamas-Maceiras M., Soengas P., Carneiro I., González-Siso I., Cerdán, M.E. (2010a) Regulatory factors controlling transcription of *Saccharomyces cerevisiae IXRI* by oxygen levels: a model of transcriptional adaptation from aerobiosis to hypoxia implicating *ROX1* and *IXRI* cross-regulation. *Biochem J.* 14; 425(1):235-43.
- Castro-Prego R., Lamas-Maceiras M., Soengas P., Fernández-Leiro R., Carneiro I., Becerra M., González-Siso M.I., Cerdán M.E. (2010b) Ixr1p regulates oxygen-dependent *HEM13* transcription. *FEMS Yeast Res.* 10(3):309-21.
- Florea, A. M., Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3, 1351-1371.
- González-Siso, M. I., Freire-Picos, M. A., Ramil, E., González-Domínguez, M., Rodríguez Torres, A. M., Cerdán, M. E. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: insights and perspectives. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 699-705.
- González-Siso, M. I., Pereira Rodríguez, A., Fernández Leiro, R., Cerdán, M. E., Becerra, M. (2008). Advances in cheese whey utilization. Transworld Research Network. Capítulo 8 (p. 195-209).
- Huang, R.Y., Eddy, M, Vujcic, M, Kowalski, D. (2005). Genome-wide screen identifies genes whose inactivation confers resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* 65(13):5890-7.

- Jamieson E.R., Lippard S.J. (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* 99(9):2467-98.
- Köberle B., Tomicic M.T., Usanova S., Kaina B. (2010). Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Bba. Rev. Cancer.* 1806: 172-182.
- McA'Nulty M.M., Whitehead J.P., Lippard S.J.. (1996). Binding of Ixr1, a yeast HMG-domain protein, to cisplatin-DNA adducts in vitro and in vivo. *Biochemistry.* 35(19):6089-99.
- Nagatani G., Nomoto M., Takano H., Ise T., Kato K., Imamura T., Izumi H., Makishima K., Kohno K. (2001). Transcriptional Activation of the Human HMG1 Gene in Cisplatin-resistant Human Cancer Cells. *Cancer Res.* 61:1592–1597.
- Rodríguez Lombardero, S., Vizoso Vázquez, A., Rodríguez Belmonte, E., González Siso, M.I., Cerdán, M.E. (2012). SKY1 and IXR1 interactions, their effects on cisplatin and spermine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* (en prensa).
- Stewart, D.J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 63:12-31.
- Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R., Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793–1808
- Zamble D.B., Lippard S.J. (1995). Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem. Sci.* 20(10):435-9.
- Zitomer, R., Hall B. (1976). Yeast cytochrome c messenger RNA. In vitro translation and specific immunoprecipitation of the CYC1 gene product. *J. Biol. Chem.* 251(20): 6320-6.